TUĞÇE NUR GÜMÜŞ

← Adınızı soyadınızı giriniz

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

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

↓

YÜKSEK LİSANS TEZİ

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

İSTANBUL_2023

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

LET-7B-5P VE LET-7B-3P MİRNA'LARININ HL-60 VE NB4 AKUT MYELOİD LÖSEMİ HÜCRE HATLARINDA FONKSİYONEL ETKİLERİNİN VE HEDEF GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

TUĞÇE NUR GÜMÜŞ

DANIŞMAN
PROF.DR. ŞÜKRÜ ÖZTÜRK

İKİNCİ DANIŞMAN
DR. MURAT KAYA

GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI

İSTANBUL-2023

İTHAF

Bu tez projesini, beni ilk günden son güne kadar destekleyen ve yanımda olan değerli eşime ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim ve tez dönemim süresince çalışmalarıma yön veren, bilgi ve engin tecrübeleri ile gelişimime katkıda bulunan ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Şükrü ÖZTÜRK'e sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, sürece yön vermemi sağlayan, her zaman bir hocadan daha yakın hissettiren ve zorlu süreçlerde dahi güçlü ve dinamik kalmamı sağlayan ve yoluma ışık tutan çok sevdiğim ve saygı duyduğum sevgili hocalarım Öğr. Gör. Dr. İlknur SUER ve Dr. Murat Kaya'ya,

İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları A.D. Tıbbi Genetik Bilim Dalı bünyesindeki laboratuvarlarda yüksek lisans deney çalışmalarımızı yürütmemizde yardımlarını, tecrübelerini, güler yüzlerini ve en önemlisi dostluklarını esirgemeyen değerli çalışanlara,

Hayatımın tüm dönüm noktalarında, zorlandığım, kararsız kaldığım anlarda ve bu akademik yolculukta beni tüm gücüyle motive eden ve bu yolu yürümemi sağlayan değerli eşime,

Teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37218

İÇİNDEKİLER

BEYAN....2
İTHAF....3
TEŞEKKÜR....4
İÇİNDEKİLER....5
TABLOLAR LİSTESİ....8
ŞEKİLLER LİSTESİ....9
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ....11
ÖZET....14
ABSTRACT....15
1. GİRİŞ VE AMAÇ....16
2. GENEL BİLGİLER....19
2.1. LÖSEMİ....19
2.1.1. Tanım....19
2.1.2. Tarihçe....20
2.2. AKUT MİYELOİD LÖSEMİ....21
2.2.1. Epidemiyoloji....22
2.2.2. AML'de Sınıflandırma....23
2.2.3. Etiyoloji....29
2.2.4. Klinik Bulgular ve Teşhis....31
2.2.5. Prognoz....32
2.2.6. Tedavi....33
2.3. MİKRORNA (miRNA)....34
2.3.1. miRNA Biyogenezi....35
2.3.2. miRNA ve Kanser....36
2.3.3. miRNA ve AML....38
2.3.4. Let-7b-5p....40
2.3.5. Let-7b-3p....42
2.4. TEZDE ÇALIŞILAN LET-7B-5P VE LET-7B-3P 'NİN POTANSİYEL HEDEF GENLERİ....43

2.4.1. CDC25A 43
2.4.2 IL-8 46
2.4.3. CCND1 48
2.4.4. CREBZF 50
2.4.5. RORA 51
2.4.6. BRF2 52
2.4.7. SYF2 53
3. GEREÇ VE YÖNTEM 56
3.1. GEREÇ 56
3.1.1. HL-60 ve NB4 Hücre Hatlarının Temini 56
3.1.2. Kullanılan Gereç ve Cihazlar 56
3.2. YÖNTEM 59
3.2.1. Hücre Kültürü 59
3.2.2. Hücre Hatlarının Çoğaltılması 60
3.2.3. Hücre Hatlarının Pasajlanması ve Stoklanması 60
3.2.4. Hücre Hatlarına miRNA Mimik Transfeksiyonu ve Validasyon İşlemleri 61
3.2.5. Hücrelerden RNA İzole Edilmesi 62
3.2.6. Transfeksiyon Validasyonu İçin cDNA Sentezi ve qRT-PZR İşlemleri 64
3.2.7. Hücresel Süreçlere Let-7b-5p ve Let-7b-3p Etkisinin Araştırılması 66
3.2.8. Let-7b-5p ve Let-7b-3p'nin Potansiyel Hedef Genlerinin İn Siliko Olarak Tayin Edilmesi 68
3.2.9. Gen İfadelerinin Belirlenebilmesi İçin cDNA sentezi 69
3.2.10. Gen Ekspresyonlarının Analizi İçin qRT-PZR İşlemleri 70
3.2.11. Primer Temini 71
3.2.12 İstatistiksel Analiz 73
4. BULGULAR 74
4.1. RNA İzolasyonu 74
4.2. HL-60 ve NB4 Hücre Hatlarına miRNA Mimik Transfeksiyon Validasyonu 74
4.3. Let-7b-5p ve Let-7b-3p'nin, HL-60 ve NB4 Hücrelerinin Proliferasyonuna Etkisi 76
4.4. Let-7b-5p ve Let-7b-3p 'nin Hücre Apoptozu Üzerindeki Etkisi 77
4.5. Let-7b-5p ve let-7b-3p'nin, AML Hücre Hatlarında Hedeflediği Genlerin Ekspresyon Sonuçları 78

5. TARTIŞMA 82
KAYNAKLAR 93
HAM VERİLER 108
FORMLAR 109
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....110

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: AML'de FAB Sınıflandırması. 23
Tablo 2: AML'nin WHO Sınıflandırması 28
Tablo 3: Akut Miyeloid Lösemi ile İlişki Risk Faktörleri 30
Tablo 4: AML'de Prognozu Etkileyen Genetik Faktörler 32
Tablo 5: AML'deki Sitogenetik Anomaliler ile İlişkili miRNA Ekpresyon Profillemesi 39
Tablo 6: Çalışmada Kullanılan Cihazlar, Sarf Malzemeleri ve Kullanım Amaçları 56
Tablo 7: Laboratuvarda Kullanılan Cam Malzemeler 58
Tablo 8: Hücre Kültüründe Kullanılan Solüsyonlar 58
Tablo 9: Transfeksiyon ve Validasyonu için Gerekli Solüsyonlar 59
Tablo 10: RNA İzolasyonunda Kullanılan Solüsyonlar 59
Tablo 11: Transfeksiyon İşlemi İçin Gerekli Bileşenler 62
Tablo 12: cDNA Sentezi İçin Kullanılan Reaksiyon Bileşenleri ve Miktarları 65
Tablo 13: cDNA Sentezi İçin Thermal Cycler Basamakları 65
Tablo 14: qRT-PZR İçin Kullanılan Reaksiyon Bileşenleri Ve Miktarları 65
Tablo 15: miRNA Ekspresyon Analizi İçin qPCR Koşulları 65
Tablo 16: Apoptoz Çalışmasında Kullanılan Solüsyonlar Ve Miktarları 68
Tablo 17: cDNA Sentezi için Karışım-1 Tüpünün Hazırlanmasında 69
Tablo 18: cDNA Sentezi için Karışım-2 Tüpünün Hazırlanmasında Kullanılan Bileşenler ve Miktarları 70
Tablo 19: qRT-PCR İçin Kullanılan Bileşenler ve Miktarları 71
Tablo 20: Ekspresyon Analizi İçin qPCR Koşulları 71
Tablo 21: qPCR Çalışmasında Kullanılan Hedef Genlerin Primer Dizileri 72
Tablo 22 : Transfekte olan Hücrelerin RNA Konsantrasyon ve Saflık Değerleri 74

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: WHO'nun yayınladığı 2020 yılı rakamlarına göre en çok ölüme neden olan kanser çeşitleri ve ölüm sayıları (Tüm yaş grupları ve cinsiyetler içerisinde) 19
Şekil 2: Lösemili hastaların kan hücrelerinin görünümü 20
Şekil 3: mikroRNA Biyogenezi. 36
Şekil 4: CDC25A geninin lokusu 43
Şekil 5: CDC25A geninin iki izoformu; A1 ve A2 44
Şekil 6: İnsan CDC25A Geninin Genomik Organizasyonu (3p terminal) 44
Şekil 7: CDC25'lerin hücre döngüsündeki düzenleyici işlevi 46
Şekil 8: IL-8 geninin lokusu 47
Şekil 9: CCND1 geninin lokusu 48
Şekil 10: Siklin D1'in yapısı. (A) CCND1 geninin genomik yapısı; (B) CCND1 proteininin fonksiyonel alanları; (C) CCND1'in alternatif eklenmesinin(uçbirleştirme) şematik gösterimi ve intron 4'ten türetilen CCND1 dizisi 48
Şekil 11: CREBZF geninin lokusu 51
Şekil 12: RORA geninin lokusu 51
Şekil 13: BRF2 geninin lokusu 52
Şekil 14: SYF2 geninin lokusu 54
Şekil 15: HL-60 ve NB4 hücrelerinin transfeksiyon validasyonu 75
Şekil 16: Let-7b-3p'nin HL60 ve NB4 hücrelerindeki proliferasyon değişimleri 76
Şekil 17: Let-7b-5p'nin HL60 ve NB4 hücrelerindeki proliferasyon değişimleri 77
Şekil 18: Let-7b-5p ve let-7b-3p miRNA'larının NB4 hücrelerindeki apoptoza etkisi . 78
Şekil 19: HL-60 hücre hatlarında CREBZF, RORA, BRF2 ve SYF2 genlerinin ekspresyon düzeyleri 79
Şekil 20: NB4 hücre hatlarında CREBZF, RORA, BRF2 ve SYF2 genlerinin ekspresyon düzeyleri 80
Şekil 21: HL-60 hücre hatlarında CDC25A, IL-8 ve CCND1 genlerinin ekspresyon düzeyleri 80
Şekil 22: NB4 hücre hatlarında CDC25A, IL-8, CCND1 genlerinin ekspresyon düzeyleri 81

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AGO	Argonaute
ALL	Akut Lenfoblastik Lösemi
AML	Akut Myeloid Lösemi
APL	Akut Promiyelositer Lösemi
AS	Alternatif Splicing
ATRA	All-Trans Retinoik Asit
BCL2	B Hücreli Lenfoma 2
BH	Cl2 Homoloji Motifi
BM	Bone Marrow (Kemik İliği)
BMSC	Kemik İliği Stromal Hücreleri
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
BRF2	TFIIB İle İlişkili Faktör 2
CAMP	Cathelicidin Antimicrobial Peptide
CCND1	Cyclin D1 (Siklin D1)
CDC25A	Cell Division Cycle 25
CDK	Sikline Bağımlı Kinazlar
CNV	Kopya Sayısı Varyasyonları
CR	Complete Remission Rates
CRC	Colorectal Cancer Cell
CREBZF	CREB/ATF BZIP Transkripsiyon Faktörü
CSC	Kanser Kök Hücreleri

CVDK	Cell Viability Detection Kit
CXCL8	C-X-C motif chemokine ligand 8
DGCR8	Digeorge Syndrome Critical Region 8
Dk	Dakika
DMSO	Dimetil Sülfoksit
dsRNA	Çift zincirli RNA
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMT	Epithelial Mesenchymal Transition
ERK	Extracellular Signal Regulated Kinase
FAB	French American British
FBS	Fetal Bovine Serum
GWAS	Genom Çapında İlişkilendirme Çalışması
HCC	Hepatosellüler Karsinom
HSC	Hematopoietik Kök Hücre
IL-8	Interlökin 8
KLL	Kronik Lenfoblastik Lösemi
KML	Kronik Myeloid Lösemi
LOH	Heterozigotluk Kaybı
LUAD	Akciğer Adenokarsinomu
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MDS	Myelodisplastik Sendromları
miRNA	Mikrorna
mL	Mililitre
MRC	Myelodisplazi'ye Bağlı Değişiklikler
mRNA	Messenger RNA

mTOR	Mammalian Target of Rapamycin
MTT	3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromür
ng	Nanogram
NH2	N-terminal sistein kalıntısı
NLS	Nükleer Lokalizasyon Sinyali
NT	Negatif Kontrol
PBMC	Periferik Kan Mononükleer Hücreleri
PBS	Phosphate Buffered Saline
PKC	Protein Kinaz C
pre-miRNA	Öncül miRNA
pri-miRNA	Birincil miRNA
qPCR	Kantitatif PZR
qRT-PCR	Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR
RGC	Retinal Ganglion Hücresi
RISC	RNA Induced Silencing Complex
RORA	Retinoid İle İlişkili Orfan Reseptör Alfa
rpm	Round Per Minute
SYF2	SYF2 Pre-miRNA Splicing Factor
TFIIB	Transkripsiyon Faktörü II B
UTR	Untranslated Region
WHO	World Health Organization
Wnts	Wnt Ligandları

ÖZET

KAŞITOĞLU, T. N. (2021). let-7b-5p ve let-7b-3p miRNA'larının HL-60 ve NB4 Akut Myeloid Lösemi Hücre Hatlarında Fonksiyonel Etkilerinin ve Hedef Genlerinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yükseklisans Tezi. İstanbul

Amaç: Akut myeloid lösemi (AML), kemik iliğindeki (Kİ) olgunlaşmamış miyeloid öncül hücrelerinin olgunlaşma ve farklılaşma süreçlerinin durması sonucunda kontrolsüz ve klonal proliferasyonları ile karakterize olan heterojen bir lösemi türüdür. MikroRNA'lar (miRNA), 19-25 nükleotid uzunluğuna sahip tek zincirli, çeşitli genlerin ekspresyonunu regüle eden, kodlanmayan RNA'lardır. MiRNA'lar, çeşitli kanserlerde değişken ifade düzeyleri göstermektedir. Bu çalışmada, çeşitli kanserlerde tümör baskılayıcı role sahip let-7b-5p ve let-7b-3p miRNA'larının, AML'de çeşitli hücresel süreçlere etkisinin ve hedeflediği olası 7 önemli proto-onkogenin ifade seviyelerindeki değişimlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntemler: Let-7b-5p ve let-7b-3p mimiklerinin, HL-60 ve NB4 AML hücrelerine Lipofektamin aracılığıyla transfeksiyonu yapılmıştır. Transfeksiyon validasyonu için TaqMan primer-problar kullanılmıştır ve qRT-PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon işleminden sonra AML hücrelerinin canlılık tayini WST-8 yöntemi ile belirlenmiştir. Let-7b-5p ve let-7b-3p'nin apoptoza etkisi kolorometrik Kaspaz 3 kiti ile incelenmiştir. Let-7b-5p'nin, AML hücrelerindeki potansiyel hedef genleri olarak CDC25A, IL-8, CCND1; let-7b-3p'nin ise potansiyel hedef genleri olarak RORA, SYF2, BRF2 ve CREBZF in silico analizler sonucunda belirlenmiştir. Potansiyel olarak hedeflenen genlerin ifade değişimleri karşılaştırmalı olarak qRT-PZR yöntemi ile değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçların kontrol grupları ile kıyaslanarak istatistiki olarak analizi yapılmıştır.

Bulgular: Hücre canlılığı oranlarında istatistiksel düzeyde anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir ($p<0,05$). NB4 hücrelerinde, Kaspaz-3 oranı ($p=0,004$; $p=0,009$) kontrol gruplarına kıyasla istatiksel olarak artış göstermiştir. Let-7b-5p ile transfekte olan grupta, kontrol grubuna göre IL-8 gen ifadesinin ($p=0,006$; $p=0,026$); let-7b-3p ile transfekte olan grupta, kontrol grubuna göre RORA ($p=0,004$; $p=0,007$) ve SYF2 ($p=0,017$; $p=0,012$) gen ifadelerinin her iki hücre hattında da anlamlı seviyede azaldığı görülmüştür.

Sonuç: Yaptığımız çalışmada ve literatür taramaları sonucunda ulaştığımız veriler, let-7b-5p ve let-7b-3p ile transfekte edilen NB4 ve HL-60 hücrelerinde, hücre proliferasyonunun baskılanabileceği ve apoptozun indüklenebileceğini işaret etmiştir. Sonuçlar let-7b-5p ve let-7b-3p'nin, AML hücrelerinde IL-8, RORA ve SYF2 gen ekspresyonları üzerinde yönlendirici olabileceğini düşündürmektedir. Doku çalışmaları ve yapılacak diğer genetik analizlerle elde edilen sonuçların doğrulanmasıyla let-7b-5p ve let-7b-3p'nin, AML patogenezinde, teşhisinde, prognozunda ve erken tanısında kullanılma potansiyeli bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: AML, mikroRNA, miR-let-7b-5p, miR-let-7b-3p, HL-60, NB4

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37218

ABSTRACT

KASITOGLU, T. N. (2021). Investigation of the Functional Effects and Target Genes of let-7b-5p and let-7b-3p miRNAs in HL-60 and NB4 Acute Myeloid Leukemia Cell Lines. Istanbul University Institute of Health Sciences, Department of Genetics. Master Thesis. Istanbul

Introduction: Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous type of leukemia characterized by uncontrolled and clonal proliferation of immature myeloid precursor cells in the bone marrow (CI) as a result of the arrest of maturation and differentiation processes. MicroRNAs (miRNA) are single-stranded, non-coding RNAs with a length of 19-25 nucleotides that regulate the expression of various genes. miRNAs show variable expression levels in various cancers. In this study, it was aimed to investigate the effects of let-7b-5p and let-7b-3p miRNAs, which have tumor suppressor roles in various cancers, on various cellular processes in AML and the changes in the expression levels of 7 possible proto-oncogenes they target.

Methods: Let-7b-5p and let-7b-3p mimics were transfected into HL-60 and NB4 AML cells by Lipofectamine. TaqMan primer-probes were used for transfection validation and qRT-PCR was performed. The viability of AML cells after transfection was determined by the WST-8 method. The effect of let-7b-5p and let-7b-3p on apoptosis was investigated with the colorometric Caspase 3 kit.. CDC25A, IL-8, CCND1 as potential target genes of Let-7b-5p in AML cells; RORA, SYF2, BRF2 and CREBZF were identified as potential target genes of let-7b-3p as a result of in silico analysis. Expression changes of potentially targeted genes were evaluated comparatively by qRT-PCR method. The results were compared with the control groups and statistically analyzed.

Results: A statistically significant decrease in cell viability rates was observed ($p<0.05$). Caspase-3 ratio ($p=0.004$; 0.009) was statistically increased in NB4 cells compared to control groups. In the group transfected with Let-7b-5p, compared to the control group, IL-8 gene expression was ($p=0.006$; 0.026); In the let-7b-3p transfected group, RORA ($p=0.004$; 0.007) and SYF2 ($p=0.017$; 0.012) gene expressions were significantly decreased in both cell lines compared to the control group.

Conclusion: The data we obtained as a result of our study and literature review indicated that cell proliferation could be suppressed and apoptosis could be induced in NB4 and HL-60 cells transfected with let-7b-5p and let-7b-3p. The results suggest that let-7b-5p and let-7b-3p may be drivers of IL-8, RORA and SYF2 gene expressions in AML cells. Let-7b-5p and let-7b-3p have the potential to be used in the pathogenesis, diagnosis, prognosis and early diagnosis of AML by confirming the results obtained by tissue studies and other genetic analyzes to be performed.

Key Words: AML, mikroRNA, miR-let-7b-5p, miR-let-7b-3p, HL-60, NB4

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: 37218

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Akut Miyeloid Lösemi (AML), olgunlaşmamış miyeloid hücrelerin aşırı çoğalması ve normal hematopoezdeki bozuklukla karakterize olan genetik, morfolojik, sitogenetik, epigenetik ve klinik özellikler açısından heterojen, malign hematolojik bir kanser türüdür (1). Yeni tanı konmuş AML hastalarının yaklaşık %55'inde kromozomal anomali bulunmaktadır. Bu nedenle AML'nin sınıflandırma ve prognozun seyrini belirleyen iki temel faktör vardır. Bunlar hastanın yaşı ve kromozom yapısıdır (2).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda AML dahil olmak üzere çeşitli hematopoetik malignitelerin patogenezinde, teşhisinde ve prognozunda mikroRNA'ların (miRNA'lar) önemli rolleri olduğu gösterilmiştir (3). miRNA'lar, hedef mRNA'nın 3'-UTR bölgesine bağlanarak transkripsiyon sonrası düzeyde gen ifadesinin düzenleyen, 19-25 nükleotit uzunluğunda tek iplikli, küçük, protein kodlamayan RNA molekülleridir (4). Kanser dokularında miRNA'lar, hem onkogenik hem de tümör inhibe edici gen gibi davranarak tümör gelişimi, metastazı ve invazyonunda düzenleyici rol oynamaktadırlar. Bu özellikleri sayesinde miRNA'lar, çeşitli kanser türlerinde tanı amaçlı önemli bir biyobelirteç potansiyeli taşımaktadır. (5, 6).

MiRNA'lar epigenetik değişiklikler, kopya sayısı varyasyonları (CNV), kromozomal translokasyonlar, değişen transkripsiyon faktörleri veya onkoproteinlerin miRNA'ların promotör bölgelerini anormal şekilde hedeflemesi ve değişken miRNA ekspresyonunun işlenmesi olarak temelde beş mekanizma aracılığıyla AML'nin patogenezinde rol oynar (7). Bazı doku spesifik miRNA ekspresyon profillerinin AML ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca miRNA'ların AML'nin gelişim, proliferasyon, sağkalım, farklılaşma, kendini yenileme, epigenetik regülasyon ve kemoterapi direnci de dahil çok farklı lökomogenezi etkileyen AML alt grubunda tümör baskılayıcı rol oynayabildiği ortaya çıkarılmıştır. Bu spesifik miRNA'ların gösterdiği ekspresyon profilleri, AML'nin tanısı, prognozu, tedavi yanıtı ve klinik işlemler bakımından önemli bir etkiye sahiptir (8). Bu durum miRNA'ların potansiyel bir AML biyobelirteci olabileceğini düşündürmüştür. Bununla birlikte miRNA'ların AML'deki rolleri hakkında belirsizlikler hala devam etmektedir (9). MiR- let-7 ailesi, AML gibi çeşitli lösemi tiplerinde ve çeşitli kanserlerde etkisi kanıtlanmış önemli tümör baskılayıcılardır. Let-7b-5p, 3'UTR yoluyla AML1-ETO füzyon genini (onkogen) doğrudan hedefleyerek ekspresyonunu aşağı yönde regüle eder. Let-7b ayrıca, t(8;21) AML hücrelerinin,

lösemik gelişimine ve yayılmasına etki ederek hücre çoğalmasını baskılar (10). Yapılan çalışmalar sonucunda, let-7b-5p'nin en önemli tümör baskılayıcı miRNA'lardan biri olduğu ve meme kanseri (11), akciğer kanseri (12), malign melanomlar (10), osteosarkom (13), prostat kanseri (14), hepatosellüler karsinom (15) gibi birçok kanserde hayati hücresel süreçleri etkilediği bilinmektedir. Let-7b-3p ise çeşitli insan kanser türlerinde tümör supressör özelliğe sahip olduğu tespit edilmiş önemli bir miRNA'dır. Let-7b-3p'nin lipid metabolik süreçte, hücre proliferasyonunda, Wnt sinyal yolağında, Notch sinyal yolağında önemli rolleri vardır (16).

Bu proje ile AML hücre hatları olan HL-60 ve NB4'te let-7b-5p ve let-7b-3p'nin hücresel düzeydeki fonksiyonel etkileri araştırılmıştır. Projede ayrıca AML hücrelerinin kanser sürecini etkileyebilecek let-7b-5p ve let-7b-3p miRNA'larının in siliko olarak hedeflediği aday genlerin ekspresyon seviyeleri incelenmiştir. Bu amaçla tedavi yanıtında olumsuzluk ve düşük sağkalım oranı gösteren AML'de, hem tedavi potansiyeli göstermesi hem de tanısal ve prognostik açıdan let-7b-5p ve let-7b-3p'nin biyobelirteç olarak araştırılması ve gerekirse bu bulguların in-vitro ve in-vivo açıdan da doğrulanması kanser ile miRNA biyobelirteçleri ile ilgili yapılacak gelecek çalışmalar için büyük önem taşımaktadır.

Çalışmamızda kullandığımız let-7b-5p ve let-7b-3p miRNA'larının -5p ve -3p dizileri saç tokası yapısının iki kolunu temsil etmektedir. Bu nedenle olgun miRNA, pre-miRNA'nın 5' veya 3' kolundan temel alır. Geçmiş çalışmalarda sadece 5'-3' koldan meydana gelen -5p miRNA'ların hastalık süreçlerine etkisi olduğu düşünülmüş olmasına rağmen sonradan yapılan çalışmalarda 3'-5'kolunun meydana getirdiği -3p miRNA'larının da hastalıklarla çok yakından ilişkili olabildiği ortaya çıkarılmıştır. İki miRNA'ya ait dizi birbirinden farklı olduğu için -5p ve -3p miRNA'larının farklı genlerin mRNA'sını hedefleyebilmektedir (17). Let-7b-5p ve let-7b-3p'nin lösemi türlerinde sıklıkla tümösüpressör özellik göstermesi, hücrelerde birden çok önemli geni hedeflemesi, diğer birçok kanserde gen ekspresyonunu düzenleyerek hastalığın teşhis, tedavi ve prognozu gibi süreçler açısından potansiyel taşıdığını düşündüğümüz için çalışmamızda yer verdik. Literatürde let-7b-5p ve let-7b-3p ile AML ilişkisini gösteren çalışmanın yetersizliği nedeniyle bu konunun aydınlatılmasına yönelik bir çalışma gerçekleştirdik.

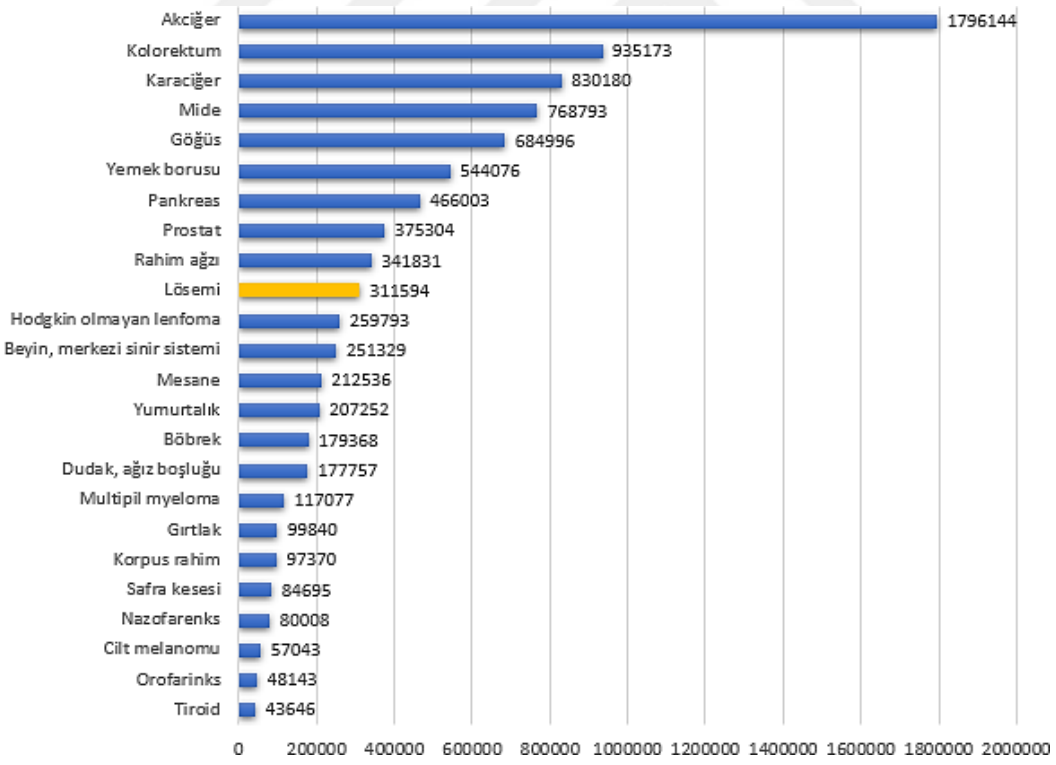
Bu çalışmada öncelikle let-7b-5p ve let-7b-3p miRNA mimiklerinin AML hücre hatlarına transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Transfeksiyon validasyonunun ardından ilgili miRNA mimiklerinin kanser hücreleri üzerindeki proliferatif etkisi araştırılmıştır. Daha sonra let-7b-5p'nin olası hedefi genleri olan CDC25A, IL-8, CCND1; let-7b-3p'nin olası hedef genleri RORA, SYF2, BRF2 ve CREBZF proto-onkogenleri, in siliko analizlerle belirlenmiş, ardından mimik transfeksiyonu yapılan gruplar ile kontrol grupları arasında miRNA-hedef gen ilişkisi araştırılmıştır. AML'de hücresel süreçlerde kritik görevlere sahip 7 önemli proto-onkogenin let-7b-5p ve let-7b-3p ile ilişkisi AML hücre hatlarında bildiğimiz kadarıyla ilk defa bu çalışma ile incelenmiştir. AML'nin karmaşık doğasının aydınlatılması adına çalışmamızda ortaya çıkarılan let-7b-5p ve let-7b-3p miRNA'larına ait potansiyel hedef genlerinin mRNA düzeyindeki ifade değişimleri, yeni çalışmalarla protein düzeyinde de gösterilmesi, miRNA-gen etkileşiminin AML hasta dokularında doğrulanması gerekmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. LÖSEMİ

2.1.1. Tanım

Lösemi, kemik iliğindeki immatür öncül hücrelerin çeşitli sebeplerle gelişiminin durması ve anormal çoğalmaya başlaması ile malign (lösemik) dönüşüm göstermesi sonucunda kemik iliğinde birikmesi ile karakterize bir kanser türüdür. Lökosit sayısında anormal artışın yanında periferik kanda lökopeni de görülebilir. Kemik iliği infiltrasyonu sonucu, trombosit ve eritrosit (alyuvar) sayısında da azalma ve fonksiyon bozukluğu meydana gelir. Öncelikli olarak kemik iliğinde gözlemlenir ardından tüm doku ve organlara yayılım gösterebilir (18). Dünya Sağlık Örgütü 2020 verilerine göre; en sık rastlanan ve ölümle sonuçlanan kanserler arasında lösemi, 10. sırada yer almaktadır (Şekil 1) (19).

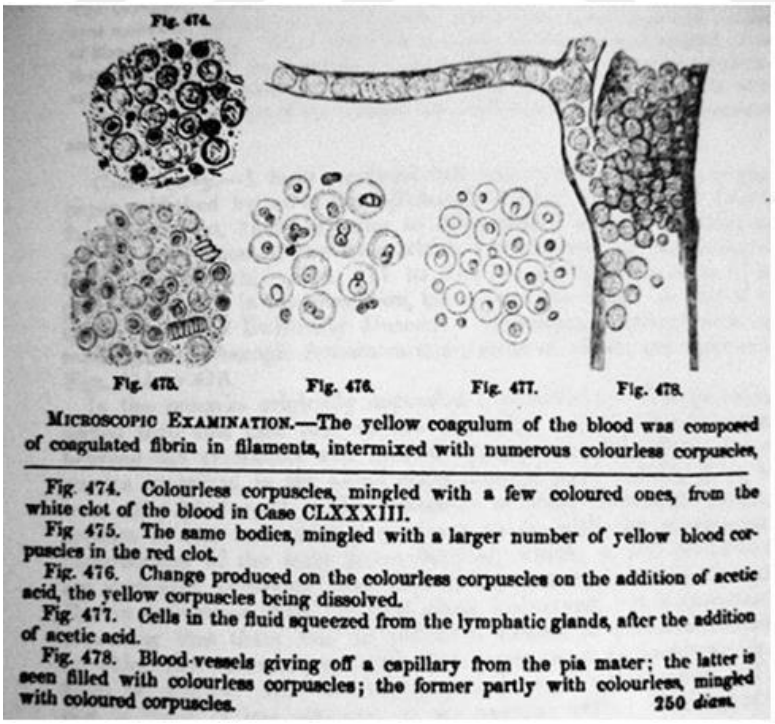


Şekil 1: WHO'nun yayınladığı 2020 yılı rakamlarına göre en çok ölüme neden olan kanser çeşitleri ve ölüm sayıları (Tüm yaş grupları ve cinsiyetler içerisinde) (19)'den değiştirilerek alınmıştır.

Lösemiler, genel olarak malign değişiklik gösteren öncül hücre türüne göre miyeloid ve lenfoid; hematopoez evresindeki olgunlaşma ve hastalık başlangıç süresine (sağkalım) göre akut veya kronik lösemi olarak gruplara ayrılırlar (20). Bu lösemi tipleri de kendi içinde, yavaş başlayıp uzun süre aralıklarla etkisini gösteren "kronik lösemiler: Kronik lenfoblastik lösemiler (KLL), Kronik miyeloid lösemiler (KML)"; hızlı başlayıp kısa sürede sonuçlanan "akut lösemiler: Akut lenfoblastik lösemiler (ALL), Akut miyeloid lösemiler (AML)" olarak ayrılmıştır (21).

2.1.2. Tarihçe

19. yüzyılın başından beri bilinen hastalıkla ilgili ilk çalışmalar Alfred Velpeau (22). J. H. Bennett, R. Virchow ve D. Craigie tarafından yapılmıştır (23). Yunancada beyaz “leukos” ve kan “haima” anlamlarına karşılık gelen sözcüklerden türetilen ‘‘leukemia’’ teriminden temel almaktadır (24).



Şekil 2: Lösemili hastaların kan hücrelerinin görünümü (25)

1950 yıllarında lösemi tedavisine yönelik ilk etkili ilaç denemeleri yapılmış ve 10 yıllık çalışmalar sonucunda 1960 yılında günümüz lösemi tedavilerinde yaygın olarak kullanılan ilaçlar bulunmuştur. Ayrıca Nowell ve Hungerford, kan hücrelerindeki anormallikten sorumlu olan 22. kromozomu yani Philadelphia kromozomunu keşfederek KML'nin patogenez süreçlerinin daha iyi kavranmasına destek olmuşlardır (26). Bu çalışmaların devamında 1973 yılında, Janet Rowley, KML için tanısal bir biyobelirteç olan t(9;22) kromozomal translokasyonunun, Philadelphia kromozomunu meydana getirdiğini göstermiştir (27). Uzun yıllar boyunca lösemi hastalığına yönelik yaşanan gelişmeler, etkisi yüksek çeşitli anti-kanser ajanların ortaya çıkmasını sağlamıştır. Aynı zamanda lösemi hastalığının patofizyolojisinin daha iyi anlaşılması ile yoğun kemoterapi, allojenik kök hücre nakli, immünoterapi tedavi teknikleri geliştirilerek kombine uygulamalar gerçekleştirilmiş ve hastaların sağkalım oranlarında artış meydana gelmiştir (28).

