T.C.

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

KRONİK MYELOİD LÖSEMİ VAKALARINDA BCR-ABL1 İLİŞKİLİ MİKRORNALARIN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN KLİNİK VE MOLEKÜLER PARAMETRELER İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

DR. ÖMER YAKAR

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Dr.Öğr.Üyesi Çiğdem YÜCE KAHRAMAN

ERZURUM 2021

T.C.

Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

KRONİK MYELOİD LÖSEMİ VAKALARINDA BCR-ABL1 İLİŞKİLİ MİKRORNALARIN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN KLİNİK VE MOLEKÜLER PARAMETRELER İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

DR. ÖMER YAKAR

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Dr.Öğr.Üyesi Çiğdem YÜCE KAHRAMAN

ERZURUM 2021

TEŞEKKÜR

Tıbbi Genetik asistanlığım, eğitimim ve tez çalışmalarım süresince her konuda desteğinden ve tavsiyelerinden faydalandığım, tecrübelerinden ve insani değerlerinden de oldukça istifade ettiğim, beni iyi bir hekim ve araştırmacı olmam için her zaman teşvik eden, anabilim dalı başkanımız saygıdeğer Prof. Dr. Abdulgani Tatar hocama teşekkürlerimi sunuyorum.

Asistanlık eğitimimim boyunca beni bilimsel çalışmalara sabırla teşvik eden, eğitimimimiz ve çalışmalarımız için emek harcayan, tez danışmanlığımı yürüten, değerli hocam Dr.Öğr.Üyesi Çiğdem Yüce Kahraman'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmam boyunca, örneklerin toplanmasında ve çalışılmasında bana her türlü desteği sağlayan değerli teknisyenimiz Ayşe Gökçe'ye ve laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen ve tecrübelerini paylaşan biyologumuz Güller Özkan'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Uzmanlık eğitimim boyunca, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum asistan, teknisyen, biyolog, moleküler biyolog, sekreter arkadaşlarıma ve diğer tüm Tıbbi Genetik Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ediyorum.

Bugünlere gelmemde büyük emekleri olan sevgili annem, babam ve ablama şükranlarımı sunuyorum.

Dr. Ömer Yakar

Erzurum 2021

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER ii
TABLOLAR DİZİNİ iv
ŞEKİLLER DİZİNİ v
KISALTMALAR DİZİNİ vi
ÖZET vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Lösemi 3
2.2. Kronik Myeloid Lösemi 3
2.2.1. Tanım 3
2.2.2. Tarihçe 3
2.2.3. Epidemiyoloji 5
2.2.4. Etyopatogenez 5
2.2.5. Klinik Bulgular 11
2.2.7. Laboratuvar Bulguları 11
2.2.8. KML'de Tanı ve Prognoz 12
2.2.9. Tedavi 13
2.3. MikroRNA (miRNA) 18
2.3.1. Tanım 18
2.3.2. MiRNA Biyogenezi 18
2.3.3. Biyolojik Görevleri 20
2.3.4. Neoplazik Süreçlerdeki Rolleri 22
2.3.5. KML ve miRNA'lar 25
3. GEREÇ VE YÖNTEM 28
3.1. Çalışma Planı 28
3.2. MikroRNA Analizi 29
3.2.1. Total RNA İzolasyonu 29
3.2.2. cDNA Eldesi 31
3.2.3. qRT-PCR aşaması 31
3.3. Verilerin analizi 33
4. BULGULAR 34

4.1. Çalışma gruplarının genel özellikleri 34
4.2. Ekspresyon analizi bulguları 35
4.3. Ekspresyon değerlerinin karşılaştırılması 39
5. TARTIŞMA 43
7. EKLER 49
KAYNAKLAR 50

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. miRNeasy Mini Kit (QIAGEN) içeriği (50 reaksiyonluk) 29
Tablo 2. miScript II RT Kit (QIAGEN) içeriği (50 reaksiyonluk)..... 31
Tablo 3. qRT-PCR için belirlenen malzemeler ve miktarları 32
Tablo 4. qRT-PCR döngü basamakları 32
Tablo 5. Hastaların tanımlayıcı özellikleri..... 34
Tablo 6. Hasta grubunda TKİ kullanımı 34
Tablo 7. İmatinib duyarlı (S) grubu için RT-PCR Ct değerleri..... 36
Tablo 8. İmatinib Dirençli (R) grubu için RT-PCR Ct değerleri 37
Tablo 9. Kontrol (K) grubu RT-PCR Ct değerleri 38
Tablo 10. hsa-miR-23a, hsa-miR-101, hsa-miR-138, hsa-miR-152, hsa-miR-181a ve SNORD61 için tespit edilen ortalama Ct değerleri..... 39
Tablo 11. SNORD61 snRNA, miR-23a, miR-138, miR-181, miR-152-3p ve miR-101 için delta Ct değerleri..... 39
Tablo 12. miR-23a, miR-138, miR-181, miR-152-3p ve miR-101 için kontrol grubuna kıyasla ‘Kat değişimi ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)’ değerleri..... 40
Tablo 13. miR-23a, miR-138, miR-181, miR-152-3p ve miR-101 ekspresyon düzeylerinin tedaviye yanıt veren ve dirençli grupta p değerlerinin karşılaştırılması 40
Tablo 14. Dasatinib-nilotinib kullananların kat değişimi..... 42

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. t(9;22)(q34;q11) translokasyonunun karyotip görünümü 6
Şekil 2. BCR-ABL'nin gen ve protein yapısı 7
Şekil 3. İmatinib molekülünün BCR-ABL1'e etki mekanizması 15
Şekil 4. miRNA transkripsiyonundan hedef mRNA'nın baskılanmasına kadar olan süreç (92). 20
Şekil 5. Nanodrop spektrofotometre cihazı 30
Şekil 6. RNA amplifikasyonunda kullanılan Real-Time PCR cihazı (Qiagen Rotor-Gene Q) 33
Şekil 7. RT-qPCR amplifikasyon eğrileri 35
Şekil 8. S, R ve Kontrol gruplarının kat değişimi değerleri 41

KISALTMALAR DİZİNİ

ABL1: Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog1

Anti-miR: Complementary synthetic RNA to miRNA

BCR: Kırılma noktası kümesi

cDNA: Complementary (tamamlayıcı) DNA (Deoksiribo Nükleik Asit)

CT: Cycle treshold (döngü eşiği)

DGCR8: DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8

DICER1: Dicer 1, Double-Stranded RNA-Specific Endoribonuclease

Drosha: RNaz enzimi (DGCR8 ile birlikte primer miRNA'ları prekürsör miRNA'lara çevirir)

JAK: Janus Kinaz

KML: Kronik Myeloid Lösemi

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

miRNA: MikroRNA

mRNA: Messenger (haberci) RNA (Ribo Nükleik Asit)

ncRNA: Kodlama yapmayan RNA

qRT-PCR: Niceliksel eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

RAS: Retrovirus-Associated DNA Sequences

RISC: RNA-indüklenmiş susturma kompleksi

snoRNA: Small nucleolar RNA

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

TKİ: Tirozin Kinaz İnhibitörü

UTR: Untranslated region (mRNA'ların translasyona uğramayan 3' ve 5' uç bölgeleri)

ÖZET

KRONİK MYELOİD LÖSEMİ VAKALARINDA BCR-ABL1 İLİŞKİLİ MİKRORNALARIN EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN KLİNİK VE MOLEKÜLER PARAMETRELER İLE İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ

Amaç: Kronik myeloid lösemi (KML) 9. ve 22. kromozomların translokasyonu sonucu oluşan BCR-ABL füzyon geni zemininde gelişen bir hematopoetik malignitedir. BCR-ABL1 geni KML hastalarının %95'inde saptanmaktadır. Hastalığın tedavisinde hedeflenmektedir ve takibinde önemli bir parametredir. MikroRNA'lar onkogenik ve tümör süpresor özellikleri gösterilmiş küçük RNA molekülleridir. Bu çalışmamızın amacı BCR-ABL1 molekülü ilişkili miRNA'ların KML gelişimi ve prognozundaki rollerinin aydınlatılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Polikliniği'ne rutin olarak başvuran, yaşları 25 ile 95 arasında olan, 25 tedaviye duyarlı ve 25 tedaviye dirençli KML hastasından ve sağlıklı olduğu gösterilmiş, yaşları 25 ile 95 arasında değişen 50 bireyden periferik kan alınarak gerçekleştirildi. Bu örneklerden total RNA izole edilerek cDNA'lar sentezlendi. Bu cDNA'lar kullanılarak spesifik miRNA düzeyleri qRT-PCR ile belirlendi.

Bulgular: KML hastalarında miRNA ekspresyon düzeylerinin düşük olduğu gözlenmiştir. Tedaviye dirençli (R) grubundaki miR-23a ve miR-152-3p düzeylerindeki azalma istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. Tedaviye duyarlı (S) ve R grubundaki miR-138 ekspresyon düzeyi ise kontrol grubuna kıyasla yüksek bulunmuş, R grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlılık göstermiştir.

Tartışma ve Sonuç: Literatürde, KML gelişimi ve prognozunu aydınlatabilecek miRNA'lara ait çalışmalar bulunmakla birlikte henüz klinikte kullanılabilecek bir biyobelirteç elde edilememiştir. Çalışmamızda imatinib'e duyarlı ve dirençli hastalar arasında miRNA düzeylerinde anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir. Bununla beraber, tedaviye dirençli hasta grubunda, miR-23a ve miR-152-3p ekspresyonlarının düşüklüğü ve miR-138 ekspresyonunun fazlalığı ile direnç mekanizması arasında bir ilişki olduğunu, bu alanda daha fazla örnekle ve daha kapsamlı (miRNome) yaklaşımlarla bu mekanizmanın daha net aydınlatılabileceğini düşünmekteyiz. Böylece ilişkili miRna düzeylerinin ölçümüyle prognoz ve direnç gelişimi hakkında klinik ön görüde bulunulabileceği inancındayız.

Anahtar Sözcükler: mikroRNA, kronik myeloid lösemi, BCR-ABL1

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN BCR-ABL1 RELATED MICRORNA'S EXPRESSION LEVELS AND CLINICAL AND MOLECULAR PARAMETERS IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA CASES

Objective: Chronic myeloid leukemia is a hematopoietic malignancy that develops on the basis of the BCR-ABL fusion gene resulting from the translocation of chromosomes 9 and 22. The BCR-ABL1 gene is detected in 95% of CML patients. It is targeted in the treatment of the disease and is an important parameter in its follow-up. MicroRNAs are small RNA molecules with oncogenic and tumor suppressor properties. The aim of this study is to elucidate the roles of BCR-ABL1 molecule-related miRNAs in CML development and prognosis.

Materials and Methods: This study was carried out on peripheral blood was collected from 25 CML patients between the ages of 25 and 95 who were sensitive to treatment and resistant to treatment, and 50 individuals between the ages of 25 and 95 who were shown to be healthy. They all routinely gave blood samples to the Atatürk University Faculty of Medicine, Department of Medical Genetics. cDNAs were synthesized by isolating total RNA from the samples. Using these cDNAs, specific miRNA levels were determined by qRT-PCR.

Results: It has been observed that miRNA expression levels were low in CML patients. The decrease in miR-23a and miR-152-3p levels in the R group was statistically significant. The expression level of miR-138 in the S and R groups was found to be higher compared to the control group, and the increase in the R group was statistically significant.

Discussion: Although there are studies in the literature on miRNAs that can elucidate the development and prognosis of CML, yet there is no biomarker that could potentially be used in clinical practice. In our study, no significant difference was found in miRNA levels between imatinib-sensitive and resistant patients. However, in the treatment-resistant patient group, there is a relationship between low miR-23a and miR-152-3p expressions and excess miR-138 expression and the mechanism of resistance, and this mechanism can be more clearly elucidated with larger sample sizes and more comprehensive (miRNome) approaches. Thus, we believe that clinical predictions can be made about the prognosis and development of resistance by measuring the associated miRNA levels.

Keywords: microRNA, chronic myeloid leukemia, BCR-ABL1

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kronik myeloid lösemi myeloid hücrelerin anormal klonal genişlemesi ile karakterize bir kök hücre hastalığı olup, erişkinlerde yeni tanı lösemilerin %15'ini oluşturmaktadır. KML insidansı 0,69-1,39/100.000/yıl olarak bildirilmiştir ve dünyada 100.000 civarı KML hastası bulunmaktadır (1). KML tanısı Philedelphia (Ph) kromozomu, t(9;22)(q34;q11), gösterilmesiyle konulmaktadır (2). KML kronik faz, akselere faz ve blast fazı olmak üzere üç fazda sınıflandırılmaktadır. Çoğu KML hastası (%90) kronik fazda tanı almaktadır (3).

KML tedavisi BCR-ABL1 onkoproteinin ATP molekülü ile ilişkisine engel olan Tirozin Kinaz İnhibitörü (TKİ) moleküllerinin keşfiyle yeni bir döneme girmiştir. Hücre çoğalmasını engelleyen bu moleküler hedefli tedaviler KML'nin doğal gidişatını değiştirmiş, 10 yıllık sağkalımı %20 'lerden %80-90'lara ulaştırmıştır (4). KML tanısı alan hastalar ömür boyu tirozin kinaz inhibitörü tedavisi almaktadırlar ve bu durum ciddi bir ekonomik ve tıbbi yük oluşturmaktadır.

KML oluşumunda, Tirozin Kinaz aktivitesi gösteren BCR-ABL1 füzyon onkogeni başrolü alır. BCR-ABL1 proteini kendiliğinden aktif olup JAK2/STAT, PI3K-AKT-mTOR, MAPK/ERK ve daha birçok alt sinyal yolaklarını aktive ederek myeloid hücrelerin büyümesine ve çoğalmasına neden olur (5). BCR-ABL1 füzyon geni KML hastalarının %90'nında pozitiftir. Tirozin Kinaz İnhibitörleri (imatinib, dasatinib ve nilotinib) güncel tedavide ilk basamakta yer almaktadırlar. Fakat bazı hastalar TKİ'ye yanıtsızdır veya ilaca daha sonra direnç geliştirmektedir (6).

Biyobelirteçler, hastalıkların biyolojik süreçlerini anlamak, doğru terapötik stratejiler geliştirmek ve prognozu değerlendirmek için önemlidir. MiRNA'lar dokulardaki ve biyolojik sıvılardaki yüksek stabiliteleri nedeniyle yeni minimal invaziv biyobelirteç adayları olarak değerlendirilmektedir (7). MiRNA'lar, (miRNA'lar) yaklaşık 22 nükleotid-(nt) -uzunluğunda, küçük, düzenleyici, kodlamayan RNA'lardır ve eliminasyon veya translasyonu engelleme yoluyla mRNA'ları baskılayarak hücrede önemli düzenleyici rol oynarlar (8). MiRNA'lar tarafından düzenlenen mRNA'lar genlerin çoğunluğunu kapsamaktadır ve anormal miRNA ifadesi, hücre proliferasyonu, apoptoz ve stres yanıtlarında önemli düzenleyici yolakları etkilemektedir (9). Kanserde, miRNA'lar

“oncomiR'ler” veya “tümör baskılayıcı miR'ler” olarak adlandırılan yeni bir onkogen ve tümör baskılayıcı gen sınıfı olarak görülmektedir (10). OncomiR'ler veya tümör baskılayıcı miR’lerin kanserle ilişkili çok sayıda sinyal yolunda rol aldığı birçok çalışma ile doğrulanmıştır (11).

KML hastalarında TKİ direncine sebep olan mekanizmaların açıklanması ve hastaların hangi tedaviye en iyi yanıt vereceğinin öngörülebilmesi önemlidir. Günümüzde diğer birçok neoplazik hastalıkta olduğu gibi KML için de prognostik biyobelirteç geliştirme çalışmaları devam etmektedir fakat henüz klinikte kullanılabilen bir biyobelirteç elde edilememiştir (12). Çalışmamız kapsamında hastalığın temelinde BCR-ABL1 onkoproteini yatmasından dolayı, BCR-ABL1 ilişkili miRNA’ların ekspresyon profillerini inceleyerek, TKİ dirençli, duyarlı ve normal gruplar arasında kıyaslayarak KML gelişimi ve prognozunu aydınlatmada miRNA’ların etkisini incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Lösemi

Lösemi, kanda ve kemik iliğinde bulunan lökositlerin ve lökosit öncüllerinin kontrolsüz proliferasyonu ve gelişimi ile karakterize, kan yapıcı organların ilerleyici, malign bir hastalığıdır. Hastalığın süresinden bağımsız olarak, hücre farklılaşmasının derecesine göre akut veya kronik olarak ve baskın olan hücre tipine (miyeloid veya lenfoid) göre miyelojen veya lenfositik olarak sınıflandırılabilir. Birkaç alt tip tanımlanmıştır. Löseminin kesin nedeni bilinmemektedir, ancak birçok alt tip için genetik ve çevresel risk faktörleri tanımlanmıştır. Gelişmiş ülkelerde insidansı yüksektir. Tüm lösemilerin %90'ından fazlası KLL ve AML başta olmak üzere erişkin yaşta görülür.

2.2. Kronik Myeloid Lösemi

2.2.1. Tanım

Kronik miyeloid lösemi (KML), öncül hematopoietik progenitör hücrelerin bir dizi değişim ile klonal miyeloproliferatif genişlemesidir. Miyeloid, monositik, eritroid, megakaryositik, B-lenfoid ve bazen T lenfoid soyları içerir. KML, bir karyotip anormalliğinin (Philadelphia (Ph) kromozomu) lökomogenez ile alakalı patojenetik olaylarda rol aldığının ilk defa gösterildiği bir hastalıktır (13). KML, miyeloproliferatif neoplazmı olan bir hastada Philadelphia kromozomunun (Ph) varlığı ile tanımlanır (14).

2.2.2. Tarihçe

KML ilk kez 1844/5'te Virchow'un lösemi (Leukämie) terimini kullanmasıyla tanımlanmıştır (15). Kemik iliği, KML'nin olası orijin dokusu olarak tahmin edilmiştir, ancak kesin bir tanıya sadece 82 yıl sonra Philadelphia kromozomunun keşfedilmesiyle ve daha sonra translokasyon t(9; 22)'nin hastalığın ayırt edici özelliği olarak tanımlanmasıyla ulaşılmıştır (2, 16). BCR-ABL füzyon ürünlerinin tanımlanmasıyla kromozom kırılma noktalarının moleküler olarak belirlenmesi, moleküler KML tanısı ve mevcut tedavi prensibi olarak BCR-ABL Tirozin kinaz inhibitörleri (TKİ) ile hedefe yönelik tedavinin zeminini oluşturmuştur. Uluslararası Ölçeğin (IS) türetilmesiyle KML'de moleküler BCR-ABL1 izleme, diğer lösemilerin ve hastalıkların moleküler izlenmesi için bir öncü olmuştur.

KML'de erken palyatif tedavilerden arsenik (Fowler solüsyonu) (17) ve dalak ışınlaması (18), 1953 yılında busulfan kullanılmaya başlanana kadar kullanılmıştır (19). Hidroksiüre, 1963'ten beri kullanılmaktadır (20), ve busulfandan daha az yan etkiye sahip olup ve orta derecede uzun süreli sağkalım sağlamıştır (21). Kemik iliği transplantasyonu yetmişli yılların sonlarında başlatılmıştır (22) ve ilk kürü sağlamıştır (23). Aynı yıllarda interferon alfa (IFN) 'nın hastaların önemli bir azınlığında, özellikle gençlerde, tam sitogenetik yanıtı sağladığı görülmüştür (24). Randomize çalışmalar, kesin etki mekanizması hala tam olarak anlaşılamamasına rağmen, tercih edilen IFN tedavisi ile sağkalımın uzadığını belgelemiştir (25).

IFN'nin yararlı olduğu, BCR-ABL tirozin kinaz inhibisyonu keşfedildiğinde henüz kabul edilmişti (American Society of Hematology yönetim önerileri 1999) (26).

ABL-onkojenin tespiti, 1960'larda ve 1970'lerin başında bir insan lösemi virüsü arayışının yan ürünü olmuştur. İlk onkojenler (SRC, MYC) kanatlı lösemi virüslerinden izole edilmiştir (27, 28). ABL, 1980'de akut dönüşen murin Abelson lösemi virüsünden izole edilmiştir (29). Bunları retrovirüslerden ve normal hücrelerin genomlarından izole edilen çok sayıda başka onkojen izlemiştir.

