

BILTEK-VIII

INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CURRENT DEVELOPMENTS IN
SCIENCE, TECHNOLOGY AND SOCIAL SCIENCES



**Full Text
Book**

EDITORS:

Prof. Dr. Zeynep KARAÇOR

Prof. Dr. Burcu GÜVENEK

Prof. Dr. Süleyman KARAÇOR

ISBN: 978-625-7720-96-0

BİLTEK-VIII

INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CURRENT DEVELOPMENTS IN
SCIENCE, TECHNOLOGY AND SOCIAL SCIENCES

October 24-26, 2023- Paris- FRANCE



FULL TEXT BOOK

EDITORS:

Prof. Dr. Zeynep KARAÇOR

Prof. Dr. Burcu GÜVENEK

Prof. Dr. Süleyman KARAÇOR

All rights of this book belong to ISPEC.
Without permission can't be duplicate or copied. Authors
are responsible both ethically and juridically ISPEC

Publications – 2023 ©

Issued: 20.11.2023

ISBN: 978-625-7720-96-0

Bu Kitabın Tüm Hakları ISPEC Yayınevi'ne aittir.
Yazarlar etik ve hukuki olarak eserlerden sorumludurlar.

ISPEC Yayınevi – 2023 ©

Yayın Tarihi: 20.11.2023

ISBN: 978-625-7720-96-0

SYMPOSIUM ID

SYMPOSIUM TITLE

BILTEK VIII-International Symposium on Current Developments in Science, Technology and Social Sciences

DATE AND PLACE

October 24-26, 2023 / Paris

ORGANIZATION

Economic Development and Social Research Institute

ORGANIZING COMMITTEE

Dr. Ethem İlhan ŞAHİN
Dr. Hülya BİNGÖL
Dr. Sümeyye ALTIPARMAK
Dr. Terane NAGIYEVA
Dr. Baurcan BOTAKARAYEV
Dr. Froilan MOBO
Dr. Violla MAKHZOUM
Dr. Sehrane KASİMİ
Elvan CAFEROV
Congress General Coordinator
Merve KIDIRYUZ

PARTICIPANTS COUNTRY (20 country)

Türkiye, Azerbaijan, Iran, Russia, Nigera, Vietnam, India, Indonesia, Pakistan, Romania, Morocco, France, Bulgaria, Ukraine, Kosova, Portugal, Moldova, Holland, Serbia, Croatia.

Prof. Dr. Nihat ŐİMŐEK
Gaziantep University

Prof. Dr. Sarash KONYRBAEVA
Kazak State Pedagogy University

Prof. Dr. Ahmet KAYA
KahramanmaraŐ Sütçü İmam University

Prof. Dr. Abdulhamit SİNANOĐLU
KahramanmaraŐ Sütçü İmam University

Prof. Dr. Ali BOZKURT
Gaziantep University

Prof. Dr. Duran AYDINÖZÜ
Kastamonu University

Prof. Dr. Erkan DİNÇ
UŐak University

Prof. Dr. Habib ÖZKAN
Gaziantep University

Prof. Dr. İsmail ARSLANTAŐ
Mersin University

Assoc. Prof. Dr. Ahmet İhsan KAYA
Gaziantep University

Assoc. Prof. Dr. Dinara FARDEEVA
Rusya Bilimler Akademisi

Assoc. Prof. Dr. Günay Abdiyeva ALİYEVA
Azerbaijan Ministry of Intenal Affairs

Assoc. Prof. Dr. Mahmut DÜNDAR
Van Yüzüncüyıl University

Assoc. Prof. Dr. Cengiz Özmen
KahramanmaraŐ Sütçü İmam University

Assoc. Prof. Dr. Emine Gül ÖZENÇ
Niğde Ömer Halisdemir University

Assoc. Prof. Dr. İsmail Hakan AKGÜN
Adıyaman University

Assoc. Prof. Dr. Serkan NAKTİYOK
Ataturk University

Assoc. Prof. Dr. Mehmet MUAT
Gaziantep University

Assoc. Prof. . Dr. Murat ESKİL
Aksaray University

Assoc. Prof. Dr. Mustafa ERCENGİZ
Ağrı İbrahim Çeçen University

Assoc. Prof. Dr. Ökkeş KESİCİ
Burdur Mehmet Akif Ersoy University

Assoc. Prof. Dr. Rasim TÖSTEN
Siirt University

Assoc. Prof. Dr. Pelin Özkartepe
Gaziantep University

Assoc. Prof. Dr. Pınar Gül
Atatürk University

Assoc. Prof. Dr. Şeyda Gül
Atatürk University

Assoc. Prof. Dr. Ömür Munzur
Başkent University

Assoc. Prof. Dr. Hakan AYDIN
Atatürk University

Assoc. Prof. Dr. Mehtap KAVURMACI
Atatürk University

Assoc. Prof. Aysel Güven
Başkent University

Assoc. Prof. Dr. Emin ŞENGÜL
Atatürk University

Assoc. Prof. Dr. Grozi DELCHEV
Trakia University

Dr. Ömer ERDİMEZ
Adıyaman University

Dr. Ahmet ONAY
Eskişehir Teknik University

Dr. Sadiye KAYAARSLAN
Kırıkkale University

Dr. C.VIJAI
Institute of Higher Education and Research, Department of Commerce

Dr. Kübra İRDAY DEMİR
Adana City Training and Research Hospital

Dr. M. Cenk BELİBAĞLI
Adana City Training and Research Hospital

Dr. Mehmet Emin KALGI
Çukurova University

Dr. Sedat EROL
Adıyaman University

Dr. Bauyrzhan BOTAKARAYEV
H.Ahmet Yesevi Uluslararası Kazak-Türk University

MİYELOİD MALİGNİTELERDE, TET2 ve DNMT3A GENLERİ İLE hsa-miR-29 İFADE DÜZEYLERİNİN ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF TET2 AND DNMT3A GENES AND hsa-miR-29 EXPRESSION LEVELS IN MYELOID MALIGNANCIES

Uzm. Biyolog Besime Deniz BABACAN

Besime Deniz BABACAN, Özlem İZCİ AY, Kenan ÇEVİK, M. Ertan AY, Anıl TOMBAK, Didem DERİCİ YILDIRIM, M. Emin ERDAL

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

ORCID NO: 0000-0002-2343-3285

ÖZET

Hematolojik maligniteler, kemik iliğinde bulunan miyeloid veya lenfoid hücrelerin kontrolsüz ve aşırı çoğalmasına bağlı olarak gelişen hastalıktır. Son on yılda yapılan çalışmalarla hematolojik malignitelerin patobiyolojisi daha iyi anlaşılacakla birlikte prognostik faktörleri de belirlenmeye başlanmıştır. Özellikle genlerdeki ekzon ve onları çevreleyen intron bölgelerinin taranması ile yapılan hedeflenmiş dizi analizlerinin geliştirilmesiyle hastalık hakkında daha fazla bilgi sahibi olmamız sağlanmıştır.