2.2. AKUT MİYELOİD LÖSEMİ

AML, immatür monosit, miyeloid, eritroid ve megakaryositik hematopoetik öncül hücrelerin sayılarında anormal artış, farklılaşma ve olgunlaşmanın duraklaması ile hızlı gelişim gösteren bir lösemi türüdür (9). Olgunlaşmamış miyeloblastların (lösemi hücreleri) kemik iliğinde aşırı artış göstermesi sonucunda diğer kan hücrelerinin oluşumu engellenmektedir. Bu şekilde normal kan hücrelerinin üretilememesi ve vücuda alınamamasıyla meydana gelen kanamalar, anemi, trombositopeni, lökositoz ve/veya enfeksiyon, kilo kaybı gibi kemik iliği yetmezliğinin semptom ve bulguları ortaya çıkmaktadır (29). Hematopoetik öncül hücrelerin de gelişim, çoğalma ve apoptoz gibi işlevleri bozularak kemik iliği, karaciğer ve dalakta aşırı miktarda ödem (sıvı) oluşumu görülmekte ve enfensiyon riski de artmaktadır (30). Hastalığın tanı ve prognozunda sitogenetik, hematolojik ve moleküler testler yönlendirici olmaktadır. AML'nin farklı prognoz profillerine sahip heterojen bir kanser olması nedeniyle kromozomal translokasyonların, genetik mutasyonların, moleküler düzeydeki anormalliklerin ya da epigenetik düzensizliklerin AML patogenezinde rol oynayabileceğini gösteren çalışmalar, kanser moleküler mekanizmalarının aydınlatılması ve olası tedavi seçeneklerinin geliştirilme potansiyeli açısından oldukça umut vadetmektedir (31). Son

yıllarda, yeni nesil dizileme teknolojilerinin gelişme göstermesi, AML hastalığında tekrarlayan mutasyonların da tanımlanmasına olanak sağlamıştır. AML olgularının %95'inden fazlasının, her AML başına 12 gen mutasyonu ve en az 1 somatik mutasyon içerdiği gösterilmiştir. AML'de 100'den fazla genetik mutasyon, 160'tan fazla tekrarlayan sitogenetik mutasyon vardır (32). AML'deki en sık rastlanan sitogenetik anomaliler şunlardır: t(9;11), t(8;21), t(15;17), inv(16)/t(16;16), t(6;9), inv(3)/t(3;3) (33). Bu kromozomal anomaliler, AML'li hastaların yaklaşık %40'ında, diğer kromozomal anomaliler ise hastaların yaklaşık %10' undan az bir kısmını kapsamaktadır. Diğer AML'li hastaların %50'sinde ise normal karyotip profili gözlemlenmektedir (34). AML, genellikle yetişkinler bireylerde sıklıkla rastlanan bir lösemi türü olmasıyla bilinmektedir (22) AML'nin görülme sıklığı 3,4/100.000'dir. Hastalığın insidansı yaşla birlikte hız kazanırken sağkalım oranları da belirgin şekilde azalmaktadır. AML genellikle 65 yaşın üzerindeki hastaları etkilerken erkeklerde, kadınlara göre daha yaygın bir şekilde görülmektedir. AML hastalığı ile ilgili yapılan tedavi çalışmaları ve uygulamalarındaki artışa rağmen nüks oranı oldukça yüksektir ve spesifik nedeni henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (35).

2.2.1. Epidemiyoloji

AML, genellikle 65 yaş ve üzerindeki yetişkinlerde en sık rastlanan ve en kısa sağkalıma sahip olan (5 yıllık = %24) lösemi türüdür. Erişkin gruptaki vakaların yaklaşık olarak %80'ini ve tüm kanserlerin de %3'ünü (36); çocukluk çağında lösemi vakalarının yaklaşık %18'lik kısmını oluşturur (37). 65 yaş altındaki AML insidansı 1.3/100.000 iken 65 yaş üzerinde bu oran 12.2/100.000'dir. Avrupa'da AML'nin görülme sıklığı 3.7/100.000, yaşa bağlı mortalitesi ise 2.7-18/100.000 aralığında değişmektedir. Yaş faktörü AML insidansını etkileyen/belirleyen önemli bir dinamiktir ve yaş artışı ile doğrudan ilişkilidir. Dolayısıyla yaşın ilerlemesine bağlı olarak prevalans hızlı bir artış gösterir (38). AML insidansı ayrıca ırklara göre de değişiklik gösterebilmektedir; beyaz ırkın, siyah ırka oranla daha yüksek morbiditeye sahip olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (39) . National Cancer Institute (Ulusal Kanser Enstitüsü)'ün 2010-2014 yılları arasındaki verilerine göre; Türkiye'de AML insidansı 2.7/100.000 iken morbiditesi, erkek ve kadınlarda yılda 4.2/100.000 ve mortalite her yıl erkek ve kadın için 2.8/100.000 olarak

bildirilmiştir. Erkek/kadın oranı yaklaşık 5/3 ‘tür (40). Amerika Birleşik Devletleri, Avusturalya ve Batı Avrupa ülkelerinde en sık oranlara sahiptir ve buradaki AML hastaları tüm lösemi hastalarının %25’ini oluşturmaktadır. Son yıllarda AML’nin insidasında ciddi bir yükselme meydana gelmiştir (41).

2.2.2. AML’de Sınıflandırma

2.2.2.1. FAB Sınıflandırması

AML, kemik iliğinin malign heterojen bir hastalığıdır. AML sınıflandırmasında iki temel yöntemden faydalanılmaktadır; ilk kullanılmaya başlanan FAB (French-American-British) sınıflandırması ve daha sonrasında tanımlanan WHO (World Healty Organization) sınıflandırmasıdır (42). AML, 1976’da geliştirilen FAB sınıflandırması ile morforlojik, sitogenetik özellikler ve histokimyasal boyamalar göz önüne alınarak sınıflandırılmıştır. FAB sınıflandırmasına göre AML, M0’dan M7’ye kadar 8 alt tipte incelenmiştir (27, 40). AML FAB sınıflandırması Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1: **AML’de FAB Sınıflandırması (43, 44) verileri kullanılarak oluşturulmuştur.**

ALT TİP	AÇIKLAMA	SİTOGEGENETİK	İNSİDANS
M0	Minimal farklılaşma gösteren akut		%5
M1	Olgunlaşma göstermeyen akut miyeloblastik lösemi	t (8; 21)	%15
M2	Granülositik olgunlaşma gösteren akut miyeloblastik lösemi	t (8; 21) (q22; q22), t (6; 9)	%25
M3	Akut Promiyelositer lösemi (APL)	t (15; 17), t(11,17)	%10
M3V	Mikrogranüler akut promiyelositik lösemi		
M4	Akut miyelomonositik lösemi	inv (16) (p13q22), del (16q)	%20

M4eo	Kemik iliği eozinofili ile birlikte akut miyelomonositik lösemi	inv (16), t (16; 16)	%5
M5	Akut Monositik Lösemi (M4 ve M5 < 2 yaşta daha sık)	del (11q), t (9; 11), t (11; 19)	%10
M6	Akut Eritroid lösemi		%5
M7	Akut Megakaryoblastik lösemi (Miyelofibrozla birlikte, blastlardaki sitoplazmik çıkıntılar belirgin, trizomi 21'li çocuklarda yaygın)	t (1; 22)	%5

AML-M0, minimal seviyede farklılaşma gösteren bir AML alt tipidir. Çocuklarda ve yetişkin bireylerde nadir olarak rastlanmaktadır. Yetişkin AML vakalarının yaklaşık %5'ini ve toplam vakaların da yaklaşık olarak %7'lik kısmını oluşturur (45). Tanısı, ışık mikroskobu düzeyinde blastların %3'ünden azında myeloperoksidaz (MPO) ve/veya Sudan black B (SBB) ekspresyonunun ve miyeloid ile ilişkili belirteçlerin pozitifliği ve B veya T hücreleri ile ilişkili antijenlerin olmaması şeklinde yapılmaktadır. AML-M0, morfolojik açıdan ALL ile benzer özellikler göstermektedir. AML-M0 vakalarında görülen 5. ve/veya 7. kromozom anomalilerinin %80'lik kısmı kompleks bir karyotip içerebilir. AML-M0, genelikle kötü prognoz ile ilişkilendirilir (46).

AML-M1, miyeloid olgunlaşma göstermeyen AML alt tipidir. Tüm AML vakalarının yaklaşık %10'unu ve çocukluk çağı AML vakalarının ise yaklaşık %4'ünü meydana getirir. Ortalama AML-M1 tanı yaşı 46'dır. Kemik iliğinde bol miktarda bulunan myeloblastlar, eritroid olmayan hücrelerin %90'ından fazlasını oluşturur. AML-M1 tanısı, sitokimyasal olarak blastların %3'den fazla bir kısmında MPO ve SBB boyamasının ve/veya Auer çubuklarının pozitifliği ile karakterizedir. AML-M1 hücreleri genellikle yuvarlak çekirdekli ve granül içermeyen bir yapıda olsa da nadiren az sayıda granüllü hücrelere de rastlanabilir. Vakaların yarısında, lösemik hücrelerde meydana gelen kromozomal anomalilere (t(9;22) gibi) rastlanır. M0'dan daha iyi fakat genel olarak kötü prognoza sahiptir (45, 47)

AML-M2, granülositik olgunlaşma gösteren ve en sık görülen AML alt tipidir. Tüm AML vakalarının yaklaşık %30'unu kapsamaktadır. Genellikle 25 yaş altındaki AML vakaların %20'sini, 65 yaş üzerindeki vakaların ise %40'ını oluşturmaktadır. AML-M2 vakaları, miyeloblastları ve miyeloid öncül hücreleri birlikte bulundurmaktadır. Kemik iliğindeki veya periferik kandaki blast hücrelerinin %20'sinden fazlasında güçlü MPO, SBB ve kloroasetat esteraz pozitifliği görülür. AML-M2'de yaygın olarak 8 ve 22. kromozomlarda meydana gelen t(8;21)(q22;22) translokasyonu mevcuttur. AML vakalarının %5 ila %12'sinde ve karyotipik anomali taşıyan M2 vakalarının 1/3'inde bulunur. Genel olarak t(8;21)(q22;22) translokasyonuna sahip hastaların, kemoterapi yanıtı daha iyi, relaps oranı daha düşük, tam remisyon ve sağkalım oranları da daha yüksektir (48). Translokasyonun meydana gelmesi ile birlikte AML-ETO füzyon proteini oluşarak, RT-PCR yöntemiyle analizi yapılabilir (49). Hücrelerin büyük bir kısmı olgunlaşan myeloblastlardan meydana gelir. Granülasyon oranı yüksektir. ve Auer cisimcikleri sık ve belirgindir. AML vakaları genel olarak bir AML-M2 tipidir ve daha olumlu bir prognoza sahiptir (45).

AML-M3 alt tipi akut promyelositik lösemi (APL) olarak tanımlanır. Tüm AML vakalarının yaklaşık %10-15'ini oluşturur. Kemik iliğinde ve periferik kanda olgunlaşmış miyeloid immünofenotipli anormal (atipik) promiyelositlerin proliferasyonu görülür. APL tanısında, yüksek MPO ve SBB pozitifliği ve yoğun Auer cisimciği gözlemlenir. AML-M3 vakalarının diğer AML alt tipleri ile karşılaştırıldığında morfolojik ve sitogenetik olarak hastaların genç olması, koagülopati, kanama ve bunu takiben erken ölüm eğilimi ve spesifik kromozom anomalileri gibi ayırt edici özellikleri vardır (50). Ayrıca APL, retinoik asit (ATRA) reseptörünün füzyonu ile 15. kromozomdaki promiyelositik lösemi (PML) geni ve 17. kromozomdaki retinoik asit reseptörü alfa (RARa) geninden ortaya çıkan spesifik t(15;17)(q22;q11) resiprokal translokasyonu ile karakterizedir (45). APL'nin 2 varyantı vardır (M3 ve M3v). Hipergranüler varyant, AML-M3 olgularının yaklaşık %75'ini kapsarken bu tipte genellikle lökopeni ön plana çıkmaktadır. Mikrogranüler varyant ise AML-M3v olarak bilinen alt tiptir. AML-M3 vakalarının %25'e yakın bir kısmını oluşturmaktadır. M3v'de sıklıkla lökositoz ön plana çıkmaktadır (51).

AML alt tipleri arasında APL, yüksek relaps gösteren ve ölümcül bir kanser olarak bilinse de gelişitirilen modern tedaviler sayesinde, APL'de uzun süreli hastalıksız

sağkalım (DFS) oranı %90'lara ulaşarak hem tedavi yanıtının hem de pronozun diğer AML alt tiplerine göre çok daha iyi olduğu görülmüştür. APL vakalarının tam remisyon oranlarının %70-80'lerde olması, tedavi için kemik iliği nakli gerekliliğini ortadan kaldırır. Bunun yanı sıra hastaların çoğunda, ATRA ve kemoterapi içeren bir tedavinin başarı oranı oldukça yüksektir (45, 52).

AML-M4 alt tipi akut myelomonositik lösemi olarak tanımlanır. AML-M4'ün diğer alt tiplerden ayıran önemli özelliği, neoplastik hücrelerin hem myeloid hem de monositik hücre serilerine diferansiyasyonudur. Tüm AML vakalarının %10-15'ini oluştururken çocukluk çağı vakalarında bu sayı %3-5 aralığındadır. AML-M4 alt tipi, kemik iliğindeki blast hücre oranının %20'den fazla olması ve bunların monositik ve promonositik karakter göstermesi ile M1 ve M2den ayırt edilebilir. Dolaşımda çok miktarda monosit olabilir. AML-M4 vakalarında sık rastlanan semptomlar arasında dalak büyümesi (splengomegali) (%30), lenf bezi büyümesi (%19-30), diş eti hiperplazisi ve ekstramedüller tutulum görülebilir (53). AML-M4'ün 2 varyantı vardır (M4 ve M4eos). AML-M4eos varyantı, kemik iliği hücrelerinde anormal artış gösteren eozinofiller içerir. Yaygın olarak inv(16)(p13q22) veya t(16; 16)(p13; q22) kromozomal varyasyonları görülür. AML-M4eos'ta tedavi yanıtı ve prognoz daha iyi seyretmektedir (45).

AML-M5 alt tipi olan akut monositik lösemi, tüm AML vakalarının %5-8'ini oluşturur. Diğer AML tiplerine kıyasla ekstramedüller lezyonlar daha sık gözlenir. Çoğunlukla küçük çocukları etkiler. AML-M5 tanısında, vakaların büyük bir kısmında yüksek lökosit sayısı saptanmaktadır. Monoblastik hücreler MPO ile SBB ile negatif, spesifik olmayan esteraz (NSE) ile pozitif boyanmaktadır. AML-M5 vakalarında 11q23'teki t(10;11)(p13;q23), t(9;11)(p22;q23), t(11;19)(p13;q23) ve t(8:16)(p11;p13) gibi kromozomal translokasyonlar görülebilir (45, 54). AML-M5, kötü prognoza sahiptir. Bununla ilişkili olarak 3 yıllık hastalıksız sağkalım oranı %26 civarlarında ve genel sağkalım (OS) oranı ise yaklaşık olarak %31'dir (55). AML-M5a ve AML-M5b olmak üzere 2 varyantı vardır. AML-M5a, kemik iliğinde bulunan non-eritroid hücrelerin %80'inden daha büyük kısmını morfolojik açıdan farklılaşmamış monoblastlar oluşturur. M5b'ye göre daha seyrek görülen bir varyanttır ve genellikle daha genç yaşlardaki bireylerde rastlanmaktadır. AML-M5b ise kemik iliğinde bulunan non-eritroid hücrelerin %80'inden daha büyük kısmını monosit, promonosit ve monoblastlar meydana getirir. M5a'ye göre daha sık görülür. Genellikle ileri yaşlarda görülür (45).

AML-M6 alt tipi olan akut eritroid lösemi, önceki yıllarda Di Guglielmo sendromu olarak bilinir. Tüm AML vakalarının %5'inden az bir kısmını oluşturur. Baskın olarak görülen eritroid hücre proliferasyonu ve morfolojik anomalileri ile karakterizedir. AML-M6 alt tipinde, kemik iliğindeki çekirdekli hücrelerin yarısından fazlasını eritroblastlar ve non-eritroid hücrelerin en az %20'sini ise miyeloblastlar oluşturur. MPO ve SBB ile negatif boyanır. AML-M6'nin prognozu kötüdür. Yetişkin bireylerde daha sık görülür (ort; 57 yaş) (45).

AML-M7, akut megakaryositik lösemi nadir görülen bir AML alt tipidir. Çocuklarda daha sık görülür. Down sendromlu çocuklarda AML-M7'nin görülme sıklığı genel popülasyon ile kıyaslandığında oldukça fazladır. Yetişkin AML vakalarının 1'ini ve çocukluk çağındaki vakaların ise yaklaşık %10'unu oluşturur. Blast hücrelerinin %30'undan fazlası megakaryositik seriyi meydana getirir. AML-M7 genellikle, megakaryositik hücrelerde görülen morfolojik ve sitogenetik anomaliler ile ilişkilidir. Tanı açısından MPO ve SBB boyaması negatiftir ve flow sitometrik ve/veya immünofenotipik inceleme gerekir. AML-M7 tanısı koyulması için kemik iliği hücrelerinde veya periferik kanda %20'den fazla miktarda blast gözlenmesi gerekmektedir. AML-M7, kötü prognoza ve düşük sağkalım oranlarına sahiptir (45).

2.2.2.2. WHO Sınıflandırması

2001 yılında, Dünya Sağlık Örgütü (WHO), AML'de yeni teknik gelişmeler sayesinde moleküler genetik (genetik anomaliler) ve sitogenetik (kromozomal anomaliler) teşhis ve tedavisinde uygulanan ilerlemeleri bir araya getirecek entegre bir yaklaşım anlayışının bir parçası olarak, morfolojik, immünfenotipik, sitogenetik ve moleküler genetik bulguların bir arada bulunduğu, akut lösemilerin sınıflandırılmasında prognostik öneme sahip yeni bir sınıflandırma sistemi geliştirmiştir (56). WHO sınıflandırması, 2008 ve 2016 yıllarında revize edilmiştir. Günümüzde kullanılan WHO sınıflandırmasında, AML'de sitogenetik ve moleküler özellikler dikkate alınmaktadır (57). Temel hastalık tanımının (klinopatolojik) açıklanması için oluşturulmuştur: Tekrarlayan genetik anormallikleri olan AML; tedaviye bağlı miyeloid neoplazmalar (t-MN); miyelodisplazi ile ilgili değişiklikler (MRC) ile AML; AML, aksi belirtilmemiş (NOS); miyeloid sarkom ve Down sendromu (DS) ile ilgili miyeloid proliferasyonlardır (58). Tablo 2'de WHO sınıflandırma sistemi özetlenmiştir.

Tablo 2: AML'nin WHO Sınıflandırması (59)

Tekrarlayan Genetik Anomalilerle Seyreden AML
• AML, t (8:21) (q22; q22); (RUNX1-RUNX1T1) • AML, inv(16)(p13.1q22) veya t(16;16)(p13.1;q22); (CBFβ/MYH11) • Akut promiyelositik lösemi; t(15;17)(q22;q12) (PML/RARA) ve varyantları] • AML, t(9;11)(p21.3;q23.3); (MLLT3-KMT2A) • AML, t(6;9)(p23;q34.1); (DEK-NUP214) • AML, inv(3)(q21.3q26.2) veya t(3;3)(q21.3;q26.2); (GATA2, MECOM) • AML (Megakaryoblastik); t(1;22)(p13.3;q13.3); (RBM15-MKL1) ile AML • BCR-ABL1 ile AML • NPM1 mutasyonlu geni ile AML • CEBPA geninin biallellik mutasyonlarına sahip AML • FLT3 mutasyonlu AML • RUNX1 mutasyonlu geni ile AML
Miyelodisplazi ile İlişkili Değişikliklerle Seyreden AML
Tedaviye Bağlı Miyeloid Neoplazmalar
• Alkilleyici ajanlar ile ilişkili olan AML • Topoizomeraz II inhibitörü ile ilişkili olan AML • Diğer çeşitler
Tanımlanmış Gruplara Girmeyen AML
• Minimal farklılaşma gösteren AML • Olgunlaşma göstermeyen AML • Olgunlaşma gösteren AML • Akut miyelomonositik lösemi • Akut monoblastik ve monositer lösemi

• Akut eritroid lösemi • Akut megakaryositik lösemi • Akut bazofilik lösemi • Akut miyelofibrozis ile panmiyeloz lösemi
Miyeloid Lösemi (sarkom)
Down Sendromu ile ilişkili Miyeloid Proliferasyonlar
• Down sendromu ile ilişkili geçici anormal miyelopoezis (TAM) • Down sendromu ile ilişkili miyeloid lösemi

2.2.3. Etiyoloji

AML'de, miyeloid hücrelerdeki malingn dönüşümüne sebep olan genetik mutasyonların kesin olarak anlaşılamamasına rağmen , akut lösemi oluşumuna etki eden birçok çevresel ve genetik risk faktörü açıklanmıştır. Bunlar arasında yaş, önceden geçirilmiş çeşitli hematolojik hastalıklar, çeşitli genetik hastalıklar, virüs enfeksiyonu, radyasyon ve diğer kimyasallara maruziyet, kemoterapi geçmişi gibi çeşitli risk faktörleri vardır. Bu faktörler neticesinde oluşan vaka sayısı azdır. AML vakalarının çoğu, herhangi bir ajana maruz kalmadan de-novo olarak da meydana gelebilir ve hiçbir lösemi etmeninin maruziyeti gözlemlenmez. Hematopoetik öncül hücrelerin malign hücre transplantasyonu çeşitli aşamalarda farklı indükleyici ajanlara duyarlılığına gereksinim duyan çok adımlı bir süreçtir (56). AML ile ilişkili çeşitli risk faktörleri Tablo 3'te özetlenmiştir.

Tablo 3 : **Akut Miyeloid Lösemi ile İlişki Risk Faktörleri (60) verileri kullanılarak oluşturulmuştur.**

Genetik Hastalıklar/Kalıtsal Faktörler	Ailede AML Öyküsü Ailevi Trombosit Hastalıgı (FPD) Ataksi Telenjiektazi Bloom Sendromu Diamond-Blackfan Sendromu Diskeratozis Konjenita Down Sendromu Dubowitz Sendromu Fankoni Anemisi Klinefelter Sendromu Konjenital Amegakaryositik Trombositopeni Kostman Sendromu Li Fraumeni sendromu Naxos Sendromu Nörofibromatozis Tip I Noonan Sendromu Patau sendromu Poland Sendromu Schwachman – Diamond sendromu Seckel Sendromu Willms Tümörü Wolf Hirschhorn Sendromu
Fiziksel ve Kimyasal Faktörler	Benzen Pipobroman gibi ilaçlar Embalming (mumyalama) sıvıları Pestisit Herbisitler Sigara kullanımı
Radyasyon	Terapötik olan ve terapötik olmayan radyasyon

Kemoterapi	Alkilleyici ajanlar Topoizomeraz - II inhibitörleri Antrasiklinler Taksanlar

2.2.4. Klinik Bulgular ve Teşhis

AML klinik ve genetik olarak heterojen bir hastalıktır. AML vakalarının büyük bir kısmında yorgunluk, iştahsızlık ve buna bağlı olarak kilo kaybı ile başlayan semptom ve bulguları, anemi, trombositopeni ve nötropeni takip eder. Bu hastalarda, anemiye bağlı olarak gelişen solgunluk, halsizlik ile birlikte hastalarda çarpıntı, nefes darlığı ve çabuk yorulma sıklıkla gibi bulgularda mevcuttur (61). Hastalarda trombositopeni gelişimine bağlı olarak morarma (kol ve bacaklarda), diş eti kanaması, peteşi, epistaksis ve konjonktival kanamalara ek olarak deri yaralanmaları sonucunda meydana gelen durmayan kanamalar hastalığın hemorajik erken bulguları arasında yer alır. Bu bulgular, tanı koyma esnasında hastaların yaklaşık olarak %50'sinde gözlemlenir. AML hastalarında genellikle ALL hastaları kadar sıkça görülen kemik ağrısı şikayeti yoktur (62).

AML hastalarının periferik kan örnekleri incelendiğinde kan değerlerinin normale göre çok yüksek olması, tanı için önemli bir belirteçtir. Ayrıca kemik iliği yayma teknikleri de kullanılarak, lösemik hücrelerin detaylı incelenmesi sonucu AML tanısı konulabilmektedir. Kemik iliği kullanılarak AML tanısı koyabilmek için kanda ve kemik iliğinde bulunması gereken blast oranının %20 ve üzerinde olmalıdır. Fakat hastada kromozomal translokasyonlardan t(8;21), t(15;17), t(16;16) veya inv(16) anomalilerinin saptanması durumunda blast sayısısının %20'lik şartına bakılmaksızın AML tanısı konulabilmektedir. Ayrıca kemik iliği aspirasyonu ve biyopsisi işlemi ile lösemik hücre miktarının tayini ve AML hücre tipinin teşhis edilmesiyle hasta AML tanısı alabilir. Önemli prognostik faktörlerden biri olan sitogenetik analizler ile hastalarda kromozomal anomaliler saptanarak AML tanısı koymak mümündür. Benzer olarak periferik kanın immünofenotiplemesi yoluyla da AML tipinin tayini gerçekleştirilerek tanıda belirleyici olabilir (63).

2.2.5. Prognoz

AML'de bulunan çok sayıda klinik, biyolojik ve patolojik özellikler, prognozun doğru bir açıdan değerlendirilmesinde olumlu etkilere sahip gibi görünseler de, yalnızca birkaç prognostik faktör, biyobelirteç olarak kabul görür. Ayrıca pratik çalışmalarda da bu faktörler etkili olmaktadır (64). Tedaviye verilen yanıtı etkileyen prognostik faktörler arasında yaş, sitotoksik terapiler, önceden geçirilmiş hematolojik hastalıklar ve diğer klinik faktörler yer almaktadır. AML prognozunu belirlemede kritik önemdeki risk faktörleri, deneysel çalışmalar ile gösterilen ya da gösterilecek olan potansiyel yeni biyobelirteçler sayesinde kontrol altına alınarak daha başarılı bir tedavi imkânı sunabilir (41). AML'de kötü prognostik faktörler; ileri yaş (60 yaş üstü), tedavi öncesi düşük performans değeri, lökosit sayısının 20.000/mm^3'ü aşması ya da artmış serum laktat dehidrogenaz miktarı, geçirilmiş bir kemoterapiye sekonder veya MDS benzeri tablonun AML'ye dönüşmesi, sitotoksik maddelere maruz kalma, MDS ya da MPN geçmişi şeklinde sıralanabilir. Ayrıca genetik değişiklikler, potansiyel çoklu ilaç direnç genlerinin analizi ve immünfenotipik değerlendirme de prognostik sonuçlara (skor) dair bilgi edinmeye yardımcı olur (65). Klinik faktörler göz önüne alındığında yaş artışı, tedavi öncesi düşük performans değeri, genel sağkalım (OS) oranındaki düşüş ve düşük tam remisyon oranları (CR) tedaviye yön verebilmektedir. Önemli prognostik bilgi edinmede sitogenetik ve moleküler analizler (miyeloblastların) de kritik bir role sahiptir. belirleyici bir etkisi bulunmaktadır (66).

AML'nin gelişiminde somatik mutasyonlar, kromozomal translokasyonlar, delesyonlar ve genetik varyasyonlar gibi çeşitli değişiklikler, miyeloid kök hücrelerin klonal popülasyonuna çoğalabilme ve hayatta kalabilme avantajı sağlar (67). AML prognozu ile ilişkili olduğu bilinen temel role sahip edinilmiş genetik bozukluklar Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4 : AML'de prognozu etkileyen genetik faktörler (68)

İyi Prognoz	Orta Prognoz (Nötr)	Kötü Prognoz
• inv(16) • t(16;16)	• +8, • +11,	• FLT3-ITD mutasyonu

• t(8;21)
• t(15;17)
• Normal karyotip:
  ○ NPM1 mutasyonu
  ○ CEBPA mutasyonu
	• +13,
	• +21(Down Sendromu)
	• t(9;11)
	• c-KIT mutasyonu
	• -Y
		• Kompleks karyotip (≥3 klonal kromozomal anomali)
		• del(5q), -5
		• -7, 7q
		• 11q23
		• inv(3), t(3;3)
		• t(6;9)
		• t(9;22)

AML prognozu ile ilişkisi gösterilen genlerindeki tekrarlayan mutasyonlar, miyeloid hücre farklılaşma ve kendini yenileme sürecinin epigenetik düzenlenmesinde sıklıkla işlev gören genlerdir. Bunlardan DNMT3A, ASXL1, IDH2 ve TET2 genlerindeki mutasyonlar, AML gelişiminin erken evrelerinde ortaya çıkan ve prelösemik HSC'lerde de bulunan mutasyonlardır. Prelösemik HSC'ler, farklılaşma yeteneği diğer HSC'lerden çok daha çeşitlidir ve kemoterapi direnci sayesinde hayatta kalarak hastalığın nüksetmesine sebep olabilir (69).

2.2.6. Tedavi

AML, heterojen bir karaktere sahip olduğu için değişik alt gruplarda bulunan her hastanın, hastalık semptomları, tedavi süreci ve tedaviye yanıtları da farklı olmaktadır (70). Tedavideki gelişmelere rağmen, temel uygulama tekniği allogenik kök hücre transplantasyonuna (sitarabin ve antrasiklin bazlı) dayanmaktadır. Mutasyonlar AML'nin prognozu bakımından oldukça kritik bir role sahiptir (57). AML tedavisinde standart olarak remisyonun başlaması için kemoterapi ve ardından ışın tedavisi ile hematopoetik kök hücre nakli (HSCT) gibi terapiler uygulanır. Bu terapiler için kullanılan kemoterapötikler, replikasyon ve/veya transkripsiyonu bloke eden anti-metabolitler ve allojenik hematopoetik kök hücre transplantasyonu (allo-HSCT) gibi bir takım komplikasyon ve kısıtlamalar içerir (71). Buna rağmen allo-HSCT, AML hastalarında sitogenetik riske bağlı olarak etkinlik göstermektedir. Ayrıca orta ve yüksek risk taşıyan AML hastalarının bir kısmında nüksüz ve genel sağkalım sürelerini de ciddi ölçüde uzatmaktadır. Allo-HSCT için uygun görülen hastalara, remisyon sonrası birinci basamak

pekiştirme (kondalidasyon) tedavisi uygulamak amacıyla tavsiye edilmektedir (72). Genomik ve proteomik düzeyde geliştirilen teknolojiler, AML'nin moleküler biyolojisinin daha iyi anlaşılması ve AML alt gruplarının daha iyi karakterize edilmesiyle hedefe yönelik tedavi ve ilaç geliştirilmesi için yeni fırsatlar sağlamaktadır (73).

2.3. MİKRORNA

MikroRNA'lar (miRNA'lar), gen ekspresyonunun transkripsiyon sonrası seviyede regüle edilmesinde önemli rol oynayan oldukça korunmuş, protein kodlamayan, yaklaşık 19-24 nükleotit uzunluğundaki küçük tek sarmallı RNA'lardır (74). MiRNA'lar, genel olarak hedef mRNA'nın 3' UTR (untranslation region) tanıma bölgelerini hedefleyerek kuvvetli bir baz eşleşmesi gerçekleştirir. Bu baz eşleşmesi sonucunda hedef mRNA'nın post transkripsiyonel ya da translasyon seviyesinde gen ekspresyonu aşağı regüle edilir ve baskılanır (75). İnsan genomundaki olgun miRNA'lardan yaklaşık 2578'i ve bunlardan öncül miRNA geni olarak toplam 1872'si tanımlanmıştır. MiRNA'ların tüm türlere özgü korunmuş diziler içermeleri sayesinde hücrelerde çeşitli şekillerde ifade edilirler (76). MiRNA ifade düzeyi profilleri, sağlıklı hücreler ve kanser hücrelerin ayırt edilmesinin yanında diğer birçok hastalığın da patogenezine katkı sağlar. Yapılan çalışmalar, miRNA'ların çeşitli tümör hücrelerinin gelişimi, ilerlemesi, farklılaşması, proliferasyonu ve diğer hücreler ile arasındaki etkileşimi gibi patalojik ve biyolojik çeşitli süreçleri düzenleyen onkogenler ve/veya tümör supresörler olarak kanser gelişiminde baskılayıcı işlev gördüğü kanıtlamıştır (77). Ayrıca çeşitli hastalıkların gelişiminde, tedavisinde ve preeklampsi gibi gebelik bozukluklarında da anahtar role sahiptirler. Annenin kan dolaşımında görülen miRNA'lar, plasenta dokusunda yoğun olarak eksprese edilerek plasenta gelişimi, gebelikteki olumsuzlukların engellenmesi ile embriyonun sağlıklı gelişimi için hayati değer taşımaktadır (76).

