ANKARA ÜNİVERSİTESİ

BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

DOKTORA TEZİ

FOLİKÜLER LENFOMALARDA SİRTUİN GEN İFADE PROFİLİ

Laleh Madayen Shishevan

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Gülşah Kaygusuz

Temmuz

2022

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Laleh Madayen Shishevan

İmzası

ONAY

Prof. Dr. Gülşah Kaygusuz danışmanlığında Laleh Madayen Shishevan tarafından hazırlanan bu çalışma 19/07/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. AYŞEGÜL ÜNER İmza:

Üye: Prof. Dr. Fulya ÖZ PUYAN İmza:

Üye: Prof. Dr. Gülşah KAYGUSUZ İmza:

Üye: Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ SEVGİLİ İmza:

Üye: Prof. Dr. Işınsu KUZU İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

Foliküler lenfomalarda *sirtuin* gen ifade profili

Laleh Madayen Shishevan

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Gülşah Kaygusuz

Foliküler lenfoma (FL) germinal merkez B hücrelerinden kaynaklanan Hodgkin dışı lenfomanın (NHL) ikinci en yaygın türüdür. Süreçte vakalar klinik seyri artan ve azalan bir seyir izlese de vakaların birçoğu zaman içerisinde nüks edip sonuçta %30'u DBBHL gibi daha agresif lenfomalara dönüşürler. Hastalık histolojik olarak FL 1, 2, 3A (düşük derece) ve 3B (yüksek derece) olarak derecelendirilir. t(14;18)(q32;21) translokasyonu FL hastalarında en sık rastlanan genetik değişikliktir. Ancak hastalığın klonal gelişiminde başka genetik değişimlerin de bulunduğu bilinmektedir. Benzer vakaların zaman içerisinde farklı prognoz göstermesi bu hastalığın bireylerde farklı moleküler değişiklikler üzerinde geliştiğini göstermektedir. FL patogenezinde bulunan moleküler değişikliklerin anlaşılması, saptanması ve klinik risk faktörleri ile korelasyonu, bu hastalığın prognozunun öngörülmesinde faydalı olabilir. Son yıllardaki çalışmalar, FL patogenezinde epigenetik bileşenlerde oluşan deregülasyonların özellikle FL'nin başlangıcında katkıda bulunduğunu göstermiştir. Nikotinamid adenin dinükleotit (NAD^+) bağımlı enzimlerin bir ailesi olan sirtuinler histonların ve transkripsiyon faktörlerinin hedeflenmesiyle epigenetik düzenlenmede rol oynar. Sirtuinlerin rolü hematolojik malignitelerde solid kanserlere kıyasla daha az araştırılmıştır. Diğer yandan bugüne dek insanda yedi sirtuin geni tanımlanmıştır ancak bu genlerin FL'de etki ve rolleri henüz belirsizdir.

Bu bilgilere dayanarak, FL patogenezi ve prognozunda katkısı olduğu düşünülen *SIRT1-7* genlerin qRT-PCR yöntemiyle mRNA düzeyindeki ifade değişimleri, 32 FL vakası ve kontrol grubunu oluşturan 10 foliküler hiperplazi vaka üzerinde incelenmesi ve elde edilen sonuçların hastaların klinikopatolojik parametreler ile ilişkilerinin saptanması hedeflenmiştir. Bu analizler sonucunda, *SIRT6* geninde yüksek dereceli hastalarda düşük dereceli ve kontrol grubuna göre ifade artışı gözlenmiştir. 65 yaş ve üstü hastalarda *SIRT6* geninin artmış ifadesi saptanmıştır. Korelasyon analizleri sonucu SIRT6 geni, FLIPI prognostik faktör ile pozitif ve CD10 markeri ile negatif korelasyon göstermiştir. Diğer genler için herhangi anlamlı sonuç saptanmamıştır. *SIRT5* geninde hastalarda kontrollere göre ifade değişimi olmamakla birlikte hastalığın evresi ve sistemik semptomlarla negatif korelasyon ortaya koymuştur. Ki-67 proliferasyon indeksi ve *SIRT1*, *2*, *4*, *5* ve *6* ifadeleri arasında pozitif korelasyonlar saptanmıştır. Ek olarak, qRT-PCR deneylerinin doğrulanması için GEO veri setinden çekilen verilerde FL hastalarının meta-analizleri yapılmıştır. Sonuçlar FL'de farklı *sirtuin*'lerin farklı ifade profilini ortaya koymuştur.

Bu tez çalışması Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 19L0230002 numaralı Lisansüstü Tez Proje olarak desteklenmiştir.

2022, 186 sayfa

Anahtar kelimeler: Foliküler lenfoma, progonoz, epigenetik, sirtuin, gen ifadesi, qRT-PCR

ABSTRACT

PhD Thesis

Gene expression profiling of *sirtuin*s in follicular lymphoma

Laleh Madayen Shishevan

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Gülşah Kaygusuz

Follicular lymphoma (FL) is the second most common type of non-Hodgkin-lymphoma (NHL) derived from germinal center B-cells. Despite relapsing and remitting course of disease, most patients experience multiple relapses over time. 30% of cases have eventually been reported transform into more aggressive lymphomas. Based on histology, FL is graded as 1, 2, 3A (low grade) and 3B (high grade). The t(14;18)(q32;21) translocation is the genetic hallmark of FL. However, additional genetic alterations play pivotal role in the clonal development of disease. Presence of various clinical features between individuals during the course of disease, represents the existence of distinct molecular alterations. Understanding the molecular events involved in the pathogenesis of FL and their correlation with clinical risk factors can be beneficial in predicting the prognosis of disease. Recent studies have revealed that dysregulation in epigenetic elements are contributed to the pathogenesis of FL. Sirtuins, a family of Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+) dependent enzymes, are involved in epigenetic regulation by targeting histones and transcription factors. To date, seven human sirtuins (SIRT1–7) have been identified, but their roles in FL are still uncertain.

According to literature survey, present study aims to investigate the expression level of *SIRT1-7* genes, by qRT-PCR on 32 FL and 10 follicular hyperplasia cases as control to assess expression changes between grades and correlation with clinicopathological parameters of patients. Obtained results demonstrated that the expression level of SIRT6 was significantly increased in high grade samples compared to low grade and controls. No significant differences were observed for other genes. Upregulation of SIRT6 was detected in patients aged ≥65. Elevated *SIRT6* expression was correlated with high FLIPI prognostic index. However, SIRT6 expression was inversely correlated with CD10 marker. Although there was no significant change in the *SIRT5* expression between patient and controls, negative correlation with the stage of disease and also B-symptoms with this gene was detected. Positive correlations between the ki-67 proliferation index and *SIRT1, 2, 4, 5* and *6* expressions were observed. For validation of qRT-PCR experiment results analysis of FL patients from microarray datasets of FL patients from GEO database revealed differentially expression profile of different sirtuins in FL.

Thesis was supported by Ankara University Scientific Research Projects Coordinator as a Graduate Thesis Project numbered 19L0230002.

2022, 186 pages

Keywords: Follicular lymphoma, progonosis, epigenetic, sirtuin, gene expression, qRT-PCR

TEŞEKKÜR

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nde 19L0230002 Lisansüstü Tez Proje olarak desteklenmiştir. Sağladıkları destek için bu kurumdan en içten teşekkürlerimi arz ederim.

Tez çalışmam boyunca beni her konuda destekleyen, önemseyen, yardım eden, bilgi ve tecrübesi ile beni yönlendiren, her türlü zorlukta yanımda olan, tüm içtenliğini ve samimiyetini her zaman bana hissettiren, danışmanım sayın **Prof. Dr. Gülşah KAYGUSUZ**'a,

Genom bilim laboratuvar üyesi olmamdan mutluluk duyan, doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, araştırmamın planlanmasında ve yürütülmesinde kıymetli önerileri ile katkılarda bulunan, çalışmamın her aşamasında sabır, özen ve görüşleri ile destek olan sayın **Prof. Dr. Hilal ÖZDAĞ SEVGİLİ**'ye;

Tez izleme komite üyem ve her zaman önerilerinden ve danışmanlığından faydalandığım sayın **Prof. Dr. Işınsu KUZU**'ya;
Çalışmanın yürütülmesinde klinik bilgisiyle beni destekleyen, sayın **Doç. Dr. Sinem CİVRİZ BOZDAĞ**'a;

Doktora eğitim süreci boyunca en mutlu ve en zor günlerimde yanımda olan ve tüm bu sureci paylaştığım çok kıymetli dostlarım, **Sülgün CHARYYEVA**, **Edibe Ece ABACI**, **Burcu ÇEVİK**, **Shaghayeg REZAPOUR**, **Dr. Şenay KÖM**, **Dr. Yasemin ŞAHİN, Merve BAKIRCI BESLER ve Şinasi AYGÜN**'e,

Tüm başarılarımın mimarı, hayatım boyunca her konuda arkamda olan ve sevgilerini hep hissettiğim, büyük emeklerle beni yetiştiren canım annem **Vejiheh** ve babam **Prof. Dr. Seyed Kazem MADAEN**'e ve yanlarındayken her zaman huzur hissettiğim canım kardeşlerime;

Başta bu zorlu süreç, olmak üzere her zaman yanımda olan, desteğini, sevgisini ve sabrını benden hiç eksik etmeyen, stresli zamanlarımı anlayışla karşılayan, daima moralimi yüksek tutan sevgili eşim **Dr. Yousef HOUSHYAR**'a,

Hayattaki en büyük mutluluk ve enerji kaynağım, varlıklarıyla güç ve ilham veren, her günümü huzurla dolduran ver zor zamanlarımda beni nazik yürekleriyle anlayan oğlum **Soroush** ve kızım **Hadis**'e;

Sonsuz minnetlerimi sunarak, en içten duygularımla teşekkür ederim…

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN ..... **İ**

ÖZET ..... **İİİ**

ABSTRACT ..... **İV**

TEŞEKKÜR ..... **V**

İÇİNDEKİLER ..... **Vİ**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **Xİ**

ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **XİV**

SİMGELER DİZİNİ ..... **XVİ**

1. GİRİŞ **1**

2. KURAMSAL TEMELLER **3**

2.1. LENFOMALARIN SINIFLANDIRILMASI **3**

2.2. FOLİKÜLER LENFOMA **4**

2.2.1. TARİHÇE 5

2.2.2. FOLLİKÜLER LENFOMA EPİDEMİYOLOJİSİ VE DAĞILIMI 6

2.2.3. FOLLİKÜLER LENFOMA ETİYOLOJİ VE RİSK FAKTÖRLERİ 6

2.3. FOLİKÜLER LENFOMA TANI, DERECELENDİRME VE EVRELEME **7**

2.3.1. FOLİKÜLER LENFOMA PROGNOSTİK PARAMETRELER VE İNDEKSLER 11

2.4. FOLİKÜLER LENFOMA PATOGENEZİ **13**

2.4.1. HİSTOGENEZ VE PREMALİGN LEZYONLAR 13

2.4.2. İKİNCİL ONKOGENİK BOZUKLUKLAR 17

2.4.2.1. Epigenetik düzenleyicilerdeki değişiklikler 18

2.4.2.2. İmmün modülatörlerdeki değişiklikler 20

2.4.2.3. NF-κB sinyal yolağındaki değişiklikler 20

2.4.2.4. JAK-STAT sinyal yolağındaki değişiklikler 21

2.4.2.5. Hücre proliferasyonu ve hücre döngüsü regülasyonu ile ilgili genleri etkileyen değişiklikler 21

2.4.2.6. Çeşitli genlerdeki değişiklikler 22

2.4.3. FOLİKÜLER LENFOMA TRANSFORMASYON GENETİĞİ 22

2.4.4. TÜMÖR MİKROÇEVRESİNİN ROLÜ 24

2.5. FOLİKÜLER LENFOMANIN EPİGENETİĞİ 26

2.5.1. DNA METİLASYONU 27

2.5.2. KODLAMAYAN DÜZENLEYİCİ BÖLGELER 27

2.5.3. HİSTON MODİFİKASYONLARI 28

2.5.3.1. Histon deasetilazlar 29

2.5.4. MEMELİ SİRTUİNLER 30

2.5.5. MEMELİ SİRTUİNLERİN SINIFLANDIRILMASI VE LOKALİZASYONU 30

2.5.6. MEMELİ SİRTUİNLERİN SUBSTRATLARI, YAPISI, FONKSİYONU VE ENZİMATİK MEKANİZMASI 32

2.6. HEMATOLOJİK MALİGNİTELERDE SİRTUİNLERİN ÇOK YÖNLÜ İŞLEVLERİ 35

2.6.1. SIRT1 37

2.6.2. SIRT2 39

2.6.3. SIRT3 41

2.6.4. SIRT4 43

2.6.5. SIRT5 45

2.6.6. SIRT6 46

2.6.7. SIRT7 49

2.7. FOLİKÜLER LENFOMA VE TRANSKRİPTOM ANALİZLERİ 50

3. GEREKÇE VE AMAÇ 54

4. MATERYAL VE YÖNTEM 56

4.1. MATERYAL 56

4.1.1. IŞIK MİKROSKOP İLE DOKULARIN DEĞERLENDİRİLMESİ 56

4.1.2. MİKROTOM CİHAZI İLE ÖRNEKLERDEN KESİT ALMA AŞAMASI 56

4.1.3. SEÇİLEN FFPE DOKULARIN RNA İZOLASYON AŞAMALARI 57

4.1.3.1. RNA'ların Spektrofotometrik Analizi, Kalite ve Konsantrasyon Tayini 60

4.1.3.2. İzole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforezi 60

4.1.4. İZOLE EDİLEN RNA'LARDAN CDNA SENTEZİ 60

4.1.4.1. Kit Protokolü 61

4.1.4.2. cDNA kitin Optimizasyon Deneyleri 62

4.1.5. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYON İLE SENTEZLENEN CDNA'LERİN DEĞERLENDİRİLMESİ 63

4.1.6. CDNA MİKTARI VE MAGNEZYUM İYON OPTİMİZASYON DENEYLERİ 64

4.1.7. ÇALIŞMAYA DAHİL OLAN REFERANS GEN VE *SIRTUİN* PRİMERLERİN TASARIMI VEYA SEÇİLMESİ 64

4.1.8. QRT-PCR REAKSİYONLARI İÇİN PRİMERLERİN ÇALIŞMA ŞARTLARININ İNCELENMESİ 66

4.1.9. KANTİTATİF GERÇEK ZAMANLI PCR REAKSİYONLARI VE ANALİZLERİ 67

4.1.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER 68

4.2. İN SİLİCO ANALİZLER 69

5. ARAŞTIRMA BULGULARI 71

5.1. DEMOGRAFİK VE KLİNİKOPATOLOJİK BULGULAR 71

5.1.1. YAŞ VE CİNSİYET 71

5.1.2. KLİNİKOPATOLOJİK BULGULAR 72

5.2. İZOLE EDİLEN RNA'LARIN NİTELİK VE NİCELİK SONUÇLARI 75

5.2.1. İZOLE EDİLEN RNA'LARIN MİKTARI 75

5.2.2. RNA'LARIN AGAROZ JEL ELEKTROFOREZ SONUÇLARI 75

5.3. cDNA KİTİN OPTİMİZASYON DENEYLERİNİN SONUÇLARI 76

5.4. OPTİMİZASYON SÜREÇLERİ 76

5.4.1. SICAKLIK DÖNGÜSÜ İLE SENTEZLENEN cDNA'LERİN DEĞERLENDİRMESİ 77

5.4.2. cDNA GİRİŞ MİKTARI VE $MgCl_2$ KONSANTRASYONU OPTİMİZASYON SONUÇLARI 77

5.4.3. SENTEZLENEN PRİMERLERİN OPTİMİZASYON SONUÇLARI 78

.5.5 **EŞ ZAMANLI KANTİTATİF POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE (qRT-PCR) *SIRTUIN* GENLERİNDE İFADE İNCELENMESİ 79**

5.6. qRT-PCR DENEYLERİN İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME SONUÇLARI 85

5.6.1. FL VE KONTROL OLGULARINDA *SİRTUİN* GENLERİN İFADE DEĞİŞİKLİKLERİNİN İNCELENMESİ 85

5.6.2. FL OLGULARINDA KLİNİK FAKTÖRLER İLE *SİRTUİN* GENLERİN İFADELERİNİN İNCELENMESİ 89

5.6.3. KORELASYON ANALİZLERİ 92

5.6.4. META-ANALİZ BULGULARI 94

6. TARTIŞMA/SONUÇ 97

6.1. TARTIŞMA 97

6.1.1. DEMOGRAFİK VE KLİNİKOPATOLOJİK DEĞERLENDİRMELER 97

6.1.2. HEMATOLOJİK MALİGNİTELERDEKİ SIRTUIN İFADESİ 100

6.1.2.1. B hücre kökenli hematolojik maligniteler 101

6.1.2.2. B hücre kökenli olmayan hematolojik maligniteler 113

6.1.3. TEKNİK DEĞERLENDİRMELER 120

6.1.3.1. Formalin fiksasyonunun RNA üzerindeki zararlı etkileri ve gen ifadesine ilişkin hususlar 120

6.1.3.2. FFPE dokuların Amplifikasyonu için PCR Koşullarının Optimizasyonu 121

6.2. SONUÇ 123

EKLER 166

EK 1: ETİK KURUL KARAR FORMU 166

EK 2: TEZ ÇALIŞMASINDA SENTEZLENEN TÜM PRİMERLERİN BİLGİLERİ 168

EK 3: KONTROL VE TÜMÖR ÖRNEKLERİN İZOLE EDİLEN RNA'LARIN KONSANTRASYONU VE SAFLIK DEĞERLERİ 170

EK 4: KONTROL VE TÜMÖR ÖRNEKLERİN ORTALAMA CP DEĞERLERİ 172

EK 5: META-ANALİZLERDEKİ SETLERİN HASTA VE KONTROL GRUPLARINDA UYGULANAN GENETİK MATERYALLER 174

ÖZGEÇMİŞ 176

YAYINLAR 177

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. FL'da tanı süreci. 8

Şekil 2.2. Farklı histolojik grade'lere sahip foliküler lenfoma olguları: **A-** Seyrek sentroblastın eşlik ettiği çoğunlukla sentrositlerden meydana gelen Grade I vaka örneği; **B-** Sentroblast ve sentrositlerden meydana gelen Grade II vaka örneği; **C-** Sentroblastlardan zengin sentrositlerin de eşlik ettiği Grade IIIa vaka örneği **D-** Yalnızca Sentroblastlardan oluşan Grade IIIb vaka örneği (7). 9

Şekil 2.3. İmmünoglobulin ağır zincir lokusunda V(D)J rekombinasyonunun şeması (74). 14

Şekil 2.4. IGH/BCL2 translokasyonuna göre kesme noktası sitelerinin haritası (80). 15

Şekil 2.5. FL patogenezinin senaryosu (8). 16

Şekil 2.6. FL patogenezineki ana genetik olaylar ve biyolojik yolakların özeti. 18

Şekil 2.7. Foliküler lenfomada germinal merkezdeki malign transformasyonun biyolojik temeli (144). 23

Şekil 2.8. Tümör mikroçevre (TME) hücreleri ve foliküler lenfoma (FL) hücrelerin karşılıklı etkileşimleri (157). 24

Şekil 2.9. İnsan HDAC'ların farklı sınıfları (179). 29

Şekil 2.10. Memeli sirtuinlerinin sınıflandırılması (188). 31

Şekil 2.11. Sirtuinlerin hücrede lokalizasyonları (190). 32

Şekil 2.12. Yedi insan SIRT izoformunun şematik gösterimi (195). 33

Şekil 2.13. Sirtuinlerin'in genel yapısı (196). 33

Şekil 2.14. Sirtuinler tarafından katalizlenen iki reaksiyon; A) Deasetilasyon ve B) ADP-ribozilasyon (203). 34

Şekil 2.15. Hematolojik malignitelerde sirtuin ilişkin moleküler yolaklar (204). 35

Şekil 4.1. FL mikrodizin setlerinin seçim akış şeması. 69

Şekil 5.1. FL Olguların yaş dağılımı 71

Şekil 5.2. FL olgularının cinsiyet dağılımı 71

Şekil 5.3. FL olguların histolojik grade dağılımı..... 72

Şekil 5.4. Olguların histolojik derecelerine göre Ki-67 proliferasyon indeksi..... 73

Şekil 5.5. İzole edilen bazı RNA'ların jel görüntüsü. 75

Şekil 5.6. Optimizasyon süreçlerindeki işlem basamakları. 76

Şekil 5.7. 10 ng cDNA ve *UBC* primer ile ile qRT-PCR ürünlerinin elektroforez jel görüntüsü. 77

Şekil 5.8. *UBC* primer ile K7 ve GIII-2 örneklerin cDNA miktarın optimizasyonu ve $MgCl_2$ titrasyonu sonuçları..... 78

Şekil 5.9. *UBC* genin qRT-PCR sonuçları: **A**- Amplifikasyon eğrisi; **B**- Erime pikleri; **C**- Agaroz jel görüntüsü. 80

Şekil 5.10. *SIRT1* genin qRT-PCR sonuçları: **A**- Amplifikasyon eğrisi; **B**- Erime pikleri; **C**- Agaroz jel görüntüsü. 81

Şekil 5.11. *SIRT2* genin qRT-PCR sonuçları: **A**- Amplifikasyon eğrisi; **B**- Erime pikleri; **C**- Agaroz jel görüntüsü. 81

Şekil 5.12. *SIRT3* genin qRT-PCR sonuçları: A- Amplifikasyon eğrisi; B- Erime pikleri; C- Agaroz jel görüntüsü. 82

Şekil 5.13. *SIRT4* genin qRT-PCR sonuçları: **A**- Amplifikasyon eğrisi; **B**- Erime pikleri; **C**- Agaroz jel görüntüsü. 83

Şekil 5.14. *SIRT5* genin qRT-PCR sonuçları: **A**- Amplifikasyon eğrisi; **B**- Erime pikleri; **C**- Agaroz jel görüntüsü. 83

Şekil 5.15. *SIRT6* genin qRT-PCR sonuçları: **A**- Amplifikasyon eğrisi; **B**- Erime pikleri; **C**- Agaroz jel görüntüsü. 84

Şekil 5.16. *SIRT7* genin pozitif kontrol sonuçları: A- Agaroz jel görüntüsü; **B**- Erime pikleri. 84

Şekil 5.17. *SIRT1* gen ifadesinin kontrol, düşük dereceli ve yüksek dereceli gruplarında kat değişimi ($p<0.05$)..... 86

Şekil 5.18. *SIRT2* gen ifadesinin kontrol, düşük dereceli ve yüksek dereceli gruplarında kat değişimi ($p<0.05$)..... 86

Şekil 5.19. *SIRT3* gen ifadesinin kontrol vakaları ve FL vakalarında kat değişimi ($p<0.05$). 87

Şekil 5.20. *SIRT4* gen ifadesinin kontrol grubu ve FL olgularındaki kat değişimi ($p<0.05$). 87

Şekil 5.21. *SIRT5* gen ifadesinin kontrol kontrol grubu ve FL olgularındaki kat değişimi ($p<0.05$). 88

Şekil 5.22. *SIRT6* gen ifadesinin kontrol grubu ve FL olgularındaki kat değişimi ($p<0.05$). 88

Şekil 5.23. *SIRT6* geninin Grade 1, 2, 3A ve 3B gruplar arasındaki ifade değişimi. 89

Şekil 5.24. FLIPI prognostik indeksi ile *SIRT6* genin ifade korelasyonu. 92

Şekil 5.25. Evre ile *SIRT5* genin ifade korelasyonu. 92

Şekil 5.26. Ki-67 proliferasyon indeki ile *SIRT1-2-4-5* ve *6* genlerin ifade korelasyonu. .. 93

Şekil 5.27. B semptomlar ile *SIRT5* genin ifade korelasyonu. 93

Şekil 5.28. CD10 marker ile *SIRT6* genin ifade korelasyonu. 94

Şekil 5.29. GEO veri setinde kontrol ve FL dokularında *sirtuin* ifade profili. 96

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. 2008 ve 2016 revize DSÖ sınıflamasında foliküler lenfomalar. 5

Çizelge 2.2. Foliküler lenfoma histolojik derecelendirme (19). 8

Çizelge 2.3. Hodgkin Lenfoma için Ann Arbor Evreleme Sistemi (59). 10

Çizelge 2.4. Lenfoma evrelemesinde Lugano sınıflaması (42). 10

Çizelge 2.5. Foliküler lenfoma uluslararası prognostik indeksler (62, 65, 66). 12

Çizelge 2.6. GEO veri tabanında FL deneylerinin mikrodizin bilgileri. 53

Çizelge 4.1. cDNA sentezinin birinci basamağının bileşenleri. 61

Çizelge 4.2. cDNA sentezinin ikinci basamağının bileşenleri. 61

Çizelge 4.3. Reverse transkripsiyon ısı programı. 62

Çizelge 4.4. Konvansiyonel PCR için hazırlanan karışım. 62

Çizelge 4.5. PCR için uygulanan ısı döngüsü. 63

Çizelge 4.6. EvaGreen için hazırlanan karışım. 63

Çizelge 4.7. EvaGreen PCR için uygulanan sıcaklık döngüsü. 64

Çizelge 4.8. cDNA ve magnezyum iyonu titrasyon karışımı. 64

Çizelge 4.9. *UBC* ve *sirtuin* için primer dizileri. 65

Çizelge 4.10. Roche LC 480 cihazında uygulanan sıcaklık döngüsü. 67

Çizelge 5.1. FL olguların histolojik grade'lerine göre Ki-67 proliferasyon indeksleri. 73

Çizelge 5.2. FL olguların klinikopatolojik özellikleri. 74

Çizelge 5.3. Optimizasyon deneyleri sonucunda elde edilen primerlerin çalışma şartları. . 79

Çizelge 5.4. Kontrol, düşük dereceli ve yüksek dereceli gruplarında *sirtuin* genlerin ifadelerinin kat değişimi (log2). 85

Çizelge 5.5. Olguların klinikopatolojik bulguları ile *sirtuin* gen ifadelerinin karşılaştırılması. 91

Çizelge 5.6. FL olgularında sirtuin gen ifadelerinin klinik faktörlerle korelasyonu. 92

Çizelge 5.7. FL olgularında *sirtuin* gen ifadeleri arasındaki korelasyon..... 94

Çizelge 5.8. Seçilen veri setlerindeki gruplar arasındaki *sirtuin* genlerin ifade değişiklikleri 95

Çizelge 6.1. Literatürdeki B hücre kökenli hematolojik malignitelerde sirtuin üzerinde yapılan çalışmalar. 102

Çizelge 6.2. Literatürdeki B hücre kökenli olmayan hematolojik malignitelerde sirtuin üzerinde yapılan çalışmalar. 114

SİMGELER DİZİNİ

°C	Derece santigrat
µm	Mikrometre
dk	Dakika
ul	Mikrolitre
ng	Nanogram
ml	Mililitre
mM	Milimolar
pmol	Pikomol
FL	Foliküler lenfoma
Sirtuin	Silent information regulator
HDAC	Histon deasetilaz
NAD^+	Nikotinamid adenin dinükleotit
ART	Mono-ADP-ribozil transferaz
DBBHL	Diffüz büyük B hücreli lenfoma
FLIPI	Follicular Lymphoma International Prognostic Index
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
GC	Germinal merkez
FLIS	Foliküler lenfoma in situ
FLLCs	Foliküler lenfoma benzeri hücreler
ISFN	İn situ foliküler neoplazi
PTM	Posttranslasyonel modifikasyonlar

HMT	Histon metil transferaz genlerinde
TF	Transkripsiyon faktörü
FFPE	Formalin fikse edilmiş parafine gömülü dokular
qRT-PCR	Eş zamanlı kantitatif PCR
NCBI	Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
GEO	Gene Expression Omnibus
GEP	Gene ekspresyon profili
RLN	Reaktif lenf nodülü

1. GİRİŞ

Kanser, hücre içi sinyal yolaklarını disregüle eden ve kanserin başlamasını ve ilerlemesini sağlayan onkogenlerin aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin inhibisyonu, epigenetik plastisite gibi moleküler değişikliklerin birikmesiyle karakterize olan çok aşamalı bir hastalıktır. Histolojik düzeyde, normal dokularda meydana gelen premalign değişikliklerin devamında maligniteler ortaya çıkar (1-3). Son yıllarda kanserin moleküler mekanizmalarının anlaşılmasıyla ve yeni hedeflenmiş terapilerin geliştirilmesiyle tedavide ve prognozda çığır açan gelişmeler olmuştur. Hanahan ve Weinberg, kanser ile ilgili altı mekanizmayı şöyle açıklamışlardır (4):

1. Kanser hücrelerinin apoptozdan kaçınması,
2. Büyüme sinyallerinin kendine yeterli olması,
3. Büyüme karşıtı sinyallere duyarsızlığı,
4. Anjiogenezin sürdürülmesi,
5. Sınırsız replikasyon potansiyeli,
6. İnvazyon ve metastaz.

Bu mekanizmalara ek olarak, genom instabilitesi ve mutasyon, tümör gelişimine yardımcı inflamasyon, enerji metabolizmasının yeniden programlanması ve immün sistemden kaçınma mekanizmaları da tanımlanmıştır (5).

Lenfoid maligniteler, lenfoid hücrelerden köken alan solid tümörlerdir. Lenfoma birçok farklı tip ve formlarda olup klinik olarak indolent hastalıktan daha agresif tiplere göre değişmektedir.

Kanser biyobelirteçleri yüksek nüks riski taşıyan hastaların belirlenmesi ve tümörlerin farklı terapötik yaklaşımlara verdikleri yanıtların önceden belirlenmesine olanak sağlar. Lenfoid kanserlerde yeni biyobelirteçlerin geliştirilmesi, bu hastalıkların tedavisinde önemlidir. Günümüzde bu tümörlerin tanısı morfolojik, immünfenotipik ve moleküler özelliklerin kombinasyonu ile mümkün olsa da hastalığın prognozu çoğunlukla klinik özelliklere dayanmaktadır.

Histolojik olarak foliküler lenfoma (FL) germinal merkez (germinal center-GC) B lenfositlerden köken alan bir neoplazmdır. Bu düşük dereceli tümörün, Amerika ve Avrupa toplumunda görülme sıklığı yüksektir (6, 7). FL genellikle orta yaş ve yaşlı popülasyonda görülmektedir. Ortalama sağ kalım süresi en az 10 yıl olmakla birlikte değişken bir klinik seyirde ilerler. FL hastaları genellikle immünoterapi, kemoterapi ve radyoterapiye yanıt verirler. Bu hastalar tedaviye direnç geliştirebilir ya da daha yüksek dereceli veya agresif diffüz büyük B hücreli lenfomaya (DBBHL) dönüşebilirler.

Günümüzde hastalığın ilerlemesinde rol oynayan erken lezyonlardaki moleküler değişikliklerin anlaşılmasının, kişiselleştirilmiş tedavi için en uygun hedeflerin tanımlanmasına yardımcı olabileceği düşünülmektedir (8). Bu hastalıkla ilişkili olarak yeni biyolojik değişikliklerin tanımlanması, yeni prognostik belirteçlerin veya terapötik hedeflerin bulunmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Kanser insidansı ve kronolojik yaş arasındaki yakın ilişki göz önünde bulundurulduğunda, biyolojik yaşlanmada rol oynayan genler ve genomik stabiliteyi sağlayan faktörler karsinogenez sürecinde etkilidir (9).

Metabolik regülasyonda görevli olan *sirtuin* gen ailesi FL patogenezi için potansiyel aday genleri içermektedir. Bu aday genler yaşlanma sürecindeki yolaklara katılan protein deasetilazları kodlamaktadır (10). İlk olarak Maya'da keşfedilen *Silent Information Regulator 2* (SIR2) proteini, nikotinamid adenin dinükleotit (NAD^+) bağımlı bir deasetilaz (DAC) ve mono-ADP-ribozil transferaz (ART) olarak işlev göstermektedir. Bu gen ailesi, bakterilerden insan türüne kadar filogenetik olarak korunmuş ve memelilerde de yedi ortolog gen olarak tanımlanmış ve *SIRT1-7* olarak adlandırılmıştır (11). Literatürde *sirtuin* genleri ile hematolojik yaşlanma ve malignite arasında muhtelif bağlantıları gösteren bulgular mevcuttur. Bu bulgulara dayanarak ileri yaşlarda görülen FL'rda, *sirtuin* genlerinin ifade seviyesinin değişiyor olabileceği ve bu değişimin prognoz ile korele olabileceği çalışmanın hipotezini oluşturmaktadır.

2. KURAMSAL TEMELLER

Lenfoma, lenfositlerin klonal çoğalmasından kaynaklanan heterojen bir malignitedir. Batı ülkelerinde en sık görülen yedinci kanser türüdür (12). Tüm kanser türleri içerisinde malignitelerin yaklaşık %5'ini temsil eder. Genel sağkalımın %72 olduğu tahmin edilmektedir (13). Ağırlıklı olarak lenfoid ve ekstranodal dokularda tümör oluşturan ve lenfositlerin olgunlaşma aşamasında ortaya çıkan bir kanser tipidir (14). Lenfomalar, çeşitli klinik özellikleri olan ve tedaviye karşı farklı yanıtlar gösteren heterojen bir lenfoid malignite grubunu oluşturur (15).

Foliküler lenfoma (FL), Hodgkin dışı lenfomanın (NHL) ikinci en yaygın türüdür. NHL'ların %35'i ve indolent lenfomaların %70'ni oluşturur. FL, folikül merkezi (germinal merkez) B hücrelerinden kaynaklanan indolent bir B hücreli lenfoproliferatif bozukluktur. Genellikle zaman içinde artan ve azalan asemptomatik lenfadenopati ile tanımlanır (16). Klinik özellikleri, hastalık biyolojisi ve genel prognozda heterojenite göstermektedir. Hastalığın prognozunda, Foliküler lenfoma uluslararası prognostik indeksi (Follicular Lymphoma International Prognostic Index-FLIPI) ve güncel versiyonu olan FLIPI2, genel sağkalımı ve progresyonsuz sağkalımı öngörmek için kullanılmaktadır. Güncel yayınlarda, hastalığın etiyolojisinde epigenetik mekanizmaların, hücre yüzeyi reseptörü sinyallerinin ve FL hücresinin mikroçevre ile etkileşimlerini kontrol eden sistemlerdeki değişikliklerin rol oynadığı gösterilmiştir (17).

2.1. LENFOMALARIN SINIFLANDIRILMASI

Lenfomalar, köken aldıkları normal hücre karşılıklarına göre sınıflandırılır. Lenfositler hem soy hem de farklılaşma aşamasına göre değişen fizyolojik immün fonksiyonlara sahip olduğundan, bu normal lenfoid popülasyonlardan kaynaklanan lenfomaların sınıflandırılması karmaşıktır. Lenfoma sınıflaması, uluslararası fikir birliğini yansıtan ve patolojik, genetik ve klinik faktörlere dayanan Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sistemini takip etmektedir. Bu sınıflama, lenfoid neoplazilerin yeni klinik, patolojik ve moleküler anlayışlarının gelişmesiyle sürekli gelişen bir alandır.

Lenfomaların mevcut kabul edilen tanı kriterleri, 2001'de yayınlanan, 2008 ve 2016'da güncellenen hematopoietik ve lenfoid doku tümörlerinin DSÖ sınıflamasına dayanmaktadır

(18, 19). DSÖ sınıflaması ilk olarak 1994'te Yenilenmiş Avrupa- Amerika Lenfoma (The revised European-American Classification of Lymphoid Neoplasms-REAL) sınıflaması tarafından açıklanan prensiplerine dayanmaktadır (20). Bu sınıflamada hastalığı tanımlamak için morfoloji, immün fenotip, genetik ve klinik özellikler gibi mevcut tüm bilgiler kullanılmıştır. En güncel sınıflama, 93'ten fazla farklı lenfoma hücre tiplerine göre gruplandırılmıştır (21).

DSÖ sınıflamasına göre lenfoid neoplaziler köken aldıkları lenfoid öncül ve olgunlaşmış hücrelere göre B hücreli veya T hücreli olmak üzere non-Hodgkin lenfomalar (NHL) başlığı altında ele alınır. Hodgkin lenfomalar (HL) DSÖ sınıflamasında ayrı grupta bulunan B hücre kökenli lenfomalardır (19, 22). Olgun histiositik ve dendritik hücre kaynaklı tümörler, lenfoid hücrelerden köken almamakla birlikte lenfoid dokuyu içerdikleri için tarihsel olarak lenfoid neoplazmlarla birlikte tartışılmıştır (15).

2.2. FOLİKÜLER LENFOMA

Foliküler lenfoma, NHL'ların ikinci en yaygın alt tipidir (23, 24). FL, germinal merkez (GC) B-hücrelerinden oluşan ve genellikle foliküler paterne sahip bir neoplazmdır. GC hücrelerinin primer kutanöz lenfomaları ayrıca sınıflandırılırlar (19).

FL'ın önceden iyi bilinen bir lenfoproliferatif bozukluk olduğu düşünülse de son birkaç yıl içinde karmaşık genetik geçmişi, farklı klinik ve patolojik sebepleri olduğu ortaya çıkmıştır. Bu durum DSÖ sınıflamasına, belirli FL alt gruplarının eklenmesiyle sonuçlanmıştır (25).

DSÖ sınıflamasına 2016 yılında Pediatrik FL, İn situ folliküler lenfoma, primer intestinal ve *IRF4* düzenlenmesi ile karakterli büyük B hücreli lenfoma olmak üzere 4 alt grup eklenmiştir (22, 26). Değişiklikler Çizelge 2.1'de özetlenmiştir (19, 22, 27).

Çizelge 2.1. 2008 ve 2016 revize DSÖ sınıflamasında foliküler lenfomalar.

2008 DSÖ Sınıflaması	2016 Revizyonu	Yorumlar
İn situ foliküler lenfoma	İn situ folliküler neoplazi	-İsimlendirmede değişiklik -İlerleme riski düşük olan öncü lezyon olarak kabul edilmiş
	Duodenal tip FL	-Yayılma riski düşük olan lokalize varyantı
	Sıklıkla difüz paternde ve 1p36 delesyonu gösteren folliküler lenfoma	-Yeni tanımlanan, genelde inguinal bölgede yerleşim gösteren, *BCL2* düzenlenmesi negatif
Pediatrik FL (FL varyantı)	Pediatrik tip FL (PTFL)	-İsimlendirmede değişiklik -Genelde çocuklar ve gençlerde ve nadiren erişkinlerde görülür -İyi prognozlu ve tedaviye gerekmeyen -Kesin bir hastalık olarak tanımlandı -TNFRSF14 ve MAP2K1 mutasyonların sık varlığı
	IRF4 düzenlenmesi ile karakterli büyük B hücreli lenfoma	-PTFL ve DBBHL arasında olan geçici antite -Genelde çocuklar ve gençlerde görünür -Çoğunlukla üst solunum yolları, waldeyer halkası ve boyun lenf nodüllerinde görülür

2.2.1. TARİHÇE

Lenfomalar ilk olarak 1862'de, FL ise 1925'te tanımlanmıştır (28). 1864 ve1865 yıllarında Virchow ve Cohnheim, lenf nodlarındaki büyümeyi sırasıyla lenfosarkom ve psödolösemi olarak adlandırmışlar, malign lenfoma terimi ise ilk olarak 1871'de Bilroth tarafından kullanılmıştır (29). Bu şekilde tanımlanan hastalıklarda, lenf nodu büyümesinin neoplastik, enfektif veya farklı nedenlerden kaynaklandığı anlaşılmıştır (30). 1925 yılında Brill ve Symmers, dev foliküler lenfomayı, 1928'de ise Oberling retikulum hücre sarkomunu tanımlamıştır (28, 29). Brill ve Symmers; hastalığı, radyoterapiye yanıt gösteren, jeneralize lenfadenopati ve dalak tutulumu ile karakterize edilen benign bir kronik hastalık olarak açıklamışlardır. 1941'de Gall ve arkadaşları FL'ın klinik seyrini ve patolojik özelliklerini açıklayıp, FL'ın benign olduğu üzerinde tartışmışlar, bazı olguların daha agresif bir hastalığa transforme olduklarını bildirmişlerdir (28, 31).

2.2.2. FOLLİKÜLER LENFOMA EPİDEMİYOLOJİSİ VE DAĞILIMI

Lenfomaların insidansı, son yıllarda önemli oranda artmıştır. Coğrafi modeller, en yüksek oranları dünyanın ekonomik olarak daha gelişmiş bölgelerinde göstermektedir (32, 33). DSÖ sınıflamasına göre FL Amerika ve batı Avrupa'da, tüm hematolojik neoplazmların yaklaşık %5'ini, lenfomaların %20 ve NHL'ların %35'ini teşkil eder. DBBHL'dan sonra NHL'nın en yaygın ikinci alt tipidir (12). Bu insidans doğu Avrupa, Asya ve gelişmekte olan ülkelerde daha düşüktür. FL nadiren 20 yaş altı bireylerde görünür. Çoğunlukla erişkinlerde ve 6. dekatta medyan yaş ile görülür. Cinsiyete göre bakıldığında kadınlarda erkeklere göre 1,7 kat daha fazla görülmektedir. (19).

FL'ın Türkiye'deki insidansı farklı literatürlerde muhtelif rakamlarla kanıtlanmıştır. Işıkdoğan ve ark. tarafından Diyarbakır popülasyonunda yapılan araştırmaya göre foliküler lenfoma NHL'ların %6,1'sını oluşturur (34). Kurtoğlu ve ark. Antalya'da yaptıkları araştırmalarında bu oranı %10,3 (35) ve Yıldırım ve ark. Erzurum popülasyonunda %5 bulmuşlardır (36). Hatay bölgesinde yapılan diğer bir araştırmaya göre de FL vakaları NHL'ların %6'sını oluşturmaktadır (37). Bu kanıtlara göre FL insidansı Türkiye'de nadirdir ve bu DSÖ'ün yayınladığı doğu Avrupa'daki bu hastalığın düşük insidansı ile uyumludur. Yıldırım ve ark.'lara göre FL insidansının Türkiye'de nispeten az görülmesi, DBBHL'nın ülkemizde daha fazla görülmesi ile ilişkilidir (36).

2.2.3. FOLLİKÜLER LENFOMA ETİYOLOJİ VE RİSK FAKTÖRLERİ

Geçmişte lenfomaların heterojen özellikleri, uygun alt tip sınıflamasının olmaması ve çelişkili tanı standartlarının uygulanması risk faktörlerinin tanısını engellemiştir (38). Farklı çevresel, enfeksiyöz ve genetik faktörler lenfomaların riski ile ilişkilendirilmiştir. B hücreli neoplazmların majör risk faktörlerinden biri bağışıklık sisteminde görülen immün yetmezlik ya da otoimmün hastalıklar gibi anomalilerdir. İmmün yetmezliğin başlıca biçimleri insan immün yetmezlik virüsü (human immunodeficiency virus-HIV) ile enfeksiyon, allogreft reddini veya graft versus host hastalığını (graft versus host disease-GVHD) önlemek için iyatrojenik immünosupresyonu ve birincil immün yetersizlikleri içerir (19). Yapılan bir araştırmada bağışıklık sistemi baskılanmasının, agresif lenfomalarla FL'dan, daha yüksek bir ilişkiye sahip oldukları görülmüştür. Bazı virüsler ve bakterilerle olan enfeksiyonlar da bu riski artırabilmektedir. FL gelişiminde rol oynayan virüsler arasında Epstein-Barr virüsü

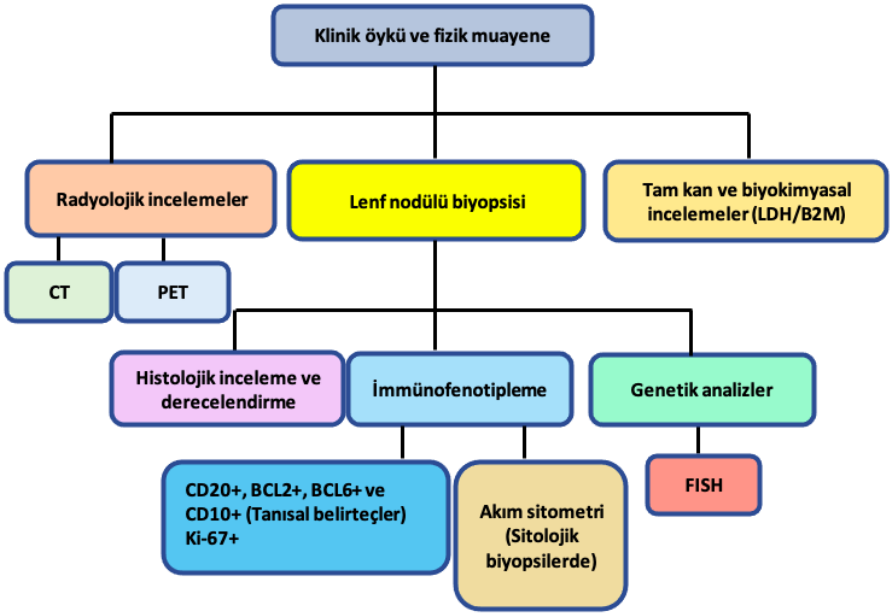
(EBV), insan T hücresi lenfotropik virüsü tip I (Human T-lymphotropic virus-HTLV) ve Kaposi sarkomu ile ilişkili herpesvirüs (İnsan herpes virüsü HHV-8) yer almaktadır (39, 40).

Çok sayıda yapılan epidemiyolojik araştırmalar meslek veya çevresel maruziyetlerle ilişkili koşulların lenfomaların insidansında etkili olduğunu göstermektedir. Obezite, sigara ve alkol tüketimi, saç boyalarının kullanımı, herbisit, pestisit ve ultraviyole radyasyona maruz kalma gibi faktörlerin de daha fazla incelenmesi gerekmektedir (39). Birçok çalışma pestisit maruziyeti ile NHL arasındaki ilişkiyi incelemiştir. FL hastalarında en sık rastlanan genetik değişiklik t(14;18)(q32;21) translokasyonudur. FL vakalarının >85% civarında ortaya çıkan bu translokasyonun birkaç çalışmada bazı pestisitlerle ilişkili olduğu gösterilmiştir (12).

Diğer kanser türleri ve diğer NHL alt tiplerinde olduğu gibi, klinik risk faktörleri ve çevresel faktörlere ek olarak moleküler (genetik, genomik, epigenetik vb.) risk faktörlerinin de FL riskine katkı sağladığına dair literatürdeki çalışmalar artmaktadır. Birçok çalışma, NHL ve FL alt tipi için aile öyküsünün risk faktörü olduğunu göstermektedir. FL gelişiminde ailesel risk ile birlikte genomik, çevresel ve klinik araştırmaların da kombinasyonu gerekmektedir (41).

2.3. FOLİKÜLER LENFOMA TANI, DERECELENDİRME VE EVRELEME

FL'ler çeşitli morfolojik varyantlar ve spesifik alt tipleri içerdiği için belirgin heterojenite göstermektedir. Eksizyonel biyopsi, tanı için en uygun yaklaşımdır. FL tanısı temel olarak immünohistokimyasal ve morfolojik inceleme dahil olmak üzere histopatolojik incelemelere dayanır, ancak gerektiğinde akış sitometrik ve sitogenetik analizlerin sonuçları ile de desteklenir (Şekil 2.1). Tipik olarak, FL belirgin bir şekilde folikülleri oluşturan sentrosit ve sentroblast karışımından oluşmaktadır (42). İmmünfenotipik olarak bu tümörler CD19, CD20, CD22, CD79a ve CD10 (%60) pozitif ve CD5, CD43 (çoğu vaka) ve CD11c negatiftir. CD23 ifadesi değişkendir ancak tipik olarak negatiftir (43). FL, histolojik olarak neoplastik folliküller içerisinde yer alan büyük hücrelerin-sentroblastların oranına göre derecelendirilir. FL'de bulunan neoplastik foliküller, küçük hücrelerden-sentrositlerden ve daha büyük hücrelerden- sentroblastlardan meydana gelir. Bu tümör hücreleri, farklı sayıda reaktif T hücreleri, foliküler dendritik hücreler (FDH) ve histiyositler, makrofajlar, granülositler ve plazma hücrelerin karışımıyla bulunmaktadır (12). Bazı çalışmalar, bu histolojik derecelendirmenin klinik prediktif olduğunu göstermiştir (19). Histolojik derece

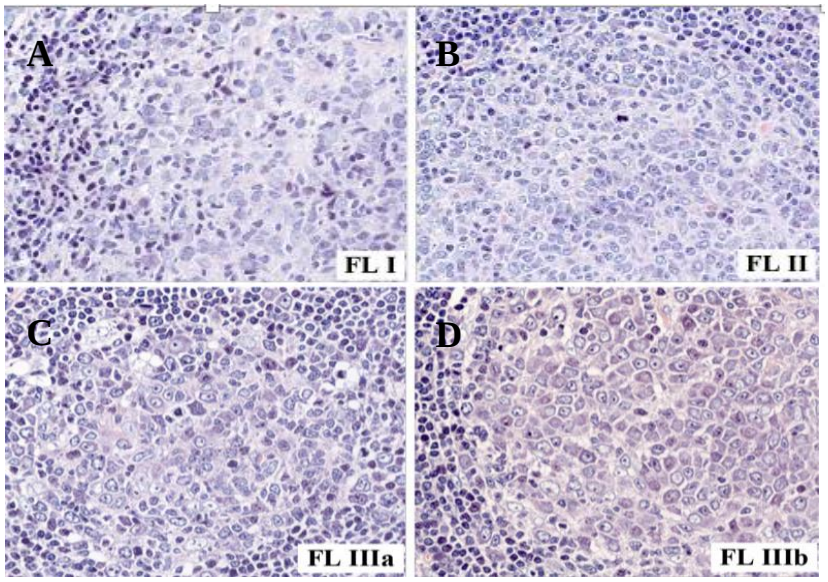


Şekil 2.1. FL'da tanı süreci.

(Grade) hastalığın davranışının belirlemesinde en erken yaklaşımlardan biridir (44). Yenilenmiş Avrupa-Amerika Lenfoma (REAL) sınıflaması ve DSÖ yeni sınıflaması FL'ın 3 grup halinde histolojik derecelendirilmesini önermektedir (20, 45). DSÖ, Mann ve Berard'ın hücre sayma yönteminin kullanılmasını önermektedir (46). DSÖ sınıflamasında FL, her büyük büyütme alanında (BBA) 10 neoplastik foliküldeki sentroblast sayısına göre üç histolojik dereceye ayrılmaktadır (Çizelge 2.2) (Şekil 2.2) (19, 42, 45). Grade 1-2 hastaların çoğunda <%20 Ki-67 proliferasyonu gözlenmektedir. BCL2 proteini, grade 1 ve 2 alt tiplerinde yaklaşık tüm hastalarda güçlü bir şekilde pozitiftir (42). BCL6, tüm FL tümörlerinde neoplastik hücrelerin en azından bir kısmı tarafından ifade olur (47). BCL6 yeniden düzenlenmelerinin insidansı, yüksek histolojik dereceli olgularda daha sık bulunmaktadır (Grade 3B'de daha yaygın). Bu durum agresif bir klinik seyir ile ilişkisi görünmektedir (48).

Çizelge 2.2. Foliküler lenfoma histolojik derecelendirme (19).

Grade 1: 0-5 sentroblast/BBA (Büyük Büyütme Alanı/40× büyütme)
Grade 2: 6-15 sentroblast/BBA (Büyük Büyütme Alanı/40× büyütme)
Grade 3: >15 sentroblast/BBA (Büyük Büyütme Alanı/40× büyütme)
3A: >15 sentroblast, sentrositler hala mevcut
3B: sadece sentroblastlar, sentrosit kalıntısı olmayan solid tabakalardan oluşur



Şekil 2.2. Farklı histolojik grade'lere sahip foliküler lenfoma olguları: **A-** Seyrek sentroblastın eşlik ettiği çoğunlukla sentrositlerden meydana gelen Grade I vaka örneği; **B-** Sentroblast ve sentrositlerden meydana gelen Grade II vaka örneği; **C-** Sentroblastlardan zengin sentrositlerin de eşlik ettiği Grade IIIa vaka örneği **D-** Yalnızca Sentroblastlardan oluşan Grade IIIb vaka örneği (7).

Bazı çalışmalara göre grade 1, 2 ve 3A histolojik olarak düşük dereceli ve yavaş hastalık seyriyle kabul edilirken (49), grade 3B FL'yi biyolojik olarak grade 1-3A'dan farklı ve tipik olarak agresif bir lenfoma seyri gösterir (50, 51). Grade 3B FL olguları, DBBHL gibi tedavi alırken, grade 3A tedavisi, grade 1 ve 2 FL gibi uygulanmaktadır (52, 53). Kanıtlara göre FL grade 3B, sıklıkla t(14;18) kaybı ve CD10 ifadesinin diğer grade'lere göre daha düşük olduğu ve TP53 ve MUM1/IRF4 ifadesinin artışıyla biyolojik açısından belirgin bir antite olarak kabul edilmektedir (54, 55).

Klinik evreleme hastalığın lokalizasyonu ve vücuttaki yaygınlığını tanımlar ve prognostik bilgileri ortaya koyar. İlk evreleme kriterleri öncelikle HL için tasarlanmış ve Ann Arbor sistemi olarak aldandırılmıştır (56). Bu sistem başlangıçta HL'lar için geliştirilmiş ancak NHL için de uygulanmaktadır. Ann Arbor evreleme sistemi lenfoma hastalarının prognozunun değerlendirilmesinde birincil sistemdir. Evre, fonksiyonel görüntüleme ile birlikte CT veya MRI taraması kullanılarak hastalığın anatomik kanıtı ile belirlenir. HL için kullanılan evreleme sınıflaması 1971'de (57) yapılan Ann Arbor Konferansı'nda kabul edilip ve 1989'da revize olmuştur (58). Ann Arbor sınıflaması, hastalığın ne kadar yaygın olduğunu dört evrede tanımlar (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Hodgkin Lenfoma için Ann Arbor Evreleme Sistemi (59).

Evre	Açıklama
I	Tek bir lenf nodu bölgesi (nodal bölgesi, Waldeyer halkası, timüs ya dalak) (I); ya da tek bir ekstranodal organ ya da lenf nodülü olmayan yer tutulumu (IE)
II	Diafragmanın aynı tarafında iki veya daha fazla lenf düğümü bölgesinin tutulumu (II); veya tek bir ekstra lenfatik organın lokalize tutulumu ya da diafragmanın aynı tarafındaki lenf nodunun bölgesel tutulumu ile birlikte diğer lenf nodu bölgelerinin tutulumun olup veya olmaması (IIE).
III	Diafragmanın her iki tarafındaki lenf düğümü bölgelerinin tutulumu (III), bunun eşliğinde ekstralenfatik organın yanında olan lenf noduna yayılımı ve tutulumu (IIIE) ya da dalak tutulumu (III_S) veya her ikisinin eşliği (III_{SE})
IV	Lenf nodu tutulumu olan veya olmayan bir veya daha fazla ekstralenfatik organın tutulumu veya yakın lenf düğümü tutulumu yokluğunda izole ekstralenfatik organ tutulumu, ancak uzak bölgelerdeki hastalıkla bağlantılı. Evre IV, karaciğer veya kemik iliği, akciğerler (başka bir bölgeden doğrudan uzatma dışında) veya beyin omurilik sıvısının herhangi bir şekilde tutulmasını içerir.

2014 yılında Lugano sınıflaması lenfomalar için yeni bir evreleme sistemi olarak oluşturuldu (56). Lugano sınıflaması, Ann Arbor evreleme sisteminden modifiye olup buna dayanmaktadır. FL dahil olmak üzere her tür lenfomaların ilk değerlendirme, evreleme ve yanıt incelemesi için uygulanmaktadır (12). Lugano sınıflandırılma sisteminde görüntüleme ve kemik iliği sonuçları lenfomaların anatomik değerlendirilmesi için esas alınır ve lenfoma sınıfları başlıca iki kategoriye ayrılmaktadır: sınırlı evre (evre I ve II) ve ileri evre (evre III ve IV) (42). Bu evreleme sistemi, tümör bölgelerinin sayısına (nodal ve ekstranodal) ve lokalizasyonlarına odaklanır (Çizelge 2.4).

Çizelge 2.4. Lenfoma evrelemesinde Lugano sınıflaması (42).

Evre	Açıklama
I	Tek bir lenfatik bölgenin tutulumu (I) veya tek ekstralenfatik organ veya bölgenin (IE) lokalize tutulumu
II	Diyaframın aynı tarafındaki iki veya daha fazla lenfatik bölgenin tutulumu (II) veya tek bir ekstralenfatik organ veya bölgenin lokalize tutulumu ve diyaframın aynı tarafındaki bir veya daha fazla lenfatik bölgenin lokalize tutulumu (IIE)
III	Diyaframın her iki tarafında lenfatik bölgelerin tutulumu
IV	Lenfatik tutulumu olan veya olmayan bir veya daha fazla ekstralenfatik organın diffüz veya yayılmış tutulumu

2.3.1. FOLİKÜLER LENFOMA PROGNOSTİK PARAMETRELER VE İNDEKSLER

Günümüzde FL hastalarının sağkalımlarının öngörülmesinde çeşitli prognostik indeksler oluşturulmuştur. Şimdiye kadar birkaç biyolojik parametre prognostik açısından onaylanmış olup, bu parametrelerin en önemlisi, hastaların genel durumu ve hastalığın yaygınlığıdır. Hodgkin lenfomalar (HL) ve non-Hodgkin lenfomaların (NHL) yaygınlığı Ann Arbor sistemi ile evrelenir (60). Ann Arbor sistemi prognostik açısından yetersiz kaldığı için, 1993'de International Prognostic Index (IPI) agresif NHL'ların prognozu için geliştirilmiştir (61). Bu yeni indekste, tanı anında hastanın yaşı, sistemik semptomların olup olmaması, hastanın performans durumu, serum laktat dehidrogenaz (LDH) konsantrasyonu, hastalığın lenf nodülü ve dışı odakların sayısı, tümör boyutu ve hastalığın lokalize (Ann Arbor evre I ya II) veya ilerlemiş olması (evre III ya IV) gibi parametreler yer almaktadır (61). 2004 yılında, uluslararası bir ortak çalışmanın sonucunda, Folliküler Lenfoma Uluslararası Prognostik İndeksi (FLIPI) yayınlandı ve böylece IPI, foliküler lenfoma için FLIPI şeklinde adlandırıldı. Bu indekse yaş, klinik evre, laktat dehidrogenaz düzeyi, hemoglobin ve lenf nodüllerinin sayısı dahil edilmektedir. FLIPI indeksi hastalığın biyolojik davranışını öngörmede yararlı olsa da yüksek risk grubundaki hastalar için güvenilir olmayabilir (62). Ardından, Rituksimab çağında 2009 yılında FLIPI2 prognostik modeli geliştirildi. Model ayrıca beş risk faktörünü yaş, kemik iliği tutulumu, hemoglobin seviyeleri, en büyük düğümün çapı ve β2-mikroglobulin seviyelerini kapsadı ve farklı sonuçlara sahip üç risk grubu belirledi (63). Genom dizileme sonuçlarından yararlanarak 2015'de m7-FLIPI isimli yeni bir prognostik model ortaya konuldu. Bu model Rituksimab, Siklofosfamid, Doksorubisin, Vinkristin ve Prednizolon içeren R-CHOP ve Rituksimab, Siklofosfamid, Vinkristin ve Prednison içeren R-CVP immünokemoterapi rejimlerinin tedavilerin öngörmesi için yedi genin (*EZH2*, *ARID1A*, *MEF2B*, *EP300*, *FOXO1*, *CREBBP* ve *CARD11*) klinik verilerini ve mutasyon durumunu birleştirdi (64). Bu model, Bendamustin gibi diğer yaygın kullanılan rejimlerde onaylanması gerekmektedir. Ayrıca, DNA dizilemesinin sınırlı kullanımı, bu modelin klinik uygulamada geniş çapta uygulanmasını engellemiştir (Çizelge 2.5) (12).

Çizelge 2.5. Foliküler lenfoma uluslararası prognostik indeksler (62, 65, 66).

İndeks	Risk parametreleri	Risk kategorileri
FLIPI	Yaş >60 Evre II/IV Hemoglobin <12g/dl LDH>ULN >4 lenf nodu bölgesi	0–1: Düşük 2: Orta 3-5: Yüksek
FLIPI2	Yaş >60 Hemoglobin <12g/dl[1] Serum b β2M >ULN[2] Kemik iliği tutulumu Lenf nodu çapı >6 cm	0–1: Düşük 2: Orta 3-5: Yüksek
M7-FLIPI	FLIPI skor >2 ECOG[3] PS[4] >1 7 gen mutasyonu: *EZH2* *ARID1A* *MEF2B* *EP300* *FOXO1* *CREBBP* *CARD11*	<0.8: Düşük ≥0.8: Yüksek

(1- gram/desilitr; 2- normalin üst sınırı; 3- Doğu Onkoloji İşbirliği Grubu; 4- Performans durumu)

Son yıllarda gerçekleştirilmiş olan PRIMA çalışmasının bulgularından, PRIMA-prognostik indeks (PRIMA-PI) isimli daha basit bir model oluşturuldu. Bu indeks, serum β2-mikroglobulin seviyeleri ve kemik iliği tutulumunun değerlendirilmesini kullanılarak, immünokemoterapi tedavisi alan hastaların farklı genel sağkalım ve EFS24 (event-free survival at 24 months) için üç risk grubu oluşturdu (67). Ancak, bu model prospektif çalışmalarında henüz doğrulanmamıştır (12).

Önceden uygulanan prognostik faktörler tanı sırasında saptanan klinik ve laboratuvar özelliklerine dayanaklı olurken son yıllarda yeni moleküler prognostik faktörler ortaya çıkmaktadır. Genom ve transkriptom analizleri sonucu elde edilen biyobelirteçlerle hastalık biyolojisinin araştırılması daha doğru ve her hasta için bireysel prognozun öngörülmesinde faydalı olabilir (68). Gelecekte FL ile ilişkili genetik imzanın klinik testlere dönüştürülmesi ve bunların rutin uygulanması mümkün olacaktır (69). FL'deki genetik değişikliklerin, klinik risk faktörleri ile birleşimi, prognozun belirlenmesinde daha etkin olabileceği öngörülür. FL hastalarının çoğunda, klinik prognostik indeksler tanı esnasında bu hastaların sağkalımlarının öngörülmesi için uygulanır ancak pratikte bireysel hasta riskini tam olarak yansıtmayabilir. Bu nedenle moleküler temelli belirteçlerin uygulanması, FL hastalarında

daha doğru bir şekilde prognozun değerlendirilmesini sağlayacaktır (70). Gelecekteki prognostik modellerin, bu farklı prognostik faktörler ile tam olarak senkronize etmesi için klinik bilgileri, patoloji bulguları, genetik değişiklikler ve tümör mikroçevresi durumunu içermesi gerekecektir. Buna ek olarak, prognostik bilgilerin spesifik tedavi yaklaşımlarıyla ilgili öngörücü modellere dönüştürülmesi ve uygulanması, hastalarda gereksiz fiziksel ve mali yüklerin azaltılmasına yardımcı olacaktır (44).

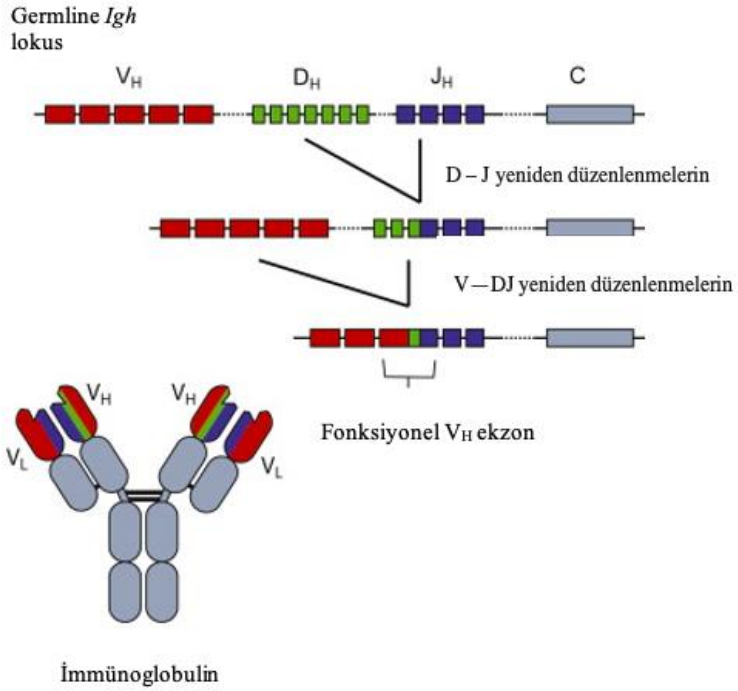
2.4. FOLİKÜLER LENFOMA PATOGENEZİ

FL'da dahil olmak üzere birçok B-hücreli lenfomanın ayırt edici özelliği, IG lokuslarından biri ile bir proto-onkogeni içeren kromozomal lokusun translokasyonudur. Translokasyona ek olarak mutasyonel ya da epigenetik diğer değişikliklerin de lenfoma gelişiminde önemli rolleri olduğu gösterilmiştir. Normal B-hücrelerinin sağ kalımı B-hücresi reseptörü (BCR) ekspresyonuna bağlıdır. BCR geninin ekspresyonunun olduğu hücreler olgun naif B hücrelerine farklılaşırken, BCR geni ifadesi olmayan B hücresi öncülleri apoptoza uğrar. Birkaç istisna dışında B-hücreli lenfomaların hayatta kalması bu genin ekspresyonuna bağlıdır. Ayrıca tümör mikroçevresi, lenfoma hücrelerinin hayatta kalmasına ve çoğalmasına da katkıda bulunabilir (71).

2.4.1. HİSTOGENEZ VE PREMALİGN LEZYONLAR

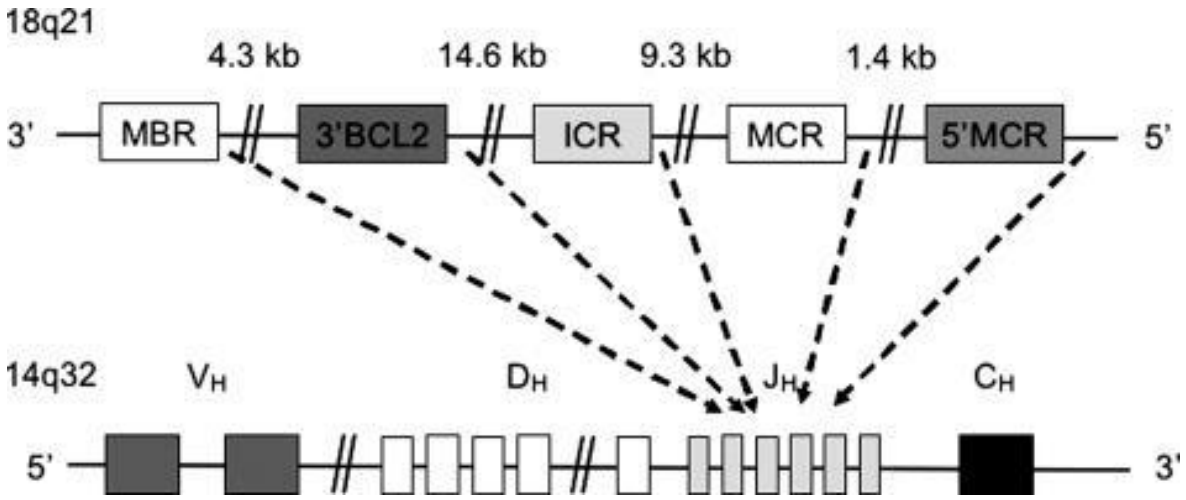
Tümör gelişimi, malignitenin tam olarak ortaya çıkmasından önce çok aşamalı bir onkogenik süreçtir. Bu süreçte birçok genetik değişiklik gözlenmektedir (72). Morfolojik olarak FL malign GC B hücrelerinin çoğalması ile karakterizedir. Ayrıca tümör mikroçevresinde bulunan malign olmayan T hücreleri, FDH ve makrofajlar hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır (19). FL'nin histogenezi, normal B hücresi gelişimi ve farklılaşmasının temel olaylarıyla yakından ilişkilidir. Kemik iliğinde erken B hücresi gelişimi sırasında, progenitör B hücreleri, antikor moleküllerinin değişken kısımlarını kodlayan immünoglobulin ağır ve hafif zincirlerinin V (variable) bölgelerindeki genlerini birleştirmek için V(D)J rekombinasyon süreçlerinden geçer. Bu, yeniden düzenlenen *V, D* (diversity) ve *J* (joining) genlerinin uçlarında bulunan spesifik rekombinasyon sinyal dizilerinde (recombination signal sequences-RSS'ler) DNA çift sarmal kırıkları içerir. İlk olarak, bir progenitör B hücrede, bir *IGHD* geni bir *IGHJ* genine birleştirilir ve bir sonraki adımda, bir *IGHV* geni

D_HJ_H ucu ile yeniden birleştirilir. Prekürsör B-hücresi reseptörü olarak bir ağır zincir genini ifade eden B-hücresi öncülleri, pre-B hücreleri adlandırılır (Şekil 2.3) (40, 73).



Şekil 2.3. İmmünoglobulin ağır zincir lokusunda V(D)J rekombinasyonunun şeması (74).

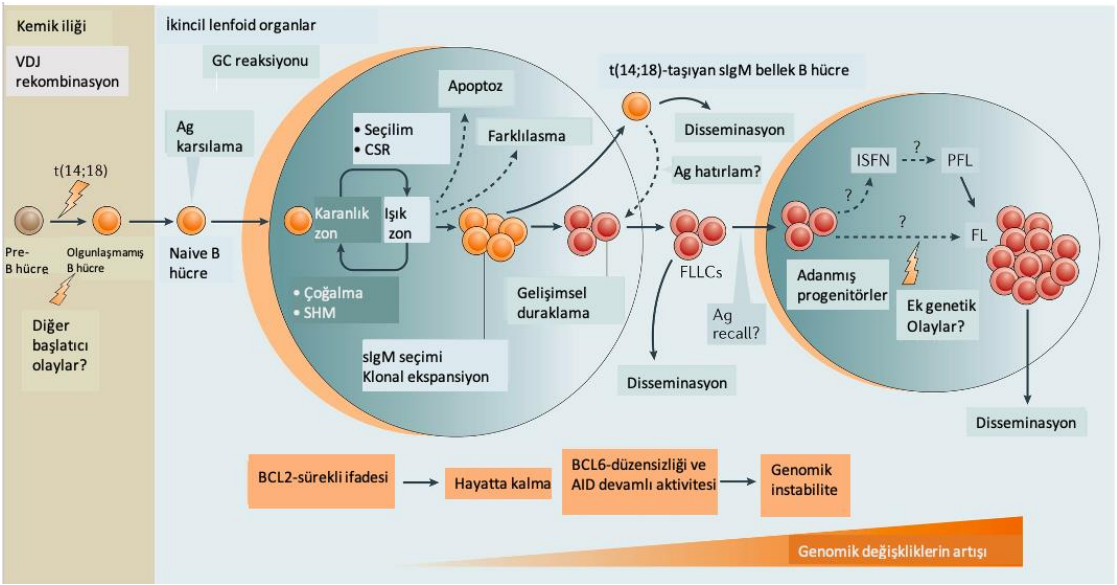
Nadir durumlarda, V(D)J rekombinasyonu sırasında hatalar meydana gelebilir ve immünoglobulin lokuslarının birisinde yeniden düzenleme genlerinin uçları, başka bir kromozomdaki DNA kırıklarına yanlışlıkla bağlanabilir. Bu bağlanma sonucunda resiprokal bir kromozom translokasyonu ortaya çıkar (75). Bu translokasyonlardan t(14; 18)(q32; p21) translokasyonu FL olgularının yaklaşık % 90'ında meydana gelir. Bu translokasyon, *BCL2* geninin bir *IGHJ* genine veya *IGH* lokusundaki bir D_HJ_H katılım bölgesine bağlanmasıyla gerçekleşir (76, 77). *BCL2* lokusundaki kesim noktaları üç bölgede: ana kesme noktası bölgesi (major breakpoint region-MBR), küçük küme bölgesi (minor cluster region-MCR) veya ara küme bölgesinde (intermediate cluster region-ICR) kümelenir (78, 79). Bu çeşitli kesme noktaları Şekil 2.4'de gösterilmiştir.



Şekil 2.4. IGH/BCL2 translokasyonuna göre kesme noktası sitelerinin haritası (80).