Aralarında SRC ve ABL'nin de bulunduğu pek çok onkojenin, özellikle, nadiren fosforile edilen bir amino asit olan tirozini hedefleyen bir kinaz aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur (29, 30) Bu bulgu, insan ABL onkojeni homoloğonun t(9;22) varlığında, kromozom 9 kırılma noktasında bulunduğu fark edildiğinde, KML için önem kazanmıştır (31). 22. Kromozomun BCR dizileri ile ABL'nin füzyon transkriptlerinin keşfi ve transfeksiyon deneyleri sonucunda, BCR-ABL dizilerinin farelerde lösemiye neden olduğu gözlemlenmiştir (32, 33). BCR-ABL1'in tirozin kinaz aktivitesi sonucu oluşan onkojenik özellikleri nedeniyle, insanlarda terapötik kullanıma uygun, bcr-abl tirozin kinazı hedefleyen spesifik bir inhibitör oluşturabileceği öngörülmüştür (34).

İmatinib ile ilk deneme düşük riskli KML hastalarında faz I çalışması olarak 1998'de başlamıştır (35). Şaşırtıcı derecede olumlu sonuçlar, en şüphecileri bile daha ileri çalışmaların gerekliliğine ikna etmiştir. 1999'da, KML üzerine bir grup uluslararası

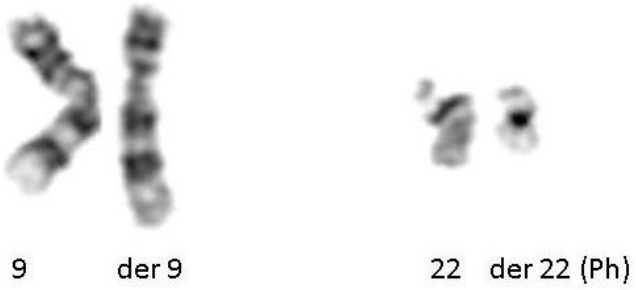
araştırmacı, sonuçları tartışmak ve daha büyük faz II ve III denemeleri için yeterli miktarlarda imatinib üretilmesi için, Fransa'nın Biarritz kentinde bir araya gelmiştir (36).

2.2.3. Epidemiyoloji

Tüm lösemi vakalarının %15'ini oluşturan KML, insidansıyla myeloproliferatif hastalıklar arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Batı ülkelerinde KML hastalarının ortalama yaşı yaklaşık 57'dir (1). 20 Avrupa ülkesinden 2904 hasta değerlendirilerek yapılan, EUTOS çalışmasında, insidans 0,69-1,39/100.000/yıl, erkek / kadın oranı 1.16:1 ve medyan yaş 55 olarak bulunmuştur. Hastaların yaklaşık %95'i kronik fazda (KF) tanı almıştır. KML vakalarının belirli bir bölgede yaygınlığına dair için hiçbir ipucu bulunmamıştır (1). KML'de 70 yaşın üzerindeki hastalar, vakaların %20'den fazlasını, çocuklar ve ergenler ise %5'den azını oluşturmaktadır. Asya ve Afrika'da tanı anındaki medyan yaş <50'dir ve bu da kısmen nüfusun daha genç olmasından kaynaklanmaktadır (37).

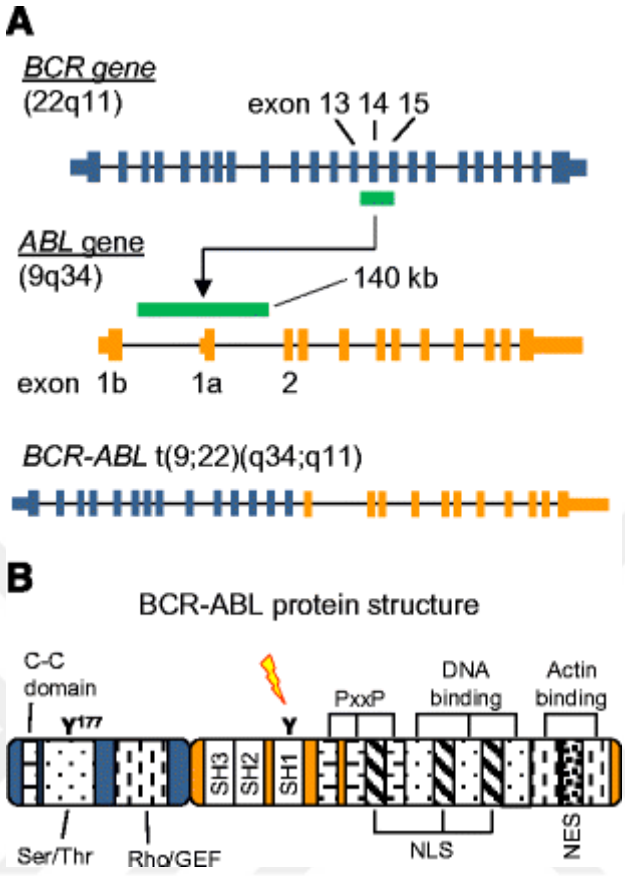
2.2.4. Etyopatogenez

KML için kanıtlanmış tek risk faktörü yüksek dozda iyonlaştırıcı radyasyona maruziyettir (38). Ph kromozomu, 9. ve 22. kromozomların uzun kolları arasındaki bir translokasyon ile oluşur; t(9;22)(q34;q11) (Şekil 1). BCR ve ABL1 genlerinin yan yana gelmesine neden olur. BCR-ABL1 füzyon geni, BCR (kırılma noktası küme bölgesi) geninin 5 ′ ucundan ve ABL1 geninin 3′ ucundan oluşur. BCR ve ABL1 genomik kırılma noktalarının konumu oldukça değişkendir, ancak rekombinasyon genellikle BCR'nin 13. veya 14. intronunun ve ABL1'in 140 kilobazlık (kb) 1b. ve 2. ekzonları arasındaki bir bölge arasında gerçekleşir (39). ABL1 genindeki kırılma noktasından bağımsız olarak, mRNA splicing, e13a2 (BCR ekzon 13 ve ABL1 ekzon 2) veya e14a2 şeklindeki majör BCR-ABL1 transkriptlerini oluşturur. Bu transkriptler başlangıçta sırasıyla b2a2 ve b3a2 olarak adlandırılmıştır. Her iki transkript, 210-kDa BCR-ABL1 proteininin ekspresyonunu sağlar. Hastaların e13a2 ya da e14a2 transkriptlerinden hangisine sahip oldukları pek çok kez tartışma konusu olmuştur (40). BCR kırılma bölgesinin konumu hasta prognozu, trombosit sayısı ve tedaviye yanıt ile ilişkilendirilmiştir (41), ancak bunun önemini reddeden başka çalışmalar da bulunmaktadır (42).



Şekil 1. t(9;22)(q34;q11) translokasyonunun karyotip görünümü

KML'de gözlemlenen 210-kDa BCR-ABL1 proteini, ondan fazla protein domaini içerir (Şekil 2). BCR-ABL1, BCR'den Ser/Thr kinaz, Rho/GEF ve dimerizasyon (sarmal bobin) domainlarini alır ve SH, prolinden zengin (PxxP), DNA ve aktin bağlama alanları ve nükleer lokalizasyona, giriş sinyalleri içeren ABL1 ile kaynaşır. SH1 tirozin kinaz bölgesi, KML patogenezindeki temel rolü nedeniyle en çok çalışılan BCR-ABL1 bölgesi olmuştur. Bununla birlikte, Ser/Thr kinaz alanındaki tryrosin-177 gibi diğer bölgeler, BCR-ABL1'in fonksiyonu için ayrıca değerlidir (43, 44).



Şekil 2. BCR-ABL'nin gen ve protein yapısı

BCR-ABL1, ABL1 geninin çoğunu içermesine rağmen, ABL1'in N-terminal miristoilasyon bölgesini kodlayan diziden yoksundur. Bu kısmın kaybının kısmen BCR-ABL1'in yapısal kinaz aktivitesini kazanmasını sağladığı düşünülmektedir. Normal ABL1 proteini için, N-terminalinin miristoilasyonu ve ardından ABL1'in miristoilasyon bağlanma cebi içinde cis-bağlanması, SH1 kinaz aktivitesinin otoinhibisyonuna neden olur (45). BCR-ABL1, miristoilasyon bağlanma cebini muhafaza ettiğinden, bu motifi hedefleyen bileşikler, BCR-ABL1 kinaz aktivitesini inhibe etmek için denenmiştir. Bu bileşikler, BCR-ABL1 aktivitesinin allosterik inhibisyonunu sağlayabilmekte ve BCR-ABL1'in terapötik hedeflenmesini artırabilmektedir (46).

BCR ve ABL genlerindeki kırılma bölgelerinin konumu ve kimerik genin yapısı, BCR-ABL proteininin patojeniteden sorumlu domainlerinin konumunun anlaşılması önem arzetmektedir (Şekil 2) (36)

BCR-ABL1 proteini, sinyal yollarının anormal aktivasyonuna ve lösemiyi tetikleyen bir hücresel ortama geçişe neden olur. Bu atipik yolak aktivasyonu, büyüme faktörü bağımlılığı, apoptoz, proliferasyon ve hücre adezyonundaki değişikliklerle ilişkilendirilmiştir. Bu özellikler, granülositlerin hiper proliferasyonuna ve KF-KML'de gözlenen klinik özelliklere neden olur (32). TKİ tedavisinin başarısıyla BCR-ABL1 sinyal yolunun önemi (özellikle tirozin kinaz aktivitesi yoluyla), tekrar gösterilmiştir. BCR-ABL1'in hedeflenebilmesi, bilim insanlarına KML'nin biyolojisini daha fazla inceleme olanağı sunmuştur.

İlk KML modelleri, BCR-ABL1'in öncelikle hastalık mekanizmasına odaklanmıştır. Fare kemik iliğinin BCR-ABL1 eksprese eden hemopoietik kök hücreler (HKH'ler) ile zenginleştirilmesi, etkilenen farelerin KML benzeri bir fenotip sergilemesine neden olmuştur (32, 47). Ek çalışmalar, BCR-ABL1'in hücreleri dönüştürme, büyüme faktöründen bağımsız hücre büyümesine neden olma ve apoptozu bloke etme yeteneğini ortaya koymuştur (48, 49). BCR-ABL1'in antisens oligonükleotidler (50, 51) tarafından hedeflenmesi ve kinaz aktivitesinin bozulması (52), BCR-ABL1'in löseminin idamesi için gerekli olduğunu göstermiştir. Bu gözlemler BCR-ABL1'in işlevini göstermiş ve bu geni KF-KML'nin sürücüsü olarak doğrulamıştır. Bir HKH'de BCR-ABL1 sekansının ekspresyonu, KML benzeri hastalık oluşturmak için yeterli olduğundan, genellikle BCR-ABL1'in KML oluşumu için yeterli olduğu kabul edilir. KML oluşturmak için ek bir olay gerekli görülmemiştir. Burada tartışılacağı gibi, BCR-ABL1, hemen hemen her hücresel olayı, KF-KML lehine işlev görmesi için kontrol edebilen yeterliliğe sahiptir. Ayrıca, BCR-ABL1'e eşlik eden başka, sürekli bir anormallik yoktur. Bununla birlikte, KML'ye neden olacak ek bir olayın varlığı henüz dışlanmamıştır (53).

BCR-ABL1 nasıl çalışmaktadır?

BCR-ABL1 ifadesinin ortaya çıkardığı fenotip anlaşıldıktan sonra, araştırmaların odak noktası BCR-ABL1'in hedef yolaklarını belirlemek olmuştur. O zamandan beri, KF-KML'yi oluşturan BCR-ABL1 tarafından müdahale edilen karmaşık bir moleküler ağı araştıran birçok çalışma yapılmıştır. Böylece, Jak/STAT, PI3K/Akt ve Ras/MEK'in BCR-ABL1 yolaklarının patojenik süreçte ön planda olduğu gösterilmiştir (54).

PI3K proteinleri, hücre büyümesini/hayatta kalmasını ve hücre ölümünün inhibisyonunu sağlayan transkripsiyon faktörü aktivasyonunu ve programlamayı modüle etmek için hücre dışı sinyalleri iletir. AKT, PI3K'nın aşağı yönde bir efektörüdür ve sinyal iletiminde önemli bir rol oynar (55). BCR-ABL1, Grb2/Gab2 ve CBL adaptör proteinleri aracılığıyla PI3K yolağını uyarabilir (56). PI3K'nin KML'deki rolünü ortaya koyan ilk çalışmalardan biri, hemopoietik hücrelerin BCR-ABL1 aracılı transformasyonu için PI3K'nın gerekli olduğunu bildirmektedir (57). Daha sonraki çalışmalarda, PI3K/AKT'nin KML devamlılığı için de önemli olduğunu ve, PI3K yolağının inhibisyonunun BCR-ABL1 onkogenezini engelleyebileceğini ve öncül KML hücrelerini öldürebileceği bilgilerine ulaşılmıştır (58). PI3K aktivasyonunun diğer bir sonucu, protein sentezi, hücre büyümesi/boyutu ve otofajiyi kontrol etmekten sorumlu olan mTOR yolağının uyarılmasıdır (59).

Ras GTPases/MEK kinazların aktivasyonu, bir dizi büyüme faktörü geninin transkripsiyonunu aktive etmek için, membran reseptör bağlanma kaskadı yoluyla hücre büyümesini uyarır ve kanserde sıklıkla deregüle olan bir yoldur (60). BCR-ABL1, hücre büyümesini desteklemek için Grb2/Gab2 fosforilasyonuyla Ras'ı aktive eder (43). Ras sinyalinin bozulması, farelerde BCR-ABL1 ile indüklenen KML benzeri hastalığın gelişimini bozar (61). Ayrıca, küçük moleküllü MEK inhibitörleri, öncül KML hücrelerini hedefleyebilir (62). Bununla birlikte, Ras-efektör repertuarının hastalığa nasıl katkıda bulunduğu ve özellikle hangi efektörlerin önemli olduğu konusunda sınırlı bilgi vardır. Bir istisna olarak NF-κB'nin BCR-ABL1/Ras (63) tarafından aktive edilen ve BCR-ABL1 ile indüklenen KML için gerekli olan bir transkripsiyon faktörü olduğu bilinmektedir (64).

Src ailesi kinazları (SFK'lar), BCR-ABL1'in downstream hedeflerinin sıklıkla incelenen bir başka grubudur. Rolleri, hücre dışı sinyallere yanıt olarak hücre büyümesi, farklılaşması ve hareketliliğini koordine etmektir (65). İlk KML hücre hattı modelleri, BCR-ABL1 ekspresyonunun Hck ve Lyn SFK'ları önemli ölçüde etkinleştirdiğini göstermiştir (66). Sonraki çalışmalar, Hck, Lyn ve Fyn'in BCR-ABL1 hücre serisi dönüşümü için ve ayrıca birkaç BCR-ABL1 tirozini fosforile etmek için gerekli olduğunu göstermiştir (67). SFK'lerin hastalığa katkıda bulunduğu bir mekanizma da, STAT5 ve AKT'nin aktivasyonunda BCR-ABL1'e yardımcı olmaktır (68). Lyn'in susturulması ile blastik kriz hücrelerinin etkileyici

bir şekilde öldürüldüğü ve KML blastik krizindeki upregülasyonun, hastalığın ilerlemesinde potansiyel bir rolü olduğu bildirilmiştir (69).

Adaptör protein Crkl yapısal olarak BCR-ABL1 tarafından aktive edilir (70). BCR-ABL1 ve Crkl'yi içeren protein ağları arasında Cbl, STAT, PI3K, Paxillin ve Ras bulunur (71). Crkl ve BCR-ABL1 arasındaki etkileşimin kaybı, farelerde BCR-ABL1 ile indüklenen dönüşümü bozmuştur (72).

KML'de uzun kodlamayan (lnc) RNA'ların işlevsel rolü henüz tanımlanmıştır. LncRNA'ların temel mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır, ancak lncRNA-BGL3'ün BCR-ABL1 dönüşümünde önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (73). BCR-ABL1, K562 ve öncül KML hücrelerinde, bu lncRNA'nın ekspresyonunu MYC transkripsiyon faktörü aracılığıyla kinaz-bağımlı bir şekilde inhibe etmiştir. K562 hücrelerinde lncRNA-BGL3'ün ekspresyon artışı apoptozu indüklemiş ve bu hücrelerin farelere aşılanma yeteneğini azaltmıştır. Daha sonra bu lncRNA'nın, tümör baskılayıcı gen PTEN'i hedefleyen birkaç mikroRNA için bir tuzak görevi görerek PTEN stabilizasyonuna ve bununla ilişkili lökomogenezin inhibisyonuna yol açtığı bulunmuştur (73).

KML'nin biyolojisi, başlangıçta, BCR-ABL1 kinaz aktivitesinin tek başına KF-KML kliniğini ortaya çıkarmak için yeterli olduğu bilgisine dayanmaktaydı. Hem hücre serilerinde hem de farelerde KML'yi kolayca modelleyebilme imkanı, KML'nin moleküler zeminine ilişkin büyük bir bilgi birikimine sağlamıştır. Bu çalışmalar, BCR-ABL1'in, hücre içindeki hemen hemen her süreci değiştirerek, KML patogenezinde rol oynadığını göstermiştir. STAT5 ve BCR-ABL1'in KML'nin indüksiyonu için knocked-out modellemedeki gibi temel bileşenler olduklarını gösterilmiştir (74). Öncül KML hücre biyolojisi hakkındaki son araştırmalarda, yeni ve güçlü teknikler kullanılarak bu konuda önemli bir dizi gen tanımlanmıştır. En çok çalışılanlar, hem kök hücre biyolojisi hem de BK dönüşümünde önemli rollere sahip olan p53, MYC ve β-katenin'dir (53).

KML biyolojisinin açıklanmasında, lösemik kök hücrelere ve öncül hücre popülasyonlarına öncelik verilmektedir. Bu hücre tiplerini incelemeye yönelik geliştirilmiş yöntemler, bu hastalığı anlamak için hem mekanik hem de terapötik açıdan önemli olan bilgileri ortaya çıkarmıştır (75).

2.2.5. Klinik Bulgular

KML'nin klinik bulguları hastalığın düzeyine göre değişebilmiktedir. Hastaların %40'ı herhangi bir şikayetleri yokken rutin yapılan testler sırasında tanı alırlar. Hastaların bir kısmı ise halsizlik, yorgunluk, kilo kaybı, hipermetabolizma nedeniyle aşırı terleme, splenomegali ve bu sebeple hissedilen erken doyma, sol üst kadranda ağrı, hepatomegali gibi şikayetlere sahip olabilir. Tromboz veya kanamaya yatkınlık, platelet ve granülosit disfonksiyonu sebebiyle görülebilir. Anemiye bağlı solukluk görülebilir. Hastalar gece terlemelerinden ve sıcağa intoleranstan yakınabilir. Nadiren hastalarda tümör yüküne bağlı olarak trombotik, vazookluzif hastalıklar, venöz tromboz, serebrovasküler hastalıklar, priapism ve görme problemleri bulunabilir. Fizik muayenede, rutin kontrol sıklıklarına bağlı olarak splenomegali (%20-70) ile karşılaşılır. Bazofil yüksekliğine bağlı olarak histamin artışı, kaşıntı, diyare, kızarıklık ve hatta gastrointestinal ülserler gibi bulgulara sebep olabilir. Hepatomegali (%10) daha az sıklıkla görülür. Palpabl lenf nodlarının (%5) olması blastik faza geçişi, hastalığın ilerlediğini düşündürebilir.

2.2.7. Laboratuvar Bulguları

Tedavi edilmeyen KML'de 10–500×10^9/L arasında değişen lökositoz görülmektedir. Periferik kan yaymasında, nötrofillerin baskın olduğu, hematopoezin sola kaydığı, bantların, miyelositlerin, metamiyelositlerin promiyelositlerin ve blastların varlığı (genellikle <%5) görülebilir. Bazofiller ve/veya eozinofiller sıklıkla yüksektir. Trombositoz yaygın, trombositopeni nadirdir ancak trombositopeni varlığında prognoz daha kötüdür ve hastalık ilerlemesini veya başka bir etiyolojiyi düşündürür. Hastaların üçte birinde anemi mevcuttur. Tedavisiz hastaların %10-20'sinde sayımların döngüsel salınımları görülür. Biyokimyasal anormallikler arasında;düşük lökosit alkalen fosfataz düzeyi ve yüksek seviyelerde vitamin B12, ürik asit, laktat dehidrojenaz ve lizozim bulunur. Splenomegali olsun veya olmasın, açıklanamayan sürekli lökositoz varlığı, ilik muayenesi ve sitogenetik analiz gerektirir.