Bu çalışmada, Akut Miyeloid Lösemi (AML), Miyelodisplastik Sendrom (MDS), Kronik Miyeloid Lösemi (KML), Esansiyel Trombositoz (ET) ve Polisitemi Vera (PV) hastalarında, DNA metilasyonunda önemli rol oynayan *TET2* ve *DNMT3A* genlerinin ve hematopoetik farklılaşmalarda etkin rol oynayan miR29'ların ekspresyon düzeyleri, hastalardan alınan kemik iliği örneklerinde real- time kantitatif PCR yöntemi ile araştırıldı.

Çalışma grubumuza, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi İç Hastalıkları Bölümü Hematoloji Bilim Dalı'na başvuran ve tanı alan, 28 AML, 34 MDS, 19 KML, 10 ET ve 11 PV olmak üzere toplam 102 hasta ve 13 kontrol grubu dâhil edildi. Hasta ve sağlıklı bireylerden alınan kemik iliği örneklerinden total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi gerçekleştirildi. Saptanan ekspresyon düzeyleri; hasta ve kontrol grupları arasında, SPSS-11.5 Windows veya Statistica 6.1 paket programlar kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirildi.

Araştırma sonuçlarına göre *DNMT3A* ($p < 0,001$), *TET2* ($p < 0,001$), *miR-29a* ($p < 0,001$), *miR-29b* ($p < 0,001$) ve *miR-29c*'nin ($p < 0,001$) ifade düzeylerindeki tüm gruplar kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu. *DNMT3A*, *TET2*, *miR-29a*, *miR-29b* ve *miR-29c*'nin ifadelerinin korelasyonları incelendiğinde; *DNMT3A* sırasıyla *miR-29a,b,c* ve *TET2* ile korele bulundu. *TET2* sırasıyla *miR-29a,b,c* ile korele bulundu. *miR-29a,b,c* kendi aralarında korele bulundu.

Bu çalışmada, *TET2* ve *DNMT3A* genlerinin ifade düzeylerinin değişimi saptanmış olup, bu iki geni en yüksek skorla (> 97) hedefleyen, post translasyonel kontrolleri sağlayan miR'lerin ifade düzeylerinin etkisi araştırılmıştır. Bulunan sonuçlar doğrultusunda saptanan değişimlerin, klinik anlamda miyeloid malignitelere birer biyobelirteç olup olmayacağına dair literatüre katkı sunabileceğini düşünmekteyiz. Aynı zamanda miR'lerin ifade düzeylerinin etkisinde, hastalığın tanı ve tedavisinde önemli bir veri olduğunu düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Miyeloid malignite, *TET2*, *DNMT3A*, *miRNA*, Ekspresyon

ABSTRACT

Hematological malignancies are a disease that develops due to uncontrolled and excessive proliferation of myeloid and lymphoid cells in the bone marrow. Although the pathobiology of hematological malignancies has been better understood with the studies conducted in the last decade, prognostic factors have begun to be determined. With the development of targeted sequence analysis, especially by scanning the exons in the genes and the intron regions surrounding them, we have provided more information about the disease.

In this study, in patients with Acute Myeloid Leukemia (AML), Myelodysplastic Syndrome (MDS), Chronic Myeloid Leukemia (CML), Essential Thrombocytosis (ET) and Polycythemia Vera (PV) patients, the expression levels of *TET2* and *DNMT3A* genes, which play an important role in DNA methylation, and miR29s, which play an active role in hematopoietic differentiation, were investigated by real-time quantitative PCR method in bone marrow samples taken from patients.

To our working group, a total of 102 patients, 28 AML, 34 MDS, 19 CML, 10 ET and 11 PV, and 13 control groups, who applied and diagnosed to the Department of Hematology, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Research and Application Hospital, Mersin University. Total RNA isolation and cDNA synthesis were performed from bone marrow samples taken from patients and healthy individuals. Detected expression levels; It was evaluated statistically between patient and control groups using SPSS-11.5 for Windows or Statistica 6.1 package programs.

According to the results of the study, when all groups in expression levels of *DNMT3A* ($p < 0,001$), *TET2* ($p < 0,001$), *miR-29a* ($p < 0,001$), *miR-29b* ($p < 0,001$) and *miR-29c* ($p < 0,001$) were compared was found to be statistically significant. When the correlations of the expressions of *DNMT3A*, *TET2*, *miR-29a*, *miR-29b* and *miR-29c* were examined; *DNMT3A* was correlated with *miR-29a,b,c* and *TET2*, respectively. *TET2* was correlated with *miR-29a,b,c*, respectively. *miR-29a,b,c* correlated among themselves, *miR-29a,c* and *miR-29b,c* were found.

In this study, the changes in the expression levels of *TET2* and *DNMT3A* genes were determined, and the effect of the expression levels of miRs that target these two genes with the highest score (> 97) and provide post-translational controls were investigated. We think that the

changes detected in line with the results may contribute to the literature on whether they can be clinical biomarkers in myeloid malignancies. At the same time, we think that the effect of the expression levels of miRs is an important data in the diagnosis and treatment of the disease.

Keywords: Myeloid malignancy, *TET2*, *DNMT3A*, *miRNA*, Expression

GİRİŞ

Hematopoez, memeli kan hücrelerinin yaşam boyu rejenerasyonunu sürdürebilmek için hem kendini yenileme hem de hematopoetik kök hücrelerin (HKH) iyi düzenlenmiş farklılaşma sürecini gerektiren oldukça dinamik bir gelişim sürecidir [1]. Hematopoez, insan sağlığı için çok önemlidir. Kan ve bağışıklık sistemleri vücuda oksijen ve besin sağlamaktan, yara iyileşmesini desteklemekten ve patojenlerle savaşmaktan sorumludur. Bu işlevler, hematopoetik sistemi oluşturan çeşitli hücre tipleri tarafından gerçekleştirilir. Bunlar, kırmızı kan hücreleri (alyuvar), trombositler, doğuştan gelen bağışıklık hücreleri (nötrofiller, monositler, vb.) ve adaptif bağışıklık hücreleridir (T hücreleri ve B hücreleri) [2].