MBR bölgesindeki DNA'nın kesme işlemleri, V(D)J rekombinasyonuna aracılık eden rekombinasyon aktive edici (recombination activating gene-RAG) enzimleri tarafından gerçekleştirilir. Böylece RAG enzimleri, her iki gendeki DNA kırıklarından sorumludur (81). Sonuç olarak, *BCL2* geni, *IGH* lokusunun enhancer bölgesinin kontrol altına alınarak antiapoptotik BCL2 proteininin konstitütif ekspresyonunu sağlar (75). BCL2 proteininin aşırı ifadesi ise programlanmış hücre ölüm yolağının engellenmesiyle apoptozu durdurur (82). Bu translokasyon kemik iliğinde B hücre gelişimi sırasında ortaya çıkar. Ancak B hücreleri translokasyona rağmen olgunlaşmaya devam eder. $t(14;18)^{+}$ naif B hücrelerinin çoğu IgM hafıza B hücreleri olarak diğer lenfoid organlara taşınırlar ve gelişmeleri için sinyal tararlar. t(14;18) translokasyonunu taşıyan ve bunun sonucunda da BCL2'nin aşırı ifadesinin olduğu B hücreleri antijen karşısında düşük afinitleri olsa da, apoptozdan kaçabilirler (83-85). GC; ikincil lenfoid dokularda oluşan küçük bir yapıdır. Bu yapıda re-enfeksiyona karşı uzun ömürlü antikor salgılayan plazma hücreleri ve hafıza B hücreleri üretilir (86). GC'in koyu alanında, antijen uyarımı sonucunda B hücreleri klonal ekspansiyona uğrar. Somatik hipermutasyon sürecinde IGV bölgesinin genlerindeki değişim ile hücrelerin afinitesi de değişir (73, 87). Bu bağlamda somatik mutasyonlar büyük ölçüde rastgele olduğundan, sadece birkaç hücre afiniteyi arttıran mutasyonları kazanır. Bu hücreler açık alanda bulunan T foliküler yardımcı hücreler tarafından çoğaltılmak amacıyla seçilir (88). Sentrositlerin çoğu self antijenlere karşı yüksek affinite gibi dezavantajlı mutasyonları geliştirir. Bu mutasyonlara sahip hücreler apoptoza uğrar (89). GC'nin açık alanında pozitif

şekilde seçilen B hücreleri farklılaşır ve hafıza B hücreleri veya plazma hücrelerine dönüşür (90). *IGH-BCL2* translokasyonunu taşıyan B hücreleri GC reaksiyonlarında ve B hücre gelişimi sırasında, apoptoz ve seçilim esnasında oluşan bir bozukluk sebebiyle hayatta kalma şansı kazanabilir (91). Sağlıklı bireylerin %70'inden fazlasında, kan veya lenfoid dokularında (kemik iliği dahil) düşük seviyelerde (milyonda bir hücre) $t(14;18)^+$ hücrelerini taşırlar. Bu durum, yaş ilerledikçe artmaktadır (92, 93). Bu translokasyonu taşıyan bireylerin büyük çoğunluğu hiçbir zaman FL geliştirmez. Bu da BCL2'nin tek başına deregülasyonunun B lenfositlerin onkogenik transformasyonu için yeterli olmadığını göstermektedir (12). FL'nin onkogenik transformasyonu için GC B hücreleri, B hücresi olgunlaşmasının sonraki aşamalarında daha fazla onkojenik değişiklikler bir araya gelmesiyle ortaya çıkmaktadır (85). Vakaların %10'unda yalnızca t(14;18) translokasyonu görülmektedir ve çoğunda en az bir veya birden fazla değişiklik ortaya çıkar. Buna ek olarak bu tür translokasyonu taşımayan FL sahibi bireylerinin yaklaşık %10-15'i de morfolojik olarak benzer tümörler geliştirebilmektedir (72). Ayrıca FL vakalarında ne kadar fazla ikincil genetik değişiklikler görülürse, hastalık da o kadar agresif seyretmektedir (84, 94). Sonuç olarak $t(14;18)^+$ B hücreleri, uzun zaman dilimi içerisinde FL'in gelişmesine neden olmaktadır (Şekil 2.5) (95).



Şekil 2.5. FL patogenezinin senaryosu (8).

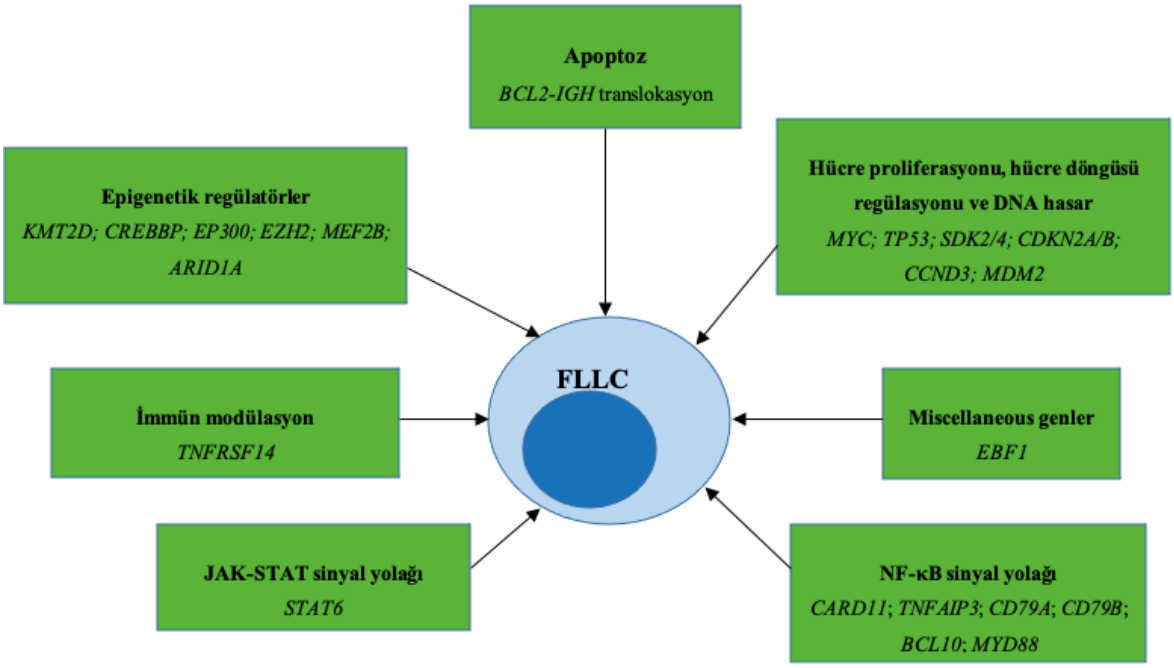
Neoplastik hücreler sentroblast ve sentrosit yüzey belirteçlerini (CD10 ve BCL6) ifade ederler ve aktif hipermutasyonu gösterirler (19, 96). Bu belirteçleri ifade eden, lenf

nodüllerinde bulunan, değişken B hücresi popülasyonu ile kolonize edilmiş ve hiperplastik GC'leri temsil eden lezyonlar "foliküler lenfoma in situ" (FLIS) olarak tanımlanırken (97, 98) periferik kandaki t(14,18)$^{+}$ B hücreler "foliküler lenfoma benzeri hücreler" (Follicular lymphoma like cells-FLLCs) olarak adlandırılmıştır (99). Bu hücreler, *B hücre lenfoma 6* (BCL6) ve aktivasyonla indüklenen sitidin deaminaz (AID) gibi enzimlerin ifadesiyle GC fonksiyonunu korurlar (8). Güncellenmiş (2016) DSÖ sınıflamasında, önceden "foliküler lenfoma in situ" olarak adlandırılmış lezyonlar, hastalığın klinik olarak zayıf seyrini tanımlamak için "in situ foliküler neoplazi" (ISFN) olarak yeniden adlandırılmıştır (22). Yüksek AID ifadesine sahip olan FL hücreleri immünoglobulin lokuslarında devamlı somatik hipermutasyona uğrar. Bu durum klinik olarak malign transformasyondan çok önceki aşamalarda ortaya çıkabilir (100).

t(14;18) translokasyonuna ek olarak, hemen hemen tüm FL vakalarında ek olarak kromozomal değişiklikler görülmektedir (72). FL vakalarının yaklaşık %5-15'inde hatalı sınıf değişim rekombinasyonu (class switching recombination-CSR) sonucunda *IGH* lokusu ve *BCL6* geni arasında t(3;14)(q27;q32) da bulunmaktadır (48, 51, 101, 102). 3q27 translokasyonunu içeren sitogenetik anormallikler daha agresif bir klinik seyir ile ilişkilendirilmiştir (51, 102). FL'lerin patogenezinde klonal sitogenetik bozukluklar, kopya sayısı değişiklikleri ve uniparental dizomi (UPD) gibi diğer genetik değişimler hastalığın patogenezine katkıda bulunurlar (95). t(14;18) dışında en yaygın kromozomal anormallikler 1p36, 6q ve 17p kaybı ve 7, 8, 12q, 18q ve X kazanımını içerir (103). 6q ve 17p kollarındaki kayıplar kötü prognoz ve daha yüksek dereceli hastalık transformasyon ile güçlü şekilde ilişkilidir (103).

2.4.2. İKİNCİL ONKOGENİK BOZUKLUKLAR

BCL2 deregülasyonu FLLC'lerin malign transformasyonu için gereklidir ancak yeterli değildir. t(14;18)$^{+}$ B hücrelerinin olgunlaşması esnasında, ikincil genetik değişiklikler, BCL2'nin onkogenik fonksiyonunu tamamlaması için gereklidir (95). FL'yi etkileyen ana biyolojik yolaklar ve bu yolaklara katılan genlerin özeti Şekil 2.6'te sunulmuştur. Yedi fonksiyonel kategoride, en yaygın tanımlanan mutasyonlar ve ifade değişiklikleri gösterilmiştir. Her bir FL tümörü, aynı veya diğer kategorilerden birkaç mutasyonu veya genetik değişikliği barındırabilmektedir.



Şekil 2.6. FL patogenezineki ana genetik olaylar ve biyolojik yolakların özeti.

2.4.2.1. Epigenetik düzenleyicilerdeki değişiklikler

Epigenetik deregülasyon hematolojik malignitelerin çoğunun belirgin bir özelliğidir. Ancak GC B-hücreli lenfomalarda daha da spesifiktir (104). FL lezyonlarında gözlenen en yaygın genetik değişiklikler, histon posttranslasyonel modifikasyonlar (PTM'ler) ve kromatin modifikasyonlarıdır (12). *KMT2D* (*MLL2/ALR/MLL4*), *EZH2*, *MEF2B*, *CREBBP* ve *EP300* kromatin düzenleyici genlerdir ve mutasyonları sık sık FL'lerde görülmektedir. FL'lerin %90'ı, histon metil transferaz genlerinde (HMT) mutasyon taşırlar (103). FL'lerin %89'u t(14;18) (q32;q21) ile aynı sıklıkta *KMT2D* mutasyonunu da gösterir. Bu mutasyon FL vakalarında görülen en yaygın genetik anormalidir (105). *KMT2D* bir H3K4 metiltransferazını kodlar. Bu enzim genlerinin promotör ve enhancer bölgelerinde histon 3 lizin 4'ün (H3K4) metile ederek hedef genlerin ifadesini artırır (106). FL'lerde mutant *KMT2D*'lerin çoğu kısalmış ve erken durdurma kodonları, çerçeve kayması insersiyon ve delesyonlar, splice/uç birleşme bölge mutasyonulardır. Bu mutasyonlar katalitik SET alanının kaybı nedeniyle fonksiyonel olarak kısalmış veya defektif proteinlerle sonuçlanır. Dolaysıyla enzimin metiltransferaz aktivitesi azalır veya tamamen proteinin ifadesinin kaybıyla sonuçlanır (107). Bu lenfoma ile ilişkili *KMT2D* mutasyonlar, KMT2D enzimatik

aktivitesinin bozmasıyla GC B hücrelerinde H3K4 metilasyonunda azalması ve hedef genlerin baskılamasına neden olur (108).

CREBBP ve EP300 histon asetil transferaz (HAT) enzimleridir ve bunların somatik mutasyonlar veya delesyonları, FL'lerde sık rastlanmaktadır. CREBBP, EP300'ün homoloğudur. FL'lerin %36'sında CREBPP ve %8'inde EP300 genlerin mutasyonu görünür. CREBBP'de oluşan mutasyon, bu enzimin katalitik HAT alanında kümelenir. Bu mutasyonlar özellikle UPD'den etkilenir. Bu nedenle mutasyonlar tipik olarak yüksek mutasyon yükü ile homozigottur ve substratlarını asetile edemezler (72). CREBBP ve EP300, lenfomalarda tümör baskılayıcı olarak, çekirdekte histon ve histon olmayan (transkripsiyon faktörler) proteinlerin lizin kalıntılarını asetile ederler (109). Bu genlerin mutasyonu sonucu hem düzensiz TP53 ve BCL6 ifadesi ve hem epigenetik düzensizlikleridir. Bu proteinlerin histon olmayan hedeflerinden, MEF2B bir transkripsiyon faktörüdür (TF). Diğer hedeflerinden BCL6 bir onkoprotein ve TP53 tümör baskılayıcı proteinlerdir. CREBBP ve EP300, post translasyon modifikasyon aşamalarında BCL6 ve TP53'ü asetile ederler ve böylece BCL6 etkisiz ve TP53 etkin hale gelir (110). Mutant CREBBP ve EP300 tümör baskılayıcıları, TP53 ve BCL6'yı asetile edemezler ve bunun sonucu BCL6'nın konstitütif aktivasyonu ve TP53'ün aktivitesinin azalmasıdır (111). Mutant MEF2B proteini, mutatnt CREBBP ve EP300'lere bağlanabilir. CREBBP ve EP300 hedeflerinden biri H3K27'dir. Bu histon işareti EZH2 ile metile olur ve transkripsiyonu baskılanır. Böylece EZH2'nin etkisi CREBBP/EP300 etkisini antagonize eder (105).

Başka bir histon metiltransferaz olan, EZH2, FL'nin yaklaşık %25'inde mutasyona uğrar (12, 112, 113). H3K27 metile eder ve bunun sonucu gen ifade baskılamasıdır (114, 115). Bu genin en yaygın mutasyonu SET alanındaki Y641, tirozin amino asitinde görünür. EZH2'nin mutantları fonksiyon kazancı gösterir ve H3K27'nin trimetilasyonun artırır (112). Yabanıl EZH2 histon 3'ün 27'inci lizinini monometile ederken, mutant gen bu lizini, di- ve tri-metile eder (116, 117). Mutant EZH2, p21'in baskılanmasıyla hücrelerin G1 aşamasından geçişine ve hücre proliferasyonuna neden olur (118).

FL vakalarının %13,4'ünde *MEF2B* genin mutasyonları gözlenir. MEF2B bir TF olarak HDAC'lar ve HAT'ler (CREBBP/EP300) gibi histon modifiye eden enzimleri hedef genlere bağlanmasını sağlar. Mutant MEF2B'lerin transkripsiyon aktivitesi artar. Bunun sonucu

BCL6 onkogeni ifadesinin artışı ve GC B-hücrelerin malign transformasyonunu ve lenfoma oluşumunun tetiklenmesidir. CREBBP/EP300 ve HDAC'lar MEF2B'nin bağlanan alanının bağlanması için yarışırlar (105).

FL vakalarının yaklaşık %10-15'inde *ARID1A* genini etkileyen mutasyonlar tanımlanmıştır. *ARID1A*, ATP'ye bağlı bir kromatin yeniden modelleme SNF/SW1 kompleksini kodlar. Kanıtlara göre oluşan mutasyonlar çoğunlukla kısalmış diziler oluşturur. Bu mutasyonlar normal DNA hasar yanıt mekanizmalarını bozar ve hücreleri genomik karasızlıklara yatkın hale getirebilir (119).

2.4.2.2. İmmün modülatörlerlerdeki değişiklikler

İmmün modülasyon, tümör hücreleri tarafından konağın doğal bağışık yanıtlarından kaçmak için sıklıkla kullanılan bir mekanizmadır. TNFRSF14, B ve T hücresi aktivasyonu veya inhibisyonunda yer alan çift yönlü bir sinyal molekülüdür. FL'de dördüncü en çok mutasyona uğrayan gendir (120). Birçok çalışma, %18-46 arasında değişen sıklıkta *TNFRSFI4* mutasyonlarını ortaya koymuştur (121, 122). Bu gen hematopoietik hücreler (B ve T hücreleri) tarafından her zaman ifade olup iki yönlü bir şekilde substartlarının birlikte hem uyarım ve hem de inhibisyonuna sebep olur. Beş farklı ligand ona bağlanabilir. Bu nedenle farklı etkiler göstermektedir (123, 124). FL hastaların yarısındaki bulan bu mutasyonlar veya delesyonlar bu reseptör etkisiz hale getirip ve genellikle kötü bir prognoz ile ilişkilidir (125).

2.4.2.3. NF-κB sinyal yolağındaki değişiklikler

Genetik lezyonlardan kaynaklanan anti-apoptotik NF-κB sinyal yolağın deregülasyonu ve özellikle bunun sürekli etkileşimi birçok B-hücreli lenfomanın özelliğidir. NF-κB ve B-hücresi reseptör sinyalinin hem pozitif hem de negatif düzenleyicilerini etkileyen genetik değişiklikler FL'de sık rastlanmaktadır. *CARD11*; NF-κB yolağında CBM (CARD11-BCL10-MALT1) signalozom kompleksinde skafold proteinini kodlar. Bu kompleks B hücrelerinde antijenlerin reseptörlere bağlanması ile bu yolağın aktivasyonunu sağlar (126). *CARD11* mutantları vakaların %10'unda görülürken NF- κB yolağının negatif düzenleyicisi olan A20 enzimini kodlayan *TNFAIP3*, benzer bir sıklıkta mutasyona uğrar. Bu sinyal yolağında *CD79A, CD79B* ve *BCL10* dahil olmak üzere diğer genlerin mutasyonaları %5'ten daha az sıklıkta kanıtlanmıştır (72). Toll benzeri reseptör (TLR) yolağında yer alan ve bir

immün reseptör adaptör proteinini kodlayan *MYD88*'de somatik mutasyonlarının, çoğunlukla nüks eden ve transformasyonu uğrayan FL vakalarında görülmektedir (127).

2.4.2.4. JAK-STAT sinyal yolağındaki değişiklikler

Janus kinaz sinyal dönüştürücüsü (JAK) ve transkripsiyon yolağın aktivatörü (STAT), yolağı sitokin, kemokin ve büyüme faktörü reseptörleri tarafında sinyal iletimine aracılık eder ve normal hematopoezde kritik rol oynamaktadır. Bu reseptörlerin çoğu, çok sayıda hücresel anti-apoptotik, proliferatif ve farklılaşma sinyali iletir ve bu yolağın sürekli aktivasyonu, hematolojik kanserler de dahil olmak üzere birçok malignite ile ilişkilendirilmiştir. SOCS1 proteini, JAK-STAT yolağın negatif düzenleyicisidir. JAK tirozin kinazın doğrudan inhibisyonu sinyal iletimini sonlandırır. Vakaların %10'undan azında *SOCS1* mutasyonları meydana gelir (128). STAT protein ailesindeki bozukluklar, bir sitoplazmik transkripsiyon faktörü olan STAT6 dışında, FL vakalarında nadirdir. FL hastaların yaklaşık %11'inde *STAT6*'nın somatik mutasyonlar bulunmaktadır (129, 130). Bu gen IL-4 ile aktif olur fakat FL'lerde IL-4'den bağımsız olarak STAT6'nın nükleer lokalizasyonu kolaylaşır (129).

2.4.2.5. Hücre proliferasyonu ve hücre döngüsü regülasyonu ile ilgili genleri etkileyen değişiklikler

Tümör hücrelerinin temel özelliklerinden birisi, kontrolsüz ve bağımsız çoğalma kabiliyetidir. Bu özelliği kazanmak için, tümör hücreleri çeşitli onkogenlerin ve tümör baskılayıcıların normal aktivitelerini önlerler. FL'de, bu süreçlerin düzenleyici mekanizmalarında yer alan birkaç gen, tümör popülasyonuna proliferatif bir avantajı sağlamak için değişiklikleri kanıtlanmıştır. Proto-onkogen, *MYC* ve hedef genlerindeki değişiklikler, FL transformasyonu ile ilişkilidir (131-133). Tümör baskılayıcı olan *TP53* genin lokusunda çeşitli mutasyonlar ve delesyonlar sıklıkla FL vakalarında gözlenir ve malignitenin ilerlemesi veya transformasyon fazını arıttırır (134, 135). Ek olarak, belirli hücre döngüsü elemanları ve bunların regülatörlerinde kopya sayısı dengesizlikleri nedenli ifade değişiklikleri görülmektedir.

2.4.2.6. Çeşitli genlerdeki değişiklikler

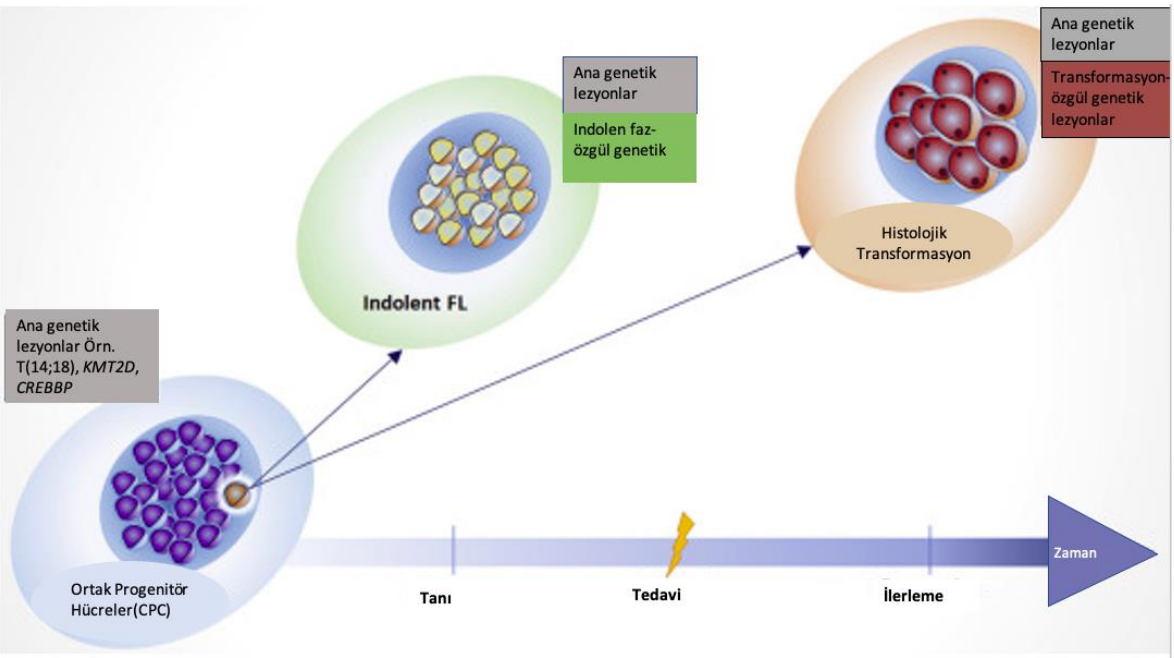
EPHA7 geninde, 6q kolunda sık sık ortaya çıkan delesyon, FL vakaların %23'inde görülmektedir. Bu tümör baskılayıcıyı taşıyan 6q kolun delesyonu vakaların neredeyse dörtte birinde görünürken, vakaların %72'sinde protein ifadesinin azalması veya hatta olmaması kanıtlanmıştır. Bunun nedeni ek epigenetik susturmanın bir sonucu olduğu düşünülmektedir (136).

B hücre gelişiminde önemli rol oynayan genlerin mutasyonu FL hastaların %17'sinde gözlenmektedir. EBF1 transkripsiyon faktörü (TF) B-hücrelerinin gelişiminde katılan bir elemandır. FL vakalarının nerdeyse %10'unda görülen mutasyonların yarısı DNA'ya bağlanan alandadır. Bu TF'nin hedef genlere bağlanması; transkripsiyonun aktivasyonu, baskılaması ve H3K4'un dimetilasyonun indükleyebilir. Mutant EBF1'ler *Igll1* ve *CD79B* hedef genlerin up-regülasyonunu bozar ve bu da FL'lerde işlem kaybı mutasyonlara neden olur (137).

2.4.3. FOLİKÜLER LENFOMA TRANSFORMASYON GENETİĞİ

Lenfomaların indolent formundan daha agresif formuna transformasyonu hastaların terapötik ve prognostik öykülerinde kritik bir olaydır. FL'lerin histolojik transformasyonu yılda hastaların %2-3'ünde meydana gelir. Bu durum tedavi direnci, ilerleme ve lenfomaya bağlı mortaliteyle ilişkilidir (127, 138, 139).

Tipik olarak transformasyon ileri evre ve yüksek FLIPI skorları ve B semptomları, yükselmiş LDH veya kalsiyum, gibi yeni semptomların ortaya çıkmasıyla ilişkilidir (140, 141). FL transformasyonu en yaygın DBBHL ve daha az *MYC* ve *BCL2* veya *BCL6* translokasyonu nedenli yüksek dereceli B hücreli lenfoma olarak ortaya çıkar. Ayrıca lenfoblastik lenfoma ve akut lenfoblastik lösemi (ALL) de nadiren görülür (142). Transformasyon, ortak progenitör hücrelerin klonal evriminden kaynaklanır (143). Ardında genetik mutasyonlar, epigenetik mekanizmalar ve tümör mikroçevresindeki değişiklikler, gibi diğer genetik olaylar transformasyonun patogenezinde ortaya çıkar. Şekil 2.7 FL'nin histolojik transformasyonun altında yatan farklı klonal evrimini göstermektedir.



Şekil 2.7. Foliküler lenfomada germinal merkezdeki malign transformasyonun biyolojik temeli (144).

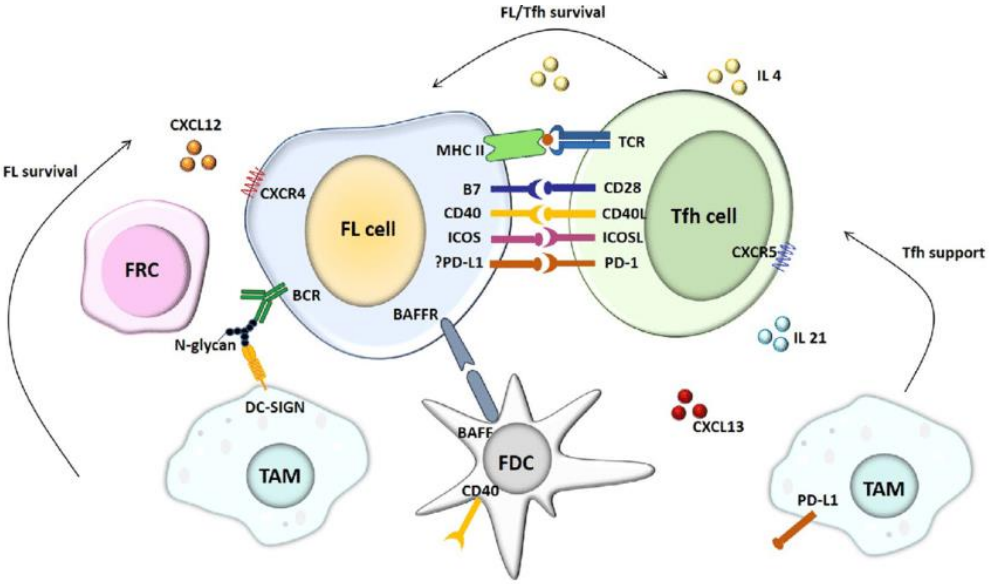
FL hücreleri, somatik hipermutasyon sürecinin sürekli devam etmesi için diğer NHL hücresi türleri arasında benzersizdir (145). Tek bir biyopsiden elde edilen FL hücreleri, immünoglobulin VDJ rekomombinasyonundan dolayı heterojendir (146). Tek bir tümör içinde, her biri farklı GC'deki malign transformasyon potansiyeline sahip klonlar mevcuttur. Rossi ve ark. DBBHL'lara dönüşen FL vakalarında *PIM1*, *PAX5* ve *MYC* proto-onkogenlerinde somatik hipermutasyonları bulmuşlardır (147). tFL (transforme FL) hastalarında, *TP53* musayonu, *CDK2A* kaybı ve *c-REL* amplifikasyonu, proliferasyon yolağın tetiklemesiyle gözlenen onkogenik olaylardandır (148). FL ile karşılaştırıldığında tFL'de *TP53*'ün negatif düzenleyicisi olan ve hücre döngüsü regülatörlerinde katılan *MDM2* ve *MDM4* genlerinde daha yüksek fonksiyon kazanç mutasyonları gözlenir (149).

Tümör mikroçevresi foliküler tümör hücrelerinin sağkalım ve prognozuyla ilişkilidir. FL'lerin intrafoliküler alanında fazla sayıda bulunan $CD4^+$ T hücreleri ile DBBHL'lara malign transformasyon olasılığının artması arasında bir ilişki gözlenmektedir (150). Proinflamatuar genlerin transforme FL'de, transforme olmayanlara göre daha fazla ifadesi bulunmuştur (151). Ayrıca tümör infiltre eden FOXP3-pozitif Treg hücrelerin sayısının azalması, FL hastalarında daha kötü sağkalım ve ayrıca DBBHL'ye daha fazla

transformasyon olasılığıyla ilişkilidir (152). MHC sınıf I (*B2M*, *HLA-B*, *HLA-C*) ifadesinde yer alan genlerin delesyonları FL'den daha fazla dönüşmüş FL'de bulunmuştur (149). tFL'lerde NF-κB yolağında *TNFAIP3* ve *MYD88*, B hücre gelişiminde *EBF1*, immün modülasyonunda *CD58* ve *TNFRSF14*, JAK-STAT yolağında *SOCS1* ve *STAT6* ve B hücre reseptörü yer alan *BCL10*, *CARD11* ve *CD79B* (128), GC B hücrelerinin yayılmasında rol oynayan *GNA13*, *S1PR2* ve *P2RY8* ve hücre döngüsünde olan *CCND3* gibi çeşitli genlerde mutasyonlar rastlanmaktadır (153).

2.4.4. TÜMÖR MİKROÇEVRESİNİN ROLÜ

Tümör mikroçevresi, bir tümör hücresini çevreleyen ve besleyen normal hücreler, moleküler ve kan damarlarından oluşmaktadır (154). FL hücreleri, tümör mikroçevresini oluşturan ve malign olmayan immün hücrelerin içerisinde bulunmaktadır (95, 155). Genetik değişikliklere ek olarak, tümör mikroçevresi, FL'nin biyolojik davranışında ve ilerlemesinde önemli bir rol oynamaktadır. Mikroçevrenin rolü, FL hücre hatların *in vitro*'da besleyici hücre ve sitokinler gibi bileşenler olmaksızın hayatta kalamaması ve otonom olarak büyümemesi ile vurgulanır. Lenfoma/Lösemi Moleküler Profil Oluşturma Projesi'nin (LLMPP) çalışmasındaki bulgulara göre, T hücre ve makrofajla-ilişkili genlerin ifadesi olumlu sağkalım ile ilişkilendirilirken, diğer makrofajlar veya dendritik hücrelerle ilişkili transkriptler, hastalığın kötü sonucuyla ilişkilidir (Şekil 2.8) (156).



Şekil 2.8. Tümör mikroçevre (TME) hücreleri ve foliküler lenfoma (FL) hücrelerin karşılıklı etkileşimleri (157).

FL'de, folikül'lerin yapısı ve hücre bileşenleri normal lenf düğümlerinden farklıdır. FL biyopsilerinde normal lenf düğümleri ile karşılaştırıldığında, hücresel bileşenlerin değişmesi ve prolifere neoplastik B hücreleri nedeniyle GC'lerin büyümesi gözlenir. Örneğin regülatör T hücreleri artarken, azalmış Th1 ve Th17 hücreleri gibi efektör T hücreleri FL'de bulunur (154). FL, tümör mikroçevresi %50'den daha fazla T hücresinin varlığı ile karakterizedir (156). FL mikroçevresinde bulunan T hücreleri genellikle heterojendir. Çeşitli T hücre popülasyonlarının prevalansına göre tümör bağışıklığında hem olumlu hem de olumsuz role sahiptir. T lenfositler $CD4^+$ ve $CD8^+$ hücre popülasyona ayrılabilir. Genelde, $CD4^+$ T hücreleri diğer bağışıklık hücrelerine yardımını sağlar ve $CD8^+$ T hücreleri perforin ve granzim B'nin (GrzB) salgılanmasıyla hedef hücrenin ölümüne neden olur. Foliküllerin hem içinde hem de dışında görülen $CD4^+$ hücrelerinin aksine, $CD8^+$ hücreleri çoğunlukla perifoliküler alanda bulunur (154). Üç boyutlu konfokal lazer tarama mikroskopisi, sitotoksik $CD8^+$ T-lenfositler (CTL'ler) ve FL B hücreleri arasındaki teması ve çoğu $CD8^+GrzB^+$ hücrelerin FL B hücrelerini hedeflediğini göstermiştir (158). Klinik olarak, daha yüksek intratümöral $CD8^+$ T hücre sayıları, FLIPI ve diğer tüm prognostik faktörlerden bağımsız olarak daha uzun sağkalım (OS) ve hastalığa özgü sağkalım (DSS) ile ilişkilidir (159). FL B-hücreleri, doğuştan gelen bağışıklık sisteminin klasik etkileşimini değiştirir ve edinilmiş bağışıklık tepkisinin işlevini bozar. Malign B hücreleri tarafından IL-12 salgılaması TIM3 ifadesiyle T hücrelerin tükenmesine sebep olduğu gösterilmiştir (160). Ayrıca, FL hücreleri, efektör T hücrelerinin FOXP3 ifade eden Treg hücrelere transformasyonun indükler. Bu dönüşmüş Treg hücreleri hem $CD4^+CD25^-$ hem de $CD8^+$ T hücrelerinin çoğalması ve etkileşimin baskılar (161).

Tümör gelişiminin sonraki aşamalarında, makrofajlar, tümörle ilişkili makrofajlar (tumor-associated macrophages-TAMs) denilen bir alt popülasyona farklılaşır. TAM'ler, M2 hücrelerine polarize olabilir. Bu makrofajlar Th2 farklılaşmasını ve işe alımını teşvik etmek için sitokinleri salgılar. M2 hücreleri genelde antitümör bağışıklığını baskılamasıyla tanımlanmıştır. Ayrıca TAM'ler TGF-β gibi baskılayıcı sitokinleri salgılayarak, anti-tümör bağışıklığını engellediğine neden olur. Buda anjiyogenezi teşvik etmek ve tümör büyümesini destekleyen büyüme faktörlerini ifadesiyle gerçekleştirilir. FDH'ler, foliküllerin GC'inde bulunan stromal hücrelerdir. Tamamen farklılaşmış FDH'ler, düşük afiniteli IgE reseptörü CD23, kompleman reseptörleri CD21 ve CD35 ve lenfosit kemoatraktan CXCL13'ü ifade

eder. FL hastalarında, FDH'ler olgunlaşmamış olabilir. Bu olgunlaşmamış denritik hücreler CD23, CD21 veya CD35 gibi yüzey belirteçlerinin tamamen veya kısmen kaybın gösterir. Bundan ilave Lenf düğümlerinde olgun FDH'leri olan FL hastalarında FL ile ilişkili T hücrelerinin sayısında artışı görülmektedir. Tanı anında olgun FDH'ler daha yüksek bir klinik evre ile ilişkilidir. Bu gözlemler, FL mikroçevresinde malign B hücreleri immüno-gözetimden kaçmak için çeşitli T hücrelerin fonksiyonların bozmasını göstermektedir.

2.5. FOLİKÜLER LENFOMANIN EPİGENETİĞİ

Epigenetik deregülasyonu uzun süredir birçok solid ve hematolojik kanserlerin temel özelliği olarak kabul edilmiştir. Şimdiye kadar, hematolojik malignitelerin tedavisi için de birkaç epigenetik ilaç ruhsatlandırılmıştır (23).

Gen düzenlemesine katılan epigenetik mekanizmalar, normal hücresel süreçlerde kritik bir rol oynar. En yaygın epigenetik modifikasyonlar; DNA metilasyonu, translasyon sonrası modifikasyonlar ve kodlanmayan RNA'lardır. Bu epigenetik modifikasyonlar, kimyasal grupların DNA veya histonlara eklenmesini veya çıkarılmasını içeren dinamik özellikleri gösterir ve epigenetik kodun "yazarları" veya "silgileri" olarak bilinen enzim aileleri tarafından katalize edilir. Başka bir protein grubu 'okuyucular'; 'yazarlar' ve 'silgiler' tarafından oluşturulan modifikasyonların tanınması yoluyla, genomun belirli bölgelerine alınır, kromatin durumunu değiştirip ve ardından hedef genlerin ifadesini düzenler (162).

Foliküler lenfoma ne kadar t(14;18) translokasyonuyla tanımlanan bir hastalık olsa da epigenomu düzenleyen genlerdeki değişikliklerin prevalansı, bu lenfomanın önemli bir özelliği olduğu belirlenmiştir (162). FL'yi ayıran özellik, bu hastalığın epigenetik değişikliklere olan bağımlılığıdır. FL vakalarının yaklaşık %100'ünde en az bir kromatin değiştirici gende mutasyon bulunmaktadır (163). Bu epigenetik değiştiricilerdeki lezyonlar neredeyse tüm hastalarda meydana gelir (23). Ancak daha agresif bir NHL formu olan diffüz büyük B hücreli lenfomanın, germinal merkez B hücresi benzeri (GCB) benzeri alt tipinde epigenetik değiştiricilerin (*CREBBP*, *EP300*, *EZH2* ve *KMT2D*) %60'ında (FL ile aynı sıklıkta) ve aktive edilmiş B hücresi (ABC) benzeri alt tipinde ve Burkitt lenfomada'da daha az epigenetik mutasyon bildirilmiştir. (105, 164, 165).

2.5.1. DNA METİLASYONU

DNA metilasyonu ile ilişkili tümör baskılayıcı genlerin transkripsiyonel baskılaması, hematolojik malignitelerde yaygın bir epigenetik olaydır (166). FL patogenezinde olan DNA'nın anormal metilasyonu, bir epigenetik düzensizliğinin göstergesidir. GC reaksiyonu esnasında, normal B hücreleri, AID enzimin aracılığıyla büyük ölçüde sitozin metilasyonuna maruz kalırlar (167). Bu durum çoğunlukla heterokromatini etkileyen global hipometilasyon ve Polycomb tarafından baskılayan bölgelerin hipermetilasyonu ile karakterizedir (168). FL tümörleri bu DNA metilasyon modelinin daha belirgin bir versiyonunun, özellikle B hücre farklılaşma sırasında dinamik metilasyon uğrayan bölgelerde taşırlar (169). Böylece, belirli tümör baskılayıcı genlerin promotör bölgelerinde ve bununla birlikte BCL6 ve EZH2'nin hedef genlerinde artan DNA metilasyonu saptanmıştır (169, 170). Bu anormal metilasyon profili, kromatin modifiye eden değişikliklerle, GC B hücrelerinin fonksiyonel durumlarını bozarak bu hücrelerin malign transformasyonlarını destekler. İlginç bir şekilde, benzer bir hipermetilasyon paterni, ISFN gibi erken aşamada görülmüştür. Bu metilasyon profilinin bozulması BCL2'nin aşırı ifadesiyle kombinasyonu, GC'deki malign transformasyon kolaylaştırdığını sağlayabilir (171). DNA metilasyon modelinde intratümöral heterojenitenin artması, FL'in daha yüksek histolojik derecesi ve potansiyel olarak hastalığın agresif durumuyla ilişkilendirilmiştir (172). DNA metiltransferaz inhibitörleri kısmen anormal metilasyon profilini ters yönde çevirmesiyle terapötik sonuçları olabilir (173).

2.5.2. KODLAMAYAN DÜZENLEYİCİ BÖLGELER

FL'nin bugüne kadar genetik çalışmaları diğer kanserlerin çoğunluğu ile birlikte, insan genomunun %2'sinden daha azını oluşturan protein kodlayan bölgelere odaklanmıştır. Protein kodlayan bölgelerin yanında bulunan promotörler ve uzak bölgelerde olan enhancer'ler TF bağlanmasıyla gene ifadesin düzenleyen ve fonksiyonel olarak kodlanmayan elemanlardır. Bu alanlar çoğunlukla göz ardı edilmiştir. Ayrıca miRNA'lar ve uzun kodlanmayan RNA'lar (long non-coding RNAs-lncRNA'lar) dahil olmak üzere kodlamayan RNA'lar gen ifadesinde, DNA ve histon modifikasyonlar gibi diğer epigenetik düzenleyiciler ile aynı öneme sahiptir (162).

FL ve birkaç B hücreli lenfomalar ile birlikte kodlamayan genomun incelemesinde yapılan ilk büyük çalışma, Mathelier ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada

TF'lerin bozulmuş bağlanmaları nedeniyle lenfomagenezde katılan bazı önemli genlerin ifade değişikliği ortaya konulmuştur (174). FL'de enhancer bölgelerin profilleme çalışmasına göre, FL hücreleri belirli enhancer'lerin baskılamasıyla GC'de tümör hücreleri için gereksiz transkripsiyonel bileşenlerin ifadesini azaltıp aynı zamanda başka hücre dizileri kritik enhancer'leri kullanmasıyla tümörogenezde spesifik ve avantajlı fonksiyonlar kazanmaktadır (175). Bu bilgiler kodlamayan genomun katkısını FL patogenezinde vurgulamaktadır.

2.5.3. HİSTON MODİFİKASYONLARI

Asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubikitinasyon, SUMOylasyon ve poli-ADP-ribozilasyon gibi histon translasyon sonrası modifikasyonlar, hücre tarafından alınan sinyallerin yanıtında ve farklı enzimler tarafından dinamik bir şekilde düzenlenen mekanizmalardır. Bu enzimler, histon asetil transferazlar (HAT), histon deasetilazlar (HDAC), histon metil transferazlar (HMT), histon demetilazlar (HDM), küçük ubikuitin-benzeri değiştiriciler (small ubiquitin-like modifiers-SUMO) ve ADP-ribozil transferazlar (ADPRT) gibi enzimleri içerir (176).

FL tümörlerin %90'ından fazlası, epigenetik değiştiricileri ('epimutasyonlar') kodlayan genlerinde mutasyonlar saptanmıştır. Bu epimutasyonlar önemli bir patojenik işaretlerdir. Çoğu bu epimutasyonlar, KMT2D, CREBBP ve EZH2 dahil olmak üzere histon modifikasyonları yoluyla epigenetik düzenlemede yer alan genlere odaklanır. Bu değişiklikler histon kuyruğunda bulunan histon 3 lizin 4 (H3K4) ve histon 3 lizin 27 (H3K27) amino asit kalıntılarının yakın iş birliğin göstermektedir (106).

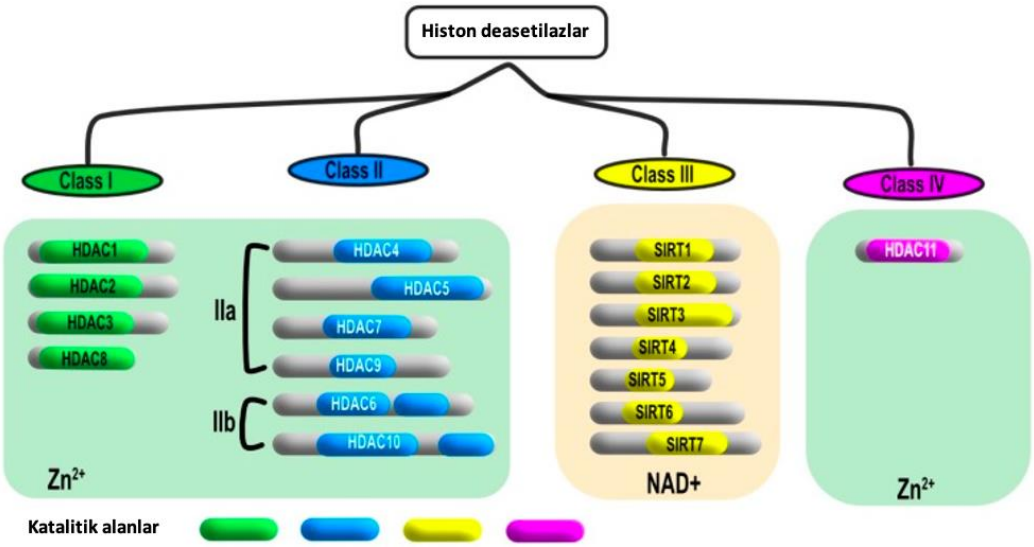
FL'de, histon değiştirici enzimlerdeki mutasyonların genel sonucunu, KMT2D (H3K4me3) "yazarlar" tarafından katalize edilen aktif transkripsiyon işaretlerinin kaybıyla ortaya çıkan gen transkripsiyonunun anormal baskısı ve *EZH2*'deki mutasyonlar sonucunda baskılayıcı H3K27me3 işaretinin artışı ve bunların arasındaki dengesizlikten varsayılır. Bu mutasyonların tek başına etkili oldukları mantıksız bulunup ve B-hücre homeostazınında katılan düzenleyicilerle beraber koordineli bir şekilde oldukları beklenmektedir (177).

2.5.3.1. Histon deasetilazlar

Histon asetilasyon ve deasetilasyon dengesi, gen ifadesi düzenlemesinde kritik rolü olan epigenetik mekanizmalardandır. Asetilasyon seviyeleri, histon asetil transferaz (HAT) ve histon deasetilaz (HDAC) enzimlerinin dengeli faalitleriyle sağlanmaktadır. HAT'ler tarafından indüklenen histon asetilasyonu, gen ifade artışıyla ilişkiliyken, HDAC aktivitesi tarafından indüklenen histon hipoasetilasyonu, gen susturma ile bağlantılıdır. HDAC'ları kodlayan genlerin ifade değişiklikleri ve mutasyonları, hücre çoğalması, hücre döngüsü regülasyonu ve apoptoz gibi önemli hücresel fonksiyonların düzenlemesinde katkıları oldukları için tümör gelişimi ile bağlantılıdır (178).

Mayanın dizi homolojisine dayanarak, insanda olan 18 HDAC dört sınıfa ayrılmaktadır (Şekil 2.9):

1- Sınıf I Rpd3-benzeri enzimler HDAC1, 2, 3 ve 8'den oluşur.
2- Sınıf II Hda1-benzeri enzimler iki alt sınıfa ayrılır: IIa (HDAC4, 5, 6, 7 ve 9) ve IIb (HDAC6 ve 10).
3- Sınıf III Sir2-benzeri enzimler, NAD'ye bağımlı protein deasetilazlar ve/veya ADP ribozilazlar olan yedi sirtuinden oluşur.
4- Sınıf IV yalnızca HDAC11'i içerir.



Şekil 2.9. İnsan HDAC'ların farklı sınıfları (179).

HDAC'lerın ifade değişikliği solid ve hematolojik tümörler dahil olmak üzere çeşitli malignitelerle ilişkilendirilmiştir. Bu nedenle, HDAC'lar kanser tedavisinde en önemli terapötik hedeflerdendir. Bu nedenle HDAC inhibitörlerin geliştirilmesi son yıllarda umut verici amaçlardandır. Bugüne kadar I, II ve IV sınıf enzimlerini hedefleyen çok sayıda sentetik veya doğal moleküller geliştirilmiş ve karakterize edilmiştir. Sınıf III sirtuin ailesine olan çalışmalar da son yıllarda artmaktadır (180).

2.5.4. MEMELİ SİRTUİNLER

Sirtuinler, yaşamın tüm evrelerinde bulunan korunmuş bir protein ailesidir. PTM karışık mekanizmalarının önemli örneklerinden lizin amino asitin yan zincirinin modifikasyonudur. En sık modifiye edilen bu amino asit, transkripsiyon, hücre sinyali, protein döngüsünden hastalık durumlarına kadar çeşitli süreçlerde yer almaktadır (181). Önceden sirtuinlerin mono-ADP-ribozil transferazlar olarak fonksiyonları tanımlanmasına rağmen, geniş ölçüde birincil işlevlerinin lizin deasetilasyonu olduğu kabul edilmiştir. Zn^{2+}'ya bağımlı HDAC'lerin aksine sirtuinler, deasilasyon reaksiyonlarında NAD^+ molekülün kosubstrat olarak kullanırlar (182). Benzersiz NAD^+ bağımlılıklarından, HDAC enzimlerinin sınıflamasında kendilerine ait ve özgün sınıf III'te gruplandırılmıştır. Son çalışmalar bazı sirtuinlerin süksinil, malonil, glutaril gibi diğer asil gruplarını da çıkardığını göstermiştir (183).

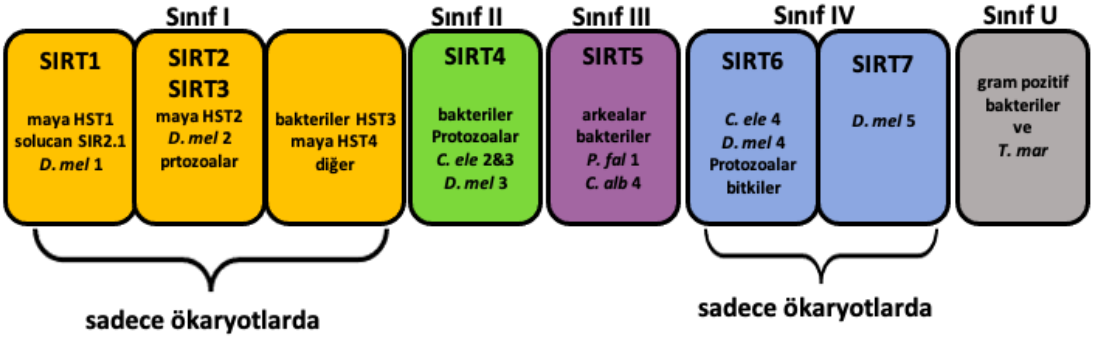
2.5.5. MEMELİ SİRTUİNLERİN SINIFLANDIRILMASI VE LOKALİZASYONU

Sirtuin ailesi enzimleri, bakterilerden memelilere kadar korunmuş enzimlerdir (184). İnsan sirtuin ailesin yedi farklı varyant teşkil eder (SIRT1–7). İlk kez *Sir2* (silent information regulator type 2) geni Saccharomyces cerevisiae'de yaklaşık otuz yıl önce bulunmuştur (185, 186). Mayada bulunan *Sir2* geni memelilerdeki genlerin homoloğudur (187).

Filogenetik analizlere göre memeli sirtuinleri dört farklı sınıfa (I-IV) ayrılır (şekil 2.9):

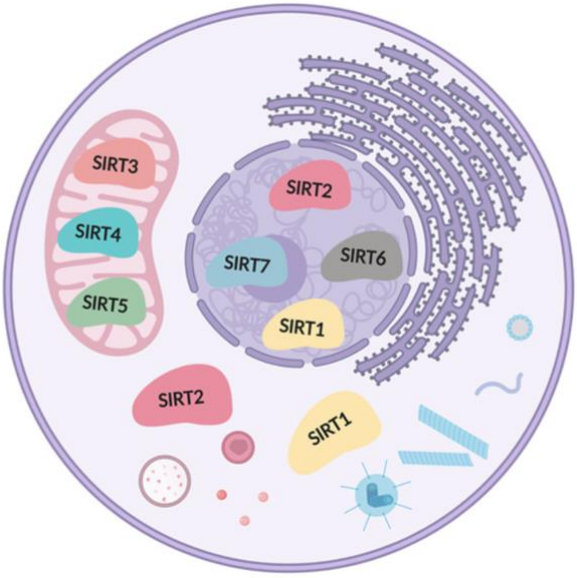
1- SIRT1, 2 ve 3, sınıf I altına yerleştirilir. Sınıf I, maya sirtuinlerine yüksek derece homoloji gösterir, prokaryotlar arasında eşdeğeri bulunmamaktadır ve güçlü deasetilaz aktivitesine sahiptir. Sınıf I ayrıca Ia (SIRT1) ve Ib (SIRT2 ve 3) alt sınıflara ayrılır.

2- SIRT4, sınıf II'ye aittir, çoğunlukla ADP-riboziltransferaz aktivitesi gösterir ve bazı bakterilerde de bulunur.
3- SIRT5, arkea ve protozoalar gibi ayrı sınıfta (sınıf III) yerleştirilir.
4- Sınıf IV SIRT6 ve SIRT7'yi içerir ve sırasıyla iki IVa ve IVb alt sınıflarına ayrılmaktadır (Şekil 2.10) (184, 188)



Şekil 2.10. Memeli sirtuinlerinin sınıflandırılması (188).

Memeli sirtuinler Şekil 2.11'da gösterildiği gibi hücrelerin farklı alt lokalizasyonlarında bulunmaktadır. SIRT1, SIRT6 ve SIRT7, çoğunlukla çekirdekte yer alır ancak çekirdek dışında bulundukları da kanıtlanmıştır. Çekirdekte SIRT1'in büyük bir ölçüde ökromatin ve SIRT6 ise heterokromatin ile bağlantılıdır, SIRT7 çekirdekçikte bulunmaktadır. SIRT2 ağrılıkla sitoplazmada bulunur, ancak belirli koşullar altında çekirdeğe yer değiştirdiği bildirilmiştir. Genel olarak SIRT3, SIRT4 ve SIRT5 mitokondriyal konumlu sirtuinlerdir (189).



Şekil 2.11. Sirtuinlerin hücrede lokalizasyonları (190).

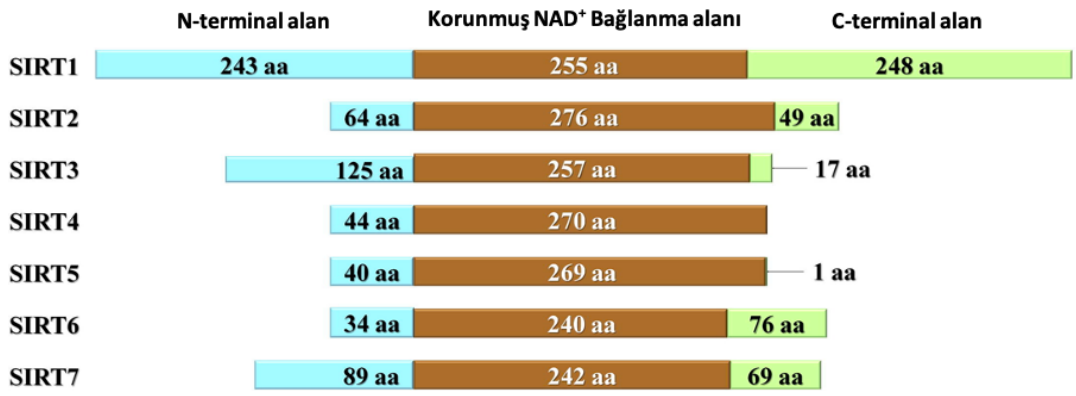
2.5.6. MEMELİ SİRTUİNLERİN SUBSTRATLARI, YAPISI, FONKSİYONU VE ENZİMATİK MEKANİZMASI

Sirtuin protein ailesinin keşfi, hücre çoğalmasının kontrolü, stres direnci ve yaşlanma gibi farklı fizyolojik süreçlerin anlayışı ve aynı zamanda metabolizma, kanser, nörodejenerasyon, inflamasyon, oksidatif stres vb. ile ilgili çeşitli hastalıklar ve farklı patolojik durumların incelenmesi için fırsat sunmuştur (191).

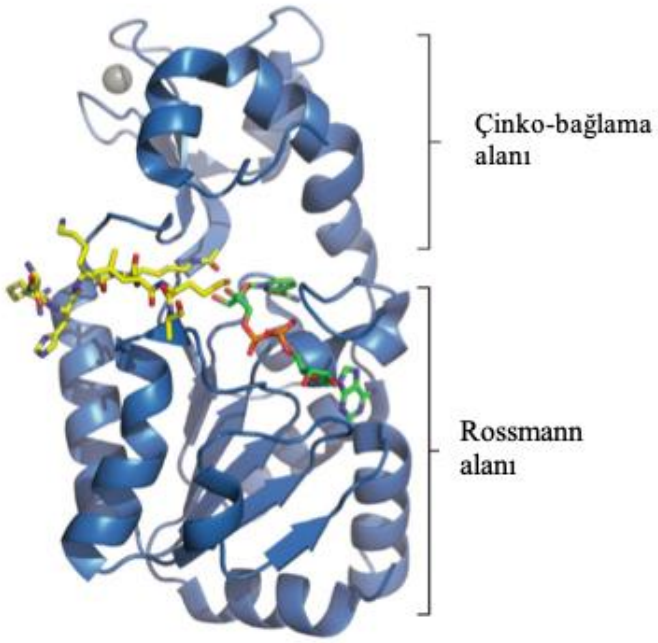
Sirtuinler sınıf III HDAC'ler olduklarından, transkripsiyonel baskılama fonksiyonuna sahip oldukları anlaşılmaktadır. Asetillenmiş H1, H3 ve H4 histonlar, sirtuinlerin fizyolojik substratları ve histon H4'te olan lizin 16 kalıntısı, sirtuin aracılı transkripsiyonel baskılamanın en kritik hedefi olduğu anlaşılıyor (192, 193). Daha sonra, artan sayıda histon olmayan proteinlerin de sirtuinler tarafından deasetile oldukları bu enzimlerin önemli biyolojik rolleri olduğunu ortaya koymuştur. Bu enzimlerin histon olmayan substratları, nükleer faktör-κB (NF-κB), FOXO transkripsiyon faktörleri, peroksizom proliferatör ile aktive edilen reseptör γ (PPARy) koaktivatör 1α (PGC-1α) gibi birkaç transkripsiyonel düzenleyicileri içerir. Ayrıca asetil koenzim A (CoA) sentetaz 2 (AceCS2), ve α-tubulin gibi yapısal proteinler de sirtuinlerin histon olmayan hedeflerine dahildir (194).

Sirtuinler yüksek oranda korunmuş 250 amino asit katalitik çekirdek alanına ve NAD^+ bağlanma bölgesine sahiptir (Şekil 2.12). Ancak, N- ve C- terminal alanları farklı sirtuin'ler

arasında değişiklik gösterir. Bu değişik yapılar sirtuinlerin hücresel lokalizasyonu ve hedef özgüllüğü ile sıkı bir şekilde bağlantılıdır (191, 194). Ayrıca N- ve C- terminal bölgeleri bu enzimlerin fonksiyonlarında translasyon sonrası modifikasyonlar için spesifik hedeflerdir (191).



Şekil 2.12. Yedi insan SIRT izoformunun şematik gösterimi (195).

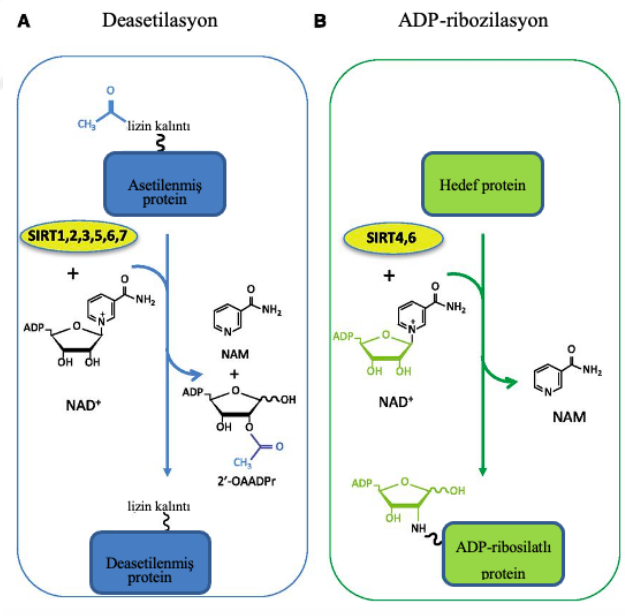


Şekil 2.13. Sirtuinlerin'in genel yapısı (196).

Diğer HDAC sınıflarından farklı bir şekilde sirtuinler, NAD^+ kofaktorünü kullanarak asetillenmiş proteinlerden asetil gruplarını uzaklaştırır. Sirtuinlerin çekirdek bölgesi Rossmann-kat alanı ve daha küçük Zn^{2+}-bağlama modülünü içerir (Şekil 2.13) (197, 198). NAD^+ ve asillenmiş substrat polipeptidi, enzimin Rossmann-katının alt alanlarının arasındaki yarıklarına bağlanırlar (191). İki substratın bağlanması, enzim içinde

konformasyonel değişikliklere neden olur. Ardından sirtuinler, NAM ve iki riboz NAD^+ grubunu arasındaki glikozidik bağın bölünmesini katalize ederek NAM ve bir ADP-riboz enzimin parçasının oluşumuna yol açar (199). Asetillenmiş substrattan gelen asetil grubu, NAD^+'nın ADP-riboz bileşenine aktarılır ve 2'-0-asetil-ADP-riboz (2-OAADPr) üretilir. Sonuçta, NAM ve 2'-0-asetil-ADP-riboz ve deasetillenmiş lizin oluşur (200). Daha sonra NAM molekülü NAD^+ molekülün tekrar üretim yolağına girer. Sirtuinlerin çoğu, (SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT5, SIRT6 ve SIRT7) N-ε-lisin kalıntılarından asetil grubunun çıkarılması ve O-asetil-ADP-riboz ve nikotinamid oluşumuyla deasetilaz aktivitelerine sahiptir. Bununla birlikte, SIRT4 ve 6'nın ayrıca mono-adenozin difosfat (ADP)-ribozil transferaz aktivitesi gösterdiği kanıtlanmıştır (201, 202).

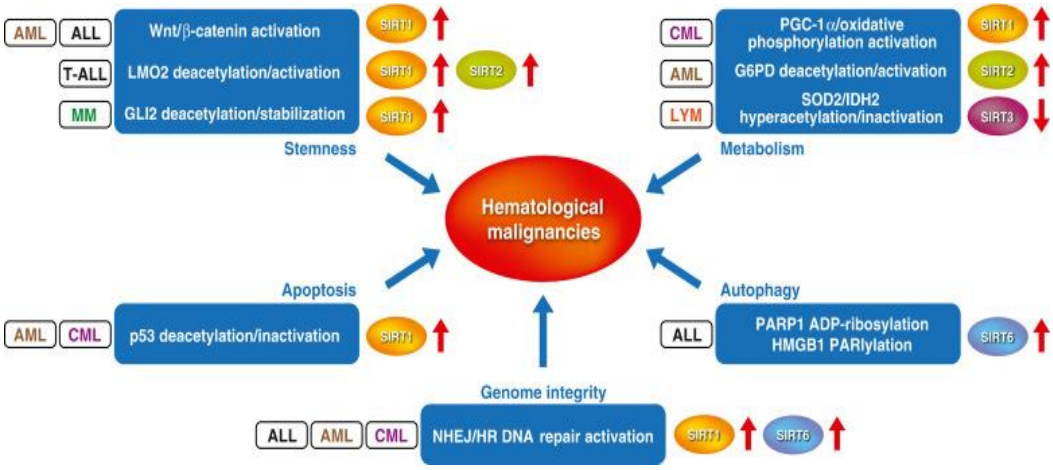
SIRT4 ve SIRT6 enzimlerinde önemli deasetilaz aktivitesi bulunmamaktadır ancak bunun yerine güçlü bir NAD^+-bağımlı ADP-ribozil transferaz aktivitesine sahiptir (Şekil 2.14). Mono-ADP-ribozilasyon ile protein substratlarının translasyon sonrası modifikasyonu, alıcı protein üzerindeki spesifik bir amino asit (arginin veya sistein gibi) ve NAD^+'nın ADP-riboz kalıntısı arasında bir N- veya S-glikosidik bağlantının oluşturulmasını içerir (194).



Şekil 2.14. Sirtuinler tarafından katalizlenen iki reaksiyon; A) Deasetilasyon ve B) ADP-ribozilasyon (203).

2.6. HEMATOLOJİK MALİGNİTELERDE SİRTUİNLERİN ÇOK YÖNLÜ İŞLEVLERİ

Hematolojik maligniteler, klinik olarak lenfoma, multipl miyelom (MM) ve lösemi olarak bulunan heterojen bir hastalık grubudur. Lenfoma, tüm kanser vakalarının %4'ünü temsil eden en yaygın hematolojik malignitedir. Hematolojik neoplazilerde sirtuin ifadesi farklı derecelerde değişir. Sirtuinlerin değişik ifadeleri bu malignitelerin patolojilerinin çeşitli moleküler yolakları ile bağlantılıdır. Bununla birlikte, löseminin moleküler patogenezine ilişkin bilgiler, sirtuinler için mitokondriyal düzenleme, enerji metabolizması, DNA onarımı ve apoptozda kritik roller oluşturmuş olsa da bunların lenfoma ve MM'deki rolleri büyük ölçüde belirlenmemiştir (Şekil 2.15) (204). Memeli sirtuinler için kanser biyolojisi ile ilgili çeşitli roller tanımlanmıştır; bunlar arasında genomik stabilitenin korunması, metabolik yeniden programlamanın düzenlenmesi ve tümör mikroçevresinde modifikasyonu yer almaktadır (205, 206). Bu işlev çeşitliliği göz önüne alındığında, sirtuinlerin bazı durumlarda tümör baskılayıcı ve diğerlerinde tümör teşvik edici fonksiyonları beklentiden uzak değil. Sirtuinler çeşitli sinyal yolaklarının düzenlenmesi ile kanserin başlangıç ve ilerlemesinde ikili göreve sahiptir. Bulgulara göre, sirtuinler tümörigenezde farklı hücresel ve moleküler şartlarda tümör baskılayıcı veya oluşturucu rolü oynamaktadır (207). Bir yandan, bazı



Şekil 2.15. Hematolojik malignitelerde sirtuin ilişkin moleküler yolaklar (204).

sirtuinler DNA'yı hasardan ve oksidatif stresten korumaya, genomik stabiliteyi sağlamaya, replikatif yaşam süresini sınırlamaya ve organizmaları kansere karşı korumaya yardımcı olurlar. Öte yandan bazı araştırmalara göre sirtuinler yaşlanmayı inhibe etmesi ve kontrolsüz hücre bölünmesine izin verdiği için stres koşulları altında hücre sağkalımına destekleyici

olup ve doğrudan tümörigenezde dahil olurlar (208). Memeli sirtuinler; insan metabolizması, yaşlanma, kanser ve hücre yaşamı da dahil olmak üzere birçok hücresel işlevi etkiler (207). Kanser yaşa bağlı bir hastalık olduğundan dolayı sirtuinler tümörigenezin bazı aşamalarında etkilidir (209). Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) istatistiklerine göre, tüm kanser vakalarının %54'ü 65 yaş ve üzere kişilerde görülmektedir (210). Bugüne kadar toplanan kanıtlar, sirtuin sinyal yolaklarındaki bozulmuş epigenetik aktivasyonu, tümör karsinojenezine katkıda bulunduğunu göstermiştir. Bu nedenle gelecekte sirtuinlerin kanserlerin tedavisinde potansiyel terapötik hedefler ve prognozun tahmininde biyobelirteç geliştirmesinde olduğunu ortaya koymuştur (207, 211).

Hematopoietik kök hücreler (HKH'ler), kendi kendini yenileme kabiliyeti ve bir organizmanın ömür boyunca tüm kan hücresi soylarına farklılaşma potansiyelleri ile karakterize edilen hücrelerdir. Yaşlı HKH'ler; immünofenotipik HKH'lerin sıklığında artış, rejeneratif kapasitedeki azalma (212, 213), hatalı miyeloid farklılaşma (212), transplantasyon sırasında hatalı engraftman ve yerleşim (214), hatalı trombosit farklılaşması (215) ve hatalı megakaryositik/eritroid gen ekspresyon paternleri (216) gibi çeşitli karakteristik değişiklikler gösterir.

Son zamanlarda, birkaç grup, sağlıklı yaşlı bireylerde klonal hematopoez ile tekrarlayan somatik mutasyonları tanımlamak için yeni nesil genom dizileme tekniğini kullanmıştır (217-219). Bu fenomen, yaşa bağlı klonal hematopoez (age-related clonal hematopoiesis-ARCH) veya potansiyeli belirlenmemiş klonal hematopoez (clonal hematopoiesis of indeterminate potential-CHIP) olarak adlandırılır (220, 221). Periferik kan kullanılarak ARCH/CHIP, bu mutasyonların genç bireylerde oldukça nadir olduğunu (<%1 yaşındaki kişilerde <40) ama yaşla birlikte katlanarak artışını göstermiştir. Bu mutasyonlar 70-79 yaş arası bireylerin %9,5'inde, 80-89 yaş arası bireylerin %11,7'sinde ve 90 yaş üstü bireylerin %18,4'ünde görülmektedir (218). ARCH/CHIP, esas olarak, hematolojik kanserlerde rol oynayan ve sonraki hematolojik kanserler için güçlü bir risk faktörü olan üç epigenetik düzenleyici gendeki (*DNMT3A*, *TET2* ve *ASXL1*) mutasyonlarla ilişkilidir (219). Bu çeşitlilikteki mutant HKH'ler, bir hastalık fenotipine ve nihayetinde morbidite ve mortaliteye yol açabilecek ek mutasyonlar kazanır. Seri mutasyonların kazanmasıyla ARCH/CHIP, miyelodisplastik sendrom (MDS) ve sonunda akut miyeloid lösemiye (AML),

araya giren bir MDS aşaması olmaksızın doğrudan AML'ye veya miyeloproliferatif neoplazmalar (MPN) veya lenfoid neoplazmalar gibi diğer koşullara ilerleyebilir (220, 222).

ARCH/CHIP mutasyonların ardından *sirtuin* genlerindeki ifade değişiklikler de HKH yaşlanması ve hematolojik malignitelerin gelişmesiyle ilişkisi olduğu da düşünülmektedir. Sirtuinlerin çoğu HKH'lerin yaşlanmaları ile ilişkili sinyal yolaklarına katılmaktadır. Bunların içinde DNA onarım yolağı, TP53, NF-κB, FOXO ve mTOR yolakları yer almaktadır. Genel olarak sirtuinler normal hücrelerde DNA hasar onarımı ile genom kararsızlığı ve hücre sağkalımında katılmaktadır (209). Ancak hata yapmaya eğilimli olan homolog olmayan uç birleştirme (non-homologous end joining-NHEJ) onarımı HKH'lerde hücrelerde majör yolaktır. Yaşlanan hücreler, kanser hücrelerine benzer bir şekilde DNA hasar durumunda hatalı onarımlara yatkındır. Yaşlanan HKH'lerde sirtuinler tarafından uyarılan kontrolsüz NHEJ onarımı, yaşlanan HKH'lerin genomunda hücrenin onkogenik transformasyonundan önce mutasyonlar oluşturur. Bu mutasyonlar malign transformasyona destek sağlar veya hızlandırabilir (209).

2.6.1. SIRT1

İnsan *SIRT1* geni, kromozom (Chr) 10q21'de bulunmaktadır (11). Bu genin kodladığı enzim enerji homeostazı, metabolizma, yaşlanma ve kanser gibi fizyolojik ve patolojik süreçlerin anahtar düzenleyicisidir (195, 223). SIRT1 proteini, histon (H) proteinlerindeki farklı pozisyonlarındaki lizinlerin deasetilenmesi ile kromatin yeniden düzenlemesinde görev alır. H1 Lys26 ve 9, H3 Lys9 ve 14 ve H4 Lys16, SIRT1'in en önemli histon hedeflerindendir (182, 193). SIRT1 proteini, esas olarak çekirdekte lokalize olmasına rağmen, bazı çalışmalar bu proteinin kanser hücrelerinde sitoplazmada geçtiğini göstermiştir (209). SIRT1 enzimi TP53, c-MYC ve FOXO dahil olmak üzere çeşitli histon olmayan substratları da deasetile edebilir. Böylece DNA onarımı, metabolizma, hücre döngüsü ve sağkalım gibi çeşitli biyolojik süreçleri düzenleyebilir (195).

Birkaç çalışmada, SIRT1'in hem tümör baskılayıcı hem de teşvik edici farklı etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Bu çelişkili rolün, hücre tipi ve SIRT1'in lokalizasyonuna bağlı olduğu belirtilmiştir (209). SIRT1'in artmış ifadesi, bozulmuş histon deasetilasyon ve metilasyon, promotör bölgesindeki CpG adalarının metilasyon, TP53, FOXO, Rb, E2F1, p73, MLH1 ve Ku-70 gibi histon olmayan tümör baskılayıcılarının deasetilasyon ve

inaktivasyonu ile sonuçlanır. Bu biyolojik değişikliklerin yaşlanmayı, hücre farklılaşmasını, stres kaynaklı apoptozun engellediğini ve hücre büyümesini, etkilediğini bilinmektedir. Ayrıca anjiyogenezi, kan akışını ve kemoterapiye direnci desteklediği de kanıtlanmıştır. Bu yüzden *SIRT1* geninin, tümörün başlangıcı ve gelişmesinde etkili olduğu, bununla birlikte ilaç direncinde de kritik rolü oynadığı düşünülmektedir (224).

Güncel çalışmalar, SIRT1 için yeni substratlar ve hedefler keşfetmektedir. Bu gelişmeler SIRT1'in çeşitli hücresel fonksiyonlarda rol oynayan farklı transkripsiyon faktörleri ve proteinleri içermektedir. Örneğin, TP53 proteini, histon asetiltransferazlar için tanımlanan ilk histon olmayan substrattır. TP53'ün asetilasyonu, DNA bağlanma aktivitesinin artmasıyla sonuçlanır. Bu da hedef gen ifadesinin aktive olmasını sağlar (225). SIRT1 aracılı bu transkripsiyon sonrası modifikasyon, TP53'ün fonksiyonunu modüle ederek TP53'e bağımlı transkripsiyonun baskılanmasıyla, bu proteinin biyolojik etkisini zayıflatabilir (226, 227). SIRT1 için bir diğer önemli substrat grubu, FOXO ailesinin proteinleridir. Brunet ve arkadaşları SIRT1'in oksidatif strese yanıtında, FOXO3'ün deasetile edilebildiğini göstermiştir. Bunun sonucunda FOXO'ya bağlı olarak apoptozun engellendiği görülmüştür., hücre döngüsünün durdurulması ve hücresel stres direncinin engellediğini bulmuşlar. Ek olarak, SIRT1'in FoxO3'ü deasetilize ettiğini, FOXO'ya bağlı tepkileri apoptozdan uzaklaştırdığını ve hücre döngüsü durmasına ve hücresel stres direncine doğru yönlendirdiğini buldular. (228). Yapılan son araştırmalar SIRT1 için yeni işlevler tanımlamış olsa da DNA hasarı ve onarımı üzerindeki rolü ve de kanser gelişimine olan katkısını tanımlayan temel mekanizmalar yeterince aydınlatılamamıştır (229). SIRT1 gen ifadesi ve deasetilaz aktivitesinin modülasyonuna ilişkin çalışmalar, SIRT1'in tümör başlangıcındaki rolü ve SIRT1 inhibitörlerinin kanser tedavisindeki rolünü ortaya koyacaktır (224).