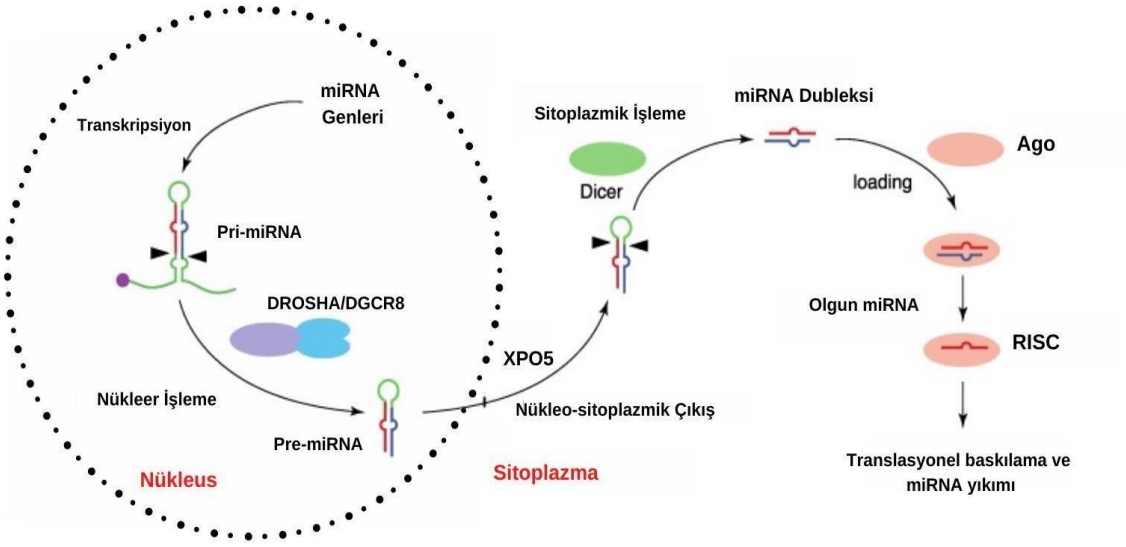
MiRNA'lar, 1993 yılında ilk olarak Lee, Feinbaum ve Ambros'un çalışmalarıyla Caenorhabditis elegans'ta keşfedilmiştir ve ilk bilinen miRNA lin-4'tür. Fakat ilk miRNA teriminin kullanılması, 2001 yılında gerçekleşmiştir (78). 2000 yılında heterokronik bir gen olarak ilk kez C. Elegans'ta tanımlanan 22 nt uzunluğunda, larvanın gelişim zamanlamasını regüle eden ikinci miRNA, Let-7'dir. Lin-4'te olduğu gibi Let-7 de, çeşitli genlerin 3'UTR bölgesine bağlanarak ekspresyon seviyelerini düzenler (79). İlk olarak

heterokronik genler için yapılan mutajenez taramaları aracılığıyla nematod C. elegans'ta keşfedilen RNA bağlayıcı protein Lin28'dir. Lin28 proteinleri, let-7 miRNA'larını inhibe ederler ve mRNA translasyonunu etkileyerek memelilerde embriyonik kök hücrelerin kendini iyileştirip yenilemesini regüle eder (80). İlerleyen yıllarda yapılan çalışmalarda çok hücreli organizmaların tamamında Lin-4 ve Let-7 benzeri pek çok küçük RNA molekülü bulunmuştur ve bunlar genel olarak miRNA grubuna aittir (81).

2.3.1. miRNA Biyogenezi

MiRNA'ların ekspresyon seviyeleri birden fazla şekilde düzenlenebilir. MiRNA'nın gen ekspresyonunu düzenleyebilmesi için bazı biyogenez süreçlerini izlemesi gerekmektedir. MiRNA'lar, intragenik miRNA'lar (konak gen) ile birlikte RNA Polimeraz II tarafından veya intergenik miRNA'ların mevcut olan kendi promotörleri aracılığıyla konakçı genden bağımsız olarak kopyalanabilir ve transkripsiyonel düzeyde eksprese edilirler (75). MiRNA'nın biyogenezi, miRNA'nın birincil trankriptlerinin ya da primer miRNA (pri-miRNA)'nın genomun farklı bölgelerindeki transkripsiyonunun, RNA polimeraz II/III'ün etkisiyle çekirdekte başlar ve sitoplazmada sonlanır (82). Olgun miRNA dizisine sahip uzun miRNA (pri-miRNA)'dan oluşan yaklaşık 70 nükleotitlik bu molekül, saç tokasına (hairpin) benzemektedir. Oluşan bu saç tokası benzeri yapı, Drosha (RNase III enzimi) ve çift sarmallı RNA (dsRNA) bağlayıcı ortak protein Pasha/DGCR8'den (kofaktör) oluşan bir mikroişlemci kompleksi (Microprosessör kompleksi) tarafından tanınınarak kesilir ve pri-miRNA, 60-70 nükleotitlik olgun ve aktif formu olan, pre-miRNA (prekürsör miRNA)'ya dönüşür (83). Pre-miRNA, nükleustan Exportin-5 (XPO5) ve Ran-GTPaz ile etkileşime girerek sitoplazmaya aktarılır. Sitoplazmada RNase III endonükleazı olan Dicer, pre-miRNA'yı 21-24 nükleotidlik çift iplikli olgun miRNA formuna keser. Dubleks formdaki bu yapı, ATPaz/RNA helikaz enzimi aracılığıyla kesilerek tek iplikli hale gelir (9). Gen ifadesinin susturulması, miRNA'nın mRNA ile arasındaki baz eşleşmesini tamamalandığında, mRNA'yı degrede etmesiyle gerçekleşir. miRNA biyogenezini Şekil 3'te özetlenmiştir. Baz eşleşmesinin tamamlanmadığı durumda mRNA degrede olmasa bile protein translasyonu, başlatma evresinde doğrudan baskılanabilir ya da miRNA-RISC kompleksi, yüksek konsantrasyonda enzim içeren fakat ribozomlardan yoksun ve mRNA depolanması, dönüşümü, bozulması gibi süreçlerde işlev gören spesifik sitoplazmik alanlar olan

processing bodies'e (Pbodies) translokasyon yapabilir (84). mRNA degregasyonu gerçekleşmeye başlarsa protein üretimi sırasında ribozomlar işlev görmez ve mRNA'daki tek iplik kaybolarak proteinin parçalanmasına yol açabilir. Sonuç olarak miRNA biyogenezi, hücreler tarafından sıkı bir şekilde kontrol altında tutulması ve hücresel homeostazın sağlanması için önemli aşamaları içerir (85). miRNA'ların hücresel süreçlerde düzenleyici gücü incelendiğinde, ekspresyon düzeylerinin kontrol altında kalması ve biyosentez yolu boyunca bütün aşamalarda kalite kontrolünün devamlılığının sağlanması oldukça önemlidir (86).



Şekil 3: mikroRNA Biyogenezi (87)'den değiştirilerek alınmıştır.

2.3.2. miRNA ve Kanser

Hücrelerin anormal ve kontrolsüz çoğalması ile apoptozun yitirilmesi, genellikle tümörogenez başlangıcı olarak görülmektedir. Kanser vakalarından alınan doku, plazma veya serum örneklerinin, sağlıklı kişilerden alınan örneklere göre birçok miRNA'nın anormal ekspresyon seviyesine sahip olduğu gösterilmiştir (83). Bu miRNA'ların çeşitli kanser türlerinde (solid, hematolojik) patogenez, prognoz ve gelişim gibi çeşitli süreçler üzerindeki etkilerinin gösterilmesi ile kansere sebep olan genetik faktörlerin çeşitliliği ve karmaşıklığı anlaşılmıştır (88). MiRNA'ların kanser hücrelerinin progresyonu, farklılaşması, proliferasyonu ve apoptozu gibi çeşitli hücresel süreçlerin

düzenlenmesinde pek çok kritik role sahip olduğu bilinmektedir ve kanser hücrelerinin *fenotipik olarak* heterojenliğini ve malignitesini korumak için miRNA düzensizliği ya da anormal miRNA ekspresyonu temel noktadır (89, 90). MiRNA ifade düzensizliğinin tümörogenezde ve çeşitli patolojik bozukluklarda spesifik bir terapötik ajanın hedefi veya potansiyel biyobelirteç olabileceği gösterilmiştir. MiRNA'lar, hedef gene bağlı olarak kanser hücrelerinin gelişimini artırmak ve/veya baskılamak için onkogenik (onkomiR) veya tümör supresör genler olarak işlev görürler (6, 91). Onkogenik miRNA'lar, tümörsupressor genleri ve/veya hücre farklılaşmasını veya hücre apoptozundan sorumlu genleri negatif yönde regüle ederek kanser gelişimini ve ilerlemesini destekler. Buna karşın tümörsupressor genler ise hücre farklılaşmasını veya hücre apoptozunun kontolünden sorumlu onkogenleri ve/veya diğer genleri regüle ederek kanserler proliferasyonunu ve gelişimini inhibe eder (92). miRNA ekspresyon düzensizliğinin sebepleri olarak kromozomal anormallikler, amplifikasyonlar, tek-baz değişimleri (nokta mutasyonları), bozuk DNA metilasyonu gibi birçok genetik ve epigenetik değişiklik yer alabilir. İnsan miRNA'larının ~%52,5'lik kısmı, çeşitli kanserler ile ilişkisi olduğu bilinen genomik bölgelerde veya kırılgan (frajil) bölgelerde yer alır. Bunun meydana gelmesinin sebeplerinden biri de miRNA'nın biyosentezi sırasında kullanılan Drosha ve Dicer gibi enzimlerin işlevlerindeki varyasyonlardır (92). Bu spesifik bölgelerde bulunan miRNA genlerinin miRNA'yı kodlayabilme özelliğine sahip olmaları miRNA'ların kanserin tanı, tedavi ve gelişimindeki önemini ortaya koymuştur (93). Bu miRNA genleri genellikle frajil bölgelerde bulunmakla birlikte, minimal boyutta bir heterozigotluk kaybı (LOH) bölgesi (tümör supresör geni içerebilen), amplifikasyon bölgesi (onkogenler bulundurabilen) veya ortak kesme noktası bölgelerinde de bulunabilir. Ortaya çıkan bu bulgular değerlendirildiğinde, malign hücrelerde görülen anormal miRNA ifade düzeyleri, miRNA genlerini içeren özelleşmiş genomik bölgelerin çoğaltılması (minimal amplikonlar) veya tamamen delesyonu nedeniyle olabilir (94).

Tömörogenez ve miRNA ilişkisi ilk olarak 2001 yılında Calin ve ark. tarafından KLL hastaları üzerinde yapılan çalışma ile gösterilmiştir. Bu çalışma ile KLL vakalarının yaklaşık %50'sinden fazlasında 13q14 kromozomal delesyon bölgesine yaygın olarak rastlanmış ve bu bölgede yetişkin insan lösemisi olarak bilinen mir-15-a ve mir-16-1 genlerinin minimal bir yere sahip olduğu gösterilmiştir (95). Apoptozu baskılayan ya da indükleyen BCL2 (B hücreli lenfoma 2) geninin, miR15-a ve miR16-1 tarafından post-transkripsiyonel düzeyde negatif olarak regüle edildiği ve kemosensitizör olarak antisens

BCL2'nin aşırı ifade edildiği lösemiler, lenfomalar ve karsinomlar da dahil çeşitli insan kanserlerinde önemli bir terapötik potansiyel taşıdığı bildirilmiştir (96).

İlerleyen çalışmalarda benzer olarak meme kanserinde (97), akciğer kanserinde (98), Burkitt's lenfomada (99), tiroid kanserinde (100), prostat kanserinde (101), malign beyin tümörlerinde (102), hepatosellüler karsinomda (103) ve kolon kanserinde (104) değişik ekspresyon seviyelerine sahip miRNA'ların varlığı gösterilmiştir (83). Sonuç olarak 2000'li yıllardan günümüze kadar keşfedilen birçok miRNA'daki ifade değişiminin çok sayıda kanser süreciyle ilişkili olabildiği ortaya konmuştur.

2.3.3. miRNA ve AML

Kodlamayan küçük RNA moleküllerinden olan miRNA'ların, hücresel proliferasyon, gelişim, sağkalım, apoptoz ve farklılaşma gibi AML gelişim evrelerinin hemen hemen tümünde bir dizi düzenleyici role sahip olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular neticesinde AML hastalığına özgü miRNA ekspresyon profilleri tanımlanarak AML'nin çok sayıda sitogenetik alt tipleri için ayıt edici sınıflandırma imkânı sağlanmıştır (105). miRNA'lar değişken ekspresyon profilleri sayesinde AML'nin klinik uygulamalarında, biyobelirteçler olarak potansiyel kullanım alanına sahiptirler (106). Yapılan çalışmalarda miRNA'ların AML dahil, birçok kanserde kanserin başlangıcı, gelişimi ve ilerlemesindeki aktif rol oynadıkları ve anormal miRNA ekspresyon paternlerinin kanserlerin alt gruplarının sınıflandırılması konusunda doğrudan ilişkili olabileceği gösterilmiştir (107, 108). AML'deki ifade edilen miRNA'ların tümör baskılayıcı gen ve/veya onkogen olarak işlev görmesi moleküler, klinik ve terapötik sonuçlara katkıda bulunmaktadır (109, 110). Tümör baskılayıcı işleve sahip mir-29a ifade düzeylerinin AML vakalarında normal dokulara kıyasla azaldığı ve klinik uygulamalardaki pediyatrik AML vakalarında kötü prognozla ilişkilendirildiği gösterilmiştir (111). AML'de tümör supresör fonksiyonuna sahip olan miR-193b'nin düşük ifade düzeylerine sahip olduğu ve AML hücresinin sağkalımının ve çoğalmasının dengede tutulmasını sağlayan mitojen aktif protein kinaz (MAPK) yolağının regüle edilmesinde aktif görevinin olduğu gösterilmiştir. Bu durum da miR-193b'nin AML kliniğinde potansiyel bir tedavi tercihi ve biyobelirteci rolüne sahip olabileceğini göstermektedir (112). Yapılan başka çalışmalarda t(8;21), inv(16) ve t(15;17) translokasyonu gibi iyi prognoza göstergesi olan sitogenetik bulgusu olan AML hastalarında let-7b, miR-9 ve miR-124-1'in ekspresyon

düzeylerinin azaldığı ve daha uzun ve nükssüz sağkalım ile ilişkili olabileceği gösterilmiştir (113). Xu H. ve ark. miR-135a'nın AML hastalarında azalan ekspresyon profili gösterirken HOXA10 genini hedefleyen miR-135a'nın artan ekspresyon düzeylerinin hücre proliferasyonunu baskılayarak apoptozu indüklediğini ortaya koymuşlardır (114). AML'de ve genellikle M2 alt gurubunda onkogenik işlev gösteren miR-375, let-7a-3 ve miR-378'in ekspresyon düzeylerindeki aşırı artışı AML'de kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (115). AML'de en sık rastlanan sitogenetik ve moleküler anomaliler ile kuvvetli ilişkiye sahip bazı miRNA ekspresyon modelleri tanımlanmıştır (Tablo 5). AML'de en doğru tedaviyi belirlemek ve hastalığın klinik sonuçlarını iyileştirmek için miRNA dünyasının daha derinliklerine inilerek yeni araştırmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

Tablo 5: **AML'deki sitogenetik anomaliler ile ilişkili miRNA Ekpresyon Profillemesi (107, 116)**

Sitogenetik Anomaliler	**Ekspresyonu artan miRNA'lar**	**Ekspresyonu azalan miRNA'lar**
t(15;17)	miR-127 miR-299 miR-323 miR-368 miR-382	miR-17
t(8;21)	miR-126/miR-126*	miR-133
inv(16)		
t(11q23)/MLL	miR-326 miR-219 miR-17-92 miR-196a	miR-29s miR-34a miR-16

Trisomy 822	miR-124a	miR-30d

Miyeloid lösemi oluşum ve gelişiminde en sık rastlanan miRNA'lar; miR-155, miR-196b, miR-29 ve miR-223'tür. Bu miRNA'lardan miR-155 ve miR-196b'nin ekspresyon düzeylerinde artış, mir-223 ve miR-29b-1'nin ekspresyon düzeylerinde ise azalma görülmektedir (107).

2.3.4. Let-7b-5p

Let-7 miRNA aile üyelerinin genellikle hücrede tümörsupresör (TsmiR) olarak görev yaptığı ve hücre proliferasyonu, migrasyonu, metastazı gibi hücresel süreçlerde kritik rol oynadığı yapılan çeşitli çalışmalarla ortaya çıkarılmıştır (117). Let-7 miRNA ailesinin merkezi üyesi (7 miRNA arasından) olan Let-7b-5p, tüm periferik kan hücrelerinde ifade edilir ve hücre döngüsü, çoğalması ve farklılaşması gibi hücresel süreçlerde kritik bir düzenleyici olarak görev alır (118). Ayrıca let-7b-5p, çeşitli onkogenlerin ve sitokinlerin ifadelerini regüle ederek insan tümör hücrelerinin değişik tiplerinde kanserin büyümesine, çoğalmasına, yayılmasına ve metastazına katılarak önemli bir tümör baskılayıcı olarak işlev görmektedir (14). Let-7b-5p, 22q13.31 kromozom pozisyonunda bulunan 20-24 nükleotid uzunluğuna sahip bir miRNA'dır. Çeşitli kromozomal dengesizlikler veya heterozigotluk kaybı miRNA'ların anlatımlarının değişmesine sebep olur (119). Let-7b-5p, PKA1, DIAPH2, RDX, Ras, c-MYC ve HMGA2 gibi pek çok geni hedefleyerek çeşitli hastalıkların sinyal yolaklarının düzenlenmesinde rol almaktadır. Yapılan deneysel çalışmalar sonucunda, let-7b-5p'nin multiple miyelom (119), AML (120), multiple sclerosis (MS) (118) mide (121), melanoma (122), akciğer (123), fibroadenom ve meme (124), over (125), glioblastoma (126), pankreas (127), hepatosellüler karsinom (128) kolorektal (129) ve prostat (14) kanseri gibi pek çok kanser türünde önemli ölçüde aşağı regüle edildiği ve genellikle tümörü inhibe edici işleve sahip olduğu bildirilmiştir. Bu durum let-7b-5p ekspresyon seviyelerinin hastalığın kötü sağkalımıyla bağlantılı olduğunu göstermiştir. Let-7b-5p'nin aşağı regüle edilmesi, meme karsinogenezinde, DNA onarım özelliği gibi farklı bir düzenleyici role sahip olduğunu ve aynı şekilde osteosarkom dokularında ve hücre hatlarında da tümör inhibe edici özelliğini (anti-tümör etki) gösterir. Bu durum da let-7b-

5p‘nin IGF1R geninin hedeflemesi ve proteininin ekspresyonunu baskılamasından kaynaklandığını göstermiştir (130).

Çeşitli kanserlerde let-7b-5p’nin aşırı ekspresyonunun, hücre proliferasyonunu, invazyon ve migrasyonu baskıladığı ve sırasıyla metiltiazoletetrazolyum (MTT) ve akış sitometresi aracılığıyla hücre apoptozunu indüklediği gösterilmiştir (131). Let-7b-5p’nin aşırı ekspresyonu pro-inflamatuar genlerin ekspresyonunu önemli ölçüde baskıladığı, buna karşın let-7b-5p'nin baskılanmasının, sitokin ekspresyonun seviyelerinde karşılıklı olarak yukarı regüle edildiğini göstermektedir (132). Buna karşın prostat kanseri (PCa) hücrelerinde let-7b-5p ve TNF-a ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı ve pozitif korelasyon vardır. PCa hücrelerinde let-7b-5p, IL-12, IL-23, IL-10 ve TNF-a gibi çeşitli inflamatuar sitokinlerin ekspresyonunu regüle eder ve let-7b-5p’nin yukarı regülasyonu, tümörle ilişkili maktofajların (TAM’ların) tümör gelişiminde ve ilerlemesinde indükleyici rol oynaması ile yüksek ölçüde ilişkilendirilmiştir. Buna bağlı olarak prostatik TAM'lerde let-7b-5p’nin aşağı regülasyonu yoluyla pro-anjiyogenezin etkisinin ve prostat karsinomu (PCa) hücre göçününün engellendiği doğrulanmıştır. PCa hücrelerinde let-7b-5p’nin aşağı regülasyonu, makrofaj polarizasyonunu düzenleyerek prostat kanseri prognoz riskini arttırması ile ilişkilendirilmiştir (133). Kanser dışında Alzheimer hastalığı ve Multiple sklerozda da umut vaat eden kritik bir miRNA biyobelirteci olabileceği ileri sürülmüştür. (134).

2007 yılında Mi S ve ark. tarafından ilk defa let-7b-5p’nin AML’deki rolü gösterilmiştir. ALL ve AML’deki lösemogenez mekanizmaları arasındaki farkın anlaşılması ile bu iki lösemi türüne ait vakaların en doğru şekilde teşhis edilip birbirinden ayrılması amacıyla yapılan çalışmada, AML ve ALL hastalarından alınan kemik iliği örneklerinde let-7b-5p, AML’de ALL’ye kıyasla anlamlı derecede daha yüksek ifade edildiği gösterilmiştir. Let-7b-5p’nin yanında miR-128a, miR-128b, ve miR-223 ekspresyon düzensizlikleri ALL’yi AML’de ayırt etmeyi sağlayan minimum ölçüt olarak varsayılabilir. Bu çalışma ile epigenetik düzenleme mekanizmalarının, AML’de miRNA ekspresyonlarının düzenlenmesinde kritik bir role sahip olabileceği gösterilmiştir (135). Kanser türleri ve diğer hastalıkların tedavileri ile ilgili yapılan deneysel ve klinik çalışmalardan elde ettiğimiz anlamlı veriler, let-7b-5p’nin hastalar için umut vaad eden terapötik potansiyel taşıdığını açıkça ortaya koymaktadır.

2.3.5. Let-7b-3p

Let-7b-3p, tümör baskılayıcı işlevdeki miRNA'lardan let-7 ailesinin üyelerinden biridir. Let-7b-3p, genomda 22. kromozom üzerinde bulunup başlangıç ve bitiş nükleotidleri; 46113686-46113768 (hg38) ve transkript NR_029479.1' in genomik lokusu üzerinde yer alır (www.ds.biogps.org). Önceden miRNA biyogenezinde -3p kökenli miRNA'ların işlevsel olmadığı sanıldığından -3p kökenli miRNA'ların önemi -5p kökenli miRNA'lardan çok daha sonra anlaşılmıştır. Bu nedenle -3p kökenli miRNA'ların hastalıklarla ilişkisi daha az araştırılmıştır (136). Let-7b-3p miRNA'sı çeşitli hastalıkların patogenezini, biyolojik süreçlerini ve sinyal kanallarını regüle edebildiği ve çeşitli kanserlerde, hücre proliferasyonu, hücre invazyon ve migrasyonu, hücre apoptozu gibi çoklu mekanizmaları düzenleyerek tümör hücrelerinin gelişimini inhibe edebildiği gösterilmiş olmasına rağmen literatürde let-7b-5p miRNA'sına kıyasla çok daha az çalışma mevcuttur (137). Let-7b-3p'nin ekspresyon seviyesi farklı doku ve hücre tiplerinde değişkenlik göstermektedir. He Z ve ark. let-7b-3p'nin, HCC (hepatosellüler karsinomun) dokularında PLK1 genini hedefleyerek ekspresyonunu aşağı yönde düzenleyerek HCC hücrelerinin gelişimini ve proliferasyonunu in-vivo ve in-vitro olarak engellediğini ve PLK1 aracılı Survivin fosforilasyon seviyesini azaltarak apoptozlarını desteklediğini göstermiştir (16). Min ve ark. let-7b-3p'nin erken evredeki kolon kanseri hastalarının tespit edilmesinde önemli bir biyobelirteç olabileceğini ileri sürmüştür. Ayrıca plazmadaki miRNA'lar (let-7b-3p, miR-139-3p, miR-150-3p ve miR-145-3p) ile ekzosomlardan türetilen miRNA'ların kombine kullanımının, erken evre kolon kanserini tespit etmede daha yüksek etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (138). Li Y ve arkadaşları tarafından akciğer kanserinin bir alt tipi olan akciğer adenokarsinomunda (LUAD) let-7b-3p'nin artan ekspresyonu, hedeflenen BRF2 geninin ekspresyonunu aşağı regüle ederek in vitro ve in vivo olarak LUAD hücrelerinin gelişimini, çoğalmasını, yayılımını ve hücre apoptozunu kuvvetli bir şekilde baskıladığı gösterilmiştir. Tersine let-7b-3p ekspresyonunun azalması BRF2 geninin ifadesini arttırarak hücre soylarında ve dokularında LUAD gelişimini indüklemiştir. LUAD hastalarında let-7b-3p ekspresyon seviyelerinin sağlıklı olanlara göre daha düşük olduğu bildirilmiştir ve düşük ekspresyon kötü bir prognozla ilişkişlendirilmiştir. (137). Ayrıca let-7b-3p özofagus kanseri (139) Ewing sarkomu (140) dahil olmak üzere çok sayıda malign tümörler ile ilişkilendirilmiştir (141). Chen ve arkadaşları tarafından, mekanizması henüz tam olarak netleşmemiş, beyin arteriyovenöz malformasyonu (BAVM) hastalarından alınan serum örneklerinde let-7b-

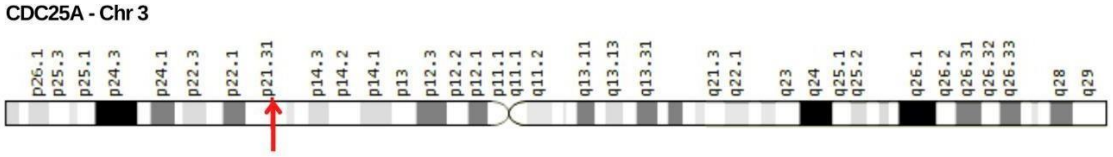
3p'nin ekspresyonunda artış meydana geldiği bildirilmiştir (142). Kar S ve ark, genom çapında ilişkilendirme çalışması (GWAS) yaparak, serebral kavernöz malformasyonlu (CCM'li) hastalara ait serum örneklerinde let-7b-3p ekspresyon seviyesinin anlamlı ölçüde azaldığını göstermişlerdir (143).

2.4. TEZDE ÇALIŞILAN LET-7B-5P VE LET-7B-3P 'NİN POTANSİYEL HEDEF GENLERİ

2.4.1. CDC25A

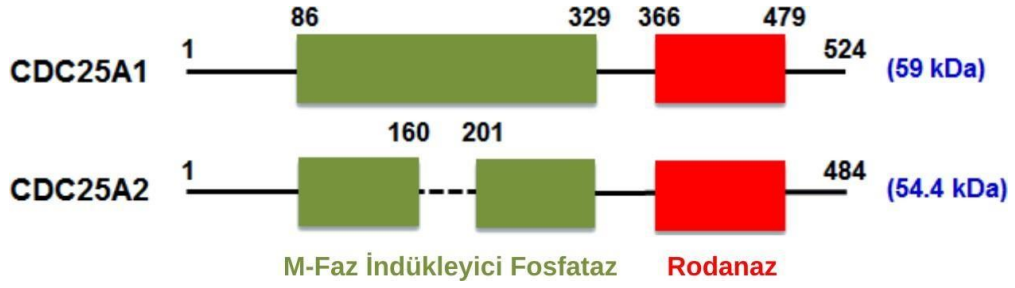
CDC25A (Cell division cycle 25), CDC25 fosfataz izoformlarından birisidir. CDC25A bir onkogenik gen olma potansiyeline sahiptir fakat mevcut çalışmalarda onkogenezdeki rolü kesin olarak bildirilmemiştir (144). Yalnızca CDC25A'nın onkogenik işlevi, tümör oluşumu ve gelişimine neden olan Neu ve RAS gibi onkogenlerle bir araya gelerek yeterli seviyelere ulaşır ve bu da tümörigenezin ilerlemesini kısıtlayıcı bir role sahip olduğunu göstermektedir (145).

CDC25A geni kromozom üzerindeki 3p21.31 bölgesinde lokalizedir. 16 adet ekzonu bulunmaktadır. (Şekil 4) (146) .



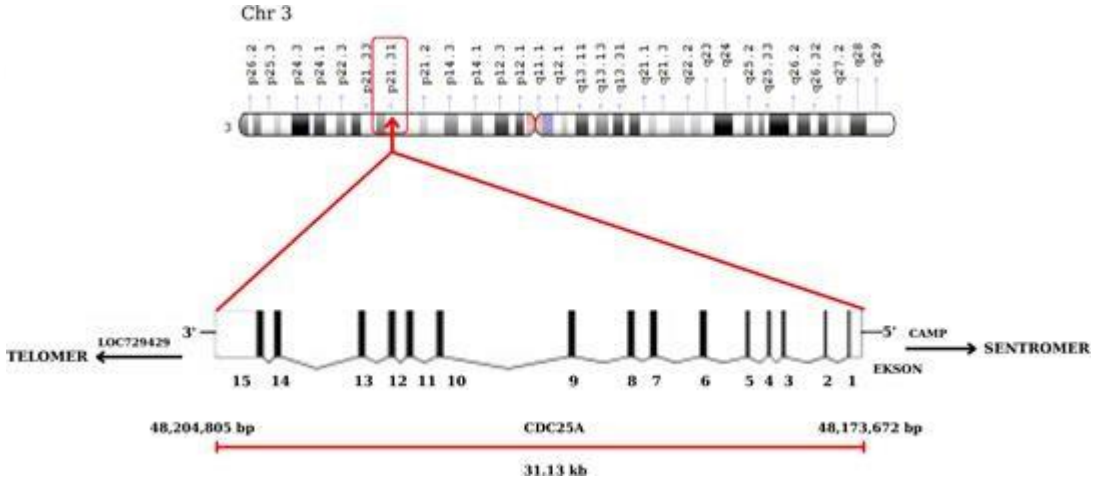
Şekil 4: CDC25A geninin lokusu (146)'dan değiştirilerek alınmıştır.

CDC25A transkriptinin uzunluğu, 3704 bp'dir. Şimdiye kadar 2 tane büyük transkript varyantı tespit edilmiştir: CDC25A1 ve A2'dir (Şekil 5) (146).



Şekil 5: CDC25A geninin iki izoformu; A1 ve A2, (146)'dan değiştirilerek alınmıştır.

Kromozomun p terminalinde bulunan CDC25A'nın, gen lokasyonunun başlangıç-bitiş noktaları: 48173672 bp-48204805 bp olarak belirlenmiştir. CDC25A geninin telomerik bölge olarak CAMP (cathelicidin antimicrobial peptide) ve sentromerik bölge olarak LOC729349 (60S ribozomal protein L17(L23)'e yakın benzerlikte bir psödogen olarak bilinir) arasında lokalize olduğu bilinmektedir. Toplam moleküler büyüklüğü 31,133 baz uzunluğundadır (Şekil 6) (146).



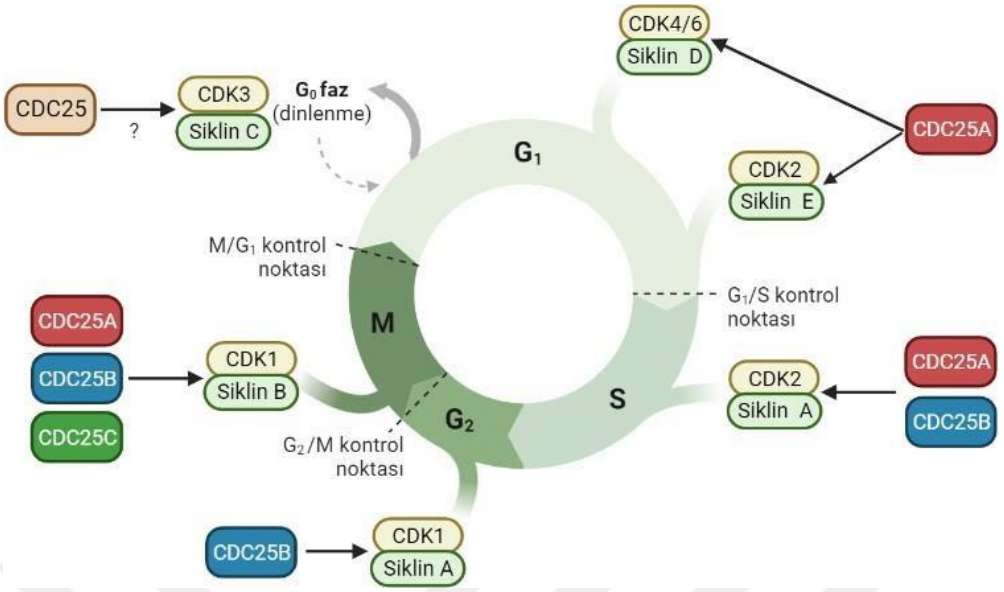
Şekil 6: İnsan CDC25A Geninin Genomik Organizasyonu (3p terminal) (146)'ten değiştirilerek alınmıştır.

İnsan CDC25A proteini, toplamda yaklaşık olarak 59 kDa moleküler ağırlığı olan 524 aminoasitinden oluşur. Çalışmalarda diğer izoformu olan CDC25A2'nın 54.4 kDa moleküler ağırlığa sahip olan 484 amino asitten oluştuğu bildirilmiştir (147).

CDC25A geni, memeli hücrelerinde yüksek miktarda korunmuştur. İnsan CDC25A geni diğer canlılarda da bildirilmiştir; şempanze %99, köpek %90, rat %86 ve fare yaklaşık %85 homolojiye sahiptir (146). CDC25A'nın yukarı regüle edilmesi (aşırı), çok şiddetli seyreden hastalıklarda ve çeşitli kanserlerde hücre proliferasyonunu arttırarak, kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (148) .

CDC25A, embriyonik dönemde erken evreden itibaren eksprese edilir ve yetişkinler bireylerde ise birçok sağlıklı hücre ve dokularda ifade edilmektedir. CDC25A'nın, yumurtalık (149), meme (150), gastrik (151), akciğer (152), baş ve boyun (153), kolorektal kanserler (154), karaciğer (HCC) (155) ve lenfomalar gibi çok sayıda kanser türünde aşırı eksprese olduğu qRT-PCR tekniğiyle yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Kanser hastalarının yaklaşık %80 kadarında, CDC25A trasnkriptlerinin yukarı regüle olduğu ve bu vakaların %55'lik kısmının da sağlıklı mukoza kontrol örneklerine göre yaklaşık 5 kat daha yüksek düzeyde eksprese edildiği bildirilmiştir (153). Diğer kanserlerden farklı olarak meme kanserinde CDC25A geninin aşırı ifade düzeyleri (%69.6), transkripsiyonel seviyede aşırı ekspresyonu ya da gen amplifikasyonunun aksine genellikle indirgenmiş bir bozunma oranına, post-transkripsiyonel düzenlenmeye ve mRNA stabilizasyonuna bağlıdır (156).

CDC25A ve AML hücreleri arasındaki ilişki yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir. FLT3-ITD mutasyonunu eksprese eden AML hücrelerinin çoğalmaları, büyük ölçüde CDC25A'ya bağımlıdır. FLT3-ITD AML hücrelerinin farklılaşmasında ERK kinaz ve CDK1/siklin B1'in kritik rol oynadığı ve bunu serin aminoasidi üzerindeki CEBPa fosforilasyonu yoluyla yaptıkları gösterilmiştir (157). CDC25A'nın kaybı, AML hücreleri gibi hematopoetik karakterdeki hücrelerin farklılaşması sırasında hücre siklusunun baskılanması ve durması için de oldukça büyük bir önem taşır ve bu baskılanma FLT3 sinyali ve PI3K-Akt-mTOR sinyali mekanizması yoluyla düzenlemektedir (158). CDC25A, hücre döngüsünde önemli bir düzenleyici olarak işlev görerek DNA replikasyonunun başlamasına sebep olan farklı bir ileri besleme döngüsü oluşturur (Şekil 7). İnsan AML hücrelerinin de bazı sitotoksik etkideki ilaçlara maruziyeti sonucu oluşan DNA hasarı yanıtında önemli rol oynarlar. Ayrıca CDC25A'nın aşağı regülasyonu, AML hücrelerinin Akt'a bağlı çoğalmasını inhibe etmektedir. CDC25A, AML'deki bu genetik anormalliklerin kötü prognoz ile sonuçlanmasına destek olabilir (159).