Tüm kan hücresi tipleri, yetişkin hematopoezinin önemli bir bölgesi olan kemik iliğinde bulunan HKH'den kaynaklanır [3]. Memeli yetişkinlerde, HKH'ler nispeten hareketsiz bir durumda bulunurlar, hem kendini yenileme hem de çok potansiyelli yeteneklerini korurken, kemik iliğinde ömür boyu bakımlarını sağlarlar. HKH'lerin kendini yenileme ve farklılaşma potansiyeli arasında dinamik denge bozulduğunda, yaşamı tehdit eden hematolojik bozukluklar meydana gelebilmektedir [1,2].

Hematolojik maligniteler (HM'ler), kan hücresi gelişiminin herhangi bir aşamasında ortaya çıkabilir ve kan hücrelerinin üretimini ve işlevini etkileyerek enfeksiyonlarla savaşmama veya kontrolsüz kanamaya yatkınlık gibi sonuçlar doğurabilir. Kemik iliğindeki HKH'ler, miyeloid veya lenfoid soyların, olgunlaşmamış progenitör hücrelerinin çoğalmasına neden olur. Normal hematopoetik farklılaşmanın bozulması klinikte, lösemi, lenfoma ve miyelom olmak üzere üç ana tip kan kanseri ile sonuçlanabilir. Lösemiye, kemik iliğinde aşırı miktarda anormal beyaz kan hücresi üretimi neden olur ve bu da kanda lösemik hücrelerin dolaşımına neden olur. Lösemi, neoplastik hücrelerin, soyuna ve klinik seyrine bağlı olarak kategorize edilir [1].

Miyelodisplastik Sendromlar (MDS) ve Akut Miyeloid Lösemi (AML), kemik iliğindeki hematopoetik kök hücrelerle yakından ilişkili olan bozukluklardır. AML, miyeloblastların farklılaşması ve hiperproliferasyonu ile karakterize edilirken, MDS, kemik iliği kök hücrelerinin displazisi ile birlikte miyeloblastın bir miktar dediferansiye olması ve hiperproliferasyonu ile karakterize edilir. AML, de novo veya önceden var olan MDS veya Miyeloproliferatif Neoplazmalardan (MPN) gelişebilir. Kronik MPN'ler ise, olgun periferik kan hücrelerinin aşırı üretimi ile karakterize edilir. MPN'lerden biri olan Kronik Miyeloid Lösemi (KML), kromozom 9 üzerindeki ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase (ABL1) geninin, kromozom 22 üzerindeki BCR activator of RhoGEF and GTPase (BCR) genine translokasyonu ile karakterize edilir. Böylece Philadelphia kromozomu ve onkojenik BCR-ABL füzyon proteini oluşturulur. Philadelphia kromozomu negatif (Ph-neg) MPN'ler, Esansiyel Trombositemi (ET), Polisitemiya Vera (PV) ve Primer Miyelofibroz (PMF) olmak üzere üç temel bozukluğu oluşturur [4].

Moleküler biyolojik çalışmalar, hematolojik malignitelerin mekanizmasını aydınlatmak ve patolojisine ışık tutmak için önemli bir yere sahiptir [5]. Malignitelerin sınıflandırılmasında ve

prognostik faktörlerinin belirlenmesinde önemli rol oynar. Akut lösemilerin patogenezi ve hücre biyolojisini anlamak için en yaygın olarak klasik karyotipleme, Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) veya Real-time PCR (RT-PCR) gibi moleküler teknikler kullanılabilmektedir [6]. Sitogenetik testin, miyeloid malignitelerde risk sınıflandırmasının temel taşı olduğu söylenmektedir [7]. Çeşitli çalışmalar, sitogenetik değişikliklerin (kromozomal translokasyonlar ve genetik materyal kaybı veya kazancı gibi) moleküler belirteçlerle karşılaştırıldığında hastalığın prognozunu doğru belirleyebileceğini göstermektedir. cDNA mikrodizileri gibi gen ifadesinin değerlendirilmesi için yeni tekniklerin geliştirilmesi ile hem hematolojik malignitelerde hem de solid tümörlerde kanserin teşhisi, sınıflandırılması ve prognozunda büyük ilerlemeler sağlanmıştır [6].

Son yıllarda, moleküler biyoloji teknikleri sayesinde farklı epigenetik değiştiricilerdeki mutasyonlar da tespit edilmiştir. Bu epigenetik değiştiricilerin değişen fonksiyonları, gen aktivasyonu ve gen baskılanması arasındaki fizyolojik dengeyi bozar ve anormal gen ifade düzenlemesine katkıda bulunur [6]. Bir dizi sekanslama çalışmaları ile miyeloid malignitelerde *DNA Metiltransferaz 3 Alfa (DNMT3A)* ve *Ten-Eleven Translocation 2 (TET2)* genlerinin epigenetik modifikasyonlarla sıklıkla mutasyonlardan etkilendiği gözlenmiştir [7,8]. *DNMT3A*, hedef DNA'da DNA metilasyonunu katalize eden de novo metiltransferazlardır. *TET2*, 5-metil sitozinin (5-mC) 5-hidroksimetil sitozine (5-hmC) dönüşümünü katalize ederek DNA demetilasyonunda merkezi bir rol oynayan bir enzimdir [8]. *DNMT3A* ve *TET2* genlerinde meydana gelen mutasyonların, kemik iliğinde anormal HKH birikmesine neden olduğu ve böylece hastalık riskini arttırdığı söylenmektedir [6].