SIRT1'in rolü kanser hücrelerinde çelişkili ve karmaşıktır. SIRT1, tümörigenezde ikili rol oynar. SIRT1'in yüksek ifadesi, bazı kanser hücre hatlarında gözlenmiştir. Genellikle SIRT1 ifadesinin artması kötü prognoz ve genel sağkalım ile ilişkilidir. SIRT1, P53 ile etkileşime girip ve Lys382 kalıntısını deasetilasyonunu tetikler. Böylece p53'bağlı yolakları inhibe ederek kontrolsüz hücre döngüsüne ve apoptotik yolağın inaktivasyonuna neden olur. Artan sayıda çalışma, SIRT1'in çeşitli kanserlerde metastaz ve invazif işlevi olduğunu bildirmektedir. Tümör baskılayıcı süreçlerde veya DNA hasarı onarımında yer alan birçok

proteinin deasetilasyonu ve spesifik yolakların etkisizleştirilmesi, SIRT1'in bir tümör teşvik edici rolünü destekler (230). Non-hematolojik kanserlerde SIRT1, prostat kanseri(231), meme kanseri (232), akciğer kanseri (233), kolon kanseri (234) melanom (235) ve over ve mide kanseri (236) dahil olmak üzere birçok malign tümörün başlatılmasında, desteklenmesinde ve ilerlemesinde rol oynar. Mide tümörlerinde, SIRT1'in yüksek ifade seviyeleri, malign durum ve kötü sağkalım ile ilişkilendirilmiştir (230).

SIRT1 ayrıca c-MYC gibi diğer onkogenlerle doğrudan etkileşime girer. Bunun sonucunda bu onkogenlerin baskılanmasıyla bir tümör baskılayıcı olarak görevi bulunmuştur (207). Glioma, mesane, prostat ve over kanseri dahil olmak üzere çeşitli insan kanserleri, düşük SIRT1 seviyelerini gösterir (237).

Hematopoietik malignitelerde SIRT1'in genel olarak yüksek seviyede ifadesi bulunmuştur. B hücre kökenli olan malignitelerde foliküler lenfoma (FL), diffüz büyük B hücreli lenfoma (DBBHL), kronik lenfositik lösemi (KLL), B lenfoblastik lösemi (B-ALL) ve B hücre soyundan köken almayan kronik miyeloid lösemi (KML), akut miyeloid lösemi (AML), kutanöz T hücreli lenfomada (KTHL) ve erişkin T hücreli lösemi-lenfoma (ETLL) maligniteler bulunmaktadır. B hücreli olmayan hastalıklardan miyelodisplastik sendrom unda (MDS) SIRT1 proteinin düşük ifadesi gözlenmiştir. SIRT1; KML, AML, ALL gibi hematopoietik malignitelerin sağkalımlarında veya kemoterapi ilaçlarına direnç geliştirilmesini etkileri gösterilmiştir (195, 238). Bu çalışmalar SIRT1'in tedavi hedefi olarak belirlenmesinin faydalı olabileceğini göstermektedir (238, 239).

2.6.2. SIRT2

İnsan *SIRT2* geni Chr 19q13.3'te yer almaktadır (11). *SIRT2* geni sürekli ifade edilen bir gendir. Ağırlıklı olarak sitoplazmada lokalize olan tek sirtuin'dir (240-242). SIRT2, sitoplazmada mikrotübül ağı ile birlikte yer alır. Bu proteinin, ilk tanımlanan substratı tubulin'in Lys40'dır (243). α-tübülininin Lys40 aminoasiti mikrotübülün iç kısmında lokalizedir. Lys40'ın asetillenmesiyle mikrotübüllerin stabilizasyonunda görev alır (244). Mikrotübüller, α ve β-tubulin birimlerinin polimerizasyonu ile oluşur. Hücre şekli, hareketliliği, hücre içi taşınma ve hücre bölünmesinde önemli rol oynar (245). Hem asetilasyon hem de deasetilasyon olmak üzere mikrotübüllerde birçok translasyon sonrası modifikasyonun olduğu bildirilmiştir (245, 246).

SIRT2, mitoz ve hücre döngüsü kontrolünde önemli rol oynar. G2/M geçiş aşamasında sitoplazmanın dışında çekirdeğe de yerleşebilir. H4 Lys16 ve H3 Lys56, SIRT2 enziminin çekirdekteki substratlarıdır. Bu histonlar, DNA hasar yanıtına ve kanser yolaklarına katılırlar. Mei ve arkadaşlarına göre SIRT2, S fazında hücre döngüsünün durdurmasıyla hücre bölünme süresini uzatır ve hücre çoğalmasını arttırır (247). SIRT2'nin bu enzimatik olarak aktif formlarının aşırı ifadesi, hücre döngüsü ilerlemesinde gecikmeye neden olur. NF-κB alt birimi p65, FOXO1 ve FOXO3 transkripsiyon faktörleri SIRT2'nin histon olmayan hedeflerindendir. Bu transkripsiyon faktörlerinin modülasyonu, SIRT2 proteininin sinyal iletimi, gen ifadesi ve otofaji gibi hücresel süreçlerinde etkili olduğunu göstermektedir. PR-Set7, fosfoenolpiruvat karboksikinaz 1 ve RIP1 (reseptör etkileşimli protein 1), SIRT2 enziminin diğer deasetilasyon hedeflerindendir. SIRT2, hücre döngüsü ilerlemesi, hücre ölümü ve stres yanıtı dahil olmak üzere çeşitli hücre fonksiyonlarını düzenler (207).

Birçok çalışmada SIRT2'nin düzensiz ifadesi farklı kanser türlerinde gösterilmiştir. SIRT2 hem substrata hem de bulunduğu hücre veya dokunun içeriğine bağlı olarak hücrelerin malignant transformasyonunda farklı görevler alır. Değişik doku ve organlarda ifade edildiğinden ve değişken fizyolojik işlevlere sahip olduğundan kanserlerdeki rolü karmaşıktır. SIRT2 tümör oluşumunda onkopatolojik durumlara göre hem onkogen hem de tümör baskılayıcı olarak tanımlanmıştır. SIRT2 enzimin tümör baskılayıcı etkisi, hücre çoğalması, hücre bütünlüğü ve DNA hasarı gibi önemli biyolojik yolaklarda yer alan birçok proteinin deasetilasyonunun sonucudur (248). Glioma (249), boyun skuamöz hücreli karsinom (250), küçük hücreli olmayan akciğer karsinoma (non-small cell lung cancer-NSCLC) (251), meme kanseri (252) prostat kanseri (253) ve HCC (254), dahil olmak üzere birçok kanser hücre hattında *SIRT2* geninin aşağı regüle edildiği veya silindiği bulunmuştur. Diğer çalışmalarda seröz over karsinomunda SIRT2'nin azalmış ifadesi kanserin ilerlemesi hücre taşınması, inazayon, lenf nod metastazı ve peritona yayılmasıyla ilişkisin bulunmuştur (255). Meme kanserin ilerlemesinde SIRT2 işlevi tümörün derecesine ve sınıflamasına bağlıdır (252). Lösemi, nöroblastoma, HCC ve pankreas kanserinde SIRT2 genin yukarı regüle edilir. Bu da vasküler invazyon, hücre proliferasyonu ve tümör büyümesinden sorumludur (230).

Birkaç çalışmada ALL, KLL ve AML gibi hematolojik malignitelerde bu genin onkogen olarak davrandığını bulunmuş olursa da multipl miyelom malignitesinde tümör baskılayıcı olduğu kanıtlanmıştır.

2.6.3. SIRT3

İnsan *SIRT3* geni, Chr 11p15.5'te bulunur (11) ve mitokondride lokalize olan sirtuindir (241). Mitokondriyal matris içinde bulunan bu deasetilaz protein, asetil-koenzim A sentetaz 2, izositrat dehidrojenaz 2 (IDH2), glutamat dehidrojenaz (GDH) ve manganez süperoksit dismutaz (MnSOD) dahil olmak üzere önemli mitokondriyal proteinlerin deasetilasyonu ile hücresel enerji metabolizmasında ve redoks düzenlemesinde önemli rollere sahiptir (207).

Lokalizasyonuna uyarak, insan asetil-CoA sentetaz-2, SIRT3'ün ilk substratı olduğu gösterilmiştir (256). Daha sonra, SIRT3'ün mitokondriyal lizin deasetilasyonunu düzenlediği bulunmuştur (257). Bununla birlikte Scher ve arkadaşları, insanlarda SIRT3'ün sadece mitokondride değil, aynı zamanda çekirdekte de H4 Lys16'yı deasetile edebileceğini göstermişlerdir. Böylece normal koşullar altında çekirdekte de bulunabileceği ortaya konulmuştur (258). SIRT3'ün nükleer lokalizasyonunu doğrulamak için, SIRT3 ile birlikte SIRT5'in ifadesi SIRT3'ün çekirdeğe doğru yer değiştirmesin gösterilmiştir. Bu durum mitokondrinin SIRT3 için tek lokalizasyon noktası olduğu iddiası için tartışmalıdır (259).

Reaktif oksijen türlerinde (reactive oxygen species-ROS) artış veya besin yoksunluğu gibi hücresel stres şartlarında *SIRT3* geninin transkripsiyonu indüklenir (260, 261) ve enzim, mitokondrinin iç zarına doğru lokalize olur (241, 258). Burada, oksitlenmiş glutatyon (GSSG) ve ROS dahil olmak üzere hücresel oksidanların azaltılmasında rol oynayan IDH2 ve süperoksit dismutaz 2 (SOD2) enzimlerini deasetile ederek bu proteinleri aktive eder (261-264). Daha da önemlisi, SOD2 (katalaz; CAT gibi diğer antioksidan enzimlerle birlikte), hücresel homeostaz ve stres yanıtının bir çekirdek transkripsiyonel düzenleyicisi olan FOXO3a aracılığıyla SIRT3 tarafından da aktive edilir. SIRT1 gibi, SIRT3'ün de FOXO ailesi ile etkileşime girdiği ve yaşam süresinin genetik düzenlenmesinde rol oynadığı bulunmuştur (265). SIRT3, FOXO3a ile etkileşime girer ve deasetilasyon sonucunda FOXO3a'ya bağlı gen ifadesini indükler (266).

Birkaç çalışma, SIRT3'ün hem normal hem de stresli koşullar altında metabolizma ile ilgili hücresel süreçleri düzenlediğini göstermiştir. Kim ve arkadaşları ilk kez SIRT3'ün mitokondriyal bütünlüğü ve oksidatif metabolizmayı koruduğunu ve tümörigeneze karşı bir bariyer oluşturduğunu ortaya koymuşlardır. Bu araştırmacıların yaptıkları deneylere göre SIRT3'ün kaybı karsinojenezi destekleyen hücresel bir ortama yol açar (267). Bu bulguların doğrultusunda diğer çalışmalar, hipoksi ile indüklenebilir faktörün (HIF) SIRT3 aracılı düzenlenmesinin kanser hücresi metabolizmasının yeniden programlanmasını indüklediğini göstermiştir. Bu veri, özellikle kanser hücrelerinde ROS ile hücresel metabolizma arasındaki etkileşimi vurgulamaktadır (268, 269).

SIRT3, stres yanıtlarında yüksek derecede ifade olarak HKH'lerin yaşam süresinin artmasında ve oksidatif stresin azaltılmasında görev alır. SIRT3 HKH'lerin sağkalımları ve doku homeostazı için gereklidir. Ancak bu genin ifadesi yaşlanmayla beraber baskılanır. Yapılan bir çalışmaya göre SIRT3'ün upregülasyonu yaşlı HKH'lerin rejenerasyon kapasitesini arttırabilir (270). Bazı kanser türlerinde SIRT3 hücre canlılığı ve çoğalmasını sağlamak için ROS seviyesini belirli bir düzeyin altında tutar. Bu fonksiyonu ile SIRT3'ün hematolojik neoplazilerde tümör teşvik edici olduğu gösterilmiştir. Bunun tersine başka araştırmalarda ise stres koşullarında SIRT3 hücre ölümünü tetiklediği için tümör baskılayıcı olduğu da ileri sürülmüştür (271).

Birkaç çalışma, SIRT3'ün kanser gelişimi ve ilerlemesinde çok önemli bir rolünü tanımlamaktadır. Kolon, mide, böbrek, oral skuamöz ve özofagus kanseri ve melanom dahil olmak üzere farklı kanser türlerinde bu kanserlerde upregüler olur. SIRT3'ün yüksek seviyedeki ifadesi bu kanserlerde birçok önemli biyolojik süreçteki değişikliği belirler. Bu süreçler yüksek tümör derecesi, pozitif lenf nodu durumu ve kötü prognoz ile ilişkilidir. Mesane karsinomunda, SIRT3, TP53'ün mitokondrideki anti-proliferatif aktivitesini ortadan kaldırarak proliferasyonu destekler (272). SIRT3'ün ayrıca, SOD2, IDH2 ve FOXO3a gibi mitokondriyal proteinlerin deasetilasyon aktivitesi ve mitokondriyal ROS üretimi ve kanser hücresi çoğalmasının inhibisyonu nedeniyle tümörigenezde ikili bir işlevi olduğu bildirilmiştir (271). İnsan meme ve mide kanserinde SIRT3'ün aşağı regülasyonu, HIF-1α'nın yukarı regülasyonu ve hücre proliferasyonunun durması ile ilişkilendirilmiştir (273). Mantle hücreli lenfoma ve KLL gibi bazı B hücreli malignitelerde, *SIRT3* geninin düşük ifadesi gözlenmiştir ve bu kötü sağkalımla ilişkili bulunmuştur (274). Ayrıca, Burkitt

lenfomasında ilaca bağlı apoptoz, mitokondriyal SIRT3-GSK3β-Bax yolağıyla indüklenmesi gösterilmiştir (275). DBBHL'larda SIRT3 ifadesi artmış olup ve kötü prognozla ilişkilendirilmiştir (276). SIRT3'ün farmakolojik inhibisyonunun, DBBHL hücrelerinde otofajiyi indükleyerek kanser hücrelerinin büyümesini durdurduğu gösterilmiştir (277).

2.6.4. SIRT4

İnsan *SIRT4* geni Chr 12q 24.31'da yer alır (11). SIRT4, esas olarak mitokondride bulunmaktadır ve çeşitli katalitik aktivitelere sahiptir (241). SIRT4 için güçlü enzimatik aktiviteler tam olarak anlaşılmamıştır. Bununla birlikte, SIRT4, insülin sekresyonu, glutamin metabolizması ve yağ asidi metabolizması gibi çok sayıda hücresel metabolik süreçlerle ilişkilidir (278). SIRT4'te belirgin histon deasetilaz aktivitesi olmamasına rağmen, biyolojik süreçlerde yer alan başlıca enzimatik aktiviteleri; ADP-riboziltransferaz, NAD^+ bağımlı deasetilaz, lipoamidaz ve uzun zincirli deasilazdır (243, 278, 279). Son yıllarda, SIRT4'ün lipoil ve biyotinillizin modifikasyonlarının çıkarılmasını, deasetilasyon aktivitesine göre daha verimli bir şekilde katalize ettiği bulunmuştur (280, 281). SIRT4 ayrıca 3,3-dimetilsüksinil (DMS), 3-hidroksi-3-metilpentadienil (HMG), 3-metilglutaril (MG) ve 3-metilglutamil (MGc) lizin modifikasyonlarının, metilkrotonil-CoA karboksilaz kompleksinden (MCCC) çıkarmak için lizin-deasilaz aktivitesine sahiptir (282, 283). Bu enzimatik aktiviteler, SIRT4'ün GDH, malonil-CoA dekarboksilaz ve piruvat dehidrojenaz kompleksi (PDHC) hedeflerini doğrudan düzenlemesini sağlar. Bu bilgiler SIRT4'ün, malign tümörlerde glutamin, lipid ve glukoz metabolizmasının düzenlenmesinde anlamlı bir rol oynadığını göstermektedir (280, 284). SIRT4, GDH ifadesini inhibe ederek glutamin metabolizmasının düzenlenmesinde ve PDHC ifadesini inhibe ederek glukoz metabolizmasına katılır. Ayrıca DNA hasar yanıtında hücre döngüsü ilerlemesi ve genomik bütünlük sağlamasının düzenlemesi için de çeşitli genetik toksik maddeler tarafından indüklenir. DNA hasarı, genomik bütünlüğü korumak için bir sinyal iletim yanıtını tetikler (281). Önceki çalışmalar, SIRT4'ün GDH inhibe ettiğini göstermiştir. Glutaminin, çoğalan hücrelerde trikarboksilik asit döngüsü (TCA) anaplerozu için önemli bir kaynak olduğu için iyi bilinmektedir (285). Jeong ve arkadaşları, DNA hasarı olan hücrelerde SIRT4'ün glutamin alımını ve anaplerotik reaksiyonları inhibe ettiği ve böylece de hücre döngüsünün durduğunu göstermişlerdir (286). SIRT4'ün kaybı, glutamine bağlı hücre çoğalmasının

artışına ve stres kaynaklı genomik kararsızlığa yol açar. Bu da kanserojen bir fenotip ile ilişkilidir (281). İkinci hipotez, Rapamisin protein kompleks1'in memeli hedefindeki (mTORC1) serin/treonin kinazın atipik aktivasyonu nedeniyle, SIRT4'ün ifadesinin inhibasyonuna yol açtığı görüşüdür. GDH aktivitesinin kontrol edilmesi glutamin alımının uyarımına dayanmaktadır. mTORC1 yolağı, siklik adenosin monofosfat yanıt elemanı bağlanması (CREB)-2'nin proteazom aracılı bozulmasını destekleyerek SIRT4'ü negatif olarak kontrol etmektedir (287).

Özetle, insanda SIRT4 enzimi, yağ asidi ve dallı zincirli amino asit metabolizması, TCA döngüsüne karbon girişi, elektron taşınması ve ROS üretimi, insülin sekresyonu ve duyarlılığı, apoptoz, ATP homeostazı ve redoks durumu dahil olmak üzere çeşitli mitokondriyal metabolik süreçlerin düzenleyicisidir. Ayrıca SIRT4, diğer sirtuinler gibi, spesifik tümör tipine, evresine ve genel biyolojik durumuna bağlı tümör baskılayıcı enzimi veya bir onkoprotein olarak davranmaktadır (288-290).

SIRT4 hücre döngüsünü durdurarak, invazyon, proliferasyon ve hücre taşınmasını inhibe ederek tümör baskılayıcı etkisin göstermektedir. Kanser genom atlası (The Cancer Genome Atlas-TCGA) veri tabanından elde edilen verilerin analizleri, SIRT4 ifadesini 30 kanser tipinde aşağı regüle edildiğini göstermiştir (281). Mesane, meme, kolon, mide, over, prostat ve tiroid kanseri gibi birçok malignitede SIRT4'ün düşük ifadesin ve bu düşük ifadenin kötü prognoz ile ilişkisi kanıtlanmıştır (290). SIRT4 kaybı hem glutamine bağlı proliferasyonun artmasına hem de stres kaynaklı genomik kararsızlığa yol açarak tümörigenik fenotip ile ilişkilidir. Kolorektal kanserde, SIRT4'ün artmış ifadesi, E-cadherin yoluyla kanser hücrelerin proliferasyonunu bloke ederek maligniteyi baskılar (291). Meme kanserinde SIRT4 kaybı, kısa sürede metastazın gelişimi ile ilişkilidir (292). Özafagus kanseri ve HepG2 hücrelerinde (hepatokarsinom) SIRT4 DNA hasar durumunda kanser hücrelerin hayatta kalmasında tümör teşvik edici olarak davrandığı gözlenmiştir (288). Burkitt lenfomada SIRT4, mitokondriyal glutamin metabolizmasını inhibe ederek MYC kaynaklı lenfomagenezi bloke edebilir (293). Bradbury ve ark. AML örneklerinde SIRT4 ifade azalmasını ortaya koymuşlardır (294).

2.6.5. SIRT5

İnsan *SIRT5* geni, malignitelerle ilişkili olan Chr 6p23'te lokalizedir (295). Bu lokus oldukça kararsızdır. Bu lokusta çeşitli kanser türlerinde sıklıkla genomik değişiklikler görülür (295, 296). SIRT5 esasen bir mitokondriyal bir sirtuindir (241), ancak birkaç çalışma sitozol, peroksizom ve çekirdekte de SIRT5'in mitokondri dışı lokalizasyonunu tanımlamıştır (191). Park ve ark., tarafından yapılan bir proteomik çalışmada, SIRT5'in sitoplazmik aktiviteleri de gösterilmiştir (297). Daha önce Matsushita ve ark., tarafından yapılan başka bir çalışma, insan SIRT5'in C-terminal dizisinde farklılık gösteren iki izoformu olduğunu göstermiştir. Kısa izoform ($SIRT5^{iso2}$) mitokondride lokalizedir ve uzun form ($SIRT5^{iso1}$) hem sitoplazma hem de mitokondride bulunur (298).

SIRT5 başlangıçta bir lizin deasetilaz olarak karakterize edilmişse de sonraki çalışmalar bu aktivitenin çok zayıf olduğunu ortaya koymuştur (191). SIRT5 için, asetillenmiş histon 4 peptidine karşı zayıf fakat saptanabilir deasetilaz aktivitesi olduğu kanıtlanmıştır (299). Ayrıca SIRT5, korunmuş bir mitokondriyal membran arası boşluk proteini olan asetilenmiş sitokrom C'ye karşı deasetilaz aktivitesi sergilemektedir (300). Sitokrom C, hücre apoptozunda önemli bir rol oynar. Daha sonra, SIRT5'in esas olarak asidik asil, süksinil, malonil ve glutaril gruplarının lizin kalıntılarından çıkarılmasına katkıda bulunduğu ortaya konmuştur (297, 301, 302). Bu bilgiler SIRT5'in mitokondriyel metabolizmada rol oynadığını göstermektedir (297). Literatürde, SIRT5'in mitokondrideki hedeflerine dair mevcut bilgi az olmasına rağmen, karaciğerdeki üre döngüsünün ilk aşamasını düzenleyen karbamoil fosfat sentetaz 1 (CPS1) enzimi SIRT5'in hedefi olarak tanımlanmıştır(303). Ayrıca SIRT5, glutaminaz enzimini, desüksinile ederek amonyak üretimini ve glutaminaz aktivitesinin inhibisyonunu sağlar. Glutaminaz inhibisyonu veya glutamin tükenmesi otofajinin tamamen önlemesiyle sonuçlanır. Tümör gelişimi durumunda, amonyak kaynaklı otofaji, tümör hücreleri için koruyucu bir mekanizma olarak kabul edilmiştir. Bu nedenle, SIRT5 aktivasyonu, amonyak kaynaklı otofajiyi azaltarak tümör hücrelerinin kemoterapiye veya hipoksi veya besin açlığı gibi diğer streslere karşı hayatta kalma kabiliyetini de azaltmaktadır (304). Güncel bir çalışmada, SIRT5 ile transfekte edilen hücrelerin ROS seviyesini azalttığı bulunmuştur. Bu da SIRT5'in hücredeki oksidatif stres koşullarını baskıladığını düşündürmektedir (305). Çok sayıda çalışma, SIRT5'in Glikoliz, TCA döngüsü ve elektron taşıma zincirinde (ETC) önemli bir rol oynadığını göstermektedir.

Sonuç olarak, SIRT5 glikoz oksidasyonu, keton cisim üretimi, yağ asidi oksidasyonu, amonyak detoksifikasyonu ve ROS'un düzenlenmesinde yer alır (191).

SIRT5 kanser biyolojisinde, metabolizma, apoptoz veya redoks homeostazı dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerde yer almaktadır (306). Muhtemelen, SIRT5'in metabolizma ve kanserdeki rolünü düşündüren ilk ipucu, SIRT5'in süperoksit dismutaz 1'in (SOD1) desüksinil edildiği ve ROS'u uzaklaştırarak akciğer kanseri hücrelerinin büyümesini engellediği gözlemi üzerine bulunmuştur (307). *SIRT5* mRNA ifadesi endometriyal karsinomda ve baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomada anlamlı olarak azalmış ifadesi saptanmıştır (250, 308). Bununla birlikte SIRT5 enzimin küçük hücreli dışı akciğer kanserlerinde up-regüle olduğu ve onkogen olarak davrandı bulunmuştur (309). Benzer şekilde, *SIRT5* mRNA ifadesi, östrojen reseptörü negatif/progesteron reseptörü pozitif üçüncü derece invaziv meme tümörlerinde anlamalı şekilde artmıştır (310). Kolorektal kanserinde SIRT5'in yüksek ifadesi kanser hücresi büyümesi ve ilaç direncini kolaylaştırır ve kötü sağkalımın bir göstergesidir. Bu nedenle SIRT5'in susturulması akciğer kanseri hücrelerini kemoterapiye daha duyarlı hale getirir (230). Hematolojik malignitelerden Waldenström makroglobulinemi'si olan hastaların tümör dokularında *SIRT5* geninin artmış ifadesi onkogenik özellikte olduğunu göstermiştir (311). Güncel bir yayında Yan ve ark. AML hücre hatlarının metabolik adaptasyon için SIRT5' bağımlı olduklarını bulmuşlar (312).

2.6.6. SIRT6

İnsan *SIRT6* geni Chr 19p13.3'te bulunur (313). SIRT6, ağırlıklı olarak, çekirdekte lokalizedir ve kromatin ile ilişkili bir proteindir (314). SIRT6 hem histonların hem de histon olmayan proteinlerin deasetilasyonu, uzun zincirli yağ asil gruplarının deasetilasyonu ve mono-ADP-ribozilasyon aktivitesi gibi çoklu substratlara ve katalitik aktivitelere sahip olan bir enzimdir (315). Kromatin düzeyinde, SIRT6, H3'ün asetillenmiş, K9, K56, K18 ve K27 kalıntılarını deasetile eder (316-319). Bu lizinlerin deasetilasyonları, inflamasyon, yaşlanma, genomik stabilite, metbolik yolaklar ve telomer bütünlüğünde katılan farklı birçok genin baskılanmasına neden olur (247, 320).

SIRT6'nın biyolojik işlevleri (ör., deasetilasyon, yağ-asilasyon ve mono-ADP-ribozilasyon), yaşam süresinde ve DNA onarımı, gen ifadesi ve telomerik koruma gibi

yaşlanmayı kontrol eden birkaç temel sürecin düzenlemesinde çok önemli rol oynar (321). Bu protein baz eksizyon onarımı ve DNA ucu rezeksiyonu ile birlikte genomik kararsızlığı baskılayan ve DNA hasarının korunmasında yardımcı olan bir enzimdir (314, 322). SIRT6'nın aşırı ifadesi yaşam süresini uzattığında gösterilmiştir (323). Bu enzim H3K9'u deasetile etmesiyle telomerik kromatini modüle eder (316). SIRT6 ayrıca NF-kB ile etkileşime girer ve NF-kB hedef genlerinin promotörlerinde H3K9'u deasetile eder. SIRT6 eksik hücrelerde H3K9 hiperasetilasyonu, artmış apoptoz ve hücresel senescence ile ilişkilendirilmiştir (324). SIRT6 oksidatif stres ve DNA hasar yolaklarında katılır. Bu enzim oksidatif stres sinyali ve DNA hasar yanıtını entegre eden bir düzenleyicidir. Oksidatif stres durumunda SIRT6 DNA'nın DNA'nın çift zincir kırık (double-strand break-DSB) bölgelerine yer alır. Ardından hem NHEJ ve hem homolog rekombinasyon tamir mekanizmalarında katılır. SIRT6 oksidatif stres durumunda poli (ADP-riboz) polimeraz'ın (PARP1) 521'inci pozisyonundaki lizinin üzerineki mono-ADP-ribozilat aktivitesiyle DSB tamarin sağlar (325). Sonuç olarak, bu bilgiler SIRT6'nın yaşlanma ve yaşam süresinde önemli bir düzenleyicisi olduğunu göstermektedir.

SIRT6'nın rolü kanser, inflamasyon, diyabet ve nörojeneratif hastalıklar gibi yaşamı tehdit eden çeşitli insan hastalıklarındaki biyolojik işlevleri açısından kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır (326). SIRT6'nın rolü kanserde tartışmalıdır. Son yıllarda çıkan çalışmalar SIRT6'nın kanserlerde hem gen seviyesinde hem de protein düzeyinde ifade değiştiğini göstermiştir. Tümörogenezde SIRT6, biyolojik duruma bağlı olarak tümör teşvik edici veya baskılayıcı rolü olduğu kabul edilebilir (327).

SIRT6'nın DNA hasar onarımı, genomik stabilite, hücresel metabolik homeostazı ve apoptoz gibi fonksiyonların kontrol etmesi bu enzimin tümör büyümesine karşı korumayı ortaya koymuştur. Özellikle SIRT6'nın tümör baskılayıcı rolünün en önemli mekanizması aerobik glikolizin (Warburg etkisi) inhibisyonüdür. Warburg etkisi, Myc transkripsiyonel aktivitesiyle birlikte kanser hücrelerinin hızlı büyümesini desteklemek için önemli bir faktördür (326). Öte yandan SIRT6'nın, kanser hücrelerinin glikolitik metabolizmasını önleyen HIF-1α'yı inhibe ederek tümör baskılanmasında rolü olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak SIRT6, HIF-1α baskılamasıyla birlikte birkaç glikolitik genin promotör bölgelerinde H3K9'u deasetil ederek kanser hücrelerine glukoz alımının azaltması ve glikolizin aşağı regülasyonun sağlar (328). Kanser Hücre Hattı Ansiklopedisi gibi farklı veri tabanlarının

analizi, SIRT6 ifadesinin çeşitli kanser türlerinde baskılandığını göstermiştir. Bu bilgiler SIRT6 enzimi için bir tümör baskılayıcı rolü olduğunu gösterir (327). Buna ek olarak, biyolojik ve enzimatik fonksiyonlarını değiştirebilen ve sıklıkla bozabilen ve sonuçta metabolik değişikliklere ve GC'deki malign transformasyona yol açan birçok SIRT6 nokta mutasyonu, tümörlerde keşfedilmiştir (329).

Artan sayıda çalışmalar SIRT6 ifadesinin artışın hem katı hem de hematolojik kanser türlerinde ortaya koymuştur. Örneğin hepatoselüler ve kolon kanserleri gibi bazı diğer kanser türlerinde kötü klinik sonuçlarla birlikte SIRT6'nın yüksek ifadesi, SIRT6'nın onkogenik fonksiyonun gösterir (326). SIRT6, onkogenik etkisini kromatin yeniden modelleme yoluyla sağlar. SIRT6, BCL-2 ile ilişkili X (Bax) genin promotör bölgesine alınır ve histon H3K9'u deasetile etmesiyle TP53 ve E2F1 transkripsiyon faktörülerin bu genin promotör bölgesine bağlanmasını inhibe eder. Böylece Bax proteinin transkripsiyonunu bloke ederek apoptozu inhibe eder (330).

Kanserlerin %20'sinde *SIRT6* geninin delesyona uğradığı veya ifadesinin azaldığı gösterilmiştir (ör. kolon kanser ve rektal adenokarsinoma) (205). Adrenokortikal karsinomda SIRT6 enzimin aşağı regülasyonu, NF-κB sinyallemesinin aktivasyonu yoluyla tümörigenezi ve reaktif oksijen türlerini (ROS) artırır (331). İnsanda *SIRT6*'nın kaybı kronik karaciğer hastalığı ve hepatosellüler karsinomanın (HCC) gelişimi ile ilişkiliyken (332), diğer kanser tiplerinde *SIRT6*'nın ifade artışı kötü prognoz ile ilişkili bulunmuştur. NSCLC hücre hatlarında SIRT6'nın susturulması, hücre döngüsünün durdurulması ve apoptozun indüklenmesine sebep olmuştur (333). Meme kanserinde *SIRT6* aktivitesinin kemoterapiye direnç sağladığı (334) ve pankreatik kanser hücrelerinde sitokin üretimi ve migrasyona neden olarak inflamasyonu, anjiyogenez ve metastazın tetiklediği gösterilmiştir (335). Yang ve ark. papiller tiroid kanserinde ROS'ın upregülasyon yoluyla SIRT6'nın tümörigenez ve Warburg etkisini indüklediğini kanıtladı (336). DBBHL'larda da bu genin yüksek ifadesi ve bu ifade artışının kötü prognoz ile ilişkisi kanıtlanmıştır (337, 338). AML'lerde normal $CD34^+$ hematopoetik progenitörlere göre SIRT6 geninde ifade artışı gözlenmiştir (339). Ayrıca diğerler çalışmalar SIRT6 ve kronik lenfositik lösemi (KLL) arasında pozitif bir korelasyon göstermiştir (340). Sonuç olarak SIRT6'nın tümörogenezdeki baskılayıcı veya destekleyici olan karşıt eylemler, tümör tipine ve evresine özgü olabilir. Başka bir değişle

SIRT6 normal hücrelerin malign transformasyonu inhibe eder ancak kanser hücrelerinde onkogenik bir fonksiyonu kazanır (341).

2.6.7. SIRT7

İnsan *SIRT7* geni Chr 17q25'te yer alır (342). SIRT7 esas olarak nükleolusta lokalizedir (241) ve hücresel homeostaz, transkripsiyon, ribozom biyogenezi, kromatin yapısı ve hücre çoğalmasında önemli bir düzenleyicisi olduğu ortaya çıkmıştır (343). SIRT7 üzerinde, diğer sirtuinlere göre daha az çalışmalar olsa da şimdiye kadar incelenen kanser türlerinde genel olarak upregüle olduğu ve potansiyel olarak onkogenik davrandığı bildirilmiştir (210). SIRT7, RNA polimeraz I (Pol I) ve histonlar dahil olmak üzere bir sürü aktif rRNA geni (rDNA) ile ilişkilidir (344). SIRT7'nin ilk görevi β-NAD^+'ya bağlı deasetilaz olduğu tanımlanmıştır. Bu işlevde SIRT7 kromatindeki histon 3'ün 18. pozisyonundaki Nε-asetil-lizini çıkarır. H3K18 asetilasyonu, aktif transkripsiyonun markeri olduğundan, bu epigenetik özellik kanser hücrelerin fenotipinin koruması için gereklidir. SIRT7, H3K18 deasetile ederken kontrolsüz hücre büyümesi ve kontakt inhibasyonun kaybını destekler ve kanser hücrelerinin özelliklerini korur (345). SIRT7, ribozom biyogenezini etkinleştirir ve hücre çoğalmasını destekler. Nükleolde RNA polimeraz I (Pol I) ve rDNA transkripsiyon faktörü UBF gibi rDNA transkripsiyon mekanizmasının bileşenleri ile etkileşime girer (241). rDNA transkripsyonu pozitif yönde düzenleyerek uyarır (344). Ayrıca, SIRT7 mitoz esnasında sikline bağımlı kinaz 1 (CDK1)-siklin B yolağında fosforile edilir. Bu fosforilasyon olaylarında SIRT7'nin C-terminal bölgesinde konformasyonel modifikasyonları indüklenir. Oluşan konformasyonel değişiklik, SIRT7 aktivitesinin değişilmesi ve rDNA transkripsiyonunun düzenlenmesi ile ilişkilendirilmiştir (346). SIRT7 ayrıca MYC transkripsiyonel aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynar. Endoplazmik retikulum (ER) stresi sırasında SIRT7, HIF-1α ve HIF-2α stabilitesini azaltır, MYC tarafından ribozomal genlerin promotörlerine alınır ve ifadelerini birlikte baskılar. Ancak, MYC'ye bağımlı tümörlerde SIRT7 için bir tümör baskılayıcı rolü olduğu tam belli değildir (191).

SIRT7, kanserin başlangıcında yer almazsa da kanser fenotipini korumasında çok önemli görünüyor (347). SIRT7, farklı tümör baskılayıcı genlerin spesifik promotörlerinin deasetilasyonu ile kanser proliferasyonunu aktive ederek, tümörogenezde onkojenik bir role sahiptir. SIRT7, kötü klinik sonucu olan agresif ve metastatik tümörler için bir biyobelirteçtir

ve aşırı ekspresyonu, ileri tümör evresi ile ilişkilidir (230). İnsan kanser hücre hatalarında SIRT7 genin susturulması hücre çoğalmasını engeller ve apoptozu indükler. Bu güçlü etki SIRT7'nin kanser hücresi canlılığında gerekli olduğunu göstermektedir (344). Hücre çoğalması üzerindeki bu etki, azalmış p21 ifadesi ve artmış siklin D1 ifadesinden dolayı G1/S geçiş aşamasının bozulmasından ortaya çıkabilir (348). Ayrıca, SIRT7 onkogenik özelliğini H3K18'in deasetilasyonu ile gösterebilir. H3K18'in SIRT7 tarafından deasetilasyonu, tümör baskılanması ile ilgili genlerin transkripsiyonunu azaltır (345). Hızlı büyüyen tümör hücrelerinde ribozom ihtiyaçlarının karşılaması için rRNA sentezinin up-regülasyonu SIRT7'nin hücre çoğalmasında olan diğer etkisidir (344).

Çeşitli kanserlerde *SIRT7*'de ifade artışı gösterilmiş ve onkogenik transformasyon ile ilişkisi bulunmuştur (205). *SIRT7*'nin mRNA seviyesi *SIRT2* ve *SIRT3* ile beraber, yaşlanan HKH'lerinde azalır. Bundan dolayı *SIRT7*'nin rolü yaşlanan hematopoietik sistem için önemlidir. İnsan hepatoselüler karsinoma'da upregülasyonu ve tümör derecesi ile artışı gösterilmiştir (223). Meme kanserinde *SIRT7* mRNA'nın artmış ifadesi özellikle erken evrelerde kanıtlanmıştır (349). Prostat adenokarsinomlarında hücre hatlarında özellikle agresif ve metastatik tümörlerde aşırı ifadesi ve EMT programın desteklenmesi saptanmıştır (350). Yapılan bir araştırmada mide tümörlerinde SIRT7'nin yüksek seviyede ifadesi ve daha kısa genel sağkalım ve hastalıksız sağkalım ila ilişkisi gözlenmiştir (351). Diğer araştırmalar deride, insan skuamöz hücre karsinoma (squamous cell carcinoma-SCC) biyopsilerinde (352), over kanseri hücrelerinde (353), NSCLC (354), uterus, kolon ve böbrek kanserlerinde bu genin artmış ifadesini göstermiştir (345).

2.7. FOLİKÜLER LENFOMA VE TRANSKRİPTOM ANALİZLERİ

Merkezi dogmanın önemli bir parçası olarak RNA, genetik ve düzenleyici bilgiyi sağlar ve hücresel durumlarını yansıtır. Yüksek verimli dizileme teknolojilerine dayanarak veriler, çeşitli RNA moleküllerinin, örneğin kanser gibi çeşitli hastalıkların teşhisi ve prognozu için biyolojik belirteçler olarak hizmet edebildiğini göstermektedir (355). Transkriptom ve metabolomda olan değişiklikler farklı kanser türlerinin çok yönlü özelliğidir. Transkriptomik, neredeyse tüm gen transkriptlerinin ölçülebildiği, bütüncül ve standart bir yaklaşımdır. Transkriptomun parçalarını analiz eden mikrodizin teknolojisi 1995'lered başlayarak 2008'lerde yeni nesil dizileme teknolojisinin gelişmesiyle ortaya çıkan RNA dizileme (RNA-Seq) yöntemleri araştırmalarda temel değişiklikler oluşturdu (356). cDNA

dizileri (mikrodizinler) ve eş zamanlı kantitatif PCR (qRT-PCR), diferansiyel olarak eksprese edilen genleri ve genom çapında transkripsiyon modellerini tanımlamak için önde gelen teknolojilerdir. Mikrodizin teknikleri, farklı deneysel koşullarda veya farklı dokularda binlerce mRNA'nın nispi ekspresyonunun paralel olarak değerlendirilmesini sağlar. cDNA mikrodizinleri, bir hücre veya dokunun tüm transkriptom profilinin belirlemesi için benzersiz ve güçlü bir teknolojidir.

Mikrodizin teknolojisi ortaya çıkışından bu yana temel araştırmalardan klinikte muhtelif hastalıkların tanı ve prognozunun ortaya koymasına kadar uzanan geniş bir uygulanma alanı sağlamaktadır. Mikrodizin teknolojisinin kullanıldığı çalışmaların ham sonuçlarının uluslararası veritabanlarına yüklenmesi bu verilerin yayınlanabilirliği için bir zorunluluktur. Deney tasarımı ve içeriğine ilişkin bilgileri de içeren bu veriler araştırmacıların deneysel hipotezlerine göre meta-analiz yapmalarına fırsat sunar. Bu tür verilerin biraraya getirilerek analiz edilmesi, entegrasyonu, bireysel mikrodizin çalışmalarını sonuçlarının güvenilirliğini ve genelleştirilebilirliğini artırma potansiyeline sahiptir. Özellikle örneklemin sınırlı olduğu bazı araştırmalarda meta-analizler büyük bir önem sağlar.

Bununla birlikte, mikrodizinlerden elde edilen gen ekspresyonu verilerinin kalitesi, kullanılan platform ve prosedürlere göre büyük ölçüde değişebilir. Mikrodizin analizinden elde edilen gen ekspresyonu sonuçlarını doğrulamak için qRT-PCR, yaygın olarak kullanılan bir validasyon yöntemdir (357).

Gene Expression Omnibus (GEO), Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) tarafından yönetilen gen ifade profili verilerinin yüklenebildiği bir veri tabanıdır. GEO'da mikrodizin ve RNA-Seq deney veritsetleri bulunmaktadır. Mikrodizin ve yeni nesil dizileme gibi yüksek işlem kapasiteli teknolojilerin gelişmesine rağmen birçok diğer multifaktöryel ve multigenetik patoloji gibi foliküler lenfoma hastalığının da gelişmesinde ve ilerlemesinde rol oynayan transkriptlerin hepsi tespit edilmemiştir. Bugüne kader GEO veri tabanına yüklenmiş yaklaşık 732 FL'ye ait olan mikrodizin verisi saptanmıştır. Bu veriler içinde nüks, grade, transformasyon durumu, FLIPI prognostik skor ve evre gibi klinikopatolojik karakteristiklerinin birkaçına veya hepsine ulaşmak mümkün olabilmektedir. Ayrıca bazı değişik ve bağımsız çalışmaların da veri setlerinde FL vakalarının sonuçlarına rastlamak mümkün olabilmektedir. DBBHL, cHL, NMZL ve farklı NHL ile ilgili çalışmalar, EZH2

mutasyonu, CD19 ve CD20 FL çalışmaları, bu örneklerdendir. GSE12195 veri seti DBBHL hastalarında NF-kB yolağın düzensizliğinde neden olan mutasyonlarının incelemesini amaçlamıştır. Bu sette toplam 136 doku bulunmaktadır. Bu dokular 73 DBBHL hastasının lenf dokusu, 38 FL lenf dokusu ve kontrol olarak normal tonsil dokusunun farklı B hücrelerinden oluşan 20 vakadan oluşmaktadır. GSE12453 seti Hodgkin lenfomaların gen ifade profilini inceleyen bir deneydir. Bu mikrodizin deneyinde toplam 67 lenf örneğinden oluşan dokulardan 5 FL ve 11 DBBHL vakası bulunmaktadır. 25 farklı B hücreleride kontrol olarak bu deneye dahil edilmiştir. GSE32231 kodlu mikrodizin deneyi 15 NMZL hastasının mRNA ve miRNA ifade profilinin incelemesine odaklanan bir deneydir. Bu deneyde ayrıca 16 FL ve 9 ekstranodal MZL vakası kontrol olarak dahil edilmiştir. Gene ifade profilindeki ifade değişikliğin kıyaslaması için de 8 RLN kullanılmıştır. GSE32018 mikrodizn araştırması 114 B hücre Hodgkin dışı lenfoma (DBBHL FL, MCL, KLL ve NMZL) hastalarından alınan biyopsilerinin üzerinde ve onlara dahil olan 7 lenf nodülü ve 6 tonsil dokusundan oluşan bir deneydir. Bu deneyde 23 FL vakası bulunmaktadır. Bu sete benzer bir şekilde GSE9327 veri setinde de farklı B hücre Hodgkin dışı lenfomaların transkriptom analizi amaçlanmıştır. Bu deneyde 33 FL vakası dahil olmak üzere 38 MCL, 38 KLL, 9 BL, 27 SMZL, 6NMZL ve 36 DBBHL hastalarını örnekleri bulunmaktadır. Ayrıca 8 RLN ve 5 dalak dokusu kontrol olarak bu deneye dahil edilmiştir. GSE23647 veri seti 116 cHL, DBBHL ve FL hastasından oluşan bir settir. Bu sette 35 FL vakası ve kanser dokularla gen ifade profili kıyaslamak için 23 RLN dokusu bulunmaktadır. GSE55267 veri seti 12 EZH2 mutasyonlarını taşıyan ve 51 taşımayan (WT) FL ve 6 normal B hücreden oluşan bir deney setidir. GSE86613 seti 41 DBBHL, 7 transforme olamayan ve 2 transforme olan FL vakasından oluşan bir deneydir. GSE107367 ve GSE62246 setleri CD19+ ve CD19- B hücreli FL vakalarını içerir. GSE38816 kodlu çalışması ise CD20 yüksek ve orta seviyede ifade eden (High ve intermediate) B hücreli FL örneklerinden oluşmaktadır. Yukarıda belirtilen bazı çalışmalarda FL vakalarına ait olan klinik bulgular sunulmuştur.

Diğer çalışmalar özel olarak FL vakalarının gen ifade profillerine odaklanmıştır. FL hastalığa ait olan bu mikrodizin çalışmalarında 7 veri setinde hastaların grade dağılımı (GSE62246, GSE23647, GSE55267, GSE103944, GSE37088, GSE126247 ve GSE48047), 2 sette evre dağılımı (GSE126247 ve GSE48047), 1 sette hasatların FLIPI prognostik bilgileri (GSE93261), 1 sette hastalığın nüks durumu (GSE38816) ve 1 sette hastalığın transformasyonuna (GSE86613) ait olan hasta bilgileri klinik olarak bulunmaktadır. GEO

veri tabanında FL transkriptom deneylerine ait olan ve analiz için seçilen mikrodizin bilgileri Çizelge 2.6'da özetlenmiştir.

FL heterojen bir yapısı olan, birkaç morfolojik varyant ve spesifik alt tip içeren bir hastalıktır. Bu hastalıkta yanlış tanıyı önlemek için morfolojik varyantların tanımlanması ve farklı klinik seyirleri nedeniyle spesifik FL alt tipleri belirlenmesi gerekmektedir (12). Dolayısıyla bu tez çalışmasında çeşitli kanser tiplerinde ve onlara dahil olmak üzere hematolojik malignitelerde önce literatürde ifade değişiklikleri tespit olan *sirtuin* genleri potansiyel aday prognostik marker olarak seçilmiştir. Yaşlanma ve metabolizma ile ilişkisi olan bu genlerin mRNA seviyesinde ifadeleri 26 düşük seyirli (Grade 1, 2 ve 3A) ve 6 agresif seyirli (Grade 3B) FL hastasında qRT-PCR yöntemiyle incelenmesi hedeflenmiştir. qRT-PCR deneylerinden elde edilen sonuçların doğrulama amaçlı GEO veri tabanında bulunan ve FL bilgileri içeren veri setleri seçilmiştir. Bu veri setlerinde *sirtuin* genlerin diferansiyel ifade değerleri her sette bulunan olguların klinik veya patolojik kategorilerine göre gruplandırılıp ve analizlerinin yapılması bu tez çalışmasında amaçlanmıştır.

Çizelge 2.6. GEO veri tabanında FL deneylerinin mikrodizin bilgileri.

GEO erişim kodu	FL	Kt	Nüks	G1	G2	G3A	tFL	FLIPI/ Düşük	FLIPI/ Orta	FLIPI/ Yüksek	Evre/ Düşük	Evre/ İleri
GSE12195	38	20										
GSE68308	94	24										
GSE65135	14	10										
GSE35331	10	18										
GSE12453	5	25										
GSE107367	38	21										
GSE152068	8	8										
GSE32231	16	8										
GSE32018	23	13										
GSE9327	33	13										
GSE4351	19	4										
GSE62246	16	4		15		1						
GSE23647	35	23		12	13	10						
GSE55267	63	6		20	21	18						
GSE103944	35			12	9	14						
GSE37088	72			14	23	35						
GSE93261	149							26	58	65		
GSE126247	11	1		2	5	4					4	7
GSE48047	28	17		14	4						15	13
GSE38816	18		2									
GSE86613	9						2					
Toplam	**732**	**215**	**2**	**74**	**75**	**82**	**2**	**26**	**58**	**65**	**19**	**20**

3. GEREKÇE VE AMAÇ

Araştırmalar uzun yıllardan beri kanserlerin genelinde ve foliküler lenfoma (FL) özelinde aynı histopatolojik alt grupta bulunan hasta gruplarının aslında farklı moleküler imzalara sahip olan alt gruplardan oluştuğunu işaret etmekteydi. 2000'li yıllara dek hücre ve dokuların genom ve transkriptom yapılarını incelemek mümkün değildi. Günümüz teknolojisi ise birçok kanser türünün genom ve transkriptomlarının yüksek rezolüsyonla analiz edilmesini mümkün kılmaktadır.

FL'de ortaya çıkan moleküler değişimler ve bu değişimlerin hastalığın prognozu ile olan ilişkilerinin ortaya çıkarılması son yıllarda önemli araştırma sahalarının başında gelmektedir. FL'lerin onkogenik kaskaddaki ilk değişimi t(14;18)(q32;q21) translokasyonudur ve bu değişim FL'nin spesifik göstergesidir. Ancak bu moleküler değişim, hastalığın neoplastik transformasyonu için tek başına yeterli değildir. Buna ek olarak hastalığın klonal gelişiminde başka genetik değişimlerin de bulunduğu bilinmektedir. Benzer vakaların zaman içerisinde farklı davranışları bu hastalığın bireylerde farklı moleküler değişiklikler üzerinde geliştiğini göstermektedir. FL olgularının moleküler patogenezinin anlaşılması, oluşan tüm moleküler değişikliklerin saptanması ve klinik risk faktörleri ile korelasyonu, bu hastalığın prognozunun öngörülmesinde faydalı olacaktır. Saptanan moleküler değişiklikler üzerinden moleküler biyobelirteç niteliği taşıyanlara karşı ilaçların tasarımı kişisel tedavinin önünü açabilmektedir. Bugüne dek IPI ve FLIPI gibi prognostik skorlama sistemleri FL hastalarının prognozunun öngörülmesinde kullanılmıştır. Ancak bu indeksler hastalığın biyolojik davranışının öngörülmesinde yararlı olmakla beraber hastaların prognostik geleceğinin tahmininde yetersiz kalmaktadır.

Sirtuinlerin ifade değişiklikleri ile hematolojik yaşlanma ve malignite arasında literatürde farklı ilişki bulunmuştur. Bu lizin modifiye eden enzimler metabolizma, yaşlanma ve kanser gibi birçok hücresel sürece katılmaktadır. Kanser yaşa bağlı bir hastalık olduğundan, sirtuinler tümörogenezin düzenlenmesinde katkıda bulunabilirler. Diğer yandan yaşlanan hematopoietik kök hücrelerde sirtuinlerde saptanan moleküler değişikliklerin onkogenik transformasyona sebep olduğunu gösteren bulgular da bulunmaktadır. Hematolojik sistemin yaşlanması anemi, bağışıklık sisteminde zayıflama ve hematolojik malignitelerin artmasına sebep olur. Lenfoma insidansı yaşlılıkla beraber artmaktadır ve yaş lenfomageneziste en

belirgin faktörlerden biridir. FL'de ise tanı zamanında medyan yaş 65'dır. FL'de etken moleküler değişimlerin anlaşılması ve hastalığın prognoz ile birlikte değerlendirilmesi ve bu saptanan moleküler değişikliklere karşı ilaçların tasarımı kişisel tedavilerin gelişmesinin önünü açabilecektir.

FL'lerin yaş medyanı tanı zamanında 65 yaştır. İleri yaşta görülen bir malignite olan FL'de *sirtuin* genlerinin ifade seviyesinin değişiyor olabileceğini ve bu değişimin FL'nin prognozu ile korele olabileceğini öngördüğümüz hipotezimizi test etmek üzere FL ve foliküler hiperplazi vakalarında ve iki grup; düşük dereceli (grade 1, 2 ve 3A) ve yüksek dereceli (grade 3B) hastalarında *sirtuin* genlerinin ifadesi mRNA seviyesinde incelenmesi hedeflenmiştir. Buradan elde edilen sonuçlar ile örneklerin klinikopatolojik verileri arasında korelasyon incelenmesi ve araştırmamızın sonucunda FL'nin prognozu ile ilgili olarak öngörüsel bilgiye ulaşılması hedeflenmiştir. qRT-PCR analizlerin devamında, *sirtuin* genlerin potansiyel ifade değişikliklerini daha büyük kohort gruplarda incelemek amacıyla ve elde edilen qRT-PCR sonuçların validasyonu için Gene Expression Omnibus (GEO) veri tabanından çekilen mikrodizin veri setlerinin üzerinde meta-analizler gerçekleştirilmiştir.

4. MATERYAL VE YÖNTEM

4.1. MATERYAL

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda 2014 ve 2016 tarihleri arasında tanı alan 32 foliküler lenfoma (26 Düşük derece ve 6 yüksek derece) ve kontrol olarak 10 reaktif foliküler hiperplazi tanısı almış vakaların bilgileri Avicenna sisteminden çekilip vaka havuzu oluşturulmuştur. Olgulara ait olan hematoksilen-eozin (H&E) ve immünhistokimya boyalı kesitler arşivden çıkarılarak yeniden değerlendirilmiş ve temsili parafin bloklar belirlenmiştir.

Çalışma 13.10.2017 tarihinde 18-1128-17 karar numarası ile "Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu" tarafından onaylanmıştır. Etik kurul karar belgesi ek 1 olarak bulunmaktadır.

4.1.1. IŞIK MİKROSKOP İLE DOKULARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Olgulara ait H&E ve immün boyalı kesitler ışık mikroskopta Dr. Gülşah KAYGUSUZ tarafından yeniden değerlendirilmiştir. Vaka grubu için yeterli tümör alanı bulunduran olgular seçilirken reaktif olguların seçiminde lenf nodülünün non-spesifik reaksiyonel değişiklikler içermiş olması ve spesifik bir patolojik değişiklik göstermiyor olması kriterleri gözetilmiştir. İzolasyon için uygun olan vakalar seçilmiştir.

4.1.2. MİKROTOM CİHAZI İLE ÖRNEKLERDEN KESİT ALMA AŞAMASI

Seçilen boyalı preparatlara ait olan FFPE bloklar arşivden çıkarılmıştır. Bu tez çalışmasında RNA izolasyonu için kullanılan Qiagen RNeasy FFPE kitin (Katalog No. 73504) protokolüne göre ön hazırlıklar yapılmıştır. Seçilen dokuların kesit alma işlemleri için Patoloji Anabilim Dalında bulunan Shandon Finesse 325 Manuel Mikrotom (Thermo, A77500016) cihazı kullanılmıştır. Tüm kesit alma ve izolasyon aşamalarında çalışılan ortam ve kullanılan malzemeler, steril şartlarda yapılmıştır.

Kesit almadan önce arşivden çıkarılan FFPE bloklar en az 30 dk boyunca -20°C'de bekletilmiştir. Mikrotom bıçakları kesit almadan önce RNaseZAP ile dekontamine edilmiştir. Önce cihaz Trim'e ayarlanıp fazla parafinler kazınmıştır. Doku çıktıktan sonra kesitler 45°C ayarlanmış su banyosuna koyularak tüm dokunun çıkmasına özen

gösterilmiştir. Sıcak su banyosu kıvrılmış dokuları saf tutarak daha düzgün incelemeyi izin verir. Tüm doku çıktıktan sonra cihazın Section ayarında kesit alınmıştır. Dokunun ebadına göre 8µm kalınlığında 4-6 kesit alınmıştır. Örnekler arası çapraz kontaminasyonu engellemek üzere her blok için ayrı mikrotom bıçağı kullanılmıştır.

Işık mikroskop yardımıyla seçilen iki tip dokuya göre kesit alma aşamasında elde edilen dokuların toplanması iki farklı yöntemle yapılmıştır:

1- Tüm tümör alanı kapsayan dokuların kesitleri otoklavlanmış ve steril edilmiş 1.5 ml'lik tüplere alınmıştır.
2- Tümör alanları deseksiyon edilecek dokular için sterillenmiş lamlar kullanılmıştır. Lam üzerinden yapılacak izolasyonların ortamının steril koşullarını sağlamak için lamlar önceden alüminyum folyo ile sarılıp, otoklav yapılıp ardından Etüv cihazında 170°C'de 2 saat boyunca kurutulmuştur. Tümör alanları seçilecek dokular su banyosundan alınacağı için bu alan DEPC'li suyla doldurulmuştur. Sağlam ve saf dokular nazikçe lam üzerine alınıp ve açık havada kurumaya kadar bekletilmiştir.

4.1.3. SEÇİLEN FFPE DOKULARIN RNA İZOLASYON AŞAMALARI

10 kontrol grubu ve 32 vaka grubu örneklerinden Qiagen RNeasy FFPE kiti ile total RNA izolasyonu için kitin aşağıdaki protokolü takip edilmiştir. Işık mikoroskop yardımıyla seçilen iki tip örneğin deparafinizasyon aşaması hariç tüm örneklerin izolasyonlarında kitin aynı protokulü uygulanmıştır.

1- Deparafinizasyon

Kesit alınan dokuların parafin içinde bulunduğu için önce dokuların bu parafinden uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu basamakta tüm doku veya lam üzerinden alınacak tümör bölgelerine göre iki farklı deparafinizasyon yöntemi takip edilmiştir.

- **Tüm kesit tümör alanı kapsayan dokuların deparafinizasyonu:**
  1- Dokuları içeren tüplerin üzerine 1 ml kesilen eklenip ve 10 saniye iyice vorteks ile karıştırıldıktan sonra 2 dk maksimum hızda santrifüj edilmiştir.
  2- Pellete dokunmadan supernatant pipet ile uzaklaştırılmıştır.
  3- Kesileni uzaklaştırmak için 1ml %100 etanol pellete eklenip, iyice vorteks ile karıştırıldıktan sonra 2 dk maksimum hızda santrifüj edilmiştir.

4- Pellete dokunmadan supernatant pipet ile uzaklaştırılmış ve geriye kalan alkol dikkatlice 10 µl'lik pipet ucuyla pelleten alınmıştır.
5- Kalan alkolün uzaklaşması için tüplerin kapağı açık tutularak oda sıcaklığında pelletin kurumasına kadar bekletilmiştir.

- **Lam üzerinden tümörlü bölgelerin kazınması gereken dokuların deparafinizasyonu:**

1- Lam üzerine alınmış kesitler önce DEPC'li suyla muamele edilmiş ve otoklavlanmış şalelere alınmıştır.
2- Şalelere ksilen ile aşacak şekilde doldurulmuş ve 10 dk deparafinize olamk için bekletilmiştir.
3- Taze keslinle 2'inci aşama tekrarlanmıştır.
4- Ksileni uzaklaştırmak için preperatlar %100 etanol ile doldurulmuş temiz şalelere alınıp ve 5 dk inkübe edilmiştir.
5- 4'üncü adım taze %100'lük etanol ile dolu kapta tekrarlanmıştır.
6- Etanolü uzaklaştırıldıktan sonra distile suyla dolmuş temiz şalede preparatlar 30 saniye yıkanmıştır.
7- Kesitlerin tamamen kurumasına kadar peçete üzerinde yaklaşık 15 dk bekletilmiştir.
8- RNaz ZAP ile temizlenmiş bistüri bıçakla yardımıyla deparafinize edilmiş kesitler marker kalem ile işaretlenmiş H&E boyalı preperatlar ile çakıştırarak tümör alanları kazılıp ve otoklavlanmış 1.5 ml'lik tüplere alınmıştır.

2- İzolasyon Protokolü

1- Tüplere 240 µl Buffer PKD eklenip ve vortekslenmiştir.
2- 1 dk 10,000 rpm'de santrifüj edilmiştir.
3- 10 µl Proteinaz K eklenmiş vorteks yapmadan pipetaj yaparak yavaşça karıştırılmıştır.
4- 15 dk 56°C'de ve daha sonra 80°C'de 15 dk inkübasyona maruz bırakılmıştır. Isı bloğu çalkalama özelliği olmadığı için her 3 dk'dan bir örnek vorteks ile hafifçe karıştırılmıştır.
5- 3 dk buz üzerinde inkübe edilmiştir. Daha sonra 15 dk 13,500 rpm'de santrifüj edilmiştir.

6- Pellet'e dokunmadan ve bozmadan dikkatlice süpernatant yeni 2'ml tüpüne alınmıştır.
7- Total örnek hacminin ondan biri kadar (yaklaşık 25 ul) DNase Booster Buffer ve 10 µl DNase I stock solüsyonundan tüpe eklenmiştir. Tüp ters-düz edilerek hafifçe karıştırılmıştır. Tüpün çeperinde kalan sıvıların toplanması için kısa bir santrifüj edilmiştir.
8- 15 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
9- Membrana bağlanma şartları sağlamak için 500 µl Buffer RBC eklenmiş ve lizat iyice karıştırılmıştır.
10- Örneğe 1200 µl saf etanol (%100) eklenmiş ve sentrifüj yapmadan nazikçe pipetaj yaparak karıştırılmıştır. Bu aşamada total RNA'nın çökeltilerinin gözlenmesi beklenir.
11- 700 µl örnekten (oluşan çöküntüleri ile beraber) alınıp 2 ml'lik tüpe yerleştirilmiş, +4°C'de saklanan RNeasy MinElute spin kolona aktarılmıştır. Dikkatlice kapak kapatılıp ve 15 saniye ≥10,000 rpm (13,500 rpm) santrifüj edilmiştir. Böylece RNA'nın membrana bağlanması ve diğer bileşenler kolona akıp gitmesi sağlanır. Alttaki oluşan sıvı atılıp ve kolon aynı koleksiyon tüpe geri konulmuştur.
12- Bir üsteki basamak tüm örneğin RNeasy MinElute spin kolondan geçene kadar devam edilmiştir. Aynı koleksiyon tüp kullanılmıştır.
13- Membranının yıkanması için 500 µl Buffer RPE RNeasy MinElute spin kolona eklenmiştir. Kapak nazikçe kapatılıp ve 15 saniye ≥10,000 rpm'de (13,500 rpm) santrifüj edilmiştir.
14- 500 µl Buffer RPE RNeasy MinElute spin kolona eklenmiştir. Kapak dikkatlice kapatıldıktan sonra 2 dk ≥10,000 rpm (13,500 rpm) santrifüj edilmiştir. Oluşan sıvı koleksiyon tüp ile birlikte atılmıştır. Bu adımda RNeasy MinElute spin kolon, koleksiyon tüpünden alınması çok dikkatli olmalıdır. Temas durumunda etanol spin kolona bulaşabilir.
15- RNeasy MinElute spin kolon yeni bir 2 ml'lik koleksiyon tüpüne yerleştirilmiştir. Spin kolonun kapağı açık şekilde en yüksek hızda 5 dk santrifüj edilmiştir. Koleksiyon tüpü akan sıvı ile birlikte uzaklaştırılıştır. Kalan etanol sonraki reaksiyonları etkilediği için spin klonun membranından kurutulması gereklidir.

16- RNeasy MinElute spin kolon yeni bir 1.5 ml'lik koleksiyon tüpüne yerleştirilmiştir. 20 µl RNase free su doğrudan spin kolonun membranına değmeden eklenmiştir. Kapak nazikçe kapatılmış ve en yüksek hızda (13,500 rpm) 1 dk santrifüj edilmiştir.

4.1.3.1. RNA'ların Spektrofotometrik Analizi, Kalite ve Konsantrasyon Tayini

İzole edilen RNA'ların saflık ve konsantrasyonları Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 cihazıyla spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. RNA'rın konsantrasyonu ng/µl olarak ölçülmüştür. Nükleik asitler (RNA, ssDNA ve dsDNA) UV ışığının OD_{260} nm, proteinler OD_{280} nm, fenol ve diğer bileşenler ise OD_{230} nm dalga boylarında maksimum absorbansına sahiptir. Bu dalga boylardan elde edilen absorbansların oranı izole edilen RNA'ların saflık derecesi için dikkate alınmıştır. OD_{260}/OD_{280} oranı protein kontaminasyonu göstergesidir ve RNA ölçümleri için ~ 2,0 kabul edilir. Fenol ve TRIzol gibi diğer organik bileşenlerin kontaminasyonu da OD_{260}/ OD_{230} oranı ile tespit edilir. Bu miktar RNA ölçümleri için>1.8 olmalıdır.

İzole edilen RNA stoklarından 1000 ng/µl konsantrasyonu olacak şekilde farklı örneklerin alikuot hacimleri hesaplanıp otoklavlanmış 200 µl'lik tüplerine dağıtılıp -80°C derin dondurucuda muhafıza edilmiştir.

4.1.3.2. İzole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforezi

Elde edilen RNA'ların nitelik değerlendirmesi için agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. İzole edilen örneklerin total RNA oldukları için %1 agaroz jel 1XTBE solüsyon ile hazırlanmıştır. UV ışığında görüntülemek için %5 EtBr hazırlanan jele eklenmiştir. Jel donduktan sonra 1XTBE içeren elektroforez tankına yerleştirilmiştir. 2 µl RNA örneği 2 µl 5x Green GoTaq yükleme boyası ile beraber jele yüklenmiştir. Kuyucukların birine 5 µl 100 bp DNA marker jele yüklenmiştir. 100 volt akımda 20 dk yürüdükten sonra "Gene Genius BioImaging System" cihazıyla görüntü alınmıştır.

4.1.4. İZOLE EDİLEN RNA'LARDAN cDNA SENTEZİ

Gen ifade düzeylerin değerlendirilmesi için gerçek zamanlı kantitatif PCR (qRT-PCR) deneyleri bu tez çalışmasında uygulanmıştır. qRT-PCR reaksiyonları için ilk adım izole edilmiş RNA'lardan cDNA sentezi ve kütüphane oluşturmasıdır. Elde edilen RNA'lardan

E0804-02 katalog numaralı, smART First Strand cDNA Synthesis kit ile cDNA sentezi yapılmıştır.

4.1.4.1. Kit Protokolü

Bu kit ile cDNA sentezi iki basamaktan oluşmaktadır:

- **Denatürasyon aşaması:**
  1- 5X cDNA Buffer çözülmek için -20°C'den çıkarılmış ve oda sıcaklığına çözene ve oda sıcaklığına gelene kadar bekletilmiştir.
  2- Reaksiyonlar Çizelge 4.1'ye göre RNase-free tüplerinde bulunan RNA'ların üzerine eklenmiştir. İzolasyon sonucundaki RNA'lerin konsantrasyonu ve alikuot'ların hacmine göre eklenen suyun miktarı hesaplanmıştır.

Çizelge 4.1. cDNA sentezinin birinci basamağının bileşenleri.

Bileşen	**Hacim**
RNA	x µl (Değişken)
Primer Random Hexamere	1µl
10 mM dNTP Mix	1µl
RNase- free su	Değişken
Toplam hacim	**12.5 µl**

  3- Karışım nazikçe pipetaj yapıldıktan sonra kısa santrifüj edilmiştir. Ardından Bio-Rad T100 thermal cycler cihazında 65°C'de 5 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyonun aşamasından sonra tüpler buz üzerine alınmıştır.

- **Ters transkripsiyon aşaması:**
  1- Çizelge 4.2'deki gibi reverse transkripsiyon bileşenleri buzun üzerindeki tüplerin karışımına eklenmiştir.

Çizelge 4.2. cDNA sentezinin ikinci basamağının bileşenleri.

Bileşen	**Hacim**
5X cDNA Buffer	4 µl
DTT 0.1 M	2 µl
RNase inhibitör	0.5 µl
smART	1 µl
Toplam hacim	**20 µl**

2- Hazırlanan karışımın reverse-transkripsiyon reaksiyonu Çizelge 4.3'teki belirtilen koşullarda Bio-Rad T100 Thermal Cycler cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 4.3. Reverse transkripsiyon ısı programı.

Sıcaklık	Zaman
25°C	10 dk
50°C	20-50 dk
85°C	5 dk

Reaksiyonun sonucunda 20 µl cDNA elde edilmiştir. Sentezlenen cDNA'lerin üzerine 80 µl RNase free su eklenerek 1:5 sulandırılmıştır. 10 ng/µl konsantrasyonunda elde edilen cDNA örnekleri -20°C dolaba kaldırılmıştır.

4.1.4.2. cDNA kitin Optimizasyon Deneyleri

Bu kitin protokolünün 5'inci basamağında 50°C'de geniş bir inkübasyon zamanının (20-50 dk) uygulanması önerilmiştir. Hangi derecede daha düzgün sonuç elde etme amacıyla bir RNA örneğin üzerinden optimizasyon reaksiyonu planlanmıştır. Kurulan deneyde aynı RNA örneği 20-30-50 dakikalarda 50°C inkübasyona maruz bırakılmıştır. Sonuçları değerlendirmek için üç farklı inkübasyon zamanında elde edilen cDNA örneklerinden, ile bir konvansiyonel PCR kurulmuştur. Bu tez çalışmasındaki primerlerin bu aşamada henüz optimize olmadığı için bu reaksiyon önceki çalışmalara ait olan ve optimize olunmuş *B2M* primeri yapılmıştır. Ayrıca bu deneyde bir pozitif kontrol de dahil edilmiştir. Dört reaksiyon için tablo Çizelge 4.4. protokolüne göre PCR hazırlıkları yapılmış ve termal döngü cihazında Çizelge 4.5. programına göre 34 döngüde PCR reaksiyonu yapılmıştır.

Çizelge 4.4. Konvansiyonel PCR için hazırlanan karışım.

Bileşen	Hacim	Son Konsantrasyon/Miktar
Buffer (10x)	2.5 µl	1x
$MgCl_2$ (25 mM)	1 µl	1 mM
dNTP (10 mM)	0.5 µl	0.2 mM
Forward Primer (10 pmol/µl)	0.5 µl	0.2 pmol/µl
Reverse Primer (10 pmol/µl)	0.5 µl	0.2 pmol/µl
Taq Polymerase (5 U/µl)	0.25 µl	1.25 U/µl
cDNA (10 ng/µl)	4 µl	40 ng
Nükleaz free su	15.75 µl	-
Toplam hacim	**25 µl**	-

Çizelge 4.5. PCR için uygulanan ısı döngüsü.

Sıcaklık	Süre	Döngü
95^0C	5 dakika	1
95^0C	30 saniye	34x
56^0C	30 saniye	
72^0C	30 saniye	
72^0C	5 dakika	1

Elde edilen PCR ürünleri %2'lik agaroz jelinde 100 V'de 15 dk yürütüldü ve jel görüntüsü alınmıştır.

4.1.5. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYON İLE SENTEZLENEN cDNA'LERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

İzole edilen RNA'lar 1000 ng miktarına göre her örnek için farklı hacimlerde alikuotlanmış olup ve -80 dolabına kaldırılmıştır. cDNA sentez aşmasından sonra elde edilen cDNA örnekleri 20 ul olup, üzerine 80ul nükleaz free su ekleyerek 1:5 sulandırılmıştır. Bu şekilde 10 ng/ul konsantrasyonun ile cDNA örnekleri elde edilmiştir. qRT-PCR deneylerine sentezlenen cDNA'lerin kontrol edilmesi ve giriş yapılacak cDNA örneklerin 10 ng miktarında yeterli olup veya olmamasına karar vermek için 10 ng cDNA ile deneme reaksiyonu kurulmuştur.

Bu deneyde tezimizde dahil olan *UBC* (Housekeeping gen) primer ile konvansiyonel PCR kurulmuştur. qRT-PCR deneylerinde ve optimizasyon deneylerinde uygulanan konvansiyonel PCR için çalışmamızda dahil olan ve qRT-PCR deneylerinde uygulanan EVAGreen mix kullanılmıştır. Bu kitin protokolüne göre reaksiyon karışımı hazırlanmıştır (Çizelge 4.6). Karışım hazırlandıktan sonra Çizelge 4.7'de bulunan sıcaklık döngüsü konvansiyonel PCR cihazında (BioRad) uygulanmıştır.

Çizelge 4.6. EvaGreen için hazırlanan karışım.

Bileşenler	Hacim	Konsantrasyon/Miktar
5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix	2 µl	1x
Forward Primer (10 pmol/µl)	0.4 µl	0.4 pmol/µl
Reverse Primer (10 pmol/µl)	0.4 µl	0.4 pmol/µl
cDNA 10 ng/ µl	1 µl	10 ng
Nükleaz free su	6.2	-
Toplam hacim	**10 µl**	-

Çizelge 4.7. EvaGreen PCR için uygulanan sıcaklık döngüsü.

Sıcaklık	Süre	Döngü
95^0C	12 dakika	1
95^0C	15 saniye	40X
55^0C	30 saniye	
72^0C	30 saniye	

4.1.6. cDNA MİKTARI VE MAGNEZYUM İYON OPTİMİZASYON DENEYLERİ

Başarılı polimeraz zincir reaksiyon sonuçlarını elde etme amacıyla optimizasyon deneyleri amaçlanmıştır. Bu amaçla *UBC* primeri kullanılarak cDNA ideal giriş miktarına karar vermek için optimizasyon reaksiyonu planlanmıştır. Aynı zamanda zor reaksiyona giren primerler için $MgCl_2$ reaksiyonlara dahil edilmesi amaçlanmıştır. Bu yüzden her primer seti için gerektiğinde bu bileşenin titrasyonu da yapılmıştır. Çizelge 4.8'de bulunan karışım hazırlanıp, cDNA ve $MgCl_2$'ın uygun miktarlarına karar vermesi amacıyla bu iki bileşen için farklı miktarlar uygulanmıştır. Toplam hacim nükleaz free suyla 10µl'ye tamamlanmıştır. Bu reaksiyon için de Çizelge 4.7'deki *UBC* primerine ait olan sıcaklık döngüsü BioRad cihazında uygulanmıştır (Konvansiyonel PCR).