Kemik iliği, belirgin miyeloid hiperplazi ile hipersellülerdir ve yüksek miyeloid-eritroid oranı 15:1 bulunmaktadır. Kemik iliğinde blastlar %5 veya azdır; daha yüksek olduğunda, kötü prognozu gösterir ve akselere faza dönüşümü düşündürür (eğer ≥15% ise). Yüksek retikülin fibrozu yaygındır. Bu olgu, TKİ öncesi dönemde kötü prognoz göstergesi kabul

edilmiştir. TKİ tedavisi ile retikülin fibrozu çoğu hastada düzelmiştir ve kötü prognozun göstergesi olmaktan çıkmıştır.

2.2.8. KML'de Tanı ve Prognoz

KML'nin teşhisi vakaların %90'ında G-bantlamayla tanımlanan t(9;22)(q34.1;q11.2) 'nin gösterilmesine dayanır. Bu yapı, Philadelphia kromozomu olarak bilinir. Bazı hastalarda, kromozom 9 ve 22 ve bir başka kromozom da dahil olmak üzere üç veya daha fazla kromozom içeren karmaşık translokasyonlar (varyant Ph) olabilir. Diğerlerinin "maskeli Ph" si olabilir (kromozom 9 ve başka bir kromozom arasındaki translokasyona bağlı, fakat moleküler olarak BCR-ABL1 özelliği gösteren). Bu hastaların prognozu ve TKİ tedavisine yanıtları, Ph'li hastalardakilere benzerdir. Hastaların yaklaşık %5-10'unda Ph-pozitif hücrelerde ek kromozomal anormallikler olabilir. Bunlar genellikle trizomi 8, bir çift Ph, izokromozom 17 veya 17p delesyonu, 20q– ve benzerlerini içerir.

FISH ve PCR gibi teknikler de KML tanısında kullanılmaktadır. TKİ tedavisi alan hastalarda KML yükünün takibinde daha duyarlı yaklaşımlardır. Periferik kandan yapılabilirler ve bu nedenle kolaylık sağlarlar. KML'si olan hastaların, tedaviye yanıtını izlemede, ilik sitogenetik analizinin yerine FISH kullanılmaktadır. Bu nedenle tanı anında da, Ph-pozitif hücrelerin yüzdesini ölçmek için bir FISH analizi yapılmış olmalıdır. Yine tanı anında FISH'in tesbit edemediği ek kromozomal anormallikleri saptamak için sitogenetik analiz yapılmış olmalıdır. Ayrıca tanı için moleküler çalışmalar yapılarak BCR-ABL1 transkriptlerinin türü ve varlığı saptanabilir. Böylece takip çalışmalarında, var olduğu halde "saptanamayan" BCR-ABL1 transkriptlerinden kaçınılmış olunur. Standart metodolojiye sahip "negatif" PCR'li Philadelphia kromozomunun varlığı, atipik transkriptlerin araştırılmasını gerektirir.

Hem FISH hem de PCR çalışmaları, düşük seviyelerde yanlış pozitif olabilir. Bu nedenle, KML tanısı her zaman sitogenetik içeren rutin bir kemik iliği analizine dayanmalıdır. Tanısal kemik iliği, Ph kromozomunun varlığını doğrular, klonal evrimi, yani Ph-pozitif hücrelerdeki kromozomal anormallikleri tespit eder ve ayrıca ilik blastlarının ve bazofillerin yüzdesini belirler. Hastaların %10'unda, kemik iliği blastları ve bazofillerin yüzdesi periferik kandan önemli ölçüde yüksek olabilir, bu da daha kötü prognoza işarettir.

TKİ tedavisi alan hastaların tedaviye uyumu, tedaviye yanıtı, muhtemel tedavi direncinin değerlendirilmesi, TKİ tedavisini değiştirme ihtiyacının ve kinaz bölgesi mutasyonlarını değerlendirme ihtiyacının belirlenmesi için sitogenetik, FISH ve moleküler çalışmalar standart bir uygulama haline gelmiştir. Kısmi bir sitogenetik yanıt şu şekilde tanımlanır: rutin sitogenetik analiz ile %35 veya daha az Ph-pozitif metafaz varlığı. Bu, Uluslararası Ölçeğe (IS) göre %10 veya daha az BCR-ABL1 transkriptlerine eşdeğerdir. Tam bir sitogenetik yanıt, Ph-pozitif metafazların yokluğunu ifade eder (%0 Ph pozitifliği). Bu yaklaşık olarak %1 veya daha az olan BCR-ABL1 transkriptlerine (IS) eşdeğerdir. Major moleküler yanıt, BCR-ABL1 transkriptlerinde (IS) ≤%0,1 veya kabaca, standartlaştırılmış bir taban çizgisinden BCR-ABL1 transkriptlerinde 3-log veya daha fazla azalma anlamına gelir. MR4.5 moleküler yanıt, BCR-ABL1 transkriptlerinde (IS) ≤% 0,0032, kabaca 4,5 log veya daha fazla azalmaya eşdeğerdir.

2.2.9. Tedavi

Hamilelik sırasında teşhis edilen KML vakaları hariç, birinci basamak tedavi bir TKİ'ye dayanmaktadır. KML tanısının moleküler ve sitogenetik doğrulanması beklenirken, yüksek beyaz kan hücresi veya trombosit sayısı olan semptomatik hastalara kısa bir hidroksiüre kürü verilebilir. Güncel olarak, FDA ve EMA tarafından birinci basamak tedavi için dört TKİ onaylanmıştır: imatinib, dasatinib, nilotinib ve bosutinib. Bunlar, endikasyonlarda, dozlamada ve geri ödemede bazı farklılıklar olsa da hemen hemen her yerde bulunabilen ilaçlardır. Beşinci TKİ, radotinib (Supect®, Dae Wong Pharmaceuticals) yalnızca Güney Kore'de onaylanmıştır. Dasatinib, nilotinib, bosutinib ve radotinib, üreticiler tarafından desteklenen randomize çalışmalarla imatinib'e karşı test edilmiştir. Bu denemelerin sonuçları, bu TKİ'lerin birinci basamak düzenlemede onaylanması için temel oluşturmuştur (76).

İmatinib

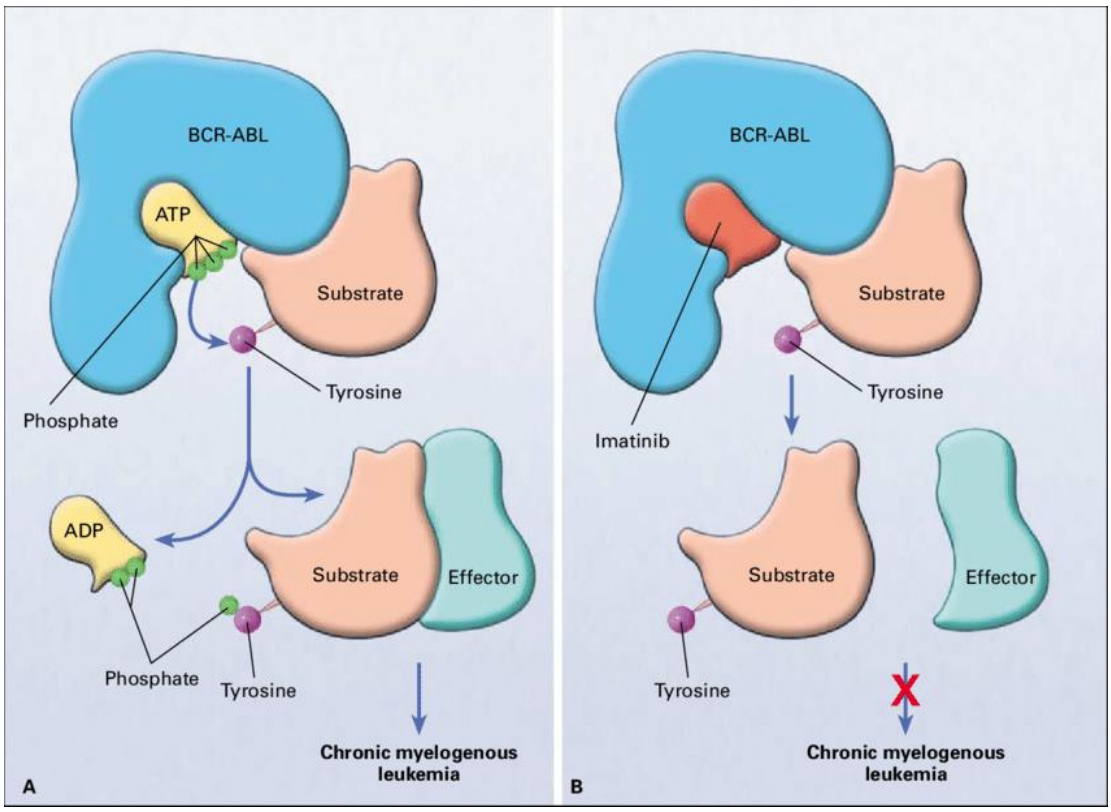
Birinci nesil TKİ olan imatinib, BCR-ABL1'deki kinaz cebini işgal ederek, BCR-ABL'nin etkisini engelleyip substratının fosforilasyonunu önleyerek etkisini gösterir (Şekil 3). Imatinib, IRIS çalışmasında, rekombinant interferon alfa (IFNα) ve düşük doz sitarabin kombinasyonu ile karşılaştırıldığında daha yüksek sitogenetik ve moleküler yanıt oranları ve daha iyi progresyonsuz sağkalım (PFS) ve genel sağkalım (OS) sağlamıştır (77). Imatinib, KML tedavisinde hemen ilk seçenek haline gelmiştir. İmatinib hakkındaki ek bilgiler, diğer akademik prospektif ve retrospektif çalışmalardan ve ayrıca popülasyon tabanlı kayıtlardan elde edilmiştir (78). Imatinib, dasatinib, nilotinib, bosutinib ve radotinib'i test eden altı prospektif çalışmada ve dasatinib'i test eden üç prospektif akademik çalışmada kontrol olarak kullanılmıştır (79). Standart imatinib dozu günde bir kez 400 mg'dır.

2020 yılında KML tedavisinde moleküler yanıt tanımlamaları yapılmıştır (80). BCR-ABL1 <%1 tam sitogenetik remisyona (CCyR) eşdeğerdir. BCR-ABL1<%0.1, tam majör moleküler remisyon (MMR veya MR3) olarak tanımlanmıştır. BCR-ABL1 <%0.01, >10,000 cDNA arasında tespit edilemeyen hastalıktır ve MR4 olarak tanımlanmıştır. BCR-ABL1 <%0.0032, >32000 cDNA arasında tespit edilemeyen hastalıktır ve MR4.5 olarak tanımlanmıştır.

İmatinib tedavisini takiben, 3. ve 6. aylarda erken moleküler yanıt oranları (BCR-ABL1 ≤%10 IS) %60 ile %80 arasında değişmektedir. Bir ve 5 yılda, MMR oranları sırasıyla %20-59 ve %60-80 arasında değişmektedir. 5 yıllık bir DMR (MR4 veya daha derin) elde etme olasılığı %35 ile %68 arasında değişmektedir. İmatinibin başka bir TKİ ile değiştirilme ihtimali, 10 yıl içinde %26,5 iken, 5 yıl içinde %37 ve %50'ye kadar değişmektedir (81). Beş yıllık PFS ve OS sırasıyla % 80–90 ve % 90–95 arasındadır. On yıllık OS % 82-85 arasında değişir ve lösemiye bağlı ölüm oranı yaklaşık %6'dır (82).

İmatinib, düşük kalp ejeksiyon fraksiyonu ve düşük glomerüler filtrasyon hızı olan hastalar için bile mutlak bir kontrendikasyon oluşturmamaktadır ancak bu hastalar için, organ toksisitesi açısından dikkatli izlenmelidir uyarısı bulunmaktadır (82). Düşük toleransın en sık görülen nedenleri erken sıvı tutulumu, gastrointestinal semptomlar, kas krampları, eklem

ağrısı, deri döküntüsü ve yorgunluktur (83). Bu advers olayların çoğu zamanla veya kısa bir ilaç arasından sonra düzelir. MMR'ye ulaşan hastalarda doz azaltımı düşünülebilir (84).



Şekil 3. İmatinib molekülünün BCR-ABL1'e etki mekanizması

Dasatinib

Dasatinib, bir 2GTKI'dır, imatinibden daha güçlüdür ve birkaç imatinibe dirençli BCR-ABL1 mutantına karşı aktiftir. DASISION çalışması [40], günde bir kez 100 mg dasatinib ile günde bir kez 400 mg imatinib'i karşılaştırmış ve minimum 5 yıllık bir takip süresiyle dasatinib ile erken moleküler yanıt oranının (% 84) MMR oranını göstermiştir (81). 1 yıla kadar (% 46), 5 yıllık kümülatif MMR (% 76) ve MR4.5'e (% 42) ulaşma olasılıkları önemli ölçüde daha yüksek, ancak PFS ve OS benzer bulunmuştur. Her iki birincil tedavide de değişme oranı benzerlik göstermiştir; % 39'a karşı % 37. 1-5 yıllık takibi olan üç akademik çalışma benzer veriler bildirmiştir (79).

Dasatinib'in onaylanmış kronik faz dozu, günde bir kez 100 mg ve ileri faz KML için günde iki kez 70 mg'dır. Dasatinib, pleuro-pulmoner toksisiteye sahiptir, bu nedenle solunum yetmezliği ve önceki veya eşlik eden plöro-pulmoner veya perikardiyal hastalıklar, birinci basamak tedavi olarak dasatinib kullanımı için güçlü kontrendikasyonlardır. Kronik komplikasyonlar arasında, hastaların %37'sinde, yıllar sonra komplike olmayan tedaviden sonra bile ortaya çıkabilen plevral efüzyonlar yer alır. Nadiren pulmoner arteriyel hipertansiyon görülür (81).

Nilotinib

İmatinibden daha güçlü olan başka bir 2GTKI olan Nilotinib, birkaç imatinibe dirençli BCR-ABL1 mutantını inhibe eder. ENESTnd çalışması, günde iki kez 300 mg nilotinib ile günde bir kez 400 mg imatinib'i 10 yıllık takip süresiyle karşılaştırmıştır (85). Nilotinib tedavisini takiben, MMR'ye ulaşmak için 5 ve 10 yıllık kümülatif olasılıklar sırasıyla % 77 ve % 82.6, MR4 (% 66 ve % 73) ve MR4.5 (% 54 ve% 64) idi. Bu sonuçlar imatinib ile karşılaştırıldığında, belirgin olarak daha iyi olmasına rağmen, yine de 5 ve 10 yıllık OS benzer bulunmuştur. Birincil tedaviyi değiştirme oranları nilotinib için %40 ve imatinib için %50 olarak bildirilmiştir.

İlk basamak tedavide onaylanan nilotinib dozu günde iki kez 300 mg ve birinci basamak tedavinin ötesinde günde iki kez 400 mg'dır.

Kardiyovasküler olaylar, 10 yıllık bir dönemde nilotinib kullanan hastaların yaklaşık %20'sinde, imatinib kullananların ise %5'inde oranında meydana gelmiştir (80). Koroner kalp hastalığı, serebrovasküler kazalar veya periferik arteriyo-oklüzif hastalık öyküsü, nilotinib'in birinci basamak tedavisi için güçlü kontrendikasyonlardır. Hipertansiyon, hiperkolesterolemi ve diabetes mellitus hastaları da yüksek risk altında olabilir ve tedavi edilen hastaların yaklaşık %5'inde pankreatit bildirildiği için, pankreatit öyküsü de nilotinib kullanımına karşı bir kontrendikasyonu temsil eder (80).

Bosutinib

Bosutinib, imatinibden daha güçlü olan üçüncü 2GTKI'dır. Ayrıca birkaç BCR-ABL1 mutantını da inhibe eder. BFORE tescil çalışması, her biri günde bir kez 400 mg olarak bosutinib ile imatinib'i karşılaştırmıştır. 2 yıllık bir medyan takipten sonra, bosutinib ile

erken moleküler yanıt oranı (%75) ve 1 yıllık MMR oranı (%47) imatinibe göre anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (86). İlgili komorbidite ve güçlü kontrendikasyon tanımlanmamıştır. Tipik olarak geçici ishal, hastaların %30 kadarında görülmüştür. Transaminazlarda geçici yükselme, çoğunlukla tedavinin ilk haftalarından ilk aylarına kadar meydana gelebilir.

Interferon α

TKİ öncesi dönemde, tercih edilen tedavi IFNa idi. Daha az sıklıkta uygulama gerektiren ve iyileştirilmiş etkinlik ve tolerabiliteye sahip pegile (PEG) formülasyonların ortaya çıkmasıyla, IFNa, KF-KML'de terapötik bir seçenek olarak yeniden ortaya çıkabilir (87). 2GTKI'lerin PEG-IFNα ile kombinasyonlarının, küçük tek kollu çalışmalarda, tarihsel kontrollerle karşılaştırıldığında faydalı olduğu gösterilmiştir. İmatinib ile kombinasyon halinde PEG-IFNα, iki randomize çalışmada daha derin ve daha hızlı yanıtlar üretmiştir, ancak uzun vadeli sağkalım yararı gösterilmemiştir (88).

Ponatinib

Ponatinib, tüm diğer TKİ'lerden daha güçlü bir üçüncü nesil TKİ'dir. Ponatinib, BCR-ABL1 T315I mutasyonu olan hastalar ve iki veya daha fazla TKİ'ye dirençli KML'si olan hastalar için onaylanmıştır (89). Spesifik mutasyonları olmayan 2GTKI'ye dirençli hastalarda, kardiyovasküler risk faktörleri kullanımını engellemedikçe, alternatif bir 2GTKI yerine ponatinib tercih edilir. FDA onaylı ponatinib dozu günde bir kez 45 mg'dır. Kardiyovasküler toksisite, alıcıların yaklaşık %30'unda meydana gelebilir ve dozla ilişkili olabilir; panel, daha az dirençli veya çoklu intoleransı olan, özellikle artmış kardiyovasküler risk profiline sahip hastalar için daha düşük bir dozla başlamayı tavsiye eder (90).

2.3. MikroRNA (miRNA)

2.3.1. Tanım

MikroRNA'lar (miRNA'lar) yaklaşık 22 nükleotid- (nt) -uzunlu, küçük düzenleyici kodlamayan RNA'lardır (ncRNA'lar) (91, 92). Bilinen ilk miRNA, 1993 yılında C. elegans'da tanımlanmıştır (93). MiRNA araştırması daha sonra 1998'de [5] RNA interferansının (RNAi) ve 2001'de çeşitli türlerde benzer endojen küçük RNA'lar için yoğun moleküler araştırmaların keşfi ile hızlanmıştır (94, 95). Şimdiye kadar, sırasıyla insanlarda ve farelerde 1800 ve 1100'den fazla miRNA geni bildirilmiştir (96). Ayrıca miRNA'lar, dizi tamamlayıcılığı yoluyla, çoklu hedef mRNA'ları tanıyarak ve (tipik olarak) hedef RNA'ları bastırarak çeşitli türlerde gen ekspresyonunun transkripsiyon sonrası düzenlemesine aracılık eder. Çok sayıda çalışma miRNA'ların gelişim, normal fizyoloji ve hastalıkta yaygın önemini göstermiştir (97).