Yapılan moleküler çalışmalar mikroRNA'ların (miRNA'lar) Akut Miyeloid Lösemi (AML), Miyelodisplastik Sendrom (MDS) ve Miyeloproliferatif Neoplazmalar (MPN) dahil miyeloid malignitelerde önemli role sahip olduğunu öne sürmektedir [9]. miRNA'lar, gen ifade modellerini ve hücrel mRNA'yı hedefleyen, gen ifadesinin önemli epigenetik düzenleyicileri olarak görev yapan, kısa kodlanmayan RNA'lardır. Genomun protein kodlayan genlerin intronlarında veya ekzonları içinde kodlanırlar ve diğer epigenetik düzenleyicileri düzenleyen posttranskripsiyonel gen susturma ve protein kodlama genlerinin ifadesini modüle ederler [6]. Farklı lösemik alt tiplerin farklı miRNA ifade profillerine sahip olduğu düşünülmektedir [9].

Bu çalışmada, miyeloid malignitesi olan bireylere ait koleksiyon kemik iliği örneklerinden *TET2*, *DNMT3A* genleri ve bu genleri hedefleyen ortak miR'lerin (*miR29a-3p*, *29b-3p* ve *29c-3p*) ifade düzeyindeki farklılıkların araştırılması amaçlanmıştır. Klinik anlamda bu değişimin miyeloid malignitelerde birer biyobelirteç olup olamayacağına dair literatüre katkı sunmak amaçlanmıştır. Aynı zamanda, her iki geni de en yüksek skorla (>97) hedefleyerek post translasyonel kontrollerini sağlayan miR'lerin ifade düzeylerinin etkisi de araştırılmak istenmiştir.

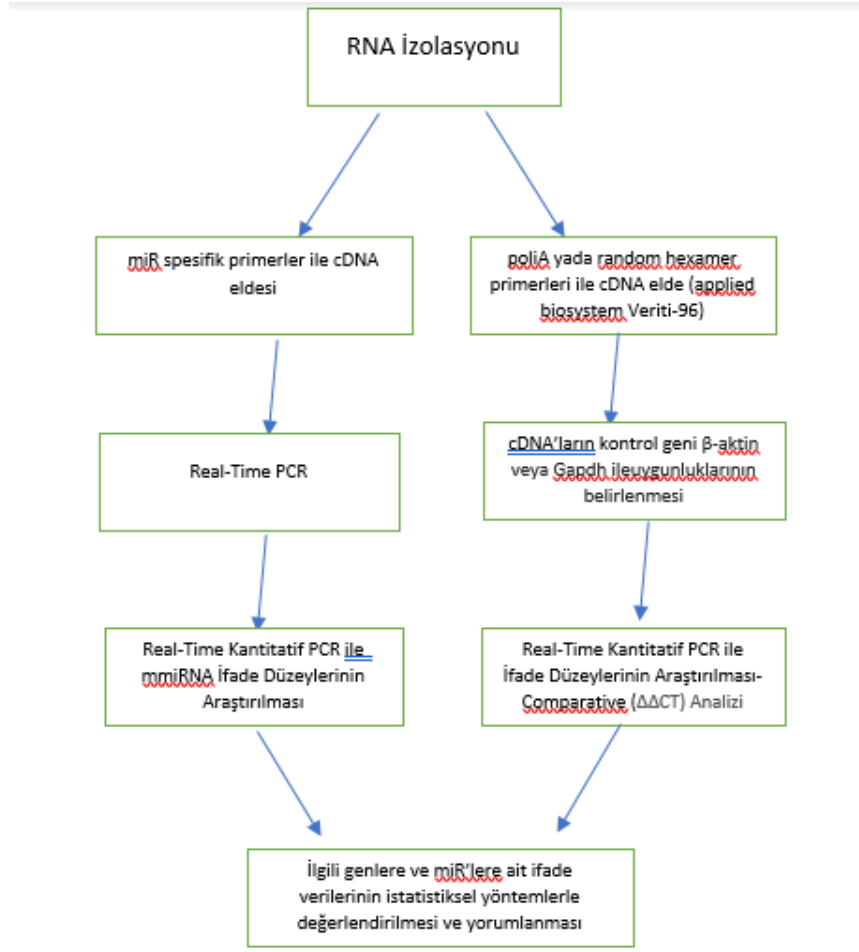
YÖNTEM

Kontrol ve Hasta Grubunun Seçimi

Çalışmamıza, miyeloid malignite tanısı almış (28 AML, 19 KML, 34 MDS, 11 PV ve 10 ET) 102 gönüllü hastaya ait, rutin amaçlı alınmış koleksiyon kemik iliği örnekleri dahil edilmiştir. 13 örnekten oluşan kontrol grubumuz ise; herhangi bir hematolojik malignite tanısı almayan hastaların kardiyovasküler cerrahi sırasında sternumlarının kesilmesiyle operasyon alanına sızan ve herhangi bir tanısız ya da tedavi değeri olmayan, cerrah tarafından aspire edilerek atılan

kemik iliği örneğinden oluşmaktadır. Çalışmamız, aşağıdaki iş akış şemasında gösterilen temel basamaklar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışma Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından (proje No: 2020-1-TP2-4003) desteklenmiştir.



MOLEKÜLER GENETİK ANALİZİ

Hsa-miR-29 ailesinin (*miR-29a*, *miR-29b* ve *miR-29c*), *TET2* ve *DNMT3A* genlerinin AML, KML, MDS, ET ve PV hastalarında ve kontrol grubunda ifade değişimleri Real-Time PCR yöntemi ile belirlendi. Ct değerleri üzerinden $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri hesaplandı. Elde edilen verilerin dağılımı Shapiro Wilk testi ile kontrol edilmiştir. Sayısal değişkenler normal varsayımının sağlanıp sağlanmadığına göre medyan [25P- 75P] veya ortalama±standart sapma şeklinde, kategorik değişkenler ise sayı ve yüzde cinsinden özetlenmiştir. İki'den fazla bağımsız grup karşılaştırması için Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Anlamlılık tespit edilen değişkenler için post-hoc test olarak Dunn-Bonferroni testi kullanılmış olup, Box-Whisker grafiği çizilmiştir. Yaş değerlerinin karşılaştırılması amacıyla ANOVA testi kullanılmıştır. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkiyi tespit etmek amacıyla ki-kare testinden yararlanılmıştır. Sürekli değişkenler arasındaki ilişkiyi tespit etmek amacıyla ise Spearman korelasyon katsayısından yararlanılmıştır. $p < 0,05$ istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edilmiştir.