Çizelge 4.8. cDNA ve magnezyum iyonu titrasyon karışımı.

Bileşenler	Hacim	Konsantrasyon/Miktar
5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix	2 µl	1x
Forward Primer (10 pmol/µl)	0.4 µl	0.4 pmol/µl
Reverse Primer (10 pmol/µl)	0.4 µl	0.4 pmol/µl
cDNA (10 ng/µl)	Değişken	Değişken
$MgCl_2$ (25 mM)	Değişken	Değişken
PCR derece su	Değişken	-
Toplam hacim	**10**	-

4.1.7. ÇALIŞMAYA DAHİL OLAN REFERANS GEN VE *SIRTUİN* PRİMERLERİN TASARIMI VEYA SEÇİLMESİ

Bu tez çalışmasında Primer 3 ve NCBI Primer Blast programları ile ilk başta *sirtuin (1-7)* ve *UBC* referans genlerinin primerleri tasarlanmıştır ve OligoAnalyzer programında olasılığı ikincil yapılar (self-dimer, hetero-dimer ve saç tokası) açısından incelenmiştir ve uygun seçilen çift primerler sentez için seçilmiştir. Ayrıca bazı çalışmayan primerler tekrar

tasarlanıp veya önce yayınlanan makalelerden seçilmiştir. Seçilen diziler spesifik bağlantılar için NCBI Blast ve ikincil yapılar için OligoAnalyzer ile analiz edilmiştir. *In Silico* analizlerde uygun olan primerler tekrar sentez için seçilmiştir. Toplam *SIRT1* için 1, *SIRT2* için 2, *SIRT3* için 1, *SIRT4* için 4, *SIRT5* için 2, *SIRT6* için 4 ve *SIR7* için 3 primer seti sentezlenmiştir. Tez çalışmalarında başarılı olan primerlerin bilgileri Çizelge 4.9'da gösterilmiştir. SIRT7 primer için sentezlenen tüm setlerin başarısız olduğu için primer dizisi burada sunulmamıştır. Bu tez çalışması için sentezlenen tüm primer bilgileri ek 2 olarak bulunmaktadır.

Çizelge 4.9. *UBC* ve *sirtuin* için primer dizileri.

Gen	Amplikon uzunluğu (bp)	Primer dizisi (5'→3')
SIRT1*	**119**	**Forward:** GTAGGCGGCTTGATGGTAATC **Reverse:** ACTGCCACAAGAACTAGAGGA
***SIRT2* (358)**	**127**	**Forward:** CAAGCCAACCATCTGTCACTACT **Reverse:** CTCCACCAAGTCCTCCTGTTC
SIRT3**	**101**	**Forward:** CTGCCAAAGACCCTTCCCAGG **Reverse:** CAATGTCGGGCTTCACAACGC
SIRT4**	**86**	**Forward:** ATGCAATCAGACGGTCCCAC Reverse: ACCTGAAAGTCAACGCAAAGC
***SIRT5* (359)**	**115**	**Forward:** TCGTGGTCATCACCCAGAAC Reverse: GCCACAACTCCACAAGAGGTAC
***SIRT6* (360)**	**123**	**Forward:** CTCCTCCGCTTCCTGGTCAG **Reverse:** CGTCTTACACTTGGCACATTC
UBC**	**150**	**Forward:** GATTTGGGTCGCAGTTCTTG **Reverse:** CCTTATCTTGGATCTTTGCCTTG

* Primer3 ve ** NCBI Primer-BLAST programlarla tasarlanan primerler

Genel olarak PCR deneyleri için primer tasarlamasında primerlerin özgünlüğü, uzunluğu, GC yüzdesini içeriği, ileri ve ters primerlerin bağlanma sıcaklıklarının yakın olması, self-dimer, hetero-dimer ve saç takası gibi kinci yapıların olmaması vb. gibi kriterler verimli PCR için önemli noktalardır.

qRT-PCR deneyler için tasarlanan primerler ve daha sonra mevcut literatürlerde bulunan dizilerin seçilmesinde birkaç önemli nokta daha dikkate alınmıştır:

1- Olası DNA kontaminasyondan kaçınmak için tasarlanan primerler ekzon-ekzon birleşimini kapsamalıdır.

2- Tipik olarak, küçük amplikonlar, özellikle FFPE dokular gibi parçalanmış RNA içerdiği için daha başarılı amplifiaksyona izin verir.
3- Belirli bir dokuda hangi izoformların ifade edildiği hakkında bilgimiz olmadığında, tüm transkripti kapsayan bir primerin tasarlanması gerekmektedir.

Güvenilir eş zamanlı kantitatif PCR (qRT-PCR) yorumları, sonuçların stabil referans genlerle internal kontrol olarak normalizasyonuna bağlıdır. Her referans gen, tüm koşullarda kararlı ifade sergilemektedir. Bu nedenle, qRT-PCR ile hedef genin transkript değişikliklerini belirlemek için stabil referans genlerin seçilmesi önemlidir. Farklı literatürlerde B hücreli lenfomalarda ilgili qRT-PCR verilerinin normalizasyonu ve sonuçları doğru bir şekilde yorumlamak için *YWHAZ, UBC, HPRT1, GAPDH, ACTB, B2M* ve *RPL13A* gibi çeşitli referans genler mevcuttur. İlk kez Potashnikova ve ark. 2015'de yaptıkları çalışmalarında, VBA (Visual Basic for Ap plications) uygulamaları geNorm, BestKeeper ve NormFinder'ın tüm önemli stabilite sıralama algoritmalarını karşılaştırmışlar (361). Bu aday referans genler heterojen ve taze klinik lenfoid örnekleri üzerinde denemişler. Sonuçta seçtikleri aday genlerin içinde *YWHAZ, UBC* and *ACTB* genleri bu dokularda güçlü ve en az değişen aday olarak tanımlamış ve önermişler. Bu çalışmaya göre ve diğer literatürlerde de lenfoid dokularda *UBC* geni geniş ölçüde referans geni olarak kullanıldığı için bu tez çalışmasında da bu gen seçilmiştir.

4.1.8. qRT-PCR REAKSİYONLARI İÇİN PRİMERLERİN ÇALIŞMA ŞARTLARININ İNCELENMESİ

Çalışmamıza dahil olan *SIRT1-7* ve qRT-PCR reaksiyonlarından elde edilecek verilerin normalizasyonu için uygulanan *UBC* primerlerin çalışama koşullarını belirlemek için öncelikle bu primerlerin optimizayon deneyleri planlanmıştır. Bu primerlerin hangi bağlanma sıcaklıklarında çalıştıkları ve gerektiğinde $MgCl_2$'inin hangi konsantrasyonda eklenmesi bu deneyler ile tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda her primer seti için 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 ve 3 mM konsantrasyonlarında $MgCl_2$ titrasyonu yapılarak uygun konsantrasyon tespit edilmiştir. Gradiant PCR yaklaşımı 50 ve 60 derceler arasında uygulanmıştır.

Bu deneyler için uygulanan reaksiyon karışımı Çizelge 4. 8'deki gibidir. Gradiant PCR deneyleri BioRad ısı döngüsü cihazında yapılmıştır. Başarılı sonuçları tekrar değerlendirmek

için qRT-PCR reaksiyonları Roche LightCycler® 480 platformunda Çizelge 4.10'deki gibi kurulmuştur. Elde edilen PCR sonuçlarını incelemek için, PCR ürünleri %2 agaroz jelde yürütülmüştür.

Çizelge 4.10. Roche LC 480 cihazında uygulanan sıcaklık döngüsü.

Program	Sıcaklık	Acquisition mode	Süre	Ramp rate	Döngü	Analiz mode
Initial activation	95^0C	None	12 dakika	4.8	1	None
Denaturation	95^0C	None	15 saniye	4.8	45	Quantification
Annealing	50^0C-60^0C	None	20-30 saniye	2.5		
Elongation	72^0C	Single	20 saniye	4.8		
Melting Curve	95^0C	None	5 saniye	4.8	1	Melting curve
	65^0C	None	1 dakika	2.5		
	97^0C	Continuous	-	0.11		
Cooling	40^0C	None	10 saniye	2.5	1	None

Ana reaksiyonları kurulmadan önce her primer seti için rastgele yaklaşık 10 örnek üzerinde denem reaksiyonlar kurulmuştur. Böylece son kontroller yapılmıştır.

4.1.9. KANTİTATİF GERÇEK ZAMANLI PCR REAKSİYONLARI VE ANALİZLERİ

Gerçek zamanlı PCR, hücrelerdeki gen ifadesin nispi veya toplam kopya sayısını belirlemektedir. Bu teknik her PCR döngüsünden sonra ürün sinyallerini kaydeder ve bu nedenle amplifikasyon platosundan önce analiz yapılmasını sağlar. *Sirtuin* genlerin ifadelerinin ölçülmesi ve qRT-PCR gerçekleştirmek için Roche LightCycler 480 platformu kullanılmıştır. Deneyler için bu cihaza uyumlu olan 384-well plate'ler uygulanmıştır. Reaksiyonlar 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix (Katalog No. 08-36-00001) ile kurulmuştur. Bu tez çalışmasında literatürlere göre *UBC*, referans geni olarak normalizasyon için uygun görünüp ve seçilmiştir.

Her reaksiyon plate'i önce üç teknik tekrar olacak şekilde 2 µl cDNA örneklerle hazırlanmıştır. Seal ile iyice kapattıktan sonra Beckman Allegra X-12 santrifüj cihazında önce 1500 rpm'de 2 dk santrifüj edilip hemen -20°C dolabına kaldırılmıştır. Deney aşamasında Çizelge 4. 8'de bulunan karışım (cDNA hariç) önce laminar kabin altında hazırlanıp, kabin dışında -20°C'den çıkarılan ve cDNA içeren plate'lere dağıtılmıştır. -20°C'den çıkarılan ve cDNA içeren plate'ler karışım dağıtılmadan önce örneklerin

kuyucuklara inmesi için santrifüj edilmiştir. Her cDNA içeren kuyucuğun üzerine Eppendorf Repeater Plus pipet yardımıyla 8 µl hacimlerde eklenmiştir. Plate yeni bir seal ile iyice kapatılıp ve 1500 rpm'de 2 dk santrifüj edilmiştir. Akabinde plate Roche LightCycler 480 cihazına yerleştirilmiş ve bu sistemin protokolü uygulanmıştır (Çizelge 4.10).

PCR reaksiyonu çalıştıktan sonra cihaz okumayı başlatır ve veriler C_T (threshold cycle) veya Cp (crossing point) değeri olarak saptanır. qRT-PCR veri analizinin değerlendirilmesi ve gruplar arasında kat değişimin karşılaştırması için bu tez çalışmasında Livak veya $2^{-\Delta\Delta C_T}$ yöntemi kullanılmıştır (362). Bu yöntemde referans genin C_T değeri, hedef genin C_T değerinden çıkarılarak ΔC_T değeri elde edilir. Böylece değerler normalize olur. Kontrol örneklerin ortalama ΔC_T değeri kalibratör olarak hedef genin her bir örneğinden çıkarılır ve $\Delta\Delta C_T$ değerleri tüm örnekler için elde edilir. Bu değerin negatif değeri ($-\Delta\Delta C_T$), denklemde 2'nin üssü olarak kullanılır ve kontrol grubuna göre hedef genin kat değişimini temsil eder:

$\Delta C_T = C_T$ (hedef gen) $- C_T$ (referans gen)

$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ (hasta örneği) $- \Delta C_T$ (kalibratör)

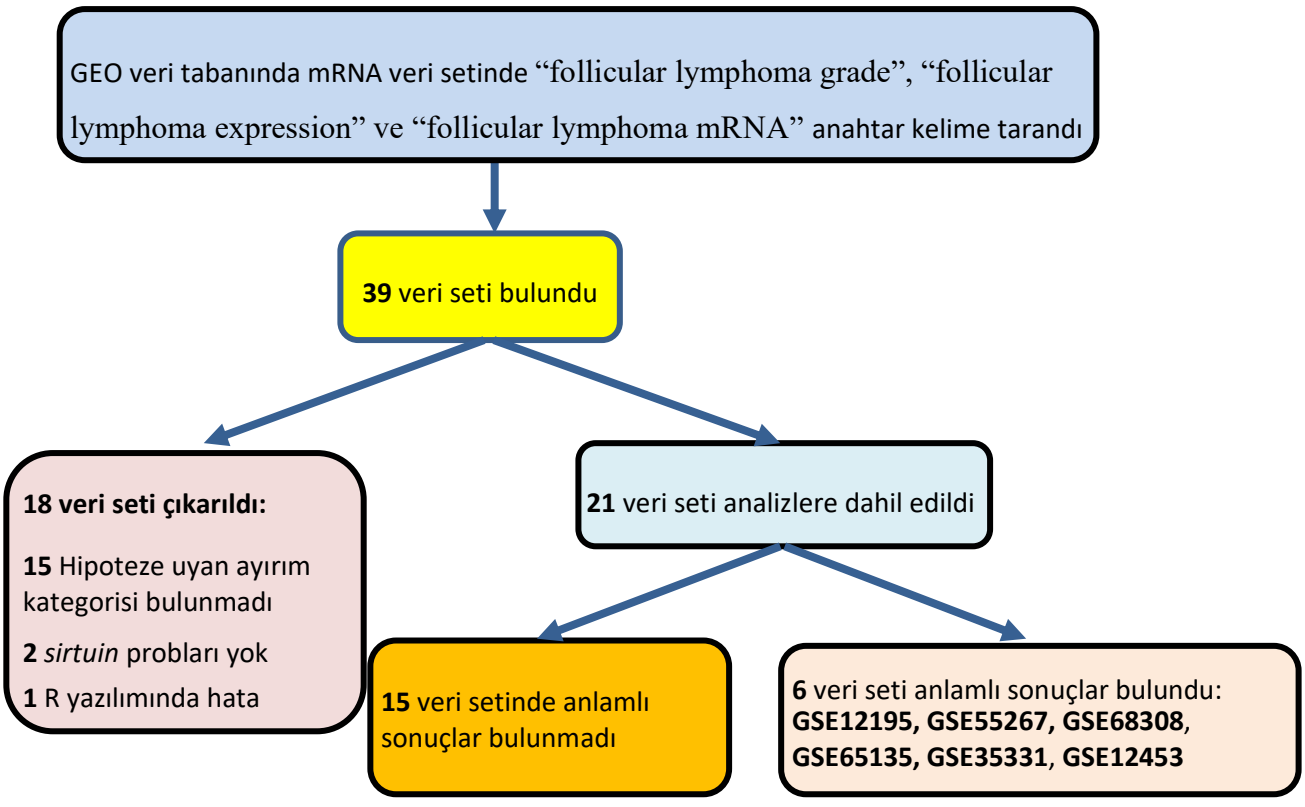
Kat değişimi= $2^{-\Delta\Delta Ct}$

4.1.10. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Araştırmada elde edilen tüm verilerin istatistiksel analizleri, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı araştırma görevlisi Ebru Dumlupınar'ın desteğiyle yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler; nicel değişkenler için normal dağılıma uygunluk durumuna göre ortalama ± standart sapma veya ortanca (minimum-maksimum), nitel değişkenler için ise frekans (yüzde) olarak sunuldu. Gen ekspresyon seviyeleri ve Ki-67 değişkenleri normal dağılım varsayımına göre Mann Whitney-U testi ve Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi. Gen ekspresyon seviyeleri ile BCL2 ve CD10 arasındaki ilişki Nokta Çift Serili Korelasyon katsayısı ile gen ekspresyon seviyelerinin aralarındaki ilişki ise Spearman Korelasyon katsayısı ile değerlendirilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi 0.05 olarak kabul edilip analizlerin gerçekleştirilmesinde Statistical Package for Social Sciences (SPSS, Versiyon 15.0, Chicago, IL.) kullanılmıştır.

4.2. İN SİLİCO ANALİZLER

Elde edilen qRT-PCR sonuçların doğrulamak için farklı çalışmalardan elde edilen ve daha geniş veri setlerinde meta-analiz planlanmıştır. Bunun için Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezinde (NCBI) bulunan Gene Expression Omnibus (GEO) veri tabanından (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) bu çalışmamıza uygun olan mikrodizin (mRNA) verileri çekilmiştir. GEO veri tabanından arama yapılırken "follicular lymphoma grade", "follicular lymphoma expression" ve "follicular lymphoma mRNA" gibi anahtara kelimeler kullanılmıştır. Bu konularla ilgili toplam 39 GEO veri seti seçilmiştir. Veri seçim iş akışı şekil 4.1'de sunulmuştur. Bu veri setlerindeki uygulanan biyolojik materyallerinin çoğu taze donmuş doku ve bir sette parafin kesitleri olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bazı deneylerde dokulardan manyetik etkin hücre sıralama (Magnetic-activated cell sorting-MACS) yöntemiyle spesifik markerleri ifade eden hücreler ayırt edilmiştir. Seçilen veri setlerinde farklı kriterler göz önüne alınmıştır (hasta ve kontrol, grade'ler dağılımı, sınırlı ve ileri evre, FLIPI skorları, nüks ve transform durumu vb.). Kriterlerimize göre 18 veri seti analiz dışı bırakılmıştır. Bunlardan 15 sette FL vakaların içinde homojen grupları ayıran parametreler bulunmamıştır. Örneğin bu setlerde FL vakaları diğer kanserlerle kontrol grupları olmadan kıyaslanmıştır. Bazı setlerde de FL vakaları için klinik veriler sunulmamıştır. 2 sette uygulanan platformalar'da *sirtuin* genlerinin probları bulunmamıştır. 1 sette de analiz esnasında çözülmeyen hata karşıya çıkmıştır.



Şekil 4.1. FL mikrodizin setlerinin seçim akış şeması.

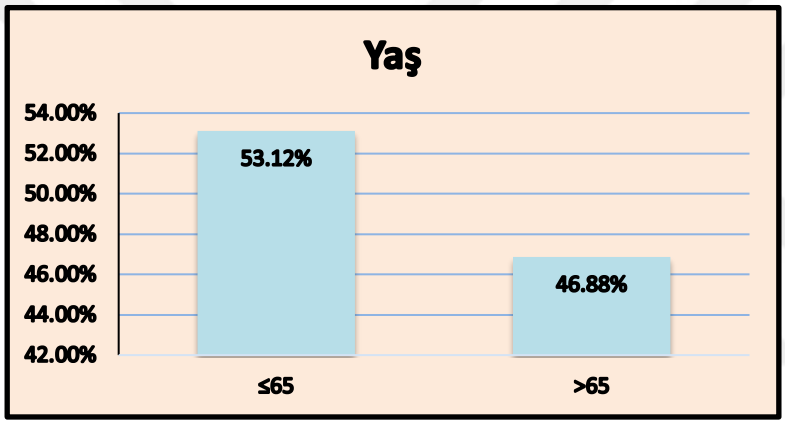
Seçilen gruplar arasındaki farklı gen ifadesi belirlemek için gen ekspresyon profili (GEP) analizleri yapılmıştır. Tüm istatistiksel analizleri R programı dilinde RStudio platformunda yapılmıştır (http://www.r-project.org/). Teknik farkları elemine etmek için quantile normalizasyon yöntemi uygulanmıştır. Analizler sonucunda gruplar arasındaki *sirtuin* genlerin ifade değişiklikleri t test ile incelenmiştir. log2 kat değişimi>|0.5| olanlar ve Benjamini ve Hochberg metoduna göre FDR-adj.P.Val<0.05 olan mRNA'ların diferansiyel eksprese oldukları kabul edilmiştir. Bu çalışmada birinci tür hatanın kontrolü için Parametrik p-değeri yerine Benjamini ve Hochberg tarafından önerilen yanlış bulgu oranı (False Discovery Rate-FDR) yaklaşımı adj.P değeri olarak uygulanmıştır.

5. ARAŞTIRMA BULGULARI

5.1. DEMOGRAFİK VE KLİNİKOPATOLOJİK BULGULAR

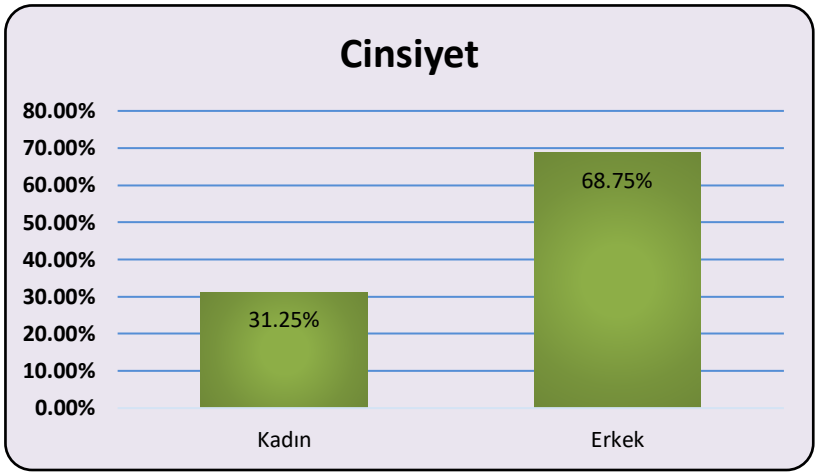
5.1.1. YAŞ VE CİNSİYET

Bu çalışmaya foliküler lenfoma tanısı alan 32 hastaya ait biyopsi örnekleri ile reaktif değişiklikler gösteren lenf nodülü özelliğinde10 kontrol vakası dahil edilmiştir. Çalışmamıza dahil edilen 32 hastanın yaş dağılımı 30-81 arasında olup ve medyan yaş 60'dır. DSÖ'ne göre FL olguların 6. dekatta en sık görüldüğü dikkate alınarak hastalar istatistik analizlerde <65 ve ≥65 yaş olarak iki gruba ayrılmıştır. Buna göre hastaların toplamda %53.12'si (n=17) 65 yaş altı olup; %46.88'i (n=15) 65 yaş veya üstü yaştır (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. FL Olguların yaş dağılımı

Cinsiyet bakımından olguların %31.25'i (n=10) kadın ve %68.75'i (n=22) erkektir (Şekil 5. 2).

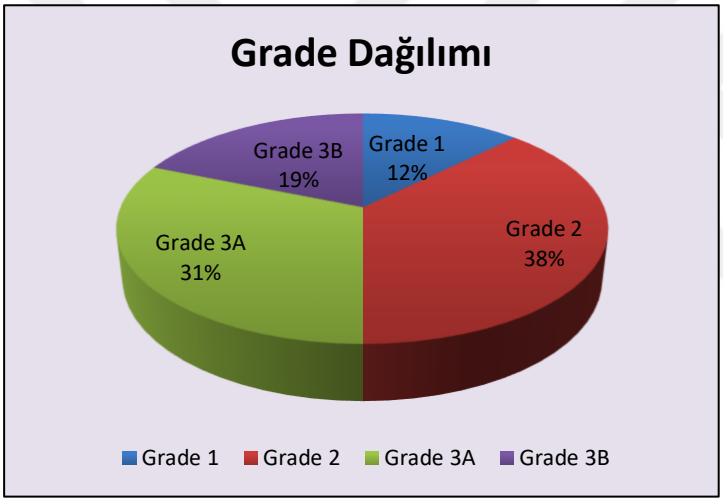


Şekil 5.2. FL olgularının cinsiyet dağılımı

Kontrol grubunun (n=10) yaş dağılımına baktığımızda olguların yaş medyanı 37.5(5-64)'dir. Kontrol grubunda cinsiyet bakımından olguların %30'unu (n=3) kadın ve %70'ini (n=7) erkek oluşturur.

5.1.2. KLİNİKOPATOLOJİK BULGULAR

Histolojik olarak olguların %12.5'i (n=4) grade 1, %37.5'i (n=12) grade 2, %31.25'i (n=10) grade 3A ve 18.75'i (n=6) grade 3B'dir. FL grade 3A histolojik olarak FL1 ve FL2'ye daha çok benzerken, grade 3B foliküler lenfoma daha değişken immünofenotipik ve genetik özelliklere sahiptir. Bu nedenle istatistiksel analizlerde grade 1, 2 ve 3A olgular 'düşük dereceli' ve grade 3B olgular 'yüksek dereceli' olmak üzere olgular histolojik dereceye göre iki gruba ayrılmıştır. Buna göre olguların %81.25'i (n=26) düşük dereceli, %18.75'i (n=6) yüksek dereceli grupta yer almıştır (Şekil 5.3).



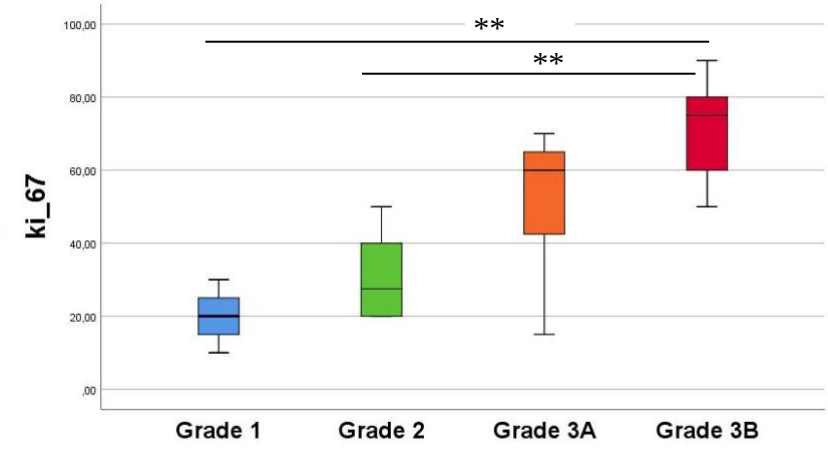
Şekil 5.3. FL olguların histolojik grade dağılımı

Ki-67 proliferasyon indeksi 26 hastada değerlendirilmiştir, buna göre hastaların Ki-67 indeksinin medyanı %45 (10-90) saptanmıştır. Ki-67 proliferasyon indeksi bakımından histolojik grade'ler arasında grup analiz (Kruskal-Wallis) yapılmıştır ve istatistiksel açıdan anlamlı farklılık ortaya çıkmıştır (p=0.001). Grade'ler arası ikili karşılaştırmaların sonucunda Ki-67 indeksi (Mann Whitney-U) grade 1 ve grade 3B arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p=0.004). Ayrıca grade 2 ve grade 3B arasında da istatistiksel açıdan anlamlı fark (p=0.012) saptanmıştır (Çizelge 5.1) (Şekil 5.4)

Çizelge 5.1. FL olguların histolojik grade'lerine göre Ki-67 proliferasyon indeksleri.

Grade	1	2	3A	3B	P değeri
Med (Min, max)	20 (10, 30)[a]	27.5 (20, 50)[a]	60 (15, 70)[ab]	75 (50, 90)[b]	**0.001**

a, b, ab: Farklı harflendirmeler, gruplar arası farklılıkları ifade etmektedir



Şekil 5.4. Olguların histolojik derecelerine göre Ki-67 proliferasyon indeksi.

Hastaların FLIPI prognostik skorlarının değerlendirmesinde 13 vaka (%54.17) düşük risk (0-1), 5 vaka (%20.83) orta risk (2) ve 6 vaka (%25) yüksek risk gruplarında yer almıştır. Klinik olarak 6 vakanın (%24) evre 1, 6 vakanın (%24) evre 2, 5 vakanın (%20) evre 3 ve 8 vakanın (%32) evre 4 olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmada 7 hastada (29.17) gece terlemesi, ateş, kilo kaybı gibi B semptomları görülürken 17 hastada (70.83) bu semptomlar saptanmamıştır. Grade 3A tanısı alan hastaların 2'si ve grade 3B hastaların 1'i ve toplam 3 hastada Diffüz Büyük B hücreli lenfoma (DBBHL) transformasyonu görülmüştür (%15.79). Grade 2 hastaların 2'si ve 3A hastaların 2'si ve toplam 4 hastada nüks ortaya çıkmıştır (%19.5). Kemik iliği tutulum durumu incelendiğinde 10 hastada (%68.75) saptanmış olup ve 22 hastada (%31.25) kemik iliği tutulumu görülmemiştir.

Germinal merkez belirteci olan BCL2 ifadesine bakıldığında, 5 vaka haricinde (%15.62) diğer 27 vakada (%84.38) bu proteinin ifadesi gözlenmiştir. Germinal merkezin diğer prognostik belirteci olan BCL6'n ifadesi tüm vakalarda saptanmıştır. CD10 germimal merkezlerde ifade olan tanısal bir diğer belirteçtir. Bu belirtecin ifadesi 23 vakada (%76.67) görülürken 7 vakada (%23.33) ifadesi gözlenmemiştir (Çizelge 5.2).

Çizelge 5.2. FL olguların klinikopatolojik özellikleri.

Klinik Özellikler		**Olgular**
Yaş (n=32)	<65 ≥65	%53.12 %46.88
Cinsiyet (n=32)	Kadın Erkek	%31.25 %68.75
Histolojik grade (n=32)	Düşük dereceli (1, 2 ve 3A) Yüksek dereceli (3B)	%81.25 %18.75
FLIPI (n=24)	Düşük risk (0-1) Orat risk (2) Yüksek risk (3-5)	%54.17 %20.83 %25
Evre (n=25)	Sınırlı Evre (1-2) İleri Evre (3-4)	%48 %52
Ki-67 (n=26)	<40 ≥40	%40 %60
B Semptom (n=24)	Var Yok	%29.17 %70.83
DBBHL transformasyon (n=19)	Var Yok	%15.79 %84.21
Nüks (n=21)	Var Yok	%19.5 %80.95
Kİ Tutulumu (n=32)	Var Yok	%68.75 %31.25
BCL2 (n=32)	Pozitif Negatif	%84.38 %15.62
BCL6 (n=31)	Pozitif	%100
CD10 (n=30)	Pozitif Negatif	%76.67 %23.33

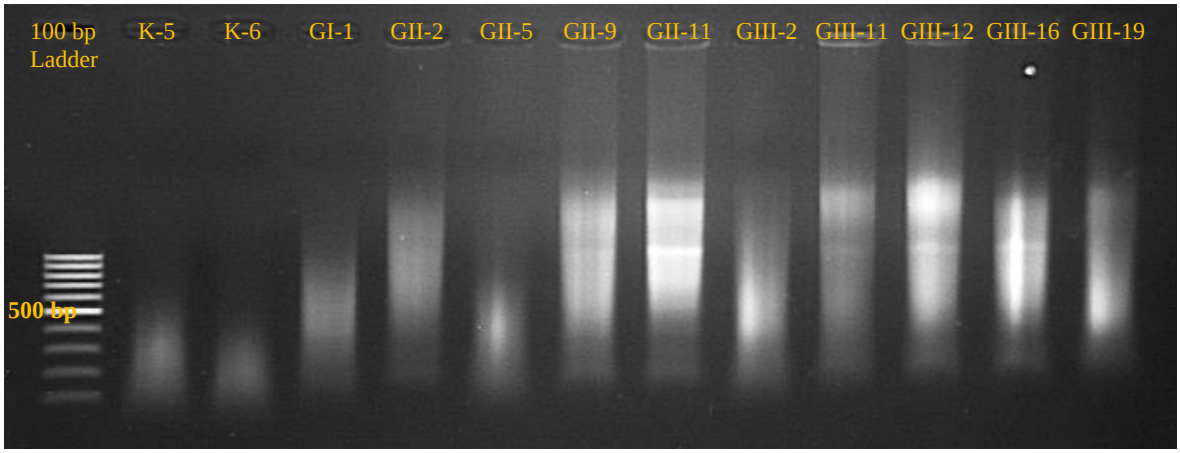
5.2. İZOLE EDİLEN RNA'LARIN NİTELİK VE NİCELİK SONUÇLARI

5.2.1. İZOLE EDİLEN RNA'LARIN MİKTARI

Tez çalışmasında Qiagen FFPE RNeasy izolasyon kiti ile kontrol vakalar dahil olmak üzere toplam 42 FFPE dokudan RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Thermo Scientific NanoDropTM 1000 aracılığıyla izole edilen RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrik olarak değerlendirilip ve ölçülmüştür. Cihazdan elde edilen 260/280 ve 260/230 değerler ve RNA'ların konsantrasyonu deneyler için uygun görünmüştür. RNA örneklerin izolasyon sonuçları ek 3 olarak tezin ekler bölümünde verilmiştir.

5.2.2. RNA'LARIN AGAROZ JEL ELEKTROFOREZ SONUÇLARI

İzole edilen total RNA'ların, kalite değerlendirmeleri için denatüre edici agaroz jel elektroforezi kullanılarak incelenmiştir. %1 agaroz jelden elde edilen birkaç örneğin görüntüler Şekil 5.5'de sunulmuştur. Toplam RNA'nın bütünlüğünü değerlendirmek için kullanılan en yaygın yöntem, agaroz jel elktroforez yöntemidir. Ancak formalin fiksasyonu yapılıp parafine gömülü dokularından (FFPE) örneklerden izole olan RNA'ların fragmente oldukları için net 28S ve 18S rRNA bantların jelde görüntülemesi beklentiden uzaktır. FFPE dokularından elde edilen RNA kalitesi, esas olarak doku örneğinin kalitesi (rezeksiyon ile etkili fiksasyon arasındaki süre), saklama süresi ve parafin bloklarının saklama koşullarına bağlıdır.



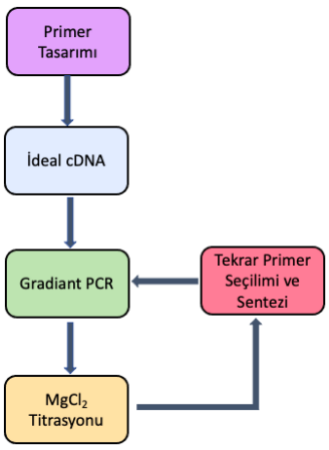
Şekil 5.5. İzole edilen bazı RNA'ların jel görüntüsü.

5.3. cDNA KİTİN OPTİMİZASYON DENEYLERİNİN SONUÇLARI

Çalışmamızda cDNA sentezi için kullanılan smART First Strand cDNA Synthesis kit protokolünde ters transkripsiyon aşamasında 50°C için 20-50 dk inkübasyon zamanı bulunmaktadır. 20-50 dakikalar arasında olan inkübasyon zamanın hangisi uygun olduğuna kara vermek için *B2M* primer ile konvansiyonel PCR yapılmıştır. Bu sonuçların daha uygun değerlendirmesi için FFPE dokudan izole olan ve Roche First Strand cDNA Synthesis Kiti ile sentezlenen bir cDNA örneği pozitif kontrol olarak da dahil edilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri %2'lik agaroz jelinde yürütülmüş ve jel görüntüsüne göre 30 dk inkübasyonda protokolün daha başarılı olduğuna karar verilmiştir (Jel görüntüsü sunulmamıştır).

5.4. OPTİMİZASYON SÜREÇLERİ

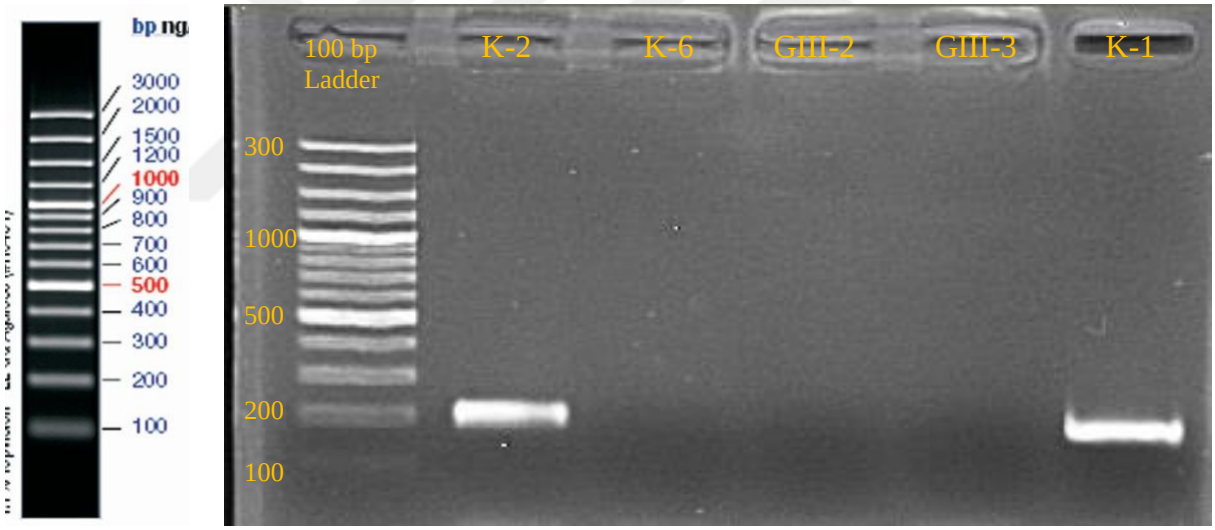
Bu tez araştırmasında FFPE dokuların üzerinde çalışıldığı ve önce optimize olmayan genler uygulandığı için bir sürü sıkıntılar yaşanmıştır. Bu sıkıntılar bazı örneklerin reaksiyonlara girilmediği ve çalışmamızda dahil olan primerlerin çalışma şartlarıyla ilgili karşılaşan çelişkilerdir. Bu sıkıntıları aşmak için bir sürü optimizasyon denemeler Prof. Dr. Hilal Özdağ Sevgili yardımıyla yapılmıştır. Bu deneylerin en başında bazı örneklerin üzerinde yapılan deneyler başarılı bulunmamıştır. Bu yüzden en başta optimum cDNA miktarı belirlenmesi amaçlanmıştır. Artı bazı primerlerin reaksiyonlarında gerektiğinde $MgCl_2$ eklenmiştir. Ayrıca primerlerin olasılığı bağlanma sıcaklıkların ortaya koyması için gradiant PCR yöntemi uygulanmıştır. Yine bunlara rağmen bazı primerler için başarılı sonuçlar elde edilmemiştir. Bu yüzden farklı primerler sentezlenip ve primer optimizasyon aşamaları tekrarlanmıştır (Şekil 5.6).



Şekil 5.6. Optimizasyon süreçlerindeki işlem basamakları.

5.4.1. SICAKLIK DÖNGÜSÜ İLE SENTEZLENEN cDNA'LERİN DEĞERLENDİRMESİ

Formalinin nükleik asitlerin, özellikle RNA'nın yapısının değiştirdiği bilinmektedir. Bu nedenle, FFPE dokulardan izole edilen RNA'ların düşük kalitede oldukları düşünülmektedir. Bu yüzden bu dokulardan deneylerde başarılı sonuçların elde etme amacıyla birkaç cDNA örneği üzerinde normal şartlarda deneme reaksiyonlar yapılmıştır ve sonuçlar incelenmiştir. Bu çalışma kapsamında elde edilen kontrol ve hasta vakalarına ait olan birkaç cDNA'lardan 10 ng miktarında konvansiyonel PCR yapılmıştır ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Referans genin dokularda her zaman ifadesinin beklendiği için bu reaksiyon *UBC* primer ile kurulmuştur. Bu deney 3 kontrol (K-2-6-1) ve iki hasta (GIII-2-6) cDNA üzerinde yapılmıştır. PCR ürünlerin %2 agaroz jelde 100 V'taki görüntüsü şekil 5. 7'deki gibidir. Sonuçlara göre sadece iki örnek (K-2 ve K-1) reaksiyona girmiştir. Kurulan bu reaksiyonda sonuçları cDNA'in 10 ng miktarının yeterli olmadığını ortaya koymuştur.



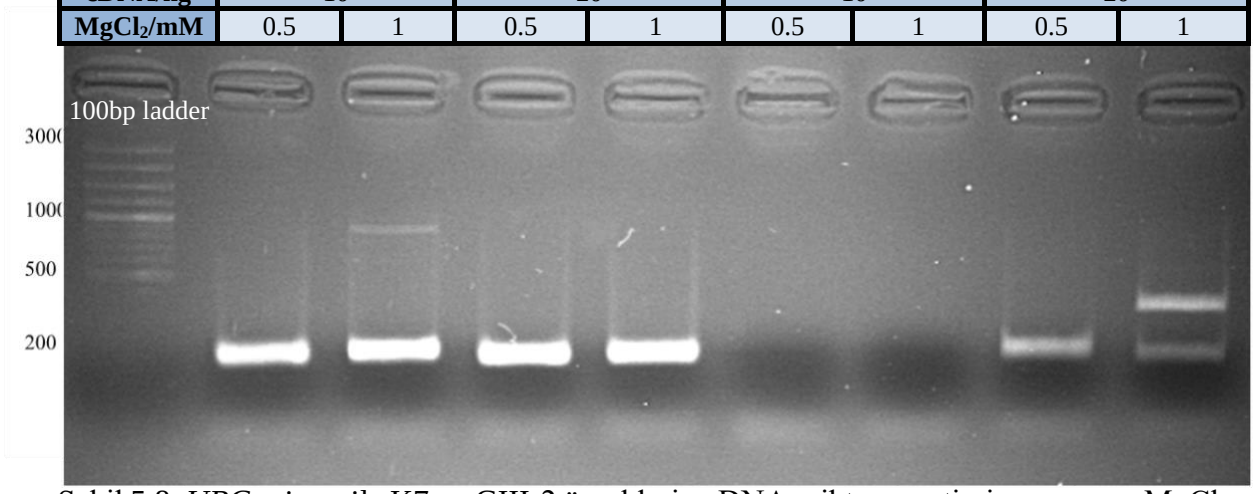
Şekil 5.7. 10 ng cDNA ve *UBC* primer ile ile qRT-PCR ürünlerinin elektroforez jel görüntüsü.

5.4.2. CDNA GİRİŞ MİKTARI VE $MGCL_2$ KONSANTRASYONU OPTİMİZASYON SONUÇLARI

Kalıp DNA, primer ve magnezyum iyonu polimeraz zincir reaksiyonu etkileyen en önemli bileşenlerdendir. Zayıf ve özgün olamayan amplifikasyonlardan kaçınmak için gereken optimum miktarlar, konsantrasyonlar ve şartların ayarlanması gerekmektedir.

Çalışmamızda uygulanan EvaGreen Mix'te 12.5 mM konsantrasyonunda, $MgCl_2$ bulunmaktadır. 10 µl reaksiyon karışımının hazırlandığında, 2 µl bu mix'ten alarak ve toplam elde ettiğimiz 1x reaksiyonda bu konsantrasyon 2.5 mM'a düşmektedir. Çalışmayan veya zor çalışan reaksiyonların çalıştırılması amacıyla kullandığımız EVAGreen mix'te bulunduğu Mg^{+2} iyonlarına ilave ek Mg^{+2} iyonları farklı konsantrasyonlarda reaksiyon karışımına eklenmesi planlanmıştır. Bu bağlamda *UBC* primer ile bir önceki deneyde reaksiyona giren K-2 ve çalışmayan GIII-2 örneklerle farklı konsantrasyonlarda $MgCl_2$ (0.5-1 mM) eklenerek konvansiyonel PCR yapılmıştır. Ayrıca cDNA en uygun giriş miktarının belirlemesi için 10 v 20 ng miktarlarında bu reaksiyon kurulmuştur. Yapılan PCR'ın jel görüntüsü Şekil 5.8'te bulunmaktadır. Jel görüntüsüne göre bir önceki deneyde reaksiyona girmeyen GIII-2 örneği 20 ng miktarda her iki 0.5 ve 1 mM $MgCl_2$ konsantrasyonunda amplifikasyon oluşurken 10 ng miktarında reaksiyona girmemiştir. K-7 örneği tüm koşullarda çalışmıştır.

	K-2				GIII-2			
cDNA/ng	10		20		10		20	
$MgCl_2$/mM	0.5	1	0.5	1	0.5	1	0.5	1



Şekil 5.8. *UBC* primer ile K7 ve GIII-2 örneklerin cDNA miktarın optimizasyonu ve $MgCl_2$ titrasyonu sonuçları.

Elde edilen sonuçlara göre 20 ng cDNA ile deneylerde $MgCl_2$ tititarsyonu yapılarak her primer seti için bu bileşenin hangi konsantrasyonun uygun olacağına karar verilmesi amaçlanmıştır.

5.4.3. SENTEZLENEN PRİMERLERİN OPTİMİZASYON SONUÇLARI

Tüm primer çiftler için başlangıçta qRT-PCR yapmadan önce gradiant PCR yapılmıştır ve $MgCl_2$ titrasyonuyla beraber olası bağlanma sıcaklıkları (Ta) tespit edilmiştir. Başarılı sonuçları tekrar incelemek için qRT-PCR cihazında optimizasyon deneyenleri her çift

primer için önce ortaya koyulmuş şartlara göre yapılmıştır. En başta tasarladığımız ve sentezlenen primerlerden *SIRT1*, *2* ve *3* primerleri optimizasyon deneylerde başarılı olarak çalışmıştır. Diğer primerler için farklı aşamalarda tekrar primer dizileri seçilmiş ve sentezlenmiştir. Yeni diziler üzerinde deneyler devam edilmiştir. *SIRT7* primer setleri hariç tüm primerler için en uygun şartlarda çalışan primer çiftleri optimizasyon çalımların sonucunda tespit edilmiş olup ve ana reaksiyonlara dahil edilmiştir. Optimizasyon deneyleri sonucunda her primer çiftin bağlanma sıcaklığı ve gerektiğinde eklenen en uygun $MgCl_2$ konsantrasyonu Çizelge 5.3'de sunulmuştur.

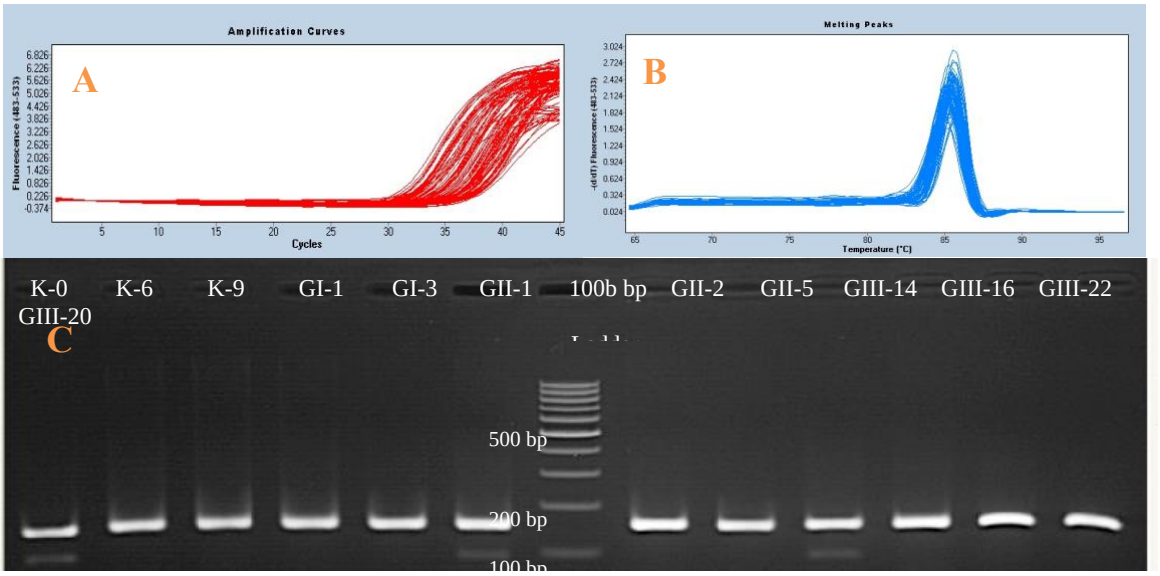
Çizelge 5.3. Optimizasyon deneyleri sonucunda elde edilen primerlerin çalışma şartları.

Primer	Bağlanma sıcaklık	$MgCl_2$/mM
UBC	55°C	0.5
SIRT1	55°C	3
SIRT2	50°C	1.5
SIRT3	60°C	0.5
SIRT4	57°C	0.5
SIRT5	50°C	0.5
SIRT6	50°C	0

5.5. EŞ ZAMANLI KANTİTATİF POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU İLE (qRT-PCR) *SIRTUIN* GENLERİNDE İFADE İNCELENMESİ

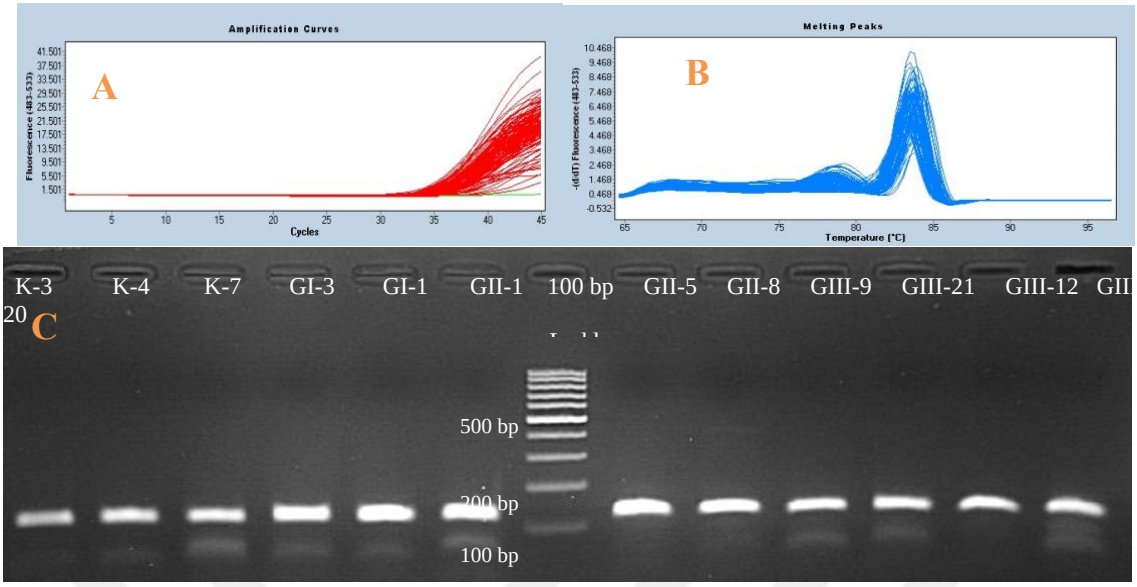
10 kontrol ve 32 FL vakalarından izole edilmiş ve cDNA sentezlenen FFPE dokuların üzerinde *SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3*, *SIRT4*, *SIRT5*, *SIRT6* ve *UBC* genlerin qRT-PCR reaksiyonları her primer setin optimize olmuş şartlarına göre Roche LightCycler 480 platformunda gerçekleştirilmiştir. Her gene ait olan primerlerin amplifikasyon sonuçları değerlendirilmiştir. Bu kapsamda elde edilen amplifikasyon eğrileri, erime eğrileri ve pikleri dikkate alınmıştır. Ayrıca her reaksiyondan rastgele birkaç örnek %2 agaroz jelde yürütülmüştür.

Tez çalışmamızda *UBC* geni referans geni olarak B hücreli lenfomalarda daha spesifik uygulandığı için kullanılmıştır. 55°C bağlanma sıcaklığında ve 0.5 mM $MgCl_2$ ilave etmesiyle beraber en iyi sonuç bu primer için belirlenmiştir. Bu genin Şekil 5.9'da bulunan sonuçlarına göre 150 baz çiftlik spesifik ürünü oluşturulmuştur.



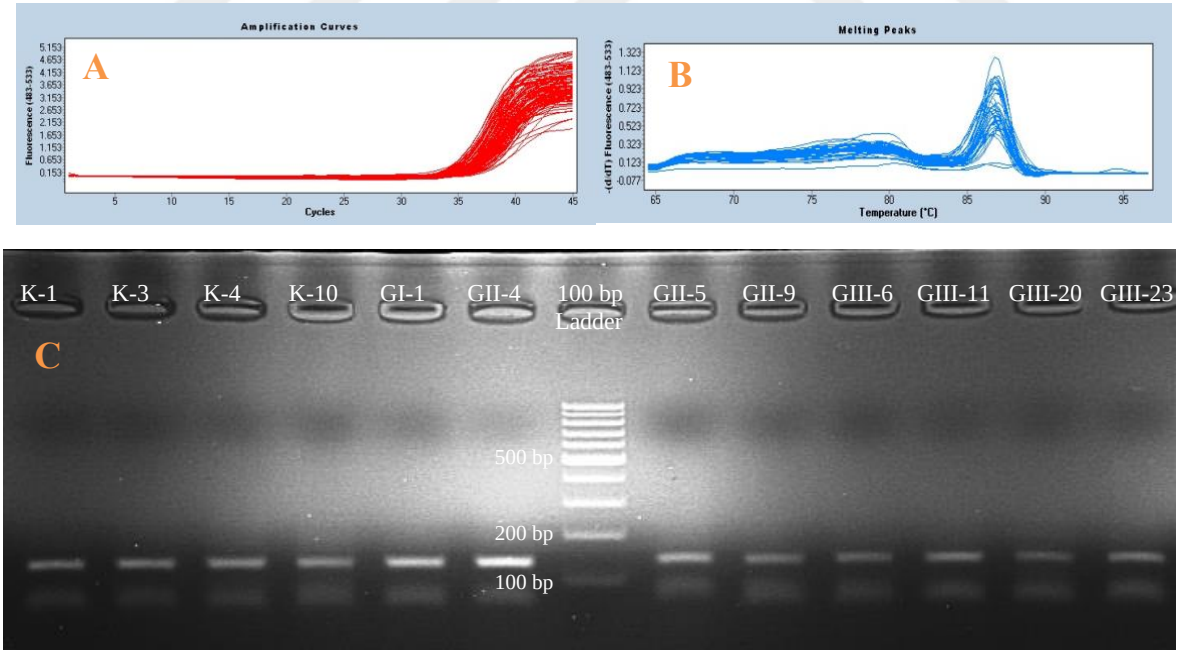
Şekil 5.9. *UBC* genin qRT-PCR sonuçları: **A**- Amplifikasyon eğrisi; **B**- Erime pikleri; **C**- Agaroz jel görüntüsü.

SIRT1 primeri için 55^0C bağlanma sıcaklığında ve 3 mM $MgCl_2$ konsantrasyonunda qRT-PCR reaksiyonu kurulmuştur. Erime pikleri ve agaroz jel görüntüsü bu primerin başarılı bir şekilde 119 bp'lik amplifikasyonun göstermektedir (Şekil 5.10).



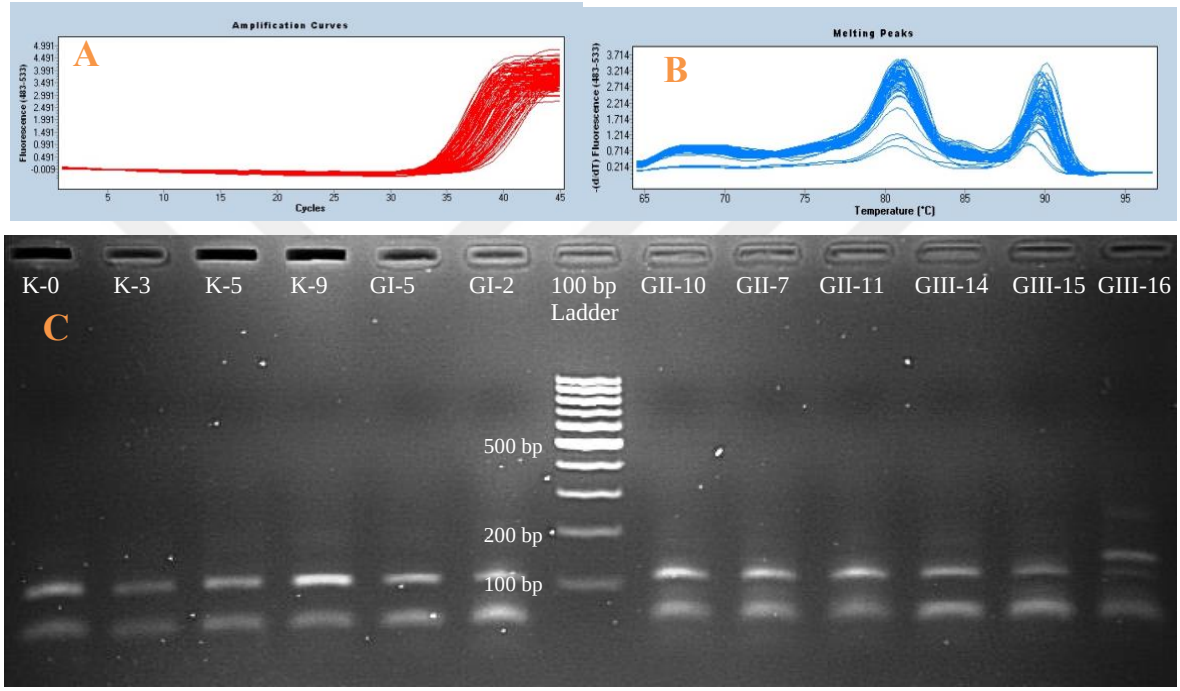
Şekil 5.10. *SIRT1* genin qRT-PCR sonuçları: **A**- Amplifikasyon eğrisi; **B**- Erime pikleri; **C**- Agaroz jel görüntüsü.

SIRT2 primer setin ortaya çıkan çalışma koşullarına göre 50^0C'de ve 1.5 mM konsantrasyonlarında $MgCl_2$ ekleyerek eş zamanlı PCR reaksiyonu yapılmıştır. Şekil 5.11'de bulunan sonuçlara göre bu primer 127 bp'lik ürün oluşturmuştur.



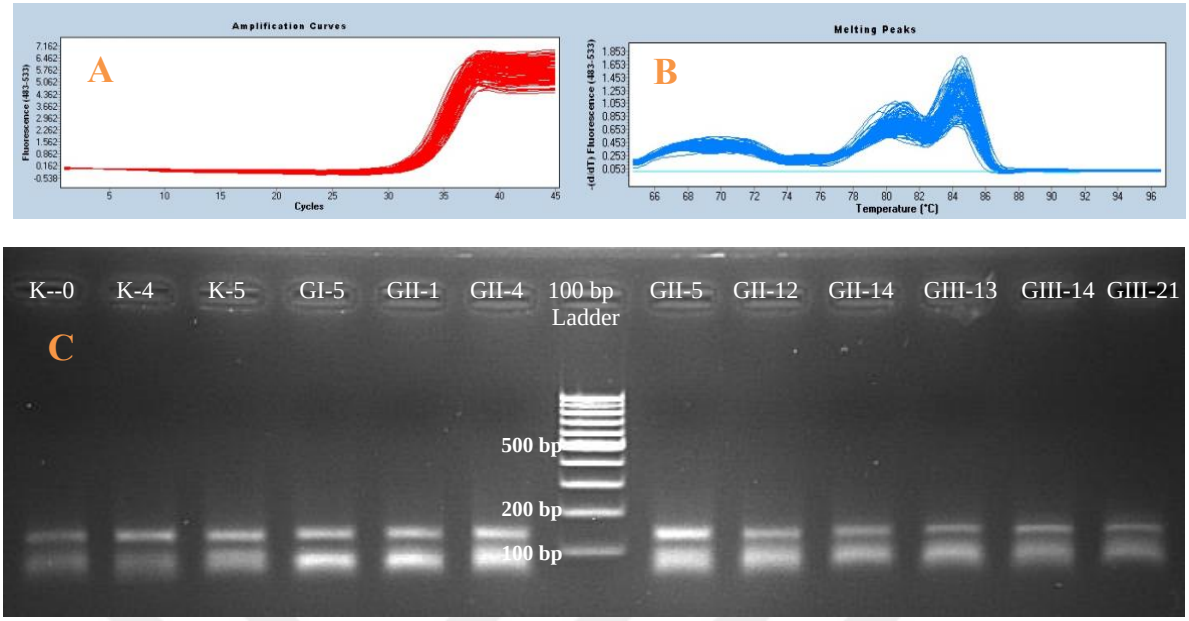
Şekil 5.11. *SIRT2* genin qRT-PCR sonuçları: **A**- Amplifikasyon eğrisi; **B**- Erime pikleri; **C**- Agaroz jel görüntüsü.

SIRT3 primerin optimizasyon deneylerin sonuçlarına göre bu primer 60^0C sıcaklıkta ve 0.5 mM $MgCl_2$ ilave ederek daha verimli sonuçlar elde etmiştir. Bu şartlarda yapılan reaksiyonun jel görüntüsü 101 çift bazlık PCR ürün ve spesifik amplifikasyonu ortaya koymaktadır (Şekil 5.12). *In silico* analizlerinde bu primerin düşük ikinci yapıların oluşturduğunu gösterildiğine rağmen primer dimer yapısı bu reaksiyonda gözükmektedir. Bu bimodal piklerin oluşum nedeni hedef bölgenin GC'den zengin olduğundan düşünülmektedir.



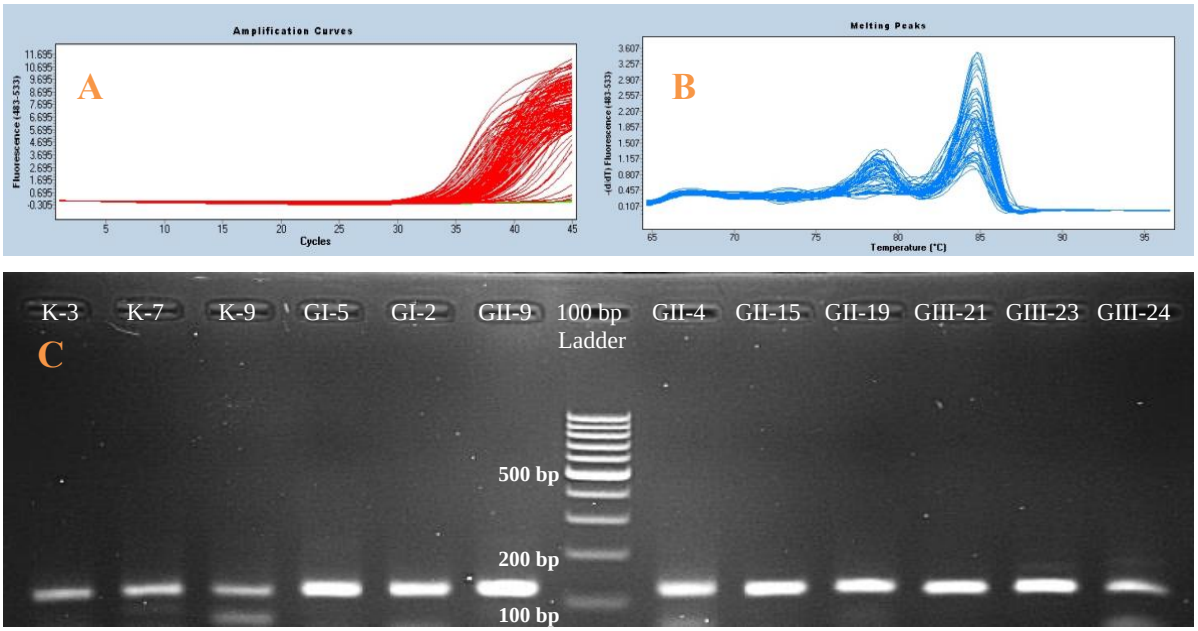
Şekil 5.12. *SIRT3* genin qRT-PCR sonuçları: A- Amplifikasyon eğrisi; B- Erime pikleri; C- Agaroz jel görüntüsü.

SIRT4 genin üzerinde qRT-PCR deneyi 0.5 mM $MgCl_2$ ilave ederek 57^0C bağlanma sıcaklığında kurumuştur ve 86 bp PCR ürünleri başarılıyla elde edilmiştir. Deney sonuçları Şekil 5.13'de bulunmaktadır. *SIRT3* primerin reaksyonu gibi benzer bir şekilde *SIRT4* primerine ait olan deneyinde de yüksek GC oranı nedeniyle bimodal pikler gözükmektedir.



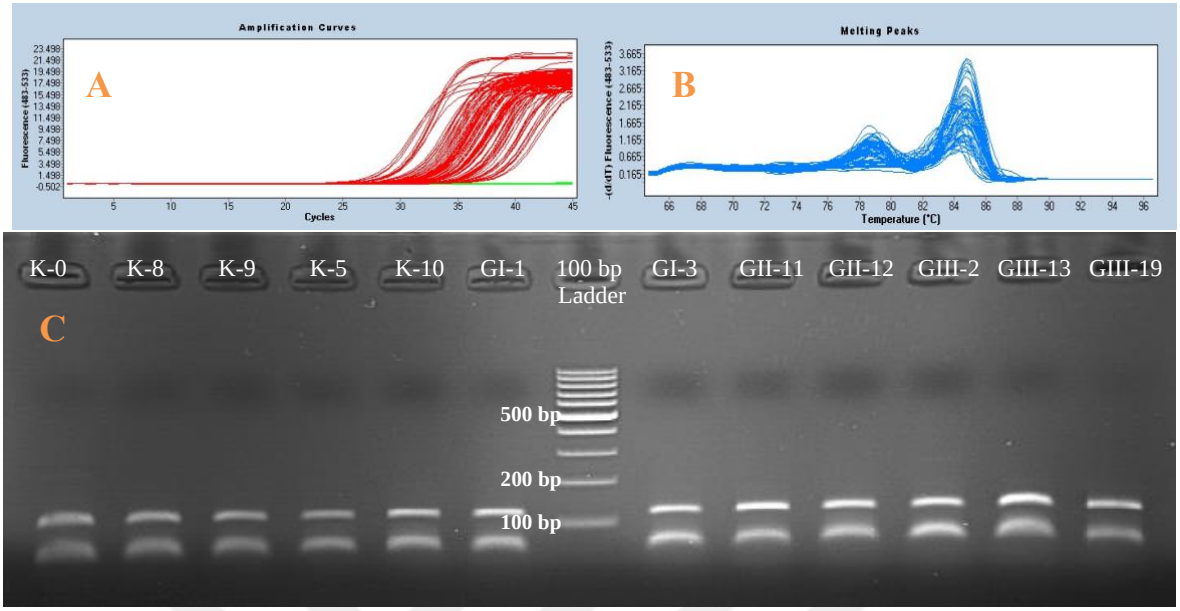
Şekil 5.13. *SIRT4* genin qRT-PCR sonuçları: **A**- Amplifikasyon eğrisi; **B**- Erime pikleri; **C**- Agaroz jel görüntüsü.

SIRT5 primer çiftin deneyinde 50^0C sıcaklık ve 0.5 mM $MgCl_2$ en iyi sonuçları ortaya koymuştur ve 115 bp'lik PCR ürünü oluşmuştur. Jel görüntüsü ve erime pikleri Şekil 5.14'de bulunmaktadır.



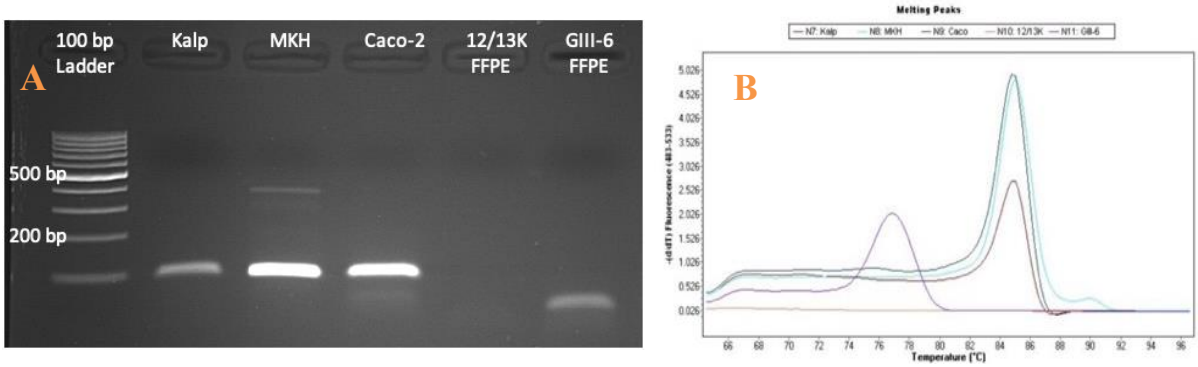
Şekil 5.14. *SIRT5* genin qRT-PCR sonuçları: **A**- Amplifikasyon eğrisi; **B**- Erime pikleri; **C**- Agaroz jel görüntüsü.

SIRT6 primer Magnezyum iyonu eklemeden 50^0C sıcaklıkta çalıştırılmış ve 123 baz çiftlik amplikon oluşturmuştur. Bu geninin qRT-PCR sonuçları Şekil 5.15'da verilmektedir.



Şekil 5.15. *SIRT6* genin qRT-PCR sonuçları: **A**- Amplifikasyon eğrisi; **B**- Erime pikleri; **C**- Agaroz jel görüntüsü.

SIRT7 genine ait olan primerlerin optimizasyon deneyenlerinde hiç başarılı sonuç elde edilmemiştir. Bu gen için toplam üç set primer sentezlendi fakat hepsi başarısız bulunmuştur. Sonuç olarak her set primer için hücre hattı ve başka çalışmaya ait olan FFPE dokulardan birkaç örnekle beraber pozitif kontrol deneme reaksiyonları kuruldu. İlk başta iki çift sentezlenen primer çiftleri tüm örneklerde non spesifik amplifikasyonlar oluşturdu (Sonuçlar sunulmamıştır). En son sentezlenen primer seti kalp, mezenkimal kök hücre ve kolon dokusuna ait olan Caco-2 hücre hattında spesifik olarak reaksiyona girmiştir ve 97 baz çiftlik amplikon oluşturmuştur. Fakat pozitif kontrol FFPE ve bu çalışmadaki FFPE örneklerle amplikon oluşmamıştır (Şekil 5.16).



Şekil 5.16. *SIRT7* genin pozitif kontrol sonuçları: A- Agaroz jel görüntüsü; **B**- Erime pikleri.

Sonuç olarak 32 FL olguların 10 kontrol örneklerin eş zamanlı kantitafif PCR deneyleri *SIRT7* primeri hariç diğer *sirtuin* (*SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6*) primerlerin üzerinde başarılı bir şekilde tamamlanmıştır. Tez çalışmasında dahil olan genlerin relative kantifikasyon için Livak yöntemi kullanılmıştır. Bu doğrultuda her olgudan elde edilen ham C_T verileri $2^{-\Delta\Delta C_T}$ formolü üzerinden kat değişimi hesaplanmıştır. Burada veriler *UBC* referans gen ile normalize edilmiştir. qRT-PCR deneylerin sonunda, elde edilen aday genlerin ortalama C_T değerleri ek 4 olarak tezin sonuna eklenmiştir.

5.6. qRT-PCR DENEYLERİN İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME SONUÇLARI

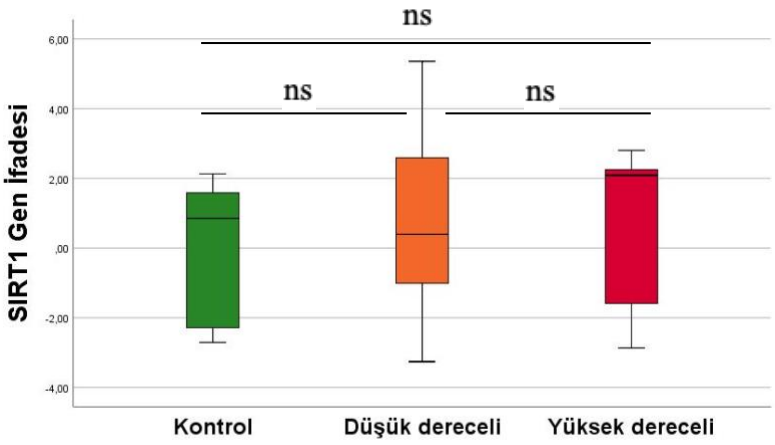
5.6.1. FL VE KONTROL OLGULARINDA *SİRTUİN* GENLERİN İFADE DEĞİŞİKLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Çalışmada yer alan 10 kontrol ve 26 grade 1, 2 ve 3A (düşük dereceli) ve 6 grade 3B (yüksek dereceli) FL hastalarının *SIRT1, SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5, SIRT6* genlerin ifade düzeyleri kat değişimi olarak farklılıkları Kruskal-Wallis testi ile incelenmiştir. Bu analizlerin sonuçlarına göre sadece *SIRT6* geni için gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmuştur (p=0.030). Diğer genlerdeki gözlenen ifade değişiklikleri anlamlı olmadığı saptanmıştır. *Sirtuin* genlerin kontrol, düşük dereceli ve yüksek derecelerindeki ifadelerini kat değişimi çizelge 5.4'de sunulmuştur.

Çizelge 5.4. Kontrol, düşük dereceli ve yüksek dereceli gruplarında *sirtuin* genlerin ifadelerinin kat değişimi (log2).

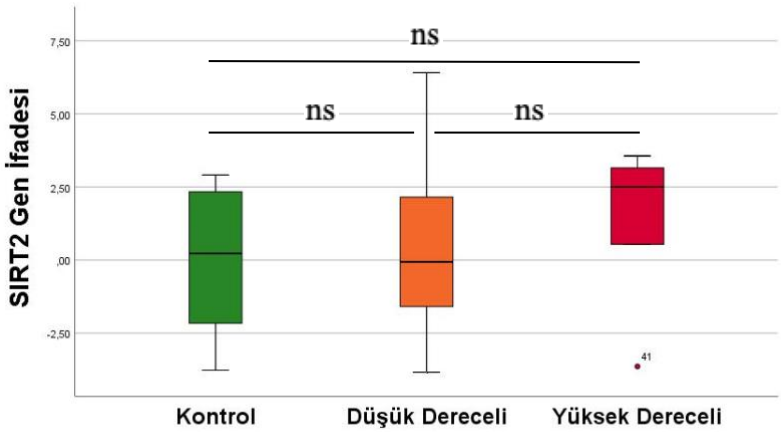
	SIRT1	***SIRT2***	***SIRT3***	***SIRT4***	***SIRT5***	***SIRT6***
Kontrol vakaları (n=10) Med (Min, Max)	0.67 (-2.71, 2.05)	-0.35 (-3.77, 2.91)	0.65 (-5.67, 5.39)	0.81 (-3.95, 2.57)	-0.01 (-4.11, 4.09)	-0.72 (-6.87, 4.13)
Düşük dereceli olgular (n=26) Med (Min-Max)	0.39 (-3.26, 5.36)	-0.07 (-3.84, 6.41)	3.13 (-5.55, 12.33)	0.17 (-3.43, 3.41)	1.09 (-4.68, 6.39)	-0.26 (-6.80, 4.71)
Yüksek dereceli olgular (n=6) Med (Min-Max)	2.09 (-2.87, 2.80)	2.49 (-3.64, 3.56)	3.00 (-3.12, 7.41)	1.57 (-2.73, 2.89)	2.63 (-4.37, 8.74)	3.81 (0.77, 6.64)
P Değeri	P=0.45	P=0.35	P=0.28	P=0.85	P=0.35	**P=0.030**

Kontrol grubu, düşük dereceli ve yüksek dereceli hasta gruplarında *sirtuin* genlerin ifadelerinin kat değişimlerinin ikili karşılaştırmaları, Mann Whitney-U testi ile incelenmiştir. Bu tez çalışmasında *SIRT1* genin ifadesi incelemelerinin sonucunda düşük dereceli hastaların ifadesi kontrol grubuna göre azalmıştır. Yüksek dereceli hastaların ifadesi kontrol grubu ve düşük dereceli hastalara göre artmış ifadeleri gözlenmiştir. Ancak bu ifade değişiklikleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 5.17).