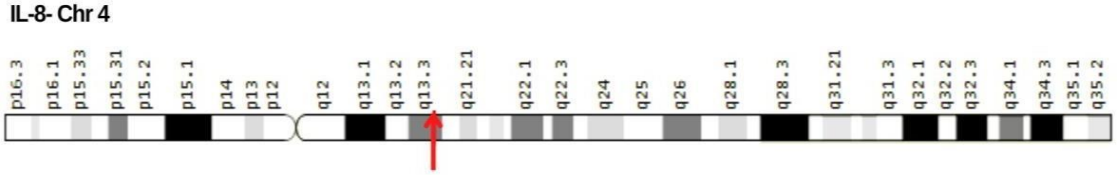
Şekil 7: CDC25'lerin hücre döngüsündeki düzenleyici işlevi (159)'tan değiştirilerek alınmıştır.

2.4.2 IL-8

Interlökin 8 (IL-8) veya CXCL8 (C-X-C motif chemokine ligand 8) olarak da bilinen IL-8, nötrofilleri, bazofilleri ve T hücrelerini inflamasyonun gerçekleştiği bölgelere çeken, CXC ailesine ait pro-inflamatuar bir kemokindir ve kemotaktik bir faktör işlevindedir (160). İnsan IL-8 geninin toplam uzunluğu 5.1 bp'dir ve üç intronla ayrılmış olan 4 ekson içerir. IL-8 gen ilesi 4q13.3 kromozomu üzerinde lokalizedir (Şekil 8) (161). mRNA, 101 baz çifti içeren 5'UTR (çevrilmemiş bölge), 297 baz çifti uzunluğunda açık bir okuma çerçevesi ve 1.2 kb'lik uzun 3'UTR'dan oluşur (162).

IL-8'in AML hücrelerine etkisinin, proliferatif ve anti-apoptotik şekilde olabileceğini göstermiştir. IL-8 genel olarak mitogenez, inflamasyon (ve yanıtı), anjiyogenezin inhibisyonu, kemotaksis, nötrofil aktivasyonu ve degranülasyonu, kalsiyum homeostazı, apoptozdan kaçış ve lökositlerin aktifleştirilmesinde rol oynar (163). IL-8, sağlıklı kontroller ile kıyaslandığında bazı hastalarda yaklaşık olarak 100 kat daha fazla yukarı regülasyon gösterir (164). IL-8 geni çok sayıda insan kanser çeşitlerinde de aşırı ifade edilir. IL-8 proinflamatuar proteini, mide (165), kolorektal (166), over

(167), meme (168) prostat (169), akciğer (170) kanserleri ve melanom gibi çok sayıda farklı türdeki solid kanserlerde, ekspresyonu yukarı regüle edilir ve tümör gelişimini destekler. Buna bağlı olarak hücre proliferasyonu, anjiyogenez, hücre göçü ve invazyon, hücre sağkalımı ve metastazı gibi hücresel mekanizmalar IL-8 tarafından indüklenir. Bu etkisi ile kanser hücrelerini, sağlıklı hücrelerden ayırt etmeyi sağlayan önemli bir biyobelirteç rolüne sahiptir (168).



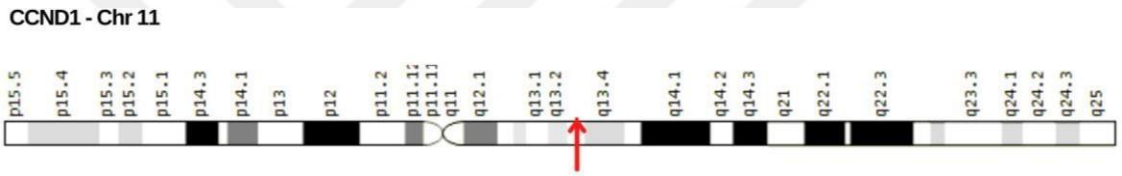
Şekil 8: IL-8 geninin lokusu (171)'dan değiştirilerek alınmıştır.

IL-8, hücreler üzerinde farklı biyolojik aktiviteler sergilediğinden, AML blast hücreleri tarafından üretilmesi, lösemi hücrelerinin gelişimi ve büyüme paterni açısından oldukça uygun olabilir. IL-8 kemokininin, AML de dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde aşırı eksprese olmakta ve kemoterapi tedavisine karşı direnç geliştirerek tümörlerin ilerlemesine yol açmaktadır ve kanserin kötü prognozu ile ilişkilidir (164). Vijay V ve ark. yaptıkları çalışmada, AML hücresinin sebep olduğu EC (endotel hücre) aktivasyonu ile IL-8 salınımının, AML'nin gelişimi, proliferasyonu ve sağkalımına destek olduğunu ve AML tedavisi ve kemoterapinin etkilerini artırmak amacıyla potansiyel bir terapötik yöntem olarak IL-8 inhibisyonunu işaret ederler (172). IL-8 gen aktivitesinin baskılanması, tümör büyümesini azaltmaktadır (173). IL-8 ekspresyonunun aşağı düzenlenmesi, özellikle taksan bazlı kemoterapi tedavisi ile kombineli olarak uygulandığında, ortotopik tümör ilerlemesinde istatistiksel düzeyde anlamlı bir azalma görülmektedir (174). IL-8'in AML'deki sürekli ifadesi, genlerdeki farklılıklara göre değişmekle birlikte akut promiyelositik lösemide (APL'de) daha düşük mRNA ekspresyonu ve FLT-ITD mutasyonu bulunan AML'de de en yüksek düzeyde IL-8 ekspresyonu gözlemlenmiştir. Bu bulgu, IL-8 ifadesindeki anlamlı değişiklikler ile ilişkili prognostik farklılıkların da tanımlanmasını sağlayabilir (175). Bulgular, IL-8'in insan malignitelerini, immün birçok hastalığı, tümörlerin tedavisini ve ilaç direncindeki önemli rollerini göstermekle birlikte bu genin reseptörlere bağlanarak ve farklı sinyal

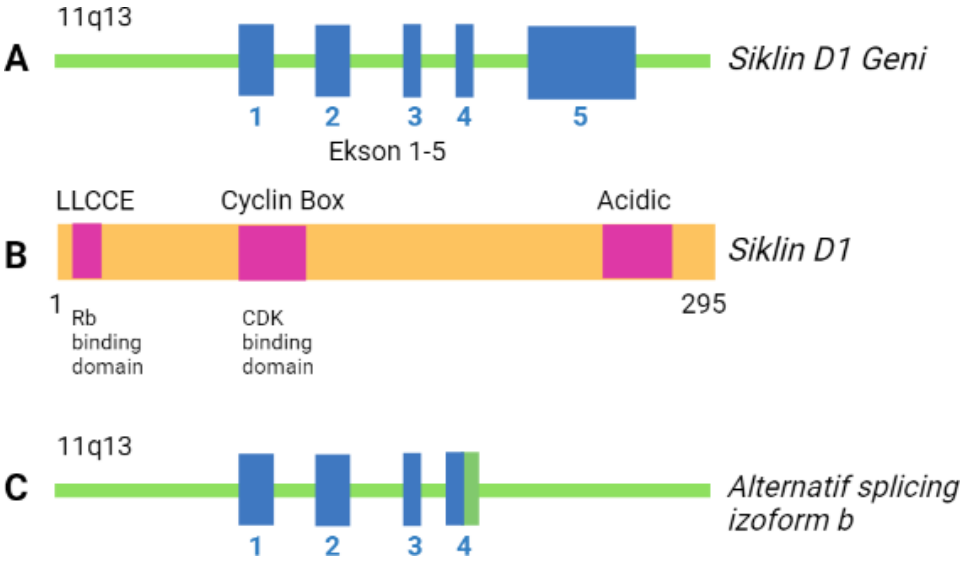
mekanizmalarının kullanılması yoluyla AML hastaları için güncel bir terapötik tedavi potansiyeli taşıdığını göstermektedir (176).

2.4.3. CCND1

Siklin D1 (CCND1), BCL1 veya PRAD1 isimleriyle de bilinir. CCND1 geni, siklin D1 proteinini kodlar ve 11q13.3 bölgesinde yer alır. Toplam uzunluğu 13.388 bp'dir ve 4 intronla ayrılmış olan 5 ekzon içerir ve 295 amino asitlik bir uzunluğa sahiptir. Ayrıca CCND1, telomerden sentromere geçiş ve uyum sağlama sırasında düzenlenir (Şekil 9-10) (177, 178). CCND1 proteininin (Transkript ID ENST00000227507) tam uzunluktaki moleküler ağırlığı 33729 Da ve uzunluğu 4307 bp'dir (179).



Şekil 9: CCND1 geninin lokusu (177)'dan değiştirilerek alınmıştır.



Şekil 10: Siklin D1'in yapısı. (A) CCND1 geninin genomik yapısı; (B) CCND1 proteininin fonksiyonel alanları; (C) CCND1'in alternatif eklenmesinin(uçbirleştirme) şematik gösterimi ve intron 4'ten türetilen CCND1 dizisi (178)

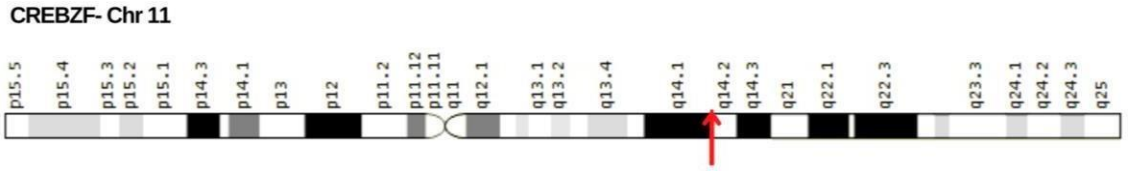
CCND1, yüksek oranda korunmuş bölge içeren siklin ailesinin alt birimlerinden Siklin D'nin bir üyesidir ve 1 adet siklin N-terminal domain bölgesine sahiptir. Siklinler, temelde CDK'ların regülatörleri olarak işlev gören kofaktörlerdir. CCND1/siklin D1, çok sayıda farklı hücre tipinde hücre döngüsünün G1-S geçişini regüle eden önemli bir proto-onkogendir (180). CCND1, lenfoid ve miyeloid kök hücre hatlarından üretilen hücreler dışında yetişkin insan doku ve hücrelerinin tamamında anlamlı derecede eksprese edilir (181). CCND1/siklin D1 sitogenetik anormallikleri özellikle paratiroid adenomları ile mantle hücreli lenfoma (MCL)'da gösterilmiştir. Aynı şekilde mesane, prostat, meme, kolorektal, mide, melanom, hepatosellüler karsinom (HCC), MM, ALL, AML gibi çok sayıda kanserde (182) CCND1'nin aşırı ekspresyonu, klinikte potansiyel terapötik ve moleküler bir hedef olduğu ve bazı ilaçlara ve tedavilere direnç gösterdiği bildirilmiştir (183). CCND1'in aşırı ekspresyonu mide, orofaringeal, akciğer, pankreas gibi bazı kanser türlerinde kötü prognozla ilişkili olurken kolorektal ve meme kanserinde farklı olarak, bazı gruplar hastalığın kötü prognozuyla ilişkisini gösterirken, bazı gruplar iyi prognoz ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca yapılan başka çalışmalarda da, meme kanserinde hem pozitif hem de negatif prognostik sonuçlar elde etmişlerdir (184). Schultz J ve ark, melanomda let-7b'nin aşırı ekspresyonunun, CCND1 transkriptinin 3'-UTR'sini hedefleyerek ifadesini aşağı regüle ettiğini ve böylece melanom hücre döngüsünün inhibisyonuna yol açtığını göstermiştir (10). CCND1 geninin amplifikasyonu, hipofiz adenomları (%49-54), akciğer kanserleri (non-small cell) (%30-46), baş ve boyun yassı hücreli karsinomlar (%30-50) pankreas karsinomları (%25), mesane kanseri (%15) ve meme kanseri (%13) olmak üzere farklı kanser türleri üzerinde yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir (185).

CCND1 ve CCND2 siklin ailesi üyeleri, hematopoetik farklılaşma, gelişim ve hücre çoğalmasının düzenlenmesinde kritik bir rol oynar ve bu genlerin farklı aktifleşme düzeyleri, lökomogenez süreci ile ilişkilendirilmiştir. Siklin D1'in artan ekspresyonu, kanser hastalarının sağkalımını daha da azalması ve artan metastatik süreç ile ilişkilidir (186). AML hücrelerinde CCND1 geninin mRNA ve protein ekspresyon düzeylerinin yukarı regüle edildiği ve bu sırada PI3K/Akt sinyal kanalının aktif hale gelmesiyle, hücrelerin hücre döngüsüne girişini ve ilerlemesini desteklemek için CCND1'in yukarı regülasyonuna yol açtığı ve kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmiştir (187). AML tedavisine yönelik farklı bir çalışmada, CCND1 ve CCND2 mutasyonları, t(8;21) AML'li

yetişkin hastalarda sıklıkla görülmekte ve mutasyonu taşıyan hastalarda, taşımayanlara göre nüks oranı daha yüksek bulunmuştur (182). CCND1/siklin D1'in pro-onkogenik işlevi çeşitli miRNA'lar tarafından hedeflenerek kanser prognozuna ve tedavisine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2.4.4. CREBZF

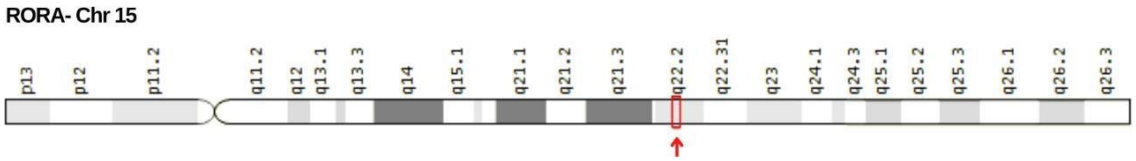
CREBZF (CREB/ATF BZIP Transkripsiyon Faktörü), SMILE (CREBZF'nin uzun izoformu) ve Zhangfei/ZF (CREBZF'nin kısa izoformu) olarak, başlatma kodonlarından türetilen iki izoforma sahiptir. CREBZF protein kodlayan bir gendir ve memeli ATF/CREB (aktive edici transkripsiyon faktörü /cAMP yanıt elementi bağlayıcı protein) ailesinin alt üyesidir (188). Çok işlevli mekanizmalara sahip transkripsiyon faktörü CREBZF, hücre proliferasyonu ve hücre apoptozunda düzenleyici bir işlev görür (189). CREBZF'nin, p53'ün tümörsüpresör işlevinin modülasyonunda ve DNA hasarı yanıtında önemli rol oynadığı bildirilmiştir. CREBZF'nin, pankreas, kolon, prostat, meme, mide, akciğer kanseri, malign melanom gibi diğer kanser tiplerinde değişen ekspresyon düzeyleri gösterilmiştir (190). CREBZF'nin artan ekspresyonu, ERK1/2 ve mTOR sinyal kanallarını baskılayarak ve otofajiyi aktif hale getirerek granüloza hücreli over tümörlerinde pro-apoptotik işleve sahip olabilmektedir (191). CREBZF azalan ekspresyonu ise hücre ölümünü düzenleyerek kanser hücrelerinin gelişmesini, proliferasyonunu, göçünü, invazyonunu ve apoptozunu indükler (189). CREB geni, AML'li hastaların kemik iliği numunelerinin büyük kısmında, aşırı ekspresyon seviyeleri sergilemektedir. CREB, AML ve diğer lösemik blast hücrelerinde ve lösemi kök hücrelerinde (HSC) mRNA ve protein düzeylerinde yukarı regüle edilir. CREB aşırı ifadesi AML hücre ilerlemesini ve gelişmini artırarak kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. CREB yıkımının ise AML hücre döngüsünü durdurduğu ve hücre proliferasyonunu baskılayarak in-vitro apoptozu indüklediği gösterilmiştir. Bu sonuçlar CREB'nin, AML'nin tedavisi için potansiyel terapötik bir hedef olabileceğini desteklemektedir (192). CREBZF geni 11q14.1 kromozomu üzerinde lokalizedir ve toplam uzunluğu 25.167 bp'dir CREBZF transkripti 523 amino asitlik bir uzunluğa sahip olup moleküler ağırlığı 58975 Da'dur (Şekil 11) (179).



Şekil 11: CREBZF geninin lokusu (193)'dan değiştirilerek alınmıştır.

2.4.5. RORA

RORA geni, NR1F1, ROR1 ve ROR2 isimleriyle de bilinir. Retinoid ile ilişkili orfan reseptör alfa (RORA), nükleer steroid hormon reseptörlerinin alt ailesinden NR1'in bir üyesi olan transmembran proteinidir (194). 1993-1994 yıllarında yapılan çalışmalarda, RORA geni, retinoik asitle ilişkili yetim reseptörler (ROR) ailesinin ilk üyesi olarak tanımlandı (195). RORA agonistinin, kanser gelişiminde ve ilerlemesinde güçlü bir tümör baskılayıcı işlevi olduğu bildirilmiştir. İmmünositokimyasal deneyler ile RORA geni, translasyonel düzeyde doğrulanarak endojen ve eksojen RORA'nın temel olarak çekirdek içinde yer aldığı gösterilmiştir (196). RORA geni (ENSG00000069667.16), 15q22.2 kromozomu üzerinde lokalizedir ve 15 ekzonun bulunduğu 730 kb uzunluğundaki genomik bölgeyi içerir. RORA proteini, 523 amino asit uzunluğuna sahip olup moleküler ağırlığı 37134 Da'dur (Şekil 12) (197).



Şekil 12: RORA geninin lokusu (197)'dan değiştirilerek alınmıştır.

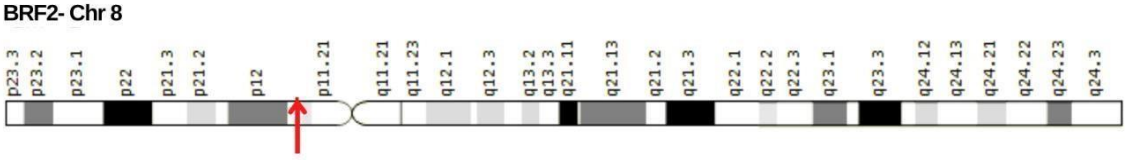
RORA ifadesindeki değişimin hücre apoptozu, anjiyogenez, morfogenez, inflamasyon, lipid metabolizması (apolipoproteinler gibi) da dahil olmak üzere çeşitli süreçlerde fonksiyonel rolleri bildirilmiştir (198). Hücresel strese cevap olarak hücre gelişimini ve büyümesini baskılayabilir. Azalmış RORA ekspresyonunun, cilt, glioma, rektum, prostat, melanom, hepatosellüler karsinom ve meme gibi farklı insan tümörlerinde Wnt / β-katenin sinyal yolunu yukarı regüle ederek tümör progresyonuna ve invazyonuna katkıda bulunduğu ve kötü prognozla ilişkili olduğu bildirilmiştir (199).

RORA geninin aşağı regülasyonu ve yetersiz aktivasyonu ile bu genin tümörsüpresör etkileri bir araya getirildiğinde, RORA'nın klinikte, kanser tedavisi için terapötik potansiyel taşıyan bir ilaç hedefi olabileceği sonucuna ulaşılmıştır (200). Diğer taraftan RORA'nın aşırı eksresyonu, Wnt / β-katenin sinyalini inhibe ederek, SEMA3F ifadesini arttırarak veya p53'ü stabilize ederek (apoptoz için) mide, kolon ve pankreas kanserleri gibi bazı kanserlerde, tümör gelişimini ve proliferasyonunu baskıladığı gösterilmiştir. (195).

RORA ve AML ile ilişkili bir çalışmada, hsa-miR-153-5p ifadesindeki artışın, AML'li hastalarda iyileştirilmiş genel sağkalımı ile ilişkili olan RORA'nın ifade seviyesini aşağı regüle ettiği sonucu ortaya çıkmıştır (201). Başka bir çalışmada ise hücresel aktivitelere destek olan ve farklı kanser türleri ile ilişkisi bilinen HSPA8 proteini, AML hastalarında sağlıklı kontrollere göre aşırı eksprese edildiği gösterilmiş ve kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. HSPA8 yüksek ifade düzeyi, kanserle bağlantılı olan genomik anomalilerle ilişkisini ve tümör baskılayıcı RORA geni ile negatif korelasyona sahip olduğunu ortaya konmuştur (202). RORA tümör baskılayıcı genin onkogenik işlevi çeşitli miRNA'lar tarafından hedef alınarak klinikte, kanser tedavisine verilen olumlu yanıta katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2.4.6. BRF2

Çeşitli genlerin ifadesini düzenleyen BRF2, oksidatif stresin de ana düzenleyicisi olup oksidatif stres (OS) yokluğunda aktivatör işlevi görür ve OS'ye yanıt olarak ilgili genlerin ifadesini azaltır BRF2'nin aşırı ekspresyonu, hücreleri oksidatif stresin neden olduğu apoptozun etkilerinden korur ve sağkalıma katkı sağlar (203). TFIIIB50, BRFU, HTFIIIB50, FLJ11052 olarak da bilinen BRF2 geni (ENSG00000104221.13), 8p11.23 kromozomu üzerinde lokalize olmaktadır ve 4 ekzonun bulunduğu 6.594 baz çifti uzunluğundaki genomik bölgeyi içerir. BRF2 proteini, 419 amino asit uzunluğundadır ve moleküler ağırlığı 46533 Da'dur (Şekil 13) (204).



Şekil 13: BRF2 geninin lokusu (204)'dan değiştirilerek alınmıştır.

BRF2 geni, bir onkogenik karakter göstererek çeşitli kanser hücrelerinde değişen ekspresyonlarıyla birlikte sıkça amplifiye edilir ve kanserli hastalarda aşırı ekspresyon seviyeleri görülür (205). BRF2, 8p11.23 bölgesinin ve kromozom kolu 8p'nin amplifikasyonu genellikle insan (somatik) meme kanserinde meydana gelir (206). Robert J, Oncomine 3.0 veritabanı (207) aracılığıyla insan kanser hücrelerinde BRF2 ekspresyonu için transkriptom verilerini analiz etmiş (18.000 gen ve 35 kanser) ve akciğer, mide, böbrek ve melanom kanserli hasta numunelerinde BRF2 aşırı ifadesini gözlemlemiştir (208). BRF2'nin aşırı ifadesinin, kanserli hücrelerde proliferasyon, anjiyogenez, metastaz, apoptoz ve tümörigenezde bilinen kritik rolleri mevcuttur (209). Ayrıca BRF2'nin aşırı ifadesi, kanserli hastalarda nüks riskinin artması ile ilişkilidir (210). Ayrıca bu çalışmada ile BRF2'nin, akciğer kanseri alt tipi olan skuamöz hücreli karsinomda soy-spesifik nitelikte yeni bir onkogen olarak tanımlanmıştır (211). İlerleyen çalışmalarda BRF2, meme ve özofagus kanserinde de progresyonsuz sağkalımda onkogenik bir sürücü (biyobelirteç) olarak kabul edildi (212). BRF2 inhibisyonu ise Akt, N-cadherin, E-cadherin, Bcl-2, Snail, p-Akt ve EGFR gibi genlerin ifade düzeylerini anlamlı ölçüde azaltırken, Bax ve E-cadherin ifadelerini arttırmıştır. Bu durum, BRF2'nin inhibisyonu yoluyla akciğer kanseri hücrelerinin progresyonunu, proliferasyonunu, migrasyonunu ve metastazını baskılamasıyla ve apoptozu indüklemesiyle doğrudan ilişkilidir (213). Benzer şekilde BRF2'nin meme, mide, cilt, böbrek ve sarkom kanserleri de dahil farklı kanser türlerinde yüksek oranda yukarı regüle edildiği bildirilmiştir (214). BRF2 ile AML arasındaki ilişkiyi net bir şekilde açıklayan mevcutta bir çalışma bulunmasa da BRF2'nin lenfomalarda ve lösemilerin genelinde anlamlı ölçüde aşırı düzeyde ifade edildiği bildirilmiştir. AML'de, BRF2'nin metastaz riski taşıyan hastalar için prognostik bir biyobelirteç olarak güçlü bir potansiyele sahip olması bu genin onkogenik desteklemektedir (215). Yapılan mevcut çalışmalar, BRF2'nin AML üzerindeki etkin rolünün daha iyi aydınlatılabilmesi amacıyla yetersiz kaldığından daha çok sayıda çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

2.4.7. SYF2

P29, FSAP29, NTC31 isimleriyle de bilinen SYF2 geni (ENSG00000117614.10), 1p36.11 kromozomu üzerinde lokalizedir ve 4 ekzonun bulunduğu 10.227 baz çifti

uzunluğundaki genomik bölgeyi içerir. SYF2 proteini, 243 amino asit uzunluğundadır ve moleküler ağırlığı 28722 Da‘dur (Şekil 14) (216).



Şekil 14: SYF2 geninin lokusu (216)’dan değiştirilerek alınmıştır.

İnsanda SYF2 geni, DNA hasar yanıtı ile ilişkili hücre döngüsü G1 fazının aktivasyonunda işlev görür ve CDC1 ile etkileşime giren bir nükleer proteini kodlar. Genel olarak SYF2'nin, ECT2-Ex5'in alternatif splicing (AS) düzenlemesini kullanarak DNA replikasyonu hızını düşürmekte ve S fazı ilerlemesine katkıda bulunmaktadır. (217). SYF2 ve homologları, çok sayıda kanser hücrelerinde ve dokularında aşırı eksprese edilmektedir. SYF2’nin meme (218), akciğer (219), karaciğer (HCC) (220), mide (221), yumurtalık (222) ve prostat (223) gibi pek çok kanserde ve lösemide aşırı düzeyde eksprese olması hücre proliferasyonunu ve gelişimini desteklediğini, tümör gelişiminde ve ilaç direncinde önemli rol oynadığını ve kötü prognozla ilişkili olduğunu göstermektedir (217). SYF2, merkezi sinir sistemi (CNS) hastalıkları ya da nöronal hastalıkların patogenezinde pro-apoptotik etki, hücre farklılaşması ve glial hücre aktivasyonu gibi çoklu etkileri bulunmaktadır (224). SYF2’nin, bir GCIP etkileşimli protein gibi davranarak CCND1 (Siklin D1) ile etkileşime girmesi ve GCIP'nin aşırı ifadesi olması ile siklin D1 geninin ifade düzeyini aşağı regüle etmesi, G1/S faz geçişini inhibisyonuyla sonuçlanır (218). Benzer şekilde mide kanserinde yapılan bir çalışmada SYF2’nin, anlamlı derece aşırı ifade edildiği ve mide kanserinde doğrudan hedeflediği miR-621'in ekspresyonu ile ters korelasyon gösterdiği ortaya kondu (221).

AML hücrelerinde ve dokularında SYF2 ve diğer anti-apoptotik özellikteki proteinlerin aşırı ifade edildiği ve anlamlı ölçüde kötü prognozla ilişkili olduğu ortaya çıkarılmıştır (225). SYF2’nin onkogenik fonksiyonu çeşitli miRNA’lar tarafından hedeflenerek klinikte kanser tedavisi için katkı sağlayacağı tahmin edilmektedir. Bunun için AML üzerinde yapılacak daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

2.5. HÜCRE HATLARI

2.5.1. HL-60 Hücre Hattı

Bu çalışmada kullanılan HL-60 hücreleri, 36 yaşında akut promiyelositik lösemili bir kadından alınan lökoferez ile periferik kandan elde edilen promyeoloblast hücreleridir. Promyelositik özelliğe sahip olması ve retinoik asit tepkisine rağmen olgunlaşmış bir akut myeloblastik lösemiden geliştiği kabul edilen HL-60 hücre hattı, kanser tanı ve tedavisinde, immünoloji araştırmalarında , DNA topoizomeraz IIα ve IIβ enzimlerinin etkisini tayin etmede, hücrelerde çeşitli apoptozis çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (226). Kültürlenmiş HL-60 hücre hattı, miyeloid farklılaşması sürecinde rol alan moleküler değişimleri ve buna ek olarak fizyolojik, virolojik ve farmakoloji temelli etmenlerin etkilerini incelemek için devamlı bir insan hücresi kaynağımı oluşturur . Ayrıca in-vitro ortamda farklılaşabilme yeteneği olup; c-myc, K-ras ve p53 gibi hücresel onkogenleri içeren spesifik genomik mutasyonlar gösterir (227).

Çalışmamızda kullanılan bu AML hücre hattı için gerekli besin ve kimyasalların şartlarına uygun olacak şekilde inkübatör ortamı %5 CO^2, %95 nem ve 37 ºC olarak ayarlandı. HL-60 hücrelerinden istenilen verimin alınması amacıyla besiyeri 48 saatte bir yenilendi.

2.5.2. NB4 Hücre Hattı

All-trans retinoik asit (ATRA) ile terminal nötrofil olgunlaşmasına sebep olduğu kanıtlanmış bir akut promiyelositik lösemi hücre hattı olan NB4, 1989'da ikinci relapsta akut promiyelositik lösemili (APL; FAB terminolojisinde M3) bir hastanın kemik iliğinden izole edilmiştir. Kökeni primer tümör (insan promyelositik lösemi) olan NB4 hücre hattı, retinoik asit ile birlikte granülositik olgunlaşma göstererek promyelositik lösemide görülen t(15;17) kromozomal anomaliyi ekprese eder. İlk defa 23 yaşında beyaz ırktan bir kadından alınan kanser hücrelerinden izole edilmiştir. NB4 hücrelerinin BRCA1, TP53, MAPK13, MDC1 mutasyonu ve PTEN delesyonu taşıdığı gösterilmiştir (228).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasının deneysel aşamaları İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Bilim Dalı laboratuvarlarında yürütülmüştür.

3.1. GEREÇ

3.1.1. HL-60 ve NB4 Hücre Hatlarının Temini

Bu çalışmada let-7b-5p ve let-7b-3p'nin AML ile arasındaki ilişkinin araştırılması amacıyla kullandığımız hücre hatlarından biri olan HL-60, Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı ŞAP Enstitüsü'nden (Ankara) dondurulmuş bir şekilde temin edilmiştir. NB4 hücre hatları ise Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE)'den temin edilmiştir.

3.1.2. Kullanılan Gereç ve Cihazlar

3.1.2.1. Kullanılan Cihazlar

Tablo 6: Çalışmada Kullanılan Cihazlar, Sarf Malzemeleri ve Kullanım Amaçları

CİHAZ ADI	MARKA	KULLANIM AMACI
Gerçek Zamanlı PZR	(LightCycler480-Roche)	qRT-PZR işlemleri
Jel görüntüleme sistemi	Vilber Lourmat	PCR ürünlerinin görüntülenmesi ve kaydedilmesi
Spektrofotometre-NanoDrop	Thermo Scientific	RNA saflığının belirlenmesi
Elektroforez aletleri, güç kaynakları	ThermoFisher	RNA kalitesinin belirlenmesi
Soğutmalı Mikrosantrifüj	Hettich Rotina 420R	RNA izolasyonu
İnvert Mikroskop	Olympus	Hücrelerin görüntülenmesi
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	Kitler, reaktifler, solüsyonlar ve örneklerin uygun koşullarda saklanması
(+4) Buzdolabı	Vestel	Besiyeri ve solüsyonların saklanması
LightCycler plate	LightCycler	Real Time PCR (gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu)
Microplate reader	BioTek	Hücre proliferasyonu ve apoptoz analizi
Laminar güvenlik kabini	Fagus	İn-vitro deney çalışmaları ve qRT-PCR işlemleri için gerekli reaksiyonların steril olarak hazırlanması
96'lı Well Plate ve 6'lı Well Plate		Transfeksiyon işlemleri
T25 ve T75 flask	BD, USA	Hücre kültürü işlemleri
Multi Kanallı Mikropipet	ThermoFisher Scientific	Birden çok sayıda reaksiyonun aynı anda yapılması
Ependorf tüpleri		Örneklerin muhafaza edilmesi ve deneylerde kullanılması
Vortex		Örneklerin karıştırılması
Soğuk blok		Deneyler sırasında reaktiflerin soğuk ortamda tutularak korunması
Parafilm		Tüp, şişe gibi malzemelerin kontaminasyondan korunması
Serolojik pipet ve pipetör		Büyük hacimli sıvı örneklerinin aktarılması
4 µl,10 µl,100 µl,1000 µl Mikropipet		Küçük hacimli sıvı örneklerinin aktarılması

3.1.2.2. Kullanılan Cam Malzemeler

Tablo 7: Laboratuvarda Kullanılan Cam Malzemeler

MALZEME	ÖZELLIK / MIKTAR
Lam	Menzel-Glaser Superfrost ground edges 90
Lamel	Menzel-Glaser100 Deckglaser
Beher	50,100,250 ml
Erlenmayer	250,1000 ml
Mezür	10,25,50,100,250,500,1000 ml
Balon joje	250,500 ml

3.1.2.3. Kullanılan Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kimyasal malzemeler ve solüsyonlar Tablo 8'de listelenmektedir.

Tablo 8: Hücre Kültüründe Kullanılan Solüsyonlar

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

Tablo 9: Transfeksiyon ve Validasyonu için Gerekli Solüsyonlar

MALZEME ADI
Let-7b-5p ve Let-7b-3p mimikleri (5nmol, 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 Let-7b-5p, Let-7b-3p ve RNU43 primer ve probları (ThermoFisher Sci.)

Tablo 10: RNA İzolasyonunda Kullanılan Solüsyonlar

MALZEME ADI
Trizol Reagent
İzopropanol
Kloroform
Etanol (%70'lik)
Nükleaz içermeyen su

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, hücrelerin kontrollü şartlar altında çoğaltıldığı bir süreci içermektedir. Hücre kültüründe gerçekleşen bütün deneysel çalışmalarda sterilizasyon kurallarına dikkat edilmiştir ve kullanılacak sarf malzemelerin tümü steril olarak temin edilmiştir.

3.2.2. Hücre Hatlarının Çoğaltılması

Çalışmamızda laboratuvar araştırmaları ve deneylerde sıklıkla kullanılan HL-60 ve NB4 insan lösemi hücre hatları kullanılmıştır. HL-60 ve NB4 akut premiyelositik lösemi hücre hatları, %10 fetal bovin serum (FBS, Sigma, USA) ve %1 antibiyotik ile desteklenmiş RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) besiyeri içinde, % 5 CO2'li etüvde, 37° C'de inkübe edilerek çoğaltılmıştır.