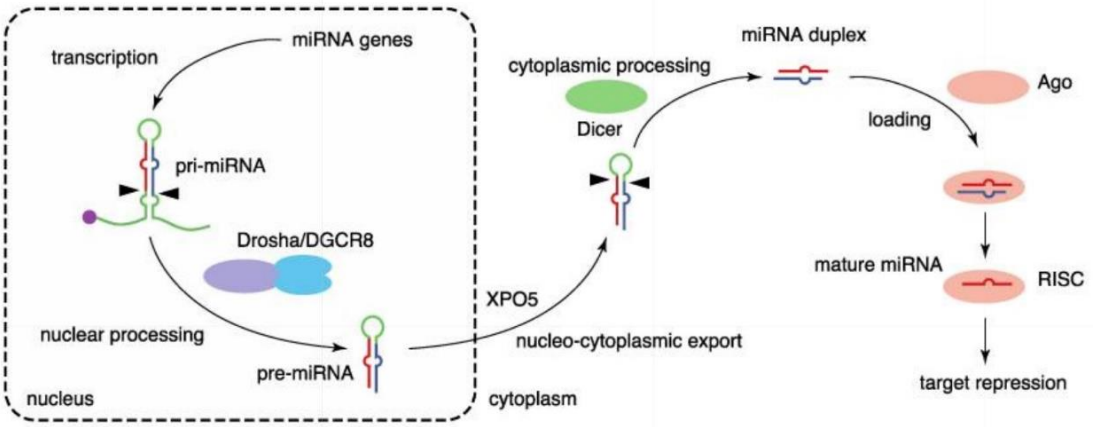
2.3.2. MiRNA Biyogenezi

MiRNA biyogenezi, RNA polimeraz II/III transkriptlerinin post- veya birlikte transkripsiyonel olarak işlenmesiyle başlar (8). Halihazırda tanımlanmış tüm miRNA'ların yaklaşık yarısı intrageniktir ve çoğunlukla intronlardan ve nispeten az sayıda protein kodlayan genin eksonundan işlenirken, geri kalanı intergeniktir, bir konak genden bağımsız olarak kopyalanır ve kendi promotörleri tarafından düzenlenir (98). Bazı miRNA'lar, benzer orjin bölgelerine sahip, küme adı verilen uzun bir transkript olarak yazılır ve bir aile olarak kabul edilirler (99). MiRNA'nın biyogenezi kanonik ve non-kanonik yollar olarak sınıflandırılır.

Kanonik biyogenez yolu, miRNA'ların işlendiği baskın yoldur. Bu yolda, pri-miRNA'lar genlerinden transkribe olur ve daha sonra bir RNA bağlayıcı protein DiGeorge Sendromu Kritik Bölge 8 (DGCR8) ve bir ribonükleaz III enzimi, Drosha tarafından pre-miRNA'lara işlenir (100). DGCR8, bir N6-metiladenile edilmiş GGAC'yi ve pri-miRNA içindeki diğer motifleri tanır, Drosha ise pri-miRNA'nın karakteristik hairpin yapısının tabanındaki pri-miRNA dupleksini ayırır (101). Bu, pre-miRNA'da 2 nt 3 ′ çıkıntının oluşmasıyla sonuçlanır. Pre-miRNA'lar oluşturulduktan sonra, exportin 5 (XPO5) / RanGTP kompleksi ile sitoplazmaya aktarılır ve daha sonra RNase III endonükleaz Dicer tarafından işlenir (102).

Bu işlem, terminal loop'un çıkarılmasını içerir ve olgun bir miRNA dupleksiyle sonuçlanır (Şekil 4). MiRNA zincirinin yönü, olgun miRNA formunun adını belirler. 5p ipliği, pre-miRNA hairpin'in 5 'ucundan doğarken, 3p ipliği 3' ucundan çıkar. Olgun miRNA dupleksinden türetilen her iki iplik de ATP'ye bağımlı bir şekilde Argonaute (AGO) protein ailesine yüklenebilir (103). Hiçbir uyumsuzluk içermeyen miRNA'nın passenger zincirleri AGO2 tarafından ayrılır ve güçlü bir dizi afinitesi üretebilen hücresel makine tarafından bozulur. Ayrıca, merkezi uyumsuzlukları olan miRNA dupleksleri ve AGO2 yüklü olmayan miRNA'lar pasif olarak çözülür ve bozulur (104).

Bugüne kadar, çok sayıda kanonik olmayan miRNA biyogenez yolu aydınlatılmıştır. Bu yollar, temel olarak Drosha, Dicer, exportin 5 ve AGO2 olmak üzere, kanonik yolda yer alan proteinlerin farklı kombinasyonlarını kullanır. Genel olarak, kanonik olmayan miRNA biyogenezi, Drosha / DGCR8'den bağımsız ve Dicer'den bağımsız yollara gruplandırılabilir. Drosha / DGCR8'den bağımsız yol tarafından üretilen pre-miRNA'lar, Dicer substratlarına benzer. Bu tür pre-miRNA'lara bir örnek, ekleme sırasında mRNA'nın intronlarından üretilen mirtronlardır (105). Diğer bir örnek, 7-metilguanosin (m7G) -kapaklı pre-miRNA'dır. Bu yeni oluşan RNA'lar, Drosha klevajına gerek kalmadan doğrudan dışarı aktarma 1 yoluyla sitoplazmaya aktarılır. Argonaute'e 5p ipliğin yüklenmesini önleyen m7G kapağı nedeniyle büyük olasılıkla güçlü bir 3p iplik eğilimi vardır . Öte yandan, Dicer'dan bağımsız miRNA'lar, Drosha tarafından endojen kısa saç tokası RNA (shRNA) transkriptlerinden işlenir. Bu pre-miRNA'lar, Dicer-substratları olmak için yeterli uzunlukta olmadıklarından, sitoplazma içinde olgunlaşmalarını tamamlamak için AGO2'yi gerektirir (106). Bu da tüm pre-miRNA'nın AGO2'ye yüklenmesini ve 3p ipliğin AGO2'ye bağlı dilimlenmesini teşvik eder. 5p ipliğin 3′-5' kırpılması olgunlaşmalarını tamamlar (107).



Şekil 4. miRNA transkripsiyonundan hedef mRNA'nın baskılanmasına kadar olan süreç (108).

2.3.3. Biyolojik Görevleri

MiRNA'ların, translasyonel baskılamayı ve mRNA deadenilasyonunu ve kapaklarını ayırmayı indüklemek için hedef mRNA'larının 3′ UTR'sindeki belirli bir diziye bağlandıklarını gösterilmiştir (109). MiRNA bağlanma bölgeleri, 5′ UTR ve kodlayan dizi de dahil olmak üzere diğer mRNA bölgelerinde ve ayrıca promoter bölgelerinde tespit edilmiştir. MiRNA'ların 5′ UTR'ye ve kodlama bölgelerine bağlanması, gen ekspresyonu üzerinde susturucu etkilere sahipken, promoter bölge ile miRNA etkileşiminin transkripsiyonu indüklediği bildirilmiştir (110). Bununla birlikte, bu tür bir etkileşim tarzının işlevsel önemini tam olarak anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Minimal miRNA kaynaklı susturma kompleksi (miRISC), kılavuz dizi ve AGO'dan oluşur. MiRISC'nin hedef özgüllüğü, miRNA yanıt öğeleri (MRE'ler) olarak adlandırılan hedef mRNA üzerindeki tamamlayıcı dizilerle etkileşiminden kaynaklanmaktadır. MRE'nin tamamlayıcılık derecesi, hedef mRNA'nın AGO2'ye bağlı parçalanmasını veya miRISC aracılı translasyon inhibisyonunu ve hedef mRNA bozulmasını belirler. Tamamen tamamlayıcı bir miRNA MRE etkileşimi AGO2 endonükleaz aktivitesini indükler ve mRNA parçalanmasını hedefler (111). Bununla birlikte, bu etkileşim AGO ile miRNA'nın 3′ ucu arasındaki ilişkiyi bozarak degradasyonunu teşvik eder (112).

Hayvan hücrelerinde miRNA, MRE etkileşimlerinin çoğu tam tamamlayıcı değildir. Çoğu MRE, AGO2 endonükleaz aktivitesini engelleyen kılavuz miRNA'sına en azından merkezi

uyumsuzluklar içerir. Sonuç olarak, AGO2, endonükleolitik olmayan AGO ailesi üyelerine (insanlarda AGO1, 3 ve 4) benzer şekilde, RNA interferansının bir aracısı olarak hareket eder. Çoğu durumda, fonksiyonel bir miRNA:MRE etkileşimi 5 'seed bölgesi (nükleotidler 2-8) aracılığıyla gerçekleşir. Bununla birlikte, 3' ucundaki ek soyma, miRNA-hedef etkileşiminin kararlılığına ve özgüllüğüne yardımcı olur (113).

MiRNA'lar tarafından gen ekspresyonunun up regülasyonu, oositler gibi hareketsiz hücrelerde de gözlenmiştir. Translasyonun miRNA aracılı aktivasyonu GW182 yerine AGO2 ve FXR1'i içerir (114). MiRNA'lar tarafından gen aktivasyonunun diğer örnekleri, amino asit açlığı sırasında ribozomal proteinleri kodlayan mRNA'ların 5′ UTR'sine bağlanmayı içerir; bu nedenle, gen ekspresyonunun miRNA aracılı up regülasyonunun spesifik koşullar altında gerçekleştiğini gösterir.

Importin-8 veya Exportin-1 aracılığıyla insan AGO2, çekirdek lokalizasyonu ve eksport sinyali içeren TNRC6A ile etkileşimiyle çekirdek ve sitoplazma arasında mekik dokur (59). Nükleer lokalize miRISC'nin hem transkripsiyonel oranları hem de transkripsiyon sonrası mRNA seviyelerini düzenlediği ve aktif transkripsiyonlu gen lokuslarında ökromatin ile ilişkili olduğu bulunmuştur (62). Bununla birlikte, miRNA'ların çekirdekte işlevlerini ne zaman ve nasıl gerçekleştirdiklerine dair bilgilerimiz sınırlıdır.

MiRNA aracılı gen düzenlemesinin dinamik olduğu ve gen ifadesini kararlı bir duruma tamponlamaya yardımcı olduğu ortaya konulmuştur. Ancak son zamanlarda miRNA dinamiklerinin daha kapsamlı bir şekilde anlaşılması, miRNA aracılı gen regülasyonunun doğasına ışık tutmaya başlamıştır. MiRNA aracılı gen regülasyonunun sağlamlığına katkıda bulunabilecek faktörler arasında miRISC'nin işlevselleştirilmiş bölümlere ayrılması ve hücreler içinde yer değiştirmesi yer alır. MiRNA'ların ve bunların hedef mRNA'larının mevcudiyeti ve bolluğu da hangi genlerin regüle edildiğinin belirlenmesine katkıda bulunan faktörlerdir. Bu her zaman böyle olmasa da, mRNA hedeflerinin miRNA baskılanması, hücre türleri arasında her yerde bulunmaz.

Birçok çalışma, plazma ve serum, beyin omurilik sıvısı, tükürük, anne sütü, idrar, gözyaşı, kolostrum, periton sıvısı, bronşiyal lavaj, seminal sıvı ve yumurtalık foliküler sıvısı gibi biyolojik sıvılarda hücre dışı/dolaşan miRNA'ları tespit etmiştir. Hücresel RNA türlerinin

aksine, hücre dışı miRNA'lar oldukça stabildir, oda sıcaklığında 4 güne kadar bozulmaya ve kaynama, çoklu donma-çözülme döngüleri ve yüksek veya düşük pH gibi zararlı koşullarda bozulmaya dirençlidirler (115).

2.3.4. Neoplazik Süreçlerdeki Rolleri

MikroRNA deregülasyonu ile kanser arasındaki ilişkinin ilk göstergesi, Croce ve ekibinin yaptığı bir çalışmada ortaya çıkarılmıştır. MiR15a/16-1 kümesinin kronik lenfositik lösemide (KLL) sıklıkla delesyona uğradığını bulmuş ve bu iki mikroRNA'nın bir tümör supresör aktiviteye sahip olduğu sonucuna varmışlardır (116). Bu ilk çalışmadan sonra kanserde deregüle olan çok sayıda mikroRNA bulunmuştur. Çoğu zaman miRNA'ların kanserde ekspresyonları normal dokulara kıyasla azalmaktadır, ancak aşırı eksprese edilenleri de vardır. Örneğin miR-155 ve miR-21'in transgenik ekspresyonu, farelerde lenfomagenezi indüklemek için yeterli olmuştur (117). Son yıllarda, birçok araştırma grubu hedeflerini kanserde mikroRNA'ların anormal ifadesinin araştırılmasına odaklamıştır; 2004'te Calin ve ekibi tarafından, genomik bölgelerdeki mikroRNA haritalarının yarısının kanserde sıklıkla değiştiği gösterilmiştir (118). Daha önce bahsedildiği gibi, mikroRNA ve kanser arasındaki korelasyonun ilk örneği, Leu2 geninin ekson 2 ve ekson 5'i arasında bulunan miR-15a ve miR-16-1'i içeren bölgenin, KLL'de sıkça silinen bir genomik bölge olduğunun keşfi olmuştur. MikroRNA'ların anormal ekspresyonuna ve dolayısıyla kansere yol açabilen bir başka mekanizma, Drosha ve Dicer gibi mikroRNA'ların biyogenezinde yer alan enzimlerin değiştirilmiş ekspresyonu ve/veya işlevidir. Örneğin, over kanseri hastalarının %39'unda Drosha ve Dicer'ın ekspresyon seviyesi düşük bulunmuştur (119). MikroRNA promoterlerinin anormal epigenetik değişiklikleri, metilasyon durumları veya histon paternlerinin değişmesinin de mikroRNA ekspresyon seviyelerinde değişikliklere neden olduğu görülmüştür (120). Tümör baskılayıcı genlerin epigenetik baskılanmasının kanserdeki rolü literatürde ayrıntılı bildirilmiştir ve tümör baskılayıcı mikroRNA miR-127'nin primer prostat kanseri ve mesane tümörlerinde epigenetik baskılanması, miR-127'nin doğrudan hedefi olan proto-onkojen BCL6'nın upregulasyonuna sebep olmuştur (121). MikroRNA'lar, epigenetik kontrolden sorumlu enzimlerin ekspresyonunu değiştirerek hücresel metilasyon durumunun düzenlenmesinde baş rolü oynayabilmektedir. Örneğin

akciğer kanserinde ex-novo DNA metiltransferazlar; DNMT3a ve DNMT3B ekspresyonunun kontrolünden, miR-29 ailesinin sorumlu olduğu tanımlanmıştır (122).

P53 kaybının kanserde en çok görülen genetik anormalliklerden biri olduğu düşünüldüğünde, miR-34a ailesi ile p53 arasındaki bağlantı, miRNA transkripsiyon düzenlemesinin önemli bir başka örneği olmuştur. P53, miR-34 ailesinin transkripsiyonunu uyararak apoptoz ve yaşlanmayı indükler. P53 fonksiyonunun kaybı, p53 mutasyonu olan over kanseri hastalarının çoğunluğunda miR-34 ailesinin down regülasyonunu indüklemiştir (123).

MiR-130a ve miR-298'in kanserde mikroRNA'ların önemli bir biyolojik rolü olduğunu düşündürecek şekilde down regüle edildiği gösterilmiştir (124). Bazı durumlarda mikroRNA'ların ilaç direncindeki etkisi dokuya özgüdür. Örneğin miR-27a, over kanserinde ilaç duyarlılığı ile dolaylı olarak ilişkilidir, ancak lösemide ilaç direncinde doğrudan rol oynayabilir (125). MikroRNA'lar, küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (NSCLC) vasküler endotelyal büyüme faktörü A'yı (VEGFA) doğrudan hedefleyen miR-126 için gösterildiği gibi, bir ilacın moleküler hedeflerinin ekspresyonunu da etkileyebilir. VEGFA, anjiyogenez inhibitörü bevacizumab'ın hedefidir ve bevacizumaba dirençli hücrelerde miR-126 restorasyonunun, ilaç duyarlılığını geri kazandırabildiği gösterilmiştir (126). Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR/HER1), mutasyonu bir hücre büyüme sinyalinin otonom indüksiyonu ile sonuçlanan bir tirozin kinaz membran reseptörüdür.

Son yıllarda literatürde, mikroRNA'ların pratik olarak her tür kanser ve malignitede yer aldığına dair birçok kanıt sunulmuştur. Mikrodizin analizi ve yeni nesil dizileme (NGS) gibi yeni teknolojiler, tümörlerde bu küçük kodlamayan RNA sınıfının tüm ekspresyon profilini inceleyerek mikroRNA'lar ve kanser arasındaki ilişkiyi kapsamlı bir şekilde incelememizi sağlamıştır; 2005 yılında Volinia ve ark. altı insan solid tümörünün miRNA profilini tanımlamak için bir mikrodizin platformu kullanmıştır. Normal dokuyu tümör dokusuyla karşılaştırarak elde edilen sonuçta, mikroRNA'ların kanserde sadece downregüle olduğu şeklindeki yaygın fikrin yanlış olduğunu ortaya çıkarılmıştır. Çünkü miR-21, miR-17-5p ve miR-191 bazı tümörlerde aşırı ifade edilmektedir (127). Zamanla, daha doğru ve hassas mikroRNA ekspresyon profillemesi gerçekleştirilmiştir ve mikroRNA ekspresyon profilinin tümör tipinin embriyonik veya gelişimsel kökenini yansıttığı ve mikroRNA ekspresyonuna

dayalı tümör sınıflandırmasını doğru bir şekilde yapılabildiği gösterilmiştir. 22 farklı tümör tipi üzerinde yapılan bir çalışma, bir mikroRNA ekspresyon profilinin, tümörleri menşe dokuya göre %90'dan daha yüksek bir doğrulukla sınıflandırabildiğini göstermiştir (128). MikroRNA'ların kanser ilerlemesinde de bir rolü olduğu ve hastalarda metastatik sonucun tahmin edilmesinde yararlı olabileceği gösterilmiştir (129). Henüz tedavide karar vermede kullanılmamasına rağmen, mikroRNA'lar, çeşitli çalışmalarda tedavi seçiminde biyobelirteç olarak kabul edilmiştir. Örneğin, miR-145 ekspresyon seviyeleri, tanı anında ve tedavi sırasında KML'de BCR-ABL seviyeleri ile ters orantılı bulunmuştur (Scholl ve ark., 2012) ve bu nedenle tedavi sırasında tedaviyi düzenlemek için kullanılabileceği düşünülmüştür. Son zamanlarda, over kanserinde kemorezistansı öngörebilen bir mikroRNA profili çıkarılmıştır (130).

Kanserde ilaç tedavisi, hasta sağkalımını artırmış ve ölüm oranlarını azaltmıştır. Bununla birlikte, hedef özgüllüğü daha fazla olan yeni ilaçların geliştirilmesine de ihtiyaç vardır. MikroRNA'ların kanserde terapötik uygulanması, malignitelerin moleküler mekanizmasına müdahale etmek için yeni ve heyecan verici bir yaklaşımdır. MikroRNA'ların kanserdeki ilk uygulaması, tekli veya çoklu mimik mikroRNA'ların (doğal olmayan çift sarmallı miRNA benzeri RNA fragmanları) bir grup tümör hücresine normal ekspresyon profilini yeniden oluşturmak ve fonksiyon kaybını gidermek için tekrar verilmesi şeklinde olmuştur (131). Farklı genleri hedefleyebilmek için çok bölgeli/çok hedefli yapay mikroRNA'ların (amiRNA'lar) tasarımı için yeni in-siliko araçların geliştirilmesi, amiRNA tedavisinin başarılı bir şekilde kullanılmasında son derece yararlı olabilecektir (132). Bu araç, birden fazla hedefin inhibisyonu için birkaç molekülün kullanılmasına izin vererek siRNA kullanımına bir alternatif temsil eder. Bu, nanopartiküller ve viral sistemler gibi küçük RNA'ların hücre içi iletimi için taşıyıcıların geliştirilmesindeki son gelişmelerle birleştirildiğinde, bu umut verici teknolojiye dayalı terapötiklerin kurulması hayal edilebilmiştir.

MikroRNA'ların terapötik araçlar olarak uygulanması için bir başka strateji, miRNA antagonisti kullanarak onkojenik miRNA'ları inhibe etmektir. Bu tür anti-miR'ler veya antagomir miRNA antagonistleri, 21-23 nükleotid uzunluğunda tek sarmallı RNA

moleküllerdir ve hedef miRNA'ların işlevlerini komplementer hibridizasyon yoluyla inhibe edebilmiştir (133).