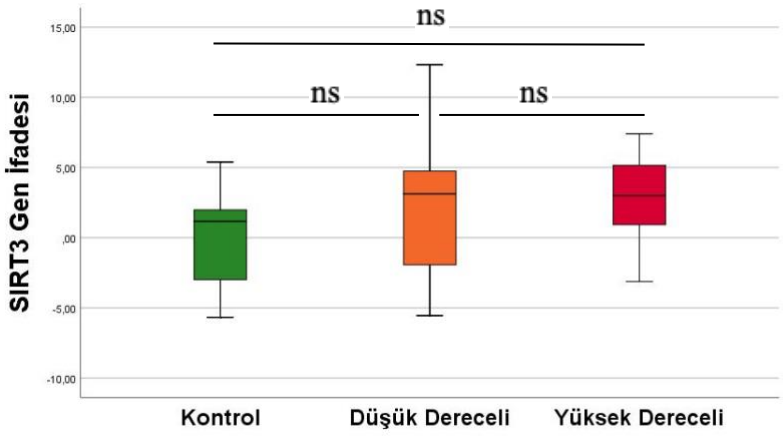
Şekil 5.17. *SIRT1* gen ifadesinin kontrol, düşük dereceli ve yüksek dereceli gruplarında kat değişimi ($p<0.05$).

SIRT2 geni ifadesinin analiz sonuçları bu genin düşük dereceli grubun kontrol grubuna göre değişilmemesi ve yüksek dereceli hastalarda kontrollere göre artmış olduğunu göstermiştir. Yüksek derece hastalarda da düşük dereceli hastalar ve kontrollere göre bu gende artmış ifadeyi gösterirse de bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 5.18).



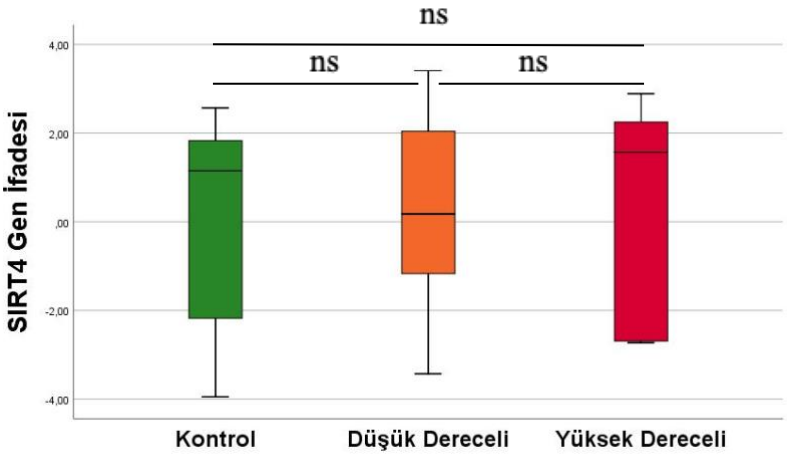
Şekil 5.18. *SIRT2* gen ifadesinin kontrol, düşük dereceli ve yüksek dereceli gruplarında kat değişimi ($p<0.05$).

SIRT3 geni ifadesine bakıldığında düşük dereceli ve yüksek dereceli olgularda, kontrol grubuna göre artış gösterilmişse de bu ifade artışının istatiksel açından anlamlı olmadığı saptanmıştır (Şekil 5.19).



Şekil 5.19. *SIRT3* gen ifadesinin kontrol, düşük dereceli ve yüksek dereceli gruplarında kat değişimi ($p<0.05$).

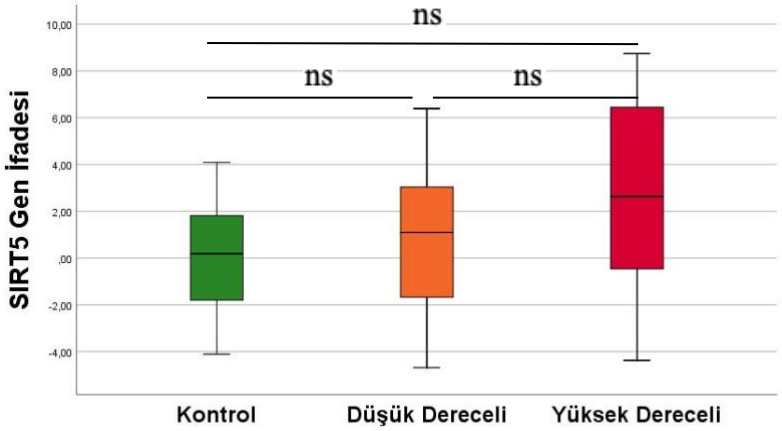
SIRT4 geni ifadesine bakıldığında; bu gen ifadesinin düşük dereceli olgularda kontrol grubuna göre azalması ve yüksek dereceli olgularda hem kontrol hem de düşük dereceli olgulara göre artışını göstermektedir. Bu bulgu istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 5.20).



Şekil 5.20. *SIRT4* gen ifadesinin kontrol, düşük dereceli ve yüksek dereceli gruplarında kat değişimi ($p<0.05$).

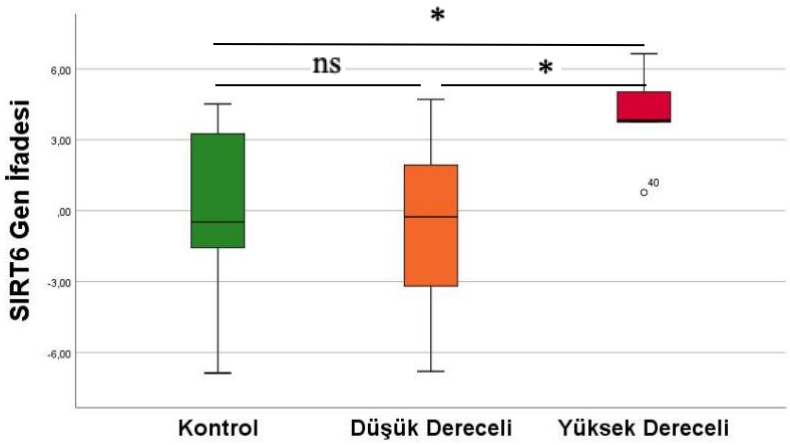
SIRT5 geni ifade analizlerine göre, bu gende hem düşük ve hem yüksek dereceli olgularda kontrol grubuna göre ve ayrıca yüksek dereceli olgularda düşük derecelilere göre artmış

ifade ortaya konmuştur. Öte yandan bu bulgu istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 5.21).



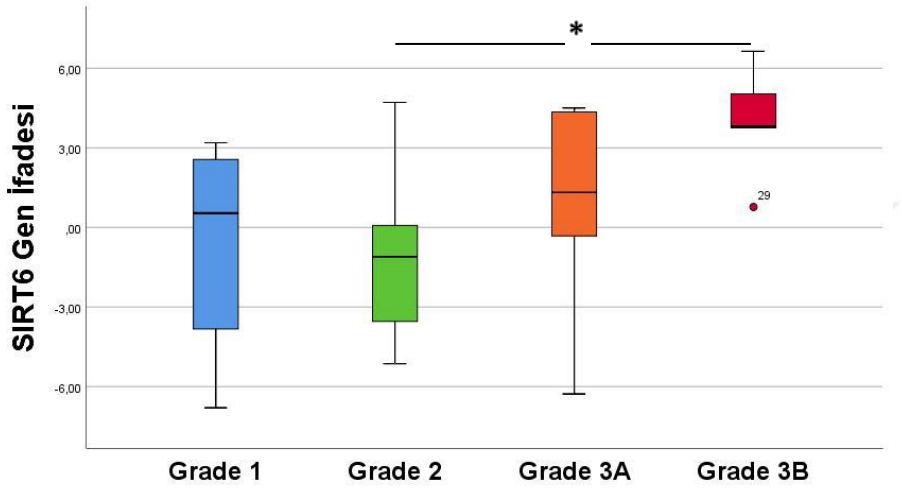
Şekil 5.21. *SIRT5* gen ifadesinin kontrol, düşük dereceli ve yüksek dereceli gruplarında kat değişimi ($p<0.05$).

SIRT6 geninin ifade düzeylerine bakıldığında; düşük dereceli olgularda kontrol grubuna göre ifade artışı gözlenmiş ancak istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. Kontrol grubu ve yüksek dereceli grubun karşılaştırılmasında *SIRT6* geninin yüksek dereceli grade 3B olgularda görülen artmış ifade istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p=0.046$). *SIRT6* geni ifadesinin yüksek dereceli olgularda düşük derecelilere göre arttığı bulunmuştur. Bu ifade artışı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.036$) (Şekil 5.22).



Şekil 5.22. *SIRT6* gen ifadesinin kontrol, düşük dereceli ve yüksek dereceli gruplarında kat değişimi ($p<0.05$).

Araştırmadaki hasta gruplarını oluşturan grade 1, 2, 3A ve 3B grupları arasında, kendi içinde *sirtuin* genlerinin ifade değişiklikleri için ayrıca Kruskal-Wallis testi yapılmıştır. Buna göre grade'ler arasında SIRT6 geni için anlamlı sonuç saptanmış (p=0.043) olup (Şekil 5. 22), diğer genler için ifade değişikliklerinin anlamlı olmadığı bulunmuştur. *SIRT6* için bu grupların ikili karşılaştırmalarının sonucunda grade 2 ve grade 3B gruplar arasındaki farkın anlamlı olduğu gözlenmiştir (p=0.031). (Şekil 5.23).



Şekil 5.23. *SIRT6* geninin Grade 1, 2, 3A ve 3B gruplar arasındaki ifade değişimi.

5.6.2. FL OLGULARINDA KLİNİK FAKTÖRLER İLE *SİRTUİN* GENLERİN İFADELERİNİN İNCELENMESİ

Sirtuin gen ifade değişiklikleri ve klinikopatolojik veriler arasındaki uyum Mann Whitney U testi ile incelenmişidir. Bu tez çalışmasında hastalar 65 altı ve 65 yaş ve üstü olarak iki yaş grubuna ayrılmıştır. *Sirtuin* genlerin ifadeleri bu iki yaş grubunda kıyaslandığında *SIRT6* (p=0.05) geninde 65 yaş ve üstü hastalar için ifade artışı anlamlı olarak saptanmıştır. Diğer genler için anlamlı sonuç gözlenmemiştir. Cinsiyet bakımından erkeklerde kadınlara göre bu genlerde ifade artışı görünürse de istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur. Ki-67 proliferasyon indeksi ile karşılaştırıldığında; SIRT3 hariç diğer genler için anlamlı fark bulunmuştur. Yüksek proliferasyon indeksine sahip olan hastalarda *SIRT1, 2, 4, 5* ve *6* genlerin daha yüksek ifadesi gözlenmiştir. Bu anlamlı P değerleri *SIRT1* için 0.017, *SIRT2* için 0.012, *SIRT4* için 0.015, *SIRT5* için 0.031 ve *SIRT6* için 0.033 saptanmıştır. Gece terlemesi, ateş, kilo kaybı gibi B semptomları olan hastalarda; bu semptomları olmayan

vakalarda *SIRT5* daha yüksek ifadesi gözlenmiştir (p=0.028). Diğer genler için anlamlı bir ifade değişikliği saptanmamıştır. DBBHL transformasyonu varlığına göre *sirtuin* genlerinin ifadelerine bakıldığında anlamlı bulgu elde edilmemiştir. Nüks varlığına göre *sirtuin* genlerinin ifadelerinde istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulunmamıştır. Hastaların kemik iliği tutulumu ve immünohistokimyasal BCL2 ifadesi açısından *sirtuin* genlerinde ifade değişikliği saptanmamıştır. İmmünohistokimyasal CD10 ekspresyonu ile *sirtuin* gen ifade değişimi arasında sadece *SIRT6* geni için anlamlı sonuç gözlenmiştir. CD10 markeri ifade eden vakalarda *SIRT6* genin daha düşük ifadesi saptanmıştır (p=0.011).

Tez çalışmasındaki olguların *sirtuin* genleri açısından tanımlayıcı istatistiksel analiz sonuçları çizelge 5.5'de bulunmaktadır.

Çizelge 5.5. Olguların klinikopatolojik bulguları ile *sirtuin* gen ifadelerinin karşılaştırılması.

		SIRT1 **Median (min-max)**	***SIRT2*** **Median (min-max)**	***SIRT3*** **Median (min-max)**	***SIRT4*** **Median (min-max)**	***SIRT5*** **Median (min-max)**	***SIRT6*** **Median (min-max)**
Yaş	**65 ve üstü**	-0.002 (-2.87, 3.01)	-0.10 (-3.79, 4.54)	3.17 (-5.55, 8.79)	-0.44 (-2.80, 3.14)	2.07 (-4.37, 8.74)	1.84 (-4.06, -6.64)
	65 altı	0.56 (-3.26, 5.36)	1.28 (-3.84, 6.41)	3.09 (-4.18, 12.33)	0.73 (-3.43, 3.41)	0.95 (-4.68, 6.39)	-0.32 (-6.80, 4.50)
	p değeri	0.180	0.299	0.734	0.335	0.509	**0.05**
Cinsiyet	**Erkek**	0.52 (-3.26, 5,36)	0.95 (-3.84, 6.41)	3.23 (-5.55, 12.33)	0.49 (-3.43, 3.41)	1.32 (-4.68, 8.74)	0.20 (-6.80, 5.03)
	Kadın	0.43 (-1.67, 3.01)	0.25 (-3.38, 3.01)	2.38 (-4.41, 7.41)	0.40 (-2.84, 2.57)	1.09 (-2.32, 6.45)	0.36 (-3.90, 6.64)
	p değeri	0.984	0.968	0.968	0.792	0.745	0.544
Ki-67	**<40**	0.18 (-3.26, 2.59)	-0.71 (-3.79, 3.31)	3.23 (-4.43, 12.33)	0.34 (-3.43, 2.03)	-1.07 (-4.68, 3.04)	-0.46 (-6.80, 3.19)
	≥40	2.25 (-2.87, 5.36)	2.15 (-3.64, 6.41)	4.05 (-3.12, 9.60)	2.04 (-2.73, 3.14)	2.88 (-4.37, 8.74)	3.78 (-6.28, 6.64)
	p değeri	**0.017**	**0.012**	0.119	**0.015**	**0.031**	**0.033**
B Semptomu	**Var**	0.31 (-3.26, 5.36)	-0.81 (-3.84, 3.31)	2.90 (-4.41, 9.60)	-0.44 (3.18, 3.41)	-1.46 (-4.68, 4.48)	-0.21 (-5.14, 1.15)
	Yok	1.74 (-2.02, 3.01)	1.90 (-3.11, 5.54)	4.32 (4.18, 12.33)	1.24 (-3.43, 3.14)	3.04 (-4.19, 8.74)	1.75 (-6.80, 6.64)
	p değeri	0.751	0.216	0.240	0.634	**0.028**	0.295
DBBHL transformasyon	**Var**	0.31 (-3.26, 2.25)	0.62 (-3.84, 3.15)	-1.43 (-3.76, 5.16)	-0.42 (-3.18, 1.24)	-0.13 (-4.68, 6.45)	1.49 (-5.14, 6.64)
	Yok	0.51 (-1.67, 3.65)	0.63 (-3.79, 2.98)	3.13 (-4.43, 12.33)	0.69 (-2.84 3.41)	2.27 (-3.07, 8.74)	-0.31 (-5.14, 5.03)
	p değeri	0.576	1	0.737	0.314	0.737	0.780
Nüks	**Var**	1.45 (-0.12, 5.36)	1.79 (0.62, 3.31)	4.02 (-1.43, 9.60)	2.38 (-0.42, 3.05)	0.25 (-1.67, 2.02)	0.68 (-5.14, 1.49)
	Yok	1.15 (-1.62, 3.65)	0.65 (-3.79, 3.84)	3.13 (-4.43, 12.33)	1.08 (-2.80, 3.41)	2.27 (-3.07, 8.74)	-0.26 (-6.28, 5.03)
	p değeri	0.560	0.210	0.420	0.591	0.282	0.788
Kemik iliği tutulumu	**Var**	0.54 (-2.87, 5,36)	-1.10 (-3.64, 3.56)	4.32 (-5.55, 9.60)	1.22 (-2.84, 3.05)	2.02 (-4.37, 4.66)	2.15 (-3.19, 4.35)
	Yok	0.48 (-3.26, 3.65)	1.28 (-3.84, 6.41)	3.09 (-4.43, 12.33)	0.33 (-3.43, 3.41)	0.95 (-4.68, 8.74)	-0.21 (-6.80, 6.64)
	p değeri	0.823	0.684	0.569	0.776	0.968	0.601
BCL2	**Pozitif**	0.31 (-3.26, 0.54)	0.62 (-3.84, 4.54)	2.90 (-5.55, 12.33)	0.33 (-3.43, 3.41)	0.63 (-4.68, 8.74)	0.20 (-6.80, 6.64)
	Negatif	0.54 (-1.01, 3.03)	-0.03 (-1.59, 6.41)	2.92 (-1.93, 4.84)	2.51 (-1.17, 2.34)	2.07 (-0.46, 2.88)	1.75 (-3.19, 4.50)
	p değeri	0.551	0.897	0.716	0.452	0.815	0.707
CD10	**Pozitif**	0.31 (-3.26, 5.36)	-0.29 (-3.84, 6.41)	3.09 (-5.55, 12.33)	0.02 (-3.43, 3.41)	0.95 (-4.68, 8.74)	-0.31 (-6.80, 5.03)
	Negatif	2.25 (-1.59, 3.01)	2.01 (0.62, 3.84)	4.84 (-1.43, 7.41)	1.90 (-2.73, 2.57)	1.24 (-0.46, 6.45)	3.81 (0.77, 6.64)
	p değeri	0.220	0.073	0.351	0.327	0.364	**0.011**

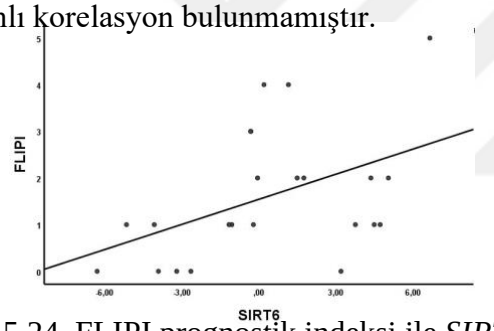
5.6.3. KORELASYON ANALİZLERİ

Bu çalışmada FL olgularının *sirtuin* genlerinin ifade düzeyleri ve olguların klinik parametrelerinin ilişkisi nokta çift serili Spearman katsayısıyla incelenmiştir (Çizelge 5.6).

Çizelge 5.6. FL olgularında sirtuin gen ifadelerinin klinik faktörlerle korelasyonu.

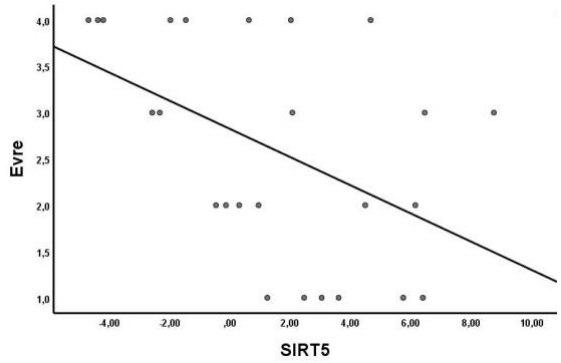
Spearman korelasyonu	*SIRT1*	*SIRT2*	*SIRT3*	*SIRT4*	*SIRT5*	*SIRT6*
FLIPI	0.196	0.112	-0.003	0.051	-0.012	**0.453**
Evre	-0.247	-0.428	-0.362	-0.346	**-0.478**	-0.088
Ki-67	**0.403**	**0.512**	0.330	**0.401**	**0.461**	**0.427**
B Semptom	-0.064	-0.284	-0.225	-0.165	**-0.433**	-0.212
DBBHL transformasyon	-0.194	-0.009	-0.170	-0.221	-0.130	0.093
Nüks	0.218	0.290	0.152	0.135	-0.225	-0.098
Kİ Tutulumu	-0.021	-0.107	0.026	-0.055	0.002	0.132
BCL2	-0.066	-0.097	-0.067	-0.152	-0.031	-0.65
CD10	-0.210	-0.307	-0.124	-0.169	-0.151	**-0.492**

Bu olguların FLIPI skorları ve *sirtuin* gen ifadeleri arasında *SIRT6* için anlamlı pozitif korelasyon saptanmıştır (r=0.453, p=0.030) (Şekil 5.24). Diğer genler için istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulunmamıştır.



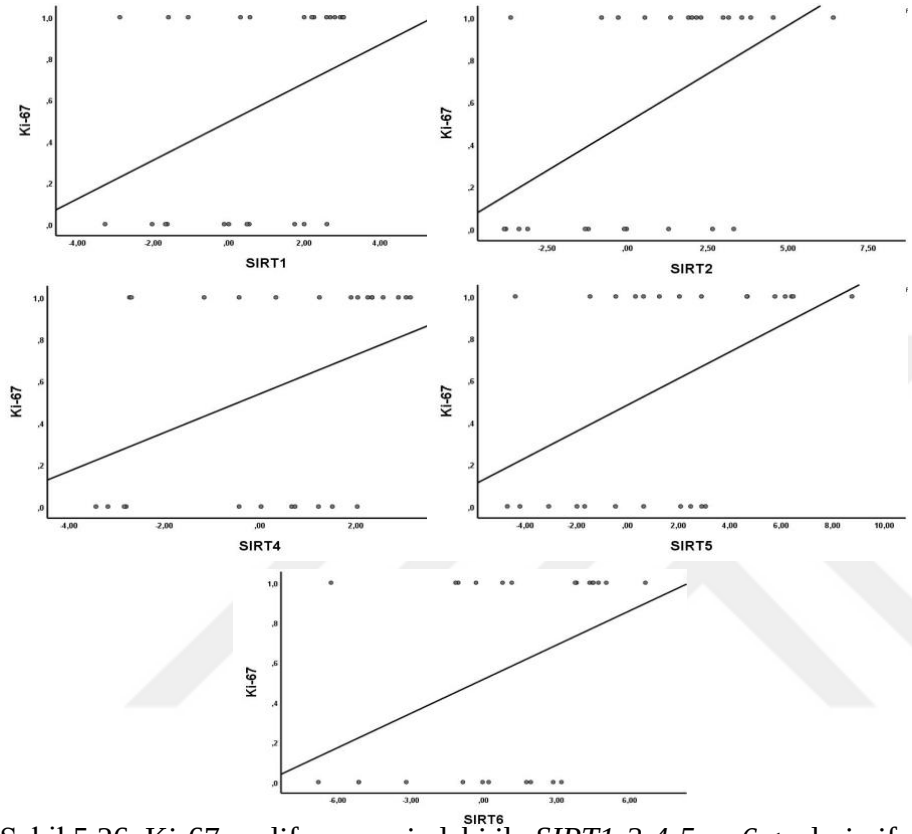
Şekil 5.24. FLIPI prognostik indeksi ile *SIRT6* genin ifade korelasyonu.

Hastaların tanı sırasındaki evre değişken ile *sirtuin* genleri arasında görülen negatif ilişki *SIRT5* için anlamlı bulunmuştur (r=-0.478, p=0.016) (Şekil 5.25). Diğer genler için bu ilişkinin anlamlı olmadığı gözlenmiştir.



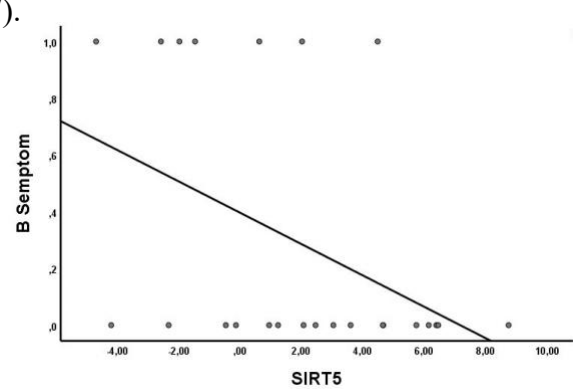
Şekil 5.25. Evre ile *SIRT5* genin ifade korelasyonu.

Ki-67 proliferasyon indeksi ve *sirtuin* genlerin ifade korelasyon incelemesinde bu indeksin *SIRT1* (r=00.403, p=0.041), *SIRT2* (r=0.512, p=0.007), *SIRT4* (r=0.401, p=0.043), *SIRT5* (r=0.461, p=0.018) ve *SIRT6* (r=0.427, p=0.033) arasında anlamalı olduğu gözlenmiştir. Bu ilişki *SIRT3* için anlamlı bulunmamıştır (Şekil 5.26).



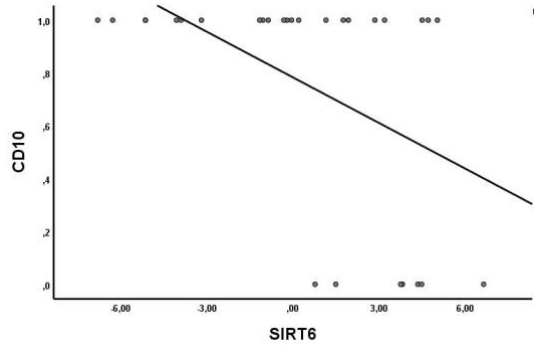
Şekil 5.26. Ki-67 proliferasyon indeki ile *SIRT1-2-4-5* ve *6* genlerin ifade korelasyonu.

FL hastalarında görülen sistemik semptomlar ve *sirtuin* gen ifade değişimi incelendiğinde, yalnızca *SIRT5* ile negatif korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (r=-0.433, p=0.034) (Şekil 5.27).



Şekil 5.27. B semptomlar ile *SIRT5* genin ifade korelasyonu.

DBBHL tranformasyonu ve *sirtuin* gen ifadeleri arasındaki korelasyon anlamlı bulunmamıştır. Ayrıca nüks durumu, kemik iliği tutulumu; immünohistokimyasal BCL2 ekspresyonu ile *sirtuin* aile gen ifadesi arasında da anlamlı korelasyon saptanmamıştır. İmmünohistokimyasal CD10 pozitifliği ve *sirtuin* genlerinin ifade değişimi arasındaki ilişki incelendiğinde, *SIRT6* ile istatistiksel olarak anlamlı negatif korelasyon ortaya koymuştur (r=-0.492, p=0.007) (Şekil 5.28).



Şekil 5.28. CD10 marker ile *SIRT6* genin ifade korelasyonu.

Spearman korelasyon katsayısı kullanılarak *sirtuin* gen aile ifade düzeylerinin potansiyel korelasyonları incelenmiştir. Bu analizin sonucunda bu çalışmada dahil olan tüm *sirtuinler*in ifadelerinin arasında güçlü ve pozitif korelasyon saptanmıştır. Saptanan p değerlerin arasında sadece *SIRT3* ve *SIRT6* arasında p=0.047 bulunmuştur. Diğerler için bu değerin p<0.001 olduğu gözlenmiştir (Çizelge5.7).

Çizelge 5.7. FL olgularında *sirtuin* gen ifadeleri arasındaki korelasyon.

Spearman korelasyonu	***SIRT1***	***SIRT2***	***SIRT3***	***SIRT4***	***SIRT5***	***SIRT6***
SIRT1	1					
SIRT2	0.782	1				
SIRT3	0.722	0.733	1			
SIRT4	0.929	0.808	0.671	1		
SIRT5	0.683	0.762	0.616	0.692	1	
SIRT6	0.585	0.502	0.395	0.517	0.487	1

5.6.4. META-ANALİZ BULGULARI

qRT-PCR analizlerini doğrulamak amacıyla, GEO veri tabanından seçilen ve foliküler lenfomalara uygun 21 mikrodizin veri setlerin analizleri yapılmıştır. Bu analizlerde her veri setinde örnekler için bulunan kategorilere göre veriler iki gruba ayrılıp ve RStudio platformunda analizleri yapılmıştır. Bu veri setlerinde toplam 259 örnek (161 FL vakası ve 98 sağlıklı kontrol) arasında kıyaslanmalar yapılabilmiştir. Foliküler lenfoma mikrodizin

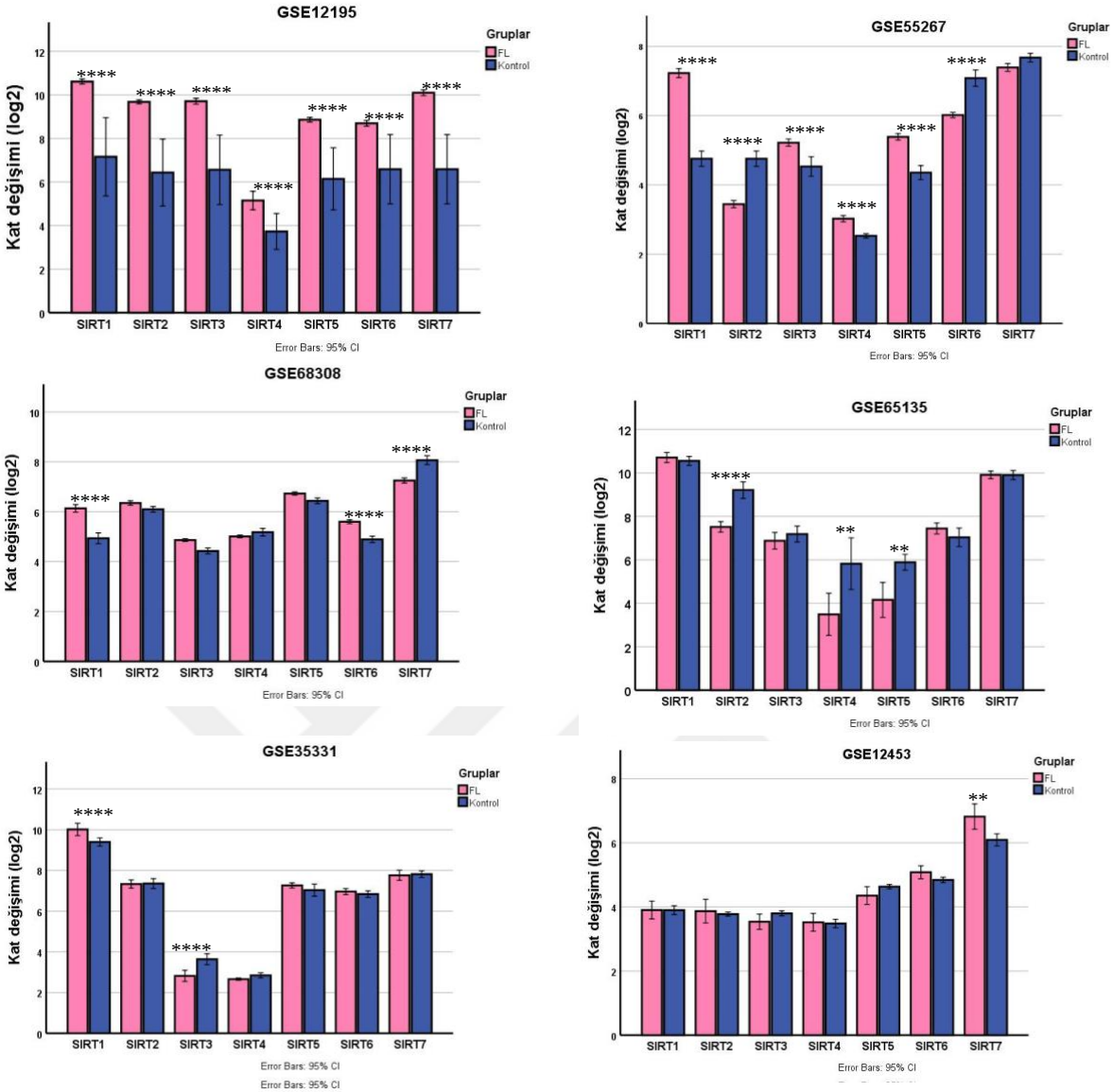
deneylerindeki hastaların klinik bulgularına göre hasta grupları analizler için oluşturulmuştur (hasta ve kontrol, grade'ler dağılımı, sınırlı ve ileri evre, FLIPI skorları, nüks ve transform durumu vb.). *Sirtuin* genlerinin ifade değişimleri oluşan gruplara göre analiz edilmiştir. Ancak hasta ve kontrol gruplar haricinde herhangi bir anlamlı ifade bulunmamıştır. Analizler sonucunda seçilen 21 veri setinde, 6 set için *sirtuin*'lerin ifadeleri arasında anlamlı sonuçlar elde edilmiştir (GSE12195, GSE55267, GSE68308, GSE65135, GSE35331 ve GSE12453). Analizler sonucunda elde edilen log2 kat değişimleri FL hastalarında kontrollere göre ve düzeltilmiş *P* değerleri Çizelge 5.8'de özetlenmiştir.

Çizelge 5.8. Seçilen veri setlerindeki gruplar arasındaki *sirtuin* genlerin ifade değişiklikleri

GEO erişim kodu		***SIRT1***	***SIRT2***	***SIRT3***	***SIRT4***	***SIRT5***	***SIRT6***	***SIRT7***
GSE12195	logFC[1]	**3.45**	**3.25**	**3.15**	**1.42**	**2.72**	**2.55**	**3.51**
	adj.P.Val	**4.11e-07**	**9.64e-08**	**3.93e-07**	**1.32e-03**	**7.92e-07**	**3.55e-06**	**3.99e-08**
GSE55267	logFC	**0.84**	**-1.31**	**0.69**	**0.50**	**1.03**	**-1.07**	-0.28
	adj.P.Val	**1.58e-3**	**7.71e-10**	**5.97e-4**	**3.44e-3**	**3.70e-8**	**8.95e-11**	0.19
GSE68308	logFC	**1.20**	0.25	0.44	-0.17	0.30	**0.71**	**-0.81**
	adj.P.Val	**2.18e-11**	1.10e-02	2.14e-10	1.28e-02	6.13e-05	**3.76e-13**	**3.80e-11**
GSE65135	logFC	0.15	**-1.70**	-0.31	**-2.33**	**-1.73**	0.41	0.01
	adj.P.Val	5.59e-01	**9.92e-07**	4.29e-01	**1.26e-02**	**6.68e-03**	1.95e-01	9.76e-01
GSE35331	logFC	**0.62**	-0.02	**-0.82**	-0.19	0.23	0.12	-0.05
	adj.P.Val	**3.94e-03**	9.18e-01	**1.97e-03**	6.39e-02	3.46e-01	4.00e-01	7.62e-01
GSE12453	logFC	0.002	0.09	-0.26	0.04	0.24	0.23	**0.72**
	adj.P.Val	9.92e-01	4.88e-01	4.41e-02	8.77e-01	2.11e-01	7.15e-02	**1.14e-02**

1- FC-kat değişimi

GSE12195 kodlu çalışmasının analiz sonuçları *sirtuin* ailesinde olan genlerin hepsinde FL olgularında kontrollere göre artmış ifade düzeyi bulunmuştur. GSE55267 kodlu çalışmada SIRT1, SIRT3, SIRT4 ve SIRT5 genlerinde kontrollere göre ifade artışı saptanırken *SIRT2* ve *SIRT6* genlerinde düşük ifade rastlanmıştır. GSE68308 kodlu çalışmada FL hastalarında *SIRT1* ve *SIRT6* genlerinin kontrollere göre anlamlı ifade artışı saptanırken *SIRT7* genin düşük ifadesi gözlenmiştir. GSE65135 kodlu çalışmada *SIRT2*, *SIRT4* ve *SIRT5* genlerinde FL'lerde kontrol gruplara göre düşük ifade bulunmuştur. GSE35331 kodlu çalışmada *SIRT1* genin FL gruplarında kontrollere göre ifade artışı ve *SIRT3*'de düşük ifadesi anlamlı olarak bulunmuştur. GSE12453 kodlu çalışmada sadece *SIRT7*'nin artmış ifadesi anlamlı olarak saptanmıştır (Şekil 5.29).



Şekil 5.29. GEO veri setinde FL ve kontrol dokularında *sirtuin* ifade profili.

6. TARTIŞMA/SONUÇ

6.1. TARTIŞMA

Lenfomalar, tüm kanser vakalarının %4'ünü temsil eden en yaygın hematolojik malignitedir (204). Foliküler lenfoma (FL) biyolojik ve doku anlamda bir heterojen malignitedir. FL, B hücrelerinin somatik hipermutasyon ve sınıf değişim rekombinasyonu süreçlerinde klonal genişlemeye ve genetik modifikasyonlara maruz kalan germinal merkez kaynaklı bir tümör tipidir (23). Avrupa ve Amerika toplumlarında en sık rastlanan indolent (yavaş seyreden) lenfomadır. Çoğu hastada tanı zamanında belirgin risk faktörleri olmamasına rağmen, hastalık genetik ve çevresel faktörlerden kaynaklanır. Bağışıklık modülatörlerindeki değişiklikler, BCR, NF-κB ve JAK-STAT sinyal yolaklarında yer alan genetik değişiklikler ve son yıllarda ortaya çıkan epigenetik düzensizlikler bu hastalığın patogenezinde katkıda bulunur. Değişmiş epigenetik profili, foliküler lenfoma patogenezinde rolü olduğu gösterilmiştir. Sınıf III histon deastilaz enzimleri olarak adlandırılan sirtuinler, çeşitli hücresel süreçleri düzenleyen yüksek oranda korunmuş epigenetik enzimlerdir. Bu enzimler kanser dahil olmak üzere, kalp-damar hastalıkları, diyabet ve nörodejeneratif hastalıklar gibi önemli hastalıklarda rol oynamaktadırlar. Hematolojik malignitelerde de araştırılmış olan sirtuin enzimlerini kodlayan genlerin ifade düzeyleri, FL hastalarında incelenmesi çalışmamızın hipotezini oluşturmaktadır. Bu bağlamda belirtilen aday genlerin hastaların prognozu ile ilişkisini incelemek de amaçlanmıştır.

Literatürde FL patogenezinde dahil olan genlerin ve bu çalışmanın özelinde *sirtuin*lerin davranışı ile ilgili çelişkili sonuçlar var. Bu farklılığın literatürde farklı çalışmalarda zaten heterojen olan bu hastalık için seçilen hastaların oluşturduğu gruplardaki farklıktan kaynaklanmaktadır.

6.1.1. DEMOGRAFİK VE KLİNİKOPATOLOJİK DEĞERLENDİRMELER

Çalışmamıza dahil olan 32 FL vakasının yaşının medyanı 60'tır. FL ağırlıklı olarak yetişkinleri etkiler, medyan yaş 6. dekattır (19). Ancak düşük dereceli grupta olan hastalarda, erken yaş tanısı olan hastalar da mevcuttur. Yaş artışı, FL hastalarında güçlü negatif prognostik faktördür. Foliküler Lenfoma Uluslararası Prognostik İndeksi'nin (FLIPI)

prognostik parametreleri arasında hastaların 60 yaş ve üzeri olması hastalığın düşük sağkalımı ile ilişkilidir (62, 66).

Çalışma cinsiyet faktörü açısından 10 kadın ve 22 erkek hastadan oluşmaktadır. FL olgularında erkek kadın oranı 1:1.7'dir (19). Bu çalışmada erkeklerin sayısı kadınlardan 2.2 kat daha fazladır. Ne kadar gözlem sayısı artarsa ve gözlemler rastgele seçilirse bu oran toplumdaki oranı daha çok olasılıkla yansıtabilir.

FL hastalarının klinik takibi için çeşitli sonuç ölçütleri geliştirilmiştir. Bunlardan birisi FLIPI prognostik indeksi ve diğeri tümör derecesi ölçütleridir (363). Histolojik derecelerin incelenmesine göre çalışmamızdaki hastaların %81'in düşük dereceli (grade 1, 2 ve 3A) bireylerden oluştururken %19'u daha agresif seyirli ve yüksek dereceli grade 3B bireylerden oluşmaktadır. Son çalışmalar grade 3B FL hastalarının, hem biyolojik hem de klinik olarak diğer grade'lere göre farklı olduğunu ve diffüz büyük B hücreli lenfoma ile daha yakından ilişkili olduğunu göstermiştir (364). Bu nedenle grade 3B vakalar moleküler genetik analizlerde ayrı bir entite olarak kabul edilmektedir (365).

FL tanısı almış bir hastada prognoz; klinik ve laboratuvar bulgularına dayanarak tahmin edilebilir. FL hastalarında sağkalımın tahmini için uygulanan FLIPI prognostik indeks rituksimab öncesi döneminde tedavi edilen FL tanısı olan 4000'den fazla hastadan oluşan bir veri tabanından oluşmaktadır (62). İndeks, çok değişkenli analizdeki en güçlü 5 prognostik faktöre dayanmaktadır. Bu faktörler: (1) hastalık nodal bölgelerinin sayısı (>4), (2) yüksek LDH, (3) yaş >60, (4) evre III veya IV hastalık ve (5) düşük hemoglobin (<12 g/dL)'dir. FLIPI, hastaları düşük risk (0-1 faktör), orta risk (2 faktör) veya yüksek riskte (≥3 faktör) kategorilere ayırmaktadır (62). Bu çalışmada FL vakalarının FLIPI değerlendirmeleri sonucunda 13 vaka düşük risk, 5 vaka orta risk ve 6 vaka yüksek risk kategorisine dahil olmuştur.

Evreleme hastalığın prognozunun tahmini ve tedavi planının belirlenmesi için en güçlü faktörlerden birisidir. Bu çalışmada, Ann Arbor evreleme sistemi kullanılarak 12 hasta erken evre (evre 1 ya da 2) ve 11 hasta da ileri evrede (evre 3 ya da 4) bulunmuştur. Sitogenetik özellikler, klinik ve görüntüleme bulguları ve yeni tedavi stratejilerinin gelişmesine rağmen ileri evrede tanısında olan hastaların geleneksel kemoterapi ile tedavileri hala mümkün olmamıştır (42). *Lugano* evreleme sisteminde FL hastaları için B semptomların durumu artık

bulunmamaktadır. Bununla birlikte FL hastalarında sistemik semptomların varlığı prognozu etkilemese de bu semptomları olan hastalar için daha dikkatli hastalık yönetimi önerilmiştir. B semptomların varlığı ve devamı tedaviye başlandığını gösterebilir. Bunun için hastalığın öyküsünde sorgulanan kriterlerdendir (42). Bu çalışmada %29.17 hastada B semptomlarına rastlanmıştır. Literatürdeki bulgulara göre FL hastalarının %20'sinden daha azında B semptomları görülmektedir (26).

Genelde FL'deki Ki-67 proliferasyon indeksi histolojik derece ile ilişkilidir. Muhtemel immün boyamadaki teknik farklılıklardan dolayı çalışmalar arasında önemli farklılıklar gözlenebilir. Ayrıca yüksek proliferatif indekse sahip ancak morfolojik olarak düşük dereceli FL'nin bir alt grubu da FL vakalarında bulunabilir. Bu alt grup düşük proliferatif indeks vakalarından daha agresif seyirleri oldukları ve grade 3 vakalarına daha benzer bir şekilde davrandıkları bildirilmiştir. Bu nedenle, Ki-67 boyaması histolojik derecelendirmeye ek olarak klinikte uygulanması önerilir (19). %40 vakanın Ki-67 proliferasyon düşük ve %60'ında yüksek ki-67 indeks gözlenmiştir. Ayrıca genel olarak düşük indeks düşük grade'lerde ve yüksek indeks yüksek grade vakalarda gözlenmiştir.

FL'nin diffüz büyük B hücreli lenfoma'ya (DBBHL) histolojik transformasyonu, hastaların %5-10'unda meydana gelmektedir. Bu durum kötü prognoz ile ilişkilidir. Transformasyon; lenfadenopatinin hızlı ilerlemesi, ekstranodal hastalık (kemik iliğin dışı tutulumu), B semptomları, hiperkalsemi, yüksek serum LDH, yüksek FLIPI skoru ve başlangıç tedavisine cevap vermeme ile ilişkilidir (141). Bu çalışmada FL hastalarının %15.79'unda DBBHL transformasyonuna uğramış olup ve 1 hastada eksitus gözlenmiştir. Bu vakada aynı zamanda B semptomlar ve yüksek LDH seviyesi saptanmış olup, beklenmeyen şekilde düşük FLIPI skoru bulunmuştur.

588 FL vakası ile yapılan bir çalışmada 110 hasta (%19) tanıdan 24 ay sonra nüks gösterip tedaviye direnç göstermişlerdir (ilk 24 ay içinde progresyon-POD24). Nüks gösteren hastalar için ikinci basamak tedaviler önerilir (366). Bu çalışmada hastaların %19.5'unda nüks durumu saptanmıştır.

Kemik iliği tutulumu, genellikle FL hastalarının prognozunu (FLIPI) ve tedavisini etkiler. Literatüre göre hastaların en az %70'inde kemik iliği tutulumu bulunurken diğer organların tutulumu nadirdir (26). Standart kemik iliği biyopsisi ve pozitron emisyon tomografisi

(PET)/bilgisayarlı tomografi (BT) üzerinde FL hastalarının kemik tutulumunun incelenmesi için uygulanan iki yöntemdir. 548 FL hasta üzerindeki yapılan bir araştırmada standart kemik iliği biyopsisi ve PET yöntemlerinin hassaslık ve özgünlüğünü incelemek için sırasıyla hastaların %53 ve %88 kemik iliği tutulumu ortaya koyulmuştur (367). Bu çalışmada FL vakaların %68.75'inde kemik iliği tutulumu saptanmıştır.

İmmünohistokimyasal olarak, FL hücreleri, BCL2 ve BCL6, CD10'u ifade ederler. Germinal merkezi belirteçleri olan BCL2 ve BCL6 olgun B hücreli neoplazmların prognozu ile ilişkili olduğu düşünülmektedir (368). Neoplastik hücrelerde, BCL2 proteini, grade 1 ve grade 2 FL vakalarının %85-90'ında ve grade 3 FL'nin yalnızca %50'sinde ifade edilir. BCL2 proteininin ifadesi neoplastik hücrelerin reaktif foliküllerden ayrılması için faydalı olabilir. Ancak BCL2 ifadesinin olmadığı FL tanısını dışlamaz (19). Bu çalışmada FL vakalarının %84.38'inde BCL2 proteini pozitif ifadesi gözlenmiştir. BCL6, tüm FL vakalarının neoplastik hücrelerin en azından bir kısmı tarafından ifade edilir. BCL6 yeniden düzenlenmelerinin insidansı, yüksek histolojik derecelerde daha sık (grade 3B'de daha yaygın) görülür (42). Bu çalışmadaki vakaların tümünde BCL6 proteini ifadesine rastlanmıştır. CD10 ifadesi B hücrelerinde ve FL vakalarının %89'unda görülmektedir (369). Bununla birlikte, bazı çalışmalarda, özellikle yüksek dereceli (grade 3) FL'de CD10 negatif vakaların da olduğunu bildirilmiştir (370). Yapılan bu çalışmada vakaların %76.67'sinde CD10 ifadesi gözlenmiş; grade 2 vakalarının hepsinde CD10 pozitif bulunmuş; yüksek dereceli olgularda CD10 ifadesi gözlenmemiştir.

6.1.2. HEMATOLOJİK MALİGNİTELERDEKİ SIRTUIN İFADESİ

Sirtuin genlerinin ifade profilinin hematolojik malignitelerde araştırıldığı az sayıda bulunmaktadır. Literatürde Sirtuin genlerinin ifade profilinin araştırıldığı B hücre kökenli maligniteler arasında akut veya B lenfoblastik lösemi (B-ALL), kronik lenfositik lösemi (KLL), diffüz büyük B hücreli lenfoma (DBBHL), foliküler lenfoma (FL), mantle hücreli lenfoma (MCL), burkitt lenfoma (BL), multipl miyelom (MM), primer efüzyon lenfoması (PEL) ve waldenström makroglobulinemisi (WM); B hücre kökenli olmayan neoplazilerden kronik miyeloid lösemi (KML), akut miyeloid lösemi (AML), miyelodisplastik sendrom (MDS) myeloid kökenli, kutanöz T hücreli lenfomada (KTHL), erişkin T hücreli lösemi-lenfoma (ETLL) ve T-ALL olgun T hücre kökenli olan malignitelerdendir.

6.1.2.1. B hücre kökenli hematolojik maligniteler

B hücre kökenli malignitelerde sirtuin üzerinde yapılan çalışmalar Çizelge 6.1'de özetlenmiştir. Artan sayıda çalışmalar SIRT1'in kritik rolünü, hematolojik maligniteler dahil olmak üzere farklı tür kanserlerde metabolizma, proliferasyon, genomik kararsızlık ve kemoterapi direncinde ortaya koymuştur. Çoğu çalışma, bu genin onkogen olarak davrandığını göstermiştir. Foliküler lenfoma'da (FL) bugüne kadar sirtuinler ile ilgili iki çalışma mevcuttur. Bu çalışmaların ikisi de *Frazzi* ve ark. tarafından yapılmıştır. Sirtuinlerle ilgili diğer çalışmalarda başka hematolojik malignitelere odaklanılmıştır. O yüzden bu tez çalışmasının bulgularını tartışırken karşılaştırmalar farklı hematolojik malignitelerde yapılan çalışmalara atıfta bulunulmuştur. Bu nedenledir ki bu tez çalışmasının sonuçlarını değerlendirmek adına literatürde FL'lerde sirtuinler ile ilgili mevcut olan başka bir bulgu olmadığı için çalışma kapsamına meta-analizler dahil edilmiştir.

Frazzi ve ark. FL üzerinde yaptıkları her iki çalışmalarında *SIRT1* geninin ifadesini incelemişler. 2014 yılındaki ilk çalışma, 36 FL ve 25 foliküler hiperplazi kontrol vakasını kapsamaktadır. SIRT1 ve ki-67 lokalizasyonları IHC yöntemiyle FFPE dokusunda incelenmiştir. Yapılan çalışmada FL vakalarında, ki-67 proliferasyon indeksi ile SIRT1'in ifadeleri arasında pozitif bir ilişkiyi göstermişlerdir. Ayrıca qRT-PCR yöntemiyle *SIRT1_001* izoformunun ifadesinin B lenfositlerdeki artışı ve bu artmış ifadenin *BCL6* geninin ifadesi ile pozitif korelasyona sahip olduğu saptanmıştır (371). Bu araştırmacıların 2017 yılında yaptıkları başka bir çalışmada ise 45 FL hastası ve 17 foliküler hiperplazi vakasına ait olan FFPE dokularında *SIRT1* genin metilasyon profili incelenmiş ve *SIRT1* genin FL hastalarının promotör bölgesinde azalmış metilasyon ile kontrol grubuna göre daha yüksek mRNA ifadesini bildirilmiştir. Ayrıca, *BCL6* ve *SIRT1* geni ifadeleri arasında pozitif korelasyon saptanmıştır (372). Bu bulgular lenfoma patogenezi ve B hücre tümörogenezinde epigenetik olayların katkısını gösterir. *Frazzi* ve ark. yaptıkları çalışmalarında örneklerinin ve onlara ait olan klinik verilerinin az sayıda olduğunu bildirmişlerdir. O yüzden makalede hastaların prognostik dağılımları belli değildir. Diğer bir ifade ile Frazzi ve ark'larının iki çalışmasında yer alan vaka grubu ile bu tez çalışmasındaki hasta grubuyla ne kadar uyumlu olduğu belli değildir. Bu tez çalışmasında yüksek dereceli olan (grade 3B) ve düşük dereceli FL olgularında, kontrol grubuna göre artmış ifade gösterilmiş olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. *SIRT1* genin ifade oranında anlamlı bir fark tespit edilmemiş

Çizelge 6.1. Literatürdeki B hücre kökenli hematolojik malignitelerde sirtuin üzerinde yapılan çalışmalar.

Bulgu	Malignite	Referans
SIRT1		
mRNA (qRT-PCR)/Protein ifadesinde artış (IHC)	FL	Frazzi ve ark. (371)
Promotor metilasyonun azalması ve mRNA ifadesinde artış (qRT-PCR)/ Protein ifadesinde artış (IHC)	FL	Frazzi ve ark. (372)
Protein ifadesinde artış (IHC) ve kötü prognozu ile ilişkisi	DBBHL	Jang ve ark. (373)
mRNA ifadesinde artış (qRT-PCR) ve kötü prognozu ile ilişkisi	DBBHL	Kan ve ark. (374)
mRNA ifadesinde artış (qRT-PCR) ve kötü prognozu ile ilişkisi	KLL	Wang ve ark. (340)
mRNA(Oncomine veri tabanı) /Protein ifadesinde artış (WB)	KLL	Bhalla ve ark. (375)
Protein ifadesinde artış (WB)	ALL	Jin ve ark. (376)
SIRT2		
mRNA sabit (Oncomine veri tabanı)/Protein ifadesinde artış (WB)	KLL	Bhalla ve ark. (375)
mRNA ifadesinde düşüş (qRT-PCR)	MM	Allegra ve ark. (377)
SIRT3		
Protein ifadesinde düşüş (WB)	KLL, ALL, BL, MM	Yu ve ark. (274)
Protein ifadesinde düşüş (WB) ve kötü prognozu ile ilişkisi	MCL	Yu ve ark.(274)
mRNA ifadesinde düşüş (qRT-PCR)	MM	Allegra ve ark. (377)
mRNA ifadesinde artış (qRT-PCR)	KLL	Van ve ark. (378)
mRNA (RNA-Seq)/Protein ifadesinde artış (WB)	DBBHL	Li ve ark. (276)
SIRT4		
Nüks eden hastada SIRT4 mutasyonu ve tümör baskılayıcı etkisi	Burkitt lenfoma	Wever ve ark. (379)
Myc kaynaklı B hücre lenfojenezini SIRT4 ile baskılanması	Burkitt lenfoma	Jeong ve ark. (293)
SIRT5		
mRNA ifadesinde artış (qRT-PCR)	WM	Sun ve ark. (311)
SIRT6		
mRNA ifadesinde artış (RNA-seq, qRT-PCR, GEO veri tabanı)/Protein ifadesinde artış (WB, IHC) ve kötü prognozu ile ilişkisi	DBBHL	Yang ve ark. (338)
mRNA ifadesinde artış (qRT-PCR) ve kötü prognozu ile ilişkisi	KLL	Wang ve ark. (340)
mRNA ifadesinde artış (qRT-PCR) ve uzun sağkalım ile ilişkisi	KLL	Van ve ark. (378)

Protein ifadesinde artış (IHC, WB) ve kötü prognozu ile ilişkisi	MM	Cea ve aek. (380)
SIRT7		
mRNA ifadesinde artış (qRT-PCR)	KLL	Wang ve ark. (340)
mRNA ifadesinde artış (qRT-PCR)	BCP-ALL	Vega-García ve ark. (381)

olmasının bir olası nedeni hastaların çoğunu düşük dereceli vakaların oluşturmasından kaynaklanabilir. Bu tez çalışmasında da literatürle uyumlu olarak benzer bir şekilde Ki-67 indeksi ve *SIRT1* genin ifadesi arasında pozitif ilişki saptanmıştır.

Meta-analizlerden elde edilen sonuçlar GSE12195, GSE55267, GSE68308 ve GSE35331 veri setlerinde FL hastalarında kontrollere göre *SIRT1* geninde artmış ifadeyi ortaya koymuştur.

GSE12195 setinde DBBHL çalışmasında bulunan 38 FL hastasının taze donmuş dokusundan ve 20 normal tonsil dokusundan RNA izole edilmiş ve mikrodizin analizleri yapılmıştır. Kontrol olarak normal tonsil dokularından MACS yönetimiyle germinal merkezi sentroblast, sentrosit, naif ve hafıza B hücreleri (her biri farklı bireylerden 5 numune) ayırt edilmiştir. Bu setin üzerinde yapılan meta-analiz FL hastalarında belirtilen kontroller göre *SIRT1* genin 3.45 kat daha fazla ifade edildiğini ortaya koymuştur.

GSE55267 setinde 12 EZH2 mutasyonu taşıyan ve 51 WT taze donmuş FL dokularında mikrodizin deneyi yapılmıştır. Bu veri setinde 6 normal B hücre transkriptom bilgileri kontrol olarak bulunmaktadır. Tez çalışmasında yapılan meta-analiz bu setin tüm FL vakalarında *SIRT1* genin kontroller göre 0.84 kata daha fazla ifade olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca bu veri setinde FL vakalarının grade bilgileri de verilmiştir ancak grade'ler arasında yüksek grade grubunu oluşturan grade 3B vakası bu sette bulunmamaktadır. Buna rağmen grade 1, 2 ve grade 3A hastalarında arasında meta-analiz yapılmıştır fakat sirtuinler açısından anlamlı sonuç bulunmamıştır. Biyolojik olarak FL3A hastaların grade 1 ve 2 ile benzer bir şekilde olduğundan bu anlamsız sonuç beklentiden uzak değildir.

GSE68308 veri seti MACS yöntemiyle CD3-, CD19- ve CD20- 94 FL dokularından ayırt edilmiş B hücreleri olan ve olmayan fraksiyonları ve 24 normal tonsil dokusunun B hücre fraksiyonu olmayan hücrelerinden RNA izolasyonu yapılan bir mikrodizin deneyini gösterir.

Bu deney üzerinde yapılan meta-analiz, FL hastalarının gen ifade profili belirtilen kontrol grup ile mukayese edildiğinde *SIRT1* geninde FL hastalarına ait olan örneklerde normal tonsil dokularına göre 1.20 kat daha artmış ifadeyi göstermiştir.

Ayrıca GSE35331 setinde 10 FL hastası ve bu sette bulunan 24 kontrol ile meta-analiz sonucunda *SIRT1* geninin ifadesi kontroller göre 0.62 kat daha fazla bulunmuştur. Burada ise kemik iliği mezenkimal stromal hücreleri FL hastalarından ayrıştırılmış ve sağlıklı bireylerin kemik iliği mezenkimal stromal hücreler ile mukayese edilmiştir.

Diğer setlerde FL ve kontrollerle kıyaslandığında veya hatta farklı setlerde bulunduğunda hastaların grade'leri, evreleri ve diğer klinik gruplar arasında *SIRT1* için herhangi bir anlamlı ifade değişikliği bulunmamıştır. Bunun nedeni hastaların arasındaki heterojeniteden kaynaklanabilir. Örneğin bazı vaka setlerinde özel olarak belirgin yüzey markeri taşıyan B hücreler veya EZH2 gibi mutasyonlar bulunmaktadır. Bu markerler ve mutasyonlara göre de gruplar ayrılmış ve meta-analizler yapılmıştır. Ancak sirtuinler bakımından anlamlı sonuçlar saptanmamıştır. Bu sonuçlara göre bu markerler ve mutasyonların ve hatta *sirtuin* genlerinin FL hastalığın patogenezinde ve prognozunda katkıda bulunsa da ancak daha geniş örneklem sayısında, çeşitli genetik materyallerin uygulanmasında (taze doku, FFPE, primer hücre ve hücre hatları v.b.) ve hastalığın patogenezinde ve prognozunda düşünülen diğer parametreleri dikkate alarak heterojen hasta grubunu daha homojen gruplara ayırt etmesiyle ortaya çıkabilir. Meta-analizlerde dahil olan setlerdeki hasta ve kontrol gruplarında uygulanan genetik materyaller ve RNA için kullanılan doku tipleri tablo ek 5'de tezin sonunda sunulmuştur.

Literatürde B hücre kökenli diğer hematolojik malignitelerede SIRT1 ifadesine göre birkaç çalışma mevcuttur. DBBHL, KLL ve ALL bu çalışmalarının örneklerindendir. DBBHL, B hücrelerinden köken alan en yaygın lenfoma tipidir. Bu malignite ve sirtuin ailesi ile ilgili farklı çalışmalar bulunmaktadır. 2008 yılında immünohistokimyasal yöntemle 104 DBBHL hastası üzerinde yapılan bir araştırmada; yüksek SIRT1 ifadesi ile DBBHL'ların kötü prognozu arasındaki korelasyon ileri sürülmüştür (373). Yapılan bu tez çalışmasında FLIPI prognostik indeksi ve *SIRT1* ifadesi arasında anlamlı korelasyon çıkmazsa da pozitif olduğu gözlenmiştir. *Kan* ve ark. 2018'de, *SIRT1* geninde tek nükleotid polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism-SNP) rs3758391 (*SIRT1* genin promotörün'de bir SNP) ile Çin

Han popülasyonundaki DBBHL hastalarının hayatta kalma oranı incelemeleri sonucunda negatif bir korelasyon olduğunu göstermişlerdir. Genotipleme sonuçları, *SIRT1* promotör bölgesinde rs3758391 SNP'yi taşıyan bireylerde yabanıl tip alleli olanlara göre daha iyi bir genel sağkalıma sahip olduğunu göstermiştir. Bu bulgular SIRT1'in DBBHL'lar için potansiyel bir biyobelirteç olduğunu ortaya koymuştur. Bu araştırmacılar ayrıca DBBHL'lerde *SIRT1* genin mRNA ifadesini kontrol grubuna göre daha yüksek seviyede olduğunu göstermişler (374). Tenovin-6 gibi farmakolojik inhibitörler tarafından SIRT1 enzimi hedeflemesinin faydalı sonuçları düşünülmektedir. *Yuan* ve ark. DBBHL hücre hatlarında tenovin-6 tarafından kanser hücrelerinin proliferasyonunu inhibe edebileceğini göstermişler. İlginç bir şekilde bu araştırmacılar DBBHL hücre hatlarında SIRT1/2/3'ların susturulmasını etkisiz bulmuşlar. Elde ettikleri bulgulara göre tenovin-6, SIRT1/p53 yolağından değil da LC3B-II otofaji markerin ifadesi düzeyinin artmasıyla kanser hücrelerin proliferasyonu inhibe etmiştir (382). *Wang* ve ark. 2011 yılında HDAC enzimlerinin ifadelerini mRNA seviyesinde KLL hastalarında incelemişler; yaptıkları araştırma soncunda sınıf III HDAC'lar arasında *SIRT1* ve *SIRT6* genlerinin kontrollere göre artmış ifadesini göstermişler, ayrıca *SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3* ve *SIRT6* genleri ve *CD44* ifadesi arasında pozitif korelasyon bulmuşlardır. Çalışmalarında HDAC'lar ve onlara dahil olan *SIRT1*, *SIRT2*, *SIRT3* ve *SIRT6* genlerin artmış ifadesini kötü prognoz ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir (340). *Jin* ve ark., ALL hücrelerinde SIRT1 ve SIRT2 proteinin artmış ifadesini bulmuşlar, ayrıca bu araştırıcılar tenovin-6 tarafından SIRT1'in inhibisyonunun, p53'ün hiperasetilasyonuna yol açabileceğini ve ALL hücrelerinde hücre büyümesinin inhibisyonunu ve apoptozu indükleyebileceğini ortaya koymuşlardır (376). Primer efüzyon lenfoma (PEL) hücrelerinde tenovin-6'nın SIRT1 üzerindeki inhibisyonu ve anitümör aktivasyonu bildirilmiştir (383). Foliküler lenfomada SIRT1 ifadesinin artması ve p53'ün SIRT1 tarafından deasetilasyonu ve inaktif olması düşünülerek tenovin-6 ve tenovin-1 iki SIRT1 inhibitörü, FL hastalığın üzerindeki olası etkisi araştırabilmesi düşünülebilir. SIRT1'in bir onkogen veya bir tümör baskılayıcı olabileceğini gösteren olası yorumular bildirilmiştir. Bir yandan SIRT1'in DNA onarımını ve genomik bütünlüğünü koruyarak kanserin başlamasını önler. Ancak bir tümör kitlesi oluştuktan sonra SIRT1 kanserin ilerlemesinde ve tedavi direncini kolaylaştırabileceği gösterilmiştir. Bu yorumun kanıtı araştırmalarda yüksek SIRT1'in ifadesi ve metastatik potansiyel ile bulunan ilişki ve kemoterapiye ajanlara karşı duyarlılığın azalmasıdır (237).

SIRT2 sitoplazmada bulunan ve α-tubulin bağımlı bir proteindir. Tubulin lokalizasyonuna ek olarak hücre mitoza girerken, SIRT2 hücre döngüsü boyunca dinamik bir şekilde çekirdeğe doğru yer değiştirir. Bu da SIRT2'nin kanser hücrelerinin hücre döngüsü üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olduğunu gösterir (384). B hücre soyunun lenfositlerinin kaynaklanan KLL hasta hücreleri ve hücre hatlarında yapılan bir çalışmada western blot yöntemi kullanılarak SIRT1 ve SIRT2 proteinlerinin normal hücrelere göre artmış ifadesi gözlenmiştir. Ayrıca Oncomine mikrodizin veri tabanından diferansiyel ifadelerinin sonucunda mRNA düzeyinde de *SIRT1* genin ifadesinin artmasını bulmuşlardır. Aynı data seti üzerinde *SIRT2* genin ifadesi analizleri anlamlı sonuç ortaya koymamıştır (375). Bu tez çalışmasındaki qRT-PCR deneylerinde FL hastalarında kontrol grubuna göre *SIRT2* geninin ifadesi anlamlı olarak değişmemiştir. Ancak GSE12195 veri setinde yapılan analizler 38 FL vakalarında 20 kontrol B hücrelerine göre *SIRT2* genin 3.25 kat daha fazla ifadesini göstermiştir. *Chowdhury* ve ark. B hücreli lenfoma hatların üzerinde yapılan çalışmadalarında SIRT2 inhibitör bileşiklerinin etkisini DBBHL ve Burkitt lenfomada bulmuşlardır. Mekanizmada SIRT2'nin inhibisyon etkisin BCL6 ve p53'ün asetilasyon dengesizliğinin düzeltebileceğinde açıklanmıştır (385). Multipl miyelom (MM), kemik iliğinde klonal plazma hücrelerinin aşırı çoğalmasıyla karakterize edilen bir hematolojik malignitedir. MM hastalığının tümör gelişme aşamalarında epigenetik değişiklikler sık görülen olaylardandır. 2021 yılında *Allegra* ve ark. MM hastaların *SIRT2* ve *SIRT3* genlerinin mRNA düzeyin incelediklerinde kontrol grubuna göre her iki genin düşük ifadesini bulmuşlar. Gözlenen düşük ifade hastalığın ileri evresi ve redoks düzensizliğinle ilişkili olduğu saptanmıştır (377). Benzer bir şekilde bu tez çalışmasındaki *in silico* analizler GSE65135 setinde *SIRT2* genin düşük ifadesini FL olgularında saptamıştır. Bu veri setinde 14 FL hastasının lenf nodüllerinin üzerinde yapılan mikrodizin çalışmasında meta-analizler 10 sağlıklı ve normal tonsil B ve T hücreler ile kıyaslandığında *SIRT2* genin 1.70 kat daha azalmış ifadesini ortaya koymuştur. GSE55267 veri setinde yapılan meta-analiz *SIRT2* genin FL vakalarında kontrollere göre 1.31 kat daha düşük ifadesini göstermiştir. Bu setlerde hasataların klinik olarak uygun verileri sunulmadığından daha bir ötesi analizler yapılması mümkün bulunmamıştır. Bu tez çalışmasında diğer setler üzerinde yapılan meta-analizler hem FL hastalarını kontrollerle mukayese edildiğinde ve hem FL vakalarının kendi içerilerinde bulunan klinik ve prognostik parametreler göre anlamlı sonuç bulmamıştır.

SIRT3, mitokondriyel proteinlerin asetilasyonu ve oksidatif stresini düzenler. Hematopoietik kök/progenitör hücrelerde SIRT3'ün kaybı IDH2 ve SOD2 mikondriyel enzimlerin aktivitesinin azalmasına ve oksidatif stresin artmasına neden olur. Bunun sonucunda kök hücreler sessiz durumdan çıkması ve hayatta kalma sürelerini azalmasıdır (209). *Yu* ve ark.'lara göre SIRT3, B hücre malignitelerinde, örneğin KLL'de aşağı regüle edilir. Bu araştırmacılar 2016 yılında SIRT3'ün ifadesini birkaç B hücreli malignitelerin üzerinde incelemişlerdir. Araştırma sonucunda KLL hastalarının periferik kandan alınan lenfositleri, ALL, Burkitt lenfoma, MCL ve MM hücre hatlarında (MM hücre hattına ait olan RPMI-8226 hücre hattı hariç) SIRT3'ün düşük ifadesini bulmuşlardır. MCL hastalarının takip süre bulgularına göre SIRT3'ün düşük ifadesi kötü sağkalımla ilişkilendirilmiştir. Yapılan bu araştırmada SIRT3'ün tümör baskılayıcı etkisi IDH2 ve SOD2'yi deasetilasyon ve ROS seviyesinin azalmasıyla ilişkili bulunmuştur. İlginç bir şekilde yaptıkları araştırmalarında inceledikleri B hücre malignite hatlarında SIRT3 protein ve mRNA ifadesi arasında ters korelasyon saptanmıştır. Bu tutarsızlığın açıklamasında post-transkripsiyon olayların araya girmesini önermişlerdir (274). Bununla birlikte, başka bir çalışmada KLL hücrelerinde kontrollere göre daha yüksek *SIRT3*, *SIRT6* ve *SIRT7* genlerin ifadesi (mRNA) kanıtlanmıştır (378). Bu tez çalışmasının qRT-PCR deneylerinde FL hastaların kontrol grubuna göre *SIRT3* genin ifade değişmediği gözlenmiş olsa da GSE35331 veri seti analizleri bu genin düşük ifadesini FL hastalarında bildirmiştir. Bu sette 10 FL hastasının kemik iliğinden MACS yöntemiyle ayırt edilmiş mezenkimak stromal hücreleri ile 18 sağlıklı B hücreden izole edilen RNA'lar üzerinde mikrodizin çalışması yapılmıştır. Meta-analizler FL vakalarında kontrollere göre *SIRT3* genin 0.82 kat daha düşük ifadesini ortaya koymuştur. SIRT3'ün DBBHL'deki pro-tümorijenik rolü, VavP-Bcl2 lenfoma fare modeli üzerinde incelenmiş ve *SIRT3*'ün onkogen olarak davrandığı gösterilmiştir. Bu araştırmada VavP-Bcl2 lenfoma fare modellerinde *SIRT3* genin susturulması, B hücre lenfomagenezin zayıflanmasına neden olmuştur. Aynı fare modelinde mitokondriyal hedefli sınıf I sirtuin inhibitörü olan YC8-02 uygulanması SIRT3'ün inaktif olması ve lenfoma hücrelerini etkili bir şekilde öldürülmesine sebep olmuştur. Bu çalışmada DBBHL primer hücrelerinde SIRT3'ün ifade artışı hem mRNA ve hem protein seviyesinde bulunmuştur. Ayrıca SIRT3'ün ifade artışı kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmada SIRT3'ün DBBHL hücrelerin proliferasyon, hayatta kalma ve metabolizma için gerekli olduğu ve tümör destekleyici bir rolü olduğunu kanıtlanmıştır. DBBHL'larda SIRT3'ün, lenfojenezi teşvik

etmek için GDH aktivitesini artırarak TCA döngüsü metabolizmasını hızlandırdığı kanıtlanmıştır (276). Tez çalışmasındaki meta-analizler, GSE12195 veri setinde FL grubunda *SIRT3* geninde artmış ifadesini ortaya koymuştur. Bu veri setinde 38 FL vakasının 20 normal B hücre ile kıyaslandığı bu genin 3.15 kat daha yüksek ifadesini bildirmiştir. Ayrıca GSE55267 setindeki meta-analiz sonuçlarında 63 FL vakası 6 kontrol B hücrelerine göre 0.62 kat daha artmış ifade bildirilmiştir. Özet olarak kanıtların çoğu SIRT3'ün oksidatif stresin baskılamasında ve mitokondriyal oksidatif metabolizmayı desteklemesinde katkıda bulunduğu için tümör baskılayıcı olarak davrandığını göstermektedir. İlginç bir şekilde, yaşlandıkça, SIRT3 seviyelerimiz azalır. Bu da *in vivo* karsinogenez için olumlu hücresel bir ortam oluşturabilir. Bununla birlikte litratürde lenfomada SIRT3 için onkojenik bir işlevi destekleyen bazı kritik kanıtlarda bulunmaktadır. Bu görünüşte çelişkili veriler için olası bir açıklama, SIRT3'ün tümör oluşumunu inhibe etmek için bir tümör baskılayıcı olarak hareket etmesi ve tümör zaten geliştikten sonra stres yanıtında tümör hücrelerin desteklemesidir (237).