3.2.3. Hücre Hatlarının Pasajlanması ve Stoklanması

Hücre pasajlama işlemi, hücre kültürü kaplarında yeterli miktarda çoğalmış hücrelerin seyreltilerek başka flasklara alınması işlemidir. Deneysel çalışmalarda bu işlem, istenilen miktarda hücre elde edebilmek ya da hücreleri uygun koşullarda çoğaltıp stoklamak amacıyla kullanılır. Stoktan alınan ve flasklara aktarılan HL-60 ve NB4 hücreleri, stoktan alındıktan bir süre sonra (2-3 gün) hem flasktaki çoğalan hücreler için alanın yetersiz gelmeye başlaması ile üremenin yavaşmalası ya da durması hem de besiyeri ortamının kirlenmesi gibi nedenlerden dolayı hücreler, öncelikle mikroskop altında kontrol edildikten sonra daha büyük bir flaska aktarılır.

%5 CO2 içeren inkübatörde çoğaltılan HL-60 ve NB4 hücrelerinin yoğunluğu, 10x objektifteki invert mikroskopta görüntülenmiştir. Hücreler, %70-80'den fazla hücre yoğunluğuna ulaştığında daha geniş olan T75 (75 cm2) flaskına (75cm²) aktarılmıştır. Bu işlem yapılırken öncelikle hücre kültür kabındaki HL-60 hücre ve medyum karışımı serolojik pipet kullanılarak santrifüj tüpüne (falkon) aktarılarak 2000 rpm' de 4 dk süresince santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrası tüplerden süpernatant kısmı atıldı ve alttaki pellet üzerine 10 mL taze besiyeri eklenerek süspanse olması sağlanmış ve T75 flaska geçilmiştir.

Hücre sayım işlemi için, ilk olarak hücre kültür kabında bulunan ve çoğalan hücreler santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldı ve pellet kısmı 5 mL antibiyotiksiz medium içerisinde çözülerek hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Ardından hücre süspansiyonundan 20 µl ependorf tüplerine alınarak 20 µl tripan mavisi boyası ile karıştırılmıştır. Karışıma, homojen hale gelene kadar pipetaj işlemi yapılmıştır. Karışımın 10 µL'si ayrı bir tüpe alınarak üzerine 10 µL tripan mavi boyası eklenip karıştırılarak thoma lamında hücre sayımı yapılmıştır. Hücre sayımı invert mikroskop altında

gerçekleştirilmiştir. Bu incelemelerde, boyanın membran yüzeyinden içeri alınmasına izin vermeyen ve şeffaf görünüme sahip hücreler canlı, membran bütünlüğü zarar görmüş boyayı içine alan ve mat görünümlü hücreler ise ölü kabul edilerek hücre sayımı yapılmıştır. Sayım sonucu hücre miktarının %90 ve üzerinde gözlemlenmesi durumunda hücreler deneysel çalışmaya alınmıştır. Thoma lamı üzerindeki 16 büyük karenin iç kısmındaki tüm hücreler sayılmıştır. Sayım, en doğru sonucun elde edilmesi için en az 3 kez tekrar edilmiştir. Mililitredeki hücre sayısı, elde edilen sayıların ortalaması alınarak (HL-60 :400 ; NB4: 150 canlı hücre) formüle uyarak hesaplanmıştır. Dilüsyon faktörü HL-60 ve NB4 için sırasıyla 9cc ve 12cc 'dir. (Toplam hücre sayısı/mL= Hücre sayısı X Dilüsyon faktörü (2) X 10.000) (229).

Pasajlama yapılırken yoğunluğu artan diğer hücrelerin bir kısmı, ilerleyen çalışmalarda kullanılmak amacıyla dondurma (freezing) medyumu olarak içerisinde %10 DMSO bulunan RPMI-1640 besiyerine alınmıştır. 10 mL'lik total dondurma medyumu (hücre stok solüsyonu), 1,5 ml'lik cryo tüplere her bir tüpte yaklaşık 1 ml solüsyon olacak miktarda dağıtılmıştır. Hücre stok solüsyonu (süspansiyon) içeren cryo tüpler -20 °C'de 3-4 saat ve -80°C'lik derin dondurucuda 1 saat beklettikten sonra 196°C'deki azot tankına yerleştirilmiş ve stoklama aşaması tamamlanmıştır.

3.2.4. Hücre Hatlarına miRNA Mimik Transfeksiyonu ve Validasyon İşlemleri

İn vitro fonksiyonel çalışması yapılacak olan let-7b-5p ve let-7b-3p'nin mimikleri (Thermo Fisher) temin edilerek, HL-60 ve NB4 AML hücre hatlarına transfeksiyon işlemi yapılmıştır. Herhangi bir geni hedeflemeyen (non-targeting miRNA) oligonükleotid dizisi, kontrol miRNA(nt) olarak kullanılmak üzere satın alınmıştır. Bu oligonükleotid dizileri, çalışma içerisinde kontrol/karşılaştırma grubu (nt kontrol) hücrelerinin hazırlık aşamasında kullanılmıştır.Mimiklerin transfeksiyon işlemleri için Lipofectamine-2000 Reagent ürünü, protokoldeki basamaklar izlenerek uygulanmıştır. Hücre zarının yağ moleküllerini rahatlıkla içeri alabilmesi için Opti-MEM™ Medyum kullanılmıştır. Transfeksiyon işleminde gerekli olan bileşenler Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11: Transfeksiyon İşlemi İçin Gerekli Bileşenler

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

- Thoma lamı yardımıyla hücre sayımının yapılmasının ardından 6 kuyucuklu plakalara her bir kuyucuk içerisinde $4x10^5$ hücre bulunması koşuluyla hücre ekimi gerçekleştirilmiştir.
- Hücre ekimi yapılmıştırktan yaklaşık olarak 24 saat sonra invert mikroskop altında hücre yoğunluğu incelenmiş ve bu hücrelerin %70-80 yoğunluğa ulaştığı durumda, bu hücrelerin transfeksiyon süreçlerine geçilmiştir.
- 3µl Lipofectamine 2000 reagent (Thermofisher) ve miRNA mimik/nt mimik karışımı 125µl Opti-MEM medyumuna, miktarı total 30 pmol olacak şekilde protokoldeki adımlar takip edilerek iki farklı tüpte homojenize olana kadar karıştırılarak hazırlanmış ve 5 dakika beklenmiştir.
- Diğer tüpte ise 125µl Opti-MEM ile toplam 6µl miRNA mimik ve negatif kontrol (nt) miRNA karışımı hazırlanıp 5 dk beklenmiştir.
- 5 dakika beklendikten sonra 2 tüp (mimik ve lipofectamin) birleştirilmiş ve oda sıcaklığı koşullarında 15-20 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- Sonuç olarak RNA-lipid kompleksi oluştuktan sonra %70-80 konfluensiye ulaşmış hücrelere miRNA mimik transfeksiyonu yapılmıştır.
- Hücreler, ileride yapılacak ekspresyon deneylerinde kullanılmak üzere 37°C'de %5 CO2'li etüv içerisinde 24 saat süresince inkübe edilmiştir.

3.2.5. Hücrelerden RNA İzole Edilmesi

- Let-7b-5p ve let-7b-3p mimiği verilen HL-60 ve NB4 hücrelerinden, total RNA izolasyonu için TRIzol (Invitrogen) protokolü takip edilmiştir.

- 37°C'de 24 saat inkübasyon sonunda hücreler 15 mL'lik falkon tüplere alınmıştır.
- Hücreler, 5 dk 1500 rpm'de santrifüj edilmiştir.
- Santrifüjden sonra tüplerin süpernatant kısmı atılarak pelletlerin üzerine 1000 µl Trizol solüsyonu eklenmiştir.
- Pelletin homojen hale gelmesi için pipetaj yapılmıştır ve 5 dk bekletilmiştir.
- Çözülen pellet, 1,5 mL'lik ependorf tüplere aktarıldı ve üzerine 100 µl kloroform (soğuk) ilave edilerek vorteks cihazı (Latvia Biosan sia) ile daha hızlı şekilde karışması sağlandı ve 2 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- Tüpler +4°C'de 13000 rpm'de 15 dk boyunca santrifüj edilerek fazlarına ayrıştırılmıştır.
- Santrifüj sonrasında ependorfun üst kısmındaki fazlalık yeni tüplere aktarılarak üzerlerine 500 µL isopropanol (soğuk) eklenmiştir.
- Buz üzerinde 5-10 dk inkübasyonu sağlanan tüpler +4°C soğutma ayarlı santrifüj cihazında 13000 rpm'de 10 dk süresince satrifüj edilmiştir.
- Dipte kalan pelletin çözülmesi için üzerine 500 µl soğuk %70'lik Ethanol (EtOH) koyulmuştur.
- 4°C ve 12000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra dipte kalan pelletin kuruması amacıyla 10-15 dk boyunca oda sıcaklığında (normal koşullarda) inkübasyon işlemi yapılmıştır.
- 50 µl RNAaz (nükleaz) içermeyen deiyonize su (dH2O) ilave edilerek pellet kısmı seyreltilmiştir.
- RNA miktarı ve konsantrasyonu NanoDrop ND-2000c (Thermo Fisher Scientific) spektrofotometresi yardımıyla ölçülüp toplam RNA saflığı, A260/A280 optik dansite oranı ile belirlenmiştir. A260/A280 optik dansite oranının 1,8-2,2 aralığında çıkması RNA'nın kaliteli olduğunu işaret etmektedir.
- RNA'lar yapacağımız diğer deneylerde kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edilmiştir .

3.2.6. Transfeksiyon Validasyonu İçin cDNA Sentezi ve qRT-PZR İşlemleri

- Let-7b-5p ve let-7b-3p'nin HL-60 ve NB4 hücre hatlarındaki ifade düzeylerini belirlemek ve transfeksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek için qRT-PCR yöntemi uygulanmıştır.
- Let-7b-5p ve let-7b-3p'nin, HL-60 ve NB4 hücre hatlarındaki ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi, cDNA sentezi miRNA özütlemesi ve transfeksiyon validasyonu için TaqMan primer ve probları (Assayleri) kullanarak ilk olarak cDNA sentezi yapılarak LightCycler 480 II (Roche) cihazında kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) gerçekleştirilmiştir.
- Transfeksiyon validasyon süreçlerinde (miRNA'dan cDNA sentezi), çalışma ve negatif kontrol olarak iki grup için total 30 ng RNA kullanılmıştır.
- qRT-PCR için Taqman Reverse Transcriptase Kit (Thermo Fisher), let-7b-5p ve let-7b-3p RT primerleri (ThermoFisher Sci.) ve RNU43 probları (kontrol miRNA-Thermo Fisher) kullanılarak üretici firmaya ait protokol içeriğine uygun olarak, hücrelerden izole edilen miRNA'lardan cDNA (komplementer DNA) sentezi yapılmıştır.
- TaqMan Universal Master Mix II kiti (ThermoFisher Sci.) RNU43 RT probu (ThermoFisher Sci.) ve let-7b-5p ve let-7b-3p RT primerleri (ThermoFisher Sci.) kullanılarak üretici firmanın protokolü takip edilerek qRT-PZR işlemleri gerçekleştirilmiştir.
- Deneyler 2 defa tekrarlı olarak yapılmıştır.
- Çalışma ve kontrol gruplarının qRT-PCR işlem sonuçları üzerinden yapılacak rölatif kantitasyon analizi, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.
- cDNA sentezi için gerekli reaksiyon bileşenleri ve miktarları Tablo 12'de verilmiştir.

Tablo 12: cDNA Sentezi İçin Kullanılan Reaksiyon Bileşenleri ve Miktarları

REAKSİYON BİLEŞENLERİ	**MİKTAR**
MultiScribeTM Reverse Transcriptase (50 U/µL)	1 µl
10X Reverse Transcription (RT) Buffer	1,5 µl
100mM dNTP Mix (25X)	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 (10X)	3 µl

Tablo 13: cDNA Sentezi İçin Thermal Cycler Basamakları

	Basamak 1	**Basamak 2**	**Basamak 3**	**Basamak 4**
Sıcaklık (°C)	16	42	85	4
Süre (dk)	30	30	5	Süresiz

Tablo 14: qRT-PZR İçin Kullanılan Reaksiyon Bileşenleri Ve Miktarları

REAKSİYON BİLEŞENLERİ	**MİKTAR**
TaqMan® Universal Master Mix II	10 µl
TaqMan® MicroRNA Prob	1 µl
cDNA	2 µl
dH2O	7 µl

Tablo 15: miRNA Ekspresyon Analizi İçin qPCR Koşulları

Basamaklar	**Döngü**	**Sıcaklık (°C)**	**Süre**
Başlangıç	**1**	**50** **95**	**2 dk** **10 dk**
Denatürasyon	**40**	**95**	**15 sn**
Bağlanma ve Uzama	**40**	**60**	**1dk**

3.2.7. Hücresel Süreçlere Let-7b-5p ve Let-7b-3p Etkisinin Araştırılması

3.2.7.1. Hücrelerin Çoğalmasındaki Etkisi

- Logaritmik şekilde ilerleyen gelişme evresindeki HL-60 ve NB4 hücreleri, 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucukta 3000 hücre bulunacak şekilde 3 tekrarlı olarak, 100 ul'lik RPMI-1640 medyumunda bir gece boyunca kültürlenmesi (%10 FBS) için bırakılmıştır.
- İşlemden 24 saat geçtikten sonra Lipofectamine 2000 Reagent üretici protokolüne uygun olarak hücrelere, let-7b-5p, let-7b-3p mimikleri ve kontrol miRNA (non-targeting/nt miRNA) transfeksiyonu yapılmıştır.
- Transfeksiyon yapılan HL-60 ve NB4 hücrelerinin çoğalmasının incelenmesi için transfeksiyondan sonraki 48. ve 72. saatte WST-8 testi aracılığıyla canlılığı ölçüm analizleri yapılmıştır.
- Optik yoğunluk (OD) değerinin ölçülmesi için bir MULTISKAN FC Mikroplaka Okuyucu (ThermoFisher Sci.) spektrofotometre cihazı ve hücrelerin proliferasyon değerlendirmesi için Cell Viability Detection Kit (CVDK-8) (Eco-tech Biotechnology NutriCulture) kullanılarak üretici firmaya ait protokol dikkate alınarak 450 nm dalga boyundaki absorbansta ölçüm yapılarak okuma işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.7.2. Let-7b-5p ve Let-7b-3p'nin Apoptoza Etkisinin İncelenmesi

Programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptoz; hücre ölümü ile ilişkili olan pro-apoptotik ve sağkalım ile ilişkili anti-apoptotik (sağkalım) moleküller arasındaki dengeyi korumak amacıyla sıkı bir şekilde kontrolünü sağlayan fizyolojik bir mekanizmadır. DNA hasar mekanizması, tamir edilmediği sürece programlanmış hücre ölümü ile sonuçlanır. Kanserli hücrelerde ise farklı olarak bu denge, DNA hasarı onarımı yapılmadığında bile genellikle apoptoz sürecinin inhibe edilmesiyle sonuçlanır.

- NB4 ve HL-60 hücrelerinin, 37°C'de %5 CO2 içeren inkübatörde (normal şartlar altında) proliferasyon sürecini tamamlamasının ardından 6 kuyucuklu plakalara (well plate) ekim işlemi yapılmıştır.

- Lipofectamine 2000 Transfektion Reagent (Thermo Fisher Scientific) reaktif maddesi kullanılarak yapılan transfeksiyon işlemi için üretici firmanın protokolü takip edilmiştir.
- Transfeksiyon işleminin üzerinden 24 saat geçmesiyle let-7b-5p ve let-7b-3p hücrelerinin apoptoz üzerindeki etkisini araştırılması amacıyla, let-7b-5p ve let-7b-3p ve nt mimikleri ile transfekte olmuş hücreler ya da hücre hatları falkon tüpleri içerisinde birleştirilerek santrifüj işlemi yapılmıştır.
- PBS tampon çözeltisi ile muamele edilen (yıkanan) pellet kısmı için tekrar santrifüj işlemi yapılmıştır ve tüpteki süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır.
- Human Caspase 3 Instant ELISA Kit (Invitrogen, ThermoFisher Sci.) ürününün protokolünde tavsiye edildiği üzere, 1 mL lysis buffer kullanılarak hücre pelleti çözdürülerek 2 mL hacimli ependorf tüplere aktarılmıştır ve 60 dk süresince düşük hızdaki bir çalkalayıcı (EcoTech, BioTechnology) cihazı aracılığıyla normal koşullar altında bekletilmiştir.
- Tüpler 15 dakika boyunca 1000xg hızda santrifüj edilmiştir ve oluşan hücre lizatının diğer temiz tüplere aktarılmasının ardından aligotlanarak diğer deney aşamasına geçinceye kadar - 80°C'deki buzdolabında muhafaza edilmiştir.
- Kit protokolünde belirtilen yönergeler izlenerek, strip içindeki solüsyon erimeden, çalışmadaki kullanılan standart kontrol ve örneklerin bulunduğu kuyulara 3 tekrarlı olacak şekilde toplam 140 µL distile su eklenmiştir.
- Örneklerin bulunduğu kuyuların üzerine hazır halde -80°C'de saklanan lizatlar eritilerek kuyu başına 10 µL ilave edilmiştir. Plate cover yardımıyla kuyular sağlam bir şekilde kapatılarak, 37°C'de 3 saat boyunca çalkalayıcı etüvde tutulmuştur.
- Yıkama işlemleri için +4°C'de muhafaza edilen Wash buffer (1x), kit protokolünde belirtildiği şekilde kullanılmıştır.
- Kuyucuklardaki sıvıların kuruma işlemi tamamlandıktan sonra total 100 µL TMB (Tetramethyl-benzidine) Substrat Solüsyonu ilave edilerek yaklaşık 20 dakika boyunca karanlık ortamda bekletilmiştir.
- MULTISKAN FC mikroplaka okuyucu (ThermoFisher Sci.) kullanılarak 620 nm absorbans değerinde okuma yapılmıştır ve Standart 1 kuyusunda okunan optik

yoğunluk (OD) değerlerinin 0.9–0.95 aralığında sonuç verip vermediği kontrol edilmiştir.

- Beklenen OD değeri gözlemlendiğinde reaksiyonu durdurucu solüsyondan total 100 µL kullanılarak kuyucukların her birine eklenmiştir ve 450 nm dalga boyunda (absorbans) okuma yapılarak elde edilen veriler kaydedilmiştir.

Tablo 16: Apoptoz Çalışmasında Kullanılan Solüsyonlar Ve Miktarları

REAKSİYON BİLEŞENLERİ	MİKTAR
1X Buffer (wash)	Total 400 µl
TBM Substrat Solüsyonu	100 µl
Durdurma Solüsyonu	100 µl
Lysis Buffer	1 µl
dH2O	140 µl

3.2.8. Let-7b-5p ve Let-7b-3p'nin Potansiyel Hedef Genlerinin İn Siliko Olarak Tayin Edilmesi

Let-7b-5p ve let-7b-3p miRNA'larının potansiyel hedef genlerini belirlemek amacıyla miRDB, Targetscan, miRTarBase, miRWalk veritabanları gibi biyoinformatik programlar kullanılarak her bir miRNA için potansiyel hedef genlerin analizi yapılmış ve listelenmiştir. Listeyi incelediğimizde en yüksek skor değerine sahip genler başta olmak üzere diğer tüm genler için literatür taraması gerçekleştirilmiştir. Yapılan literatür taraması sonucunda seçtiğimiz genlerin, AML hücre ve dokularında yüksek ekspresyon seviyeleri göstermesine dikkat edilmiştir. Aynı zamanda bu genlerin, çalıştığımız miRNA'lar ile AML ilişkisinde de önceden gösterilmemiş olması önemli bir kriterdir. AML hücrelerinde yüksek ekspresyon düzeyi sergileyen ve in-siliko biyoinformatik programda belirlenen let-7b-5'nin potansiyel hedef genleri; CDC25A, IL-8, CCND1 ve let-7b-3p'nin potansiyel hedef genleri; CREBZF, RORA, BRF2 ve SYF2'dir. Let-7b-5p ve let-7b-3p miRNA'ları ile transfekte edilmiş HL-60 ve NB4 hücre hatlarındaki ekspresyon seviyelerinin araştırılması amacıyla belirlediğimiz hedef genlerin, qRT-

PCR'da primer dizileri incelenmiştir. Hedef genlerin forward (F) ve reverse (R) primer dizileri listelenerek olası mismatch ve SNP durumları SNPCheck programı aracılığıyla kontrol edilmiştir. UCSC In-Silico PCR (isPCR) program ile primerlerin bağlanma (annealing) sıcaklıkları tayin edilerek kaydedilmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda hedef genlerin primer dizilerinde (forward ve reverse) olası bir mismatch ve SNP gözlemlenmeyen ve annealing sıcaklıklık dereceleri birbiriyle aynı ya da çok yakın olan diziler, tez çalışması için uygun bulunmuştur. Tezde kullanılacak primer dizilerinin (forward ve reverse), insan genomunda spesifik olmayan (non spesifik) bağlanma gerçekleştirip gerçekleştirmediği BLAST programı aracılığıyla kontrol edilmiştir. Analiz edilen primer dizileri, ilgili hedef genlerin ekspresyon seviyelerinin incelenmesi için daha sonra qRT-PCR işlemi için kullanılmıştır.

3.2.9. Gen İfadelerinin Belirlenebilmesi İçin cDNA sentezi

Let-7b-5p ve let-7b-3p ve nt mimik ile transfekte olmuş AML hücrelerine ait RNA numunelerinden total 1000 ng RNA olacak şekilde RevertAid First Strand cDNA sentez kiti (ThermoFisher Sci.) ile protokoldeki talimatlara göre cDNA sentezi yapılmıştır. Tablo 17'deki bileşenler ve gerekli miktarlar steril ve nükleaz içermeyen ependorf tüplerin her birine ayrı ayrı eklenmiştir.

Tablo 17: cDNA Sentezi için Karışım-1 Tüpünün Hazırlanmasında Kullanılan Bileşenler ve Miktarları

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

Listede belirtilen bileşenlerin eklenmesiyle birlikte karışımları içeren ependorf tüpler 65°C'de inkübe edilmiştir ve ardından 5 dk süre boyunca buz üzerinde bekletilmiştir. Tablo 18'deki bileşenler ve protokoldeki miktarlar farklı bir ependorf tüp içerisinde hazırlanmıştır.

Tablo 18: cDNA Sentezi için Karışım-2 Tüpünün Hazırlanmasında Kullanılan Bileşenler ve Miktarları

REAKSİYON BİLEŞENLERİ	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

Ependorf tüplere bileşenlerin tamamı ilave edildikten sonra yavaş bir şekilde pipetaj uygulayarak homojen bir karışım elde edilmiştir. Hazırlanmış olan karışım-1 üzerine karışım-2 yavaşça eklenerek pipetaj yapılmıştır. İşlemlerin tamamı buz üzerinde gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi, termal ısıtıcı cihazındaki 60 dk 42°C, 5 dk 25°C, 5 dk 70°C olacak şekilde farklı koşullarda yapılmıştır.

3.2.10. Gen Ekspresyonlarının Analizi İçin qRT-PZR İşlemleri

5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix (Solis ByoDyne) kitinin protokolüne uygun olarak, hedeflenen 7 gen için sentezlenen cDNA (20µl)'lar ile qRT-PCR yapılmıştır. Tablo 19'da gösterilen miktarlar ile yapılacak karışım buz üzerinde hazırlanmıştır. RNU43 kontrol miRNA'sının ve let-7b-5p ve Let-7b-3p miRNA'larının primerleri (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılmıştır.

MiRNA'ların transfeksiyonundan sonra hedef genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için hücrelerden izole edilen RNA, cDNA 'ya ters transkripte edilmiştir ve qRT-PZR işlemi yapılmıştır. Gen ekspresyon analizi için cDNA sentezi, LightCycler480 (Roche) qRT-PCR sisteminde 5x HOT--++ FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix UNG (Suitable for ROX-dependent and ROX independent qPCR cyclers) kullanılarak kit

protokolüne uygun olarak yapılmıştır. β-aktin, hedef sinyallerin (mRNA) normalizasyonunda referans olarak kullanılmıştır. Deneyler 2 tekrar halinde gerçekleştirilmiştir. Hedef genlerin nispi ekspresyon seviyeleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile analiz edilmiştir.

Tablo 19: qRT-PCR İçin Kullanılan Bileşenler ve Miktarları

BİLEŞENLER	**MİKTAR**
5X HOT FIREPol EvaGreen qPCR Supermix (Solis BioDyne)	4 µl
Primer Forward (10pmol/µL)	0,4 µl
Primer Reverse (10pmol/µL)	0,4 µl
RNAaz İçermeyen su	13,2 µl
Kalıp cDNA	2 µl
Total	**20 µ**

Tablo 20: Ekspresyon Analizi İçin qPCR Koşulları

Basamaklar	**Döngü**	**Sıcaklık (°C)**	**Süre**
Polimeraz Aktivasyonu	1	95	12 dk
Denatürasyon	40	95	15 sn
Bağlanma	40	60-65	20sn
Uzama	40	72	25sn

3.2.11. Primer Temini

Ekpresyon analizi yapılacak proto-onkogenik özellikteki CDC25A, IL-8, CCND1, CREBZF, RORA, BRF2, SYF2 genlerinin 3'UTR gen bölgeleri ile let-7b-5p ve let-7b-3p miRNA'larına özgü dizilerin PCR reaksiyonunda amplifiye edilmesi amacıyla spesifik primer çiftleri ticari olarak temin edilmiştir.

Let-7b-5p ve let-7b-3p mimiklerinin transfekte edildiği HL-60 ve NB4 hücre hatlarında in silico analiz yöntemleri kullanılarak, potansiyel hedef olarak seçilmiş genler

olan CDC25A, IL-8, CCND1, CREBZF, RORA, BRF2, SYF2 genlerinin 3'UTR bölgelerinde bulunan spesifik bağlanma noktaları belirlenmiştir. Bu 7 genin ekspresyon seviyeleri, rölatif kantitasyon tekniğiyle incelenmiştir. Gen ekspresyonlarının normalizasyon düzeyleri için β-aktin geni kullanılmıştır. Deneyler iki tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Ulaşılan verilerin tamamı $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodu aracılığıyla analiz edilmiştir.

Çalışmamızda ekpresyon analizi yapılacak hedef genlere özgü primerin dizilimleri Tablo 21'de gösterilmiştir.

Tablo 21: qPCR Çalışmasında Kullanılan Hedef Genlerin Primer Dizileri (R: reverse; F: forward)

GENLER	PRİMER DİZİSİ (5'→3')	BAZ SAYISI
IL-8/CXCL8-F	AACTGAGAGTGATTGAGAGTGG	22
IL-8/CXCL8-R	ATGAATTCTCAGCCCTCTTCAA	22
CREBZF-F	GCTCCGTTGTAGGGGTTACA	20
CREBZF-R	AAAAACAGCAGAAGCCCTGA	20
RORA-F	TGCCTACCGCTTTCCTTT	18
RORA-R	AAATAAACTTGGAGTGTTCTGGA	23
CCND1–F	CGTGGCCTCTAAGATGAAGG	20
CCND1-R	CTGGCATTTTGGAGAGGAAG	20
CDC25A-F	TTCCTCTTTTTACACCCCAGTCA	23
CDC25A-R	TCGGTTGTCAAGGTTTGTAGTTC	23
BRF2–F	CAGAAGTGGAGACCCGAGAG	20
BRF2–R	CAGGGAGGGTTAGGGACACT	20
SYF2–F	CAGAAGATGCAGAAAGATGGG	21
SYF2-R	TTGATCTGCTTGGTCAACCG	20
Let-7b-5p-F	GCGCTGAGGTAGTAGGTT	18
Let-7b-5p-R	GTGCAGGGTCCGA	13
Let-7b-3p-F	CCTCCACCCTATACAACCTACTGC	24
Let-7b-3p-R	CTCGACCCTGGCACCT	16

3.2.12 İstatistiksel Analiz

Yapılan deneysel çalışmalardan elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SPSS 28 programı aracılığıyla Student's t-Testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. miRNA hedef gen ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerin hesaplanması için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak) yöntemi kullanılmıştır ve sonuçlar rölatif kantitasyon metodu ile incelenmiştir. Çalışma içerisinde veriler ortalama '± standart sapma' ile ifade edilmiştir. $p<0,05$'in altındaki değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. RNA İzolasyonu

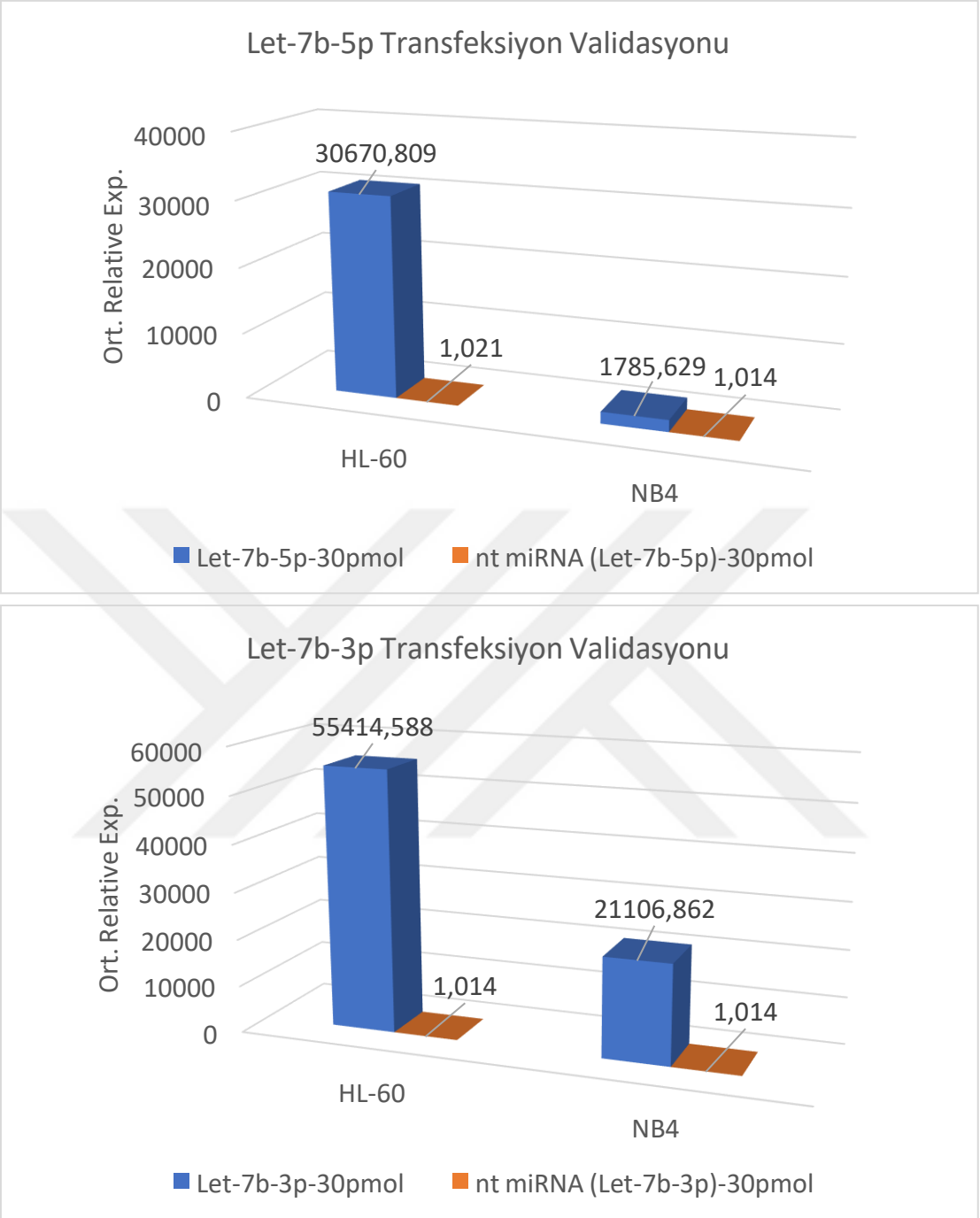
Let-7b-5p ve let-7b-3p miRNA mimiklerinin transfekte edildiği hücrelerde transfeksiyonun doğrulanmasının ardından ekspresyonları araştırılacak genlerin ifade düzeylerindeki değişimlerin analiz edilebilmesi için RNA izolasyonu yapılmıştır. Sonuç olarak tespit edilen RNA konsantrasyonları ve saflık değerleri Tablo 22'de gösterilmiştir.