2.3.5. KML ve miRNA'lar

KML'de miRNA'lar, BCR-ABL1 füzyon genini hedefleyebilir veya bunun için bir hedef olabilir, TKİ'lerin tedavisinde potansiyel bir kullanıma sahip olabilir veya epigenetik olarak modifiye edilebilir. KML'de henüz tedavi ya da prognostik değeri olan miRNA bulunamamıştır. Bu alanda oldukça fazla çalışma yapılmaktadır. BCR-ABL molekülü ile ilişkili yolaklarda rol alan miR-23a, miR-138, miR-181, 152-3p ve miR-101 ile ilgili daha önceki çalışmalar ile elde edilen bilgiler aşağıda yer almaktadır:

miR-23a

KML hasta örneklerinde miR-23a ekspresyounun normal insanların örneklerine göre düşük düzeyde olduğu, miR-23a 'nın etki mekanizmasının KML ile ilişkili SALL4, RAS, ve HOXA9 onkogenlerini hedeflediği gösterilmiştir. Target Scan Human ve miRGen yazılımları ile miR-23a'nın büyük olasılıkla BCR/ABL'in 3′-untranslate bölgesine (UTR) bağlanarak ekspresyonunu düzenlediği tahmin etmiştir. BCR-ABL geninin ekpresyonunun miR-23a ile transfekte K562 hücrelerinde kontrol grubuna göre düşük düzeyde olduğu gösterilmiştir (134). İmatinib tedavisinin ve trandüksiyon ile sağlanan miR-101 upregülasyonunun miR-23a aşırı ekspresyonuna yol açtığı ve BCR-ABL+ imatinib dirençli hücrelerde apoptozu indükleyen Jak2 mRNA düzeylerini düşürdüğü gösterilmiştir (135). Bu çalışmalarda miR-23a'nın yeni tanı alan ve remisyondaki hastalardaki düzeyleri gösterilmiş, fakat TKİ direnci gösteren hastaların örneklerindeki düzeyleri gösterilmemiştir. Çalışmamızda TKİ direnci olan hastalara da bakılmış ve miR-23a'nın KML prognozundaki önemi daha iyi anlaşılmıştır.

mir-138

MiR-138 omurgalılar arasında oldukça korunmuştur ve organogenezde rol oynadığı gösterilmiştir. Tiroid kanseri, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu, oral skuamöz hücreli karsinom ve dil skuamöz hücreli karsinomu dahil olmak üzere birçok tümörde miR-

138'in down regülasyonu sıklıkla gözlenmiştir (136). Belirgin bir şekilde, ZEB2, EZH2 ve hTERT dahil olmak üzere birçok onkojenin, hücre hatlarında miR-138 tarafından düzenlendiği bildirilmiştir. Bu bulgular, miR-138'in bir tümör süpresör olarak tümör oluşumunda ve ilerlemesinde önemli rollere sahip olduğunu göstermiştir.

MiR-138'in, KML'de down regüle olduğu, transfeksiyon ile aşırı ekspresyonunun, K562, Ku812 hücrelerinin ve KML hastalarının kemik iliği mononükleer hücrelerinin klonojenik büyümesinin inhibisyonuna yol açtığı görülmüştür. Ayrıca BCR-ABL ve CCND3 miR-138'in doğrudan hedef genleri olarak ve GATA1 miR-138 ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörü olarak belirlenmiştir. Bu bulgular, KML'de BCR-ABL, GATA1, miR-138 ve CCND3'ü içeren karmaşık bir moleküler ağın varlığını göstermiştir (137). Çalışmamızla KML hastalarında imatinib tedavisine yanıt veren ve direnç gösteren örneklerden ekspresyon analizi yapılarak miR-138'in KML oluşumu ve ilerleyişi hakkında detaylı bilgi edinilmiştir.

miR-181a

Fare kemik iliğindeki B hücrelerinde spesifik olarak eksprese olan bir miRNA olan miR-181, hematopoietik kök / progenitör hücrelerde eksprese edildiğinde B hücresi farklılaşmasını indüklediği gösterilmiştir (138). Bu çalışma ile mir-181'in hücre diferansiyasyonunda rol aldığı görülmektedir. Bir başka çalışmada AML hastalarının kemik iliği örneklerindeki mir-181 seviyeleri tanı aşamasında, tam remisyondakilere kıyasla anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (139). Başka bir çalışmada miR-181'in AML'de önemli bir rol oynadığı ve ileri yaşlı AML hastalarında azasitidin tedavisine yanıtı belirlediği ve böylece bir prognostik biyobelirteç olabileceği gösterilmiştir (140). TargetScan ve miRNAmap yazılımlarının tahminlerinin kombinasyonu, BCR-ABL ile aynı yolakta yer alan SOS1'in miR-181a'nın varsayılan hedef genleri arasında olduğunu ileri sürmüştür (141). Bir çalışma, KML K562 hücrelerinde miR-181a'nın lentiviral trandüksiyon ile sağlanan aşırı ekspresyonunun, bu hücrelerin imatinib'e kemoterapötik duyarlılığını arttırdığını göstermiştir (142).

mir-152-3p

K562 hücre serisinde ve KML hastalarının kemik iliğinde mir-152-3p yüksek düzeyde bulunmuştur, ayrıca mir-152-3p'nin downstream proteini p27'nin ekspresyonunu inhibe ederek K562 hücrelerinin proliferasyonunu ve hücre döngüsüne girişini teşvik etmiştir. Ek olarak, hücre apoptozunu inhibe ettiği gösterilmiştir (143). BCR-ABL1 kinaza bağımlı veya bağımsız mekanizmalar, p27'yi bir nükleer tümör supresörden bir sitoplazmik onkojene dönüştürmektedir. TKİ'ler tarafından BCR-ABL1 inhibisyonuna rağmen p27'nin sitoplazmik lokalizasyonunun ilaç direncine sebep olabileceği düşünülmektedir (144). Bu çalışma ile miR-152'nin p27 aracılığıyla KML hücrelerinde proliferasyonu sağlayan BCR-ABL1 proteinin downstream yolaklarıyla ilişkisi incelenmiştir.

mir-101

Bcr-Abl onkoproteini tarafından aktive edilen Jak2 tirozin kinazın Bcr-Abl aracılı onkojenisitede önemli bir rolü bulunmaktadır (145). Lu Wang, mir-101'in Jak2 yi hedefleyerek tümor hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığını ve meme kanserinde apoptozu engellediğini göstermiştir (146). Bir çalışmada mir-101'in K562 hücrelerinde imatinib direncine etkisi araştırılmıştır ve mir-101 artışının ilaç direncini Jak2 yolağı üzerinden azalttığı ortaya konulmuştur (146). Bu çalışmalar ile mir-101'in BCR-ABL1'in downstream yolakları ile ilişkili olduğu düşünülmüştür.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Planı

Bu çalışma bir vaka-kontrol çalışması olarak planlanmıştır ve Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul'undan 07-39 nolu 07.11.2019 tarihli onay alınmıştır. Çalışmaya Eylül 2020-Şubat 2021 tarihleri arasında Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda rutin olarak genetik test yaptıran hastalardan KML tanılı klinik ve moleküler bulguları olan 50 hasta dahil edilmiştir. Kontrol grubunda ise kriterleri karşılayan 50 sağlıklı gönüllü yer almıştır.

Çalışmaya Alınma Kriterleri (Hasta grubu için)

- Kronik myeloid lösemi tanısını ve en az 6 ay imatinib (TKİ) tedavisini almış olmak
- İmatinib tedavisine cevap veren 25 vaka için; 6. ayda veya sonrasında BCR-ABL1 ≤ %1 olmak
- İmatinib tedavisine cevap vermeyen 25 dirençli vaka için; 6. ayda veya sonrasında BCR-ABL1 > %10 olmak
- 25-95 yaş aralığında olmak
- Bu çalışmaya katılmayı kabul etmek ve onam formunu imzalamış olmak

Çalışmaya Alınmama Kriterleri (Hasta grubu için)

- KML haricinde bir başka neoplazi öyküsü olmak
- Sistemik bir enfeksiyonu olmak veya genel durumu kötü olmak
- Hamile ya da laktasyonda olmak

Sağlıklı kontrol grubu için kriterler;

- 25-95 yaş aralığında olmak ve herhangi bir akut ya da kronik hastalığı olmamak

Çalışma ile ilgili bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu doldurup imzalayan, çalışmaya katılmayı ve örnek vermeyi kabul eden hastalardan ve gönüllülerden, EDTA'lı tüplere 3'er ml periferik kan örneği alınmıştır, yaş-cinsiyet gibi demografik özellikler kaydedilmiştir.

Bu hastalara ait imatinib kullanımı sonrası BCR-ABL1 düzeyleri incelenerek imatinib direnci gelişip gelişmediği belirlenmiştir. Hangi TKİ kullanıldığı ve ABL1 geni

mutasyonları not edilmiştir. Hastalar TKİ yanıtlı (S) ve TKİ dirençli (R) olmak üzere iki ayrı grupta sınıflandırılmıştır.

3.2. MikroRNA Analizi

3.2.1. Total RNA İzolasyonu

EDTA'lı tüplere alınmış kanlar bekletilmeden işleme alındı. Total RNA eldesinde miRNeasy Mini Kit 50 (QIAGEN) üreticinin talimatları doğrultusunda kullanıldı. Kit içeriğine ek olarak Eritrolizis Tampon kullanıldı.

Tablo 1. miRNeasy Mini Kit (QIAGEN) içeriği (50 reaksiyonluk)

miRNeasy Mini Kit (QIAGEN)	
QIAzol ®	50 ml
RWT Tamponu	15 ml
RPE Tamponu	11 ml
RNaz İçermeyen Su	10 ml

Aşağıda RNA izolasyonu aşamaları sıralanmıştır:

1- Falkon tüpü içerisinde 2 ml periferik kan ve 10 ml Tampon Eritrolizis Buffer eklenerek vortekslendi.
2- Elde edilen karışım 10 dk buz üzerinde inkübe edildi ve inkübasyon sırasında 2 kez vortekslendi.
3- Daha sonra 4ºC'de 10 dakika 400xg'de santrifüjlendi ve süpernatant kısmı atıldı. Bu aşamada pellet oluşumu gözlendi.
4- Pellet üzerinde kırmızı renk veren eritrositleri uzaklaştımak için Tampon Eritrolizis (kullanılan periferik kan hacminin 2 katı kadar) eklenerek kısa vorteks yapıldı.
5- 400 x g'de 4ºC'de 10 dakika santrifüjlendi ve süpernatant kısmı atıldı.
6- Pellet üzerine 700 µl QIAzol eklendi ve pipetaj yapıldı, sonrasında 140 µl kloroform eklenerek hızlı bir şekilde karıştırıldı. Üst faz yeni tüpe aktarıldı ve üzerine %100'lük 525 µl etanol eklendi.

7- Yaklaşık 700 µl numune miRNeasy Mini kolona aktarıldı ve oda ısısında 800 x g'de 15 saniye santrifüj edildi. Kolonun altındaki sıvı kısım atıldı.
8- Kolonun üzerine 700 µl Tampon RWT eklenerek oda ısısında 800 x g'de 15 saniye santrifüj tekrarlandı. Kolonun alt kısmında yer alan sıvı tekrar atıldı.
9- Kolona 500 µl Tampon RPE eklendi ve 15 saniye oda ısısında 800 x g'de santrifüj yapıldı. Kolon yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne alınarak 1 dakika yüksek hızda santrifüj edildi.
10- Kolon yeni bir 1,5 ml toplama tüpüne alınarak ve 30-50 µl RNaz içermeyen su eklenerek oda ısısında 800 x g'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
11- Elde edilen RNA'nın konsantrasyonunun ölçümü NanoDrop spektrofotometre (Şekil 5) cihazı ile yapıldı, A260/A280 absorbsiyon oranına bakılarak Total RNA saflığı/kalitesi belirlendi. Uygun kalitede olan izole total RNAlar cDNA dönüşümü için -80 C sıcaklığa alındı.

Şekil 5. Nanodrop spektrofotometre cihazı

3.2.2. cDNA Eldesi

Elde edilmiş total RNA'dan miScript II RT Kit (QIAGEN) üreticinin talimatları doğrultusunda kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. miScript HiSpec tamponu kullanılarak sadece miRNA'ları da içeren küçük boyutlu RNA'lar cDNA'ya dönüştürüldü.

Tablo 2. miScript II RT Kit (QIAGEN) içeriği (50 reaksiyonluk).

miScript II RT Kit (QIAGEN)	
miScript Reverz Transkriptaz karışımı	100 µl
10x miScript Nükleik asit karışımı	200 µl
5x miScript HiSpec tamponu	400 µl
RNaz içermeyen su	1.9 ml

Aşağıda cDNA eldesi aşamaları sıralanmıştır:

1- Elde edilen RNA örnekleri buz üzerinde ve RT PCR için gerekli olan diğer kimyasallar oda ısısında çözdürüldü.
2- Her örnek için: 5x miScript HiSpec Buffer 4 µl, 10x miScript Nucleics Mix 2 µl, miScript Reverse Transcriptase Mix 2 µl, 125-250 ng RNA ve RNaz içermeyen sudan konsantrasyona göre ayarlanarak ayrı ayrı tüplere eklendi.
3- Karışım 37ºC'de 60 dakika inkübe edildi.
4- Daha sonra 95°C'de 5 dakika inkübe edildi ve buz üzerine alındı.
5- NanoDrop kullanılarak cDNA konsantrasyonları ölçüldü.
6- Oluşan cDNA, 200 µl RNaz içermeyen suda seyreltildi ve hemen RT PCR ile devam edildi.

3.2.3. qRT-PCR aşaması

miRNA ekspresyon düzeyinin ölçümü için miScript Primer Assay Kit (QIAGEN) üretici talimatları doğrultusunda 50 hasta ve 50 kontrol olmak üzere toplam 100 örnek için kullanıldı. Kit içeriği 2x QuantiTect SYBR Green PCR Karışımı, 10x miScript Universal Primer, 10x miScript Primer Assay, Kalıp cDNA 3 µl (10 ng/ µl) ve RNaz içermeyen sudan oluşmaktadır.

Tablo 3. qRT-PCR için belirlenen malzemeler ve miktarları

Bileşenler	Her örnek için hacim
2x QuantiTect SYBR Green PCR Mix	10 µl
10x miScript Universal Primer	2 µl
10x miScript Primer Assay (Belirlenen primer)	2 µl
Kalıp cDNA	3 µl (10 ng/ µl)
RNaz içermeyen su	3 µl
Toplam	20 µl

PCR verilerinin rölatif kuantifikasyon ile normalizasyonu için SNORD61 PCR kontrolü olarak kullanıldı. Belirlenmiş olan miRNA'lar Rotor Gene® cihazında (Şekil 6) 72'lik platform kullanılarak çalışıldı. PCR çalışmasındaki kalıp cDNA konsantrasyonu tüm örnekler için 10 ng/ µl olarak belirlendi. Real-time qPCR reaksiyonu basamakları ve şartları Tablo 4'de belirtilmiştir.

Tablo 4. qRT-PCR döngü basamakları

Basamak	Sıcaklık	Zaman
PCR Başlangıç Aşaması	95°C	15 dk
Denatürasyon	94°C	15 sn
Bağlanma	55°C	30 sn
Uzama	70°C	30 sn
Siklus Sayısı	40	

RT-qPCR işlemi sonrasında her bir örnek için fluoresan ışıma miktarını gösteren CT (Cycle of threshold) değerleri incelendi. Her bir örneğin ve negatif kontrollerin PCR eğrileri kontrol edilerek veriler analiz edilmek üzere kaydedildi.

Şekil 6. RNA amplifikasyonunda kullanılan Real-Time PCR cihazı (Qiagen Rotor-Gene Q)

3.3. Verilerin analizi

Her bir olgu ve kontrolde negatif kontrole karşı hem hedef miRNA hem endojen kontrol (*SNORD61*) için reaksiyonlar yapıldı. *SNORD61* normalizasyon için referans olarak kullanıldı.

Rotor-Gene® Software, vaka ve kontrol gruplarının *SNORD61*, miR-23a, miR-138, miR-181, miR-152-3p ve miR-101 Ct (cycle thresold) değerleri belirlendi.

Elde edilen veriler kullanılarak miRNA ekspresyon değişiklikleri aşağıdaki gibi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak) yöntemiyle hesaplandı:

Bu metoda göre $2^{-\Delta Ct}$ (ΔCt = CT Hedef Gen – CT Referans Gen) formülü ile referans gen ve hedef genin CT değerleri arasındaki katlı değişimleri (fold change) hesaplandı.

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ ($\Delta\Delta Ct$ = Hasta grubu ΔCt - Kontrol grubu ΔCt) ile hasta ve kontrol grupları arasındaki katlı değişim bulundu.

Çalışma kapsamında veriler tanımlayıcı istatistikler kullanılarak özetlendi. Bu amaçla miRNA ekspresyon düzeyleri için ortalama ± standart sapma [ortanca (minimum-maksimum)] hesaplandı. İstatistiksel anlamlılık için Student-t testi kullanıldı ve istatistiksel anlamlılık $p<0.05$ kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Çalışma gruplarının genel özellikleri

KML hastalarında hsa-miR-23a, hsa-miR-138, hsa-miR-181, hsa-miR-152-3p ve hsa-miR-101 miRNA'larının ekspresyonlarının çalışılabilmesi için Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 07.11.2019 tarihli ve 07-39 no'lu etik kurul kararı ile onay alındıktan sonra Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Hematoloji Bilim Dalında KML tanısı almış, gerekli tetkiklerinin çalışılması için periferik kan veya kemik iliği örnekleri Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalına gönderilen yaşları 26-94 arasında değişen, yaş ortalaması 53,48 olan 23 erkek ve 27 kadın toplamda 50 hasta ve Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Polikliniklerinde yapılan muayene ve tetkikler ile sağlıklı oldukları belirlenmiş yaşları 28-91 arasında değişen, yaş ortalaması 52,2 olan 22 erkek ve 28 kadın toplamda 50 sağlıklı kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edildi (Tablo 5).

Tablo 5. Hastaların tanımlayıcı özellikleri

Veriler /Gruplar	S Grubu (n=25)	R Grubu (n=25)	K Grubu (n=50)	Toplam (n=100)
Kadın	14	13	28	55
Erkek	11	12	22	45
Yaş ortalaması	54,64	52,32	52,2	52,84

Hasta ve kontrol grubu olgularının yaşları ve cinsiyet dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$).

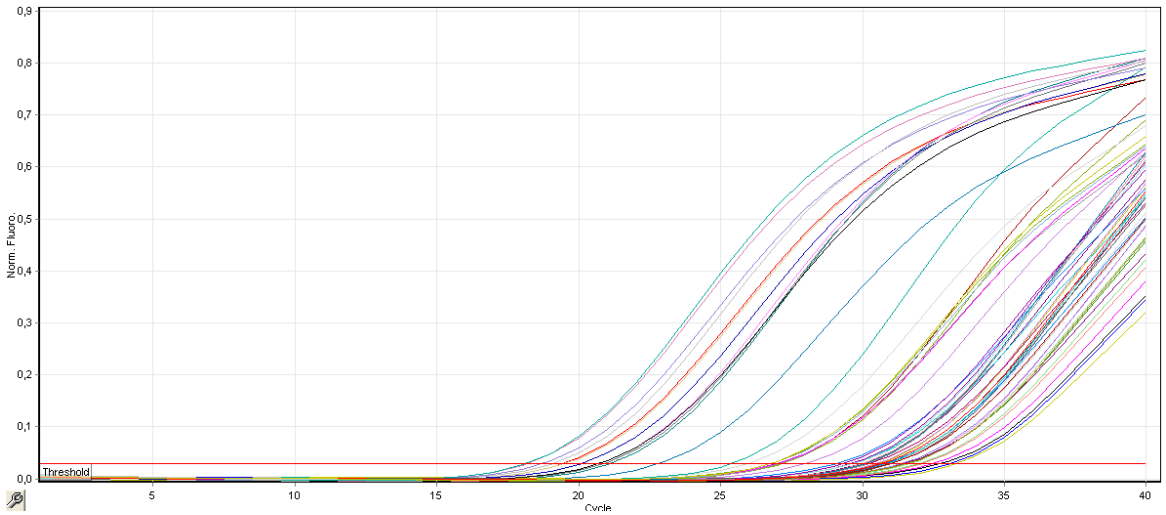
Tablo 6. Hasta grubunda TKİ kullanımı

Gruplar\TKİ	İmatinib	Dasatinib	Nilotinib
S grubu	25	-	-
R grubu	-	13	12

İmatinib tedavisine yanıt vermeyen R grubundaki 25 hastanın 13'ünün dasatinib, 12'sinin ise nilotinib ile kullanımı ile takip edildiği tespit edilmiştir (Tablo 6).