Sirtuin'ler ailesi arasında SIRT4, nispeten az çalışılmış bir üyedir. Literatürde SIRT4 neredeyse tüm kanıtlara göre bir tümör baskılayıcı olduğuna işaret etmektedir. MYC kaynaklı Burkitt lenfoma hücrelerinde SIRT4'ün aşırı ifadesi, mitokondride glutamin metabolizmasını inhibe ederek, hücre proliferasyonunu inhibe edip ve glikoliz inhibitörleriyle hücre ölümünü indükler. Aynı araştırmada MYC-kaynaklı B hücreli lenfoma transgenik fare modellerinde, SIRT4 tarafından tümör oluşumu baskılanması kanıtlanmıştır (293). Yapılan başka bir çalışmada nük eden Burkitt lenfoma hastalarında *SIRT4* geninde mutasyon olduğu tespit edilmiş; burada *SIRT4* geninde oluşan mutasyonun tümör baskılayıcı olarak davrandığı bildirilmiştir. DNA hasarı durumunda DNA'nın etkili tamiri için glutamin metabolizmasını inhibe ettiği kanıtlanmıştır (379). Bu tez çalışmasında qRT-PCR deneylerinde FL vakaları ve kontrol gruplar arasında *SIRT4* geninde ifade değişikliği bulunmamıştır. Ancak meta-analizler, FL'lerde GSE12195 ve GSE55267 veri setlerinde bu genin ifade artışını ve GSE65135'de düşük ifadesini göstermiştir. GSE12195 setindeki bulunan 38 FL transkriptom analizleri bu setteki 20 farklı kontrol B hücrelerle kıyaslandığı sonucunda *SIRT4* genin FL vakalarında 1.42 kat daha yüksek ifade olduğunu göstermiştir. GSE55267 setinde de EZH2 mutasyonu taşıyan ve taşımayan 63 FL vakası ve 6 kontrol B hücreleri üzerinde yapılan meta-analiz bu genin FL hastalarında 0.5 kat ifade artışını ortaya koymuştur. Ancak bu sonuçların aksine GSE65135 veri setindeki 14 FL vakası ve 10 kontrol

B hücreleri arasındaki yapılan meta-analizler bu gende 2.33 kat daha düşük ifadeyi bulmuştur. SIRT4'ün tümör oluşumu ve gelişimindeki inhibisyon rolü iki mekanizmayla açıklanmıştır. Bunların birisi DNA hasarı olduğunda glutamin metabolizmasının inhibisyonu ve hücre siklusu ilerlemesisin engellemesidir (281). Kanser hücrelerinde, SIRT4'ün düşük ifadesi, glutamat dehidrojenazın (GDH) artmasına ve dolayısıyla kanser hücrelerinin büyümesini destekleyen glutamin üretiminin artmasına neden olur (237). SIRT4'ün tümör baskılayıcı olduğuna dair diğer hipotez mTOR yolağının atipik etkileşimi sonucunda GDH aktivitesinin kontrolü ve SIRT4 ifadesinin inhibisyonudur (281). mTOR yolağı CREB proteinini degrede ederek SIRT4'ün ifadesini düşürür. Bunun da sonucu GDH aktivasyonunun ve kanser hücrelerinde glutamin metabolizmasının artışıdır (237).

Çoğu araştırmalar SIRT5'in, bir onkogen olarak davrandığını göstermektedir. Hematolojik malignitelerde SIRT5 ile ilgili çalışmalar çok az sayıda bulunmaktadır. hücre kökenli olan hematolojik malignitelerde SIRT5 bugüne kadar sadece Waldenström makroglobulinemi'de (WM) araştırılmıştır. Bu araştırmaya göre WM hastalarının tümör dokuları sağlıklı bireylere göre daha yüksek seviyede *SIRT5*'in mRNA ifadesini göstermiştir. Bu araştırmaya göre B hücreli malignitesi olan WM hastaların tümör dokuları sağlıklı bireylere göre daha yüksek seviyede *SIRT5* mRNA ifadesi göstermiştir (311). Tezde yapılan qRT-PCR deneylerinde, *SIRT5* geni ifadesi, hasta ve kontrol grubu ile kıyaslandığında ifade değişimi olmamakla birlikte hastalığın evresi ve B-semptomlarla negatif korelasyonu göstermiştir. Ki-67 proliferasyon indeksi ile *SIRT5* gen ifadesinin korelasyonuna bakıldığında pozitif bir ilişki saptanmıştır. Ayrıca GSE12195 ve GSE55267 veri setlerinde FL vakalarında kontrol gruplara göre bu genin artmış ifadesi ve GSE65135 veri seti ise *SIRT5* genin düşük ifadesini bildirmiştir. 38 FL vakası bulunan GSE12195 setinde bu genin ifadesi 20 kontrol vakasıyla kıyaslandığında 2.72 kat ifade atışını göstermiştir. GSE55267 setinde ise 63 FL hastası ve 6 kontrol vakadan oluşmuştur. Bu setin meta-analizleri FL hastalarında kontroller göre bu genin 1.03 kata daha fazla ifade olduğunu ortaya koymuştur. Ancak GSE65135 sitinde yapılan meta-analiz bu genin FL'lerde 1.73 kat daha düşük olduğunu bildirmiştir. Ancak her veri setinde hastaların biyolojik ve klinik dağılımları daha ayrıntılı bir şekilde bilgileri sunulduğu durumunda daha detaylı analizler ve yorum yapabilme şansı olabiliridir. Halihazırdaki çalışmalarda ve bu çalışmada FL patogenezinde *SIRT5* geninin ifade değişilmesi anlamlı olarak henüz tespit edilmemişse de bu çalışmada hasta grubu ile kontrol

grubu karşılaştırıldığında *SIRT5* genin ifadesiyle evre ve B semptomları arasında olan anlamlı korelasyon ilişkisi SIRT5'in potansiyel prognostik bir marker olduğu gösterilebilir.

SIRT5'in rolü kanser mekanizmasında net değildir. Literatürde bu konuda az sayıda bilgi olmakla birikte SIRT5'in metabolik yolakların üzerinden kanser gelişimi ve ilerlemesindeki etkisini gösterir. Asetil olmayan lizin modifikasyonları SIRT5'in birçoğu hedeflerini oluşturur (237). Yapılan bir çalışmaya göre, SIRT5'in glikolitik enzimlerinin demalonilasyonu, glikolizi pozitif olarak düzenleyip ve bu şekilde SIRT5'in kanser metabolizmasında katkısını sağlar (205). Kanserde bu işlev, kanser hücrelerinin aerobik glikolizin gerçekleştirdiği Warburg etkisini güçlendirebilir. SIRT5 ayrıca üre döngüsünü de düzenler. Kanser hücreleri genellikle glutamine bağımlıdır. Glutamin metabolizması amonyağın üretimini arttırır. Bu nedenle kanser hücrelerinin bu fazla amonyağı ortadan kaldırması için SIRT5'in yüksek seviyede regülasyonu bir avantajdır (237). *SIRT5* genin diğer kanserlerdeki etkisi göz önüne alındığında, bu genin etkisi hematolojik kanserlerde gelecekteki araştırmaların bir alanını oluşturabilir.

Birçok çalışma, SIRT6 düzensizliğini hematolojik malignitelerle ilişkilendirmiştir. Bu tez çalışmasında qRT-PCR reaksiyonlarında, yüksek dereceli FL hastalarında kontrol grubu ve düşük dereceli hastalara göre ifade artışı gözlenmiştir. Düşük dereceli hastaların kontrollere göre artan ifadesinin anlamlı olmadığı saptanmıştır. Bu bulgular *SIRT6* genin FL patogenezinde ve prognozunda potansiyel bir biyobelirteç olduğunu gösterir. Benzer bir şekilde GSE12195 ve GSE68308 üzerinde yapılan *in silico* analizler de FL hastalarında kontroller göre *SIRT6* geninde ifade artışını gösterirken bu analizler GSE55267 setinde bu genin FL hastalarında düşük ifadesini bildirmiştir. Yapılan meta-analizler GSE12915 setinde FL hastalarında bu genin kontroller göre 2.55 kat ve GSE68308 setinde 0.71 kat ifade artışını bildirmiştir. Ancak GSE55267 setinde bulunan 63 FL vakası 6 kontrole göre bu genin 1.07 kat daha düşük ifadesini göstermiştir. GSE55267 setinde diğer sirtuinler gibi grade dağılımı bulunduğuna rağmen bu sette yüksek derece 3B vakası olmadığı için tez hipotezine uyumlu analize imkan sağlanmamıştır. Bu veri setinde 12 EZH2 mutasyonlu ve 51 EZH2 mutasyonu taşımayan vaka bulunur. Bu iki grupa göre yapılan meta-analizler sirtuinlerin ifadelerinde bir değişik olmadığını göstermiştir. Ancak bu iki grup kontrol grupla ayrı ayrı mukayese edildiğinde tüm FL vakalar ve kontrol grupla mukayesesi gibi sirtuinler için benzer sonuçlar

ortaya koymuştur. Bu bulgular EZH2 ve sirtuinlerin FL patogenezinde ve prognozunda tek başına katkıda olduklarını gösterirse bağımsız olduklarını gösterir.

B hücre kökenli hemaolojik malignitelerde bugüne kadar SIRT6'nın ifadesi DBBHL, KLL ve MM'de araştırılmıştır. *Yang* ve ark. *in vitro* çalışmalarında hem DBBHL hücre hatlarında ve hem DBBHL hastalarının FFPE dokularında SIRT6'nin artmış ifadesini mRNA ve protein seviyesini göstermişlerdir. Bu ifade artışı kötü prognozla ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen bulgulara göre *SIRT6* geni ifadesi ve FLIPI prognostik indeksi arasında anlamlı pozitif korelasyon olduğunu gösterilmiştir. Yüksek dereceli hastalarda gözlenen *SIRT6* geni ifade artışı ve FLIPI indeksi ile saptanan pozitif korelasyon bu genin potansiyel prognostik belirteç olduğu fikrini ortaya koyabilir. *Yang* ve ark.'ın araştırmalarına göre SIRT6, PI3K/AKT/mTOR yolağını aktive ederek kanserin ilerlemesini kolaylaştırır. Ayrıca, SIRT6 inhibisyonu veya susturulması, ilaç direncinin azalmasına ve apoptotik hücre ölümünün indüklenmesine neden olması gösterilmiştir. Aslında LY1 ve LY8 DBBHL hücre hatlarında SIRT6'nin susturulması kesilmiş PARP moleküllerinin artışı, PI3K yolağın çeşitli fosforillenmiş hedeflerinin azalması (PI3K (p110), Akt (Ser473) ve p-mTOR gibi) ve FoxO1 onkopresör seviyesinin artışıyla apoptotik kaskadı destekler (338). 2011 yılında *Wang* ve ark. KLL hastaları üzerinde HDAC izoenzimlerinin incelemeleri sonucunda sınıf III HDAC'larda *SIRT6* genin ifadesini kontrollere göre 4 kat daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca bu gendeki bulunan artmış ifadeyi, CD44 ifadesi ve kötü prognozla ilişkili olduğunu göstermişlerdir (340). Bu çalışmada *SIRT6* geni ve folikül merkez veya germinal merkez B hücreleri belirteci olan CD10 ifadesi arasında negatif korelasyon bulunmuştur. CD10 foliküler lenfoma için diyagnostik belirteçlerdendir (386). Klinik bulgulara göre bu tez çalışmasında bulunan düşük dereceli vakalarda sadece 3'ünün CD10 ifadesi yokken 6 yüksek dereceli vakanın 4'ünde CD10 ifadesi bulunmamıştır. Literatürde FL hastalarında CD10 azalmış ifadesinin hastalığın yüksek derecesi ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (387). Bu bulgular bu tez çalışmasında yüksek dereceli FL hastalarında görülen *SIRT6* geni artmış ifadesini hastalığın kötü prognozu ile ilişkili olduğu fikrini ortaya koyabilir. 200 KLL hastasının periferik kan üzerinde *HDAC* genleri ve onlara dahil olmak üzere *sirtuin*'lerin ifade profili mRNA seviyesinde iki kontrol grubuna göre incelenmiştir. Sonuçta *SIRT3, SIRT6* ve *SIRT7* genlerinde her iki kontrole göre artmış ifade gözlenmiştir. Ancak bu çalışmada, yüksek *SIRT2, SIRT3* ve *SIR6* ifadesi olan hastaların daha iyi prognoz ve sağkalımları bildirilmiştir (378). *Cea* ve ark. MM hücrelerinde DNA hasar

yanıtında SIRT6 proteinin aşırı ifadesini tümörogenezde göstermişlerdir. Bu artmış ifade hastalığın kötü prognoz ve kısa sağkalımı ile ilişkilendirilmiştir (380).

İlginç bir şekilde ve hematolojik malignitelerle ilgili olan SIRT7 lokusu (17q25.3), akut lösemi ve lenfomalarda kromozomal değişikliklerden sıklıkla etkilenen bir bölgedir (342). Bu tez çalışmasında qRT-PCR deneylerinde SIRT7 için 3 set primer sentezlemesine rağmen başarılı reaksiyonlar elde edilmemiştir. Bu başarısızlığın nedeni FFPE dokularında bu geni taşıyan bölgenin degrede olduğuna daha yatkın olduğundan düşünülür. Zira farklı hücre hatlarında ve primer hücrelerinde bu primerler ile yapılan qRT-PCR reaksiyonların başarılı olduğu ve ayrıca başka bir çalışmadan gelen FFPE dokusunun da başarısız olduğu bu bulguya önemli bir kanıttır. Buna rağmen FL vakalarına ait olan mikrodizin deneylerinin üzerinde yapılan meta-analizler bu gen için 3 sette anlamlı ifade değişikliği ortaya koymuştur. GSE12195 ve GSE12453 veri setlerinde FL olgularında *SIRT7* geninde ifade artışı gözlenmiştir. GSE12195 veri setindeki yapılan meta-analizler *SIRT7* genin FL hasta örneklerinde kontroller göre 3.51 kat daha fazla ifade edildiğini ortaya koymuştur. Ancak GSE68308 setindeki analizler bu genin FL vakalarında 0.81 kat daha düşük olduğunu bildirmiştir. GSE12453 setinde yalnızca FL tümör hücrelerinde diferansiyel gen ekspresyonunun tanımlanmasını geliştirmek için yüksek B hücre içeriğine sahip FL hürlerinden lazer mikrodiseksiyon yapılmıştır. Bu çalışmada hodgkin lenfoma temelli yapılan bir araştırma olduğundan sadece 5 FL vakasını içerir. 25 vakayı oluşturan Kontrol grubu tonsil dokusundan izole edilmiş ve değişik normal B hücrelerinin havuzundan oluşmuştur. Bu sette meta-analiz sonuçları *SIRT7* geninde kontroller göre 0.72 kat daha fazla ifadeyi bildirmiştir. Bu sette diğer genler için herhangi bir ifade değişikliği bulunmamıştır. diğer B hücre kökenli malignitelerden KLL hastalarının periferal kanlarında yapılan bir çalışmaya göre bu hastalıkta *SIRT7*'nın mRNA ifadesi artmış olup ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (340). SIRT7 aşırı ifadesi ayrıca KMT2A yeniden düzenlenmeleri ile B-ALL ile ilişkilendirilmiştir. 134 pediatrik akut lösemi vakası üzerinde yapılan bir çalışmada farklı HDAC'lar ve onlara dahil *SIRT1* ve *SIRT7* genlerinin ifadeleri incelenmiştir. Bu çalışmada 11 kontrol ile kıyaslandığında *SIRT1* ve *SIRT7* genlerin artmış mRNA ifadesi heterojen bir şekilde B hücreli öncül-ALL (BCP-ALL) hastalarında saptanmıştır (381). Önceki çalışmalar kanserlerde SIRT7'nin etkileşimini KMT2A ile göstermiştir. Ancak lösemi oluşumunda ve gelişiminde bu etkileşimin de gerçekten rolü olduğuna dair araştırmalar gerekmektedir (204).

6.1.2.2. B hücre kökenli olmayan hematolojik maligniteler

B hücre kökenli olmayan hematolojik malignitelerde bugüne kadar sirtuinler üzerinde yapılan çalışmalar Çizelge 6.2'de özetlenmiştir. SIRT1'in ifadesi B hücre kökenli olmayan hematolojik malignitelerde bugüne kadar kronik miyeloid lösemi (KML), akut miyeloid lösemi (AML), miyelodisplastik sendrom (MDS), kutanöz T hücreli lenfomada (KTHL) ve erişkin T hücreli lösemi-lenfoma (ETLL) maligniteler araştırılmıştır. AML kemik iliğinde hiperproliferatif ve olgunlaşmamış lösemik blastlar kaynaklanan heterojen bir malignitedir. 2014 yılında AML hastalarının kemik iliğinden izole edilen $CD34^{+}CD38^{-}$ hücrelerinde SIRT1'in artmış ifadesi mRNA ve protein düzeyinde kanıtlanmıştır. Ayrıca bu çalışmada SIRT1 yüksek ve orta risk hastalarda düşük risk hastalara göre daha yüksek seviyede ifadesi gözlenmiştir (388). Bu bulguların aksine, bazı çalışmalarda *SIRT1* gen ifadesini AML ve KLL hasta örneklerinde periferik kan mononükleer hücrelere (PBMC'ler) kıyaslandığında benzer olduğunu ve değişmediğini, göstermişlerdir (389). Bu tez çalışmasında qRT-PCR deneylerinde FL hastaları ve kontrol gruplar arasında *SIRT1* geni ifadesinde anlamlı fark bulunmamıştır. Ancak tez çalışmasındaki meta-analizler GSE12195, GSE55267, GSE68308 ve GSE35331 veri setlerinde *SIRT1* genin FL vakalarında ifade artışını göstermiştir. AML'ye benzer şekilde KML lösemik kök hücrelerinde (LKH) SIRT1'in normal olgulara göre artmış ifadesi kanıtlanmıştır (390). *Nihal* ve ark. SIRT1'in ifadesini kutanöz T hücreli lenfomada (KTHL) hücre hatlarında incelemişlerdir. Sonuçta bu hücrelerde normal lenfositlere göre SIRT1'n artmış ifadesini bulmuşlardır. Bu çalışmada, SIRT1'in tenovin-1 ile inhibisyonu hücresel metabolizmanın ve proliferasyonun azalması ve apoptozun artması ile sonuçlanmıştır (391). Bu çalışmada SIRT1 proteinin ifadesi akut ETLL hücrelerinde yüksek oranda ifade edilirse de kronik ETLL'de bu ifade artışı anlamlı bulunmamıştır. Bununla birlikte mRNA ifade düzeyinde ETLL hastaları ve kontroller arasında anlamlı fark bulunmamıştır. Bu araştırmacılar bunun nedeninin transkripsiyon sonrası mekanizmalardan kaynaklı olduğunu düşünmüşlerdir (392). mRNA ifadesinin değişilmemesi ve protein düzeyindeki ifade artışı diğer nedeni transkriptom ve proteom dinamiğinden kaynaklı olabilir. Bunlarda proteinin yarı ömrü ve degradasyon hızıdır (393). Bu çalışmada SIRT1 inhibitörü olan *sirtinol*, NF-κB sinyal yolağın inhibisyonu yoluyla ETLL hücrelerinin apoptozunu indüklemiştir (392). MDS hematopoetik kök hücrelerinden kaynaklanan (HKH) bir grup hematolojik kanser tipidir. *Sun* ve ark. 2018 yılındaki çalışmalarında MDS HKH'lerinde SIRT1 proteinin düşük ifadesini bulmuşken bu genin mRNA ifadesini normal

Çizelge 6.2. Literatürdeki B hücre kökenli olmayan hematolojik malignitelerde sirtuin üzerinde yapılan çalışmalar.

Bulgu	Malignite	Referans
SIRT1		
mRNA (qRT-PCR)/Protein ifadesinde artış (WB)	AML	Li ve ark. (388)
mRNA (qRT-PCR)/Protein ifadesinde artış (WB)	KML	Li ve ark. (390)
Protein ifadesinde artış (WB)	KTHL	Nihal ve ark. (391)
Protein ifadesinde artış (WB)	ETLL	Kozako ve ark. (392)
Protein ifadesinde düşüş (WB)	MDS	Sun ve ark. (394)
SIRT2		
mRNA (mikrodizin-qRT-PCR)/Protein ifadesinde artış (WB)	AML	Dan ve ark. (395)
mRNA ifadesinde artış (qRT-PCR)	AML, ALL, KML, ET, PV, MPN, Çocuk-ALL	Xu ve ark. (396)
mRNA ifadesinde artış ve kötü prognozu ile ilişkisi TCGA veri tabanı RNA-seq/GEO veri tabanı mikrodizin	AML	Deng ve ark. (397)
SIRT4		
mRNA ifadesinde düşüş (qRT-PCR)	AML	Bradbury ve ark. (294)
mRNA ifadesinde düşüş (mikrodizin)	ETLL	Choi ve ark. (398)
SIRT6		
mRNA ifadesinde artış (GEO veri tabanı mikrodizin) /Protein ifadesinde artış (WB) ve kötü prognozu ile ilişkisi	AML	Cagnetta ve ark. (339)
mRNA (qRT-PCR)/Protein ifadesinde artış (WB) ve kötü prognozu ile ilişkisi	AML	Zhang ve ark. (399)
Protein ifadesinde artış (WB) ve kötü prognozu ile ilişkisi	AML, ALL, MDS	Gaál ve ark. (400)
SIRT7		
mRNA (qRT-PCR)/protein ifadesinde düşüş	AML-KML	Kaiser ve ark. (401)
mRNA ifadesinde artış (qRT-PCR)	T-ALL	Vega-García ve ark. (381)

olgularla aynı düzeyde olduğunu göstermişlerdir. Çalışmalarında SIRT1 mRNA'sının iki miR-9 ve miR-34a tarafından baskılanmasın ortaya koymuşlardır (394).

Hematolojik malignitelerde, SIRT2'nin onkojenik olduğuna dair bazı kanıtlar mevcuttur (237). Sağlıklı hematopoietik progenitör hücrelere kıyaslarken SIRT2'nin aşırı ifadesi (hem protein hem de mRNA düzeyinde) birincil AML blast'larında gösterilmiştir (237, 395). Xu ve ark. AML, ALL, esansiyel trombositemi (ET), KML, polisitemiya vera (PV) ve miyeloproliferatif neoplazi (MPN) hastaların kemik iliğinden alınan örnekleri üzerinde

yaptıkları çalışmalarında SIRT2'in sağlıklı kontroller göre artmış ifadesini göstermişler. Bu araştırmacılar nüks gösteren AML hastalarında primer ve yeni tanı alan hastalara göre SIRT2'nın daha artmış ifadesini bildirmişler (396). 2016 yılında Deng ve ark. Kanser Genom Atlası (The Cancer Genome Atlas-TCGA) veri tabanından 167 tedavi olmayan AML hastanın verileri üzerindeki yaptıkları analiz sonucunda SIRT2'nin artmış ifadesini daha kötü prognozu olan hastalarda bulmuşlar (397). Yapılan bu tez çalışmasında deneylerin sonucunda *SIRT2* geninde ifade değişimi saptanmamıştır. Ancak meta-analizler GSE12195 veri setinde bu genin FL olgularında kontrollere göre ifade artışını gösterirken GSE55267 ve GSE65135 veri setlerinde düşük ifade saptanmıştır. AML hücre hatlarındaki yapılan *in vitro* araştırmalarında ve fare ksenograft çalışmalarında, SIRT2 inhibitörlerinin uygulanması sonucunda, AML hücrelerinin proliferasyonun azalması ve apoptozun artışı gözlenmiştir (385, 395, 402, 403). SIRT2'nin onkojenik rolünü açıklayan potansiyel mekanizmalardan birisi, peroksiredoksin-1 enzimin (PRDX1) SIRT2 tarafından deasetile edilmesi ve akabinde bu enzimin aktivitesinin azalmasıdır. PRDX1 çeşitli ROS'ların ortadan kaldırması için antioksidan proteinlerdir (237).

Bugüne kadar B hücreli olmayan hematolojik malignitelerde SIRT3 üzerinde pek çok araştırma yapılmamıştır. Genel olarak bu çalışmalar az sayıda olursa da SIRT3 inhibitörleri ve bu proteinin kemotrapi direncinde olan etkisi konusunda yapılmıştır (404, 405). Yapılan bu tez çalışmasının deneylerinde FL vakaları ve kontrol grubu arasında *SIRT3* genin ifade düzeyinde anlamlı fark bulunmamıştır. Meta-analizlerden elde edilen sonuçlar bu genin GSE12195 ve GSE55267 veri setlerinde FL'lerde kontrollere göre ifade artışını ve GSE35331 setinde düşük ifadesini göstermiştir. SIRT3'ün tümör promotör etkisi, özellikle oksidatif fosforilasyon (OxPhos) bağımlılığı olan bazı hematolojik malignitelerde incelenmiştir (406). Ma ve ark. SIRT3'ün deasetilaz aktivitesinin kemorezistans olduğunu AML'de mitokondriyal OxPhos ve ROS üretiminin düşük regülasyonu, yoluyla bulmuştur. Bu çalışma AML hatalığında indüksiyon tedavi sırasında ortaya çıkan kemorezistansı atlatmak için mitokondrinin hedeflenmesi ve SIRT3 deasetilaz aktivitesinin inhibe etmesini önermiştir (404). AML'nin nadir alt tipi olan eritrolösemi ve T-hücre lenfomalar üzerinde yapılan bir çalışmada HDAC sınıf 3'ün inhibitörü olan A671'in uygulanması SIRT3'ün inhibasyonu ve hücrelerin apoptozuna neden olmuştur (407). 2021 yılında *O'Brien* ve ark., AML hücre hatlarında *SIRT3* geninin susturulması sonucunda hücrelerin canlılığın azalmasını ve koloni oluşma potansiyelinin azalmasını göstermişlerdir. Aynı araştırmada

SIRT3 inhibitörü olan YC8, AML hücreler üzerinde uygulanması sonucunda kontrollere göre benzer bir şekilde koloni oluşma potansiyelin azalmasını ortaya koymuşlardır. Bu araştırmacılar çalışmalarında SIRT3'ün inhibasyonu TCA ve yağ asidi oksidasyonu yolaklarıyla ATP üretimi ve AML hücrelerin ölümüne neden olduğunu göstermişlerdir (408).

SIRT4, kanser hücrelerinin mitokondrilerinde glutamin metabolizmasını inhibe ettiği için bir tümör baskılayıcı olarak görev alır. *Choi* ve ark. T hücre lösemide *SIRT4*'ün düşük mRNA ifadesini göstermişler (398). Bradbury ve ark. kemik iliğinden alınan AML primer hücrelerinde, 18 *HDAC* ve onlara dahil olan *sirtuin* genlerinin ifadelerini 4 kontrol ile incelemeleri sonucunda *sirtuin*'lerde *SIRT1*'in artmış ifadesini ve *SIRT4*'ün azalmış ifadelerini kontrollere kıyaslandığında saptamışlardır (294). Yapılan bu çalışmanın deneylerinde FL ve hastalar grubu arasında *SIRT4* geninde ifade değişimi olmamakla birlikte *in silico* analizler, GSE12195 ve GSE55267 veri setlerinde FL olgularında kontrol gruplarına göre bu genin artmış ifadesini ve GSE65135 setinde azalmış ifadesi ortaya koymuştur. SIRT4 enzimi aktivasyonu ve ifadesinin artması kanser tedavisinde terapötik bir amaçtır (237). mTOR yolağı transkripsyon faktörü olan CREB2'nin proteazomal degradasyonu ve ardından *SIRT4* genin ifadesinin azalmasını sağlar. Bunun da sonucu glutamat dehidrojenaz aktivasyonunu artırması ve kanser hücrelerinde glutamin metabolizmasını artırmasıdır. mTORC1 inhibitörü olan Rapamisin (veya klinik'te sirolimus olarak kullanılan ilaç), tarafından SIRT4'ün ifadesinin artması gösterilmiştir (287). Bu nedenle hematolojik maligniteler de dahil olmak üzere belirli kanserlerde trapötik ajan olduğu düşünülmektedir.

B hücreli olmayan hematolojik malignitelerde SIRT5 konusunda pek çok araştırma bulunmamaktadır. 2021 yılında yayınlanan bir çalışmada, *Yan* ve ark., birçok primer akut miyeloid lösemi (AML) örneklerin ve hücre hatlarının SIRT5'e bağımlı olduklarını göstermişlerdir. Bu araştırmacılara göre AML hücrelerinde mitokondriyal deasilaz SIRT5, mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu, redoks homeostazını ve glutaminolizi destekler. Bu çalışmada yeni SIRT5 inhibitörü olan NRD167, AML'lerde SIRT5'i verimli bir şekilde hedeflediği gösterilmiştir. Bulgularına göre SIRT5 yeni inhibitörü olan NRD167, klinikte AML hastalarında yeni bir terapötik yaklaşım olabileceği düşünülmektedir (312). Bu tezdeki qRT-PCR deneyleri *SIRT5* geninde hasta ve kontrol gruplar arasında ifade değişikliği göstermemiştir. Yapılan meta-analizlerde GSE12195 ve GSE55267 setlerinde hasta

gruplarında kontrol gruplarına göre bu genin artmış ifadesi ve GSE65135 veri setinde azalmış ifadesi saptanmıştır.

AML'de *SIRT6* genin kromozomal lokusu olan 19p13.3 bölgesinde sık kırılma olduğunu kanıtlayan çalışmalar bulunmaktadır (237). Üç yüz kadar AML hastasında lösemik $CD34^+$ blastları üzerinde yapılan bir çalışmada normal $CD34^+$ hematopoietik progenitörlere göre *SIRT6* geninin sürekli ifade artışı gözlenmiştir. AML hücrelerinde SIRT6'nın kaybı, genomik kararsızlığa neden olur (380), böylece SIRT6 kaybı klinik uygulamalarda daunorubisin (DNR) ve sitarabin (ARA-C) gibi DNA'ya zarar veren ajanların aşırı duyarlılığını tetikler (339). Çalışmalar, AML de dahil olmak üzere hematolojik kanserlerin devamlı DNA hasarını ve ayrıca sürekli aktive olan bir DNA onarım yanıtını göstermiştir. Bu nedenle, SIRT6 inhibisyonu ile yüksek DNA hasarı ve azaltılmış DNA onarımını içeren stratejiler, tümör büyümesini potansiyel olarak azaltabilir (339, 380). 2019 yılında yayınlanan bir araştırmada AML'de kontrollere göre *SIRT6*'nin yüksek ifadesi saptanmıştır. Bu çalışmada uzun kodlanmayan LINC00319'un etkisi post-transkripsiyonel seviyesinde AML lökomogenezinde incelenmiştir. Bulgulara göre LINC00319 bir uzun kodlanmayan olan RNA, *SIRT6* genin mRNA molekülün FUS ribonükleoproteinin etkileşimiyle AML hücrelerinde stabilize eder. Böylece SIRT6 aracılı, LINC00319, AML hücrelerinin prolifreasyonu ve apoptozun inhibasyonunda katılması gösterilmiştir (399). *Gaál* ve ark., 45 kemik iliği örneğine dahil olan 32 AML hastalarının örneklerinde HDAC4 ve SIRT6 histon deasetilaz enzimlerinin yükselmiş ifadelerinin ve bu iki enzimin ifadelerinin arasında güçlü ve pozitif korelasyonun olduğunu göstermişlerdir. Bulunan bu ilişkiye göre lösemi hastalarında HDAC enzimlerini inhibe eden potansiyel yeni terapötik yaklaşımların faydalı olduğunu öne sürmüşlerdir (400). Yapılan bu tez çalışmasında incelenen 6 *sirtuin* genin ifadeleri arasında pozitif ve güçlü bir korelasyon gözlenmiştir. Yukarıda belirtilen çalışmaya hariç bugüne dek hematolojik malignitelerde histon deasetilazlar ve onlara dahil olmak üzere sirtuin'lerin ifade korelasyonları incelenmemiştir. 2022 yılındaki yayınlanan bir çalışmada 17 hematolojik kanser olmayan hücre hatlarında 10 HDAC izoenzimleri ve onlara dahil sirtuin'lerin ifade korelasyonları ve onların 23 antikanser ilaçlarına karşı duyarlılıkları incelenmiştir. Yapılan çalışmada sirtuinler grubu içinde, SIRT1 ile SIRT3, SIRT6 ve SIRT7 ve ayrıca SIRT6 ve SIRT3 aralarında anlamlı pozitif korelasyonlar saptanmıştır. Bu çalışmada ifade ilişkileri olan HDAC/SIRT'lerin kemoterapötiklerle potansiyel kombinasyon inhibasyonu incelenmiştir. Sonuçta sisplatin, lomustin ve topotekan

kombinasyonları başarılı bir şekilde uygulanmaları önerilmiştir. Bu araştırmada bulunan pozitif korelasyonların nedenin bu genlerin aynı kromozom üzerinde yakın lokusta bulundukları açıklanmıştır (409). Ancak NCBI veri tabanındaki bilgiler bu genlerin farklı lokusta olduklarını göstermektedir.

SIRT6'nın kanserdeki ikili rolü göz önüne alındığında, bu enzim için inhibitörler ve aktivatörler geliştirilmiştir. Bu bağlamda SIRT6'nın farklı kanserlerde tümör baskılayıcı veya geliştirmesindeki olduğu rolüne bağlı bu enzimin aktivasyonu veya inhibisyonu kişiselleştirilmiş farmakolojisine yol açar. Tez çalışmamızda *sirtuin* ailesi genler arasında *SIRT6* genin ifadesi yüksek dereceli FL hastalarında kontrol ve düşük derecelilere göre yüksek ifadesi gözlenmiş olup ve FLIPI prognostik marker ile ilişkilendirilmiştir. Bu yüzden FL tedavisinde SIRT6'yı hedefleyen terapötik inhibitörler bu hastalığın destekleyici veya alternatif tedavi olarak önerilebilir. Bu inhibitörler, DNA onarım mekanizmaları, hücre farklılaşması inhibisyonu ve inflamatuar yanıt gibi kanser ilerlemesine katkıda bulunan farklı SIRT6 aracılı yolakları hedefleyebilir. Literatürde bugüne kadar SIRT6'nın inhibasyonu için Quinazolinediones, Salicylates (OSS-128167), Trichostatin A, Doğal polifenoller, Lizin bazlı peptitler, fenilpiperazinler gibi değişik bileşenler bulunmuştur (321). Bu inhibatörler arasında, OSS_128167 DBBHL hücre hatlarında ve fare ksenograft üzerinde araştırılmıştır. DBBHL hücre hatlarında hücre proliferasyonunu azalması, apoptozun indüklenmesi ve hücre döngüsü ilerlemesini engellediği bulunmuştur. Ksenograft modelinde ise OSS_128167, tümör büyümesini güçlü bir şekilde inhibe etmiştir (337, 338). FL üzerinde araştırımalar gerekmektedir.

SIRT7'nin H3K18Ac'yi deasetille etmesiyle, tümör baskılayıcı genlerin ifadesini inaktive eder. Bu hipoasetilasyon durumu kanser hücrelerinin fenotipi ve onkogenik transformasyon ile ilişkilidir (410). SIRT7 genomik stabilite ve DNA onarımı için önemli olduğundan, transforme olmayan normal hücrelerin korunmasında da katkıda bulunur. Ancak yapılan araştırmalara göre diğer sirtuinler gibi önce kansere dönüşen hücrelerin ilerlemesi ve kemoterapiye direncinde rolü olduğu gösterilmiştir (237). SIRT7 belirgin bir şekilde hematopoietik hücrelerde, özellikle miyeloid progenitör hücrelerde ifade edilir (342). T-ALL daha çok çocuklarda ve ergenlerde tanısı olan ve gelişen bir T lenfositinden kaynaklanan agresif bir lösemi tipidir. 0-18 yaşlarındaki pediatrik akut lösemi vakaları üzerinde yapılan bir çalışmada T-ALL hastalarında *SIRT1* ve *SIRT7* genlerinin ifade artışın

saptanmıştır. Bu çalışmada AML vakalarında SIRT1 ve SIRT7 genlerinde artmış ifade rastlanmamıştır (381). Bu tez çalışmasında *SIRT7* geni için başarılı qRT-PCR deneylerin gerçekleşmediğinden bu gen için sonuç elde edilmemiştir. Ancak yapılan meta-analizler GSE12195 ve GSE12453 veri setlerinde bu gen için FL vakalarında kontroller göre artmış ifadeyi tespit ederken, GSE68308 veri seti bu genin FL'lerde düşük ifadesinin bildirmiştir. Bu veri setin sonucuna uyumlu bir şekilde yapılan başka bir araştırmada SIRT7 ifadesi yaşlanan lökositlerde azalmasıyla beraber AML ve KML hastalarında düşük *SIRT7* mRNA seviyeleri tespit edilmiştir. Düşük SIRT7 seviyeleri, yaşa bağlı malign miyeloid kök hücre bozukluklarıyla ilişkilendirilmiştir. Dolayısıyla SIRT7, miyeloid kök hücrelerde tümör baskılayıcı olarak işlev görebildiği kanıtlanmıştır (401). Bu çelişkili sonuçlara rağmen çoğu kanserlerde SIRT7'nin onkogen olarak davrandığı bildirilmiştir. Ancak hematolojik malignitelede bugüne dek bu gen için pek çok literatür ve araştırma bulunmamaktadır.

Mikrodizin teknolojisi, binlerce geni kısa sürede analiz etmek için son zamanlarda geliştirilmiş güçlü bir tekniktir. Halihazırda, cDNA ve oligonükleotit tip mikrodizinleri veya çipleri, mevcuttur. Güçlü özelliklerine rağmen, mikrodizin temelli çalışmalar, bazı durumlarda tekrarlanabilir olmadıkları veya bazen hafif veri bozulmalarından dolayı sağlam olmayan bulgular bildirebilir. Bu tez çalışmasında *sirtuin* genlerinin ifade düzeyleri düşük ve yüksek dereceli FL vakaları ve kontroller arasında qRT-PCR tekiniyle incelenmiştir. Elde edilen sonuçların doğrulaması için GEO veri tabanında açıkta bulunan veri setleri üzerinde meta-analizler yapılmıştır. Her veri setinde hipotezimizdeki olan FL hastalığın düşük ve yüksek derece ifade değişikliklerinin incelemesinden ilave, her sette bulunan klinik ve patolojik verilere göre de gruplar ayrılıp ve analizler yapılmıştır. Ancak hasta ve kontrol grup haricinde anlamlı sonuçlar bulunmamıştır. Bu analizler sonucunda 6 veri setinde FL olgularında kontroller göre *sirtuin* genlerinde değişmiş ifadeler gözlenmiştir. GSE12195 veri setinde FL hastalarında kontrol grubuna göre tüm *sirtuin*'ler için ifade artışı bulunmuştur. Diğer setlerde bazı *sirtuin*'lerde anlamlı ifade değişikliği saptanmıştır. Özellikle bazı *sirtuin*'ler için uyumsuz analiz sonuçları dikkat çekmiştir. Öğreneğin GSE12195 veri setinde *SIRT2, SIRT3, SIRT4, SIRT5* ve *SIRT7* için ifade artışı bulunurken GSE65135 setinde *SIRT2, SIRT4* ve *SIRT5* genlerin düşük ifadeleri, GSE35331 setinde *SIRT3* genin düşük ifadesi ve GSE68308 setinde *SIRT7* genin düşük ifadesi rastlanmıştır. Literatürde bu uyumsuzluk, özellikle farklı mikrodizin çiplerin ne kader güvenilir olması, prob'ların düşük özgünlüğü, diferansiyel gen ifadelerinin kat değişmlerinde tutarsızlık ve bir genin farklı izoformları için

prob özgüllüğünün olmamasından kaynaklı olduğu bildirilmiştir. Bu yüzden Mikrodizin araştırmalar, PCR, Northern blot hibridizasyon ve RNase protection yöntemleri gibi geleneksel yöntemleri ile doğrulamaları gerekmektedir (411).

6.1.3. TEKNİK DEĞERLENDİRMELER

6.1.3.1. Formalin fiksasyonunun RNA üzerindeki zararlı etkileri ve gen ifadesine ilişkin hususlar

Eş zamanlı kantitatif PCR (qRT-PCR) ile gen ifade ölçümü, kişiselleştirilmiş kanser tedavisini destekler. Bununla birlikte, standart klinik patoloji iş akışı yoluyla elde edilen çoğu klinik örnek, formalinle fikse edilmiş parafine gömülü (FFPE) dokulardır. Ancak bu örnekler küçük miktarlarda bulunan ve düşük bütünlüklü RNA molekülleri içerir. Bu nedenle, özellikle bu tür örneklerde güvenilir qRT-PCR analizler için optimizasyon deneylerine ihtiyaç duyulur.

Çeşitli çalışmalarda formalin fikse edilmiş parafine gömülü dokular (FFPE), antik DNA ve adli tıp gibi degrade olan örneklerin üzerinde yapılan çalışmaların sorunlarını ortaya koymuşlar (412-414). Arşivlerde bulunan FFPE doku örnekleri, retrospektif çalışmalar için değerli bir örnek kaynağıdır. FFPE dokuları hayatta kalma öyküsü, klinik ve tedavi yanıtı gibi hazır bilgilere sahip olduğu için kısa zamanda patolojik parametrelerin kıyaslamalarına izin verir (415). 1980'lerin sonlarından beri FFPE dokularından başarılı RNA izolasyonu ve amplifikasyonu yayınlanmıştır (416-419). Ancak bu tür arşivlenmiş örneklerin hazırlanma sürecinin hem DNA hem de RNA kalitesi üzerinde önemli bir olumsuz etkisi olduğu gösterilmiştir (420). Dokuların formalin fiksasyonu ve parafine gömülmesi gibi blokların hazırlanma aşaması ve saklama koşulları nükleik asitlerin, özellikle RNA'nın yapısının bozulmasına neden olur. RNA üzerinde gen ifade analizleri, RNA'nın kimyasal modifikasyonları, özellikle formalin fiksasyonu ile indüklenen proteinler ve nükleik asitler arasındaki oluşan çapraz bağlanmalar, oksidiyon ve degradasyonu nedeniyle sıkıntılıdır (421). Dolayısıyla FFPE dokuları DNA veya RNA yapısının az korunduğu ve hücresel proteinlerin daha iyi korunması için daha çok immünohistokimya gibi protein temelli deneyler tasarlanmıştır (422). Arşive dayalı FFPE örnekleri, transkriptom analizi için yalnızca çok sınırlı kullanıma sunulmuştur (423).

6.1.3.2. FFPE dokuların Amplifikasyonu için PCR Koşullarının Optimizasyonu

Standart Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), bir DNA molekülünün tek, kısa bir bölgesinin Taq polimeraz enzimi tarafından birçok kez kopyalanmasına izin veren *in vitro* bir yaklaşımdır. Bu teknik son derece hassas bir yöntemdir ve genel olarak yüksek kaliteli kalıp DNA gerektirir. Bu durum söz konusu olan FFPE örneklerinde daha önemlidir. Başarısız bir PCR reaksiyonu birden fazla ya da özgün olmayan amplifikasyon, zayıf veya hatta hiçbir ürünün oluşmasına sonuçlanabilir. Bu teknoloji özellikle intakt olmayan, GC zengin bölgeler (>%60), uzun homopolimerik bölgeler ve ters çevrilmiş tekrarları içerdiğinde, kalıp DNA'lar üzerine uygulandığında daha da çelişkilidir. Başarılı bir PCR reaksiyonu için düzgün izolasyon yöntemi tek başına yeterli değildir. PCR tekniğinin doğruluğu, etkinliğini ve hassasiyeti farklı parametrelerden etkilenmektedir. Kalıp DNA miktarı, magnezyum iyonlarının konsantrasyonu, PCR sıcaklık döngü koşulları ve ayrıca gerektiğinde PCR katkı maddelerinin eklenmesi en önemli parametrelerdendir (424).

FFPE örnekleri, PCR yöntemleri dahil olmak üzere çok sayıda araştırma tekniğinde başarıyla kullanılmıştır (425). Doku fiksasyonu için kullanılan formalin, genellikle mevcut nükleik asitlerin miktarını ve kalitesini azaltır. Bu yüzden başarılı amplifikasyon için yeterli miktarda kalıp DNA'nın giriş miktarının belirlenmesi önemlidir. Magnezyum iyonu Taq DNA polimerazın ideal aktivitesini tetikleyen kritik bir faktördür. Teorik olarak düşük $MgCl_2$ konsantrasyonu verimsiz PCR'a neden olurken yüksek miktarda bulunması özgün olmayan bağlantıları artırmaktadır. Bu nedenle yapılan deneylerde optimum magnezyum iyonun konsantrasyonun belirlenmesi gerekmektedir. Bazı PCR reaksiyonlarında, özellikle kalıp DNA ve primer bölgelerinde GC zengin bölgelerin olduğunda dimetil sülfoksit (DMSO), gliserol, formamid ve betaine gibi PCR katkı maddeleri araştırmalarda yaygın olarak kullanılmıştır (426). Özellikle DMSO, PCR reaksiyonlarında kalıp DNA ve primerlerin ikincil yapıların oluşumun bozmak için kullanılan yaygın bileşendir. DMSO DNA'nın minör ve majör oluklarında hidrojen bağlara bağlanıp ve sonuç olarak çift sarmal yapıyı dengesizleştirir. Dolaysıyla uygun miktarda DMSO DNA yapısını kararsız hale getirerek bağlanma sıcaklığını düşürür (427).

PCR, tekrarlanan sıcaklık döngülerinden gerçekleştirilen, üç aşamalı bir yöntemdir. Bu aşamalar, denaturasyon, bağlanma ve uzama basamaklardan oluşmaktadır. Bunlardan en

önemli parametre, primer bağlanma sıcaklığıdır. Belirli PCR reaksiyonu için optimal olan primer bağlanma sıcaklığı, doğrudan primerlerin baz oranına ve dizi uzunluklarıyla ilişkilidir. Bu sıcaklık genellikle primerlerin erime sıcaklığın yaklaşık 5^0C altındadır. Hedef bölgelerde GC zengin olduğunda bağlanma sıcaklık artmaktadır (424). Teoride daha düşük bağlanma sıcaklık spesifik olmayan amplifikasyonlara yol açarken, daha yüksek sıcaklıklar bağlanmayı engelleyerek ampifikasyona izin vermez. Ancak pratikte bazı primerler optimizasyon deneylere bilinmeyen nedenlerden dolayı direnç gösterir (428).

Bu tez çalışmasında ilk başta temel PCR koşullarında başarılı sonuçlar elde edilmediğinden yukarıda belirtilen şartların değiştirilmesi planlanmıştır. Bunlardan DMSO ve $MgCl_2$ katkı maddelerin eklenmesidir. Ancak DMSO eklediğinde farklı bir sonuç elde edilmemiştir. Ayrıca bazı özgün olmayan reaksiyonların özgünlüğünün artırılması için touchdown PCR (TD-PCR) uygulanmıştır. TD-PCR programında erken döngülerdeki bağlanma sıcaklığı primer setlerin standart sıcaklığın üzerinde ayarlanır ve sonraki döngülerde azaltarak düzenlenmektedir. Başlangıçtaki yüksek bağlanma sıcaklığı hedef bölgelere bağlaması için daha fazla özgünlüğe yol açarken, daha düşük sıcaklıklar reaksiyonun sonunda daha verimli amplifikasyona izin vermektedir. Ancak bu teknikten de istenen sonuçlar elde edilmemitir. Bu deneylerde sadece $MgCl_2$'in farklı miktarlarda eklendiğinde başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Bu şekilde her primer çifti için (*SIRT7* hariç) farklı şartlarda başarılı amplifikasyon sonuçları elde edilmiştir.

6.2. SONUÇ

1- Kantitatif gerçek zamanlı PCR yönteminde, yüksek dereceli ve düşük dereceli FL vakaların kontrol grupla *sirtuin* genlerin ifade profilinin incelemesi sonucunda (*SIRT7* hariç) *SIRT6* geni için ifade değişikliği ortaya koymuştur. Diğer genlerde kontrol ve hasta gruplar arasında anlamlı ifade değişikliği saptanmamıştır. *SIRT6* geninde yüksek dereceli hastalar hem düşük dereceli FL hastalar ve hem sağlıklı kontrollere göre ifade artışı sergilemiştir. GEO veri tabanında bulunan mikrodizin veri setlerin analizleri, GSE12195 veri setinde FL hastalarında kontrol grubuna göre tüm *sirtuin*'ler için ifade artışı bulunmuştur. Diğer setlerde bazı *sirtuin*'lerde anlamlı ifade değişikliği saptanmıştır.

2- Bu genlerin ifadeleri hastaların klinikopatolojik verileri ile karşılaştırma soncunda *SIRT6* genindeki gözlenen artmış ifade ve FLIPI prognostik indeksi arasında pozitif korelasyon bulunmuştur. Yüksek dereceli hastalarda gözlenen *SIRT6* genin ifade artışı ve FLIPI indeksi ile saptanan pozitif korelasyon bu genin potansiyel prognostik marker olduğu fikrini ortaya koymuştur. Ayrıca *SIRT6* geni ve CD10 ifadesi arasında negatif korelasyon bulunmuştur. Literatürde FL hastalarında CD10 markerin aşağı ifadesi hastalığın yüksek derecesi ve kötü prognoz ile ilişkili olduğundan, bu çalışmadan elde edilen bulgular, *SIRT6* genin artmış ifadesini hasatlığın kötü prognozu ile ilişkili öldüğü düşüncesini öne sürmüştür.

3- İncelen 6 *sirtuin* genin ifadeleri arasında pozitif ve güçlü bir korelasyon gözlenmiştir. Literatürdeki bulgulara göre gözlenen korelasyonlar kemoterapilerde potansiyel kombinasyonların uygulamalarına yol açabilir.

4- Bu tez çalışmasında foliküler lenfomalarda sirtuinlerin bu malignitede olan etkisinin araştırılmadığından yorumlar diğer hematopoitk malignitelere dayanmaktadır. Bu nedenle FL patogenezi ne kadar bu maligniteler yakın olursa da FL'nın farklı yolaklardan ve patogenzden etkilendiğinden sonuçlar farklı olabilir. Dolaysıyla sonuçlarımızı değerlendirmek adına literatürde FL'lerde sirtuinler ile ilgili mevcut olan başka bir bulgu olmadığı için özellikle bu tez çalışmasında meta-analizler yapılmıştır.

5- FL malignitesinde sirtuinlerin gerçekten diyagnostik veya prognostik biyobelirteç olmasına karar vermek için ancak daha geniş örneklem sayısında, çeşitli genetik materyallerin uygulanmasında (taze doku, FFPE, primer hücre ve hücre hatları v.b.)

ve hastalığın patogenezinde ve prognozunda düşünülen diğer parametreleri dikkate alarak heterojen hasta grubunu daha homojen gruplara ayırt etmesiyle ortaya çıkabilir.

KAYNAKLARUncategorized References

1. Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. Cancer Res. 2003;63(8):1727-30. Epub 2003/04/19. PubMed PMID: 12702551.

2. Yokota J. Tumor progression and metastasis. Carcinogenesis. 2000;21(3):497-503. Epub 2000/02/26. doi: 10.1093/carcin/21.3.497. PubMed PMID: 10688870.

3. Flavahan WA, Gaskell E, Bernstein BE. Epigenetic plasticity and the hallmarks of cancer. Science. 2017;357(6348):eaal2380. Epub 2017/07/22. doi: 10.1126/science.aal2380. PubMed PMID: 28729483; PubMed Central PMCID: PMC5940341.

4. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000;100(1):57-70. Epub 2000/01/27. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9. PubMed PMID: 10647931.

5. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. PubMed PMID: 21376230.

6. Freedman A. Follicular lymphoma: 2018 update on diagnosis and management. Am J Hematol. 2018;93(2):296-305. doi: 10.1002/ajh.24937. PubMed PMID: 29314206.

7. Bargetzi M, Baumann R, Cogliatti S, Dietrich PY, Duchosal M, Goede J, et al. Diagnosis and treatment of follicular lymphoma: an update. Swiss Med Wkly. 2018;148:w14635. Epub 20180724. doi: 10.4414/smw.2018.14635. PubMed PMID: 30044476.

8. Huet S, Sujobert P, Salles G. From genetics to the clinic: a translational perspective on follicular lymphoma. Nat Rev Cancer. 2018;18(4):224-39. Epub 20180209. doi: 10.1038/nrc.2017.127. PubMed PMID: 29422597.

9. Ashraf N, Zino S, Macintyre A, Kingsmore D, Payne AP, George WD, et al. Altered sirtuin expression is associated with node-positive breast cancer. Br J Cancer. 2006;95(8):1056-61. Epub 20060926. doi: 10.1038/sj.bjc.6603384. PubMed PMID: 17003781; PubMed Central PMCID: PMC2360714.

10. Rodríguez-Rodero S, Fernández-Morera JL, Menéndez-Torre E, Calvanese V, Fernández AF, Fraga MF. Aging genetics and aging. Aging Dis. 2011;2(3):186-95. Epub 20110428. PubMed PMID: 22396873; PubMed Central PMCID: PMC3295054.

11. Frye RA. Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. Biochem Biophys Res Commun. 1999;260(1):273-9. Epub 1999/06/25. doi: 10.1006/bbrc.1999.0897. PubMed PMID: 10381378.

12. Carbone A, Roulland S, Gloghini A, Younes A, von Keudell G, Lopez-Guillermo A, et al. Follicular lymphoma. Nat Rev Dis Primers. 2019;5(1):83. Epub 20191212. doi: 10.1038/s41572-019-0132-x. PubMed PMID: 31831752.

13. Jamil A, Mukkamalla SKR. Lymphoma. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.; 2021.

14. Scott DW, Gascoyne RD. The tumour microenvironment in B cell lymphomas. Nature Reviews Cancer. 2014;14(8):517-34. doi: 10.1038/nrc3774.

15. Jiang M, Bennani NN, Feldman AL. Lymphoma classification update: T-cell lymphomas, Hodgkin lymphomas, and histiocytic/dendritic cell neoplasms. Expert Rev Hematol. 2017;10(3):239-49. Epub 2017/01/29. doi: 10.1080/17474086.2017.1281122. PubMed PMID: 28133975.

16. Freedman A. Follicular lymphoma: 2015 update on diagnosis and management. American Journal of Hematology. 2015;90(12):1171-8. doi: https://doi.org/10.1002/ajh.24200.

17. Boughan KM, Caimi PF. Follicular Lymphoma: Diagnostic and Prognostic Considerations in Initial Treatment Approach. Current Oncology Reports. 2019;21(7):63. doi: 10.1007/s11912-019-0808-0.

18. Swerdlow SH, Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J.WSwerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J.W. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press, Lyon, . 2001.

19. Steven H. Swerdlow EC, Nancy Lee Harris, Elaine S. Jaffe, Stefano A. Pileri, Harald Stein, Jürgen Thiele, James W. Vardiman. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th Edition ed, ed. E.S.J. Fred T. Bosman, Sunil R. Lakhani. Hiroko Onqaki. . Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC) 69008 Lyon. 2008.

20. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, Banks PM, Chan JK, Cleary ML, et al. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. Blood. 1994;84(5):1361-92. PubMed PMID: 8068936.

21. Hematopoietic and Lymphoid Neoplasm Database: National Cancer Institute. Available from: https://seer.cancer.gov/seertools/hemelymph/?offset=0&limit=25&sort=score&q=lymphoma.

22. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, Siebert R, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. Blood. 2016;127(20):2375-90. Epub 20160315. doi: 10.1182/blood-2016-01-643569. PubMed PMID: 26980727; PubMed Central PMCID: PMC4874220.

23. Korfi K, Ali S, Heward JA, Fitzgibbon J. Follicular lymphoma, a B cell malignancy addicted to epigenetic mutations. Epigenetics. 2017;12(5):370-7. Epub 20170120. doi:

10.1080/15592294.2017.1282587. PubMed PMID: 28106467; PubMed Central PMCID: PMC5453190.

24. Wang W, Corrigan-Cummins M, Hudson J, Maric I, Simakova O, Neelapu SS, et al. MicroRNA profiling of follicular lymphoma identifies microRNAs related to cell proliferation and tumor response. Haematologica. 2012;97(4):586-94. Epub 20111118. doi: 10.3324/haematol.2011.048132. PubMed PMID: 22102710; PubMed Central PMCID: PMC3347661.

25. Magnoli F, Tibiletti MG, Uccella S. Unraveling Tumor Heterogeneity in an Apparently Monolithic Disease: BCL2 and Other Players in the Genetic Landscape of Nodal Follicular Lymphoma. Front Med (Lausanne). 2019;6:44. Epub 2019/04/02. doi: 10.3389/fmed.2019.00044. PubMed PMID: 30931307; PubMed Central PMCID: PMC6428742.

26. Freedman A, Jacobsen E. Follicular lymphoma: 2020 update on diagnosis and management. Am J Hematol. 2020;95(3):316-27. Epub 20191222. doi: 10.1002/ajh.25696. PubMed PMID: 31814159.

27. Quintanilla-Martinez L. The 2016 updated WHO classification of lymphoid neoplasias. Hematol Oncol. 2017;35 Suppl 1:37-45. doi: 10.1002/hon.2399. PubMed PMID: 28591427.

28. van Besien K, Schouten H. Follicular lymphoma: a historical overview. Leuk Lymphoma. 2007;48(2):232-43. doi: 10.1080/10428190601059746. PubMed PMID: 17325883.

29. Norton AJ. Classification of non-Hodgkin's lymphomas. Baillieres Clin Haematol. 1996;9(4):641-52. doi: 10.1016/s0950-3536(96)80046-1. PubMed PMID: 9138610.

30. Lakhtakia R, Burney I. A Historical Tale of Two Lymphomas: Part II: Non-Hodgkin lymphoma. Sultan Qaboos Univ Med J. 2015;15(3):e317-21. Epub 20150824. doi: 10.18295/squmj.2015.15.03.003. PubMed PMID: 26355399; PubMed Central PMCID: PMC4554264.

31. Gall EA, Morrison HR, Scott AT. The Follicular Type of Malignant Lymphoma; a Survey of 63 Cases. Annals of Internal Medicine. 1941;14(11):2073-90. doi: 10.7326/0003-4819-14-11-2073.

32. Farmanfarma KK, Kiasara SH, Hassanipour S, Salehiniya H. NON-HODGKIN'S LYMPHOMA IN THE WORLD: AN EPIDEMIOLOGICAL REVIEW. World Cancer Res J. 2020;7:6. PubMed PMID: WOS:000518433400001.

33. Perry AM, Diebold J, Nathwani BN, MacLennan KA, Muller-Hermelink HK, Bast M, et al. Non-Hodgkin lymphoma in the developing world: review of 4539 cases from the International Non-Hodgkin Lymphoma Classification Project. Haematologica. 2016;101(10):1244-50. Epub 2016/06/30. doi: 10.3324/haematol.2016.148809. PubMed PMID: 27354024; PubMed Central PMCID: PMC5046654.

34. Isikdogan A, Ayyildiz O, Buyukcelik A, Arslan A, Tiftik N, Buyukbayram H, et al. Non-Hodgkin's lymphoma in southeast Turkey: clinicopathologic features of 490 cases. Ann Hematol. 2004;83(5):265-9. Epub 2004/04/03. doi: 10.1007/s00277-003-0812-0. PubMed PMID: 15060744.

35. Kurtoğlu E. Clinicopathological Properties of Non-Hodgkin Lymphomas in the South-West of Turkey. Cancer Research Journal. 2013;1(2). doi: 10.11648/j.crj.20130102.11.

36. Yildirim R, Sincan G. The clinicopathologic features and response to treatment of patients with Nonhodgkin Lymphoma: A single-center experiment in Turkey. Pak J Med Sci. 2019;35(1):82-5. doi: 10.12669/pjms.35.1.415. PubMed PMID: 30881401; PubMed Central PMCID: PMC6408640.

37. Özgür T, Yaldız M, Kaya H, Yengİl E, Toprak S. Descriptive epidemiology of Non-Hodgkin's lymphomas in Hatay. Eastern Journal of Medicine. 2013;18(4):181-4.

38. Adamson P, Bray F, Costantini AS, Tao MH, Weiderpass E, Roman E. Time trends in the registration of Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas in Europe. Eur J Cancer. 2007;43(2):391-401. Epub 20061128. doi: 10.1016/j.ejca.2006.10.008. PubMed PMID: 17134891.

39. Ma S. Risk Factors of Follicular Lymphoma. Expert Opin Med Diagn. 2012;6(4):323-33. Epub 2012/07/04. doi: 10.1517/17530059.2012.686996. PubMed PMID: 22754588; PubMed Central PMCID: PMC3384553.

40. Kuppers R, Stevenson FK. Critical influences on the pathogenesis of follicular lymphoma. Blood. 2018;131(21):2297-306. Epub 2018/04/19. doi: 10.1182/blood-2017-11-764365. PubMed PMID: 29666116.

41. Chiu BC, Dave Bj Fau - Blair A, Blair A Fau - Gapstur SM, Gapstur Sm Fau - Chmiel JS, Chmiel Js Fau - Fought AJ, Fought Aj Fau - Zahm SH, et al. Cigarette smoking, familial hematopoietic cancer, hair dye use, and risk of t(14;18)-defined subtypes of non-Hodgkin's lymphoma. 2007(0002-9262).

42. Dada R. Diagnosis and management of follicular lymphoma: A comprehensive review. Eur J Haematol. 2019;103(3):152-63. Epub 2019/07/05. doi: 10.1111/ejh.13271. PubMed PMID: 31270855.

43. Barry TS, Jaffe ES, Kingma DW, Martin AW, Sorbara L, Raffeld M, et al. CD5+ follicular lymphoma: a clinicopathologic study of three cases. Am J Clin Pathol. 2002;118(4):589-98. doi: 10.1309/4keh-agy7-ut5h-41xj. PubMed PMID: 12375647.

44. Patel AA, Smith SM. Clinical and Biological Prognostic Factors in Follicular Lymphoma. Hematol Oncol Clin North Am. 2020;34(4):647-62. Epub 2020/06/27. doi: 10.1016/j.hoc.2020.02.002. PubMed PMID: 32586571.

45. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House,

Virginia, November 1997. J Clin Oncol. 1999;17(12):3835-49. doi: 10.1200/jco.1999.17.12.3835. PubMed PMID: 10577857.

46. Mann RB, Berard CW. Criteria for the cytologic subclassification of follicular lymphomas: a proposed alternative method. Hematol Oncol. 1983;1(2):187-92. doi: 10.1002/hon.2900010209. PubMed PMID: 6376315.

47. Pittaluga S, Ayoubi TA, Wlodarska I, Stul M, Cassiman JJ, Mecucci C, et al. BCL-6 expression in reactive lymphoid tissue and in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. J Pathol. 1996;179(2):145-50. Epub 1996/06/01. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199606)179:2<145::AID-PATH565>3.0.CO;2-1. PubMed PMID: 8758205.

48. Díaz-Alderete A, Doval A, Camacho F, Verde L, Sabin P, Arranz-Sáez R, et al. Frequency of BCL2 and BCL6 translocations in follicular lymphoma: relation with histological and clinical features. Leuk Lymphoma. 2008;49(1):95-101. doi: 10.1080/10428190701742472. PubMed PMID: 18203018.

49. Rimsza LM, Li H, Braziel RM, Spier CM, Persky DO, Dunlap J, et al. Impact of histological grading on survival in the SWOG S0016 follicular lymphoma cohort. Haematologica. 2018;103(4):e151-e3. Epub 20180222. doi: 10.3324/haematol.2017.175059. PubMed PMID: 29472351; PubMed Central PMCID: PMC5865434.

50. Ott G, Katzenberger T, Lohr A, Kindelberger S, Rudiger T, Wilhelm M, et al. Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. Blood. 2002;99(10):3806-12. Epub 2002/05/03. doi: 10.1182/blood.v99.10.3806. PubMed PMID: 11986240.

51. Bosga-Bouwer AG, van Imhoff GW, Boonstra R, van der Veen A, Haralambieva E, van den Berg A, et al. Follicular lymphoma grade 3B includes 3 cytogenetically defined subgroups with primary t(14;18), 3q27, or other translocations: t(14;18) and 3q27 are mutually exclusive. Blood. 2003;101(3):1149-54. doi: 10.1182/blood.V101.3.1149. PubMed PMID: 12529293.

52. Dreyling M, Ghielmini M, Rule S, Salles G, Vitolo U, Ladetto M, et al. Newly diagnosed and relapsed follicular lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. 2016;27(suppl 5):v83-v90. Epub 2016/09/25. doi: 10.1093/annonc/mdw400. PubMed PMID: 27664263.

53. Zelenetz AD, Abramson JS, Advani RH, Andreadis CB, Byrd JC, Czuczman MS, et al. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: non-Hodgkin's lymphomas. J Natl Compr Canc Netw. 2010;8(3):288-334. doi: 10.6004/jnccn.2010.0021. PubMed PMID: 20202462.

54. Wahlin BE, Yri OE, Kimby E, Holte H, Delabie J, Smeland EB, et al. Clinical significance of the WHO grades of follicular lymphoma in a population-based cohort of 505 patients with long follow-up times. Br J Haematol. 2012;156(2):225-33. Epub 20111130. doi: 10.1111/j.1365-2141.2011.08942.x. PubMed PMID: 22126847.

55. Horn H, Schmelter C, Leich E, Salaverria I, Katzenberger T, Ott MM, et al. Follicular lymphoma grade 3B is a distinct neoplasm according to cytogenetic and immunohistochemical profiles. Haematologica. 2011;96(9):1327-34. Epub 20110609. doi: 10.3324/haematol.2011.042531. PubMed PMID: 21659362; PubMed Central PMCID: PMC3166103.

56. Cheson BD, Fisher RI, Barrington SF, Cavalli F, Schwartz LH, Zucca E, et al. Recommendations for initial evaluation, staging, and response assessment of Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma: the Lugano classification. J Clin Oncol. 2014;32(27):3059-68. Epub 2014/08/13. doi: 10.1200/JCO.2013.54.8800. PubMed PMID: 25113753; PubMed Central PMCID: PMC4979083.

57. Carbone Pp Fau - Kaplan HS, Kaplan Hs Fau - Musshoff K, Musshoff K Fau - Smithers DW, Smithers Dw Fau - Tubiana M, Tubiana M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. 1971(0008-5472 (Print)).

58. Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, Glatstein E, Canellos GP, Young RC, et al. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting. J Clin Oncol. 1989;7(11):1630-6. doi: 10.1200/jco.1989.7.11.1630. PubMed PMID: 2809679.

59. Board PDQPTE. Childhood Hodgkin Lymphoma Treatment (PDQ®): Health Professional Version. PDQ Cancer Information Summaries. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002.

60. Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. Cancer Res. 1971;31(11):1860-1. PubMed PMID: 5121694.

61. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. N Engl J Med. 1993;329(14):987-94. doi: 10.1056/nejm199309303291402. PubMed PMID: 8141877.

62. Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P, White J, Armitage JO, Arranz-Saez R, et al. Follicular lymphoma international prognostic index. Blood. 2004;104(5):1258-65. Epub 20040504. doi: 10.1182/blood-2003-12-4434. PubMed PMID: 15126323.

63. Federico M, Bellei M, Marcheselli L, Luminari S, Lopez-Guillermo A, Vitolo U, et al. Follicular Lymphoma International Prognostic Index 2: A New Prognostic Index for Follicular Lymphoma Developed by the International Follicular Lymphoma Prognostic Factor Project. Journal of Clinical Oncology. 2009;27(27):4555-62. doi: 10.1200/JCO.2008.21.3991.

64. Pastore A, Jurinovic V, Kridel R, Hoster E, Staiger AM, Szczepanowski M, et al. Integration of gene mutations in risk prognostication for patients receiving first-line immunochemotherapy for follicular lymphoma: a retrospective analysis of a prospective clinical trial and validation in a population-based registry. Lancet Oncol. 2015;16(9):1111-22. Epub 2015/08/11. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00169-2. PubMed PMID: 26256760.

65. Casulo C, Nastoupil L, Fowler NH, Friedberg JW, Flowers CR. Unmet needs in the first-line treatment of follicular lymphoma. Ann Oncol. 2017;28(9):2094-106. Epub 2017/04/22. doi: 10.1093/annonc/mdx189. PubMed PMID: 28430865; PubMed Central PMCID: PMC5834060.

66. Federico M, Bellei M, Marcheselli L, Luminari S, Lopez-Guillermo A, Vitolo U, et al. Follicular lymphoma international prognostic index 2: a new prognostic index for follicular lymphoma developed by the international follicular lymphoma prognostic factor project. J Clin Oncol. 2009;27(27):4555-62. Epub 2009/08/05. doi: 10.1200/JCO.2008.21.3991. PubMed PMID: 19652063.

67. Bachy E, Maurer MJ, Habermann TM, Gelas-Dore B, Maucort-Boulch D, Estell JA, et al. A simplified scoring system in de novo follicular lymphoma treated initially with immunochemotherapy. Blood. 2018;132(1):49-58. Epub 20180417. doi: 10.1182/blood-2017-11-816405. PubMed PMID: 29666118; PubMed Central PMCID: PMC6034646.

68. Davies AJ. Clinical and molecular prognostic factors in follicular lymphoma. Curr Oncol Rep. 2006;8(5):359-67. PubMed PMID: 16901397.

69. Rimsza LM, Jaramillo MC. Indolent lymphoma: follicular lymphoma and the microenvironment-insights from gene expression profiling. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2014;2014(1):163-8. Epub 20141118. doi: 10.1182/asheducation-2014.1.163. PubMed PMID: 25696850.

70. Casulo C. Risk stratification in follicular lymphoma. Best Pract Res Clin Haematol. 2018;31(1):15-22. Epub 20171122. doi: 10.1016/j.beha.2017.11.002. PubMed PMID: 29452661.

71. Küppers R. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. Nat Rev Cancer. 2005;5(4):251-62. doi: 10.1038/nrc1589. PubMed PMID: 15803153.

72. Klapper W, Klein U, De Silva NS, Zha S, Crowe JL, Dai B, et al. Malignant Lymphomas Biology and Molecular Pathogenesis.2016.

73. Rajewsky K. Clonal selection and learning in the antibody system. Nature. 1996;381(6585):751-8. Epub 1996/06/27. doi: 10.1038/381751a0. PubMed PMID: 8657279.

74. Little AJ, Matthews A, Oettinger M, Roth DB, Schatz DG. Chapter 2 - The Mechanism of V(D)J Recombination. In: Alt FW, Honjo T, Radbruch A, Reth M, editors. Molecular Biology of B Cells (Second Edition). London: Academic Press; 2015. p. 13-34.

75. Kuppers R, Dalla-Favera R. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. Oncogene. 2001;20(40):5580-94. Epub 2001/10/19. doi: 10.1038/sj.onc.1204640. PubMed PMID: 11607811.

76. Tsujimoto Y Fau - Cossman J, Cossman J Fau - Jaffe E, Jaffe E Fau - Croce CM, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. 1985(0036-8075 (Print)).

77. Yunis Jj Fau - Frizzera G, Frizzera G Fau - Oken MM, Oken Mm Fau - McKenna J, McKenna J Fau - Theologides A, Theologides A Fau - Arnesen M, Arnesen M. Multiple recurrent genomic defects in follicular lymphoma. A possible model for cancer. 1987(0028-4793 (Print)).

78. Albinger-Hegyi A, Hochreutener B Fau - Abdou M-T, Abdou Mt Fau - Hegyi I, Hegyi I Fau - Dours-Zimmermann MT, Dours-Zimmermann Mt Fau - Kurrer MO, Kurrer Mo Fau - Heitz PU, et al. High frequency of t(14;18)-translocation breakpoints outside of major breakpoint and minor cluster regions in follicular lymphomas: improved polymerase chain reaction protocols for their detection. 2002(0002-9440 (Print)).

79. Buchonnet G, Jardin F, Jean N, Bertrand P, Parmentier F, Tison S, et al. Distribution of BCL2 breakpoints in follicular lymphoma and correlation with clinical features: specific subtypes or same disease? Leukemia. 2002;16(9):1852-6. doi: 10.1038/sj.leu.2402568. PubMed PMID: 12200703.

80. Weinberg OK, Ai WZ, Mariappan MR, Shum C, Levy R, Arber DA. "Minor" BCL2 breakpoints in follicular lymphoma: frequency and correlation with grade and disease presentation in 236 cases. J Mol Diagn. 2007;9(4):530-7. Epub 2007/07/27. doi: 10.2353/jmoldx.2007.070038. PubMed PMID: 17652637; PubMed Central PMCID: PMC1975105.

81. Raghavan SC, Swanson PC, Wu X, Hsieh CL, Lieber MR. A non-B-DNA structure at the Bcl-2 major breakpoint region is cleaved by the RAG complex. Nature. 2004;428(6978):88-93. Epub 2004/03/06. doi: 10.1038/nature02355. PubMed PMID: 14999286.

82. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nat Rev Mol Cell Biol. 2008;9(1):47-59. Epub 2007/12/22. doi: 10.1038/nrm2308. PubMed PMID: 18097445.

83. Ott G, Katzenberger T Fau - Lohr A, Lohr A Fau - Kindelberger S, Kindelberger S Fau - Rudiger T, Rudiger T Fau - Wilhelm M, Wilhelm M Fau - Kalla J, et al. Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma 2 types of follicular lymphoma grade 3. The American Society of Hematology. 2002;131.

84. Yunis JJ, Frizzera G, Oken MM, McKenna J, Theologides A, Arnesen M. Multiple recurrent genomic defects in follicular lymphoma. A possible model for cancer. N Engl J Med. 1987;316(2):79-84. doi: 10.1056/nejm198701083160204. PubMed PMID: 3537802.

85. Roulland S, Faroudi M, Mamessier E, Sungalee S, Salles G, Nadel B. Early steps of follicular lymphoma pathogenesis. Adv Immunol. 2011;111(1557-8445 (Electronic)):1-46. Epub 2011/10/06. doi: 10.1016/B978-0-12-385991-4.00001-5. PubMed PMID: 21970951.

86. Stebegg M, Kumar SD, Silva-Cayetano A, Fonseca VR, Linterman MA, Graca L. Regulation of the Germinal Center Response %U https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.02469. Frontiers in Immunology. 2018;9(2469 %M):%7 %8 2018-October-25 %9 Review %# %! Regulation of the Germinal Centre Response %* %<. doi: 10.3389/fimmu.2018.02469 %W %L.