BULGULAR**Çalışma Gruplarının Yaş ve Cinsiyet Bakımından Değerlendirilmesi**

Çalışma grubumuzda toplam 64 erkek birey ve 51 kadın birey bulunmaktadır. Cinsiyetlerin dağılımı ($p=0,142$) ve yaş değerleri bakımından ($p=0,071$) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur.

Genlerin İfade Değişimlerinin Değerlendirilmesi

Genlerin ifade seviyeleri ve gruplar arasındaki ifade değerlerinin değişimleri RQ değerlerine göre tespit edilmiştir. Tüm genler gruplara ayırmaksızın birlikte değerlendirildiğinde, gruplar arasında tüm genler için ifade düzeyleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p<0,001$).

DNMT3A İfade Seviyesindeki Değişimlerinin Değerlendirilmesi

DNMT3A geninin ifade seviyesi kontrol grubuna göre tüm hastalık grubunda azalmış olarak bulundu. Hastalık grupları arasında kıyaslama yapıldığında AML grubuna kıyasla KML, MDS, ET ve PV gruplarında daha az *DNMT3A* ifadesi bulundu. *DNMT3A* ifadesi PV grubuna kıyasla daha fazla ET ifade seviyesi bulundu. Son olarak MDS grubuna kıyasla daha az KML, ET ve PV grubu bulundu. Tablo 1’de görüldüğü gibi, *DNMT3A* geni ifade değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0,001$).

Tablo 1: *DNMT3A* gen ifadesinin gruplar arasında kıyaslanması.

Grup1-2	İstatistik Test	Standart Hata	Standart İstatistik Test	P Değeri	Adj. P Değeri
ET- Kontrol	-53,269	14,024	-3,798	0,001	,002
ET-PV	-3,136	14,568	-,215	,830	1,000
ET-KML	-12,974	13,026	-,996	,319	1,000
ET-MDS	-17,206	11,994	-1,435	,151	1,000
ET-AML	-36,750	12,283	-2,992	,003	,042
PV- Kontrol	-50,133	13,659	-3,670	0,001	,004
PV-KML	9,837	12,632	,779	,436	1,000
PV-MDS	14,070	11,565	1,217	,224	1,000
PV-AML	33,614	11,864	2,833	,005	,069
KML-Kontrol	-40,296	12,001	-3,358	,001	,012
KML-MDS	-4,232	9,550	-,443	,658	1,000
KML-AML	23,776	9,910	2,399	,016	,246
MDS-Kontrol	-36,063	10,872	-3,317	,001	,014
MDS-AML	19,544	8,509	2,297	,022	,324
AML- Kontrol	-16,519	11,190	-1,476	,140	1,000

TET2 İfade Seviyesindeki Değişimlerinin Değerlendirilmesi

TET2 geninin ifade seviyesi kontrol grubuna göre AML, KML, MDS ve ET gruplarında artmış olarak bulundu. Diğer yandan kontrol grubuna kıyasla PV grubunda azalmış olarak bulundu. Hastalık grupları arasında kıyaslama yapıldığında AML grubunda KML grubuna kıyasla daha fazla *TET2* ifadesi bulundu. AML grubuna kıyasla ise KML, MDS, ET ve PV gruplarında daha az *TET2* ifadesi bulundu. Son olarak ET grubunda PV grubuna kıyasla daha fazla *TET2* ifadesi bulundu. Tablo 2’de görüldüğü gibi, *TET2* geni ifade değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0,001$).

Tablo 2: *TET2* geni ifadesinin gruplar arasında kıyaslanması.

Grup1-2	İstatistik Test	Standart Hata	Standart İstatistik Test	P Değeri	Adj. P Değeri
PV- Kontrol	-34,965	13,659	-2,560	,010	,157
PV- MDS	31,008	11,565	2,681	,007	,110
PV-KML	41,273	12,632	3,267	,001	,016
PV-ET	44,973	14,568	3,087	,002	,030
PV-AML	55,130	11,864	4,647	0,001	0,001
MDS-Kontrol	-3,957	10,872	-,364	,716	1,000
MDS-KML	10,265	9,550	1,075	,282	1,000
MDS-ET	13,965	11,994	1,164	,244	1,000
MDS-AML	24,122	8,509	2,835	,005	,069
Kontrol-KML	6,308	12,001	,526	,599	1,000
Kontrol-ET	10,008	14,024	,714	,475	1,000
Kontrol-AML	20,165	11,190	1,802	,072	1,000
KML-ET	3,700	13,026	,284	,776	1,000
KML-AML	13,857	9,910	1,398	,162	1,000
ET-AML	-10,157	12,283	-,827	,408	1,000

miR-29a İfade Seviyelerindeki Değişimlerin Değerlendirilmesi

miR-29a ifade seviyesi kontrol grubuna göre KML, ET ve PV gruplarında azalmış olarak bulundu. Diğer yandan AML ve MDS gruplarında ise kontrol grubuna göre *miR-29a* ifadesi artmış olarak bulundu. Hastalık grupları arasında kıyaslama yapıldığında AML grubuna kıyasla KML, MDS, ET ve PV gruplarında *miR-29a* ifadesi azalmış olarak bulundu. AML grubunda diğer hastalık gruplarına göre daha fazla *miR-29a* ifadesi bulundu. Son olarak ET ve PV gruplarındaki *miR-29a* ifadesi kontrol grubuna göre oldukça az bulundu. Tablo 3’de görüldüğü gibi, *miR-29a* ifade değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p < 0,001$).

Tablo 3: *miR-29a* geni ifadesinin gruplar arasında kıyaslanması.