4.2. Ekspresyon analizi bulguları

Çalışmaya dahil edilen hasta kontrol grubu örneklerinin her birinden hsa-miR-23a, hsa-miR-138, hsa-miR-181, hsa-miR-152-3p ve hsa-miR-101 ve normalizasyonda kullanılmak üzere *SNORD61* ekspresyon çalışmaları yapılmıştır ve Ct değerleri Tablo 7,8,9' da belirtilmiştir. RT-qPCR çalışmalarından birine ait amplifikasyon eğrisi Şekil 7'de verilmiştir.



Şekil 7. RT-qPCR amplifikasyon eğrileri

İmatinib tedavisine yanıt veren 25 hastanın bulunduğu S grubunda yapılan PCR çalışmasına ait Ct değerleri hsa-miR-23a, hsa-miR-138, hsa-miR-181, hsa-miR-152-3p, hsa-miR-101 ve SNORD61 için Tablo 7'da ayrı ayrı verilmiştir.

Tablo 7. İmatinib duyarlı (S) grubu için RT-PCR Ct değerleri

	hsa-miR-23a	hsa-miR-101	hsa-miR-138	hsa-miR-152	hsa-miR-181a	SNORD61
S1	25,43	30,44	34,27	32,37	33,08	29,87
S2	23,63	31,87	32,46	31,84	33,12	29,51
S3	24,68	30,64	33,59	33,1	33,4	30,61
S4	22,46	30,81	33,44	32,13	31,19	28,13
S5	20	30,42	34,07	31,17	31,42	27,87
S6	20,65	29,58	33,5	32	32,34	29,17
S7	19,26	31,59	36,24	30,6	30,99	27,67
S8	17,8	26,48	30,75	26,77	24,85	22,37
S9	20,57	30,59	35,69	33,04	32,57	31,07
S10	21,26	29,87	31,07	31,24	30,03	27,44
S11	20,88	30,77	36,07	31,76	33,35	29,87
S12	27,49	33,54	32,45	37,79	37,34	33,83
S13	17,59	31,44	34,81	29,93	30,7	27,85
S14	19,46	32,96	34,83	31,25	32,46	29,67
S15	18,63	29,6	34,12	30,66	31,06	28,41
S16	22,58	31,93	34,86	33,51	33,19	30,07
S17	21,76	31,04	33,15	32,28	33,46	29,05
S18	17,18	32,05	34	30,55	30,23	27,18
S19	18,34	31,03	34,16	30,78	31,32	28,2
S20	20,87	32,44	35,42	32,48	33,38	30,6
S21	17,94	30,87	34,38	30,11	30,05	26,63
S22	16,55	30,01	33,17	27,52	27,37	24,66
S23	20,88	30,26	32,48	32,64	33	29,73
S24	20,88	30,77	36,07	31,76	33,35	29,87
S25	18,56	29,84	33,98	29,45	31,25	29,57

İmatinib tedavisine direnç gösteren içerisinde 25 hastanın bulunduğu R grubunda yapılan PCR çalışmasına ait Ct değerleri hsa-miR-23a, hsa-miR-138, hsa-miR-181, hsa-miR-152-3p, hsa-miR-101 ve SNORD61 için Tablo 8'de ayrı ayrı verilmiştir.

Tablo 8. İmatinib Dirençli (R) grubu için RT-PCR Ct değerleri

	hsa-miR-23a	hsa-miR-101	hsa-miR-138	hsa-miR-152	hsa-miR-181a	SNORD61
R1	25,46	31,5	34,05	33,73	33,48	30,64
R2	23,74	31,69	33,53	32,33	32,36	28,81
R3	20,84	30,75	34,87	29,86	30,25	28,22
R4	17,71	27,17	33,81	27,01	26,15	21,96
R5	21,26	29,37	34,3	29,66	31,4	27,18
R6	18,99	30,11	33,95	29,41	30,98	28,63
R7	19,77	29,06	35,39	30,28	30,3	26,54
R8	20,28	30,22	33,15	31,68	31,21	26,48
R9	20,38	30,55	34,81	31,27	29,11	26,43
R10	18,32	30,02	34,32	30,68	30,97	26,32
R11	17,65	29,59	32,42	28,87	29,87	25,46
R12	18,61	29,62	35,3	30,41	30,33	26,14
R13	16,38	30,03	31,87	29,1	29,12	25,3
R14	19,72	30,04	33,93	30,87	32,15	28,11
R15	16,99	29,9	32,52	29,9	29,43	25,93
R16	18,4	30,8	31,69	31,16	30,21	25,72
R17	27,94	32,53	33,76	36,41	35,62	35,67
R18	18,49	31,65	34,71	31,18	32,44	29,09
R19	22,66	32,25	33,73	32,8	35,57	32,42
R20	23,9	33,42	31,6	35,07	36,26	33,1
R21	19,26	31,85	34,96	31,01	31,64	28,69
R22	38,63	37,06	32,9	36,81	32,45	29,56
R23	18,87	30,94	34,33	30,42	30,92	26,37
R24	18,33	30,7	33,01	30,11	29,67	26,27
R25	18,85	31	32,78	31,11	28,55	27,22

Sağlıklı kontrol grubunu oluşturan içerisinde 50 örneğin bulunduğu K grubunda yapılan PCR çalışmasına ait Ct değerleri hsa-miR-23a, hsa-miR-138, hsa-miR-181, hsa-miR-152-3p, hsa-miR-101 ve *SNORD61* için Tablo 9'de ayrı ayrı verilmiştir.

Tablo 9. Kontrol (K) grubu RT-PCR Ct değerleri

	hsa-miR-23a	hsa-miR-101	hsa-miR-138	hsa-miR-152	hsa-miR-181a	SNORD61
K1	14,58	26,19	33,98	26,83	28,55	26,29
K2	14,15	26,4	32,94	26,26	26,71	24,41
K3	15,67	27,63	33,25	28,36	28,73	25,1
K4	12,25	21,57	31,73	25,82	23,41	21,45
K5	14,33	24,79	31,66	25,29	26,72	24,11
K6	16,47	29,06	33,61	33,23	29,57	27,91
K7	14,45	23,75	32,32	25,41	26,51	20,63
K8	14,21	23,07	29,62	24,44	23,57	21,73
K9	15,08	26,3	31,82	25,95	27,28	23,9
K10	15,31	27,34	33,11	27,21	28,57	26,52
K11	13,87	25,74	32,18	26,25	27,39	24,26
K12	15,11	26,53	33,11	27,3	28,71	25,78
K13	14,07	25,96	31,76	26,92	27,51	24,16
K14	17,3	29,89	34,05	30,27	31,27	28,09
K15	14,07	26,86	32,22	26,46	26,77	24,12
K16	14,76	25,8	32,71	26,04	27,85	25,12
K17	15,2	27,71	34,3	27,27	29,62	26,47
K18	15,9	27,64	34,16	28,08	29,27	26,52
K19	14,43	25,27	31,59	25,89	27,43	24,18
K20	13,46	26,72	32,4	26,19	27,32	24,92
K21	14,16	25,12	29,94	25,67	26,75	23,42
K22	16,39	26,39	34,27	28,09	29,45	26,48
K23	14,99	26,31	33,72	26,77	29,03	26,32
K24	14,77	28,1	34,24	28,55	29,74	28,06
K25	12,74	24,23	30,27	23,94	24,92	22,34
K26	16,14	27,85	35,57	29,6	33,29	29,24
K27	13,4	21,6	28,43	23,57	22,68	19,07
K28	21,97	27,64	38,69	31,88	33,36	31,37
K29	16,12	29,45	35,95	28,96	31,43	30,16
K30	14,23	25,36	30,48	25,4	26,57	23,41
K31	13,36	22,3	30,44	23,75	24	21,24
K32	14,69	22,66	31,1	24,91	25,25	22,61
K33	13,62	24,43	30,43	24,2	23,98	22,28
K34	13,84	23,72	29,89	24,97	25,16	22,33
K35	16,76	24,76	32,65	26,5	26,93	24
K36	14,88	24,68	31,77	25,05	26,76	24,59
K37	13,02	23,2	29,81	24,25	24,47	21,45
K38	14,67	24,7	31,1	24,8	25,74	23,65
K39	13,96	22,8	29,69	23,39	23,7	21,36
K40	14,09	26,76	32,44	25,57	26,47	24,24
K41	13,02	24,1	28,94	24,18	23,78	21,1
K42	13,79	23,41	29,54	24,07	24,29	21,21
K43	14,31	24,19	30,57	23,58	24,14	20,44
K44	15,4	23,91	31,82	25,66	25,81	23,61
K45	13,84	22,92	30,33	24,09	23,59	21,16
K46	13,1	22,53	28,32	23,01	23,29	19,86
K47	13,5	24,72	32,87	25,94	26,26	23,29
K48	13,57	22,94	29,13	23,35	23,12	20,52
K49	10,91	17,98	26,3	20,22	16,93	15,07
K50	32,1	34,6	35,82	36,36	35,16	33,59

4.3. Ekspresyon değerlerinin karşılaştırılması

RT-PCR çalışmaları sonucunda hasta ve kontrol gruplarına ait elde edilen Ct ve standart sapma değerleri Tablo 10'da verilmiştir. Bu değerler ile hesaplanan delta Ct değerleri Tablo 11'de yer almaktadır.

Tablo 10. hsa-miR-23a, hsa-miR-101, hsa-miR-138, hsa-miR-152, hsa-miR-181a ve SNORD61 için tespit edilen ortalama Ct değerleri

	Ortalama Ct değerleri			Standard Sapma		
	S grubu	R grubu	K grubu	S grubu	R grubu	K grubu
hsa-miR-23a	20,6132	20,8572	14,9202	2,6440	4,516	2,917
hsa-miR-101	30,8336	30,8728	25,3516	1,3357	1,774	2,615
hsa-miR-138	33,9612	33,6676	31,9408	1,4020	1,079	2,247
hsa-miR-152	31,4692	31,2456	26,195	2,0300	2,228	2,696
hsa-miR-181a	31,78	31,2176	26,7762	2,2927	2,254	3,137
SNORD61	28,756	27,8504	24,0628	2,1592	2,798	3,252

Tablo 11. SNORD61 snRNA, miR-23a, miR-138, miR-181, miR-152-3p ve miR-101 için delta Ct değerleri

	Ortalama Delta Ct (Ct(Hedef miRNA) - Ct(SNORD61))			Standard Sapma		
	S grubu	R grubu	K grubu	S grubu	R grubu	K grubu
hsa-miR-23a	-8,1428	-6,9932	-9,1426	1,640101	6,190739	1,102996
hsa-miR-101	2,0776	3,0224	1,2888	0,997462	0,859727	2,359612
hsa-miR-138	5,2052	5,8172	7,878	0,777387	1,712303	2,386923
hsa-miR-152	2,7132	3,3952	2,1322	0,785048	1,106106	1,4192
hsa-miR-181a	3,024	3,3672	2,7134	0,615248	1,157921	0,752908
SNORD61	0	0	0	0	0	0

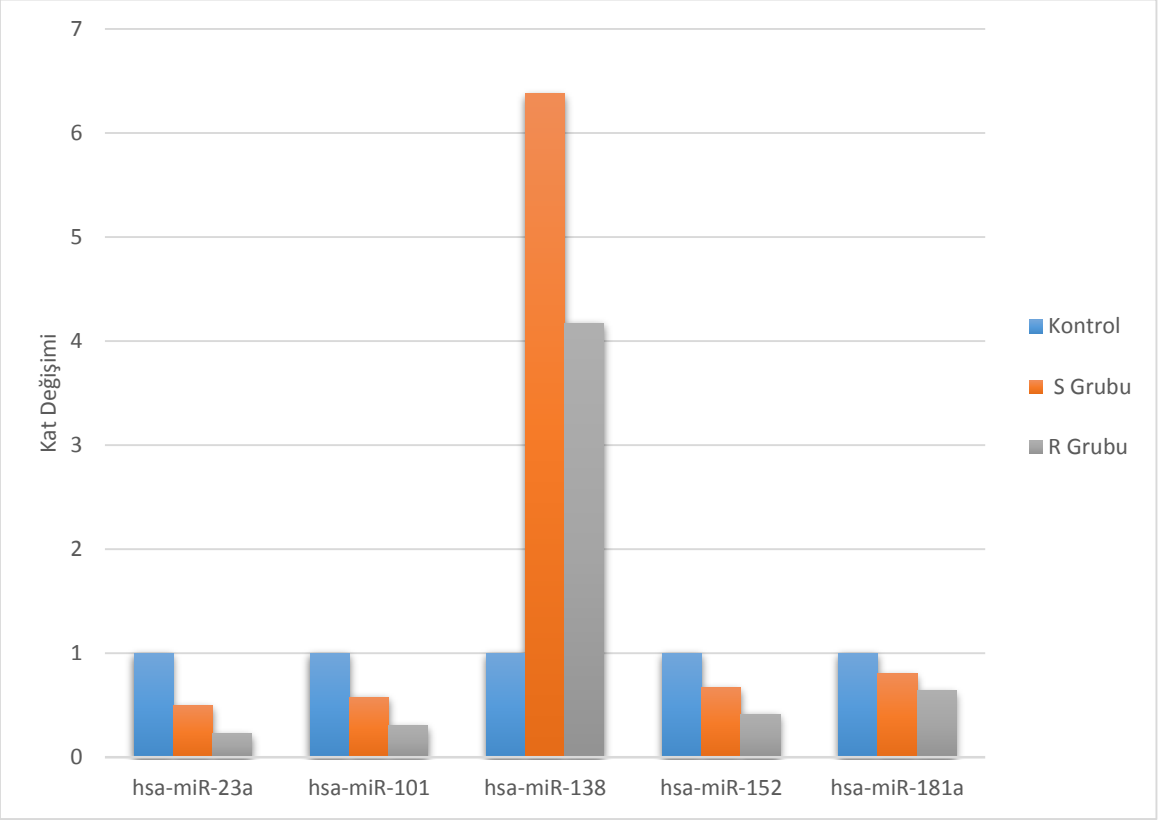
Hasta ve kontrol gruplarındaki her bir miRNA'nın $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerine (Tablo 12) Student t testi uygulanmasıyla elde edilen p değerleri Tablo 13'de verilmiştir. $p<0.05$ olan ölçümler istatiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 12. miR-23a, miR-138, miR-181, miR-152-3p ve miR-101 için kontrol grubuna kıyasla 'Kat değişimi (2−ΔΔCt)' değerleri

	'Kat değişimi' ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (Kontrol grubuyla kıyaslandığında)		'Kat değişimi' ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (S grubu R grubuyla kıyaslandığında)
	S Grubu	R Grubu	S-R
hsa-miR-23a	0,50006932	0,22540634	2,218523753
hsa-miR-101	0,578825345	0,300700673	1,924922017
hsa-miR-138	6,376655759	4,172175948	1,528376521
hsa-miR-152	0,668500248	0,416676604	1,604362333
hsa-miR-181a	0,806306356	0,635603952	1,268567248
SNORD61	1	1	1

Tablo 13. miR-23a, miR-138, miR-181, miR-152-3p ve miR-101 ekspresyon düzeylerinin tedaviye yanıt veren ve dirençli grupta p değerlerinin karşılaştırılması

	p-değerleri (Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında)		p-değerleri (S grubu R grubu ile karşılaştırıldığında)
	S Grubu	R Grubu	
hsa-miR-23a	0,091752719	**0,04142777**	0,107493915
hsa-miR-101	0,348384748	0,626734964	0,701200128
hsa-miR-138	0,070492269	**0,02877334**	0,466630286
hsa-miR-152	0,080267266	**0,034873427**	0,617315615
hsa-miR-181a	0,050608761	0,399701652	0,822151152
SNORD61	N/A	N/A	0,107493915



Şekil 8. S, R ve Kontrol gruplarının kat değişimi değerleri

S ve R grubundaki KML hasta örneklerinde miR-23a, miR-181a, miR-152-3p ve miR-101 ekspresyon düzeylerinde (Şekil 8) kontrol grubuna kıyasla azalma saptanmıştır. R grubundaki miR-23a ve miR-152-3p düzeylerindeki azalma istatistiki olarak anlamlı (sırasıyla p=0,0414, p=0,0348) bulunmuştur. S ve R grubundaki miR-138 ekspresyon düzeyi ise kontrol grubuna kıyasla yüksek bulunmuş, R grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlılık (p=0,028) göstermiştir. İmatinib duyarlı olan S grubu ile dirençli R grubu kıyaslandığında miRNA düzeylerinin S grubunda yüksek olduğu görülmüştür fakat istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır.

İmatinib direnci olan hasta grubundaki dasatinib kullanan 13 hastanın nilotinib kullanan 12 hastanın miRNA ekspresyon seviyeleri göre kat değişimi Tablo 14'de verilmiştir. Dasatinib kullananlarda nilotinib kullananlara göre miR-23a düzeyinde artış saptanmış, diğer miRNA düzeylerinde azalma saptanmıştır. Bu iki grup arasındaki ekspresyon düzeylerindeki farklılık istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Tablo 14. Dasatinib-nilotinib kullananların kat değişimi

	Kat Değişimi	p değerleri
hsa-miR-23a	2,513803	0,649552
hsa-miR-101	0,726308	0,341223
hsa-miR-138	0,933821	0,832087
hsa-miR-152	0,848176	0,481391
hsa-miR-181a	0,723281	0,311252

5. TARTIŞMA

Kronik myeloid lösemi (KML) myeloid projenitör hücrelerinin kontrolsüz çoğalması ile oluşan bir neoplazi olup, erişkinlerde yeni tanı lösemilerin %15'ini oluşturur. KML tanısı Philedelphia (Ph) kromozomunun, t(9;22)(q34;q11), sitogenetik veya moleküler yöntemlerle gösterilmesiyle konulmaktadır (2). KML üç faza ayrılmaktadır; kronik faz, akselere faz ve blast fazı. Hastaların çoğunluğu kronik fazda tanı almaktadır (3).

KML tedavisinde, BCR-ABL1 onkoproteinin ATP molekülü ile ilişkisine engel olan Tirozin Kinaz İnhibitörü (TKİ) moleküllerinin keşfiyle yeni bir döneme girilmiştir. Hücre çoğalmasını engelleyen bu moleküler hedefli tedaviler KML'de 10 yıllık sağkalımı %90'lara ulaştırmıştır (4). KML hastaları ömür boyu tirozin kinaz inhibitörü tedavisi almaktadırlar.

BCR-ABL1 proteini kendiliğinden aktif olup JAK2/STAT, PI3K-AKT-mTOR, MAPK/ERK ve daha birçok alt sinyal yolaklarını aktive ederek myeloid hücrelerin büyümesine ve çoğalmasına sebep olur (5). BCR-ABL1 füzyon geni KML hastalarının %90'nında pozitiftir bulunmaktadır. Tirozin Kinaz İnhibitorleri (imatinib, dasatinib ve nilotinib) tedavide ilk basamak olarak yer almaktadır ancak bazı hastalar TKİ'ye yanıtsızdır veya ilaca daha sonra direnç geliştirmektedir (6). Bu dirence sebep olan mekanizmaların açıklanması ve hastanın hangi tedaviye en iyi yanıt vereceğinin bulunması önemlidir. Günümüzde KML için prognostik biyobelirteç geliştirme çabaları devam etmektedir fakat henüz klinikte kullanılabilen bir biyobelirteç elde edilememiştir. Bu çalışma kapsamında KML vakalarında BCR-ABL1 ilişkili miRNA ekspresyon profilleri incelenerek KML vakaları için prognostik önemi olabilecek ve direnç ile ilişkililendirilebilecek miRNA'ların incelenmesi hedeflenmiştir.

miRNA'lar formalinle tespit edilmiş parafine gömülü (FFPE) doku, kan, idrar, gözyaşı, anne sütü, tükürük ve seminal sıvı gibi biyolojik sıvılardaki yüksek stabiliteleri nedeniyle yeni minimal invaziv biyobelirteç adayları olarak değerlendirilmektedir (7). miRNA'lar, eliminasyon veya translasyonu engelleme yoluyla mRNA'ları baskılayarak hücrede önemli düzenleyici rol oynarlar. miRNA'lar tarafından düzenlenen mRNA'ların genlerin çoğunluğunu kapsamasından dolayı anormal miRNA ifadesi, hücre proliferasyonu, apoptoz ve stres yanıtları için önemli olan çeşitli hücre düzenleme yollarını etkilemektedir. Kanserde,

miRNA'lar “oncomiR'ler” veya “tümör baskılayıcı miR'ler” olarak adlandırılan yeni bir onkogen ve tümör baskılayıcı gen sınıfı olarak görülmektedir (10). OncomiR'ler veya tümör baskılayıcı miR’lerin kanserle ilişkili çok sayıda sinyal yolunda rol aldığı birçok çalışma ile doğrulanmıştır. KML hastalarında, hastalık patogenezinde rol alan miRNA’ların biyobelirteç olabileceği düşünülmektedir (12). Çalışmamızda hastalığın temelinde BCR-ABL1 onkoproteini yatmasından dolayı bu molekül ve etkilediği yolaklar ile ilişkili olabilecek miRNA’ların ekspresyon düzeylerini tespit etmeye çalıştık.