87. Kuppers R, Zhao M, Hansmann ML, Rajewsky K. Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. EMBO J. 1993;12(13):4955-67. Epub 1993/12/15. PubMed PMID: 8262038; PubMed Central PMCID: PMC413756.

88. Victora GD, Nussenzweig MC. Germinal centers. Annu Rev Immunol. 2012;30(1545-3278 (Electronic)):429-57. Epub 2012/01/10. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-075032. PubMed PMID: 22224772.

89. Liu YJ, Joshua DE, Williams GT, Smith CA, Gordon J, MacLennan IC. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. Nature. 1989;342(6252):929-31. Epub 1989/12/21. doi: 10.1038/342929a0. PubMed PMID: 2594086.

90. Liu YJ, Mason DY, Johnson GD, Abbot S, Gregory CD, Hardie DL, et al. Germinal center cells express bcl-2 protein after activation by signals which prevent their entry into apoptosis. Eur J Immunol. 1991;21(8):1905-10. doi: 10.1002/eji.1830210819. PubMed PMID: 1868875.

91. Smith KG, Light A, O'Reilly LA, Ang SM, Strasser A, Tarlinton D. bcl-2 transgene expression inhibits apoptosis in the germinal center and reveals differences in the selection of memory B cells and bone marrow antibody-forming cells. J Exp Med. 2000;191(3):475-84. doi: 10.1084/jem.191.3.475. PubMed PMID: 10662793; PubMed Central PMCID: PMC2195819.

92. Schuler F, Dolken L, Hirt C, Kiefer T, Berg T, Fusch G, et al. Prevalence and frequency of circulating t(14;18)-MBR translocation carrying cells in healthy individuals. Int J Cancer. 2009;124(4):958-63. doi: 10.1002/ijc.23958. PubMed PMID: 19030176; PubMed Central PMCID: PMC4216731.

93. Liu Y, Hernandez AM, Shibata D, Cortopassi GA. BCL2 translocation frequency rises with age in humans. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(19):8910-4. Epub 1994/09/13. doi: 10.1073/pnas.91.19.8910. PubMed PMID: 8090743; PubMed Central PMCID: PMC44716.

94. Ott G, Katzenberger T Fau - Lohr A, Lohr A Fau - Kindelberger S, Kindelberger S Fau - Rudiger T, Rudiger T Fau - Wilhelm M, Wilhelm M Fau - Kalla J, et al. Cytomorphologic, immunohistochemical, and cytogenetic profiles of follicular lymphoma: 2 types of follicular lymphoma grade 3. he American Society of Hematology. 2018;131(0006-4971 (Print)).

95. Kridel R, Sehn LH, Gascoyne RD. Pathogenesis of follicular lymphoma. J Clin Invest. 2012;122(10):3424-31. Epub 2012/10/02. doi: 10.1172/JCI63186. PubMed PMID: 23023713; PubMed Central PMCID: PMC3461914.

96. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature. 2000;403(6769):503-11. doi: 10.1038/35000501.

97. Cong P, Raffeld M, Teruya-Feldstein J, Sorbara L, Pittaluga S, Jaffe ES. In situ localization of follicular lymphoma: description and analysis by laser capture microdissection. Blood. 2002;99(9):3376-82. doi: 10.1182/blood.v99.9.3376. PubMed PMID: 11964306.

98. Mamessier E, Broussais-Guillaumot F, Chetaille B, Bouabdallah R, Xerri L, Jaffe ES, et al. Nature and importance of follicular lymphoma precursors. Haematologica. 2014;99(5):802-10. Epub 2014/05/03. doi: 10.3324/haematol.2013.085548. PubMed PMID: 24790058; PubMed Central PMCID: PMC4008113.

99. Tellier J, Menard C, Roulland S, Martin N, Monvoisin C, Chasson L, et al. Human t(14;18)positive germinal center B cells: a new step in follicular lymphoma pathogenesis? Blood. 2014;123(22):3462-5. Epub 2014/03/29. doi: 10.1182/blood-2013-12-545954. PubMed PMID: 24677543.

100. Sakhdari A, Miranda RN. Pathologic Features, Grading, and Variants of Follicular Lymphoma. In: Fowler NH, editor. Follicular Lymphoma: Current Management and Novel Approaches. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 23-45.

101. Ruminy P, Jardin F, Picquenot JM, Gaulard P, Parmentier F, Buchonnet G, et al. Two patterns of chromosomal breakpoint locations on the immunoglobulin heavy-chain locus in B-cell lymphomas with t(3;14)(q27;q32): relevance to histology. Oncogene. 2006;25(35):4947-54. Epub 2006/04/19. doi: 10.1038/sj.onc.1209512. PubMed PMID: 16619046.

102. Katzenberger T, Ott G Fau - Klein T, Klein T Fau - Kalla J, Kalla J Fau - Müller-Hermelink HK, Müller-Hermelink Hk Fau - Ott MM, Ott MM. Cytogenetic alterations affecting BCL6 are predominantly found in follicular lymphomas grade 3B with a diffuse large B-cell component. Am J Pathol. 2004(0002-9440 (Print)).

103. Randall C, Fedoriw Y. Pathology and diagnosis of follicular lymphoma and related entities. Pathology. 2020;52(1):30-9. Epub 20191130. doi: 10.1016/j.pathol.2019.09.010. PubMed PMID: 31791624.

104. Green MR. Chromatin modifying gene mutations in follicular lymphoma. Blood. 2018;131(6):595-604. Epub 2017/11/22. doi: 10.1182/blood-2017-08-737361. PubMed PMID: 29158360; PubMed Central PMCID: PMC5805487.

105. Morin RD, Mendez-Lago M, Mungall AJ, Goya R, Mungall KL, Corbett RD, et al. Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. Nature. 2011;476(7360):298-303. Epub 20110727. doi: 10.1038/nature10351. PubMed PMID: 21796119; PubMed Central PMCID: PMC3210554.

106. Pickard L, Palladino G, Okosun J. Follicular lymphoma genomics. Leuk Lymphoma. 2020;61(10):2313-23. Epub 20200519. doi: 10.1080/10428194.2020.1762883. PubMed PMID: 32427008.

107. Ng ZY, Leslie C, Cheah CY. Follicular Lymphoma: Epidemiology, Pathogenesis and Initiating Events. In: Fowler NH, editor. Follicular Lymphoma. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 3-21.

108. Zhang J, Dominguez-Sola D, Hussein S, Lee JE, Holmes AB, Bansal M, et al. Disruption of KMT2D perturbs germinal center B cell development and promotes lymphomagenesis. Nat Med. 2015;21(10):1190-8. Epub 2015/09/15. doi: 10.1038/nm.3940. PubMed PMID: 26366712; PubMed Central PMCID: PMC5145002.

109. Iyer NG, Ozdag H, Caldas C. p300/CBP and cancer. Oncogene. 2004;23(24):4225-31. Epub 2004/05/25. doi: 10.1038/sj.onc.1207118. PubMed PMID: 15156177.

110. Schneider C, Pasqualucci L, Dalla-Favera R. Molecular pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. Semin Diagn Pathol. 2011;28(2):167-77. Epub 2011/08/17. doi: 10.1053/j.semdp.2011.04.001. PubMed PMID: 21842702; PubMed Central PMCID: PMC3562715.

111. Pasqualucci L, Dominguez-Sola D, Chiarenza A, Fabbri G, Grunn A, Trifonov V, et al. Inactivating mutations of acetyltransferase genes in B-cell lymphoma. Nature. 2011;471(7337):189-95. doi: 10.1038/nature09730. PubMed PMID: 21390126; PubMed Central PMCID: PMC3271441.

112. Bodor C, Grossmann V, Popov N, Okosun J, O'Riain C, Tan K, et al. EZH2 mutations are frequent and represent an early event in follicular lymphoma. Blood. 2013;122(18):3165-8. Epub 20130919. doi: 10.1182/blood-2013-04-496893. PubMed PMID: 24052547; PubMed Central PMCID: PMC3814734.

113. Ryan RJ, Nitta M, Borger D, Zukerberg LR, Ferry JA, Harris NL, et al. EZH2 codon 641 mutations are common in BCL2-rearranged germinal center B cell lymphomas. PLoS One. 2011;6(12):e28585. Epub 20111214. doi: 10.1371/journal.pone.0028585. PubMed PMID: 22194861; PubMed Central PMCID: PMC3237460.

114. Vire E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, et al. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. Nature. 2006;439(7078):871-4. Epub 20051214. doi: 10.1038/nature04431. PubMed PMID: 16357870.

115. Kirmizis A, Bartley SM, Kuzmichev A, Margueron R, Reinberg D, Green R, et al. Silencing of human polycomb target genes is associated with methylation of histone H3 Lys 27. Genes Dev. 2004;18(13):1592-605. doi: 10.1101/gad.1200204. PubMed PMID: 15231737; PubMed Central PMCID: PMC443521.

116. Majer CR, Jin L, Scott MP, Knutson SK, Kuntz KW, Keilhack H, et al. A687V EZH2 is a gain-of-function mutation found in lymphoma patients. FEBS Lett. 2012;586(19):3448-51. Epub 20120728. doi: 10.1016/j.febslet.2012.07.066. PubMed PMID: 22850114.

117. Yap DB, Chu J, Berg T, Schapira M, Cheng SW, Moradian A, et al. Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation. Blood. 2011;117(8):2451-9. Epub

20101229. doi: 10.1182/blood-2010-11-321208. PubMed PMID: 21190999; PubMed Central PMCID: PMC3062411.

118. Velichutina I, Shaknovich R, Geng H, Johnson NA, Gascoyne RD, Melnick AM, et al. EZH2-mediated epigenetic silencing in germinal center B cells contributes to proliferation and lymphomagenesis. Blood. 2010;116(24):5247-55. Epub 20100824. doi: 10.1182/blood-2010-04-280149. PubMed PMID: 20736451; PubMed Central PMCID: PMC3012542.

119. Bararia D, Heide M, Romashova T, Alessandro P, Wilson BG, Roberts CWM, et al. ARID1A Is Recurrently and Significantly Mutated in Follicular Lymphoma (FL) and Impairs DNA Repair Efficiency. American Society of Hematology Washington, DC; 2014.

120. Watanabe T. The Tumor Microenvironment in Follicular Lymphoma: Its Pro-Malignancy Role with Therapeutic Potential. International journal of molecular sciences. 2021;22(10):5352. doi: 10.3390/ijms22105352. PubMed PMID: 34069564.

121. Cheung KJ, Johnson NA, Affleck JG, Severson T, Steidl C, Ben-Neriah S, et al. Acquired TNFRSF14 mutations in follicular lymphoma are associated with worse prognosis. Cancer Res. 2010;70(22):9166-74. Epub 2010/10/05. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2460. PubMed PMID: 20884631.

122. Launay E, Pangault C, Bertrand P, Jardin F, Lamy T, Tilly H, et al. High rate of TNFRSF14 gene alterations related to 1p36 region in de novo follicular lymphoma and impact on prognosis. Leukemia. 2012;26(3):559-62. Epub 2011/09/24. doi: 10.1038/leu.2011.266. PubMed PMID: 21941365.

123. Cai G, Freeman GJ. The CD160, BTLA, LIGHT/HVEM pathway: a bidirectional switch regulating T-cell activation. Immunol Rev. 2009;229(1):244-58. Epub 2009/05/12. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00783.x. PubMed PMID: 19426226.

124. Steinberg MW, Cheung TC, Ware CF. The signaling networks of the herpesvirus entry mediator (TNFRSF14) in immune regulation. Immunol Rev. 2011;244(1):169-87. Epub 2011/10/25. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01064.x. PubMed PMID: 22017438; PubMed Central PMCID: PMC3381650.

125. Dobaño-López C, Araujo-Ayala F, Serrat N, Valero JG, Pérez-Galán P. Follicular Lymphoma Microenvironment: An Intricate Network Ready for Therapeutic Intervention. Cancers. 2021;13(4):641. doi: 10.3390/cancers13040641. PubMed PMID: 33562694.

126. Nagel D, Vincendeau M, Eitelhuber AC, Krappmann D. Mechanisms and consequences of constitutive NF-kappaB activation in B-cell lymphoid malignancies. Oncogene. 2014;33(50):5655-65. Epub 20140127. doi: 10.1038/onc.2013.565. PubMed PMID: 24469030.

127. Kridel R, Mottok A, Farinha P, Ben-Neriah S, Ennishi D, Zheng Y, et al. Cell of origin of transformed follicular lymphoma. Blood. 2015;126(18):2118-27. Epub 2015/08/27. doi: 10.1182/blood-2015-06-649905. PubMed PMID: 26307535; PubMed Central PMCID: PMC4626253.

128. Okosun J, Bodor C, Wang J, Araf S, Yang CY, Pan C, et al. Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma. Nat Genet. 2014;46(2):176-81. Epub 20131222. doi: 10.1038/ng.2856. PubMed PMID: 24362818; PubMed Central PMCID: PMC3907271.

129. Yildiz M, Li H, Bernard D, Amin NA, Ouillette P, Jones S, et al. Activating STAT6 mutations in follicular lymphoma. Blood. 2015;125(4):668-79. Epub 2014/11/28. doi: 10.1182/blood-2014-06-582650. PubMed PMID: 25428220; PubMed Central PMCID: PMC4729538.

130. Yan Q, Huang Y, Watkins AJ, Kocialkowski S, Zeng N, Hamoudi RA, et al. BCR and TLR signaling pathways are recurrently targeted by genetic changes in splenic marginal zone lymphomas. Haematologica. 2012;97(4):595-8. Epub 20111118. doi: 10.3324/haematol.2011.054080. PubMed PMID: 22102703; PubMed Central PMCID: PMC3347666.

131. Pasqualucci L, Khiabanian H, Fangazio M, Vasishtha M, Messina M, Holmes AB, et al. Genetics of follicular lymphoma transformation. Cell Rep. 2014;6(1):130-40. Epub 2014/01/07. doi: 10.1016/j.celrep.2013.12.027. PubMed PMID: 24388756; PubMed Central PMCID: PMC4100800.

132. Davies AJ, Rosenwald A, Wright G, Lee A, Last KW, Weisenburger DD, et al. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma proceeds by distinct oncogenic mechanisms. Br J Haematol. 2007;136(2):286-93. Epub 2007/02/06. doi: 10.1111/j.1365-2141.2006.06439.x. PubMed PMID: 17278262; PubMed Central PMCID: PMC2532951.

133. Lossos IS, Alizadeh AA, Diehn M, Warnke R, Thorstenson Y, Oefner PJ, et al. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large-cell lymphoma: alternative patterns with increased or decreased expression of c-myc and its regulated genes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(13):8886-91. Epub 2002/06/22. doi: 10.1073/pnas.132253599. PubMed PMID: 12077300; PubMed Central PMCID: PMC124393.

134. Lo Coco F, Gaidano G, Louie DC, Offit K, Chaganti RS, Dalla-Favera R. p53 mutations are associated with histologic transformation of follicular lymphoma. Blood. 1993;82(8):2289-95. Epub 1993/10/15. doi: https://doi.org/10.1182/blood.V82.8.2289.2289. PubMed PMID: 8400281.

135. O'Shea D, O'Riain C, Taylor C, Waters R, Carlotti E, Macdougall F, et al. The presence of TP53 mutation at diagnosis of follicular lymphoma identifies a high-risk group of patients with shortened time to disease progression and poorer overall survival. Blood. 2008;112(8):3126-9. Epub 2008/07/17. doi: 10.1182/blood-2008-05-154013. PubMed PMID: 18628487; PubMed Central PMCID: PMC2954748.

136. Oricchio E, Nanjangud G, Wolfe AL, Schatz JH, Mavrakis KJ, Jiang M, et al. The Eph-receptor A7 is a soluble tumor suppressor for follicular lymphoma. Cell. 2011;147(3):554-64. Epub 2011/11/01. doi: 10.1016/j.cell.2011.09.035. PubMed PMID: 22036564; PubMed Central PMCID: PMC3208379.

137. Okosun J, Bödör C, Wang J, Araf S, Yang C-Y, Pan C, et al. Integrated genomic analysis identifies recurrent mutations and evolution patterns driving the initiation and progression of follicular lymphoma. Nature Genetics. 2014;46(2):176-81. doi: 10.1038/ng.2856.

138. Garcia-Alvarez M, Alonso-Alvarez S, Prieto-Conde I, Jimenez C, Sarasquete ME, Chillon MC, et al. Immunoglobulin gene rearrangement IGHV3-48 is a predictive marker of histological transformation into aggressive lymphoma in follicular lymphomas. Blood Cancer J. 2019;9(7):52. Epub 2019/06/19. doi: 10.1038/s41408-019-0213-9. PubMed PMID: 31209206; PubMed Central PMCID: PMC6579759.

139. Al-Tourah AJ, Gill KK, Chhanabhai M, Hoskins PJ, Klasa RJ, Savage KJ, et al. Population-based analysis of incidence and outcome of transformed non-Hodgkin's lymphoma. J Clin Oncol. 2008;26(32):5165-9. Epub 2008/10/08. doi: 10.1200/JCO.2008.16.0283. PubMed PMID: 18838711.

140. Casulo C, Burack WR, Friedberg JW. Transformed follicular non-Hodgkin lymphoma. Blood. 2015;125(1):40-7. Epub 2014/12/17. doi: 10.1182/blood-2014-04-516815. PubMed PMID: 25499449.

141. Montoto S, Davies AJ, Matthews J, Calaminici M, Norton AJ, Amess J, et al. Risk and clinical implications of transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma. J Clin Oncol. 2007;25(17):2426-33. Epub 2007/05/09. doi: 10.1200/JCO.2006.09.3260. PubMed PMID: 17485708.

142. Nie K, Redmond D, Eng KW, Zhang T, Cheng S, Mathew S, et al. Mutation landscape, clonal evolution pattern, and potential pathogenic pathways in B-lymphoblastic transformation of follicular lymphoma. Leukemia. 2021;35(4):1203-8. Epub 2020/08/14. doi: 10.1038/s41375-020-01014-2. PubMed PMID: 32788647.

143. Carlotti E, Wrench D, Matthews J, Iqbal S, Davies A, Norton A, et al. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma may occur by divergent evolution from a common progenitor cell or by direct evolution from the follicular lymphoma clone. Blood. 2009;113(15):3553-7. Epub 2009/02/10. doi: 10.1182/blood-2008-08-174839. PubMed PMID: 19202129.

144. Kumar EA, Okosun J, Fitzgibbon J. The Biological Basis of Histologic Transformation. Hematol Oncol Clin North Am. 2020;34(4):771-84. Epub 20200505. doi: 10.1016/j.hoc.2020.02.010. PubMed PMID: 32586580.

145. Wong E, Dickinson M. Transformation in follicular lymphoma: biology, prognosis, and therapeutic options. Curr Oncol Rep. 2012;14(5):424-32. Epub 2012/08/07. doi: 10.1007/s11912-012-0258-4. PubMed PMID: 22865028.

146. Matolcsy A, Schattner EJ, Knowles DM, Casali P. Clonal evolution of B cells in transformation from low- to high-grade lymphoma. Eur J Immunol. 1999;29(4):1253-64. Epub 1999/05/06. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199904)29:04<1253::AID-IMMU1253>3.0.CO;2-8. PubMed PMID: 10229093; PubMed Central PMCID: PMC4625534.

147. Rossi D, Berra E, Cerri M, Deambrogi C, Barbieri C, Franceschetti S, et al. Aberrant somatic hypermutation in transformation of follicular lymphoma and chronic lymphocytic leukemia to diffuse large B-cell lymphoma. Haematologica. 2006;91(10):1405-9. Epub 2006/10/05. doi: 10.3324/%x. PubMed PMID: 17018394.

148. Davies AJ, Rosenwald A, Wright G, Lee A, Last KW, Weisenburger DD, et al. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large B-cell lymphoma proceeds by distinct oncogenic mechanisms. British Journal of Haematology. 2007;136(2):286-93. doi: https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2006.06439.x.

149. Bouska A, McKeithan TW, Deffenbacher KE, Lachel C, Wright GW, Iqbal J, et al. Genome-wide copy-number analyses reveal genomic abnormalities involved in transformation of follicular lymphoma. Blood. 2014;123(11):1681-90. Epub 2013/09/17. doi: 10.1182/blood-2013-05-500595. PubMed PMID: 24037725; PubMed Central PMCID: PMC3954050.

150. Martinez A, Carreras J, Campo E. The follicular lymphoma microenvironment: From tumor cell to host immunity. Curr Hematol Malig Rep. 2008;3(4):179-86. Epub 2008/10/01. doi: 10.1007/s11899-008-0026-6. PubMed PMID: 20425464.

151. Glas AM, Knoops L, Delahaye L, Kersten MJ, Kibbelaar RE, Wessels LA, et al. Gene-expression and immunohistochemical study of specific T-cell subsets and accessory cell types in the transformation and prognosis of follicular lymphoma. J Clin Oncol. 2007;25(4):390-8. Epub 2007/01/04. doi: 10.1200/JCO.2006.06.1648. PubMed PMID: 17200149.

152. Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC, Colomo L, Martinez A, Roncador G, et al. High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. Blood. 2006;108(9):2957-64. Epub 2006/07/11. doi: 10.1182/blood-2006-04-018218. PubMed PMID: 16825494.

153. Kridel R, Chan FC, Mottok A, Boyle M, Farinha P, Tan K, et al. Histological Transformation and Progression in Follicular Lymphoma: A Clonal Evolution Study. PLoS Med. 2016;13(12):e1002197. Epub 2016/12/14. doi: 10.1371/journal.pmed.1002197. PubMed PMID: 27959929; PubMed Central PMCID: PMC5154502 following competing interests: SPS is a founder and shareholder of Contextual Genomics Inc., developer of clinical genomic tests for cancer.

154. Yang ZZ, Ansell SM. The tumor microenvironment in follicular lymphoma. Clin Adv Hematol Oncol. 2012;10(12):810-8. PubMed PMID: 23271353.

155. Sugimoto T, Watanabe T. Follicular Lymphoma: The Role of the Tumor Microenvironment in Prognosis. J Clin Exp Hematop. 2016;56(1):1-19. Epub 2016/06/24. doi: 10.3960/jslrt.56.1. PubMed PMID: 27334853; PubMed Central PMCID: PMC6247780.

156. Dave SS, Wright G, Tan B, Rosenwald A, Gascoyne RD, Chan WC, et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. N Engl J Med. 2004;351(21):2159-69. doi: 10.1056/NEJMoa041869. PubMed PMID: 15548776.

157. Kumar E, Pickard L, Okosun J. Pathogenesis of follicular lymphoma: genetics to the microenvironment to clinical translation. British Journal of Haematology. 2021;194(5):810-21. doi: https://doi.org/10.1111/bjh.17383.

158. Laurent C, Müller S, Do C, Al-Saati T, Allart S, Larocca LM, et al. Distribution, function, and prognostic value of cytotoxic T lymphocytes in follicular lymphoma: a 3-D tissue-imaging study. Blood. 2011;118(20):5371-9. Epub 20110819. doi: 10.1182/blood-2011-04-345777. PubMed PMID: 21856865.

159. Wahlin BE, Sander B, Christensson B, Kimby E. CD8+ T-cell content in diagnostic lymph nodes measured by flow cytometry is a predictor of survival in follicular lymphoma. Clin Cancer Res. 2007;13(2 Pt 1):388-97. Epub 2007/01/27. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1734. PubMed PMID: 17255259.

160. Yang ZZ, Grote DM, Ziesmer SC, Niki T, Hirashima M, Novak AJ, et al. IL-12 upregulates TIM-3 expression and induces T cell exhaustion in patients with follicular B cell non-Hodgkin lymphoma. J Clin Invest. 2012;122(4):1271-82. Epub 2012/03/20. doi: 10.1172/JCI59806. PubMed PMID: 22426209; PubMed Central PMCID: PMC3314462.

161. Yang ZZ, Novak AJ, Ziesmer SC, Witzig TE, Ansell SM. Attenuation of CD8(+) T-cell function by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. Cancer Res. 2006;66(20):10145-52. Epub 2006/10/19. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1822. PubMed PMID: 17047079; PubMed Central PMCID: PMC2680600.

162. Araf S, Okosun J, Koniali L, Fitzgibbon J, Heward J. Epigenetic dysregulation in follicular lymphoma. Epigenomics. 2016;8(1):77-84. Epub 2015/12/25. doi: 10.2217/epi.15.96. PubMed PMID: 26698557; PubMed Central PMCID: PMC4864036.

163. Li X, Kositsky R, Reddy A, Love C, Naresh K, Koff JL, et al. Whole Exome and Transcriptome Sequencing in 1042 Cases Reveals Distinct Clinically Relevant Genetic Subgroups of Follicular Lymphoma. Blood. 2019;134:19. doi: https://doi.org/10.1182/blood-2019-130255.

164. Pasqualucci L, Trifonov V, Fabbri G, Ma J, Rossi D, Chiarenza A, et al. Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. Nat Genet. 2011;43(9):830-7. Epub 2011/08/02. doi: 10.1038/ng.892. PubMed PMID: 21804550; PubMed Central PMCID: PMC3297422.

165. Lohr JG, Stojanov P, Lawrence MS, Auclair D, Chapuy B, Sougnez C, et al. Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(10):3879-84. Epub 20120217. doi: 10.1073/pnas.1121343109. PubMed PMID: 22343534; PubMed Central PMCID: PMC3309757.

166. Hayslip J, Montero A. Tumor suppressor gene methylation in follicular lymphoma: a comprehensive review. Mol Cancer. 2006;5(1):44. Epub 2006/10/10. doi: 10.1186/1476-4598-5-44. PubMed PMID: 17026765; PubMed Central PMCID: PMC1629025.

167. Dominguez PM, Teater M, Chambwe N, Kormaksson M, Redmond D, Ishii J, et al. DNA Methylation Dynamics of Germinal Center B Cells Are Mediated by AID. Cell Rep. 2015;12(12):2086-98. Epub 2015/09/15. doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.036. PubMed PMID: 26365193; PubMed Central PMCID: PMC4591215.

168. Kulis M, Merkel A, Heath S, Queirós AC, Schuyler RP, Castellano G, et al. Whole-genome fingerprint of the DNA methylome during human B cell differentiation. Nat Genet. 2015;47(7):746-56. Epub 20150608. doi: 10.1038/ng.3291. PubMed PMID: 26053498; PubMed Central PMCID: PMC5444519.

169. Kretzmer H, Bernhart SH, Wang W, Haake A, Weniger MA, Bergmann AK, et al. DNA methylome analysis in Burkitt and follicular lymphomas identifies differentially methylated regions linked to somatic mutation and transcriptional control. Nat Genet. 2015;47(11):1316-25. Epub 20151005. doi: 10.1038/ng.3413. PubMed PMID: 26437030; PubMed Central PMCID: PMC5444523.

170. De S, Shaknovich R, Riester M, Elemento O, Geng H, Kormaksson M, et al. Aberration in DNA methylation in B-cell lymphomas has a complex origin and increases with disease severity. PLoS genetics. 2013;9(1):e1003137-e. Epub 2013/01/10. doi: 10.1371/journal.pgen.1003137. PubMed PMID: 23326238.

171. Schmidt J, Salaverria I, Haake A, Bonzheim I, Adam P, Montes-Moreno S, et al. Increasing genomic and epigenomic complexity in the clonal evolution from in situ to manifest t(14;18)-positive follicular lymphoma. Leukemia. 2014;28(5):1103-12. Epub 20131023. doi: 10.1038/leu.2013.307. PubMed PMID: 24153014.

172. De S, Shaknovich R, Riester M, Elemento O, Geng H, Kormaksson M, et al. Aberration in DNA methylation in B-cell lymphomas has a complex origin and increases with disease severity. PLoS Genet. 2013;9(1):e1003137. Epub 20130110. doi: 10.1371/journal.pgen.1003137. PubMed PMID: 23326238; PubMed Central PMCID: PMC3542081.

173. Clozel T, Yang S, Elstrom RL, Tam W, Martin P, Kormaksson M, et al. Mechanism-based epigenetic chemosensitization therapy of diffuse large B-cell lymphoma. Cancer Discov. 2013;3(9):1002-19. Epub 20130816. doi: 10.1158/2159-8290.Cd-13-0117. PubMed PMID: 23955273; PubMed Central PMCID: PMC3770813.

174. Mathelier A, Lefebvre C, Zhang AW, Arenillas DJ, Ding J, Wasserman WW, et al. Cis-regulatory somatic mutations and gene-expression alteration in B-cell lymphomas. Genome Biol. 2015;16(1):84. Epub 2015/04/24. doi: 10.1186/s13059-015-0648-7. PubMed PMID: 25903198; PubMed Central PMCID: PMC4467049.

175. Koues OI, Kowalewski RA, Chang LW, Pyfrom SC, Schmidt JA, Luo H, et al. Enhancer sequence variants and transcription-factor deregulation synergize to construct pathogenic regulatory circuits in B-cell lymphoma. Immunity. 2015;42(1):186-98. Epub 2015/01/22. doi: 10.1016/j.immuni.2014.12.021. PubMed PMID: 25607463; PubMed Central PMCID: PMC4302272.

176. Keppler BR, Archer TK. Chromatin-modifying enzymes as therapeutic targets--Part 1. Expert Opin Ther Targets. 2008;12(10):1301-12. Epub 2008/09/11. doi: 10.1517/14728222.12.10.1301. PubMed PMID: 18781828; PubMed Central PMCID: PMC2761090.

177. Araf S, Okosun J, Koniali L, Fitzgibbon J, Heward J. Epigenetic dysregulation in follicular lymphoma. Epigenomics. 2015;8(1):77-84. doi: 10.2217/epi.15.96.

178. Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. Mol Oncol. 2007;1(1):19-25. Epub 2007/06/01. doi: 10.1016/j.molonc.2007.01.001. PubMed PMID: 19383284; PubMed Central PMCID: PMC5543853.

179. Elmallah MIY, Micheau O. Epigenetic Regulation of TRAIL Signaling: Implication for Cancer Therapy. Cancers (Basel). 2019;11(6). Epub 20190619. doi: 10.3390/cancers11060850. PubMed PMID: 31248188; PubMed Central PMCID: PMC6627638.

180. Li Y, Seto E. HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy. Cold Spring Harb Perspect Med. 2016;6(10):a026831. Epub 2016/09/08. doi: 10.1101/cshperspect.a026831. PubMed PMID: 27599530; PubMed Central PMCID: PMC5046688.

181. Zhang Z, Tan M, Xie Z, Dai L, Chen Y, Zhao Y. Identification of lysine succinylation as a new post-translational modification. Nat Chem Biol. 2011;7(1):58-63. Epub 20101212. doi: 10.1038/nchembio.495. PubMed PMID: 21151122; PubMed Central PMCID: PMC3065206.

182. Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. Nature. 2000;403(6771):795-800. doi: 10.1038/35001622. PubMed PMID: 10693811.

183. Carafa V, Rotili D, Forgione M, Cuomo F, Serretiello E, Hailu GS, et al. Sirtuin functions and modulation: from chemistry to the clinic. Clin Epigenetics. 2016;8:61. Epub 20160525. doi: 10.1186/s13148-016-0224-3. PubMed PMID: 27226812; PubMed Central PMCID: PMC4879741.

184. Frye RA. Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. Biochem Biophys Res Commun. 2000;273(2):793-8. doi: 10.1006/bbrc.2000.3000. PubMed PMID: 10873683.

185. Ivy Jm Fau - Hicks JB, Hicks Jb Fau - Klar AJ, Klar AJ. Map positions of yeast genes SIR1, SIR3 and SIR4. 1985(0016-6731 (Print)).

186. Rine J, Herskowitz I. Four genes responsible for a position effect on expression from HML and HMR in Saccharomyces cerevisiae. Genetics. 1987;116(1):9-22. PubMed PMID: 3297920.

187. Gray SG, Ekström TJ. The human histone deacetylase family. Exp Cell Res. 2001;262(2):75-83. doi: 10.1006/excr.2000.5080. PubMed PMID: 11139331.

188. Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. Biochem J. 2007;404(1):1-13. Epub 2007/04/24. doi: 10.1042/BJ20070140. PubMed PMID: 17447894; PubMed Central PMCID: PMC2753453.

189. Osborne B, Bentley NL, Montgomery MK, Turner N. The role of mitochondrial sirtuins in health and disease. Free Radic Biol Med. 2016;100:164-74. Epub 2016/05/11. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.04.197. PubMed PMID: 27164052.

190. Garcia-Peterson LM, Guzmán-Pérez G, Krier CR, Ahmad N. The sirtuin 6: An overture in skin cancer. Experimental Dermatology. 2020;29(2):124-35. doi: https://doi.org/10.1111/exd.14057.

191. Aventaggiato M, Vernucci E, Barreca F, Russo MA, Tafani M. Sirtuins' control of autophagy and mitophagy in cancer. Pharmacol Ther. 2021;221:107748. Epub 20201124. doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107748. PubMed PMID: 33245993.

192. Liou GG, Tanny JC, Kruger RG, Walz T, Moazed D. Assembly of the SIR complex and its regulation by O-acetyl-ADP-ribose, a product of NAD-dependent histone deacetylation. Cell. 2005;121(4):515-27. doi: 10.1016/j.cell.2005.03.035. PubMed PMID: 15907466.

193. Vaquero A, Scher M, Lee D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. Mol Cell. 2004;16(1):93-105. doi: 10.1016/j.molcel.2004.08.031. PubMed PMID: 15469825.

194. Yamamoto H, Schoonjans K, Auwerx J. Sirtuin functions in health and disease. Mol Endocrinol. 2007;21(8):1745-55. Epub 2007/04/26. doi: 10.1210/me.2007-0079. PubMed PMID: 17456799.

195. Huang FT, Sun J, Zhang L, He X, Zhu YH, Dong HJ, et al. Role of SIRT1 in hematologic malignancies. J Zhejiang Univ Sci B. 2019;20(5):391-8. doi: 10.1631/jzus.B1900148. PubMed PMID: 31090265; PubMed Central PMCID: PMC6568226.

196. Bheda P, Jing H, Wolberger C, Lin H. The Substrate Specificity of Sirtuins. Annual Review of Biochemistry. 2016;85(1):405-29. doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014537.

197. Sanders BD, Jackson B, Marmorstein R. Structural basis for sirtuin function: what we know and what we don't. Biochim Biophys Acta. 2010;1804(8):1604-16. Epub 20090918. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.09.009. PubMed PMID: 19766737; PubMed Central PMCID: PMC2886166.

198. Moniot S, Weyand M, Steegborn C. Structures, substrates, and regulators of Mammalian sirtuins - opportunities and challenges for drug development. Front Pharmacol. 2012;3(16):16. Epub 2012/03/01. doi: 10.3389/fphar.2012.00016. PubMed PMID: 22363286; PubMed Central PMCID: PMC3275776.

199. Landry J, Sutton A, Tafrov ST, Heller RC, Stebbins J, Pillus L, et al. The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. Proc Natl Acad Sci

U S A. 2000;97(11):5807-11. Epub 2000/05/17. doi: 10.1073/pnas.110148297. PubMed PMID: 10811920; PubMed Central PMCID: PMC18515.

200. Borra MT, Smith BC, Denu JM. Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. J Biol Chem. 2005;280(17):17187-95. Epub 20050304. doi: 10.1074/jbc.M501250200. PubMed PMID: 15749705.

201. Liszt G, Ford E, Kurtev M, Guarente L. Mouse Sir2 homolog SIRT6 is a nuclear ADP-ribosyltransferase. J Biol Chem. 2005;280(22):21313-20. Epub 20050328. doi: 10.1074/jbc.M413296200. PubMed PMID: 15795229.

202. Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, Murphy AJ, et al. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. Cell. 2006;126(5):941-54. doi: 10.1016/j.cell.2006.06.057. PubMed PMID: 16959573.

203. Morigi M, Perico L, Benigni A. Sirtuins in Renal Health and Disease. Journal of the American Society of Nephrology. 2018;29(7):1799. doi: 10.1681/ASN.2017111218.

204. Vazquez BN, Fernández-Duran I, Vaquero A. Chapter 23 - Sirtuins in hematopoiesis and blood malignancies. In: Maiese K, editor. Sirtuin Biology in Medicine: Academic Press; 2021. p. 373-91.

205. Chalkiadaki A, Guarente L. The multifaceted functions of sirtuins in cancer. Nat Rev Cancer. 2015;15(10):608-24. Epub 20150918. doi: 10.1038/nrc3985. PubMed PMID: 26383140.

206. Bringman-Rodenbarger LR, Guo AH, Lyssiotis CA, Lombard DB. Emerging Roles for SIRT5 in Metabolism and Cancer. Antioxid Redox Signal. 2018;28(8):677-90. Epub 20171026. doi: 10.1089/ars.2017.7264. PubMed PMID: 28707979; PubMed Central PMCID: PMC5824490.

207. Yuan H, Su L, Chen WY. The emerging and diverse roles of sirtuins in cancer: a clinical perspective. OncoTargets and therapy. 2013;6:1399-416. doi: 10.2147/OTT.S37750. PubMed PMID: 24133372.

208. Taylor DM, Maxwell MM, Luthi-Carter R, Kazantsev AG. Biological and potential therapeutic roles of sirtuin deacetylases. Cell Mol Life Sci. 2008;65(24):4000-18. doi: 10.1007/s00018-008-8357-y. PubMed PMID: 18820996.

209. Roth M, Wang Z, Chen WY. Sirtuins in hematological aging and malignancy. Crit Rev Oncog. 2013;18(6):531-47. doi: 10.1615/critrevoncog.2013010187. PubMed PMID: 24579733; PubMed Central PMCID: PMC3951433.

210. Zhao L, Cao J, Hu K, He X, Yun D, Tong T, et al. Sirtuins and their Biological Relevance in Aging and Age-Related Diseases. Aging Dis. 2020;11(4):927-45. Epub 20200723. doi: 10.14336/ad.2019.0820. PubMed PMID: 32765955; PubMed Central PMCID: PMC7390530.

211. Bosch-Presegué L, Vaquero A. The dual role of sirtuins in cancer. Genes Cancer. 2011;2(6):648-62. doi: 10.1177/1947601911417862. PubMed PMID: 21941620; PubMed Central PMCID: PMC3174263.

212. Dykstra B, Olthof S, Schreuder J, Ritsema M, de Haan G. Clonal analysis reveals multiple functional defects of aged murine hematopoietic stem cells. J Exp Med. 2011;208(13):2691-703. Epub 2011/11/24. doi: 10.1084/jem.20111490. PubMed PMID: 22110168; PubMed Central PMCID: PMC3244040.

213. Sudo K, Ema H, Morita Y, Nakauchi H. Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. J Exp Med. 2000;192(9):1273-80. doi: 10.1084/jem.192.9.1273. PubMed PMID: 11067876; PubMed Central PMCID: PMC2193349.

214. Liang Y, Van Zant G, Szilvassy SJ. Effects of aging on the homing and engraftment of murine hematopoietic stem and progenitor cells. Blood. 2005;106(4):1479-87. Epub 20050412. doi: 10.1182/blood-2004-11-4282. PubMed PMID: 15827136; PubMed Central PMCID: PMC1895199.

215. Grover A, Sanjuan-Pla A, Thongjuea S, Carrelha J, Giustacchini A, Gambardella A, et al. Single-cell RNA sequencing reveals molecular and functional platelet bias of aged haematopoietic stem cells. Nat Commun. 2016;7:11075. Epub 20160324. doi: 10.1038/ncomms11075. PubMed PMID: 27009448; PubMed Central PMCID: PMC4820843.

216. Rundberg Nilsson A, Soneji S, Adolfsson S, Bryder D, Pronk CJ. Human and Murine Hematopoietic Stem Cell Aging Is Associated with Functional Impairments and Intrinsic Megakaryocytic/Erythroid Bias. PLoS One. 2016;11(7):e0158369. Epub 20160701. doi: 10.1371/journal.pone.0158369. PubMed PMID: 27368054; PubMed Central PMCID: PMC4930192.

217. Xie M, Lu C, Wang J, McLellan MD, Johnson KJ, Wendl MC, et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. Nat Med. 2014;20(12):1472-8. Epub 20141019. doi: 10.1038/nm.3733. PubMed PMID: 25326804; PubMed Central PMCID: PMC4313872.

218. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. N Engl J Med. 2014;371(26):2488-98. Epub 20141126. doi: 10.1056/NEJMoa1408617. PubMed PMID: 25426837; PubMed Central PMCID: PMC4306669.

219. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. N Engl J Med. 2014;371(26):2477-87. Epub 20141126. doi: 10.1056/NEJMoa1409405. PubMed PMID: 25426838; PubMed Central PMCID: PMC4290021.

220. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. Blood. 2015;126(1):9-16. Epub 20150430. doi: 10.1182/blood-2015-03-631747. PubMed PMID: 25931582; PubMed Central PMCID: PMC4624443.

221. Jaiswal S, Ebert BL. Clonal hematopoiesis in human aging and disease. Science. 2019;366(6465):eaan4673. Epub 2019/11/02. doi: 10.1126/science.aan4673. PubMed PMID: 31672865; PubMed Central PMCID: PMC8050831.

222. Menssen AJ, Walter MJ. Genetics of progression from MDS to secondary leukemia. Blood. 2020;136(1):50-60. doi: 10.1182/blood.2019000942. PubMed PMID: 32430504; PubMed Central PMCID: PMC7332895.

223. Costa-Machado LF, Fernandez-Marcos PJ. The sirtuin family in cancer. Cell Cycle. 2019;18(18):2164-96. Epub 20190725. doi: 10.1080/15384101.2019.1634953. PubMed PMID: 31251117; PubMed Central PMCID: PMC6738532.

224. Liu T, Liu PY, Marshall GM. The Critical Role of the Class III Histone Deacetylase SIRT1 in Cancer. Cancer Research. 2009;69(5):1702. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3365.

225. Brooks CL, Gu W. Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation. Curr Opin Cell Biol. 2003;15(2):164-71. doi: 10.1016/s0955-0674(03)00003-6. PubMed PMID: 12648672.

226. Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A, et al. Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. Cell. 2001;107(2):137-48. doi: 10.1016/s0092-8674(01)00524-4. PubMed PMID: 11672522.

227. Han MK, Song EK, Guo Y, Ou X, Mantel C, Broxmeyer HE. SIRT1 regulates apoptosis and Nanog expression in mouse embryonic stem cells by controlling p53 subcellular localization. Cell Stem Cell. 2008;2(3):241-51. doi: 10.1016/j.stem.2008.01.002. PubMed PMID: 18371449; PubMed Central PMCID: PMC2819008.

228. Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, Chua KF, Greer PL, Lin Y, et al. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. Science. 2004;303(5666):2011-5. Epub 20040219. doi: 10.1126/science.1094637. PubMed PMID: 14976264.

229. Alves-Fernandes DK, Jasiulionis MG. The Role of SIRT1 on DNA Damage Response and Epigenetic Alterations in Cancer. Int J Mol Sci. 2019;20(13):3153. Epub 2019/07/03. doi: 10.3390/ijms20133153. PubMed PMID: 31261609; PubMed Central PMCID: PMC6651129.

230. Carafa V, Altucci L, Nebbioso A. Dual Tumor Suppressor and Tumor Promoter Action of Sirtuins in Determining Malignant Phenotype. Frontiers in Pharmacology. 2019;10(38). doi: 10.3389/fphar.2019.00038.

231. Jung-Hynes B, Nihal M, Zhong W, Ahmad N. Role of sirtuin histone deacetylase SIRT1 in prostate cancer. A target for prostate cancer management via its inhibition? J Biol Chem. 2009;284(6):3823-32. Epub 2008/12/17. doi: 10.1074/jbc.M807869200. PubMed PMID: 19075016; PubMed Central PMCID: PMC2635052.

232. Jin X, Wei Y, Xu F, Zhao M, Dai K, Shen R, et al. SIRT1 promotes formation of breast cancer through modulating Akt activity. J Cancer. 2018;9(11):2012-23. Epub

20180430. doi: 10.7150/jca.24275. PubMed PMID: 29896286; PubMed Central PMCID: PMC5995935.

233. Han L, Liang X-H, Chen L-X, Bao S-M, Yan Z-Q. SIRT1 is highly expressed in brain metastasis tissues of non-small cell lung cancer (NSCLC) and in positive regulation of NSCLC cell migration. Int J Clin Exp Pathol. 2013;6(11):2357-65. PubMed PMID: 24228097.

234. Lin Z, Fang D. The Roles of SIRT1 in Cancer. Genes Cancer. 2013;4(3-4):97-104. doi: 10.1177/1947601912475079. PubMed PMID: 24020000.

235. Ohanna M, Bonet C, Bille K, Allegra M, Davidson I, Bahadoran P, et al. SIRT1 promotes proliferation and inhibits the senescence-like phenotype in human melanoma cells. Oncotarget. 2014;5(8):2085-95. doi: 10.18632/oncotarget.1791. PubMed PMID: 24742694.

236. Shuang T, Wang M, Zhou Y, Shi C. Over-expression of Sirt1 contributes to chemoresistance and indicates poor prognosis in serous epithelial ovarian cancer (EOC). Med Oncol. 2015;32(12):260. Epub 20151031. doi: 10.1007/s12032-015-0706-8. PubMed PMID: 26520143.

237. Denu RA. Chapter 13 - Sirtuin signaling in hematologic malignancies. In: Maiese K, editor. Sirtuin Biology in Cancer and Metabolic Disease: Academic Press; 2021. p. 233-58.

238. M R, Z W, WY C. Sirtuins in hematological aging and malignancy. D - 8914610. 2013(- 0893-9675 (Print)):- 531-47.

239. Zhao B, Li X, Zhou L, Wang Y, Shang P. SIRT1: a potential tumour biomarker and therapeutic target. J Drug Target. 2019;27(10):1046-52. Epub 2019/05/07. doi: 10.1080/1061186X.2019.1605519. PubMed PMID: 31056963.

240. Afshar G, Murnane JP. Characterization of a human gene with sequence homology to Saccharomyces cerevisiae SIR2. Gene. 1999;234(1):161-8. doi: 10.1016/s0378-1119(99)00162-6. PubMed PMID: 10393250.

241. Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC, Horikawa I. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. Mol Biol Cell. 2005;16(10):4623-35. Epub 20050803. doi: 10.1091/mbc.e05-01-0033. PubMed PMID: 16079181; PubMed Central PMCID: PMC1237069.

242. Voelter-Mahlknecht S, Ho AD, Mahlknecht U. FISH-mapping and genomic organization of the NAD-dependent histone deacetylase gene, Sirtuin 2 (Sirt2). Int J Oncol. 2005;27(5):1187-96. PubMed PMID: 16211212.

243. North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E. The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD+-dependent tubulin deacetylase. Mol Cell. 2003;11(2):437-44. doi: 10.1016/s1097-2765(03)00038-8. PubMed PMID: 12620231.

244. Magiera MM, Singh P, Gadadhar S, Janke C. Tubulin Posttranslational Modifications and Emerging Links to Human Disease. Cell. 2018;173(6):1323-7. doi: https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.018.

245. Nogales E, Whittaker M, Milligan RA, Downing KH. High-resolution model of the microtubule. Cell. 1999;96(1):79-88. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80961-7. PubMed PMID: 9989499.

246. Piperno G, LeDizet M, Chang XJ. Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture. J Cell Biol. 1987;104(2):289-302. doi: 10.1083/jcb.104.2.289. PubMed PMID: 2879846; PubMed Central PMCID: PMC2114420.

247. Mei Z, Zhang X, Yi J, Huang J, He J, Tao Y. Sirtuins in metabolism, DNA repair and cancer. J Exp Clin Cancer Res. 2016;35(1):182. Epub 20161205. doi: 10.1186/s13046-016-0461-5. PubMed PMID: 27916001; PubMed Central PMCID: PMC5137222.

248. Huang S, Zhao Z, Tang D, Zhou Q, Li Y, Zhou L, et al. Downregulation of SIRT2 Inhibits Invasion of Hepatocellular Carcinoma by Inhibiting Energy Metabolism. Translational Oncology. 2017;10(6):917-27. doi: https://doi.org/10.1016/j.tranon.2017.09.006.

249. Inoue T, Hiratsuka M, Osaki M, Yamada H, Kishimoto I, Yamaguchi S, et al. SIRT2, a tubulin deacetylase, acts to block the entry to chromosome condensation in response to mitotic stress. Oncogene. 2007;26(7):945-57. doi: 10.1038/sj.onc.1209857.

250. Lai CC, Lin PM, Lin SF, Hsu CH, Lin HC, Hu ML, et al. Altered expression of SIRT gene family in head and neck squamous cell carcinoma. Tumour Biol. 2013;34(3):1847-54. Epub 20130312. doi: 10.1007/s13277-013-0726-y. PubMed PMID: 23475622.

251. Grbesa I, Pajares MJ, Martínez-Terroba E, Agorreta J, Mikecin AM, Larráyoz M, et al. Expression of sirtuin 1 and 2 is associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer patients. PLoS One. 2015;10(4):e0124670. Epub 20150427. doi: 10.1371/journal.pone.0124670. PubMed PMID: 25915617; PubMed Central PMCID: PMC4411155.

252. McGlynn LM, Zino S, MacDonald AI, Curle J, Reilly JE, Mohammed ZM, et al. SIRT2: tumour suppressor or tumour promoter in operable breast cancer? Eur J Cancer. 2014;50(2):290-301. Epub 20131029. doi: 10.1016/j.ejca.2013.10.005. PubMed PMID: 24183459.

253. Kim HS, Vassilopoulos A, Wang RH, Lahusen T, Xiao Z, Xu X, et al. SIRT2 maintains genome integrity and suppresses tumorigenesis through regulating APC/C activity. Cancer Cell. 2011;20(4):487-99. doi: 10.1016/j.ccr.2011.09.004. PubMed PMID: 22014574; PubMed Central PMCID: PMC3199577.

254. Chen J, Chan AW, To KF, Chen W, Zhang Z, Ren J, et al. SIRT2 overexpression in hepatocellular carcinoma mediates epithelial to mesenchymal transition by protein kinase B/glycogen synthase kinase-3β/β-catenin signaling. Hepatology. 2013;57(6):2287-98. Epub 20130426. doi: 10.1002/hep.26278. PubMed PMID: 23348706.

255. Du Y, Wu J, Zhang H, Li S, Sun H. Reduced expression of SIRT2 in serous ovarian carcinoma promotes cell proliferation through disinhibition of CDK4 expression. Mol Med

Rep. 2017;15(4):1638-46. Epub 20170208. doi: 10.3892/mmr.2017.6183. PubMed PMID: 28259910; PubMed Central PMCID: PMC5365020.

256. Schwer B, Bunkenborg J, Verdin RO, Andersen JS, Verdin E. Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(27):10224-9. Epub 20060620. doi: 10.1073/pnas.0603968103. PubMed PMID: 16788062; PubMed Central PMCID: PMC1502439.

257. Lombard DB, Alt FW, Cheng HL, Bunkenborg J, Streeper RS, Mostoslavsky R, et al. Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. Mol Cell Biol. 2007;27(24):8807-14. Epub 20071008. doi: 10.1128/mcb.01636-07. PubMed PMID: 17923681; PubMed Central PMCID: PMC2169418.

258. Scher MB, Vaquero A, Reinberg D. SirT3 is a nuclear NAD+-dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress. Genes Dev. 2007;21(8):920-8. Epub 2007/04/18. doi: 10.1101/gad.1527307. PubMed PMID: 17437997; PubMed Central PMCID: PMC1847710.

259. Nakamura Y, Ogura M, Tanaka D, Inagaki N. Localization of mouse mitochondrial SIRT proteins: shift of SIRT3 to nucleus by co-expression with SIRT5. Biochem Biophys Res Commun. 2008;366(1):174-9. Epub 20071203. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.11.122. PubMed PMID: 18054327.

260. Shi T, Wang F, Stieren E, Tong Q. SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. J Biol Chem. 2005;280(14):13560-7. Epub 20050114. doi: 10.1074/jbc.M414670200. PubMed PMID: 15653680.

261. Chen Y, Zhang J, Lin Y, Lei Q, Guan KL, Zhao S, et al. Tumour suppressor SIRT3 deacetylates and activates manganese superoxide dismutase to scavenge ROS. EMBO Rep. 2011;12(6):534-41. Epub 20110513. doi: 10.1038/embor.2011.65. PubMed PMID: 21566644; PubMed Central PMCID: PMC3128277.

262. Schlicker C, Gertz M, Papatheodorou P, Kachholz B, Becker CF, Steegborn C. Substrates and regulation mechanisms for the human mitochondrial sirtuins Sirt3 and Sirt5. J Mol Biol. 2008;382(3):790-801. Epub 20080725. doi: 10.1016/j.jmb.2008.07.048. PubMed PMID: 18680753.

263. Qiu X, Brown K, Hirschey MD, Verdin E, Chen D. Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. Cell Metab. 2010;12(6):662-7. doi: 10.1016/j.cmet.2010.11.015. PubMed PMID: 21109198.

264. Someya S, Yu W, Hallows WC, Xu J, Vann JM, Leeuwenburgh C, et al. Sirt3 mediates reduction of oxidative damage and prevention of age-related hearing loss under caloric restriction. Cell. 2010;143(5):802-12. doi: 10.1016/j.cell.2010.10.002. PubMed PMID: 21094524; PubMed Central PMCID: PMC3018849.

265. Vassilopoulos A, Fritz KS, Petersen DR, Gius D. The human sirtuin family: evolutionary divergences and functions. Hum Genomics. 2011;5(5):485-96. Epub 2011/08/03. doi: 10.1186/1479-7364-5-5-485. PubMed PMID: 21807603; PubMed Central PMCID: PMC3230576.

266. Jacobs KM, Pennington JD, Bisht KS, Aykin-Burns N, Kim HS, Mishra M, et al. SIRT3 interacts with the daf-16 homolog FOXO3a in the mitochondria, as well as increases FOXO3a dependent gene expression. Int J Biol Sci. 2008;4(5):291-9. Epub 20080905. doi: 10.7150/ijbs.4.291. PubMed PMID: 18781224; PubMed Central PMCID: PMC2532794.

267. Kim HS, Patel K, Muldoon-Jacobs K, Bisht KS, Aykin-Burns N, Pennington JD, et al. SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. Cancer Cell. 2010;17(1):41-52. doi: 10.1016/j.ccr.2009.11.023. PubMed PMID: 20129246; PubMed Central PMCID: PMC3711519.

268. Bell EL, Emerling BM, Ricoult SJ, Guarente L. SirT3 suppresses hypoxia inducible factor 1alpha and tumor growth by inhibiting mitochondrial ROS production. Oncogene. 2011;30(26):2986-96. Epub 2011/03/02. doi: 10.1038/onc.2011.37. PubMed PMID: 21358671; PubMed Central PMCID: PMC3134877.

269. Finley LW, Carracedo A, Lee J, Souza A, Egia A, Zhang J, et al. SIRT3 opposes reprogramming of cancer cell metabolism through HIF1α destabilization. Cancer Cell. 2011;19(3):416-28. doi: 10.1016/j.ccr.2011.02.014. PubMed PMID: 21397863; PubMed Central PMCID: PMC3065720.

270. Brown K, Xie S, Qiu X, Mohrin M, Shin J, Liu Y, et al. SIRT3 reverses aging-associated degeneration. Cell Rep. 2013;3(2):319-27. Epub 20130131. doi: 10.1016/j.celrep.2013.01.005. PubMed PMID: 23375372; PubMed Central PMCID: PMC3582834.

271. Torrens-Mas M, Oliver J, Roca P, Sastre-Serra J. SIRT3: Oncogene and Tumor Suppressor in Cancer. Cancers (Basel). 2017;9(7). Epub 20170712. doi: 10.3390/cancers9070090. PubMed PMID: 28704962; PubMed Central PMCID: PMC5532626.

272. Li S, Banck M, Mujtaba S, Zhou MM, Sugrue MM, Walsh MJ. p53-induced growth arrest is regulated by the mitochondrial SirT3 deacetylase. PLoS One. 2010;5(5):e10486. Epub 20100505. doi: 10.1371/journal.pone.0010486. PubMed PMID: 20463968; PubMed Central PMCID: PMC2864751.

273. Yang B, Fu X, Shao L, Ding Y, Zeng D. Aberrant expression of SIRT3 is conversely correlated with the progression and prognosis of human gastric cancer. Biochem Biophys Res Commun. 2014;443(1):156-60. Epub 20131125. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.11.068. PubMed PMID: 24287180.

274. Yu W, Denu RA, Krautkramer KA, Grindle KM, Yang DT, Asimakopoulos F, et al.

ll Malignancies. J Biol Chem. 2016;291(7):3268-79. Epub 20151202. doi: 10.1074/jbc.M115.702076. PubMed PMID: 26631723; PubMed Central PMCID: PMC4751373.

275. Kong J, Wang L, Ren L, Yan Y, Cheng Y, Huang Z, et al. Triptolide induces mitochondria-mediated apoptosis of Burkitt's lymphoma cell via deacetylation of GSK-3beta by increased SIRT3 expression. Toxicol Appl Pharmacol. 2018;342:1-13. Epub 2018/02/07. doi: 10.1016/j.taap.2018.01.011. PubMed PMID: 29407771.

276. Li M, Chiang YL, Lyssiotis CA, Teater MR, Hong JY, Shen H, et al. Non-oncogene Addiction to SIRT3 Plays a Critical Role in Lymphomagenesis. Cancer Cell. 2019;35(6):916-31 e9. doi: 10.1016/j.ccell.2019.05.002. PubMed PMID: 31185214; PubMed Central PMCID: PMC7534582.

277. Li M, Chiang YL, Lyssiotis C, Teater M, Shen H, Wang L, et al. SIRT3 Is a Novel Metabolic Driver of and Therapeutic Target for Chemotherapy Resistant Dlbcls. Blood. 2017;130(Supplement 1):643-. PubMed PMID: WOS:000432419401290.

278. Wang C, Liu Y, Zhu Y, Kong C. Functions of mammalian SIRT4 in cellular metabolism and research progress in human cancer. Oncol Lett. 2020;20(4):11. Epub 20200715. doi: 10.3892/ol.2020.11872. PubMed PMID: 32774484; PubMed Central PMCID: PMC7405384.

279. van de Ven RAH, Santos D, Haigis MC. Mitochondrial Sirtuins and Molecular Mechanisms of Aging. Trends Mol Med. 2017;23(4):320-31. Epub 20170310. doi: 10.1016/j.molmed.2017.02.005. PubMed PMID: 28285806; PubMed Central PMCID: PMC5713479.

280. Mathias RA, Greco TM, Oberstein A, Budayeva HG, Chakrabarti R, Rowland EA, et al. Sirtuin 4 is a lipoamidase regulating pyruvate dehydrogenase complex activity. Cell. 2014;159(7):1615-25. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.046. PubMed PMID: 25525879; PubMed Central PMCID: PMC4344121.

281. Bai Y, Yang J, Cui Y, Yao Y, Wu F, Liu C, et al. Research Progress of Sirtuin4 in Cancer. Front Oncol. 2020;10:562950. Epub 2021/02/16. doi: 10.3389/fonc.2020.562950. PubMed PMID: 33585187; PubMed Central PMCID: PMC7874138.

282. Pannek M, Simic Z, Fuszard M, Meleshin M, Rotili D, Mai A, et al. Crystal structures of the mitochondrial deacylase Sirtuin 4 reveal isoform-specific acyl recognition and regulation features. Nat Commun. 2017;8(1):1513. Epub 20171115. doi: 10.1038/s41467-017-01701-2. PubMed PMID: 29138502; PubMed Central PMCID: PMC5686155.

283. Anderson KA, Huynh FK, Fisher-Wellman K, Stuart JD, Peterson BS, Douros JD, et al. SIRT4 Is a Lysine Deacylase that Controls Leucine Metabolism and Insulin Secretion. Cell Metab. 2017;25(4):838-55 e15. Epub 2017/04/06. doi: 10.1016/j.cmet.2017.03.003. PubMed PMID: 28380376; PubMed Central PMCID: PMC5444661.

284. Laurent G, German NJ, Saha AK, de Boer VC, Davies M, Koves TR, et al. SIRT4 coordinates the balance between lipid synthesis and catabolism by repressing malonyl CoA

decarboxylase. Mol Cell. 2013;50(5):686-98. doi: 10.1016/j.molcel.2013.05.012. PubMed PMID: 23746352; PubMed Central PMCID: PMC3721068.

285. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G, Thompson CB. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. Cell Metab. 2008;7(1):11-20. doi: 10.1016/j.cmet.2007.10.002. PubMed PMID: 18177721.

286. Jeong SM, Xiao C, Finley LW, Lahusen T, Souza AL, Pierce K, et al. SIRT4 has tumor-suppressive activity and regulates the cellular metabolic response to DNA damage by inhibiting mitochondrial glutamine metabolism. Cancer Cell. 2013;23(4):450-63. Epub 20130404. doi: 10.1016/j.ccr.2013.02.024. PubMed PMID: 23562301; PubMed Central PMCID: PMC3650305.

287. Csibi A, Fendt SM, Li C, Poulogiannis G, Choo AY, Chapski DJ, et al. The mTORC1 pathway stimulates glutamine metabolism and cell proliferation by repressing SIRT4. Cell. 2013;153(4):840-54. doi: 10.1016/j.cell.2013.04.023. PubMed PMID: 23663782; PubMed Central PMCID: PMC3684628.

288. Tomaselli D, Steegborn C, Mai A, Rotili D. Sirt4: A Multifaceted Enzyme at the Crossroads of Mitochondrial Metabolism and Cancer. Frontiers in Oncology. 2020;10:474.

289. Nebbioso M, Lambiase A, Armentano M, Tucciarone G, Sacchetti M, Greco A, et al. Diabetic retinopathy, oxidative stress, and sirtuins: an in depth look in enzymatic patterns and new therapeutic horizons. Surv Ophthalmol. 2021. Epub 20210414. doi: 10.1016/j.survophthal.2021.04.003. PubMed PMID: 33864872.

290. Huang G, Zhu G. Sirtuin-4 (SIRT4), a therapeutic target with oncogenic and tumor-suppressive activity in cancer. Onco Targets Ther. 2018;11:3395-400. Epub 2018/06/22. doi: 10.2147/OTT.S157724. PubMed PMID: 29928130; PubMed Central PMCID: PMC6001835.

291. Miyo M, Yamamoto H, Konno M, Colvin H, Nishida N, Koseki J, et al. Tumour-suppressive function of SIRT4 in human colorectal cancer. Br J Cancer. 2015;113(3):492-9. Epub 2015/06/18. doi: 10.1038/bjc.2015.226. PubMed PMID: 26086877.

292. Shi Q, Liu T, Zhang X, Geng J, He X, Nu M, et al. Decreased sirtuin 4 expression is associated with poor prognosis in patients with invasive breast cancer. Oncol Lett. 2016;12(4):2606-12. Epub 20160816. doi: 10.3892/ol.2016.5021. PubMed PMID: 27698834; PubMed Central PMCID: PMC5038587.

293. Jeong SM, Lee A, Lee J, Haigis MC. SIRT4 protein suppresses tumor formation in genetic models of Myc-induced B cell lymphoma. J Biol Chem. 2014;289(7):4135-44. Epub 2013/12/26. doi: 10.1074/jbc.M113.525949. PubMed PMID: 24368766; PubMed Central PMCID: PMC3924279.

294. Bradbury CA, Khanim FL, Hayden R, Bunce CM, White DA, Drayson MT, et al. Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors. Leukemia. 2005;19(10):1751-9. doi: 10.1038/sj.leu.2403910. PubMed PMID: 16121216.

295. Mahlknecht U, Ho AD, Letzel S, Voelter-Mahlknecht S. Assignment of the NAD-dependent deacetylase sirtuin 5 gene (SIRT5) to human chromosome band 6p23 by in situ hybridization. Cytogenet Genome Res. 2006;112(3-4):208-12. doi: 10.1159/000089872. PubMed PMID: 16484774.

296. Takeshita A, Naito K, Shinjo K, Sahara N, Matsui H, Ohnishi K, et al. Deletion 6p23 and add(11)(p15) leading to NUP98 translocation in a case of therapy-related atypical chronic myelocytic leukemia transforming to acute myelocytic leukemia. Cancer Genet Cytogenet. 2004;152(1):56-60. Epub 2004/06/15. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2003.10.002. PubMed PMID: 15193442.

297. Park J, Chen Y, Tishkoff DX, Peng C, Tan M, Dai L, et al. SIRT5-mediated lysine desuccinylation impacts diverse metabolic pathways. Mol Cell. 2013;50(6):919-30. Epub 2013/06/29. doi: 10.1016/j.molcel.2013.06.001. PubMed PMID: 23806337; PubMed Central PMCID: PMC3769971.

298. Matsushita N, Yonashiro R, Ogata Y, Sugiura A, Nagashima S, Fukuda T, et al. Distinct regulation of mitochondrial localization and stability of two human Sirt5 isoforms. Genes Cells. 2011;16(2):190-202. Epub 20101209. doi: 10.1111/j.1365-2443.2010.01475.x. PubMed PMID: 21143562.

299. North BJ, Schwer B, Ahuja N, Marshall B, Verdin E. Preparation of enzymatically active recombinant class III protein deacetylases. Methods. 2005;36(4):338-45. Epub 2005/08/11. doi: 10.1016/j.ymeth.2005.03.004. PubMed PMID: 16091304.

300. Schlicker C, Gertz M, Papatheodorou P, Kachholz B, Becker CFW, Steegborn C. Substrates and Regulation Mechanisms for the Human Mitochondrial Sirtuins Sirt3 and Sirt5. Journal of Molecular Biology. 2008;382(3):790-801. doi: https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.07.048.

301. Peng C, Lu Z, Xie Z, Cheng Z, Chen Y, Tan M, et al. The first identification of lysine malonylation substrates and its regulatory enzyme. Mol Cell Proteomics. 2011;10(12):M111 012658. Epub 2011/09/13. doi: 10.1074/mcp.M111.012658. PubMed PMID: 21908771; PubMed Central PMCID: PMC3237090.

302. Rardin MJ, He W, Nishida Y, Newman JC, Carrico C, Danielson SR, et al. SIRT5 regulates the mitochondrial lysine succinylome and metabolic networks. Cell Metab. 2013;18(6):920-33. Epub 2013/12/10. doi: 10.1016/j.cmet.2013.11.013. PubMed PMID: 24315375; PubMed Central PMCID: PMC4105152.

303. Nakagawa T, Lomb DJ, Haigis MC, Guarente L. SIRT5 Deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle. Cell. 2009;137(3):560-70. Epub 2009/05/05. doi: 10.1016/j.cell.2009.02.026. PubMed PMID: 19410549; PubMed Central PMCID: PMC2698666.

304. Polletta L, Vernucci E, Carnevale I, Arcangeli T, Rotili D, Palmerio S, et al. SIRT5 regulation of ammonia-induced autophagy and mitophagy. Autophagy. 2015;11(2):253-70. Epub 2015/02/24. doi: 10.1080/15548627.2015.1009778. PubMed PMID: 25700560; PubMed Central PMCID: PMC4502726.

305. Singh CK, Chhabra G, Ndiaye MA, Garcia-Peterson LM, Mack NJ, Ahmad N. The Role of Sirtuins in Antioxidant and Redox Signaling. Antioxid Redox Signal. 2018;28(8):643-61. Epub 2017/10/20. doi: 10.1089/ars.2017.7290. PubMed PMID: 28891317.

306. Kumar S, Lombard DB. Functions of the sirtuin deacylase SIRT5 in normal physiology and pathobiology. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2018;53(3):311-34. Epub 2018/04/12. doi: 10.1080/10409238.2018.1458071. PubMed PMID: 29637793; PubMed Central PMCID: PMC6233320.

307. Lin ZF, Xu HB, Wang JY, Lin Q, Ruan Z, Liu FB, et al. SIRT5 desuccinylates and activates SOD1 to eliminate ROS. Biochem Biophys Res Commun. 2013;441(1):191-5. Epub 20131016. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.033. PubMed PMID: 24140062.

308. Bartosch C, Monteiro-Reis S, Almeida-Rios D, Vieira R, Castro A, Moutinho M, et al. Assessing sirtuin expression in endometrial carcinoma and non-neoplastic endometrium. Oncotarget. 2016;7(2):1144-54. Epub 2015/12/25. doi: 10.18632/oncotarget.6691. PubMed PMID: 26701732; PubMed Central PMCID: PMC4811449.

309. Lu W, Zuo Y, Feng Y, Zhang M. SIRT5 facilitates cancer cell growth and drug resistance in non-small cell lung cancer. Tumour Biol. 2014;35(11):10699-705. Epub 2014/07/30. doi: 10.1007/s13277-014-2372-4. PubMed PMID: 25070488.

310. Igci M, Kalender ME, Borazan E, Bozgeyik I, Bayraktar R, Bozgeyik E, et al. High-throughput screening of Sirtuin family of genes in breast cancer. Gene. 2016;586(1):123-8. Epub 2016/04/16. doi: 10.1016/j.gene.2016.04.023. PubMed PMID: 27080717.

311. Sun JY, Xu L, Tseng H, Ciccarelli B, Fulciniti M, Hunter ZR, et al. Histone deacetylase inhibitors demonstrate significant preclinical activity as single agents, and in combination with bortezomib in Waldenstrom's macroglobulinemia. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2011;11(1):152-6. doi: 10.3816/CLML.2011.n.036. PubMed PMID: 21454220.

312. Yan D, Franzini A, Pomicter AD, Halverson BJ, Antelope O, Mason CC, et al. SIRT5 Is a Druggable Metabolic Vulnerability in Acute Myeloid Leukemia. Blood Cancer Discovery. 2021;2(3):266. doi: 10.1158/2643-3230.BCD-20-0168.

313. Mahlknecht U, Ho AD, Voelter-Mahlknecht S. Chromosomal organization and fluorescence in situ hybridization of the human Sirtuin 6 gene. Int J Oncol. 2006;28(2):447-56. PubMed PMID: 16391800.

314. Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, Pang WW, Fischer MR, Gellon L, et al. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. Cell. 2006;124(2):315-29. doi: 10.1016/j.cell.2005.11.044. PubMed PMID: 16439206.

315. Kugel S, Mostoslavsky R. Chromatin and beyond: the multitasking roles for SIRT6. Trends Biochem Sci. 2014;39(2):72-81. Epub 20140114. doi: 10.1016/j.tibs.2013.12.002. PubMed PMID: 24438746; PubMed Central PMCID: PMC3912268.

316. Michishita E, McCord RA, Berber E, Kioi M, Padilla-Nash H, Damian M, et al. SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. Nature. 2008;452(7186):492-6. Epub 20080312. doi: 10.1038/nature06736. PubMed PMID: 18337721; PubMed Central PMCID: PMC2646112.

317. Yang B, Zwaans BM, Eckersdorff M, Lombard DB. The sirtuin SIRT6 deacetylates H3 K56Ac in vivo to promote genomic stability. Cell Cycle. 2009;8(16):2662-3. Epub 20090822. doi: 10.4161/cc.8.16.9329. PubMed PMID: 19597350; PubMed Central PMCID: PMC2728171.

318. Wang WW, Zeng Y, Wu B, Deiters A, Liu WR. A Chemical Biology Approach to Reveal Sirt6-targeted Histone H3 Sites in Nucleosomes. ACS Chem Biol. 2016;11(7):1973-81. Epub 20160517. doi: 10.1021/acschembio.6b00243. PubMed PMID: 27152839; PubMed Central PMCID: PMC5478164.

319. Tasselli L, Xi Y, Zheng W, Tennen RI, Odrowaz Z, Simeoni F, et al. SIRT6 deacetylates H3K18ac at pericentric chromatin to prevent mitotic errors and cellular senescence. Nat Struct Mol Biol. 2016;23(5):434-40. Epub 2016/04/05. doi: 10.1038/nsmb.3202. PubMed PMID: 27043296; PubMed Central PMCID: PMC5826646.

320. Jia G, Su L, Singhal S, Liu X. Emerging roles of SIRT6 on telomere maintenance, DNA repair, metabolism and mammalian aging. Mol Cell Biochem. 2012;364(1-2):345-50. doi: 10.1007/s11010-012-1236-8. PubMed PMID: 22286818.

321. Liu G, Chen H, Liu H, Zhang W, Zhou J. Emerging roles of SIRT6 in human diseases and its modulators. Med Res Rev. 2021;41(2):1089-137. Epub 2020/12/17. doi: 10.1002/med.21753. PubMed PMID: 33325563; PubMed Central PMCID: PMC7906922.

322. Kaidi A, Weinert BT, Choudhary C, Jackson SP. Human SIRT6 promotes DNA end resection through CtIP deacetylation. Science. 2010;329(5997):1348-53. doi: 10.1126/science.1192049. PubMed PMID: 20829486; PubMed Central PMCID: PMC3276839.

323. Kanfi Y, Naiman S, Amir G, Peshti V, Zinman G, Nahum L, et al. The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. Nature. 2012;483(7388):218-21. Epub 2012/03/01. doi: 10.1038/nature10815. PubMed PMID: 22367546.

324. Kawahara TL, Michishita E, Adler AS, Damian M, Berber E, Lin M, et al. SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. Cell. 2009;136(1):62-74. doi: 10.1016/j.cell.2008.10.052. PubMed PMID: 19135889; PubMed Central PMCID: PMC2757125.

325. Mao Z, Hine C, Tian X, Van Meter M, Au M, Vaidya A, et al. SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1. Science. 2011;332(6036):1443-6. doi: 10.1126/science.1202723. PubMed PMID: 21680843; PubMed Central PMCID: PMC5472447.

326. Liu G, Chen H, Liu H, Zhang W, Zhou J. Emerging roles of SIRT6 in human diseases and its modulators. Medicinal Research Reviews. 2021;41(2):1089-137. doi: https://doi.org/10.1002/med.21753.

327. Fiorentino F, Carafa V, Favale G, Altucci L, Mai A, Rotili D. The Two-Faced Role of SIRT6 in Cancer. Cancers (Basel). 2021;13(5). Epub 20210308. doi: 10.3390/cancers13051156. PubMed PMID: 33800266; PubMed Central PMCID: PMC7962659.