Grup1-2	İstatistik Test	Standart Hata	Standart İstatistik Test	P Değeri	Adj. P Değeri
PV-Kontrol	-40,385	13,903	-2,905	,004	,055
PV-AML	55,964	12,177	4,596	0,001	0,001
PV-ET	9,200	14,782	,622	,534	1,000
PV-KML	28,684	12,913	2,221	,026	,395
PV-MDS	38,765	11,890	3,260	,001	,017
ET-Kontrol	-31,185	13,903	-2,243	,025	,373
ET-AML	-46,764	12,177	-3,841	0,001	,002
ET-KML	-19,484	12,913	-1,509	,131	1,000
ET-MDS	-29,565	11,890	-2,486	,013	,194
KML-Kontrol	-11,700	11,897	-,983	,325	1,000
KML-AML	27,280	9,824	2,777	,005	,082
KML-MDS	-10,080	9,467	-1,065	,287	1,000
MDS-Kontrol	-1,620	10,778	-,150	,881	1,000
MDS-AML	17,200	8,435	2,039	,041	,622
Kontrol-AML	15,580	11,093	1,404	,160	1,000

miR-29b İfade Seviyelerindeki Değişimlerin Değerlendirilmesi

miR-29b ifade seviyesi kontrol grubuna göre KML, ET ve PV gruplarında artmış olarak bulundu. Diğer yandan AML ve MDS gruplarında ise kontrol grubuna göre *miR-29b* ifadesi azalmış olarak bulundu. Hastalık grupları arasında kıyaslama yapıldığında AML grubuna kıyasla KML, ET ve PV gruplarında *miR-29b* ifadesi artmış bulundu. Son olarak ET grubuna kıyasla PV grubunda *miR-29b* ifadesi artmış bulundu. Tablo 4’de görüldüğü gibi, *miR-29b* geni ifade değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p < 0,001$).

Tablo 4: *miR-29b* geni ifadesinin gruplar arasında kıyaslanması.

Grup1-2	İstatistik Test	Standart Hata	Standart İstatistik Test	P Değeri	Adj. P Değeri
AML-Kontrol	-42,920	11,190	-3,836	0,001	,002
AML-KML	-55,694	9,910	-5,620	0,001	0,001
AML-ET	61,036	12,283	4,969	0,001	0,001
AML-PV	-68,445	11,864	-5,769	0,001	0,001
AML-MDS	-19,036	8,509	-2,237	,025	,379
MDS-Kontrol	-23,885	10,872	-2,197	,028	,421
MDS-KML	36,658	9,550	3,838	0,001	,002
MDS-ET	42,000	11,994	3,502	0,001	,007
MDS-PV	-49,409	11,565	-4,272	0,001	0,001
Kontrol-KML	12,773	12,001	1,064	,287	1,000
Kontrol-ET	18,115	14,024	1,292	,196	1,000
Kontrol-PV	25,524	13,659	1,869	,062	,925
KML-ET	5,342	13,026	,410	,682	1,000
KML-PV	-12,751	12,632	-1,009	,313	1,000
ET-PV	-7,409	14,568	-,509	,611	1,000

miR-29c İfade Seviyelerindeki Değişimlerin Değerlendirilmesi

miR-29c ifade seviyesi kontrol grubuna göre KML, MDS, ET ve PV gruplarında azalmış olarak bulundu. Diğer yandan AML grubunda ise kontrol grubuna göre *miR-29c* ifadesi artmış olarak bulundu. Hastalık grupları arasında kıyaslama yapıldığında AML grubuna kıyasla diğer hastalık gruplarında *miR-29c* ifadesi azalmış olarak bulundu. Son olarak MDS, ET ve PV gruplarına kıyasla KML grubunda *miR-29c* ifadesi artmış bulundu. Tablo 5’de görüldüğü gibi, *miR-29c* geni ifade değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0,001$).

Tablo 5: *miR-29c* geni ifadesinin gruplar arasında kıyaslanması.

Grup1-2	İstatistik Test	Standart Hata	Standart İstatistik Test	P Değeri	Adj. P Değeri
PV-Kontrol	-53,643	13,659	-3,927	0,001	,001
PV-ET	7,182	14,568	,493	,622	1,000
PV-MDS	24,123	11,565	2,086	,037	,555
PV-KML	26,656	12,632	2,110	,035	,523
PV-AML	53,218	11,864	4,485	0,001	0,001
ET-Kontrol	-46,462	14,024	-3,313	,001	,014
ET-MDS	-16,941	11,994	-1,412	,158	1,000
ET-KML	-19,474	13,026	-1,495	,135	1,000
ET-AML	-46,036	12,283	-3,748	0,001	,003
MDS-Kontrol	-29,520	10,872	-2,715	,007	,099
MDS-KML	2,533	9,550	,265	,791	1,000
MDS-AML	29,095	8,509	3,419	,001	,009
KML-AML	26,562	9,910	2,680	,007	,110
KML-Kontrol	-26,988	12,001	-2,249	,025	,368
AML-Kontrol	-,426	11,190	-,038	,970	1,000

Gen İfade Seviyelerinin Birbiri İle Korelasyonu

Çalışmamızdaki *DNMT3A*, *TET2*, *miR-29a*, *miR-29b* ve *miR-29c* genlerinin ifadelerindeki değişimlerin birbiri ile ilişkili olup olmadığını her grup için araştırdık. Tablo 6’da görüldüğü gibi, ifade değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0,001$).

Tablo 6: Hasta ve kontrol grupları arasında *DNMT3A*, *TET2*, *miR-29a*, *miR-29b* ve *miR-29c*’nin korelasyon tablosu.

			Gen <i>DNMT3A</i>	Gen <i>TET2</i>	Gen <i>miR29a</i>	Gen <i>miR29b</i>	Gen <i>miR29c</i>
Spearman'ın rho'su	Gen_ <i>DNMT3A</i>	Korelasyon katsayısı	1,000	,097	,278**	-,072	,176
		Sig. (2-tailed)	.	,303	,003	,446	,059
		N	115	115	114	115	115
	Gen_ <i>TET2</i>	Korelasyon katsayısı					
		Sig. (2-tailed)	,303	.	0,001	,003	,001
		N	115	115	114	115	115
	Gen_ <i>miR29a</i>	Korelasyon katsayısı					
		Sig. (2-tailed)	,003	,000	.	0,001	,003
		N	114	114	114	114	114
	Gen_ <i>miR29b</i>	Korelasyon katsayısı					
		Sig. (2-tailed)	,446	,003	0,001	.	0,001
		N	115	115	114	115	115
	Gen_ <i>miR29c</i>	Korelasyon katsayısı					
		Sig. (2-tailed)	,059	,001	,003	0,001	.
		N	115	115	114	115	115