Tablo 22 : Transfekte olan Hücrelerin RNA Konsantrasyon ve Saflık Değerleri

RNA ÖRNEĞI	KONSANTRASYON (ng/µL)	SAFLIK DEĞERI (A260/280)
HL-60-Let-7b-5p	317,2	1,88
NB4-Let-7b-5p	415,4	1,92
HL-60-Let-7b-3p	345,6	1,95
NB4-Let-7b-3p	474,4	1,93
HL-60-nt Kontrol	660,8	2,04
NB4-nt-Kontrol	890,4	2,03

4.2. HL-60 ve NB4 Hücre Hatlarına miRNA Mimik Transfeksiyon Validasyonu

Transfeksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak için RNA, cDNA'ya çevrildi. qRT-qPCR tekniği kullanılarak HL-60 ve NB4 hücre hatlarında let-7b-5p ve let-7b-3p ekspresyon düzeylerindeki değişimlerin analizi yapılmıştır. AML hücre hatlarına Lipofectamin 2000 kullanılarak yapılan let-7b-5p, let-7b-3p mimikleri ve nt transfeksiyon işleminden sonra mimik transfeksiyonu yapılan hücrelerde kontrol grubuna göre ilgili miRNA ifade düzeylerinin anlamlı şekilde arttığı tespit edilmiştir. (Şekil 18)

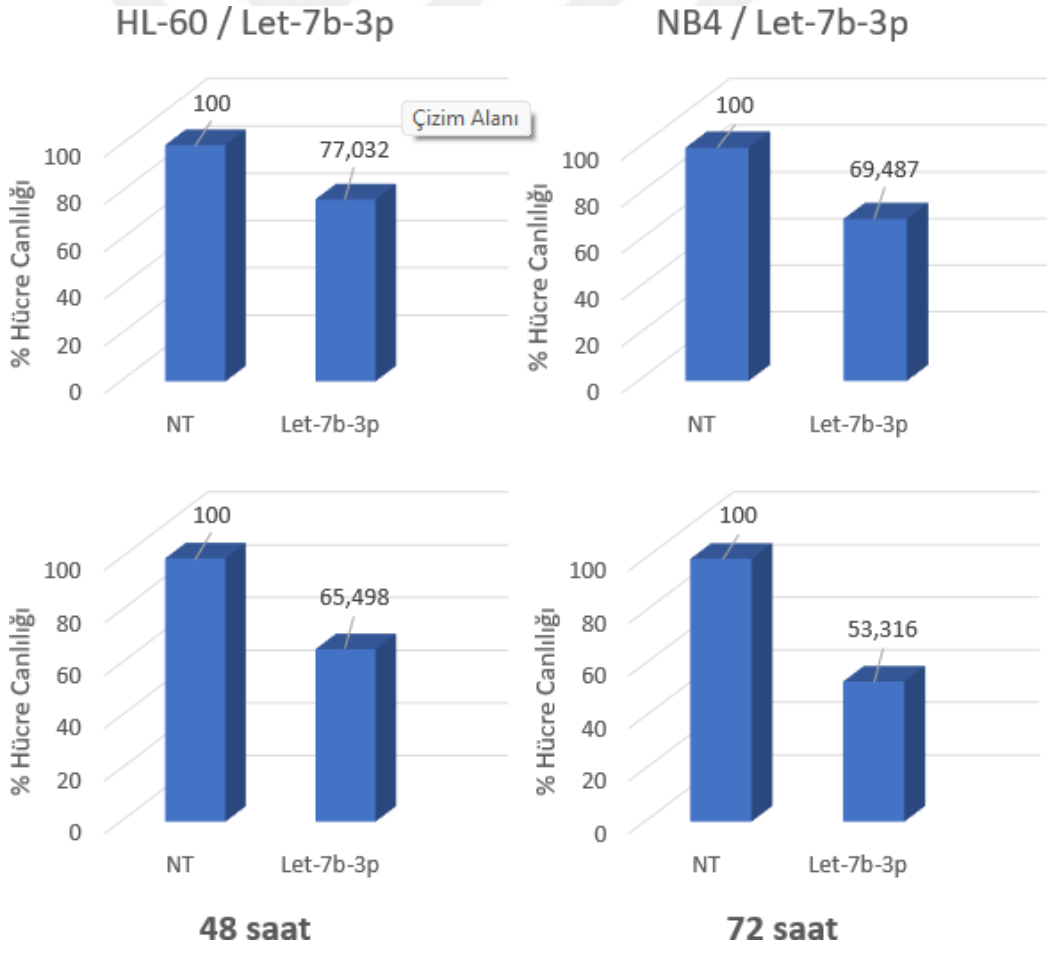


Şekil 15: HL-60 ve NB4 hücrelerinin Transfeksiyon Validasyonu

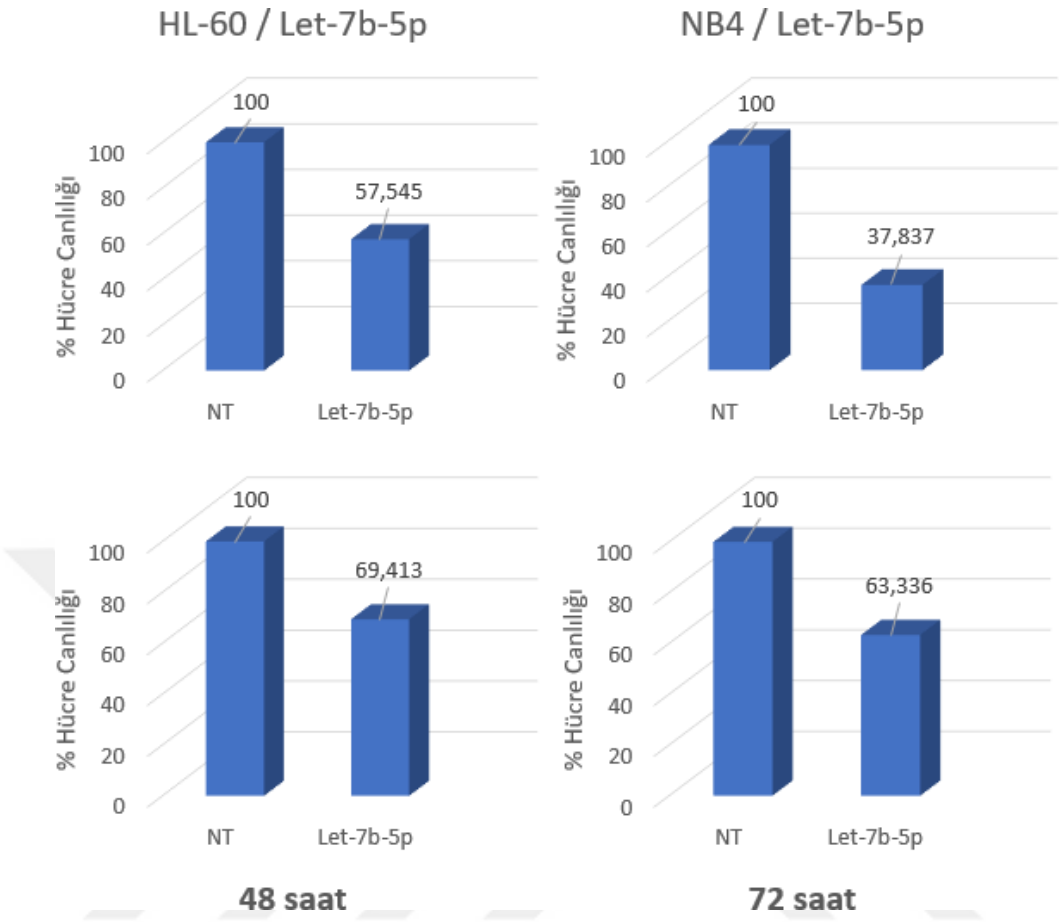
Let-7b-5p ve let-7b-3p mimiklerinin HL-60 ve NB4 hücre hatlarına transfeksiyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmesi sonucunda miRNA ekspresyonlarının negatif kontrol grubuna kıyasla önemli miktarda arttığı gözlemlenmiştir.

4.3. Let-7b-5p ve Let-7b-3p'nin, HL-60 ve NB4 Hücrelerinin Proliferasyonuna Etkisi

Gerçekleştirilen hücre proliferasyonu çalışmaları sonucuna göre; HL-60 ve NB4 hücre hatlarına transfekte edilen let-7b-5p, nt miRNA kontrol grubuna göre 48 saatlik (p=0.028; p=0,02) ve 72 saatlik (p=0,036; p=0,015, sırasıyla) inkübasyon süreleri sonucunda hücre proliferasyonunu azalttığı tespit edilmiştir. Aynı şekilde let-7b-3p de nt miRNA kontrol grubuna göre 48 saatlik (p=0.028; p=0,028) ve 72 saatlik (p=0.028; p=0,028, sırasıyla) inkübasyon süreleri sonucunda hücre proliferasyonda anlamlı derecede düşüşe yol açtığı görülmüştür. Bu bulgular, let-7b-5p ve let-7b-3p'nin AML hücrelerinin proliferasyonunda negatif düzenleyici rolde olduklarını göstermiştir (Şekil 16-17).



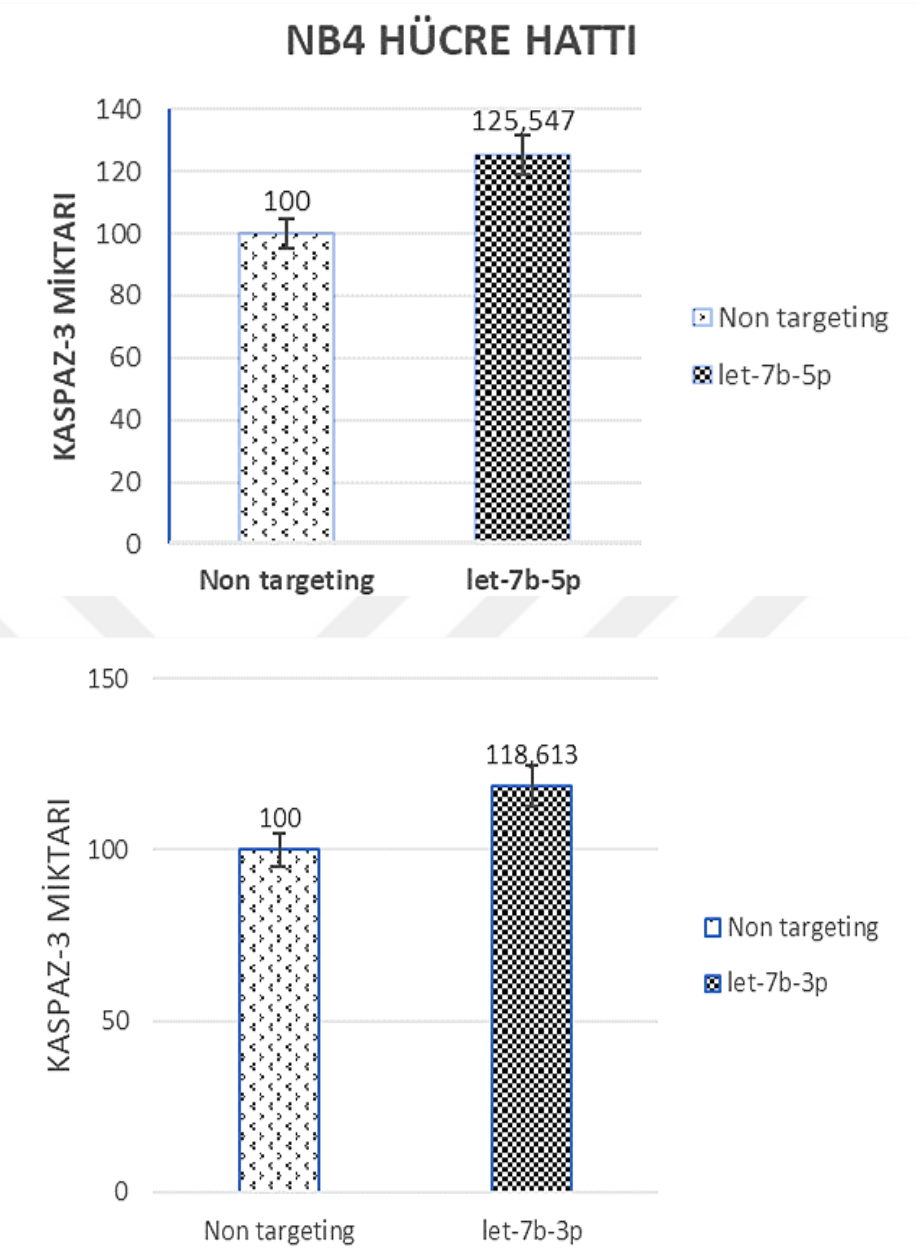
Şekil 16: Let-7b-3p'nin HL60 ve NB4 hücrelerindeki proliferasyon değişimleri (48. ve 72. saat)



Şekil 17: Let-7b-5p'nin HL60 ve NB4 hücrelerindeki proliferasyon değişimleri (48. ve 72. saat)

4.4. Let-7b-5p ve Let-7b-3p 'nin Hücre Apoptozu Üzerindeki Etkisi

AML hücrelerinde let-7b-5p ve let-7b-3p'nin apoptoz yolağı üzerindeki etkisini araştırmak için AML hücrelerinde bir apoptoz baskılayıcısı ve otofaji düzenleyicisi olan Kaspaz-3 miktarının analiz edildiği Kaspaz-3 deneyi verilerine göre; NB4 hücre hatlarına transfekte edilmiş let-7b-5p ve let-7b-3p'nin, nt miRNA kontrol grubuna göre AML hücrelerinin apoptozunu istatistiksel olarak anlamlı derecede artırdığı görülmüştür. (p=0,004 ; p=0,009 , sırasıyla) (Şekil 18).



Şekil 18: Let-7b-5p Ve Let-7b-3p miRNA'larının NB4 Hücrelerindeki Apoptoza Etkisi (p<0,01)**

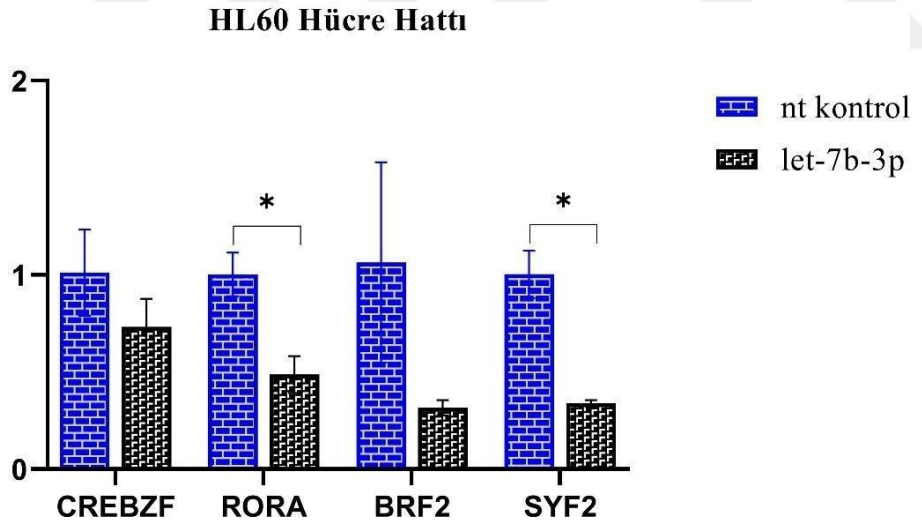
4.5. Let-7b-5p ve let-7b-3p'nin, AML Hücre Hatlarında Hedeflediği Genlerin Ekspresyon Sonuçları

Bu tez çalışmasının amacı doğrultusunda HL-60 ve NB4 kullanılarak let-7b-5p ve let-7b-3p miRNA'larının, bu hücrelerde tahmini hedef genleri olan CDC25A, IL-8, CCND1 ve CREBZF, RORA, BRF2 ve SYF2 genlerinin ekspresyon düzeyleri Light Cycler 480 cihazında relatif kantitasyon metodu ile değerlendirilmiştir. Gen ekspresyonlarının normalizasyon seviyeleri β-aktin geni kullanılarak yapılırken

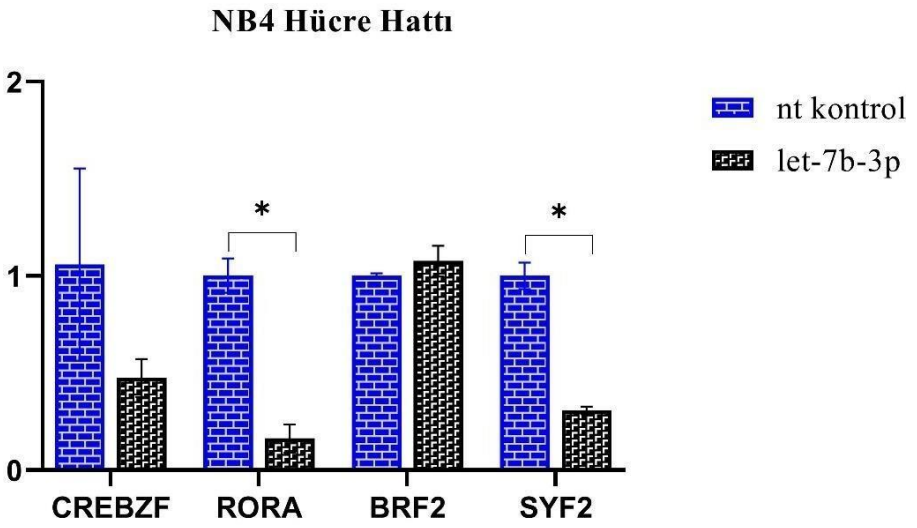
istatistiksel analizler Student's t-testi ile yapılmıştır. İstatistiksel analizler sonucunda $p<0,05$ olan değerler anlamlı; $p>0,05$ olanlar ise istatistiksel açıdan anlamlı olduğu kabul edilmiştir.

Ekspresyon çalışmalarında 1000 ng total RNA kullanılmış olup sonuçta let-7b-3p miRNA transfekte edilen HL-60 ve NB4 hücre hatlarında RORA (p=0,038; p=0,007) ve SYF2 (p=0,0169; p=0,0122) genlerinin ifadelerinin kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir. Buna rağmen CREBZF (p=0,27; p=0,107), BRF2 (p=0,177; p=0,309) genlerinin ekspresyon seviyelerinde ise istatistiki olarak anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir (Şekil 19-20).

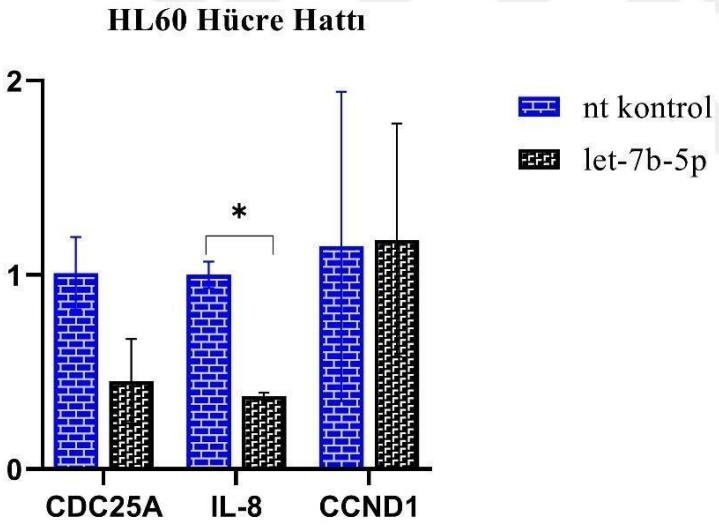
Let-7b-5p hedef genlerinin ifade düzeyinin belirlenmesi için de yine total 1000 ng RNA kullanılmıştır. Elde edilen veriler sonucunda HL-60 ve NB4 hücre hatlarında IL-8 (p=0,006; p=0,026) gen ifadesinin let-7b-5p ile transfekte edilen her iki AML hücre hattı grubunda, nt miRNA kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte CDC25A (p=0,48; p=0,20) ve CCND1 (p=0,77; p=0,33) genlerinin ifadelerinde istatistiki olarak anlamlı şekilde değişmediği tespit edilmiştir (Şekil 21-22).



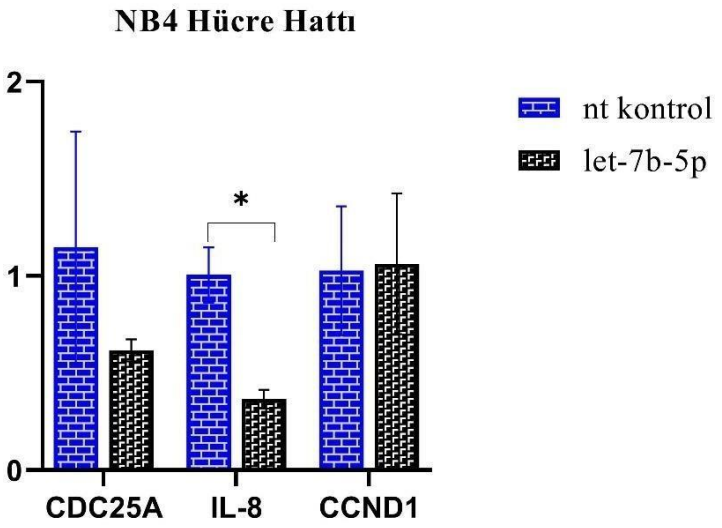
Şekil 19: HL-60 hücre hatlarında CREBZF, RORA, BRF2 ve SYF2 genlerinin ekspresyon düzeyleri (* p<0,05, ** p<0,01)



Şekil 20: NB4 hücre hatlarında CREBZF, RORA, BRF2 ve SYF2 genlerinin ekspresyon düzeyleri (* p<0,05, ** p<0,01)



Şekil 21: HL-60 hücre hatlarında CDC25A, IL-8 ve CCND1 genlerinin ekspresyon düzeyleri (* p<0,05, ** p<0,01)



Şekil 22: NB4 hücre hatlarında CDC25A, IL-8, CCND1 genlerinin ekspresyon düzeyleri (* p<0,05, ** p<0,01)

5. TARTIŞMA

AML, hematopoetik kök hücrelerin anormal olarak proliferasyonu, farklılaşması ve olgunlaşması ile karakterize olan en yaygın ölümcül hematolojik malignitelerden biridir (230). AML, çocukluk çağındaki lösemilerin %15-20'sini ve yetişkin dönemdeki lösemilerin yaklaşık %35'ini oluşturmaktadır (64). Amerikan Kanser Araştırmaları Derneği'nin verilerine göre, ABD'de birkaç yıl içerisinde 20 bin civarlarında yeni AML vakası teşhisi konulacağı ve AML nedeni ile hayatını kaybedenlerin sayısının ise 10 bin kişinin üzerinde olacağı tahmin edilmektedir (231). SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results) kanser verilerinde, AML'nin görülme sıklığı kadın ve erkeklerde yılda 4.3/100.000 olarak belirtilmiştir ve en sık tanı konulan yaşlar 65-74 aralığını kapsar (70). Mevcut tedavide kullanılan kemoterapötik ilaçların toksisitelerinin yüksek olması, etki düzeyinin yeterli olmaması ve moleküler hedefli terapötiklere oluşan direnç gibi sebeplerden dolayı tedavideki başarı yüzdesi istenilen seviyede değildir (1, 31). AML tedavisi gören hastalarda geleneksel olarak uygulanan yoğun kemoterapinin ardından hastalığın ilerlemesi belli bir noktaya kadar yavaşlasa da kemik iliğinde yine de düşük miktarda lösemik blastlar kalabilmektedir. Bu sebeple hastaların çoğunda tam remisyonun görülmesinin ardından lösemi nüks etmekte ya da ölümle sonuçlanabilmektedir (9).

AML'nin gelişimi, ve ilerlemesinde çeşitli faktörlerin etkisi bulunmaktadır (105). Bunlardan birisi miRNA'lardaki genetik ve epigenetik değişikliklerdir. MiRNA'lar, hedefledikleri mRNA'ların ifadesinin inhibe edilmesi ya da susturulmasında görevli RNA'lardır (9). MiRNA'lar çeşitli kanserlerde tanı, prognoz ve tedavi gibi önemli temel süreçlere katkıda bulunma potansiyeli taşıyan önemli moleküllerdir. MiRNA'lar, hem onkogenik (onkomiR) hem de tümör supresör (TsmiR) olarak işlev görebilmektedir. OnkomiR'ler çeşitli kanserlerde aşırı ifade seviyeleri gösterirken, TsmiR'ler çeşitli kanser hücre ve dokularda düşük ifade seviyelerine sahiptir (232). miRNA'lar, çeşitli hücrelerde birçok geni hedeflerler ve bu genlerin ekspresyon seviyelerinin yeniden regüle edilmesi, çeşitli hastalıkların tedavileri için potansiyel taşımaktadır. Özellikle çeşitli kanser hücrelerinde miRNA'ların ekspresyon düzeylerinin yeniden düzenlenmesi sayesinde günümüzde uygulanan mevcut kanser tedavilerinin yanında, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi konusunda önemli desteklerinin olacağı düşünülmektedir. Mevcut çalışmalarda miRNA ekspresyon profillerinin yeniden düzenlenmesi sonucunda,

onkogenik karakterdeki genlerin susturulmasına veya ekspresyon düzeyi azalmış tümör süpresör genlerin tekrar ifade edilmesine katkı sağlayarak kanser gelişim ve ilerleme sürecinde önemli bir durdurucu etki göstermesi hedeflenmektedir (1, 230). AML'de miRNA ekspresyonlarının, hematopoetik süreci kontrol etmek ile ilişkili olduğu ve AML patogenezinde de kritik önem taşıdığı bildirilmiştir. Bu nedenle miRNA ekspresyon düzensizlikleri, hematopoetik mekanizmaların işlevindeki bozulmalara neden olarak lösemi gelişimini desteklemektedir (7).

Akut lösemili hastaların tespiti ve AML alt tiplerine sınıflandırılması, prognoz ve tedavinin belirlenmesi amacıyla tedaviye duyarlı ve spesifik olan biyobelirteçler gereklidir. AML'li hastalarda yapılan farklı çalışmalar, çeşitli miRNA ifade düzeylerinin, hastalığın genel sağkalım ve nükssüz sağkalım arasındaki ilişkili olabileceğini göstermektedir. Aynı zamanda lösemi semptomlarının ve tedaviye yanıtın tahmininde, hastalığın prognozunun belirlenmesinde moleküler biyobelirteç olarak işlev görebileceğini düşündürmektedir (9).

Literatürde, kanser ve çeşitli hastalıklar üzerindeki etkisi araştırılan pek çok farklı miRNA bulunmaktadır. İlk defa C. elegans'ta gelişimsel zamanlamayı regüle eden bir gen olarak keşfedilen miRNA let-7, türler arası yüksek derecede korunmuştur ve önemli bir tümör baskılayıcı olarak işlev görmektedir. Buna karşın onkogenik özellik gösteren let-7 ailesi üyelerinin olduğu da bildirilmiştir. Pre-miRNA (prekürsör-miRNA) let-7b, mature seviyeye geldiğinde dubleksin bir kolu -5p (let-7b-5p), diğer kolu ise -3p (let-7b-3p) kısmını meydana getirir. Let-7b-5p ve let-7b-3p, let-7 ailesinin önemli merkezi üyeleri arasındadır (233). Let-7b-5p'nin, AML prognozunu etkileyen miRNA'lardan olduğu bilinirken let-7b-3p'nin AML ile ilişkisini gösteren henüz bir çalışma mevcut değildir. Tümörsupressör olarak iyi tanımlanmış let-7b-5p, RAS, MYC ve HMGA2 gibi tümörogenezde çeşitli işlevlere sahip birçok proto-onkogeni hedefleyerek ekspresyonlarında anlamlı değişiklikler meydana getirebilmektedir (14). Let-7b-5p'nin aşırı ekspresyonunun birçok lösemik süreçte olduğu gibi AML hücrelerinin de proliferasyonunu baskıladığı ve çeşitli hedef genlerinin ekspresyonunu aşağı regüle ettiği bilinmektedir (120). AML'de olduğu gibi let-7b-5p, gastrik (121), melanoma (122), akciğer (123), meme (124), glioblastoma (126), kolorektal (129) kanser gibi pek çok kanser türünde azalmış ekspresyon seviyeleri göstermektedir. Yapılan çalışmalar hücrelere transfeksiyonu sağlanarak ekspresyon seviyesi arttırılan let-7b-5p'nin tümör

hücrelerininin proliferasyonunu, gelişimini ve metastazını baskılayarak hücrelerin apoptoz indüksiyonunu arttırdığı bildirilmiştir. Literatürde let-7b-5p ve AML ilişkisini gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmaların birisinde, t(8;21) kromozomal değişikliğe sahip AML hücrelerinde let-7b-5p, hedeflediği AML1-ETO (RUNX1-ETO, RUNX1-RUNX1T1) onkogenik füzyon geninin 3′UTR'sine bağlanarak ekspresyonunu baskılayarak, hücrelerin proliferasyonunu bloke ettiği gösterilmiştir. Elde edilen bu veriler let-7b-5p'nin AML hücrelerinde tümör baskılayıcı işlevini desteklemektedir (234).

Let-7b-5p ve let-7b-3p miRNA'ları farklı doku ve hücrelerde farklı şekilde ekspresyon seviyeleri gösterirken let-7b-3p'nin, AML ile ilişkisini gösteren literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Çeşitli malign hastalıklarla ilişkisi gösterilmiş let-7b-3p'nin lipid metabolizmasında, hücre proliferasyonunda, Wnt ve Notch sinyal yolaklarında önemli işlevlere sahip olduğu bildirilmiştir. Let-7b-3p'nin hücre döngüsü, hücre proliferasyonu, ve apoptozu ve EMT gibi çoklu etkileşimler üzerinden hücrelere etki ettiği çeşitli çalışamalarda gösterilmiştir. Tümör hücreleri üzerindeki bu işlevi sayesinde erken aşamadaki kolon kanseri hastaları için umut verici bir biyobelirteç olarak tanımlanmıştır (16). Ayrıca glial ve glionöronal pediatrik beyin tümörlerinde anormal let-7b-3p ekspresyonu gözlemlenmiştir (137). Let-7b-3p'nin çeşitli kanserlerdeki tümörsupressor özelliği gastrik kanser hücrelerinde de bildirilmiştir. Bu çalışmada, PlGF geninin TGF-β, MAPK ve Wnt sinyal yolları aracılığıyla baskılanması sonucunda let-7b-3p ifadesinin anlamlı seviyede artmış ve kanser oluşumu ve gelişimi desteklenmiştir. Burada Let-7b-3p, hücre döngüsüne etki eden CDC2, MAPK2 gibi onkogenleri hedefleyerek çeşitli sinyal yolları (PI3k, VEGF, MAPK ve Wnt) üzerinde düzenleyici etki göstermiştir (235). Ayrıca let-7b-3p, FZD5 ve GSK3B genlerinin mRNA'larını hedefleyerek anjiyogenez sinyal yolu ile etkileşime girdiği rapor edilmiştir (236). Literatürde bu bulguları destekleyici, tanı ve tedavide kullanılma potansiyeli taşıyabilecek yeterli sayıda çalışma bulunmadığı için tezimizden elde edeceğimiz sonuç literatüre katkı sağlaması amacıyla oldukça önemlidir.

Çalışmamızda let-7b-5p ve let-7b-3p mimiklerinin transfekte edildiği HL-60 ve NB4 hücre hatlarında gözlemlenen proliferasyon oranında, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde azalma tespit edilmiştir. Aynı zamanda yapılan in vitro apoptoz çalışmaları sonucunda da let-7b-5p ve let-7b-3p'nin aktif kaspaz-3 oranını arttırarak hücreleri

apoptoza zorladığı görülmüştür. Elde ettiğimiz bulgular neticesinde AML'de kanser proliferasyon ve apoptoz süreçlerinde etkin rolleri bilinen let-7b-5p ve let-7b-3p'nin bazı potansiyel hedef genleri miRTarBase, miRDB, Targetscan ve miRWalk gibi in siliko veritabanları kullanılarak tespit edilmiştir.

Bir miRNA çok sayıda geni aynı anda hedefleyebilmektedir. Çalışmamızda let-7b-5p'nin, HL-60 VE NB4 AML hücrelerinde hedeflediği CDC25A, IL8, CCND1 genlerinin ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler gözlemlenmiştir ve bu miRNA'nın AML oluşumu, gelişimi, prognozu ve apoptozu gibi hücresel süreçler üzerindeki etkisi gösterilmiştir. Benzer şekilde let-7b-3p'nin de HL-60 VE NB4 hücrelerinde hedeflediği CREBZF, RORA, BRF2 ve SYF2 genlerinin ekspresyon düzeylerindeki değişiklikler gözlemlenmiştir. Hedeflenen bu genler kanser çalışmalarında sıklıkla kullanılan ve aşırı ekspresyon seviyeleri gösteren ve genellikle kanser patogeneziyle ilişkilendirilmiş proto-onkogenlerdir. Bildiğimiz kadarıyla bu çalışmayla let-7b-3p'nin AML'de CREBZF, RORA, BRF2 ve SYF2 genlerini hedefleyerek regüle ettiğine dair ilk bulgular rapor edilmiştir. Elde ettiğimiz bulgular AML'nin patogenezinin aydınlatılmasında yeni ve önemli bilgiler sağlayabilir.

Çalışmamızda let-7b-5p'nin hedeflediği genlerden biri olan IL-8 geninin ekspresyon seviyelerinde, kontrol grubuna kıyasla let-7b-5p mimik transfekte edilen grupta istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir azalma gözlemlenmiştir. IL-8 geni, insan kromozomunun 4q13.3 bölgesinde lokalizedir ve 4 ekzon, 3 intron, ve 1 proksimal promotör bölgesi vardır. CXCL8 (CXC Motif Chemokine Ligand 8) olarak da isimlendirilir. CXC kemokin gen ailesinden olan IL-8, enflamatuar uyaranlara tepki olarak çok sayıda farklı hücre tipi tarafından salgılanır. İlk keşfedilen kemokinlerden biri olan IL-8'in, bazofillerin, nötrofillerin ve T lenfositlerin migrasyonunu indükleyen aktifleşmiş monositlerin ve makrofajların salgıladığı önemli bir kemotaktik faktör olduğu belirtilmiştir (237). IL-8 tümörijenezde özellikle tümör gelişimi, ilerlemesi, invazyonu ve anjiyogenez gibi hücresel süreçler için önemli bir rolü olan bir gendir. IL-8'in anormal ekspresyonunun prostat, meme, akciğer ve karaciğer kanserleri dahil olmak üzere çeşitli tümör tiplerine yol açabileceğini düşündürmektedir. IL-8 polimorfizmleri gibi genetik ve epigenetik anomaliler kanser riski ve gelişimiyle ilişkilendirilmiştir (238). Mevcut çalışmalar IL-8'in, trombofili ve anjiyogeneze katılması sebebiyle farklı malign hastalıklarla ilişkisini bildirilmektedir. Akciğer kanseri, renal hücreli karsinom, mide

kanseri, kolorektal kanser, prostat kanseri, over kanseri, hepatosellüler karsinom ve melanom gibi çeşitli kanser türlerinde IL-8 geninin aşırı eksprese olduğu ve hücrelerin metastazını desteklediği bildirilmiştir. Farklı çalışmalardan elde edilen bulgular, *IL-8'in* çeşitli kanserlerin klinik değerlendirmesinde ve hastalığın prognozunda önemli bir biyobelirteç rolüne sahip olabileceğini göstermektedir. (160, 171). Bu çalışmalardan birinde tümörden türetilen IL-8 geninin, kemiğe invazyonu gerçekleşmiş meme kanseri hücrelerinin osteolitik metastazını ve osteoklast hücrelerinin farklılaşmasını ve aktifleşmesini indüklediği bildirilmiştir (160). Ayrıca IL-8'de nadir olarak rastlanan genetik polimorfizmler de meme kanseri gelişimi ile ilişkilendirilmiştir (168). IL-8 geninin, melanom hücreleri tarafından üretilen hem in-vitro hem de in-vivo güçlü anjiyojenik faktörlerden (pro-anjiyojenik) biri olması, insan melanomlarına karşı geliştirilen immünoterapi tedavileri için potansiyel bir hedef olabileceğini düşündürmektedir. Huang S ve arkadaşları tarafından, melanom kanser hücrelerinde aşırı eksprere olan IL-8'in, anti-IL-8 antikoru (ABX-IL8) tarafından baskılanması yoluyla insan melanom hücrelerinin anjiyojenezini ve metastazını inhibe ettiği yapılan çalışmada gösterilmiştir (239). Farklı bir çalışmada prostat kanseri, gastrik kanser, over ve akciğer kanserlerinde gösterilen IL-8 geninin artmış ifadesi, gelişmiş anjiyojenez, tümör gelişimi ve büyümesi ve metastaz ile bağlantılı olduğundan, IL-8 yeni tedavi stratejisi ve terapötik gelişim için potansiyeli yüksek bir hedef olabileceği düşünülmektedir (240). İnsan mide karsinomunda IL-8'in artmış ekspresyonunun, otokrin/parakrin mekanizmalar aracılığıyla tümör vaskülaritesi, gelişimi ve ilerlemesi ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir (165). Literatürde mevcut çalışmalar, IL-8'in çeşitli kanser türlerinin prognozunu belirlemek ve takip etmek amacıyla klinikte faydalı olabilecek bir biyobelirteç potansiyeli taşıdığını düşündürmektedir (241).