Çalışmamızda, imatinib tedavisine yanıt veren 25 hasta ve imatinib tedavisine yanıtsız olup dasatinib veya nilotinib kullanan 25 kişilik hasta grubu örnekleri kullanılmıştır. Sırasıyla S ve R grubu olarak belirlenen bu gruplar sağlıklı 50 kişiden oluşan K grubuyla ve kendi aralarında kıyaslanmıştır. R grubunda miR-23a ve miR-152-3p düzeylerindeki azalma K grubuna kıyasla istatiksel olarak anlamlı görülmüştür. Yine R grubundaki miR-138 düzeyindeki artış istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur. KML hastalarında miR-23a düzeylerindeki azalma daha önce yapılan çalışmaları destekler niteliktedir. Fakat imatinib dirençli ve duyarlı gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

38 KML hastasının örneklerinden yapılan bir başka çalışmada, yine miR-23a ekspresyon düzeylerinin düşük olduğu görülmüştür ve klinikte tanısal marker veya ilaç hedefi olabileceği öne sürülmüştür (147). miR-23a ile transfekte edilmiş hücrelerdeki BCR/ABL seviyeleri, kontrol gruplarındakilere göre düşük bulunmuştur. Bu bulgu miR-23a nın BCR-ABL1 düzeylerini düşürdüğünü ve birbirleriyle ters orantılı olduklarını düşündürmektedir. K562 hücrelerinde miR-23a'nın ektopik ekspresyonu, hücrelerin ölümüne yol açmıştır. Ayrıca, K562 hücreleri, bir DNA metilasyon inhibitörü olan 5-aza-2'-deoksisitidin ile tedavi edilmiş, BCR/ABL ekspresyonu upregüle olmuş, lösemik hücrelerde miR-23a'nın epigenetik susturulduğu gösterilmiştir. BCR-ABL ve miR-23a ekspresyonlarının KML’de ters orantılı olduğu düşünülmüştür (134). miR-101 ekspresyon artışının, Jak2 baskılanması ve miR-23a upregülasyonu yoluyla K562 lösemi hücrelerini imatinib tedavisine duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (135). Çalışmamızda da imatinib dirençli R grubunda miR-23a’nın downregülasyonu görülmüştü, dolayısıyla miR-23a mimiklerinin kullanımıyla BCR-ABL1 hedeflenerek imatinib direncinin önlenmesi mümkün olabilir. miR-23a KML hastalarındaki

ekspresyon düzeylerinin düşüklüğü hastalığın imatinib direnci geliştirmesi hakkında fikir verici olabilir.

Ayrıca, miR-23a, -27a ve -24'ün dahil olduğu bir miRNA kümesinin, JAK1/Stat3 kaskadını sinerjistik olarak düzenlediği, akut eritroid lösemi hastalarında önemli ölçüde down regüle olduğu, ekspresyonlarının restorasyonunun apoptozu ve eritropoezi indüklediği ve lösemik semptomları hafiflettiği bu nedenle yeni terapötik hedefler olabileceği gösterilmiştir (148).

Tümör süpresör olarak tanımlanan miR-101'in kanser hücrelerinde down regüle olduğu, histon metiltransferaz EZH2'yi hedeflediği ve kanser hücrelerinin metastazını azalttığı gösterilmiştir (149). Bunun yanında KML hastalarında upregüle olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (150). miR-101'in Jak2 ekspresyonunu downregüle ederek ve K562 hücrelerini imatinib'e duyarlı hale getirdiği ve tümör supresör görevi gördüğü gösterilmiştir (135). Bizim çalışmamızda miR-101'in literatürden farklı olarak KML hasta örneklerinde sağlıklı kontrollere göre daha az eksprese olduğu fakat bunun istatistiki olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. Çalışma örnekleminin kısıtlı olması çalışmamızın sonucunu etkilemiş olabileceğini düşünülebilir. Yine miR-101 ekspresyonu, R grubunda, S grubuna göre daha az bulunmuş olmakla birlikte S ve R grupları arasında da anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

miR-138'in tümör süpresor özelliği, K562 ve Ku812 hücrelerinde miR-138'i aşırı eksprese ederek G0/G1 hücre döngüsünün durdurulması ve hücre proliferasyonunun inhibe edilmesiyle gösterilmiştir. Bu miRNA'nın de-regüle olmuş ekspresyonu, çeşitli tümörlerde gösterilmiş olmasına rağmen, miR-138 ekspresyonunun K562 hücrelerinde ve primer KML örneklerinde down regüle olduğu görülmüştür. Ayrıca, miR-138'in aşırı ekspresyonu, BCR-ABL'nin downregülasyonuna yol açtığı, dolayısıyla miR-138 ve BCR-ABL arasında negatif düzenleyici döngü olduğu gösterilmiştir (137). miR-138, ABL mRNA'nın 3′UTR'si yerine ABL proteininin kodlayan bölgesine bağlanır ve ABL ve BCR-ABL proteinlerinin ekspresyon seviyelerini down regüle ederek hücre proliferasyonunun inhibisyonuna neden olur (137). Çalışmamızda miR-138 ekspresyon düzeyleri, tanı sonrasında en az 6 ay TKİ tedavisi almış S ve R grubundaki KML hastalarında artmış olarak bulunmuştur. Sadece R grubundaki değişiklik istatiksel anlamlılık içermektedir. S grubundaki artış imatinibe verilen olumlu cevapla tümör yükünün azaldığını ve tümör süpresör düzeylerinin yükseldiğini

düşündürmektedir. R grubunda S grubuna göre görülen düşük miR-138 düzeyleri imatinib direncinin habercisi olabilir. Hastalığın tanısının konulduğu zamandan itibaren yapılacak miR-138 takiplerinin prognoz ve direnç gelişimi hakkında bilgi sağlama ihtimali vardır.

miR-152'nin, KML hastalarının kemik iliği örneklerinde ve K562 hücrelerinde yüksek oranda eksprese edildiği gösterilmiştir. miR-152-3p'in altyolağında bulunan tümör süpresör özelliği olan p27'nin ekspresyonunu inhibe ettiği, böylece K562 hücrelerinin çoğalmasını ve hücrelerin hücre döngüsüne girmesini teşvik ettiği, hücre apoptozunu inhibe ettiği görülmüştür (143). Çalışmamızda miR-152'nin S ve R grubunda down regüle olduğu görülmüştür. Bu durumun hastaların tedavi almış olmasıyla açıklanması mümkündür. Yeni tanı alan ve BCR-ABL1 düzeyleri yüksek hastalarda sonuçların farklı çıkması olasıdır. Tedavi alan hastalarda miR-152'nin düzeylerinin düşmesi tedavi etkinliğinin bir belirteci olarak takip edilebilir.

miR-181a'nın ekspresyon seviyelerinin, KML'li hastalarda ve KML K562 hücre hattında azaldığı, miR-181a'nın K562 hücrelerine transfeksiyonunun, bu hücrelerin imatinib'e karşı kemoterapötik duyarlılığını arttırdığı gösterilmiştir. Bu etkilere aracılık eden potansiyel mekanizma, miR-181a'nın hücre büyümesini inhibe etme ve/veya K562 hücrelerinde hücre apoptozunu ve farklılaşmasını indükleme kapasitesi ile ilişkilendirilmiştir (142). Çalışmamızda literatür ile uyumlu olarak KML hastalarında R ve S gruplarında miR-181a düzeylerinde azalma saptanmıştır, ancak istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. R grubunda S grubuna kıyasla görülen, istatistiki olarak anlamlı olmamakla birlikte, miR-181a ekspresyon düşüklüğünün R grubundaki imatinib direncinden kaynaklanması muhtemeldir. Bu durum imatinib direnci gelişiminin takibi açısından kullanılabilir veya TKİ tedavisiden görülen faydanın bir ölçütü olabilir.

R grubundaki dasatinib ve nilotinib kullanan imatinib dirençli hastaların miRNA düzeylerinde istatiksel olarak anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Çalışmamız ile KML hastalarında imatinib'e duyarlı ve dirençli olgulardaki BCR-ABL1 ilişkili miRNA'ların ekspresyon düzeylerini incelenmiştir. Olgular arasında bazı farklılıklar saptanmış fakat tam bir istatistiki anlamlılık elde edilememiştir. Tedaviye dirençli ve duyarlı gruplar arasındaki miRNA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık

saptanmamıştır. KML hastalarındaki miRNA düzeylerinin ise literatür verileriyle uyumlu olduğu görülmüştür (134, 137, 142, 150). Çalışmamızdaki örneklemin genişletilmesiyle daha farklı sonuçlar elde edilmesi öngörülmektedir. Daha fazla örnek ve farklı BCR-ABL ilişkili miRNA'ların çalışıldığı kapsamlı çalışmalar ile KML prognozunun ve direnç gelişip gelişmeyeceğinin veya ne zaman direnç gelişeceğinin ön görülmesi miRNA ekspresyon düzeylerine bakılarak ön görülebileceğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR

1. İmatinib tedavisine duyarlı ve dirençli hastalarda hsa-miR-23a ekspresyonu düzeylerinde kontrollere göre azalma tespit edilmiştir, ancak sadece R grubundaki değişiklik istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Yine duyarlı ve dirençli gruplar arasında istatiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir.

2. hsa-miR-101 düzeylerindeki azalma S ve R gruplarında kontrollere göre istatistiki olarak anlamlı bulunmamıştır. S ve R grupları arasında yine anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir.

3. hsa-miR-138 ekspresyon düzeyleri S ve R grubunda kontrollere göre yüksek bulunmuştur. R grubundaki artış istatistiksel olarak anlamlıdır. R ve S grupları arasında anlamlı farklılık tespit edilmemiştir.

4. hsa-miR-152 ekspresyon düzeylerinin S ve R gruplarında K grubuna göre azaldığı görülmüştür. R grubundaki kontrollere kıyasla görülen azalma istatiksel olarak anlamlı bulunmuştur. S ve R grupları arasındaki değişiklik istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

5. hsa-miR-181a ekspresyon düzeylerinin S ve R gruplarında kontrollere göre azaldığı görülmüştür ancak istatiksel olarak anlamlı değildir. S ve R grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

6. Çalışmamızda hsa-miR-23a, hsa-miR-138, hsa-miR-181, hsa-miR-152-3p, hsa-miR-101 miRNA'larının KML hastalarındaki ekspesyon düzeyleri genel olarak literatür verisiyle uyumlu bulunmuştur. Fakat çalışmamızdaki imatinib tedavisine duyarlı olan ve direnç gösteren gruplar arasındaki ekspresyon farklılığı istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. R grubundaki dasatinib ve nilotinib kullanan imatinib dirençli hastaların miRNA düzeylerinde de istatiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

7. Çalışmamızdaki hedef olan S ve R gruplarındaki ekspresyon farklılığının tespit edilebilmesi için daha büyük hasta grubuyla çalışılması ve miRNA'ların lösemik serideki hücrelerden çalışılması faydalı olacaktır.

7. EKLER

ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı
	TELEFON	+90 442 234 65 11
	FAKS	+90 442 236 09 68
	E-POSTA	atatipetikkurul@gmail.com
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI		**Prof.Dr.Abdulgani TATAR**
ARAŞTIRMACININ AÇIK ADI		**Kronik Myeloid Lösemi Vakalarında BCR-ABL1 İlişkili Mikrornaların Ekspresyon Düzeylerinin Klinik ve Moleküler Parametreler ile İlişkisinin İncelenmesi**
KARAR BİLGİLERİ	**Toplantı Sayısı: 07 Karar No: 39**	**Tarih:** 07.11.2019
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın bütçesinin **TÜBİTAK tarafından** karşılanması koşulu ile yapılmasında bilimsel ve etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verildi. **Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.** Araştırmacıya çalışmalarında başarılar dileriz.	

KAYNAKLAR

1. Hoffmann VS, Baccarani M, Hasford J, Lindoerfer D, Burgstaller S, Sertic D, et al. The EUTOS population-based registry: incidence and clinical characteristics of 2904 CML patients in 20 European Countries. Leukemia. 2015;29(6):1336-43.
2. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature. 1973;243(5405):290-3.
3. Quintás-Cardama A, Cortes JE. Chronic myeloid leukemia: diagnosis and treatment. Mayo Clin Proc. 2006;81(7):973-88.
4. Hochhaus A, O'Brien SG, Guilhot F, Druker BJ, Branford S, Foroni L, et al. Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. Leukemia. 2009;23(6):1054-61.
5. Kang ZJ, Liu YF, Xu LZ, Long ZJ, Huang D, Yang Y, et al. The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. Chin J Cancer. 2016;35:48.
6. Hehlmann R. How I treat CML blast crisis. Blood. 2012;120(4):737-47.
7. Lan H, Lu H, Wang X, Jin H. MicroRNAs as potential biomarkers in cancer: opportunities and challenges. Biomed Res Int. 2015;2015:125094.
8. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014;15(8):509-24.
9. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 2004;116(2):281-97.
10. Koturbash I, Zemp FJ, Pogribny I, Kovalchuk O. Small molecules with big effects: the role of the microRNAome in cancer and carcinogenesis. Mutat Res. 2011;722(2):94-105.
11. Svoronos AA, Engelman DM, Slack FJ. OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. Cancer Res. 2016;76(13):3666-70.
12. Kotagama K, Chang Y, Mangone M. miRNAs as Biomarkers in Chronic Myelogenous Leukemia. Drug Dev Res. 2015;76(6):278-85.
13. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. N Engl J Med. 1999;341(3):164-72.
14. Deininger MW, Shah NP, Altman JK, Berman E, Bhatia R, Bhatnagar B, et al. Chronic Myeloid Leukemia, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. J Natl Compr Canc Netw. 2020;18(10):1385-415.
15. Geary CG. The story of chronic myeloid leukaemia. Br J Haematol. 2000;110(1):2-11.
16. Hungerford D, Nowell P. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. Science. 1960;132:1497-9.
17. FORKNER CE, Scott TM. Arsenic as a therapeutic agent in chronic myelogenous leukemia: preliminary report. Journal of the American Medical Association. 1931;97(1):3-5.
18. Minot GR, Buckman TE, Isaacs R. Chronic myelogenous leukemia: age incidence, duration, and benefit derived from irradiation. Journal of the American Medical Association. 1924;82(19):1489-94.
19. Haut A, Abbott WS, Wintrobe MM, Cartwright GE. Busulfan in the treatment of chronic myelocytic leukemia. The effect of long term intermittent therapy. Blood. 1961;17:1-19.
20. Kennedy BJ. Hydroxyurea therapy in chronic myelogenous leukemia. Cancer. 1972;29(4):1052-6.

21. Hydroxyurea versus busulphan for chronic myeloid leukaemia: an individual patient data meta-analysis of three randomized trials. Chronic myeloid leukemia trialists' collaborative group. Br J Haematol. 2000;110(3):573-6.
22. Fefer A, Buckner CD, Thomas ED, Cheever MA, Clift RA, Glucksberg H, et al. Cure of hematologic neoplasia with transplantation of marrow from identical twins. N Engl J Med. 1977;297(3):146-8.
23. Goldman JM, Apperley JF, Jones L, Marcus R, Goolden AW, Batchelor R, et al. Bone marrow transplantation for patients with chronic myeloid leukemia. N Engl J Med. 1986;314(4):202-7.
24. Talpaz M, Kantarjian HM, McCredie K, Trujillo JM, Keating MJ, Gutterman JU. Hematologic remission and cytogenetic improvement induced by recombinant human interferon alpha A in chronic myelogenous leukemia. N Engl J Med. 1986;314(17):1065-9.
25. Talpaz M, Mercer J, Hehlmann R. The interferon-alpha revival in CML. Ann Hematol. 2015;94 Suppl 2:S195-207.
26. Silver RT, Woolf SH, Hehlmann R, Appelbaum FR, Anderson J, Bennett C, et al. An evidence-based analysis of the effect of busulfan, hydroxyurea, interferon, and allogeneic bone marrow transplantation in treating the chronic phase of chronic myeloid leukemia: developed for the American Society of Hematology. Blood. 1999;94(5):1517-36.
27. Duesberg PH, Vogt PK. Differences between the ribonucleic acids of transforming and nontransforming avian tumor viruses. Proc Natl Acad Sci U S A. 1970;67(4):1673-80.
28. Bister K, Vogt PK. Genetic analysis of the defectiveness in strain MC29 avian leukosis virus. Virology. 1978;88(2):213-21.
29. Witte ON, Dasgupta A, Baltimore D. Abelson murine leukaemia virus protein is phosphorylated in vitro to form phosphotyrosine. Nature. 1980;283(5750):826-31.
30. Collett MS, Erikson RL. Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product. Proc Natl Acad Sci U S A. 1978;75(4):2021-4.
31. Heisterkamp N, Stephenson JR, Groffen J, Hansen PF, de Klein A, Bartram CR, et al. Localization of the c-ab1 oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. Nature. 1983;306(5940):239-42.
32. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. Science. 1990;247(4944):824-30.
33. Heisterkamp N, Jenster G, ten Hoeve J, Zovich D, Pattengale PK, Groffen J. Acute leukaemia in bcr/abl transgenic mice. Nature. 1990;344(6263):251-3.
34. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. Nat Med. 1996;2(5):561-6.
35. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. N Engl J Med. 2001;344(14):1031-7.
36. Clarkson B, Strife A, Wisniewski D, Lambek CL, Liu C. Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies. Leukemia. 2003;17(7):1211-62.
37. Malhotra H, Radich J, Garcia-Gonzalez P. Meeting the needs of CML patients in resource-poor countries. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2019;2019(1):433-42.
38. Corso A, Lazzarino M, Morra E, Merante S, Astori C, Bernasconi P, et al. Chronic myelogenous leukemia and exposure to ionizing radiation--a retrospective study of 443 patients. Ann Hematol. 1995;70(2):79-82.