Kontrol Grubunun Gen İfade Seviyelerinin Birbiri İle Korelasyonu

Kontrol grubunda *DNMT3A*, *TET2*, *miR-29a*, *miR-29b* ve *miR-29c* genlerinin ifade seviyelerindeki değişimlerinin birbiri ile ilişkili olup olmadığı spearman korelasyonu ile istatistiksel olarak değerlendirildi ve ifade değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p < 0,001$).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Miyeloid maligniteler için birçok çalışma mevcuttur ve yapılan çalışmalar sayesinde bazı sitogenetik anormalliklerle birlikte birden fazla genin driver/non-driver mutasyona uğradığı, aynı zamanda miRNA'ların hematopoetik kök hücrede birçok geni kontrol ettiği ve ilgili genlerin ifade seviyesini etkilediği bu yüzden malignite gelişiminde rol oynadığı bilinmektedir. Bu mutasyonlar hastalık alt tipine göre ve her bir hastada farklılık göstermektedir. Hastalık tedavisi için birçok ilaç mevcuttur, fakat hastalarda zamanla ilaca karşı direnç artmaktadır. Bu yüzden yeni ilaçlar geliştirilmektedir ama daha etkili bir tedavi ve hastalıkta erken tanı için biyobelirteçlere ihtiyaç vardır [10-14]. Çalışmamızda, *TET2*, *DNMT3A* genleri ve bu genleri hedefleyen ortak miR'lerin (miR-29a-3p, 29b-3p ve 29c-3p) ifade düzeyindeki farklılıklarını araştırdık. Bu araştırma da amacımız; *TET2* ve *DNMT3A* genlerinin ifade düzeylerinin ne derece değişime uğradığını saptamak ve klinik anlamda bu değişimin miyeloid malignitelerde birer biyobelirteç olup olamayacağı sorusuna cevap aramaktı. Aynı zamanda, her iki geni de en yüksek skorla (>97) hedefleyen, post transkripsiyonel kontrolleri sağlayan miR'lerin ifade düzeylerinin etkisini de araştırmak amaçlanmıştır.

Çalışmamızda miyeloid malignite hastalarında *DNMT3A* geninde ifade değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p < 0,001$).

Na Lin ve ark. bir çalışmalarında *DNMT3A* varyantlarının alternatif eklenmesinin ifade seviyelerini değerlendirmeyi ve bunların AML'deki rollerini araştırmayı amaçlamıştır. *DNMT3A* varyantlarının gen ifadesini, hücre proliferasyonu üzerindeki etkilerini ölçerek değerlendirmişlerdir. Ek olarak, AML hastalarında *DNMT3A* varyantlarının ifadesini değerlendirmişlerdir. AML hücre hatlarında baskın dört *DNMT3A* varyantı tanımlamışlardır [15]. Başka bir çalışmada da, Samantha Bruno ve ark. *DNMT3A* protein ifadesindeki değişikliklerin CpG metilasyonunda gözlenen değişikliklerden sorumlu olduğunu

söylemektedirler [16]. Biz çalışmamızda; miyeloid malignite gruplarında *DNMT3A* genindeki ifade seviyesi azalmış olarak bulunmuştur. AML grubunda, diğer gruplara kıyasla daha fazla bir ifade düzeyi söz konusudur. Bu durumun *DNMT3A* varyantlarının olmasından ve AML alt tiplerinin bulunmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda *DNMT3A* mutasyonuna ve protein düzeyinde varyant proteinlerin varlığına bakmamış olmamız yorumlamamızı güçleştirmektedir.

Çalışmamızda *TET2* geninde ifade değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulduk ($p < 0,001$).

Araştırmacılar bebek AML'sinde yaptıkları çalışmada TET enzim ailesini, t(10;11) translokasyon kırılma noktasından klonlamıştır. Sonraki genomik analizlerle somatik mutasyonları ortaya çıkarmışlardır ve hematolojik neoplazmlarda zenginleştirilmiş bir dizi malignite boyunca TET ailesi üyelerinin ifadesini bastırıldığını gözlemlemişlerdir. İlginç bir şekilde, *TET2* mutasyonlarına sahip AML hastalarının çoğu, wild-type allel ifadesini korurken, hastaların sadece %10'u bialelik mutasyonlara sahip olduğunu görmüşlerdir. *TET2*'nin işlevi tam olarak bilinmemekle birlikte, bu veriler bir tümör baskılayıcı rolü ve *TET2* mutantlarında potansiyel olarak haplo yetmezlik işlev kaybı rolünü düşündürmektedir [17]. Biz çalışmamızda; miyeloid malignite gruplarında *TET2* genindeki ifade seviyesini PV grubunda azalmış, ET, KML, AML ve MDS grubunda ise artmış olarak bulduk. Bu durumun *TET2* fonksiyon kaybının malignitelerde değişkenlik gösteren, sitogenetik anormallik ve *TET2* geninde meydana gelen mutasyon sıklıklarından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Çalışmamızda *TET2* gen mutasyonuna bakmamış olmamız yorumlamamızı güçleştirmektedir. Önemli olarak, *TET2* geninin düşük ifade seviyeleri, mutasyonlardan bağımsızda olabilmektedir. *TET2* geninde nadiren mutasyona uğradığı bilinen bir popülasyon olan pediatrik MDS vakalarında *TET2* gen ifadesi ve 5-hmC seviyelerinin de azaldığını bulmuşlardır [18]. Biz çalışmamızda MDS gruplarında *TET2* ifade seviyesini artmış olarak bulduk. Bu durum, *TET2*'nin tek başına miyeloid maligniteye neden olamayacağından ve MDS grubundaki hasta sayımızın yetersiz olabileceğinden kaynaklanan bir sonuç olduğunu düşündürmektedir.

Hematolojik malignitelerde meydana gelen sitogenetik anormallik ve gen mutasyonları sonucunda genlerin ifade seviyelerindeki artış ya da azalış literatürde bahsedilmektedir. Bu nedenle, bulmuş olduğumuz *DNMT3A* ifadesindeki azalma ve *TET2* ifade seviyesinin maligniteler arasındaki değişkenliğin literatürdeki bu durum ile benzer olduğunu düşünmekteyiz. Fakat gen mutasyonlarına bakmamış olmamız yorumlamamızı güçleştirmektedir. Miyeloid malignitelerde *DNMT3A* ve *TET2* ifadelerindeki düzensizliğe neden olabilecek miRNA ifade seviyelerini araştırmak için, *DNMT3A* ve *TET2* genini en çok skorla hedefleyen miR-29 ailesini seçtik.