Let-7b-5p'nin HL-60 VE NB4 hücrelerinde hedeflediği diğer gen CDC25A'dır. CDC25A, CDC25 fosfataz ailesinin bir izoformudur. Çift özgüllüklü protein fosfataz olan CDC25A, CDK'lara karşı etkinlik göstererek hücre döngüsünün G1 fazından S fazına geçişini düzenlemede kritik bir role sahiptir. CDC25A'nın, sitogenetik anormallikleri olan ökaryotik hücrelerin, hücre döngüsü boyunca ilerlemesini engelleyen DNA hasarına tepki olarak spesifik bir bozunmaya uğradığı bilinmektedir. Yapılan güncel çalışmalarda, in-vivo olarak hücre döngüsü kontrol noktasındaki hasarlarından (DNA hasarı gibi) kaynaklanan genomik instabilitenin, tümörün başlaması ve ilerlemesi için indükleyici bir temel mekanizma olduğu bildirilmiştir. CDC25A geni, hücre proliferasyonu, gelişimi ve

apoptozu gibi hücresel süreçlerde önemli işleve sahiptir ve çeşitli insan kanseri hücrelerinde ve primer tümör örneklerinde yukarı regüle edilir ve bu durum hastalığın şiddetlenmesi ve kötü prognostik süreç ile ilişkilendirilmiştir (147). CDC25A gen ifadesi, transkripsiyon ve translasyon düzeyinde regüle edilir. CDC25A ekspresyonunun meme kanserinde hücre gelişimini ve büyümesini inhibe ettiği bildirilmiştir (150). Aynı şekilde hepatosellüler karsinomda, CDC25A'nın aşırı ifade edilmesi hastalığın kötü prognozu ile ilişkilendirilmiştir. Rahim ağzı kanseri hücrelerinde yüksek ekspresyon seviyeleri bildirilen CDC25A geni, bu hücrelerin sağkalımı ve apoptozu üzerinde belirgin bir etkiye sahiptir fakat ilgili mekanizma ve sinyal yolları henüz net olarak bilinmemektedir (242). Bir diğer çalışmada CDC25A'nın aşırı ekspresyonunun, kanser hücrelerinin radyoterapi ve kemoterapi direncini arttırır. Buna karşın CDC25A geninin baskılanması ile serviks kanseri hücrelerinde apoptozun indükler ve bu durum da radyoterapiye direnç gösteren hastalar için klinikte potansiyel bir terapötik hedef olarak umut vaad etmektedir fakat çalışmaların devamlılığı sağlanmalıdır. (243). Literatürde let-7b-5p ve CDC25A ilişkisi retinoblastom ve melanom hücrelerinde gösterilmiş olup CDC25A'nın artmış ekspresyon seviyeleri tespit edilmiştir (122). Literatürde let-7b-5p ve CDC25A ilişkisini gösteren yeterli çalışma mevcut değildir. Yaptığımız bu tez çalışması ile aralarındaki ilişki araştırılmıştır. Çalışmamızda AML hücrelerinde let-7b-5p'nin hedef geni olan CDC25A'nın ekspresyon seviyelerinde, kontrol grubuna kıyasla let-7b-5p mimik transfekte edilen grupta istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir değişim gözlemlenmemiştir.

Let-7b-5p'nin HL-60 VE NB4 hücrelerinde hedeflediği diğer bir gen ise CCND1 genidir. G1-S fazları arasındaki geçişte, hücre döngüsünün regülasyonu için kritik bir protein olan CCND1 geni, bir onkogen olarak tanımlanmıştır. CCND1'in aşırı ekspresyonu G1 fazını hızlandırır ve bu durum da hücre proliferasyonunu, kanser gelişimi ve ilerlemesi riskini arttırmaktadır. CCND1'deki gen polimorfizmler kolorektal, akciğer, özofagus, baş ve boyun, prostat ve mesane gibi solid tümörler ile ilişkilendirilmiştir (185, 244). Buna ek olarak CCND1'in ekspresyonu melanom, glioblastoma, osteosarkom, tiroid kanseri gibi kanserlerde miRNA'ların etkisiyle aşağı regüle edilmektedir (184). Malign mukozal melanomada yapılan bir çalışmada let-7b-5p'in aşırı ifadesi, CCND1 ekspresyonunu inhibe ederek hücre büyümesini, migrasyonu, invazyonu ve metastazı baskılamakta ve hücre apoptozunu indüklemektedir. Başka bir çalışmada let-7b-5p ve CCND1 ve CDC25A ilişkisini nöral prekürsör hücrelerde (NPC'ler) de araştırılmıştır.

NCP hücrelerinde let-7b-5p'nin yüksek düzeyde eksprese olmasıyla CDC25A ve CCND1'nın aşağı regülasyonu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada artan let-7b-5p ekspresyonunun, hücre proliferasyonunu ve hücre döngüsünün ilerlemesini de engellediği bildirilmiştir (245). Bu bulgular Let-7b-5p'nin, radyosensitivite açısından bir biyobelirteç rolünün olabileceğini gösterir ve terapötik olarak kanser tedavisini destekleyebilir. Tez çalışmamızda HL-60 VE NB4 AML hücrelerinde let-7b-5p'nin hedef geni olan CCND1'nın ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla let-7b-5p mimiği ile transfekte olmuş grupta istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir değişiklik gözlemlenmemiştir.

Çalışmamızda let-7b-3p'nin hedeflediği genlerden olan RORA ve SYF2 genlerinin ekspresyon seviyelerinde, kontrol grubuna kıyasla let-7b-3p mimik transfekte edilen grupta istatistiksel olarak anlamlı düzeyde bir azalma gözlemlenmiştir. Buna karşın CREBZF ve BRF2 genlerinin ekspresyonlarında anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. Let-7b-3p'nin AML hücrelerinde hedeflediği ve çalışmamızın sonucunda da ekspresyon düzeyinde istatistiki olarak anlamlı bir azalma gözlemlenmiştir. 1994'te ilk olarak Giguère V ve ark, RORA geni ile farklı DNA yapısına ve ligand spresifik bağlanma bölgesine sahip olan ve doku spesifik ekspresyon seviyeleri gösteren dört farklı izoform (RORA 1-4) tanımlamıştır (197). Bu izoformların yapıları ve fonksiyonel karakterleri ilk defa in-vitro incelenerek klonlanmış ve günümüzde bilindiği haliyle, nükleer reseptörler (NR1) olarak işlev kazanmştır. RORA geninin, kalp, kas, deri, kolon, akciğer, beyin, dalak ve meme kanseri ve epitel hücreleri de dahil çok sayıda doku ve hücrede ifade düzeyleri tanımlanmıştır (195, 199) Yapılan çalışmalarda RORA geninin bir tümörsopressör olarak işlev gördüğü bildirilmiştir. Anormal RORA fonksiyonu ve aktivasyonu, osteoporoz, astım, ateroskleroz, otoimmün hastalıklar, epilepsi veya serebellar ataksi, otizm ve obezite gibi çeşitli hastalıkların patolojilerini etkilediği bilinmektedir. (200). Meme kanserinde yapılan bir çalışmada RORA'nın ifade seviyesinin aşağı regülasyonu kanser gelişimini inhibe ederek RORA'nın güçlü ve önemli bir tümör baskılayıcı role sahip olduğunu işaret eder (246). Endometrial kanserde RORA geninin aşırı ifade edilmesi, miR-652'nin tümörogenezi indükleyici etkisini engelleyebileceğini göstermiştir (247). Bir diğer çalışmada RORA'nın yüksek ekspresyon düzeyinin, glioma hücrelerinde proliferasyonunu ve tümör gelişimini baskılayabileceği gözlemlenmiştir (248). Zou ve arkadaşları, hepatoselüler karsinomlu (HCC) hastalarda kullanılması amacıyla RORA genini, bir inhibitör ve prognostik bir

biyobelirteç şeklinde tanımlamıştır. Ayrıca bu bulgular, RORA geninin ilerleyen çalışmalarda Wnt sinyal yolunun regülasyonu aracılığıyla tümörün gelişimini ve ilerlemesini inhibe edebileceğini göstermiştir (249). RORA ve AML ile ilişkisini gösteren bir çalışmada, hsa-miR-153-5p ifadesindeki artışın, AML'li hastalarda iyileştirilmiş genel sağkalımı ile ilişkili olan RORA geninin ifade seviyesini aşağı regüle ettiği bildirilmiştir. RORA geni genellikle AML'de mutasyona uğramaz fakat solid tümörlerde tümör baskılayıcı işlevi bildirilmiştir. Bu sonuçlar, RORA geninin AML'de yüksek potansiyel taşıyan terapötik bir hedef olabileceği fikrini beraberinde getirmiştir (201). Literatürde AML hücrelerinde let-7b-3p ile RORA ilişkisini gösteren mevcut bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma ile ilk defa gösterilmiştir.

Let-7b-3p'nin HL-60 VE NB4 hücrelerinde hedeflediği ve anlamlı olarak ekspresyon seviyesinde azalma gözlemlediğimiz diğer gen ise SYF2 genidir. P29, FSAP29, NTC31 gibi çeşitli isimleri vardır. İnsan p29 geninin homoloğu olduğu bilinen SYF2 (SYF2 homologu, RNA ekleme faktörü), ilk olarak mayadan başlayıp insana kadar uzanmaktadır. SYF2, DNA hasar mekanizmasıyla ilişkili hücre döngüsündeki G1/S geçişinin regülasyonunda ve splizom (spliceosome) içinde pre-mRNA splicingte iki önemli işleve sahiptir (250). hücre döngüsündeki G1 fazının aktifleşirilmesinde önemli bir role sahiptir. SYF2 geni, splicing veya diğer bağımsız mekanizmalar aracılığıyla G1/S geçişini ve S fazının yavaş ilerlemesini veya durmasını indüklemektedir (217). SYF2 geni, hücre döngüsünün kontrolü, pre-mRNA ekleme ve DNA onarımı gibi kritik hücresel süreçlerde rol oynamaktadır. SYF2 geninin, karaciğer, meme, akciğer, yumurtalık ve özofagus kanserleri gibi solid tümör çeşitlerindeki aşırı ekspresyon seviyeleri tümör oluşumu, gelişimi ve ilerlendirilmiştir. Meme kanserinde yukarı regüle edilen SYF2 geninin inhibisyonu, hücre döngüsü ilerlemesinin durmasına ve kanser hücrelerinin büyüme hızının düşmesine ve proliferasyonun engellenmesine yol açmıştır (218). miR-621, yukarı regüle olan SYF2 aktivitesi üzerinde ters etki yaratarak, mide kanseri gelişimi ve ilerlemesini baskıladığını ve buna bağlı olarak tedavi için etkili bir terapötik hedef potansiyeli taşıdığını gösterir (221). AML hücrelerinde ve dokularında SYF2 ve diğer anti-apoptotik özellikteki proteinlerin aşırı ifade edildiği ve anlamlı ölçüde kötü prognozla ilişkili olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada, AML-P29 etkileşiminde düşük bazal fosforilasyon gözlemlenmesine rağmen STAT5'in pek çok miyeloid uyaranı takiben fosforillendiği tespit edilmiştir (225). SYF2'nin onkogenik fonksiyonu çeşitli miRNA'lar tarafından hedeflenerek klinikte kanser tedavisi için katkı sağlayacağı tahmin

edilmektedir. Bunun için AML üzerinde yapılacak daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Tez çalışmamızda ilk defa SYF2'nin AML hücrelerinde let-7b-3p miRNAsı ile ilişkisi gösterilmiştir. Analiz sonuçlarımız istatistiksel olarak anlamlı ölçüde SYF2 gen ekpresyonunun aşağı regüle edildiğini göstermiştir.

Let-7b-3p'nin hedeflediği diğer genler arasında CREBZF geni bulunmaktadır. Zhangfei ve SMILE isimleriyle de bilinmektedir. İlk defa herpes simplex virüs transkripsiyon faktör VP16'nın önemli bir kofaktörü olarak işlev gören konakçı hücre faktörü (HCF-Host Cell Faktör) proteininin, bağlanmasına eşlik eden bir protein olarak keşfedildi (251). CREBZF'nin, pankreas kanseri, meme kanseri, mide kanseri, akciğer kanseri, prostat kanseri, kolorektal kanser ve malign melanom gibi diğer kanser tiplerinde değişen ekspresyon düzeyleri gösterilmiştir (190). CREBZF, gen ifadesini p53 ve ATF4 gibi transkripsiyon faktörlerini (TF) kullanarak aktivasyonunu sağlarken, nükleer reseptörleri bulunduran pek çok TF'nin aktivitesini inhibe eder. Osteosarkom hücrelerinde, CREBZF geni tümörsupressör bir protein olan p53 ile doğrudan bağlantı kurarak hücre büyümesini ve metastazını baskıladığı gösterilmiştir. Bu çalışma ile CREBZF'nin p53 ile ilişkili diğer tümör tedavileri için yüksek potansiyel taşıyabileceği düşünülmüştür (252). Farklı bir çalışmada CREBZF'nin yukarı regüle edilmesi yoluyla, insan meme kanseri hücrelerinin (MCF7) çoğalmasını, migrasyon ve invazyonunu baskıladığı, hücre apoptozunu indüklediği ve meme kanseri gelişimini hızlandırdığı (189, 251). Prostat kanseri hücre hatları kullanılarak yapılan bir çalışmada CREBZF geninin SMAD1, SMAD5 ve SMAD8 proteinlerine bağlanarak BMP-6 (Bone morphogenetic protein 6) geninin aktivitesini engellediği gösterilmiştir (253). AML hücrelerinde let-7b-3p ve CREBZF ilişkisini gösteren mevcutta bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma ile aralarındaki ilişki bu çalışma ile ilk defa gösterilmiştir. Sonuçlarımız, HL-60 VE NB4 AML hücrelerinde let-7b-3p'nin hedeflediği CREBZF'nin ekspresyonnda anlamlı bir değişiklik gözlemlenmediğini göstermiştir.

Let-7b-3p'nin AML hücrelerinde hedeflediği diğer gen BRF2'dir. BRF2 geninin, kanser hücre ve dokularında farklı şekilde ifade edildiği ve kanser hastalarında yüksek ekspresyon düzeyleri gösterdiği bildirilmiştir (214). Lockwood ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, BRF2'nin yukarı regülasyonunun, RNA polimeraz III transkriptlerinin ifadesini indüklemesi aracılığıyla skuamöz hücreli karsinom (SCC) tümör gelişimini ve

ilerlemesini destekleyen spesifik bir mekanizması olduğunu ortaya koyulmuştur ve bu çalışma ilk klinik güçlü kanıttır (254). BRF2 geni, özofagus skuamöz hücreli karsinom, mide, böbrek ve akciğer kanseri gibi solid tümörlerde ve çeşitli insan tümörlerinde anlamlı derecede aşırı ifade edildiği gösterilmiştir. Akciğer kanserinde BRF2'nin yüksek ifadesi, RNA Pol III transkriptlerinin ifadesini arttırarak bir onkogen gibi davranabileceğini ve tümör oluşumuna sebep olabileceğini düşündürmüştür (209, 212). 8. Kromozomun amplifikasyonuna çoğunlukla somatik meme kanseri hücre ve dokularında rastlanmaktadır. BRF2'nin meme kanserinde aşırı ekspresyon edilmesi kötü sağkalım ile ilişkilendirilmiştir. Mevcut çalışmalar, BRF2 geninin genel sağkalım için prognostik bir potansiyel hedef olabileceğini düşündürmektedir. BRF2 geni benzer şekilde lösemi ve lenfoma (çoklu kanser) hücrelerine ait veri setlerinde aşırı ifade edildiği gösterilmiştir. Buna karşın karaciğer kanserinde BRF2 geninin düşük seviyelerde eksprese edildiği tespit edilmiştir (215). BRF2'nin AML ile ilişkisini gösteren mevcutta bir çalışma bulunmamaktadır. Li Y ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, akciğer adenokarsinomunda (LUAD) let-7b-3p'nin, BRF2 geni aracılığıyla MAPK/ERK sinyal yolunu hedefleyerek akciğer adenokarsinomunda hücre proliferasyonunu, metastazını ve hücre gelişimini in-vivo ve in-vitro olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. Çeşitli kanser hücre ve dokularında BRF2'nin baskılanması, tedavi açısından yüksek potansiyel taşıyan yeni bir hedef olabileceğini düşündürmüştür (137). Tez çalışamızda AML hücrelerinde let-7b-3p'nin hedefi olan BRF2 geninin ifadesinde anlamlı bir değişiklik gözlemlenmemiştir.

Tez çalışmamızda tercih ettiğimiz let-7b-5p ve let-7b-3p miRNA'ları tarafından hedeflenen genler ve çalışma amacımız literatürle uyumludur. Hedeflenen genlerden IL-8, RORA ve SYF2 genlerinin ekspresyonlarında anlamlı ölçüde bir azalma gözlemlenmiştir. Çalışmamızdan elde edilen verilere göre AML kanser süreciyle yakından ilgili çeşitli protoonkogenlerin ifade düzeylerindeki değişimde let-7b-5p ve let-7b-3p miRNA'larının önemli rol oynayabileceğine işaret etmektedir. Analiz sonuçlarında CDC25A, CCND1, BRF2, CREBZF genlerinin ekspresyonlarında anlamlı bir değişim gözlemlenmemiştir. Bu durum, HL-60 ve NB4 hücre hatlarının birbirleriyle tamemen aynı karakteristik özelliklere sahip olmaması, moleküler ve kromozomal farklılıkların bulunması gibi pek çok sebeple ilişkilendirilebilir. miRNA'ların hücrede birden fazla sayıda geni hedefleyebilme potansiyelleri, miRNA mimikleriyle transfekte edilen grupta apoptoz ve proliferasyona farklı genler üzerinden etki etmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak Let-7b-5p ve let-7b-3p'nin AML hücre hatları olan HL-60 ve NB4'te hücre proliferasyonu, hedef gen ekspresyon düzeyleri ve apoptoz deneyleri yapılması aracılığıyla incelendiğinde, tez çalışmamızda let-7b-5p tarafından IL-8'in ifadesinin ve let-7b-3p tarafından ise RORA ve SYF2 gen ifadelerinin regüle edilebileceği mRNA seviyesinde gözlemlenmiştir. Bu sonucun gözlemlenmesi, gelecek araştırmalar için let-7b-5p ve let-7b-3p'nin AML'de potansiyel bir biyobelirteç olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca let-7b-5p ve let-7b-3p ekspresyonunun azalması düşük sağkalım oranı ve kötü prognozla ilişkilendirildiği için miRNA'ların ekspresyon artışı, terapötik kullanım için potansiyel bir hedef olabileceği değerlendirilmektedir. Literatürdeki çalışmaları incelediğimizde AML'nin klinikte erken tanı, teşhis ve tedavi takibi ve yeni etkili tedavilerin geliştirilmesi gibi hastalığın önemli evrelerinde büyük bir potansiyel taşıyacak let-7b-5p ve let-7b-3p'nin diğer hedef genlerinin tayin edilerek doğrulanması gibi çalışmaların öncelikli tutulması kritik bir öneme sahiptir. Transkripsiyonel düzeyde elde ettiğimiz verilerin ileriki çalışmalarda hem protein seviyesinde hem de klinikte hasta ile kontrol numunelerinde de doğrulanması ve let-7b-5p ve let-7b-3p ile bu genler arasındaki bağlantının da lusiferaz aktivite deneyleri yapılarak tespit edilmesi oldukça önemlidir. Bu nedenle let-7b-5p ve let-7b-3p'nin AML ile ilişkisine yönelik çalışmaların devamlılığı gereklidir. Bu amaçla AML tedavisine yönelik miRNA'ların temelde kullanıldığı genetik, moleküler ve/veya immünolojik terapiler ile ilişkili çeşitli klinik deneysel çalışmalar günümüzde de devam etmektedir. Hücresel süreçlerde kritik görevlere sahip hedeflenen genlerin, let-7b-5p ve let-7b-3p ile ilişkisi AML hücre hatlarında bildiğimiz kadarıyla ilk defa gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Pelcovits A, Niroula R. Acute Myeloid Leukemia: A Review. R I Med J (2013). 2020;103(3):38-40.
2. Yohe S. Molecular Genetic Markers in Acute Myeloid Leukemia. J Clin Med. 2015;4(3):460-78.
3. Neaga A, Bagacean C, Tempescul A, Jimbu L, Mesaros O, Blag C, et al. MicroRNAs Associated With a Good Prognosis of Acute Myeloid Leukemia and Their Effect on Macrophage Polarization. Front Immunol. 2020;11:582915.
4. Capik O, Sanli F, Kurt A, Ceylan O, Suer I, Kaya M, et al. CASC11 promotes aggressiveness of prostate cancer cells through miR-145/IGF1R axis. Prostate Cancer Prostatic Dis. 2021;24(3):891-902.
5. Rupaimoole R, Calin GA, Lopez-Berestein G, Sood AK. miRNA Deregulation in Cancer Cells and the Tumor Microenvironment. Cancer Discov. 2016;6(3):235-46.
6. Kaya M, Karatas OF. The Relationship Between Larynx Cancer andMicroRNAs. Van Med J 2020;27(4):535-41.
7. Liu Y, Cheng Z, Pang Y, Cui L, Qian T, Quan L, et al. Role of microRNAs, circRNAs and long noncoding RNAs in acute myeloid leukemia. J Hematol Oncol. 2019;12(1):51.
8. Tang X, Chen L, Yan X, Li Y, Xiong Y, Zhou X. Overexpression of miR-210 is Associated with Poor Prognosis of Acute Myeloid Leukemia. Med Sci Monit. 2015;21:3427-33.
9. Wallace JA, O'Connell RM. MicroRNAs and acute myeloid leukemia: therapeutic implications and emerging concepts. Blood. 2017;130(11):1290-301.
10. Schultz J, Lorenz P, Gross G, Ibrahim S, Kunz M. MicroRNA let-7b targets important cell cycle molecules in malignant melanoma cells and interferes with anchorage-independent growth. Cell Res. 2008;18(5):549-57.
11. Valentini CG, Fianchi L, Voso MT, Caira M, Leone G, Pagano L. Incidence of acute myeloid leukemia after breast cancer. Mediterr J Hematol Infect Dis. 2011;3(1):e2011069.
12. Lee YS, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. Genes Dev. 2007;21(9):1025-30.
13. Zhang K, Wang W, Liu Y, Guo A, Yang D. Let-7b acts as a tumor suppressor in osteosarcoma via targeting IGF1R. Oncol Lett. 2019;17(2):1646-54.
14. Rong J, Xu L, Hu Y, Liu F, Yu Y, Guo H, et al. Inhibition of let-7b-5p contributes to an anti-tumorigenic macrophage phenotype through the SOCS1/STAT pathway in prostate cancer. Cancer Cell Int. 2020;20:470.
15. Hui L, Zheng F, Bo Y, Sen-Lin M, Ai-Jun L, Wei-Ping Z, et al. MicroRNA let-7b inhibits cell proliferation via upregulation of p21 in hepatocellular carcinoma. Cell Biosci. 2020;10:83.
16. He Z, Deng W, Jiang B, Liu S, Tang M, Liu Y, et al. Hsa-let-7b inhibits cell proliferation by targeting PLK1 in HCC. Gene. 2018;673:46-55.
17. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. Nucleic Acids Res. 2014;42(Database issue):D68-73.
18. Lichtman MA. Rheology of leukocytes, leukocyte suspensions, and blood in leukemia. Possible relationship to clinical manifestations. J Clin Invest. 1973;52(2):350-8.
19. Leukemia. Globocan 2020.

20. Guenova M, Balatzenko G. Leukemia. Crotia: IntechOpen; 2013.
21. TI. M. Understanding Leukemias, Lymphomas and Myelomas. 2nd Edition ed. London: CRC Press; 2017.
22. Mughal TI, Radich JP, Deininger MW, Apperley JF, Hughes TP, Harrison CJ, et al. Chronic myeloid leukemia: reminiscences and dreams. Haematologica. 2016;101(5):541-58.
23. Bennett JH. Case of hypertrophy of the spleen and liver, which death took place from suppuration of the blood, .
ed. Edinburgh: Medical and Surgical Journal; 1845 1845. 413-23 p.
24. Williams WJ, Beutler E., Litchman M.A., Coler B.S., Kipps T.J., Mauner, A.M. William's Hematology. McGraw Hill Company1991. 2209-349. p.
25. Hynes M. The Distribution of Leucocytes on the Counting Chamber. J Clin Pathol. 1947;1(1):25-9.
26. Geary CG. The story of chronic myeloid leukaemia. Br J Haematol. 2000;110(1):2-11.
27. 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;33(4):451-8.
28. Knorr DA, Goldberg AD, Stein EM, Tallman MS. Immunotherapy for acute myeloid leukemia: from allogeneic stem cell transplant to novel therapeutics. Leuk Lymphoma. 2019;60(14):3350-62.
29. Strati P, Kantarjian H, Ravandi F, Nazha A, Borthakur G, Daver N, et al. Phase I/II trial of the combination of midostaurin (PKC412) and 5-azacytidine for patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. Am J Hematol. 2015;90(4):276-81.
30. Bumbea H, Vladareanu AM, Dumitru I, Popov VM, Ciufu C, Nicolescu A, et al. Platelet Defects in Acute Myeloid Leukemia-Potential for Hemorrhagic Events. J Clin Med. 2021;11(1).
31. Cai SF, Levine RL. Genetic and epigenetic determinants of AML pathogenesis. Semin Hematol. 2019;56(2):84-9.
32. Gupta M, Mahapatra M, Saxena R. Cytogenetics' impact on the prognosis of acute myeloid leukemia. J Lab Physicians. 2019;11(2):133-7.
33. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med. 2016;374(23):2209-21.
34. Handschuh L, Kazmierczak M, Milewski MC, Goralski M, Luczak M, Wojtaszewska M, et al. Gene expression profiling of acute myeloid leukemia samples from adult patients with AML-M1 and -M2 through boutique microarrays, real-time PCR and droplet digital PCR. Int J Oncol. 2018;52(3):656-78.
35. Ferrara F, Schiffer CA. Acute myeloid leukaemia in adults. Lancet. 2013;381(9865):484-95.
36. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. CA Cancer J Clin. 2017;67(1):7-30.
37. Puumala SE, Ross JA, Aplenc R, Spector LG. Epidemiology of childhood acute myeloid leukemia. Pediatr Blood Cancer. 2013;60(5):728-33.
38. 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;105(11):1684-92.

39. Kirtane K, Lee SJ. Racial and ethnic disparities in hematologic malignancies. Blood. 2017;130(15):1699-705.
40. Estey E, Dohner H. Acute myeloid leukaemia. Lancet. 2006;368(9550):1894-907.
41. Estey EH, Faderl SH, Kantarjian HM. Hematologic Malignancies: Acute Leukemias: Springer Berlin Heidelberg; 2007.
42. Dohner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med. 2015;373(12):1136-52.
43. Cakan M, Koc A, Cerit K, Bozkurt S, Ergelen R, Vural I. A Case of Acute Myeloid Leukemia (FAB M2) with Inversion 16 Who Presented with Pelvic Myeloid Sarcoma. Case Rep Pediatr. 2014;2014:246169.
44. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. Ann Intern Med. 1985;103(4):620-5.
45. Schiffer CA SR. Morphologic Classification and Clinical and Laboratory Correlates. Kufe DW PR, Weichselbaum RR, editor. Holland-Frei Cancer Medicine.: Hamilton (ON): BC Decker; 2003.
46. Venditti A, Del Poeta G, Buccisano F, Tamburini A, Cox MC, Stasi R, et al. Minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0): comparison of 25 cases with other French-American-British subtypes. Blood. 1997;89(2):621-9.
47. AML-M1 [Available from: https://wiki.clinicalflow.com/aml-acute-myelogenous-leukemia-without-maturation-m1.
48. Cho EK, Bang SM, Ahn JY, Yoo SM, Park PW, Seo YH, et al. Prognostic value of AML 1/ETO fusion transcripts in patients with acute myelogenous leukemia. Korean J Intern Med. 2003;18(1):13-20.
49. Langabeer SE, Walker H, Rogers JR, Burnett AK, Wheatley K, Swirsky D, et al. Incidence of AML1/ETO fusion transcripts in patients entered into the MRC AML trials. MRC Adult Leukaemia Working Party. Br J Haematol. 1997;99(4):925-8.
50. Iyer SG, Elias L, Stanchina M, Watts J. The treatment of acute promyelocytic leukemia in 2023: Paradigm, advances, and future directions. Front Oncol. 2022;12:1062524.
51. De Rossi G, Avvisati G, Coluzzi S, Fenu S, LoCoco F, Lopez M, et al. Immunological definition of acute promyelocytic leukemia (FAB M3): a study of 39 cases. Eur J Haematol. 1990;45(3):168-71.
52. McClellan JS, Kohrt HE, Coutre S, Gotlib JR, Majeti R, Alizadeh AA, et al. Treatment advances have not improved the early death rate in acute promyelocytic leukemia. Haematologica. 2012;97(1):133-6.
53. Al-Achkar W, Aljapawe A, Othman MA, Wafa A. A de novo acute myeloid leukemia (AML-M4) case with a complex karyotype and yet unreported breakpoints. Mol Cytogenet. 2013;6(1):18.
54. JL H. 11q23 rearrangements in leukaemia. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.2003 [Available from: Available: http://AtlasGeneticsOncology.org/Anomalies/11q23ID1030.html.
55. Liu LP, Zhang AL, Ruan M, Chang LX, Liu F, Chen X, et al. Prognostic stratification of molecularly and clinically distinct subgroup in children with acute monocytic leukemia. Cancer Med. 2020;9(11):3647-55.
56. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'. Blood Cancer J. 2016;6(7):e441.

57. 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.
58. Hwang SM. Classification of acute myeloid leukemia. Blood Res. 2020;55(S1):S1-S4.
59. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. Br J Haematol. 1982;51(2):189-99.
60. Tallarico M, Odenike O. Secondary acute myeloid leukemias arising from Philadelphia chromosome negative myeloproliferative neoplasms: pathogenesis, risk factors, and therapeutic strategies. Curr Hematol Malig Rep. 2015;10(2):112-7.
61. Meyers CA, Albitar M, Estey E. Cognitive impairment, fatigue, and cytokine levels in patients with acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. Cancer. 2005;104(4):788-93.
62. Lagunas-Rangel FA, Chavez-Valencia V, Gomez-Guijosa MA, Cortes-Penagos C. Acute Myeloid Leukemia-Genetic Alterations and Their Clinical Prognosis. Int J Hematol Oncol Stem Cell Res. 2017;11(4):328-39.
63. Percival ME, Lai C, Estey E, Hourigan CS. Bone marrow evaluation for diagnosis and monitoring of acute myeloid leukemia. Blood Rev. 2017;31(4):185-92.
64. Kantarjian H, Kadia T, DiNardo C, Daver N, Borthakur G, Jabbour E, et al. Acute myeloid leukemia: current progress and future directions. Blood Cancer J. 2021;11(2):41.
65. Xu J, Huang B, Liu X, Zhang Y, Liu Y, Chen L, et al. Poor Prognosis in Acute Myeloid Leukemia Patients with Monosomal Karyotypes. Turk J Haematol. 2017;34(2):126-30.
66. Dohner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Blood. 2017;129(4):424-47.
67. Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. Nature. 2012;481(7382):506-10.
68. Lin TL, Levy MY. Acute myeloid leukemia: focus on novel therapeutic strategies. Clin Med Insights Oncol. 2012;6:205-17.
69. Corces-Zimmerman MR, Hong WJ, Weissman IL, Medeiros BC, Majeti R. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(7):2548-53.
70. Saultz JN, Garzon R. Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review. J Clin Med. 2016;5(3).
71. Takami A. Hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia. Int J Hematol. 2018;107(5):513-8.
72. Yanada M, Matsuo K, Emi N, Naoe T. Efficacy of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation depends on cytogenetic risk for acute myeloid leukemia in first disease remission: a metaanalysis. Cancer. 2005;103(8):1652-8.
73. Gosline SJC, Tognon C, Nestor M, Joshi S, Modak R, Damnernsawad A, et al. Proteomic and phosphoproteomic measurements enhance ability to predict ex vivo drug response in AML. Clin Proteomics. 2022;19(1):30.
74. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 2004;116(2):281-97.

75. Gulyaeva LF, Kushlinskiy NE. Regulatory mechanisms of microRNA expression. J Transl Med. 2016;14(1):143.
76. Tsochandaridis M, Nasca L, Toga C, Levy-Mozziconacci A. Circulating microRNAs as clinical biomarkers in the predictions of pregnancy complications. Biomed Res Int. 2015;2015:294954.
77. Kavitha N, Vijayarathna S, Jothy SL, Oon CE, Chen Y, Kanwar JR, et al. MicroRNAs: biogenesis, roles for carcinogenesis and as potential biomarkers for cancer diagnosis and prognosis. Asian Pac J Cancer Prev. 2014;15(18):7489-97.
78. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell. 1993;75(5):843-54.
79. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans. Nature. 2000;403(6772):901-6.
80. Nimmo RA, Slack FJ. An elegant miRror: microRNAs in stem cells, developmental timing and cancer. Chromosoma. 2009;118(4):405-18.
81. Bagga S, Bracht J, Hunter S, Massirer K, Holtz J, Eachus R, et al. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. Cell. 2005;122(4):553-63.
82. 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;23(20):4051-60.
83. Condrat CE, Thompson DC, Barbu MG, Bugnar OL, Boboc A, Cretoiu D, et al. miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. Cells. 2020;9(2).
84. Karaboz I. Antisens teknolojisi. Or-lab on-line Mikrobiyo Dergisi 2007;5(2):14-37.
85. Macfarlane LA, Murphy PR. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. Curr Genomics. 2010;11(7):537-61.
86. Ardekani AM, Naeini MM. The Role of MicroRNAs in Human Diseases. Avicenna J Med Biotechnol. 2010;2(4):161-79.
87. Matsuyama H, Suzuki HI. Systems and Synthetic microRNA Biology: From Biogenesis to Disease Pathogenesis. Int J Mol Sci. 2019;21(1).
88. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. Nat Rev Cancer. 2006;6(11):857-66.
89. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. Nat Rev Cancer. 2006;6(4):259-69.
90. Suer I, Kaya M. Is the AURKB Gene Involved in Aml Cell Proliferation Since It is Targeted by miR-34a-5p and let-7b-5p? Konuralp Medical Journal. 2023.
91. Ji W, Sun B, Su C. Targeting MicroRNAs in Cancer Gene Therapy. Genes (Basel). 2017;8(1).
92. Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. Dev Biol. 2007;302(1):1-12.
93. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. Signal Transduct Target Ther. 2016;1:15004.
94. 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;101(9):2999-3004.
95. 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. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(24):15524-9.

96. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio MV, Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(39):13944-9.
97. Le Quesne J, Caldas C. Micro-RNAs and breast cancer. Mol Oncol. 2010;4(3):230-41.
98. Sevli S, Uzumcu A, Solak M, Ittmann M, Ozen M. The function of microRNAs, small but potent molecules, in human prostate cancer. Prostate Cancer Prostatic Dis. 2010;13(3):208-17.
99. Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. Genes Chromosomes Cancer. 2004;39(2):167-9.
100. He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, Nagy R, Volinia S, et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(52):19075-80.
101. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. Cancer Res. 2005;65(21):9628-32.
102. Chan JA, Krichevsky AM, Kosik KS. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. Cancer Res. 2005;65(14):6029-33.
103. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. Oncogene. 2006;25(17):2537-45.
104. Okayama H, Schetter AJ, Harris CC. MicroRNAs and inflammation in the pathogenesis and progression of colon cancer. Dig Dis. 2012;30 Suppl 2(Suppl 2):9-15.
105. Dixon-McIver A, East P, Mein CA, Cazier JB, Molloy G, Chaplin T, et al. Distinctive patterns of microRNA expression associated with karyotype in acute myeloid leukaemia. PLoS One. 2008;3(5):e2141.
106. Grasedieck S, Sorrentino A, Langer C, Buske C, Dohner H, Mertens D, et al. Circulating microRNAs in hematological diseases: principles, challenges, and perspectives. Blood. 2013;121(25):4977-84.
107. Marcucci G, Mrozek K, Radmacher MD, Garzon R, Bloomfield CD. The prognostic and functional role of microRNAs in acute myeloid leukemia. Blood. 2011;117(4):1121-9.
108. Suer I, Kaya M, Ozgur E. The Effect of miR-34a-5p and miR-145-5p Ectopic Expression on Cell Proliferation and Target Gene Expression in the MDA-MB-231 Cell Line. NKMJ. 2021;9(2):166-73.
109. Wiemer EA. The role of microRNAs in cancer: no small matter. Eur J Cancer. 2007;43(10):1529-44.
110. Kaya M, Suer I. The effect of miR-34a-5p on overexpressed AML associated genes. J Ist Faculty Med. 2023;86(1):59-68.
111. Zhu C, Wang Y, Kuai W, Sun X, Chen H, Hong Z. Prognostic value of miR-29a expression in pediatric acute myeloid leukemia. Clin Biochem. 2013;46(1-2):49-53.
112. 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.
113. Chen XX, Lin J, Qian J, Qian W, Yang J, Ma JC, et al. Dysregulation of miR-124-1 predicts favorable prognosis in acute myeloid leukemia. Clin Biochem. 2014;47(1-2):63-6.

114. Xu H, Wen Q. Downregulation of miR-135a predicts poor prognosis in acute myeloid leukemia and regulates leukemia progression via modulating HOXA10 expression. Mol Med Rep. 2018;18(1):1134-40.
115. 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;383(1-2):59-65.
116. Li Z, Lu J, Sun M, Mi S, Zhang H, Luo RT, et al. Distinct microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(40):15535-40.
117. Zhao B, Han H, Chen J, Zhang Z, Li S, Fang F, et al. MicroRNA let-7c inhibits migration and invasion of human non-small cell lung cancer by targeting ITGB3 and MAP4K3. Cancer Lett. 2014;342(1):43-51.
118. Mandolesi G, Rizzo FR, Balletta S, Stampanoni Bassi M, Gilio L, Guadalupi L, et al. The microRNA let-7b-5p Is Negatively Associated with Inflammation and Disease Severity in Multiple Sclerosis. Cells. 2021;10(2).
119. Lionetti M, Biasiolo M, Agnelli L, Todoerti K, Mosca L, Fabris S, et al. Identification of microRNA expression patterns and definition of a microRNA/mRNA regulatory network in distinct molecular groups of multiple myeloma. Blood. 2009;114(25):e20-6.
120. Dong LH, Huang JJ, Zu P, Liu J, Gao X, Du JW, et al. CircKDM4C upregulates P53 by sponging hsa-let-7b-5p to induce ferroptosis in acute myeloid leukemia. Environ Toxicol. 2021;36(7):1288-302.
121. Yang X, Cai H, Liang Y, Chen L, Wang X, Si R, et al. Inhibition of c-Myc by let-7b mimic reverses mutidrug resistance in gastric cancer cells. Oncol Rep. 2015;33(4):1723-30.
122. Xu D, Tan J, Zhou M, Jiang B, Xie H, Nie X, et al. Let-7b and microRNA-199a inhibit the proliferation of B16F10 melanoma cells. Oncol Lett. 2012;4(5):941-6.
123. Zhang Q, Pan J, Xiong D, Wang Y, Miller MS, Sei S, et al. Pulmonary Aerosol Delivery of Let-7b microRNA Confers a Striking Inhibitory Effect on Lung Carcinogenesis through Targeting the Tumor Immune Microenvironment. Adv Sci (Weinh). 2021;8(17):e2100629.
124. Al-Harbi B, Hendrayani SF, Silva G, Aboussekhra A. Let-7b inhibits cancer-promoting effects of breast cancer-associated fibroblasts through IL-8 repression. Oncotarget. 2018;9(25):17825-38.
125. Huang X, Dong H, Liu Y, Yu F, Yang S, Chen Z, et al. Silencing of let-7b-5p inhibits ovarian cancer cell proliferation and stemness characteristics by Asp-Glu-Ala-Asp-box helicase 19A. Bioengineered. 2021;12(1):7666-77.
126. Guo Y, Yan K, Fang J, Qu Q, Zhou M, Chen F. Let-7b expression determines response to chemotherapy through the regulation of cyclin D1 in glioblastoma. J Exp Clin Cancer Res. 2013;32(1):41.
127. Ali S, Almhanna K, Chen W, Philip PA, Sarkar FH. Differentially expressed miRNAs in the plasma may provide a molecular signature for aggressive pancreatic cancer. Am J Transl Res. 2010;3(1):28-47.
128. Hung CH, Hu TH, Lu SN, Kuo FY, Chen CH, Wang JH, et al. Circulating microRNAs as biomarkers for diagnosis of early hepatocellular carcinoma associated with hepatitis B virus. Int J Cancer. 2016;138(3):714-20.
129. Vishnubalaji R, Hamam R, Abdulla MH, Mohammed MA, Kassem M, Al-Obeed O, et al. Genome-wide mRNA and miRNA expression profiling reveal multiple regulatory networks in colorectal cancer. Cell Death Dis. 2015;6(1):e1614.

130. Zhang Y, Tang S, Yang W, Du F. let-7b-5p suppresses the proliferation and migration of pulmonary artery smooth muscle cells via down-regulating IGF1. Clinics (Sao Paulo). 2022;77:100051.
131. Xu H, Liu C, Zhang Y, Guo X, Liu Z, Luo Z, et al. Let-7b-5p regulates proliferation and apoptosis in multiple myeloma by targeting IGF1R. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2014;46(11):965-72.
132. Wang Z, Xu L, Hu Y, Huang Y, Zhang Y, Zheng X, et al. miRNA let-7b modulates macrophage polarization and enhances tumor-associated macrophages to promote angiogenesis and mobility in prostate cancer. Sci Rep. 2016;6:25602.
133. Schubert M, Spahn M, Kneitz S, Scholz CJ, Joniau S, Stroebel P, et al. Distinct microRNA expression profile in prostate cancer patients with early clinical failure and the impact of let-7 as prognostic marker in high-risk prostate cancer. PLoS One. 2013;8(6):e65064.
134. Freiesleben S, Hecker M, Zettl UK, Fuellen G, Taher L. Analysis of microRNA and Gene Expression Profiles in Multiple Sclerosis: Integrating Interaction Data to Uncover Regulatory Mechanisms. Sci Rep. 2016;6:34512.
135. Mi S, Lu J, Sun M, Li Z, Zhang H, Neilly MB, et al. MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(50):19971-6.
136. Mitra R, Lin CC, Eischen CM, Bandyopadhyay S, Zhao Z. Concordant dysregulation of miR-5p and miR-3p arms of the same precursor microRNA may be a mechanism in inducing cell proliferation and tumorigenesis: a lung cancer study. Rna. 2015;21(6):1055-65.
137. Li Y, Dong R, Lu M, Cheng C, Feng Z, Zhao R, et al. Let-7b-3p inhibits tumor growth and metastasis by targeting the BRF2-mediated MAPK/ERK pathway in human lung adenocarcinoma. Transl Lung Cancer Res. 2021;10(4):1841-56.
138. Min L, Zhu S, Chen L, Liu X, Wei R, Zhao L, et al. Evaluation of circulating small extracellular vesicles derived miRNAs as biomarkers of early colon cancer: a comparison with plasma total miRNAs. J Extracell Vesicles. 2019;8(1):1643670.
139. Chen Z, Shen Z, Zhang Z, Zhao D, Xu L, Zhang L. RNA-Associated Co-expression Network Identifies Novel Biomarkers for Digestive System Cancer. Front Genet. 2021;12:659788.
140. Weaver DT, Pishas KI, Williamson D, Scarborough J, Lessnick SL, Dhawan A, et al. Network potential identifies therapeutic miRNA cocktails in Ewing sarcoma. PLoS Comput Biol. 2021;17(10):e1008755.
141. Butler AE, Ramachandran V, Cunningham TK, David R, Gooderham NJ, Benurwar M, et al. Increased MicroRNA Levels in Women With Polycystic Ovarian Syndrome but Without Insulin Resistance: A Pilot Prospective Study. Front Endocrinol (Lausanne). 2020;11:571357.
142. Chen Y, Li Z, Shi Y, Huang G, Chen L, Tan H, et al. Deep Sequencing of Small RNAs in Blood of Patients with Brain Arteriovenous Malformations. World Neurosurg. 2018;115:e570-e9.
143. Kar S, Bali KK, Baisantry A, Geffers R, Samii A, Bertalanffy H. Genome-Wide Sequencing Reveals MicroRNAs Downregulated in Cerebral Cavernous Malformations. J Mol Neurosci. 2017;61(2):178-88.
144. Galaktionov K, Lee AK, Eckstein J, Draetta G, Meckler J, Loda M, et al. CDC25 phosphatases as potential human oncogenes. Science. 1995;269(5230):1575-7.

145. Ray D, Terao Y, Fuhrken PG, Ma ZQ, DeMayo FJ, Christov K, et al. Deregulated CDC25A expression promotes mammary tumorigenesis with genomic instability. Cancer Res. 2007;67(3):984-91.
146. GENECARDS. CDC25A Gene - Cell Division Cycle 25A 2022 [Available from: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CDC25A.
147. Wegener S, Hampe W, Herrmann D, Schaller HC. Alternative splicing in the regulatory region of the human phosphatases CDC25A and CDC25C. Eur J Cell Biol. 2000;79(11):810-5.
148. Boutros R, Lobjois V, Ducommun B. CDC25 phosphatases in cancer cells: key players? Good targets? Nat Rev Cancer. 2007;7(7):495-507.
149. Broggini M, Buraggi G, Brenna A, Riva L, Codegoni AM, Torri V, et al. Cell cycle-related phosphatases CDC25A and B expression correlates with survival in ovarian cancer patients. Anticancer Res. 2000;20(6C):4835-40.
150. Cangi MG, Cukor B, Soung P, Signoretti S, Moreira G, Jr., Ranashinge M, et al. Role of the Cdc25A phosphatase in human breast cancer. J Clin Invest. 2000;106(6):753-61.
151. Xing X, Chen J, Chen M. Expression of CDC25 phosphatases in human gastric cancer. Dig Dis Sci. 2008;53(4):949-53.
152. Li D, Liu Z, Ning G. [Expression of CDC25A in non-small cell lung cancer and its relationship with let-7 gene]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2020;40(11):1622-7.
153. Gasparotto D, Maestro R, Piccinin S, Vukosavljevic T, Barzan L, Sulfaro S, et al. Overexpression of CDC25A and CDC25B in head and neck cancers. Cancer Res. 1997;57(12):2366-8.
154. Takemasa I, Yamamoto H, Sekimoto M, Ohue M, Noura S, Miyake Y, et al. Overexpression of CDC25B phosphatase as a novel marker of poor prognosis of human colorectal carcinoma. Cancer Res. 2000;60(11):3043-50.
155. Xu X, Yamamoto H, Sakon M, Yasui M, Ngan CY, Fukunaga H, et al. Overexpression of CDC25A phosphatase is associated with hypergrowth activity and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas. Clin Cancer Res. 2003;9(5):1764-72.
156. Donzelli M, Draetta GF. Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. EMBO Rep. 2003;4(7):671-7.
157. Bertoli S, Boutzen H, David L, Larrue C, Vergez F, Fernandez-Vidal A, et al. CDC25A governs proliferation and differentiation of FLT3-ITD acute myeloid leukemia. Oncotarget. 2015;6(35):38061-78.
158. Fernandez-Vidal A, Ysebaert L, Didier C, Betous R, De Toni F, Prade-Houdellier N, et al. Cell adhesion regulates CDC25A expression and proliferation in acute myeloid leukemia. Cancer Res. 2006;66(14):7128-35.
159. Brenner AK, Reikvam H, Lavecchia A, Bruserud O. Therapeutic targeting the cell division cycle 25 (CDC25) phosphatases in human acute myeloid leukemia--the possibility to target several kinases through inhibition of the various CDC25 isoforms. Molecules. 2014;19(11):18414-47.
160. Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. Clin Cancer Res. 2008;14(21):6735-41.
161. 8 CG-C-X-CMCL. https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CXCL8&keywords=cxcl8 [
162. Zhang W, Chen H. [The study on the interleukin-8 (IL-8)]. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi. 2002;19(4):697-702.

163. Brennan K, Zheng J. Interleukin 8. In: Enna SJ, Bylund DB, editors. xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference. New York: Elsevier; 2007. p. 1-4.
164. Schinke C, Giricz O, Li W, Shastri A, Gordon S, Barreyro L, et al. IL8-CXCR2 pathway inhibition as a therapeutic strategy against MDS and AML stem cells. Blood. 2015;125(20):3144-52.
165. Yu L, Zhou G, Shi Z, Guo J, Yu S, Yu C, et al. Interleukin-8 Regulates the Autophagy and Apoptosis in Gastric Cancer Cells via Regulating PI3K/Akt Signaling Pathway. Dis Markers. 2022;2022:7300987.
166. Cabrero-de Las Heras S, Martinez-Balibrea E. CXC family of chemokines as prognostic or predictive biomarkers and possible drug targets in colorectal cancer. World J Gastroenterol. 2018;24(42):4738-49.
167. Thongchot S, Jamjuntra P, Therasakvichya S, Warnnissorn M, Ferraresi A, Thuwajit P, et al. Interleukin-8 released by cancer-associated fibroblasts attenuates the autophagy and promotes the migration of ovarian cancer cells. Int J Oncol. 2021;58(5).
168. Todorovic-Rakovic N, Milovanovic J. Interleukin-8 in breast cancer progression. J Interferon Cytokine Res. 2013;33(10):563-70.
169. Guo Y, Zang Y, Lv L, Cai F, Qian T, Zhang G, et al. IL-8 promotes proliferation and inhibition of apoptosis via STAT3/AKT/NF-kappaB pathway in prostate cancer. Mol Med Rep. 2017;16(6):9035-42.
170. Zhu YM, Webster SJ, Flower D, Woll PJ. Interleukin-8/CXCL8 is a growth factor for human lung cancer cells. Br J Cancer. 2004;91(11):1970-6.
171. CXCL8 Gene - C-X-C Motif Chemokine Ligand 8 2022 [Available from: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CXCL8&keywords=CXCL8.
172. Vijay V, Miller R, Vue GS, Pezeshkian MB, Maywood M, Ast AM, et al. Interleukin-8 blockade prevents activated endothelial cell mediated proliferation and chemoresistance of acute myeloid leukemia. Leuk Res. 2019;84:106180.
173. Mian BM, Dinney CP, Bermejo CE, Sweeney P, Tellez C, Yang XD, et al. Fully human anti-interleukin 8 antibody inhibits tumor growth in orthotopic bladder cancer xenografts via down-regulation of matrix metalloproteases and nuclear factor-kappaB. Clin Cancer Res. 2003;9(8):3167-75.
174. Xu L, Fidler IJ. Interleukin 8: an autocrine growth factor for human ovarian cancer. Oncol Res. 2000;12(2):97-106.
175. Kuett A, Rieger C, Perathoner D, Herold T, Wagner M, Sironi S, et al. IL-8 as mediator in the microenvironment-leukaemia network in acute myeloid leukaemia. Sci Rep. 2015;5:18411.
176. Singh JK, Simoes BM, Howell SJ, Farnie G, Clarke RB. Recent advances reveal IL-8 signaling as a potential key to targeting breast cancer stem cells. Breast Cancer Res. 2013;15(4):210.
177. https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CCND1. Erişim Tarihi: 09.11.2022 [
178. Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. Endocrinology. 2004;145(12):5439-47.
179. Shreya S CK. https://atlasgeneticsoncology.org/gene/36/ccnd1-(b-cell-leukemia-lymphoma-1) Erişim Tarihi: 01.04.2015 [
180. Xiong Y, Zhang H, Beach D. D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. Cell. 1992;71(3):505-14.
181. Inaba T, Matsushime H, Valentine M, Roussel MF, Sherr CJ, Look AT. Genomic organization, chromosomal localization, and independent expression of human cyclin D genes. Genomics. 1992;13(3):565-74.

182. Eisfeld AK, Kohlschmidt J, Schwind S, Nicolet D, Blachly JS, Orwick S, et al. Mutations in the CCND1 and CCND2 genes are frequent events in adult patients with t(8;21)(q22;q22) acute myeloid leukemia. Leukemia. 2017;31(6):1278-85.
183. Weinstein S, Emmanuel R, Jacobi AM, Abraham A, Behlke MA, Sprague AG, et al. RNA inhibition highlights cyclin D1 as a potential therapeutic target for mantle cell lymphoma. PLoS One. 2012;7(8):e43343.
184. Wang QS, Li F, Liao ZQ, Li K, Yang XL, Lin YY, et al. Low level of Cyclin-D1 correlates with worse prognosis of clear cell renal cell carcinoma patients. Cancer Med. 2019;8(9):4100-9.
185. Li Z, Cui J, Yu Q, Wu X, Pan A, Li L. Evaluation of CCND1 amplification and CyclinD1 expression: diffuse and strong staining of CyclinD1 could have same predictive roles as CCND1 amplification in ER positive breast cancers. Am J Transl Res. 2016;8(1):142-53.
186. Ortiz AB, Garcia D, Vicente Y, Palka M, Bellas C, Martin P. Prognostic significance of cyclin D1 protein expression and gene amplification in invasive breast carcinoma. PLoS One. 2017;12(11):e0188068.
187. Chen P, Jin Q, Fu Q, You P, Jiang X, Yuan Q, et al. Induction of Multidrug Resistance of Acute Myeloid Leukemia Cells by Cocultured Stromal Cells via Upregulation of the PI3K/Akt Signaling Pathway. Oncol Res. 2016;24(4):215-23.
188. Xie YB, Lee OH, Nedumaran B, Seong HA, Lee KM, Ha H, et al. SMILE, a new orphan nuclear receptor SHP-interacting protein, regulates SHP-repressed estrogen receptor transactivation. Biochem J. 2008;416(3):463-73.
189. Fang J, Jiang G, Mao W, Huang L, Huang C, Wang S, et al. Up-regulation of long noncoding RNA MBNL1-AS1 suppresses breast cancer progression by modulating miR-423-5p/CREBZF axis. Bioengineered. 2022;13(2):3707-23.
190. Kim YJ, Jeong S, Jung WY, Choi JW, Hwang KC, Kim SW, et al. miRNAs as potential biomarkers for the progression of gastric cancer inhibit CREBZF and regulate migration of gastric adenocarcinoma cells. Int J Med Sci. 2020;17(6):693-701.
191. Chen F, Wen X, Lin P, Chen H, Wang A, Jin Y. Activation of CREBZF Increases Cell Apoptosis in Mouse Ovarian Granulosa Cells by Regulating the ERK1/2 and mTOR Signaling Pathways. Int J Mol Sci. 2018;19(11).
192. Shankar DB, Cheng JC, Kinjo K, Federman N, Moore TB, Gill A, et al. The role of CREB as a proto-oncogene in hematopoiesis and in acute myeloid leukemia. Cancer Cell. 2005;7(4):351-62.
193. CREBZF Gene - CREB/ATF BZIP Transcription Factor 2022 [Available from: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CREBZF&keywords=crebzf.
194. Hubbard TJ, Aken BL, Ayling S, Ballester B, Beal K, Bragin E, et al. Ensembl 2009. Nucleic Acids Res. 2009;37(Database issue):D690-7.
195. Lee JM, Kim IS, Kim H, Lee JS, Kim K, Yim HY, et al. RORalpha attenuates Wnt/beta-catenin signaling by PKCalpha-dependent phosphorylation in colon cancer. Mol Cell. 2010;37(2):183-95.
196. Delerive P, Monte D, Dubois G, Trottein F, Fruchart-Najib J, Mariani J, et al. The orphan nuclear receptor ROR alpha is a negative regulator of the inflammatory response. EMBO Rep. 2001;2(1):42-8.
197. https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=RORA&keywords=rora. Erişim Tarihi: 09.11.2022 [
198. Besnard S, Silvestre JS, Duriez M, Bakouche J, Lemaigre-Dubreuil Y, Mariani J, et al. Increased ischemia-induced angiogenesis in the staggerer mouse, a mutant of the nuclear receptor Roralpha. Circ Res. 2001;89(12):1209-15.

199. Xiao W, Geng W, Zhou M, Xu J, Wang S, Huang Q, et al. POU6F1 cooperates with RORA to suppress the proliferation of lung adenocarcinoma by downregulation HIF1A signaling pathway. Cell Death Dis. 2022;13(5):427.
200. Du J, Xu R. RORalpha, a potential tumor suppressor and therapeutic target of breast cancer. Int J Mol Sci. 2012;13(12):15755-66.
201. Snider CA, Fung K, Gould F, Adema V, Kerr CM, Kongkiatkamon S, et al. RORA Is a Potential Prognostic Biomarker and Therapeutic Target for Patients with Acute Myeloid Leukemia. Blood. 2019;134:2696.
202. Li J, Ge Z. High HSPA8 expression predicts adverse outcomes of acute myeloid leukemia. BMC Cancer. 2021;21(1):475.
203. Gouge J, Satia K, Guthertz N, Widya M, Thompson AJ, Cousin P, et al. Redox Signaling by the RNA Polymerase III TFIIB-Related Factor Brf2. Cell. 2015;163(6):1375-87.
204. BRF2 Gene - BRF2 RNA Polymerase III Transcription Initiation Factor Subunit 2022 [Available from: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=BRF2.
205. Rhodes DR, Kalyana-Sundaram S, Mahavisno V, Varambally R, Yu J, Briggs BB, et al. Oncomine 3.0: genes, pathways, and networks in a collection of 18,000 cancer gene expression profiles. Neoplasia. 2007;9(2):166-80.
206. Garcia MJ, Pole JC, Chin SF, Teschendorff A, Naderi A, Ozdag H, et al. A 1 Mb minimal amplicon at 8p11-12 in breast cancer identifies new candidate oncogenes. Oncogene. 2005;24(33):5235-45.
207. Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D, et al. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. Neoplasia. 2004;6(1):1-6.
208. White RJ. RNA polymerase III transcription and cancer. Oncogene. 2004;23(18):3208-16.
209. Wang L, Qu J, Zhou L, Liao F, Wang J. MicroRNA-373 Inhibits Cell Proliferation and Invasion via Targeting BRF2 in Human Non-small Cell Lung Cancer A549 Cell Line. Cancer Res Treat. 2018;50(3):936-49.
210. Tian Y, Wang C, Lu M. BRF2 as a promising indicator for radical lymph-node dissection surgery in patients with cN0 squamous cell carcinoma of the middle thoracic esophagus. Surg Today. 2019;49(2):158-69.
211. Almanza A, Carlesso A, Chintha C, Creedican S, Doultsinos D, Leuzzi B, et al. Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications. FEBS J. 2019;286(2):241-78.
212. Lu M, Tian H, Yue W, Li L, Li S, Qi L, et al. Overexpression of TFIIB-related factor 2 is significantly correlated with tumor angiogenesis and poor survival in patients with esophageal squamous cell cancer. Med Oncol. 2013;30(2):553.
213. Bian Y, Li Q, Li Q, Pan R. Silencing of BRF2 inhibits the growth and metastasis of lung cancer cells. Mol Med Rep. 2020;22(3):1767-74.
214. Cabarcas S, Schramm L. RNA polymerase III transcription in cancer: the BRF2 connection. Mol Cancer. 2011;10:47.
215. Cabarcas-Petroski S, Meneses PI, Schramm L. A meta-analysis of BRF2 as a prognostic biomarker in invasive breast carcinoma. BMC Cancer. 2020;20(1):1093.
216. SYF2 Gene - SYF2 Pre-MRNA Splicing Factor 2022 [Available from: https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SYF2&keywords=syf2.
217. Tanaka I, Chakraborty A, Saulnier O, Benoit-Pilven C, Vacher S, Labiod D, et al. ZRANB2 and SYF2-mediated splicing programs converging on ECT2 are involved in breast cancer cell resistance to doxorubicin. Nucleic Acids Res. 2020;48(5):2676-93.

218. Shi F, Cai FF, Cai L, Lin XY, Zhang W, Wang QQ, et al. Overexpression of SYF2 promotes cell proliferation and correlates with poor prognosis in human breast cancer. Oncotarget. 2017;8(51):88453-63.
219. Liu Y, Ni T, Xue Q, Lv L, Chen B, Cui X, et al. Involvement of p29/SYF2/fSAP29/NTC31 in the progression of NSCLC via modulating cell proliferation. Pathol Res Pract. 2015;211(1):36-42.
220. Zhang S, Shi W, Chen Y, Xu Z, Zhu J, Zhang T, et al. Overexpression of SYF2 correlates with enhanced cell growth and poor prognosis in human hepatocellular carcinoma. Mol Cell Biochem. 2015;410(1-2):1-9.
221. Tao Y, Zhao Y, Peng Y, Ma X, Sun C, Xu K. MicroRNA-621 inhibits the growth of gastric cancer cells by targeting SYF2. Arch Biochem Biophys. 2020;688:108406.
222. Yan S, Deng Y, Qiang Y, Xi Q, Liu R, Yang S, et al. SYF2 is upregulated in human epithelial ovarian cancer and promotes cell proliferation. Tumour Biol. 2015;36(6):4633-42.
223. Ma W, Stafford LJ, Li D, Luo J, Li X, Ning G, et al. GCIP/CCNDBP1, a helix-loop-helix protein, suppresses tumorigenesis. J Cell Biochem. 2007;100(6):1376-86.
224. Sang A, Yang X, Chen H, Qin B, Zhu M, Dai M, et al. Upregulation of SYF2 Relates to Retinal Ganglion Cell Apoptosis and Retinal Glia Cell Proliferation After Light-Induced Retinal Damage. J Mol Neurosci. 2015;56(2):480-90.
225. Irish JM, Hovland R, Krutzik PO, Perez OD, Bruserud O, Gjertsen BT, et al. Single cell profiling of potentiated phospho-protein networks in cancer cells. Cell. 2004;118(2):217-28.
226. Collins SJ. The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression. Blood. 1987;70(5):1233-44.
227. Birnie GD. The HL60 cell line: a model system for studying human myeloid cell differentiation. Br J Cancer Suppl. 1988;9:41-5.
228. Albanesi J, Noguera NI, Banella C, Colangelo T, De Marinis E, Leone S, et al. Transcriptional and Metabolic Dissection of ATRA-Induced Granulocytic Differentiation in NB4 Acute Promyelocytic Leukemia Cells. Cells. 2020;9(11).
229. Kirkman-Brown J, Bjorndahl L. Evaluation of a disposable plastic Neubauer counting chamber for semen analysis. Fertil Steril. 2009;91(2):627-31.
230. Cheng Y, Su Y, Wang S, Liu Y, Jin L, Wan Q, et al. Identification of circRNA-lncRNA-miRNA-mRNA Competitive Endogenous RNA Network as Novel Prognostic Markers for Acute Myeloid Leukemia. Genes (Basel). 2020;11(8).
231. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. CA Cancer J Clin. 2022;72(1):7-33.
232. Anelli L, Zagaria A, Specchia G, Musto P, Albano F. Dysregulation of miRNA in Leukemia: Exploiting miRNA Expression Profiles as Biomarkers. Int J Mol Sci. 2021;22(13).
233. Chirshev E, Oberg KC, Ioffe YJ, Unternaehrer JJ. Let-7 as biomarker, prognostic indicator, and therapy for precision medicine in cancer. Clin Transl Med. 2019;8(1):24.
234. Johnson DT, Davis AG, Zhou JH, Ball ED, Zhang DE. MicroRNA let-7b downregulates AML1-ETO oncogene expression in t(8;21) AML by targeting its 3'UTR. Exp Hematol Oncol. 2021;10(1):8.
235. Salehi Z, Akrami H, Sisakhtnezhad S. The Effect of Placenta Growth Factor Knockdown on hsa-miR-22-3p, hsa-let-7b-3p, hsa-miR-451b, and hsa-mir-4290

Expressions in MKN-45- derived Gastric Cancer Stem-like Cells. Middle East Journal of Cancer. 2018;9(2):113-22.
236. Dweep H, Gretz N. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. Nat Methods. 2015;12(8):697.
237. Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. Neuro Oncol. 2005;7(2):122-33.
238. Huang CY, Chang WS, Tsai CW, Hsia TC, Shen TC, Bau DT, et al. The contribution of interleukin-8 genotypes and expression to nasopharyngeal cancer susceptibility in Taiwan. Medicine (Baltimore). 2018;97(36):e12135.
239. Huang S, Mills L, Mian B, Tellez C, McCarty M, Yang XD, et al. Fully humanized neutralizing antibodies to interleukin-8 (ABX-IL8) inhibit angiogenesis, tumor growth, and metastasis of human melanoma. Am J Pathol. 2002;161(1):125-34.
240. Schadendorf D, Moller A, Algermissen B, Worm M, Sticherling M, Czarnetzki BM. IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor. J Immunol. 1993;151(5):2667-75.
241. Zhang M, Fang T, Wang K, Mei H, Lv Z, Wang F, et al. Association of polymorphisms in interleukin-8 gene with cancer risk: a meta-analysis of 22 case-control studies. Onco Targets Ther. 2016;9:3727-37.
242. Wang C, Zeng J, Li LJ, Xue M, He SL. Cdc25A inhibits autophagy-mediated ferroptosis by upregulating ErbB2 through PKM2 dephosphorylation in cervical cancer cells. Cell Death Dis. 2021;12(11):1055.
243. Ding FN, Gao BH, Wu X, Gong CW, Wang WQ, Zhang SM. miR-122-5p modulates the radiosensitivity of cervical cancer cells by regulating cell division cycle 25A (CDC25A). FEBS Open Bio. 2019;9(11):1869-79.
244. Yoneda R, Ueda N, Uranishi K, Hirasaki M, Kurokawa R. Long noncoding RNA pncRNA-D reduces cyclin D1 gene expression and arrests cell cycle through RNA m(6)A modification. J Biol Chem. 2020;295(17):5626-39.
245. Cimadamore F, Amador-Arjona A, Chen C, Huang CT, Terskikh AV. SOX2-LIN28/let-7 pathway regulates proliferation and neurogenesis in neural precursors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(32):E3017-26.
246. Mao W, Xiong G, Wu Y, Wang C, St Clair D, Li JD, et al. RORalpha Suppresses Cancer-Associated Inflammation by Repressing Respiratory Complex I-Dependent ROS Generation. Int J Mol Sci. 2021;22(19).
247. Sun X, Dongol S, Qiu C, Xu Y, Sun C, Zhang Z, et al. miR-652 Promotes Tumor Proliferation and Metastasis by Targeting RORA in Endometrial Cancer. Mol Cancer Res. 2018;16(12):1927-39.
248. Jiang Y, Zhou J, Zhao J, Hou D, Zhang H, Li L, et al. MiR-18a-downregulated RORA inhibits the proliferation and tumorigenesis of glioma using the TNF-alpha-mediated NF-kappaB signaling pathway. EBioMedicine. 2020;52:102651.
249. Ma X, Chen H, Li L, Yang F, Wu C, Tao K. CircGSK3B promotes RORA expression and suppresses gastric cancer progression through the prevention of EZH2 trans-inhibition. J Exp Clin Cancer Res. 2021;40(1):330.
250. Ben-Yehuda S, Dix I, Russell CS, McGarvey M, Beggs JD, Kupiec M. Genetic and physical interactions between factors involved in both cell cycle progression and pre-mRNA splicing in Saccharomyces cerevisiae. Genetics. 2000;156(4):1503-17.
251. Lu R, Misra V. Zhangfei: a second cellular protein interacts with herpes simplex virus accessory factor HCF in a manner similar to Luman and VP16. Nucleic Acids Res. 2000;28(12):2446-54.

252. Zhang R, Thamm DH, Misra V. The effect of Zhangfei/CREBZF on cell growth, differentiation, apoptosis, migration, and the unfolded protein response in several canine osteosarcoma cell lines. BMC Vet Res. 2015;11:22.
253. Lee JH, Lee GT, Kwon SJ, Jeong J, Ha YS, Kim WJ, et al. CREBZF, a novel Smad8-binding protein. Mol Cell Biochem. 2012;368(1-2):147-53.
254. Lockwood WW, Chari R, Coe BP, Thu KL, Garnis C, Malloff CA, et al. Integrative genomic analyses identify BRF2 as a novel lineage-specific oncogene in lung squamous cell carcinoma. PLoS Med. 2010;7(7):e1000315.

HAM VERİLER

FORMLAR

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



LET-7B-5P VE LET-7B-3P MİRNA'LARININ HL-60 VE NB4 AKUT MYELOİD LÖSEMİ HÜCRE HATLARINDA FONKSİYONEL ETKİLERİNİN VE HEDEF GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI-2

ORİJİNALLİK RAPORU

%12	%11	%3	%4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%6
2	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
3	acikerisim.erbakan.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
4	Submitted to Konya Necmettin Erbakan University Öğrenci Ödevi	<%1
5	cdn.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
6	qmro.qmul.ac.uk İnternet Kaynağı	<%1
7	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<%1
8	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<%1