39. Score J, Calasanz MJ, Ottman O, Pane F, Yeh RF, Sobrinho-Simões MA, et al. Analysis of genomic breakpoints in p190 and p210 BCR-ABL indicate distinct mechanisms of formation. Leukemia. 2010;24(10):1742-50.
40. Melo JV. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. Blood. 1996;88(7):2375-84.
41. Elliott SL, Taylor KM, Taylor DL, Rodwell RL, Williams BF, Shuttlewood MM, et al. Cytogenetic response to alpha-interferon is predicted in early chronic phase chronic myeloid leukemia by M-bcr breakpoint location. Leukemia. 1995;9(6):946-50.
42. Dowding C, Guo AP, Maisin D, Gordon MY, Goldman JM. The effects of interferon-alpha on the proliferation of CML progenitor cells in vitro are not related to the precise position of the M-BCR breakpoint. Br J Haematol. 1991;77(2):165-71.
43. Chu S, Li L, Singh H, Bhatia R. BCR-tyrosine 177 plays an essential role in Ras and Akt activation and in human hematopoietic progenitor transformation in chronic myelogenous leukemia. Cancer Res. 2007;67(14):7045-53.
44. Zhang X, Subrahmanyam R, Wong R, Gross AW, Ren R. The NH(2)-terminal coiled-coil domain and tyrosine 177 play important roles in induction of a myeloproliferative disease in mice by Bcr-Abl. Mol Cell Biol. 2001;21(3):840-53.
45. Hantschel O. Structure, regulation, signaling, and targeting of abl kinases in cancer. Genes Cancer. 2012;3(5-6):436-46.
46. Zhang J, Adrián FJ, Jahnke W, Cowan-Jacob SW, Li AG, Iacob RE, et al. Targeting Bcr-Abl by combining allosteric with ATP-binding-site inhibitors. Nature. 2010;463(7280):501-6.
47. Kelliher MA, McLaughlin J, Witte ON, Rosenberg N. Induction of a chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with v-abl and BCR/ABL. Proc Natl Acad Sci U S A. 1990;87(17):6649-53.
48. Bedi A, Zehnbauer BA, Barber JP, Sharkis SJ, Jones RJ. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. Blood. 1994;83(8):2038-44.
49. Hariharan IK, Adams JM, Cory S. bcr-abl oncogene renders myeloid cell line factor independent: potential autocrine mechanism in chronic myeloid leukemia. Oncogene Res. 1988;3(4):387-99.
50. Ratajczak MZ, Kant JA, Luger SM, Hijiya N, Zhang J, Zon G, et al. In vivo treatment of human leukemia in a scid mouse model with c-myb antisense oligodeoxynucleotides. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89(24):11823-7.
51. Szczylik C, Skorski T, Nicolaides NC, Manzella L, Malaguarnera L, Venturelli D, et al. Selective inhibition of leukemia cell proliferation by BCR-ABL antisense oligodeoxynucleotides. Science. 1991;253(5019):562-5.
52. Engelman A, Rosenberg N. Temperature-sensitive mutants of Abelson murine leukemia virus deficient in protein tyrosine kinase activity. J Virol. 1990;64(9):4242-51.
53. Chereda B, Melo JV. Natural course and biology of CML. Ann Hematol. 2015;94 Suppl 2:S107-21.
54. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia--advances in biology and new approaches to treatment. N Engl J Med. 2003;349(15):1451-64.
55. Zhao JJ, Cheng H, Jia S, Wang L, Gjoerup OV, Mikami A, et al. The p110alpha isoform of PI3K is essential for proper growth factor signaling and oncogenic transformation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(44):16296-300.
56. Sattler M, Salgia R, Okuda K, Uemura N, Durstin MA, Pisick E, et al. The proto-oncogene product p120CBL and the adaptor proteins CRKL and c-CRK link c-ABL, p190BCR/ABL and p210BCR/ABL to the phosphatidylinositol-3' kinase pathway. Oncogene. 1996;12(4):839-46.

57. Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M, Majewski M, Martinez R, Choi JK, et al. Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. Embo j. 1997;16(20):6151-61.
58. Klejman A, Rushen L, Morrione A, Slupianek A, Skorski T. Phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors enhance the anti-leukemia effect of STI571. Oncogene. 2002;21(38):5868-76.
59. Mayerhofer M, Valent P, Sperr WR, Griffin JD, Sillaber C. BCR/ABL induces expression of vascular endothelial growth factor and its transcriptional activator, hypoxia inducible factor-1alpha, through a pathway involving phosphoinositide 3-kinase and the mammalian target of rapamycin. Blood. 2002;100(10):3767-75.
60. Steelman LS, Franklin RA, Abrams SL, Chappell W, Kempf CR, Bäsecke J, et al. Roles of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in leukemia therapy. Leukemia. 2011;25(7):1080-94.
61. Sattler M, Mohi MG, Pride YB, Quinnan LR, Malouf NA, Podar K, et al. Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. Cancer Cell. 2002;1(5):479-92.
62. Packer LM, Rana S, Hayward R, O'Hare T, Eide CA, Rebocho A, et al. Nilotinib and MEK inhibitors induce synthetic lethality through paradoxical activation of RAF in drug-resistant chronic myeloid leukemia. Cancer Cell. 2011;20(6):715-27.
63. Reuther JY, Reuther GW, Cortez D, Pendergast AM, Baldwin AS, Jr. A requirement for NF-kappaB activation in Bcr-Abl-mediated transformation. Genes Dev. 1998;12(7):968-81.
64. Hsieh MY, Van Etten RA. IKK-dependent activation of NF-κB contributes to myeloid and lymphoid leukemogenesis by BCR-ABL1. Blood. 2014;123(15):2401-11.
65. Kim LC, Song L, Haura EB. Src kinases as therapeutic targets for cancer. Nat Rev Clin Oncol. 2009;6(10):587-95.
66. Danhauser-Riedl S, Warmuth M, Druker BJ, Emmerich B, Hallek M. Activation of Src kinases p53/56lyn and p59hck by p210bcr/abl in myeloid cells. Cancer Res. 1996;56(15):3589-96.
67. Wilson MB, Schreiner SJ, Choi HJ, Kamens J, Smithgall TE. Selective pyrrolo-pyrimidine inhibitors reveal a necessary role for Src family kinases in Bcr-Abl signal transduction and oncogenesis. Oncogene. 2002;21(53):8075-88.
68. Warmuth M, Simon N, Mitina O, Mathes R, Fabbro D, Manley PW, et al. Dual-specific Src and Abl kinase inhibitors, PP1 and CGP76030, inhibit growth and survival of cells expressing imatinib mesylate-resistant Bcr-Abl kinases. Blood. 2003;101(2):664-72.
69. Ptasznik A, Nakata Y, Kalota A, Emerson SG, Gewirtz AM. Short interfering RNA (siRNA) targeting the Lyn kinase induces apoptosis in primary, and drug-resistant, BCR-ABL1(+) leukemia cells. Nat Med. 2004;10(11):1187-9.
70. ten Hoeve J, Arlinghaus RB, Guo JQ, Heisterkamp N, Groffen J. Tyrosine phosphorylation of CRKL in Philadelphia+ leukemia. Blood. 1994;84(6):1731-6.
71. Birge RB, Kalodimos C, Inagaki F, Tanaka S. Crk and CrkL adaptor proteins: networks for physiological and pathological signaling. Cell Commun Signal. 2009;7:13.
72. Seo JH, Wood LJ, Agarwal A, O'Hare T, Elsea CR, Griswold IJ, et al. A specific need for CRKL in p210BCR-ABL-induced transformation of mouse hematopoietic progenitors. Cancer Res. 2010;70(18):7325-35.
73. Guo G, Kang Q, Zhu X, Chen Q, Wang X, Chen Y, et al. A long noncoding RNA critically regulates Bcr-Abl-mediated cellular transformation by acting as a competitive endogenous RNA. Oncogene. 2015;34(14):1768-79.
74. Hoelbl A, Schuster C, Kovacic B, Zhu B, Wickre M, Hoelzl MA, et al. Stat5 is indispensable for the maintenance of bcr/abl-positive leukaemia. EMBO Mol Med. 2010;2(3):98-110.
75. Chakraborty S, Stark JM, Sun CL, Modi H, Chen W, O'Connor TR, et al. Chronic myelogenous leukemia stem and progenitor cells demonstrate chromosomal instability related to

repeated breakage-fusion-bridge cycles mediated by increased nonhomologous end joining. Blood. 2012;119(26):6187-97.
76. Guilhot J, Preudhomme C, Mahon FX, Guilhot F. Analyzing molecular response in chronic myeloid leukemia clinical trials: pitfalls and golden rules. Cancer. 2015;121(4):490-7.
77. Hochhaus A, Larson RA, Guilhot F, Radich JP, Branford S, Hughes TP, et al. Long-Term Outcomes of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia. N Engl J Med. 2017;376(10):917-27.
78. Thielen N, Visser O, Ossenkoppele G, Janssen J. Chronic myeloid leukemia in the Netherlands: a population-based study on incidence, treatment, and survival in 3585 patients from 1989 to 2012. Eur J Haematol. 2016;97(2):145-54.
79. Radich JP, Kopecky KJ, Appelbaum FR, Kamel-Reid S, Stock W, Malnassy G, et al. A randomized trial of dasatinib 100 mg versus imatinib 400 mg in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. Blood. 2012;120(19):3898-905.
80. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. Leukemia. 2020;34(4):966-84.
81. Cortes JE, Saglio G, Kantarjian HM, Baccarani M, Mayer J, Boqué C, et al. Final 5-Year Study Results of DASISION: The Dasatinib Versus Imatinib Study in Treatment-Naïve Chronic Myeloid Leukemia Patients Trial. J Clin Oncol. 2016;34(20):2333-40.
82. Hehlmann R, Lauseker M, Saußele S, Pfirrmann M, Krause S, Kolb HJ, et al. Assessment of imatinib as first-line treatment of chronic myeloid leukemia: 10-year survival results of the randomized CML study IV and impact of non-CML determinants. Leukemia. 2017;31(11):2398-406.
83. Kalmanti L, Saussele S, Lauseker M, Müller MC, Dietz CT, Heinrich L, et al. Safety and efficacy of imatinib in CML over a period of 10 years: data from the randomized CML-study IV. Leukemia. 2015;29(5):1123-32.
84. Michel C, Burchert A, Hochhaus A, Saussele S, Neubauer A, Lauseker M, et al. Imatinib dose reduction in major molecular response of chronic myeloid leukemia: results from the German Chronic Myeloid Leukemia-Study IV. Haematologica. 2019;104(5):955-62.
85. Hughes TP, Saglio G, Larson RA, Kantarjian HM, Kim D-W, Issaragrisil S, et al. Long-term outcomes in patients with chronic myeloid leukemia in chronic phase receiving frontline nilotinib versus imatinib: ENESTnd 10-year analysis. American Society of Hematology Washington, DC; 2019.
86. Cortes JE, Gambacorti-Passerini C, Deininger MW, Mauro MJ, Chuah C, Kim DW, et al. Bosutinib Versus Imatinib for Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia: Results From the Randomized BFORE Trial. J Clin Oncol. 2018;36(3):231-7.
87. Talpaz M, Hehlmann R, Quintás-Cardama A, Mercer J, Cortes J. Re-emergence of interferon-α in the treatment of chronic myeloid leukemia. Leukemia. 2013;27(4):803-12.
88. Simonsson B, Gedde-Dahl T, Markevärn B, Remes K, Stentoft J, Almqvist A, et al. Combination of pegylated IFN-α2b with imatinib increases molecular response rates in patients with low- or intermediate-risk chronic myeloid leukemia. Blood. 2011;118(12):3228-35.
89. Cortes JE, Kim DW, Pinilla-Ibarz J, le Coutre P, Paquette R, Chuah C, et al. A phase 2 trial of ponatinib in Philadelphia chromosome-positive leukemias. N Engl J Med. 2013;369(19):1783-96.
90. Cortes JE, Kim DW, Pinilla-Ibarz J, le Coutre PD, Paquette R, Chuah C, et al. Ponatinib efficacy and safety in Philadelphia chromosome-positive leukemia: final 5-year results of the phase 2 PACE trial. Blood. 2018;132(4):393-404.
91. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. Cell. 2018;173(1):20-51.

92. Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. Nat Rev Mol Cell Biol. 2019;20(1):5-20.
93. 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.
94. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. Science. 2001;294(5543):853-8.
95. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans. Science. 2001;294(5543):862-4.
96. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. Nucleic Acids Res. 2014;42(Database issue):D68-73.
97. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. Front Endocrinol (Lausanne). 2018;9:402.
98. de Rie D, Abugessaisa I, Alam T, Arner E, Arner P, Ashoor H, et al. An integrated expression atlas of miRNAs and their promoters in human and mouse. Nat Biotechnol. 2017;35(9):872-8.
99. Tanzer A, Stadler PF. Molecular evolution of a microRNA cluster. J Mol Biol. 2004;339(2):327-35.
100. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. Nature. 2004;432(7014):231-5.
101. Alarcón CR, Lee H, Goodarzi H, Halberg N, Tavazoie SF. N6-methyladenosine marks primary microRNAs for processing. Nature. 2015;519(7544):482-5.
102. Okada C, Yamashita E, Lee SJ, Shibata S, Katahira J, Nakagawa A, et al. A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. Science. 2009;326(5957):1275-9.
103. Yoda M, Kawamata T, Paroo Z, Ye X, Iwasaki S, Liu Q, et al. ATP-dependent human RISC assembly pathways. Nat Struct Mol Biol. 2010;17(1):17-23.
104. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. Cell. 2003;115(2):209-16.
105. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. Nature. 2007;448(7149):83-6.
106. Yang JS, Maurin T, Robine N, Rasmussen KD, Jeffrey KL, Chandwani R, et al. Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(34):15163-8.
107. Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MM, Hannon GJ. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. Nature. 2010;465(7298):584-9.
108. Matsuyama H, Suzuki HI. Systems and Synthetic microRNA Biology: From Biogenesis to Disease Pathogenesis. Int J Mol Sci. 2019;21(1).
109. Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. Nat Rev Genet. 2011;12(2):99-110.
110. Dharap A, Pokrzywa C, Murali S, Pandi G, Vemuganti R. MicroRNA miR-324-3p induces promoter-mediated expression of RelA gene. PLoS One. 2013;8(11):e79467.
111. Jo MH, Shin S, Jung SR, Kim E, Song JJ, Hohng S. Human Argonaute 2 Has Diverse Reaction Pathways on Target RNAs. Mol Cell. 2015;59(1):117-24.
112. Ameres SL, Horwich MD, Hung JH, Xu J, Ghildiyal M, Weng Z, et al. Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs. Science. 2010;328(5985):1534-9.
113. Broughton JP, Lovci MT, Huang JL, Yeo GW, Pasquinelli AE. Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. Mol Cell. 2016;64(2):320-33.

114. Truesdell SS, Mortensen RD, Seo M, Schroeder JC, Lee JH, LeTonqueze O, et al. MicroRNA-mediated mRNA translation activation in quiescent cells and oocytes involves recruitment of a nuclear microRNP. Sci Rep. 2012;2:842.
115. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105(30):10513-8.
116. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(24):15524-9.
117. Medina PP, Nolde M, Slack FJ. OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. Nature. 2010;467(7311):86-90.
118. 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.
119. Merritt WM, Lin YG, Han LY, Kamat AA, Spannuth WA, Schmandt R, et al. Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. N Engl J Med. 2008;359(25):2641-50.
120. Fabbri M, Calore F, Paone A, Galli R, Calin GA. Epigenetic regulation of miRNAs in cancer. Adv Exp Med Biol. 2013;754:137-48.
121. Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, et al. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. Cancer Cell. 2006;9(6):435-43.
122. Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N, Callegari E, et al. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(40):15805-10.
123. Corney DC, Flesken-Nikitin A, Godwin AK, Wang W, Nikitin AY. MicroRNA-34b and MicroRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth. Cancer Res. 2007;67(18):8433-8.
124. Acunzo M, Visone R, Romano G, Veronese A, Lovat F, Palmieri D, et al. miR-130a targets MET and induces TRAIL-sensitivity in NSCLC by downregulating miR-221 and 222. Oncogene. 2012;31(5):634-42.
125. Zhu H, Wu H, Liu X, Evans BR, Medina DJ, Liu CG, et al. Role of MicroRNA miR-27a and miR-451 in the regulation of MDR1/P-glycoprotein expression in human cancer cells. Biochem Pharmacol. 2008;76(5):582-8.
126. Zhu X, Li H, Long L, Hui L, Chen H, Wang X, et al. miR-126 enhances the sensitivity of non-small cell lung cancer cells to anticancer agents by targeting vascular endothelial growth factor A. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2012;44(6):519-26.
127. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(7):2257-61.
128. Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, Rosenwald S, Spector Y, Zepeniuk M, et al. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. Nat Biotechnol. 2008;26(4):462-9.
129. Pencheva N, Tavazoie SF. Control of metastatic progression by microRNA regulatory networks. Nat Cell Biol. 2013;15(6):546-54.
130. Vecchione A, Belletti B, Lovat F, Volinia S, Chiappetta G, Giglio S, et al. A microRNA signature defines chemoresistance in ovarian cancer through modulation of angiogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(24):9845-50.

131. Bader AG, Brown D, Winkler M. The promise of microRNA replacement therapy. Cancer Res. 2010;70(18):7027-30.
132. Laganà A, Acunzo M, Romano G, Pulvirenti A, Veneziano D, Cascione L, et al. miR-Synth: a computational resource for the design of multi-site multi-target synthetic miRNAs. Nucleic Acids Res. 2014;42(9):5416-25.
133. Krützfeldt J, Kuwajima S, Braich R, Rajeev KG, Pena J, Tuschl T, et al. Specificity, duplex degradation and subcellular localization of antagomirs. Nucleic Acids Res. 2007;35(9):2885-92.
134. Xishan Z, Xianjun L, Ziying L, Guangxin C, Gang L. The malignancy suppression role of miR-23a by targeting the BCR/ABL oncogene in chromic myeloid leukemia. Cancer Gene Ther. 2014;21(9):397-404.
135. Farhadi E, Zaker F, Safa M, Rezvani MR. miR-101 sensitizes K562 cell line to imatinib through Jak2 downregulation and inhibition of NF-κB target genes. Tumour Biol. 2016;37(10):14117-28.
136. Jiang L, Dai Y, Liu X, Wang C, Wang A, Chen Z, et al. Identification and experimental validation of G protein alpha inhibiting activity polypeptide 2 (GNAI2) as a microRNA-138 target in tongue squamous cell carcinoma. Hum Genet. 2011;129(2):189-97.
137. Xu C, Fu H, Gao L, Wang L, Wang W, Li J, et al. BCR-ABL/GATA1/miR-138 mini circuitry contributes to the leukemogenesis of chronic myeloid leukemia. Oncogene. 2014;33(1):44-54.
138. Chen CZ, Lodish HF. MicroRNAs as regulators of mammalian hematopoiesis. Semin Immunol. 2005;17(2):155-65.
139. Lee YG, Kim I, Oh S, Shin DY, Koh Y, Lee KW. Small RNA sequencing profiles of mir-181 and mir-221, the most relevant microRNAs in acute myeloid leukemia. Korean J Intern Med. 2019;34(1):178-83.
140. Butrym A, Rybka J, Baczyńska D, Poręba R, Mazur G, Kuliczkowski K. Expression of microRNA-181 determines response to treatment with azacitidine and predicts survival in elderly patients with acute myeloid leukaemia. Oncol Lett. 2016;12(4):2296-300.
141. Yendamuri S, Calin GA. The role of microRNA in human leukemia: a review. Leukemia. 2009;23(7):1257-63.
142. Wang G, Zhao R, Zhao X, Chen XI, Wang D, Jin Y, et al. MicroRNA-181a enhances the chemotherapeutic sensitivity of chronic myeloid leukemia to imatinib. Oncol Lett. 2015;10(5):2835-41.
143. Wang L, Wang Y, Lin J. MiR-152-3p promotes the development of chronic myeloid leukemia by inhibiting p27. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2018;22(24):8789-96.
144. Agarwal A, Mackenzie RJ, Besson A, Jeng S, Carey A, LaTocha DH, et al. BCR-ABL1 promotes leukemia by converting p27 into a cytoplasmic oncoprotein. Blood. 2014;124(22):3260-73.
145. Xie S, Lin H, Sun T, Arlinghaus RB. Jak2 is involved in c-Myc induction by Bcr-Abl. Oncogene. 2002;21(47):7137-46.
146. Wang L, Li L, Guo R, Li X, Lu Y, Guan X, et al. miR-101 promotes breast cancer cell apoptosis by targeting Janus kinase 2. Cell Physiol Biochem. 2014;34(2):413-22.
147. Zhu X, Lin Z, Du J, Zhou X, Yang L, Liu G. Studies on microRNAs that are correlated with the cancer stem cells in chronic myeloid leukemia. Mol Cell Biochem. 2014;390(1-2):75-84.
148. Su R, Dong L, Zou D, Zhao H, Ren Y, Li F, et al. microRNA-23a, -27a and -24 synergistically regulate JAK1/Stat3 cascade and serve as novel therapeutic targets in human acute erythroid leukemia. Oncogene. 2016;35(46):6001-14.

149. Varambally S, Cao Q, Mani RS, Shankar S, Wang X, Ateeq B, et al. Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer. Science. 2008;322(5908):1695-9.
150. Fallah P, Amirizadeh N, Poopak B, Toogeh G, Arefian E, Kohram F, et al. Expression pattern of key microRNAs in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase. Int J Lab Hematol. 2015;37(4):560-8.