Çalışmamızda *miR-29a*, *miR-29b* ve *miR-29c*'nin ifade değerleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır ($p < 0,001$).

Bazı çalışmaların sonuçları ile ilgili olarak, *DNMT3A*'nın düşük ifadesi, tümör progresyonunun artması ve hastaların zayıf sağkalımı ile ilişkilidir; buna göre çeşitli miRNA'lar bu geni hedefleyebilir ve bu nedenle kanserde bu epimiRNA'ların aşağı regülasyonu tahmin edilebilir. miR-29 ailesi (a, b ve c), *DNMT3A*'yı hedefleyen ve düzenleyen epimiRNA'lardan biridir. AML üzerinde yapılan bir deney, *miR-29b*'nin DNA metilasyonunu azaltabileceğini ve *DNMT3A* ve *DNMT3B*'nin doğrudan down regülasyonu yoluyla *p15* ve *ESR1* ifadesini artırabileceğini göstermişlerdir. Salati et al. KML lösemik kök hücrelerde *miR-29a*'nın yukarı regülasyonunun,

TET2 geninin doğrudan hedeflenmesi yoluyla tirozin kinaz inhibitörleri direncine yol açtığını göstermiştir [19]. Bizim çalışmamızda da; AML grubunda, *DNMT3A* ile *miR-29c* ve *miR-29b* arasında orta düzeyde negatif yönde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmuştur. KML grubunda ise, *miR-29a* ve *miR-29c* arasında iyi düzeyde pozitif yönde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmaktadır. Aynı zamanda *miR-29a* ifadesi kontrol grubuna kıyasla; AML ve MDS'de artmış, KML, ET ve PV'de azalmış olarak, *miR-29b* ifadesi; AML ve MDS'de azalmış, KML, ET ve PV'de artmış, *miR-29c* ifadesi; AML'de artmış, KML, MDS, ET ve PV'de azalmış olarak bulunmuştur. Literatürde de farklılık gösteren *miR-29* ifade sonuçları tartışılmalı olduğundan, bu farklılığın hastalık alt tiplerinden ve hedefledikleri genlerden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

DNMT3A ve *TET2* genlerini en yüksek skorla hedefleyen *miR-29* ailesinin miyeloid maligniteler için birer biyobelirteç olabileceğini düşünmekteyiz. Fakat, mutasyon ve protein düzeyinde varyant proteinlerin varlığının, özellikle *miR-29* ailesinin miyeloid maligniteler üzerindeki etkilerinin daha kapsamlı araştırmaları gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- [1]. Hu, D., Shilatifard, A. (2016). Epigenetics of hematopoiesis and hematological malignancies. *Genes & development*, 30(18), 2021-2041.
- [2]. Luis, T. C., Wilkinson, A. C., Beerman, I., Jaiswal, S., Shlush, L. I. (2019). Biological implications of clonal hematopoiesis. *Experimental hematology*, 77, 1-5.
- [3]. Rieger, M. A., Schroeder, T. (2012). Hematopoiesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(12), a008250.
- [4]. Holmström, M. O., Hasselbalch, H. C. (2019, January). Cancer immune therapy for myeloid malignancies: present and future. In *Seminars in immunopathology* (Vol. 41, No. 1, pp. 97-109). Springer Berlin Heidelberg.
- [5]. Hansen, M. C., Haferlach, T., Nyvold, C. G. (2020). A decade with whole exome sequencing in haematology. *British journal of haematology*, 188(3), 367-382.
- [6]. Cruz-Rodriguez, N., Combita, A. L., Zabaleta, J. (2018). Epigenetics in hematological malignancies. *Cancer Epigenetics for Precision Medicine*, 87-101.
- [7]. Docking, T. R., Karsan, A. (2019). Genomic testing in myeloid malignancy. *International journal of laboratory hematology*, 41, 117-125.
- [8]. Sato, H., Wheat, J. C., Steidl, U., Ito, K. (2016). DNMT3A and TET2 in the pre-leukemic phase of hematopoietic disorders. *Frontiers in oncology*, 6, 187.
- [9]. Ciccone, M., Adrian Calin, G. (2015). MicroRNAs in myeloid hematological malignancies. *Current genomics*, 16(5), 336-348.
- [10]. Bose, P., Vachhani, P., Cortes, J. E. (2017). Treatment of relapsed/refractory acute myeloid leukemia. *Current treatment options in oncology*, 18(3), 1-30.
- [11]. Short, N. J., Rytting, M. E., Cortes, J. E. (2018). Acute myeloid leukaemia. *The Lancet*, 392(10147), 593-606.

- [12]. Osman, A. E., Deininger, M. W. (2021). Chronic myeloid leukemia: modern therapies, current challenges and future directions. *Blood Reviews*, 49, 100825.
- [13]. Steensma, D. P. (2018). Myelodysplastic syndromes current treatment algorithm 2018. *Blood cancer journal*, 8(5), 1-7.
- [14]. Venugopal, S., Mascarenhas, J. (2020). Novel therapeutics in myeloproliferative neoplasms. *Journal of Hematology & Oncology*, 13(1), 1-13.
- [15]. Lin, N., Fu, W., Zhao, C., Li, B., Yan, X., Li, Y. (2017). Biologico-clinical significance of DNMT3A variants expression in acute myeloid leukemia. *Biochemical and biophysical research communications*, 494(1-2), 270-277.
- [16]. Bruno, S., Bochicchio, M. T., Franchini, E., Padella, A., Marconi, G., Ghelli Luserna di Rorà, A., Martinelli, G. (2019). Identification of Two DNMT3A Mutations Compromising Protein Stability and Methylation Capacity in Acute Myeloid Leukemia. *Journal of oncology*, 2019.
- [17]. Bowman, R. L., Levine, R. L. (2017). TET2 in normal and malignant hematopoiesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 7(8), a026518.
- [18]. Gurnari, C., Pagliuca, S., Visconte, V. (2021). The Interactome between Metabolism and Gene Mutations in Myeloid Malignancies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3135.
- [19]. Karimzadeh, M. R., Pourdavoud, P., Ehtesham, N., Qadbeigi, M., Asl, M. M., Alani, B., Pakzad, B. (2021). Regulation of DNA methylation machinery by epi-miRNAs in human cancer: emerging new targets in cancer therapy. *Cancer Gene Therapy*, 28(3), 157-174.