328. Sebastián C, Zwaans BM, Silberman DM, Gymrek M, Goren A, Zhong L, et al. The histone deacetylase SIRT6 is a tumor suppressor that controls cancer metabolism. Cell. 2012;151(6):1185-99. doi: 10.1016/j.cell.2012.10.047. PubMed PMID: 23217706; PubMed Central PMCID: PMC3526953.

329. Kugel S, Feldman JL, Klein MA, Silberman DM, Sebastián C, Mermel C, et al. Identification of and Molecular Basis for SIRT6 Loss-of-Function Point Mutations in Cancer. Cell Rep. 2015;13(3):479-88. Epub 20151008. doi: 10.1016/j.celrep.2015.09.022. PubMed PMID: 26456828; PubMed Central PMCID: PMC4618237.

330. Ran LK, Chen Y, Zhang ZZ, Tao NN, Ren JH, Zhou L, et al. SIRT6 Overexpression Potentiates Apoptosis Evasion in Hepatocellular Carcinoma via BCL2-Associated X Protein-Dependent Apoptotic Pathway. Clin Cancer Res. 2016;22(13):3372-82. Epub 20160209. doi: 10.1158/1078-0432.Ccr-15-1638. PubMed PMID: 26861461.

331. Wu X, Tian HA-O, Xue L, Wang L. SIRT6 abrogation promotes adrenocortical carcinoma through activation of NF-κB signaling. 2019(1573-4919 (Electronic)).

332. Marquardt JU, Fischer K, Baus K, Kashyap A, Ma S, Krupp M, et al. Sirtuin-6-dependent genetic and epigenetic alterations are associated with poor clinical outcome in hepatocellular carcinoma patients. Hepatology. 2013;58(3):1054-64. Epub 2013/03/26. doi: 10.1002/hep.26413. PubMed PMID: 23526469; PubMed Central PMCID: PMC3759627.

333. Krishnamoorthy V, Vilwanathan R. Silencing Sirtuin 6 induces cell cycle arrest and apoptosis in non-small cell lung cancer cell lines. Genomics. 2020;112(5):3703-12. Epub 2020/05/04. doi: 10.1016/j.ygeno.2020.04.027. PubMed PMID: 32360514.

334. Khongkow M, Olmos Y, Gong C, Gomes AR, Monteiro LJ, Yague E, et al. SIRT6 modulates paclitaxel and epirubicin resistance and survival in breast cancer. Carcinogenesis. 2013;34(7):1476-86. Epub 2013/03/22. doi: 10.1093/carcin/bgt098. PubMed PMID: 23514751.

335. Bauer I, Grozio A, Lasiglie D, Basile G, Sturla L, Magnone M, et al. The NAD+-dependent histone deacetylase SIRT6 promotes cytokine production and migration in pancreatic cancer cells by regulating Ca2+ responses. J Biol Chem. 2012;287(49):40924-37. Epub 2012/10/23. doi: 10.1074/jbc.M112.405837. PubMed PMID: 23086953; PubMed Central PMCID: PMC3510797.

336. Yang Z, Yu W, Huang R, Ye M, Min Z. SIRT6/HIF-1alpha axis promotes papillary thyroid cancer progression by inducing epithelial-mesenchymal transition. Cancer Cell Int.

2019;19:17. Epub 2019/01/25. doi: 10.1186/s12935-019-0730-4. PubMed PMID: 30675128; PubMed Central PMCID: PMC6335740.

337. Yang J, Li Y, Zhang Y, Zhou X, Wang X. SIRT6 As a Potential Therapeutic Target in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. Blood. 2018;132(Supplement 1):2862-. doi: 10.1182/blood-2018-99-115823.

338. Yang J, Li Y, Zhang Y, Fang X, Chen N, Zhou X, et al. Sirt6 promotes tumorigenesis and drug resistance of diffuse large B-cell lymphoma by mediating PI3K/Akt signaling. J Exp Clin Cancer Res. 2020;39(1):142. Epub 2020/07/28. doi: 10.1186/s13046-020-01623-w. PubMed PMID: 32711549; PubMed Central PMCID: PMC7382040.

339. Cagnetta A, Soncini D, Orecchioni S, Talarico G, Minetto P, Guolo F, et al. Depletion of SIRT6 enzymatic activity increases acute myeloid leukemia cells' vulnerability to DNA-damaging agents. Haematologica. 2018;103(1):80-90. Epub 2017/10/14. doi: 10.3324/haematol.2017.176248. PubMed PMID: 29025907; PubMed Central PMCID: PMC5777193.

340. Wang JC, Kafeel MI, Avezbakiyev B, Chen C, Sun Y, Rathnasabapathy C, et al. Histone deacetylase in chronic lymphocytic leukemia. Oncology. 2011;81(5-6):325-9. Epub 20120110. doi: 10.1159/000334577. PubMed PMID: 22237050.

341. Giblin W, Lombard DB. Chapter 3 - Sirtuins, Healthspan, and Longevity in Mammals. In: Kaeberlein MR, Martin GM, editors. Handbook of the Biology of Aging (Eighth Edition). San Diego: Academic Press; 2016. p. 83-132.

342. Voelter-Mahlknecht S, Letzel S, Mahlknecht U. Fluorescence in situ hybridization and chromosomal organization of the human Sirtuin 7 gene. Int J Oncol. 2006;28(4):899-908. PubMed PMID: 16525639.

343. Blank MF, Grummt I. The seven faces of SIRT7. Transcription. 2017;8(2):67-74. Epub 2017/01/10. doi: 10.1080/21541264.2016.1276658. PubMed PMID: 28067587; PubMed Central PMCID: PMC5423475.

344. Ford E, Voit R, Liszt G, Magin C, Grummt I, Guarente L. Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. Genes & development. 2006;20(9):1075-80. Epub 2006/04/17. doi: 10.1101/gad.1399706. PubMed PMID: 16618798.

345. Barber MF, Michishita-Kioi E, Xi Y, Tasselli L, Kioi M, Moqtaderi Z, et al. SIRT7 links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation. Nature. 2012;487(7405):114-8. Epub 2012/06/23. doi: 10.1038/nature11043. PubMed PMID: 22722849; PubMed Central PMCID: PMC3412143.

346. Grob A, Roussel P, Wright JE, McStay B, Hernandez-Verdun D, Sirri V. Involvement of SIRT7 in resumption of rDNA transcription at the exit from mitosis. J Cell Sci. 2009;122(Pt 4):489-98. Epub 20090127. doi: 10.1242/jcs.042382. PubMed PMID: 19174463; PubMed Central PMCID: PMC2714433.

347. Martínez-Redondo P, Santos-Barriopedro I, Vaquero A. A Big Step for SIRT7, One Giant Leap for Sirtuins… in Cancer. Cancer Cell. 2012;21(6):719-21. doi: https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.05.028.

348. Kim JK, Noh JH, Jung KH, Eun JW, Bae HJ, Kim MG, et al. Sirtuin7 oncogenic potential in human hepatocellular carcinoma and its regulation by the tumor suppressors MiR-125a-5p and MiR-125b. Hepatology. 2013;57(3):1055-67. Epub 20130211. doi: 10.1002/hep.26101. PubMed PMID: 23079745.

349. Aljada A, Saleh AM, Alkathiri M, Shamsa HB, Al-Bawab A, Nasr A. Altered Sirtuin 7 Expression is Associated with Early Stage Breast Cancer. Breast Cancer (Auckl). 2015;9:3-8. Epub 2015/04/30. doi: 10.4137/BCBCR.S23156. PubMed PMID: 25922576; PubMed Central PMCID: PMC4396534.

350. Kiran S, Kiran M, Ramakrishna G. Sirtuin 7 Promotes Mesenchymal to Epithelial Transition by beta-Catenin Redistribution and Stabilization. Front Oncol. 2020;10(740):740. Epub 2020/07/14. doi: 10.3389/fonc.2020.00740. PubMed PMID: 32656073; PubMed Central PMCID: PMC7324751.

351. Zhang S, Chen P, Huang Z, Hu X, Chen M, Hu S, et al. Sirt7 promotes gastric cancer growth and inhibits apoptosis by epigenetically inhibiting miR-34a. Sci Rep. 2015;5(1):9787. Epub 2015/04/11. doi: 10.1038/srep09787. PubMed PMID: 25860861; PubMed Central PMCID: PMC4392652.

352. Benavente CA, Schnell SA, Jacobson EL. Effects of niacin restriction on sirtuin and PARP responses to photodamage in human skin. PLoS One. 2012;7(7):e42276. Epub 2012/08/04. doi: 10.1371/journal.pone.0042276. PubMed PMID: 22860104; PubMed Central PMCID: PMC3409181.

353. Wang HL, Lu RQ, Xie SH, Zheng H, Wen XM, Gao X, et al. SIRT7 Exhibits Oncogenic Potential in Human Ovarian Cancer Cells. Asian Pac J Cancer Prev. 2015;16(8):3573-7. Epub 2015/04/30. doi: 10.7314/apjcp.2015.16.8.3573. PubMed PMID: 25921180.

354. Shi H, Ji Y, Zhang D, Liu Y, Fang P. MicroRNA-3666-induced suppression of SIRT7 inhibits the growth of non-small cell lung cancer cells. Oncol Rep. 2016;36(5):3051-7. Epub 2016/10/26. doi: 10.3892/or.2016.5063. PubMed PMID: 27599551.

355. Xi X, Li T, Huang Y, Sun J, Zhu Y, Yang Y, et al. RNA Biomarkers: Frontier of Precision Medicine for Cancer. Noncoding RNA. 2017;3(1). Epub 20170220. doi: 10.3390/ncrna3010009. PubMed PMID: 29657281; PubMed Central PMCID: PMC5832009.

356. Rachinger N, Fischer S, Böhme I, Linck-Paulus L, Kuphal S, Kappelmann-Fenzl M, et al. Loss of Gene Information: Discrepancies between RNA Sequencing, cDNA Microarray, and qRT-PCR. Int J Mol Sci. 2021;22(17). Epub 20210828. doi: 10.3390/ijms22179349. PubMed PMID: 34502254; PubMed Central PMCID: PMC8430810.

357. Morey JS, Ryan JC, Van Dolah FM. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. Biol Proced Online. 2006;8:175-93. Epub 2006/12/12. doi: 10.1251/bpo126. PubMed PMID: 17242735.

358. Yu H, Pan W, Huang H, Chen J, Sun B, Yang L, et al. Screening Analysis of Sirtuins Family Expression on Anti-Inflammation of Resveratrol in Endothelial Cells. Med Sci Monit. 2019;25:4137-48. Epub 2019/06/04. doi: 10.12659/MSM.913240. PubMed PMID: 31158122; PubMed Central PMCID: PMC6561145.

359. Tang Z, Li L, Tang Y, Xie D, Wu K, Wei W, et al. CDK2 positively regulates aerobic glycolysis by suppressing SIRT5 in gastric cancer. Cancer Sci. 2018;109(8):2590-8. Epub 20180710. doi: 10.1111/cas.13691. PubMed PMID: 29896817; PubMed Central PMCID: PMC6113437.

360. Freitas M, Rodrigues AR, Tomada N, Fonseca J, Magalhães A, Gouveia AM, et al. Effects of Aging and Cardiovascular Disease Risk Factors on the Expression of Sirtuins in the Human Corpus Cavernosum. The Journal of Sexual Medicine. 2015;12(11):2141-52. doi: https://doi.org/10.1111/jsm.13035.

361. Potashnikova D, Gladkikh A, Vorobjev IA. Selection of superior reference genes' combination for quantitative real-time PCR in B-cell lymphomas. Ann Clin Lab Sci. 2015;45(1):64-72. Epub 2015/02/20. PubMed PMID: 25696013.

362. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method. Methods. 2001;25(4):402-8. doi: https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262.

363. Relander T, Johnson NA, Farinha P, Connors JM, Sehn LH, Gascoyne RD. Prognostic factors in follicular lymphoma. J Clin Oncol. 2010;28(17):2902-13. Epub 2010/04/14. doi: 10.1200/JCO.2009.26.1693. PubMed PMID: 20385990.

364. Zhou T, Pittaluga S, Jaffe ES. Molecular insights into the pathogenesis of follicular lymphoma. Annals of Lymphoma. 2021;5.

365. Takata K, Miyata-Takata T, Sato Y, Yoshino T. Pathology of follicular lymphoma. J Clin Exp Hematop. 2014;54(1):3-9. doi: 10.3960/jslrt.54.3. PubMed PMID: 24942941.

366. Casulo C, Byrtek M, Dawson KL, Zhou X, Farber CM, Flowers CR, et al. Early Relapse of Follicular Lymphoma After Rituximab Plus Cyclophosphamide, Doxorubicin, Vincristine, and Prednisone Defines Patients at High Risk for Death: An Analysis From the National LymphoCare Study. J Clin Oncol. 2015;33(23):2516-22. Epub 2015/06/29. doi: 10.1200/JCO.2014.59.7534. PubMed PMID: 26124482.

367. St-Pierre F, Broski SM, LaPlant BR, Maurer MJ, Ristow K, Thanarajasingam G, et al. Fluorodeoxyglucose-Positron Emission Tomography Predicts Bone Marrow Involvement in the Staging of Follicular Lymphoma. Oncologist. 2020;25(8):689-95. Epub 2020/04/28. doi: 10.1634/theoncologist.2019-0952. PubMed PMID: 32319706.

368. Mahmoud HM, El-Sakhawy YN. Significance of Bcl-2 and Bcl-6 immunostaining in B-Non Hodgkin's lymphoma. Hematol Rep. 2011;3(3):e26-e. Epub 2011/11/16. doi: 10.4081/hr.2011.e26. PubMed PMID: 22593817.

369. Almasri NM, Iturraspe JA, Braylan RC. CD10 expression in follicular lymphoma and large cell lymphoma is different from that of reactive lymph node follicles. Arch Pathol Lab Med. 1998;122(6):539-44. PubMed PMID: 9625422.

370. Karube K, Guo Y, Suzumiya J, Sugita Y, Nomura Y, Yamamoto K, et al. CD10−MUM1+ follicular lymphoma lacks BCL2 gene translocation and shows characteristic biologic and clinical features. Blood. 2006;109(7):3076-9. doi: 10.1182/blood-2006-09-045989.

371. Frazzi R, Tigano M, Valli R, Tamagnini I, Fragliasso V, Merli F. SIRT1 Expression Is Higher in Human Follicular Lymphoma and Correlates with Ki67 and Bcl-6 Overexpression. Blood. 2014;124(21):1649-. doi: 10.1182/blood.V124.21.1649.1649.

372. Frazzi R, Zanetti E, Pistoni M, Tamagnini I, Valli R, Braglia L, et al. Methylation changes of SIRT1, KLF4, DAPK1 and SPG20 in B-lymphocytes derived from follicular and diffuse large B-cell lymphoma. Leuk Res. 2017;57:89-96. Epub 20170309. doi: 10.1016/j.leukres.2017.02.012. PubMed PMID: 28324774.

373. Jang KY, Hwang SH, Kwon KS, Kim KR, Choi HN, Lee NR, et al. SIRT1 expression is associated with poor prognosis of diffuse large B-cell lymphoma. Am J Surg Pathol. 2008;32(10):1523-31. doi: 10.1097/PAS.0b013e31816b6478. PubMed PMID: 18724249.

374. Kan Y, Ge P, Wang X, Xiao G, Zhao H. SIRT1 rs3758391 polymorphism and risk of diffuse large B cell lymphoma in a Chinese population. Cancer Cell Int. 2018;18:163-. doi: 10.1186/s12935-018-0659-z. PubMed PMID: 30377410.

375. Bhalla S, Gordon LI. Functional characterization of NAD dependent de-acetylases SIRT1 and SIRT2 in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). Cancer Biol Ther. 2016;17(3):300-9. Epub 2016/01/21. doi: 10.1080/15384047.2016.1139246. PubMed PMID: 26794150.

376. Jin Y, Cao Q, Chen C, Du X, Jin B, Pan J. Tenovin-6-mediated inhibition of SIRT1/2 induces apoptosis in acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells and eliminates ALL stem/progenitor cells. BMC Cancer. 2015;15:226-. doi: 10.1186/s12885-015-1282-1. PubMed PMID: 25884180.

377. Allegra A, Innao V, Polito F, Oteri R, Alibrandi A, Allegra AG, et al. SIRT2 and SIRT3 expression correlates with redox imbalance and advanced clinical stage in patients with multiple myeloma. Clinical Biochemistry. 2021;93:42-9. doi: https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2021.04.002.

378. Van Damme M, Crompot E, Meuleman N, Mineur P, Bron D, Lagneaux L, et al. HDAC isoenzyme expression is deregulated in chronic lymphocytic leukemia B-cells and has a complex prognostic significance. Epigenetics. 2012;7(12):1403-12. Epub 2012/10/29. doi: 10.4161/epi.22674. PubMed PMID: 23108383.

379. Wever CM, Geoffrion D, Grande BM, Yu S, Alcaide M, Lemaire M, et al. The genomic landscape of two Burkitt lymphoma cases and derived cell lines: comparison between primary and relapse samples. Leuk Lymphoma. 2018;59(9):2159-74. Epub 2018/01/04. doi: 10.1080/10428194.2017.1413186. PubMed PMID: 29295643.

380. Cea M, Cagnetta A, Adamia S, Acharya C, Tai Y-T, Fulciniti M, et al. Evidence for a role of the histone deacetylase SIRT6 in DNA damage response of multiple myeloma cells. Blood. 2016;127(9):1138-50. doi: 10.1182/blood-2015-06-649970.

381. Vega-García N, Malatesta R, Estella C, Pérez-Jaume S, Esperanza-Cebollada E, Torrebadell M, et al. Paediatric patients with acute leukaemia and KMT2A (MLL) rearrangement show a distinctive expression pattern of histone deacetylases. Br J Haematol. 2018;182(4):542-53. Epub 20180705. doi: 10.1111/bjh.15436. PubMed PMID: 29978456.

382. H Y, M H, F C, R B, SR dS, RC A, et al. Tenovin-6 inhibits proliferation and survival of diffuse large B-cell lymphoma. D - 101532965. 2017(- 1949-2553 (Electronic)):- 14912-24.

383. He M, Tan B, Vasan K, Yuan H, Cheng F, Ramos da Silva S, et al. SIRT1 and AMPK pathways are essential for the proliferation and survival of primary effusion lymphoma cells. J Pathol. 2017;242(3):309-21. Epub 20170513. doi: 10.1002/path.4905. PubMed PMID: 28393364; PubMed Central PMCID: PMC5503455.

384. Chen G, Huang P, Hu C. The role of SIRT2 in cancer: A novel therapeutic target. Int J Cancer. 2020;147(12):3297-304. Epub 20200616. doi: 10.1002/ijc.33118. PubMed PMID: 32449165.

385. Chowdhury S, Sripathy S, Webster A, Park A, Lao U, Hsu JH, et al. Discovery of Selective SIRT2 Inhibitors as Therapeutic Agents in B-Cell Lymphoma and Other Malignancies. Molecules. 2020;25(3):455. Epub 2020/01/25. doi: 10.3390/molecules25030455. PubMed PMID: 31973227; PubMed Central PMCID: PMC7036909.

386. Xu Y, McKenna RW, Kroft SH. Assessment of CD10 in the diagnosis of small B-cell lymphomas: a multiparameter flow cytometric study. Am J Clin Pathol. 2002;117(2):291-300. doi: 10.1309/t88x-71u4-wc0r-2531. PubMed PMID: 11863226.

387. Eshoa C, Perkins S, Kampalath B, Shidham V, Juckett M, Chang CC. Decreased CD10 expression in grade III and in interfollicular infiltrates of follicular lymphomas. Am J Clin Pathol. 2001;115(6):862-7. doi: 10.1309/b6mk-j7nf-a6jp-x56k. PubMed PMID: 11392883.

388. Li L, Osdal T, Ho Y, Chun S, McDonald T, Agarwal P, et al. SIRT1 activation by a c-MYC oncogenic network promotes the maintenance and drug resistance of human FLT3-ITD acute myeloid leukemia stem cells. Cell Stem Cell. 2014;15(4):431-46. doi: 10.1016/j.stem.2014.08.001. PubMed PMID: 25280219; PubMed Central PMCID: PMC4305398.

389. Cea M, Soncini D, Fruscione F, Raffaghello L, Garuti A, Emionite L, et al. Synergistic interactions between HDAC and sirtuin inhibitors in human leukemia cells. PLoS One. 2011;6(7):e22739. Epub 20110727. doi: 10.1371/journal.pone.0022739. PubMed PMID: 21818379; PubMed Central PMCID: PMC3144930.

390. Li L, Wang L, Li L, Wang Z, Ho Y, McDonald T, et al. Activation of p53 by SIRT1 Inhibition Enhances Elimination of CML Leukemia Stem Cells in Combination with Imatinib. Cancer Cell. 2012;21(2):266-81. doi: https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.12.020.

391. Nihal M, Ahmad N, Wood GS. SIRT1 is upregulated in cutaneous T-cell lymphoma, and its inhibition induces growth arrest and apoptosis. Cell Cycle. 2014;13(4):632-40. Epub 2013/12/18. doi: 10.4161/cc.27523. PubMed PMID: 24343700.

392. Kozako T, Aikawa A, Shoji T, Fujimoto T, Yoshimitsu M, Shirasawa S, et al. High expression of the longevity gene product SIRT1 and apoptosis induction by sirtinol in adult T-cell leukemia cells. Int J Cancer. 2012;131(9):2044-55. Epub 20120327. doi: 10.1002/ijc.27481. PubMed PMID: 22322739.

393. Liu Y, Beyer A, Aebersold R. On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. Cell. 2016;165(3):535-50. doi: https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.014.

394. Sun J, He X, Zhu Y, Ding Z, Dong H, Feng Y, et al. SIRT1 Activation Disrupts Maintenance of Myelodysplastic Syndrome Stem and Progenitor Cells by Restoring TET2 Function. Cell Stem Cell. 2018;23(3):355-69.e9. Epub 20180823. doi: 10.1016/j.stem.2018.07.018. PubMed PMID: 30146412; PubMed Central PMCID: PMC6143172.

395. Dan L, Klimenkova O, Klimiankou M, Klusman J-H, van den Heuvel-Eibrink MM, Reinhardt D, et al. The role of sirtuin 2 activation by nicotinamide phosphoribosyltransferase in the aberrant proliferation and survival of myeloid leukemia cells. Haematologica. 2012;97(4):551-9. Epub 2011/12/29. doi: 10.3324/haematol.2011.055236. PubMed PMID: 22207684.

396. Xu H, Li Y, Chen L, Wang C, Wang Q, Zhang H, et al. SIRT2 mediates multidrug resistance in acute myelogenous leukemia cells via ERK1/2 signaling pathway. Int J Oncol. 2016;48(2):613-23. doi: 10.3892/ijo.2015.3275.

397. Deng A, Ning Q, Zhou L, Liang Y. SIRT2 is an unfavorable prognostic biomarker in patients with acute myeloid leukemia. Sci Rep. 2016;6(2045-2322 (Electronic)):27694. Epub 2016/06/14. doi: 10.1038/srep27694. PubMed PMID: 27291931; PubMed Central PMCID: PMC4904374.

398. Choi YL, Tsukasaki K, O'Neill MC, Yamada Y, Onimaru Y, Matsumoto K, et al. A genomic analysis of adult T-cell leukemia. Oncogene. 2007;26(8):1245-55. doi: 10.1038/sj.onc.1209898.

399. Zhang Y, Huang Z, Sheng F, Yin Z. MYC upregulated LINC00319 promotes human acute myeloid leukemia (AML) cells growth through stabilizing SIRT6. Biochemical and

Biophysical Research Communications. 2019;509(1):314-21. doi: https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.12.133.

400. Gaál Z, Oláh É, Rejtő L, Erdődi F, Csernoch L. Strong Correlation between the Expression Levels of HDAC4 and SIRT6 in Hematological Malignancies of the Adults. Pathol Oncol Res. 2017;23(3):493-504. Epub 20161020. doi: 10.1007/s12253-016-0139-5. PubMed PMID: 27766571.

401. Kaiser A, Schmidt M, Huber O, Frietsch JJ, Scholl S, Heidel FH, et al. SIRT7: an influence factor in healthy aging and the development of age-dependent myeloid stem-cell disorders. Leukemia. 2020;34(8):2206-16. doi: 10.1038/s41375-020-0803-3.

402. Heltweg B, Gatbonton T, Schuler AD, Posakony J, Li H, Goehle S, et al. Antitumor activity of a small-molecule inhibitor of human silent information regulator 2 enzymes. Cancer Res. 2006;66(8):4368-77. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3617. PubMed PMID: 16618762.

403. Kozako T, Mellini P, Ohsugi T, Aikawa A, Uchida YI, Honda SI, et al. Novel small molecule SIRT2 inhibitors induce cell death in leukemic cell lines. BMC Cancer. 2018;18(1):791. Epub 2018/08/08. doi: 10.1186/s12885-018-4710-1. PubMed PMID: 30081901; PubMed Central PMCID: PMC6091197.

404. Ma J, Liu B, Yu D, Zuo Y, Cai R, Yang J, et al. SIRT3 deacetylase activity confers chemoresistance in AML via regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation. Br J Haematol. 2019;187(1):49-64. Epub 20190624. doi: 10.1111/bjh.16044. PubMed PMID: 31236919; PubMed Central PMCID: PMC6790595.

405. Ma J, Liu B, Yu D, Tam W, Yang J, Cheng J. SIRT3 Sumoylation Contributes to Chemoresistance in AML. Blood. 2018;132:3929. doi: https://doi.org/10.1182/blood-2018-99-110898.

406. Zhang J, Xiang H, Liu J, Chen Y, He RR, Liu B. Mitochondrial Sirtuin 3: New emerging biological function and therapeutic target. Theranostics. 2020;10(18):8315-42. Epub 2020/07/30. doi: 10.7150/thno.45922. PubMed PMID: 32724473; PubMed Central PMCID: PMC7381741.

407. Gajendran B, Varier KM, Liu W, Wang C, Sample KM, Zacksenhaus E, et al. A C21-steroidal derivative suppresses T-cell lymphoma in mice by inhibiting SIRT3 via SAP18-SIN3. Commun Biol. 2020;3(1):732-. doi: 10.1038/s42003-020-01458-3. PubMed PMID: 33273692.

408. O'Brien C, Berman J, Culp-Hill R, Reisz J, Ling T, Rondeau V, et al. Sirtuin 3 Inhibition Targets AML Stem Cells through Perturbation of Fatty Acid Oxidation. Blood. 2021;138(Supplement 1):2240-. doi: 10.1182/blood-2021-148143.

409. Behnisch-Cornwell S, Grathwol CW, Schulig L, Voigt A, Baecker D, Link A, et al. Correlation Analysis of Protein Expression of 10 HDAC/Sirtuin Isoenzymes with Sensitivities of 23 Anticancer Drugs in 17 Cancer Cell Lines and Potentiation of Drug Activity by Co-Treatment with HDAC Inhibitors. Cancers (Basel). 2021;14(1). Epub

20211231. doi: 10.3390/cancers14010187. PubMed PMID: 35008351; PubMed Central PMCID: PMC8750037.

410. Barber MF, Michishita-Kioi E, Xi Y, Tasselli L, Kioi M, Moqtaderi Z, et al. SIRT7 links H3K18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation. Nature. 2012;487(7405):114-8. doi: 10.1038/nature11043.

411. Kothapalli R, Yoder SJ, Mane S, Loughran TP. Microarray results: how accurate are they? BMC Bioinformatics. 2002;3(1):22. doi: 10.1186/1471-2105-3-22.

412. Farragher SM, Tanney A, Kennedy RD, Paul Harkin D. RNA expression analysis from formalin fixed paraffin embedded tissues. Histochem Cell Biol. 2008;130(3):435-45. Epub 20080805. doi: 10.1007/s00418-008-0479-7. PubMed PMID: 18679706.

413. Morozova I, Flegontov P, Mikheyev AS, Bruskin S, Asgharian H, Ponomarenko P, et al. Toward high-resolution population genomics using archaeological samples. DNA Res. 2016;23(4):295-310. Epub 20160719. doi: 10.1093/dnares/dsw029. PubMed PMID: 27436340; PubMed Central PMCID: PMC4991838.

414. Mori C, Matsumura S. Current issues for mammalian species identification in forensic science: a review. Int J Legal Med. 2021;135(1):3-12. Epub 2020/06/21. doi: 10.1007/s00414-020-02341-w. PubMed PMID: 32562039.

415. Li J, Smyth P, Cahill S, Denning K, Flavin R, Aherne S, et al. Improved RNA quality and TaqMan Pre-amplification method (PreAmp) to enhance expression analysis from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) materials. BMC Biotechnol. 2008;8(1):10. Epub 2008/02/08. doi: 10.1186/1472-6750-8-10. PubMed PMID: 18254955; PubMed Central PMCID: PMC2259333.

416. Jackson D, Lewis F, Taylor G, Boylston A, Quirke P. Tissue extraction of DNA and RNA and analysis by the polymerase chain reaction. Journal of Clinical Pathology. 1990;43(6):499-504.

417. Stanta G, Schneider C. Rna Extracted from Paraffin-Embedded Human Tissues Is Amenable to Analysis by Pcr Amplification. Biotechniques. 1991;11(3):304-&. PubMed PMID: WOS:A1991GE77900002.

418. Weizsäcker F, Labeit S, Koch H, Oehlert W, Gerok W, Blum H. A simple and rapid method for the detection of RNA in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by PCR amplification. Biochemical and biophysical research communications. 1991;174(1):176-80.

419. Finke J, Fritzen R, Ternes P, Lange W, Dolken G. An improved strategy and a useful housekeeping gene for RNA analysis from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by PCR. Biotechniques. 1993;14(3):448-53. Epub 1993/03/01. PubMed PMID: 7681300.

420. von Ahlfen S, Missel A, Bendrat K, Schlumpberger M. Determinants of RNA quality from FFPE samples. PLoS One. 2007;2(12):e1261. Epub 2007/12/07. doi: 10.1371/journal.pone.0001261. PubMed PMID: 18060057; PubMed Central PMCID: PMC2092395.

421. Belder N, Coskun O, Doganay Erdogan B, Ilk O, Savas B, Ensari A, et al. From RNA isolation to microarray analysis: Comparison of methods in FFPE tissues. Pathol Res Pract. 2016;212(8):678-85. Epub 2016/05/11. doi: 10.1016/j.prp.2015.11.008. PubMed PMID: 27161306.

422. Zhang P, Lehmann BD, Shyr Y, Guo Y. The Utilization of Formalin Fixed-Paraffin-Embedded Specimens in High Throughput Genomic Studies. Int J Genomics. 2017;2017:1926304. Epub 2017/03/02. doi: 10.1155/2017/1926304. PubMed PMID: 28246590; PubMed Central PMCID: PMC5299160.

423. Schlunck G, Boneva S, Wolf J, Schlecht A, Reinhard T, Auw-Hadrich C, et al. RNA Sequencing of Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tissue as a Complementary Method in Ophthalmopathology. Klin Monbl Augenheilkd. 2020;237(7):860-6. Epub 20200713. doi: 10.1055/a-1187-1590. PubMed PMID: 32659839.

424. Obradovic J, Jurisic V, Tosic N, Mrdjanovic J, Perin B, Pavlovic S, et al. Optimization of PCR conditions for amplification of GC-Rich EGFR promoter sequence. J Clin Lab Anal. 2013;27(6):487-93. Epub 2013/11/13. doi: 10.1002/jcla.21632. PubMed PMID: 24218132; PubMed Central PMCID: PMC6807403.

425. Ben-Ezra J, Johnson DA, Rossi J, Cook N, Wu A. Effect of fixation on the amplification of nucleic acids from paraffin-embedded material by the polymerase chain reaction. J Histochem Cytochem. 1991;39(3):351-4. Epub 1991/03/01. doi: 10.1177/39.3.1704393. PubMed PMID: 1704393.

426. Green MR, Sambrook J. Polymerase Chain Reaction (PCR) Amplification of GC-Rich Templates. Cold Spring Harb Protoc. 2019;2019(2). Epub 20190201. doi: 10.1101/pdb.prot095141. PubMed PMID: 30710022.

427. Strien J, Sanft J, Mall G. Enhancement of PCR amplification of moderate GC-containing and highly GC-rich DNA sequences. Mol Biotechnol. 2013;54(3):1048-54. Epub 2013/04/10. doi: 10.1007/s12033-013-9660-x. PubMed PMID: 23568183.

428. Serpil Kahya EB, K. Tayfun Carlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Optimizasyonu. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2013.

EKLER

EK 1: ETİK KURUL KARAR FORMU

EK 2: TEZ ÇALIŞMASINDA SENTEZLENEN TÜM PRİMERLERİN BİLGİLERİ

1. Sentez (2019)				
Gen	**Amplikon uzunluğu (bp)**	**Primer dizisi (5'→3')**	**Saflaştırma yöntemi**	**Sentez kaynağı**
SIRT1	**119**	**Forward:** GTAGGCGGCTTGATGGTAATC **Reverse:** ACTGCCACAAGAACTAGAGGA	**HPLC**	**Primer 3**
SIRT2	**119**	**Forward:** CTGAAGGACAAGGGGCTACTC **Reverse:** TGTGATGTGTAGAAGGTGCCG	**HPLC**	**Primer Blast**
SIRT3	**101**	**Forward:** CTGCCAAAGACCCTTCCCAGG **Reverse:** CAATGTCGGGCTTCACAACGC	**HPLC**	**Primer Blast**
SIRT4	**130**	**Forward:** ACCTGGGAGAAACTCGGAAAG **Reverse:** CACAATCCAAGCACAGGACC	**HPLC**	**Primer Blast**
SIRT5	**98**	**Forward:** TAGAAAGCAGCCGTGGAGAC **Reverse:** AGAGGTCGCATCAGGGTTTG	**HPLC**	**Primer Blast**
SIRT6	**100**	**Forward:** TGGAAGAATGTGCCAAGTGTAAG **Reverse:** GCCTTAGCCACGGTGCAG	**HPLC**	**Primer 3**
SIRT7	**120**	**Forward:** CTTGGTCGTCTACACAGGCG **Reverse:** CTCAGGTCGGCAGCACTAAC	**HPLC**	**Primer Blast**
UBC	**150**	**Forward:** GATTTGGGTCGCAGTTCTTG **Reverse:** CCTTATCTTGGATCTTTGCCTTG	**HPLC**	**Primer Blast**
2. Sentez (2020)				
SIRT2	**127**	**Forward:** CAAGCCAACCATCTGTCACTACT **Reverse:** CTCCACCAAGTCCTCCTGTTC	**Desalting**	**Malkale**
SIRT4	**126**	**Forward:** TCGGAAAGCTGTACTGGTTG **Reverse:** TCTGTTCCCCACAATCCAAG	**Desalting**	**Malkale**
SIRT6	**194**	**Forward:** CCCACGGAGTCTGGACCAT **Reverse:** CTCTGCCAGTTTGTCCCTG	**Desalting**	**Malkale**
3. Sentez (2021)				
SIRT4	**109**	**Forward:** CCGTAGAGCTGTGAGAGAATGA **Reverse:** ACCCAATGGAGGCTTTCGAG	**HPSF**	**Malkale**
SIRT5	**115**	**Forward:** TCGTGGTCATCACCCAGAAC **Reverse:** GCCACAACTCCACAAGAGGTAC	**HPSF**	**Malkale**
SIRT6	**142**	**Forward:** TGGCAGTCTTCCAGTGTGGTGT **Reverse:** CGCTCTCAAAGGTGGTGTCGAA	**HPSF**	**Origene**
SIRT7	**135**	**Forward:** TGTGGACACTGCTTCAGAAAGGGA **Reverse:** CACAGTTCTGAGACACCACATGCT	**HPSF**	**Malkale**

4. Sentez				
SIRT4	**86**	**Forward:** ATGCAATCAGACGGTCCCAC **Reverse:** ACCTGAAAGTCAACGCAAAGC	**Desalting**	**Primer Blast**
SIRT6	**123**	**Forward:** CTCCTCCGCTTCCTGGTCAG **Reverse:** CGTCTTACACTTGGCACATTC	**Desalting**	**Makale**
SIRT7	**97**	**Forward:** GGTCCAGCCTGAAGGTTCTA **Reverse:** CACTGCAGGTTCACGATGTA	**Desalting**	**Makale**

EK 3: KONTROL VE TÜMÖR ÖRNEKLERİN İZOLE EDİLEN RNA'LARIN KONSANTRASYONU VE SAFLIK DEĞERLERİ

Deney kodu	RNA Kons. (ng/ul)	260/280	260/230
K1	306,55	2,06	2,15
K2	451,76	2,11	2,19
K3	441,11	2,03	2,13
K4	465,51	1,99	2,14
K5	488,54	2,04	2,07
K6	481,45	1,93	2,02
K7	404,75	2,04	2,02
K8	441,6	2,02	1,99
K9	278,7	2,05	2,1
K10	391,56	1,99	2,07
GI-1	450,7	2,01	2,17
GI-2	437,4	2,05	2,1
GI-3	341,3	2,07	2,11
GI-5	438,1	2,08	2,13
GII-1	468,35	2,13	2,11
GII-2	392,6	2,01	2,03
GII-3	401,45	2,11	2,16
GII-4	428,93	2,01	2,09
GII-5	414,6	2,01	2,04
GII-7	87,91	1,78	2,06
GII-8	486,15	2,04	2,15
GII-9	495,83	2,08	2,15
GII-10	307,07	2	2,12
GII-11	463,53	2,1	2,04
GII-12	398,95	2,07	2,14
GII-14	305,2	1,95	1,93
GIII-2	420,47	2,05	2,1
GIII-6	184	1,99	2,1
GIII-9	398,1	2,05	2,1
GIII-11	474,8	1,97	2,03
GIII-12	487,1	2,05	2,15
GIII-13	423,07	2,03	2,06
GIII-14	460,6	2,02	2,04
GIII-15	458,75	2,01	2,15
GIII-16	483,35	2,09	2,1

GIII-17	241,55	2,05	2,06
GIII-19	461,3	2	2,11
GIII-20	434,13	2	2,09
GIII-21	175,1	2,03	2,11
GIII-22	202,6	2,08	2,09
GIII-23	362,1	1,99	2,02
GIII-24	382,75	1,99	2,08

EK 4: KONTROL VE TÜMÖR ÖRNEKLERİN ORTALAMA CP DEĞERLERİ

Deney Kodu	UBC	SIRT1	SIRT2	SIRT3	SIRT4	SIRT5	SIRT6
K-1	35,83	36,24	35,08	34,73	32,45	36,87	33,53
K-2	35,58	35,97	35,98	29,25	32,85	35,63	28,76
K-3	36,29	35,99	33,83	34	32,97	33,22	33,58
K-4	32,48	36,77	33,67	35,16	32,53	32,94	35,67
K-5	36,11	36,9	33,7	34	32,13	36,12	29,06
K-6	37,18	38,31	33,75	34,52	32,66	35,63	38,2
K-7	32,26	36,16	35,51	33,68	32,8	36,05	29,07
K-8	32,5	36,44	34,59	35,57	32,43	35,54	27,82
K-9	30,88	35,22	33,89	35,6	32,77	35,23	28,95
K-10	36,82	36,4	33,43	32,2	32,4	32,96	29,01
GI-1	36,06	35,95	32,89	22,78	32,16	33,26	29,19
GI-2	31,99	35,25	35,26	35,48	32,46	35,31	29,17
GI-3	34,33	35,97	35,02	38,93	32,43	31,68	28,72
GI-5	32,17	35,83	34,76	35,4	33,05	36,6	35,29
GII-1	37,68	36,37	35	35,18	32,47	31,53	35,05
GII-2	33,87	35,91	35,98	34,54	32,27	36,43	34,09
GII-3	33,47	36,12	34,54	34,45	31,89	32,76	32,44
GII-4	36,53	35,57	32,7	30,83	32,02	36,15	32,65
GII-5	33,23	35,46	33,16	27,97	32,2	29,87	33,61
GII-7	31,69	34,4	26,63	21,95	30,53	25,79	29,17
GII-8	35,64	36,73	35,15	30,37	31,79	33,42	35,15
GII-9	35,02	36,78	33,22	30,79	31,96	36,94	36,48
GII-10	37,77	35,76	35,13	33,73	31,91	33,53	34,31
GII-11	31,95	35,25	34,8	35,41	32,07	34,16	28,32
GII-12	34,51	35,66	35,3	30,39	32,15	32,68	29,08
GII-14	37,49	36,44	35,07	30,66	31,96	31,99	29,1
GIII-2	37,18	35,8	35,31	30,67	32,27	32,76	29,15
GIII-6	36,74	35,57	32,66	28,39	32,21	32,33	29,25
GIII-9	32,59	35,66	34,7	36,04	32,64	35,4	29,22
GIII-11	36,53	35,91	32,86	30,42	32,96	30,32	26,21
GIII-12	35,39	36,47	35,16	30,4	32,73	35,33	37,99
GIII-13	32,28	35,5	31,22	30,16	32,68	31,9	27,83
GIII-14	36,05	35,69	35,63	29,95	30,88	36,77	29,52
GIII-15	31,49	36,38	34,8	34,3	32,22	36,41	32,95
GIII-16	31,78	36,29	34,87	33,96	32,05	36,39	27,63

GIII-17	37,89	34,16	35,08	27,34	32,26	36,11	33,06
GIII-19	37,11	36,16	32,74	34,3	32,28	36,11	28,95
GIII-20	34,15	35,48	33,01	34,64	31,83	34,53	28,99
GIII-21	36,98	35,58	30,05	32,12	32,19	34,34	28,8
GIII-22	34,53	35,85	34,82	30,68	32,4	36,23	31,17
GIII-23	36,68	36,13	34,15	30,9	32,01	37,38	29,25
GIII-24	37,63	37,27	34,13	35,75	32,26	29,13	28,92

EK 5: META-ANALİZLERDEKİ SETLERİN HASTA VE KONTROL GRUPLARINDA UYGULANAN GENETİK MATERYALLER

GEO erişim kodu	Hasta grubu tanımı	Kontrol grubu tanımı	İlgili Yayın PMID	RNA için kullanılan doku tipi	Platform
GSE12195	38 FL donmuş tümör biyopsisi	Tonsil dokusundan MACS ile ayrıt edilmiş 5 GC sentrobalst, 5 sentrosit, 5 naif B hücre ve 5 hafıza B hücre	PMID: 19412164, 19965633, 21156281, 21390126, 22137796, 28314854, 28288979	Donmuş tümör örnekleri	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0
GSE65135	14 taze dondurulmuş FL örneği	Sağlıklı tonsil dokusundan 5 normal B ve 5 normal T hücre	PMID: 25822800	FL hastalardan alınan 14 ayrıştırılmış lenf nodu biyopsisi	
GSE35331	10 FL'nin Kemik iliği mezenkimal stromal hücreleri	FRC-benzer farklılaşmak için TNF ve Lt ile muamele edilmiş 6 sağlıklı donor, 12 muamele edilmemiş	PMID: 22289889	FRC benzeri farklılaşmak için TNF ve Lt ile muamele edilmiş ve a edilmemiş Kemik hücrelerinden hücre kültürü	
GSE12453	5 FL hastasının lazerle mikrodisseke edilmiş primer lenfoma hücreleri	Tonsil dokusundan MACS ve FACS ile ayırt edilmiş 5naif B hücre, 5hafıza B hücre,5sentrosit, 5sentroblast ve 5plazma B hücre	PMID: 18794340, 24376854, 29889102	Lenfoma hastalarından alınan lenf nodüllerinin donmuş dokuları	
GSE55267	EZH2 mutasyonu olan veya olmayan 63 FL	2 sentroblast, 2 sentrosit ve 2 naif B hücre	PMID: 24634383	FL tanası ile taze donmuş örnekler	
GSE107367	23 CD19+ FL lenfositi/15 CD19-CD22- B hücre olmayan FL lenf nodülü	10 CD19+ RLN lenfosit, 6 CD22- B hücre olmayan RLN, 5 CD19- B hücre olmayan tonsil dokusu	PMID: 20944673	Taze izole edilmiş Lenf nodülleri	
GSE152068	8 FL lenf nodüün in vitro'da geliştirlmiş stromal hücreleri	8 RLN'den in vitro'da geliştirlmiş stromal hücreleri	PMID: 33881493	Kemik iliği plazmasından ex-vivo'da geliştirlmiş mezenkimal stromal hücreler ve lenf nodülden alınmış stromal hücreler	
GSE62246	16 FL lenf nodülünden CD19+ hücreleri	4 tümör olmayan çevresel kan CD19+ B hücreleri	PMID: 25607463, 27183590	MACS ile her FL biyopsisinden CD19+ lenfositlerin tek hücreleri	Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array
GSE32231	16 FL lenf nodülü	8 reaktif lenf nodü	PMID: 22110251	Taze domuş lenf nodülülleri	Agilent 012391 Whole Human

					Genome Oligo Microarray G4112A
GSE32018	23 FL lenf nodülü	7 taze donmuş len nodü, 6 taze donmuş reaktif tonsil	PMID: 21937691	Taze domuş lenf nodülülleri	Agilent 014850 Whole Human Genome Microarray 4x44K G4112F
GSE126247	11 FL cerrahi örneği	Sağlıklı donorlardan oluşturulmuş 1 havuz	PMID: 31197180	Cerrahi numunelerinin foliküler lenfoma biyopsileri	
GSE48047	10 Duodenal FL ve 18 Nodal FL	5 normal duodonal mukos, 8 nodal reaktif lenfoid hiperplazi ve 4 normal gastrik mukos	PMID: 24602001	Taze donmuş tümör örnekleri	Agilent 028004 SurePrint G3 Human GE 8x60K
GSE4351	20 FL lenf nodülü	2 normal tonsil ve 2 normal dalak lenfoid dokusu	PMID: 12571354	Taze donmuş lenf nodü örnekleri	SHAU
GSE23647	35 FL lenf nodülü	23 karışık reaktif lenoid dokuları	PMID: 21453471	Donmuş lenf nodü dokusu	Compugen 19K human v5.0
GSE9327	33 FL lenf nodülü	8 reaktif lenf nodü ve 5 normal dalak dokusu	PMID: 18032706	Farklı insan dokularını temsil eden hücre hatlarından izole edilen total RNA	CNIO Human Oncochip 1.0, 1.2 and 2.0
GSE68308	94 FL (eşit olarak FL'nin B-hücre fraksiyonu ve FL'nin B-hücresi olmayan fraksiyonu)	24 normal tonsil dokusu	Yayınlanmamış	MACS ile CD3- B hücreleri ve CD19- ve CD20- B hücre olmayan hücre süspansiyonları	Illumina HumanHT 12 V4.0 expression beadchip
GSE103944	24 FL	_	PMID: 29567771, 31039827	Parafin kesitleri	Affymetrix Human Genome U133A
GSE37088	72 FL	_	PMID: 24913233	FL tümör dokusu	
GSE93261	149 FL	_	PMID: 29475724	Taze donmuş doku	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0
GSE38816	18 FL, 2nüks FL	_	PMID: 23297126	FACS ile CD20 orta ve yüksek düzeyde ayırt edilmiş tümör B hücreleri	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0
GSE86613	7 FL, 1 transforme FL (tFL), 1 önce tFL sonra nüks eden	_	PMID: 28097046	Lenfoma örnekleri	Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.1

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Laleh Madayen Shishevan

Yabancı Dili: İngilizce, Farsça

Eğitim Durumu

Lisans: Tabriz Üniversitesi (1996-2000)

Yüksek Lisans: Tabriz Üniversitesi (2001-2005)

Yayınlar ve Bildiriler

Hejazi MA, Khoshrouy R, Hosseinzadeh Gharajeh N, Etemadi MR, Madayen L, Javanmard A. Conservation and Biodiversity Analysis of the Microalga Dunaliella in Shrinking Highly Saline Urmia Lake Based on Intron-sizing Method. mdrsjrns. 2016;18(6):1693-703.

J. Agr. Sci. Tech. (2016) Vol. 18: 1693-1703

Conservation and Biodiversity Analysis of the Microalga *Dunaliella* in Shrinking Highly Saline Urmia Lake Based on Intron-sizing Method

M. A. Hejazi[1*], R. Khoshrouy[1], N. Hosseinzadeh Gharajeh[1], M. R. Etemadi[1], L. Madayen[1], and A. Javanmard[1]

ABSTRACT

As the world's second saltiest lake, Urmia Lake is the main source of halotolerant unicellular microalga, *Dunaliella,* in Iran. Recently, this lake and, consequently, its biodiversity are being threatened environmentally. Hence collecting, preserving, and identification of indigenous microorganisms of the lake are of great importance. The objective of the present study was the molecular screening of *Dunaliella* isolates in Urmia Lake. For this purpose, 32 samples were taken from different geographical regions of the lake. Then, their molecular pattern was examined based on *18S rDNA* gene and intron-sizing method. Results based on conserved and species-specific primers of *18S rDNA* illustrated that, depending on the various parts of the lake, the genetic variation of *Dunaliella* population differs. The amplified pattern for individual isolates was similar to that previously described for *D. tertiolecta*, *D. bardawil* and *Dunaliella sp.* ARIINW-M1/2. Also,*18S rDNA* sequencing and phylogenetic analysis of five index isolates showed that the isolates *Dunaliella sp*. ABRIINW-Ch5, -Sh6.3 and -U1/1 were grouped with different intron lacking species of *Dunaliella*, ABRIINW-Ch3.1 was clustered with *Dunaliella sp*. ABRIINW-M1/2, while the isolate *Dunaliella sp*. ABRIINW-S1.5 was clustered with intron-harboring species of *D. bardawil*, *D. parva,* and *D. viridis*. The results indicated that Urmia Lake is composed of isolates with different *18S rDNA* profiles with various intron arrangement.

Keywords: *18S rDNA*, Halotolerant unicellular microalga, Molecular screening.

INTRODUCTION

Dunaliella is a halotolerant unicellular microalga which has exceptional ability in biosynthesis of *β*-carotene (up to 10% of dry weight) (Ben-Amotz and Avron, 1983). In addition to *β*-carotene, *Dunaliella* strains can accumulate glycerol in response to salinity stress (Ben-Amotz and Avron, 1990). In the recent years, *Dunaliella* has been suggested to possess prominent advantages in molecular farming (Barzegari *et al*., 2009).

Saline waters, oceans, marshes and salty lakes are the preferred locations for existence of the microalga *Dunaliella* (Borowitzka and Borowitzka, 1988). Urmia Lake, as the second largest salt-water lake on earth located in Northwest Iran, accommodates one of the world's richest biodiversity. It is full of mysterious cryptic organisms including microalga *Dunaliella* (Eimanifar and Mohebbi, 2007). During the last years since 2000, the lake is shrinking significantly. The reduction in the lake water level may threaten biodiversity, aquatic ecosystems, and species interactions (Gaeta *et al*., 2014). Considering the decline of this

[1] Department of Food Biotechnology, Branch for Northwest and West Region, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tabriz, Iran.
[*]Corresponding author; email: aminhejazi@abrii.ac.ir

valuable genetic source as well as beneficial features of *Dunaliella*, isolation and identification of its endogenous strains is of high importance.

Many authors have suggested that due to lack of morphological standard characteristics discrimination is difficult for most species of microalgae. Furthermore, physiological variability has been reported at the intraspecific level in *Dunaliella* (Gomez *et al*., 1999). To overcome biased physiological and morphological disadvantages, molecular features have been used to help to confirm the microalgal taxonomy. By employing molecular markers, a number of polyphyletic genera have been identified and the existence of genetically distinct lineages within single morpho-species has been revealed (Pröschold *et al*., 2001; Friedl and O'Kelly, 2002).

Identification and classification of the organisms based on conserved and variable regions is a common procedure in taxonomic studies (Hosseinzadeh *et al*., 2012). Thus, *18S rDNA* gene has been used for molecular identification of different species of *Dunaliella* as eukaryotic microorganism. The *18S rDNA* gene in *Dunaliella* genus contains relatively conserved region of exon(s) and possible variable region of intron(s).

The general purpose of the current study was to collect, isolate, and screen the molecular pattern of indigenous *Dunaliella* isolates based on *18S rDNA* gene in this important natural source.

MATERIALS AND METHODS

Sampling and Geographical Location

Urmia Lake, as the saltiest lake of the world after Dead Sea, and the biggest basin of Western Asia and also the most important lake of Iran, is located in the north west of Iran Plateau, between East and West Azerbaijan Provinces. This lake has a unique ecosystem with limited halophile species such as a variety of green algae and cyanobacteria.

In total, 32 samples were taken from 8 different regions of the Urmia Lake and the origin names were described (Figure 1), covering East, North, Northeast, West (coast and deeper parts) areas, each area with at least 4 replications.

Preparation and Culturing of Dunaliella Samples

Electrical Conductivity (EC) of the samples was measured in the lab, using an EC meter (Cond 315i). Liquid medium was prepared by the method described by Hejazi *et al*. (2010) containing 90 g L^{-1} NaCl. The samples were inoculated with prepared medium (1: 9) and maintained in temperature of 24°C and irradiance of 80 µmol photon m^{-2} s^{-1} in the photoperiod of 16: 8 (L:D).

To obtain single colonies, 5 µL of the liquid medium was spread on solid medium (1.8% agar). They were cultured in the previously described condition. After appearing single colonies on the media, these colonies were again transferred to liquid medium. As standard known samples, the standard strain of *D. salina* 19/18 was obtained from a Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP). It was cultivated under the same condition, as well.

DNA Extraction

DNA extraction of populations as well as single colonies was performed by the method described by Hejazi *et al*. (2010).

PCR amplification

Polymerase Chain Reactions (PCR) were carried out by conserved and species-specific primers. Conserved primers were designed according to 3′ and 5′ termini of *18S rDNA* regions by Olmos *et al*. (2000).



Figure 1. Geographical origins of Urmia Lake, West Azerbaijan Province, from where the samples were taken. Sampling regions of *Dunaliella* species are indicated by numbers. **(1)** Area Near Tasouj; **(2)** Sharafkhaneh Port; **(3)** Tabriz Plain; **(4)** Aji Chay Estuary; **(5)** Rahmanlou Port; **(6)**: Barandouz Chay Estuary; **(7)** South central Water, and **(8)** Nazlu Chay Estuary.

They include MA1: [5′-CGGGATCCGTAGTCATATGCTTGTCTC-3′], MA2: [5′-CGGAATTCCTTCTGCAGGTCACC-3′].

For identification of the isolates at species level, other primers were designed based on the sequences of introns in different species (Olmos *et al.*, 2000; Olmos-Soto *et al.*, 2002). They were used together with MA2 primer as reverse primer. These specific primers include DSs, DPs and DBs. These primers could amplify the intron within *18S rDNA* in *D. salina* and *D. parva* (Wilcox *et al.*, 1992) and *D. bardawil* (Olmos *et al.*, 2000). Using Oligo 5, another pair of primers was designed based on the intron existing in new *18S rDNA* arrangement reported by Hejazi *et al.* (2010). These primers were called as DMf [5′-ATGATAGGGGCAGTGAAAAGC-3′] and DMr [5′-CAGCAGGGCTCGACTATATC-3′].

PCR was performed for both specific and conserved primers with 25 µL of sample containing 25 ng of genomic DNA dissolved and 50 ng of each primer. The amplification conditions for these primers (except DMf-DMr), were according to those proposed by Olmos *et al.* (2000). The amplification condition regarding the primers DMf-DMr was considered as follows. The initial denaturation of 4 minutes at 94ºC, 32 amplification cycles consisting of 1 minute at 94ºC for denaturation, 35 seconds at 64ºC for annealing and 30 seconds at 72ºC for extension and final extension of 10 minutes at 72ºC.

Purification and Sequencing of PCR Products

To get a deep identification, *18S rDNA* gene sequencing of five isolates was performed.

Four of the isolates were selected from the group containing *18S rDNA* fragment of 1,770 bp and the remaining isolate belonged to the group with *18S rDNA* size of 2,170. These isolates were named as *Dunaliella sp.* ABRIINW-Ch5, Ch3.1, Sh6-3, UI/1 and S1-5. For this purpose, the PCR products were purified according to the manufacturer's instructions described in PCR Purification Kit (Roche, Product No. 1732668). The purified amplicon was sent to Macrogen Company (Korea) for sequencing.

Alignment and Phylogenetic Analysis of Sequences

Sequence alignment and phylogenetic analyses of *18S rDNA* sequence were carried out using MAFFT online software available at http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/. In this regard, the *18S rDNA* sequences of different *Dunaliella* strains were collected from NCBI. *Chlamydomonas reinhardtii* was determined as out group.

RESULTS AND DISCUSSION

Sampling and Isolation

Salinity measurement of the samples collected from different regions of Urmia Lake (Figure 1) showed that the highest salinity was related to the north and northeast of the lake (300- 350 g. L^{-1} of salt). Salinity of eastern and western coasts was as 280 g L^{-1} and 180 g L^{-1}, respectively. The total average of the samples was estimated at about 266.4 g L^{-1}. Differences in salinity levels were estimated to influence biodiversity profile of *Dunaliella* in various regions of the lake.

Amplification of *18S rDNA* Region

Using conserved primers, three 1,770, 2,170, and 2,550 bp fragments were amplified (Figure 2-a) as *18S rDNA* region. This preliminarily showed that there is *18S rDNA* variability in different *Dunaliella* populations.

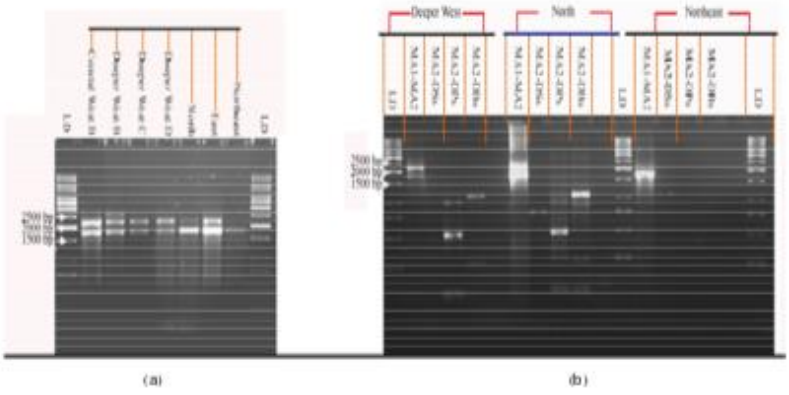


Figure2: Urmia Lake, from left to right respectively. (B): Amplified *18S rDNA* with conserved and specific primers, in the population of deeper west, north and northeast of Urmia Lake, with MA1-MA2, MA2-DSs, MA2-DPs and MA2-DBs from left to right respectively. The molecular weight marker was 1Kb ladder

In the populations related to the coastal and deeper parts located in the west of Urmia Lake, different varieties of fragments (1,770, 2,170, and 2,570 bp) were observed. In the coastal region, fragments of 1,770 and 2,170 bp were obtained, whereas in the deeper parts all three fragments existed. The molecular variation present in the northern parts was the same as deeper parts of western regions with three bands, while in the northeast only one fragment (1,770 bp) was amplified. The eastern regions of the lake showed less variation, which was similar to the coastal parts in the western regions. Two fragments with sizes of 1,770 and 2,170 bp were obtained in this part. Each of these *18S rDNA* fragment sizes showed us an initial indication of certain species. According to Olmos *et al.* (2000), *18S rDNA* of *D. salina* has a band of 2,170 bp and contains one intron (near 5′ terminus), while this region in *D. parva* is 2,570 bp with two introns. On the other hand, *18S rDNA* of *D. tertiolecta* (Olmos *et al.*, 2000) is 1,770 bp without any intron, and it is 2,570 bp in *D. bardawil* containing two introns. Furthermore, according to the submitted sequence of *D. viridis* (Gonzalez *et al.*, 1999) with accession number of DQ009776 at GenBank, using these primers, *18S rDNA* size of about 2,500 bp is expected. Prior to the present study, our group verified and introduced a novel strain of *Dunaliella sp.* from Maharlou, a saline lake in Iran, namely, *Dunaliella sp.* ABRIINW-M1/2 with *18S rDNA* of 2,170 bp, which harbored one intron near 3′ terminus (Hejazi *et al.*, 2010).

To study at species level, PCR was performed using species-specific primers (Figure 2-b). Primer pair of MA2-DSs was amplified in a few samples of the population. It produced the desired fragments only in the samples of the north and east of the lake. Whilst, using MA2-DPs and MA2-DBs potent fragments were amplified in the samples. The pairs MA2-DPs and MA2-DBs were well amplified in the samples collected from all regions of the lake, except the northeast region. In addition, DMr and DMf were amplified in the desired fragments of 250 bp in the samples of north and east of the lake.

According to Olmos *et al.* (2000 and 2002), by amplification with species-specific primers of DSs, DPs, and DBs, three species of *D. salina, D. parva* and *D. bardawil* are respectively discernible. Using DSs-MA2, a fragment of ~750 bp in *D. salina*, using DPs-MA2, a fragment of ~1,050 bp in *D. parva*, and using DBs-MA2, a fragment of ~1,000 bp was amplified in *D. bardawil* . The latter may produce a band of ~500 bp with DPs-MA2. Because *18S rDNA* of *D. tertiolecta* does not harbor any intron, no amplification with species-specific primers occurs. The early variability pattern in the populations predicted existence of *D. bardawil*, *D. parva*, *D. salina*, *D. tertiolecta* (Olmos *et al.*, 2000; Olmos-Soto, *et al.*, 2002) and isolates similar to *Dunaliella sp.* ABRIINW-M1/2 in Urmia Lake (Hejazi *et al.*, 2010). These observations confirmed the existence of different *Dunaliella* species in Urmia Lake.

Furthermore, these results suggested that the genetic variation in *18S rDNA* region of *Dunaliella* was different depending on the various parts of the lake. Logically, the reason for different series of isolates might be due to salinity difference in various regions of the lake. The finding is in agreement with the results showing that different *Dunaliella* species have a salinity preference for their optimum growth reported by Borowitzka and Christopher (2007).

Amplification of *18S rDNA* Region in Single Colonies

For single colonies, PCR using MA1-MA2 primers led to production of fragments with 1,770, 2,170, and 2,550 bp sizes. In the next step based on *18S rDNA* size of each isolate, DNA amplification by species-specific primers was performed (Figures 3-a, -b, -c and -d).

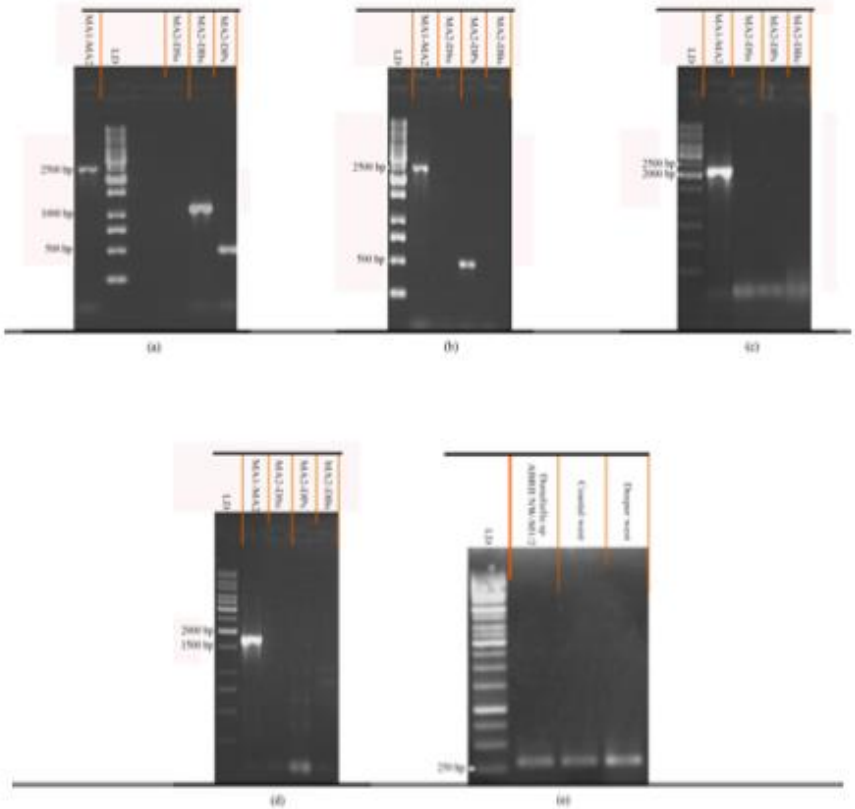


Figure 3. (a) The isolate producing *18S rDNA* amplified fragment of 2550 bp with MA1-MA2, 500 bp with MA2-DPs and 1000 bp with MA2-DBs. (b) The *Dunaliella* isolate producing 18SrDNA amplified fragment of 2550 bp with MA1-MA2 and 500 bp with MA2-DPs. (c) The isolate producing *18S rDNA* amplified fragment of 2150 bp with MA1-MA2 and no fragment with MA2-DSs. (d) The isolate producing *18S rDNA* amplified fragment of 1770 bp with MA1-MA2 and no fragment with MA2-DBs, MA2-DPs and MA2-DSs. (e) Amplified *18S rDNA* with specific primers DMf-DMr on 3 single colonies, including *Dunaliella sp.* ABRIIW-M1/2, Coastal West and deeper west.

All the obtained single colonies were successfully amplified with MA1-MA2, confirming the genus of the isolates as *Dunaliella*. The isolates, in which a fragment of ~ 1,000 bp with MA2-DBs and a 500 bp fragment with MA2-DPs were produced, were attributed to *D. bardawil*. For the isolates with *18S rDNA* gene of 2,570 bp and a fragment of 500 bp produced with DPs-MA2, no certain species were determined. The colonies with *18S rDNA* of 2,170 bp were divided into two groups: in

one group ~250 bp was amplified with specific primers of DMf-DMr. These were recognized as relatives of the described taxon, *Dunaliella sp.* ABRIINW-M1/2. The other group did not produce any amplicon with species-specific primers and we could not attribute them to any of the known species. The *18S rDNA* gene of 1,770 bp and presence of no intron led to identification of the majority of the isolates (16 isolates) as *D. tertiolecta*.

Table 1 illustrates the fragment size of amplified *18S rDNA* for each isolate obtained. According to the data shown, out of thirty two isolates, seven isolates produced *18S rDNA* size of 2,550 bp. Out of these, four produced ~1,000 bp fragments with MA2-DBs and 500 bp fragments with MA2-DPs. Three other isolates produced a fragment of 500 bp with MA2-DPs.

Subsequently, PCR was performed for nine isolates with *18S rDNA* gene of 2,170 bp using MA2-DSs and DMf-DMr primers. They all produced no fragments with MA2-DSs. Only two isolates produced a fragment of 250 bp with DMf-DMr (Figure 3-e). These isolates were comparable with *Dunaliella sp.* ABRIINW-M1/2 (Hejazi *et al.*, 2010) from which the primer pair was designed and the same fragment size was amplified with them. The remaining seven isolates produced no fragment with DMf-DMr unabling us to relate them to any species.

Sixteen isolates produced 1,770 bp as *18S rDNA*. No amplification was observed with species-specific primers in these isolates. It should be considered that intron-sizing method developed by Olmos *et al.* (2000 and 2002) is rapid and sensitive, for specifically identifying species of *Dunaliella*. However, according to this method we were not able to imbed some of our isolates within certain species.

To have a deep insight into gene sequence of *18S rDNA* in our isolates, five isolates (four from the group containing 1,770 bp and one from 2,170 bp *18S rDNA* gene) were sequenced and compared with the known registered species. In the *18S rDNA* region, an extensive variable site was detectable extending from 1,093-1,919 of the consensus sequence (Figure 4). It is related to the first intron of *D. parva* and *D. bardawil* and the only intron of *D. salina* and *D. viridis*. Our isolated *Dunaliella* members all lacked this region. The second variable region starts from 2,494 and relates to second intron of *D. parva*, *D. bardawil* and only intron of *Dunaliella sp.* ABRIINW-M1/2. The comparative alignment analysis showed that only *Dunaliella sp.* ABRIINW-S1.5 harbors the variable region (related to intron) in the 3′ terminus. This intron position is similar to the one reported for *Dunaliella sp.* ABRIINW-M1/2. However, sequence composition similarity of the intron was not confirmed by phylogenetic tree. This finding confirmed pattern variability of *18S rDNA* intron.

The phylogenetic tree of the indigenous and the species described based on Neighbor-joining method is depicted in Figure 5. As expected, *Chlamydomonas reinhardtii* appeared as outgroup. According to the tree, the isolates *Dunaliella sp.*

Table1. *18S rDNA* amplification results of *Dunaliella* isolates with conserved and species- specific primers.

PCR size	N[a]	Produced bands with specific primers (bp)				Identifies species
		MA2-DSs	MA2-DPs	MA2-DBs	DMf-DMr	
2570 bp	4	*	500 bp	~1000 bp	*	*D. bardawil*
	3	*	500 bp	No band	*	?
2170 bp	7	No band	*	*	No band	?
	2	No band	*	*	250	*Dunaliella sp.* ABRIINW-M1/2
1770 bp	16	*	*	*	*	*D. tertiolecta*

[a] The number of isolates, PCR size: Size of *18S rDNA* (bp).



Figure 4. *18S rDNA* sequence alignment of Urmia *Dunaliella* isolates and other species. The variable regions of the gene are demonstrated in different color. The diagram shows the position of intron insertions of *18S rDNA* gene.

ABRIINW-Ch5, Sh6.3 and U1/1 were grouped within a clade containing the species *D. salina*, *D. tertiolecta*, *D. bioculata*, *D. primolecta*, and *D. peircei*. *Dunaliella sp.* ABRIINW-Ch3.1 was clustered with *Dunaliella sp.* ABRIINW-M1/2, while the isolate *Dunaliella sp.* ABRIINW-S1.5 was clustered with the

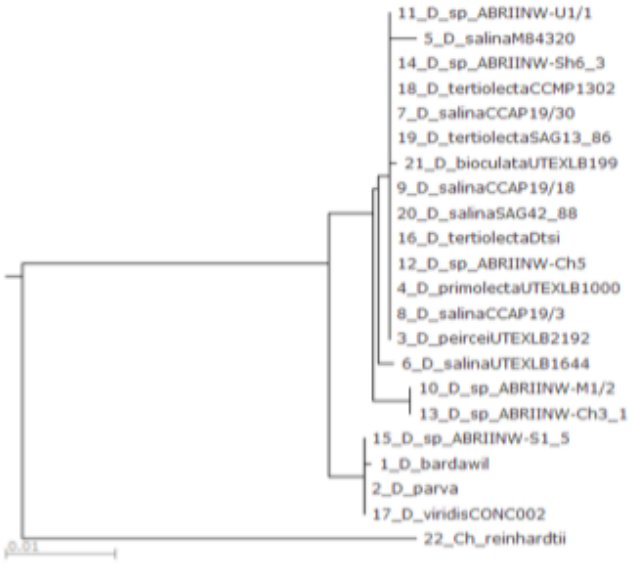


Figure 5. Phylogram based on *18S rDNA* gene for *Dunaliella* species and indigenous isolates from Urmia Lake. The tree is constructed using MAFFT, Neighbor-joining method. The sequenced native isolates are shown in rectangles.

species *D. bardawil*, *D. parva* and *D. viridis*. The sequences of *Dunaliella sp.* ABRIINW-S1.5, Ch3.1, Ch5, Sh6.3 and U1/1 were submitted as JQ922245, JQ694056, JQ694055, JQ712983 and FJ164062.

CONCLUSIONS

In this study, we applied intron-sizing method to compare the *18S rDNA* fingerprint between *Dunaliella* isolates of Urmia Lake. According to the fragment size of *18S rDNA*, we observed the genetic variation in *Dunaliella* genus depending on different areas of Urmia Lake. PCR with species-specific primers in the population confirmed the existence of at least four species of *D. tertiolecta*, *D. parva*, *D. salina*, and *D. bardawil* and some types of isolates which were similar to *Dunaliella sp.* ABRIINW-M1/2. Studies of single colonies indicated that we were able to isolate and identify some isolates belonging to *D. bardawil*, *D. tertiolecta*, and the isolates similar to *Dunaliella sp.* ABRIINW-M1/2. In summary, this study indicated that our method was appropriate to differentiate between some species of *Dunaliella* and rapidly identify them. However, more conserved genes such as ITS for identification of *Dunaliella* isolates in Urmia Lake need to be evaluated before any confirmation of high potential carotenogenic indigenous strains may be considered for use in commercial selection programs.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financially supported by ABRII. The authors would like to appreciate M. S. Hejazi and A. Barzegari (Tabriz University of Medical Science) for helpful contribution in sequence analysis and primer design.

REFERENCES

1. Barzegari, A., Hejazi, M. A., Hosseinzadeh, N., Eslami, S., Mehdizadeh aghdam, E. and Hejazi, M.S. 2009. *Dunaliella* as an Attractive Candidate for Molecular Farming. *Mol. Biol. Report*, **37:** 3427-3430
2. Ben-Amotz, A. and Avron, M. 1983. On the Factors which Determine Massive β-Carotene Accumulation in the Halotolerant Alga *Dunaliella bardawil*. *Plant Physiol.*, **72**: 593–597
3. Ben-Amotz, A. and Avron, M. 1990. The Biotechnology of Cultivating the Halotolerant Alga *Dunaliella*. *Trend. Biotechnol.*, **8**: 121-126
4. Borowitzka, M. A. and Borowitzka, L. J. 1988. *Dunaliella*. In: "*Micro-algal Biotechnology*", (Eds.): Borowitzka, M. A. and Borowitzka, L. J.. Cambridge University Press, Cambridge, PP. 27–58
5. Borowitzka, M. A. and Christopher, J. S. 2007. The Taxonomy of the Genus *Dunaliella* (Chlorophyta, *Dunaliella*) with Emphasis on the Marine and Halophilic Species. *J. App. Phycol.*, **19**: 567–590
6. Eimanifar, A. and Mohebbi, F. 2007. Urmia Lake (Northwest Iran): A Brief Review. *Saline Syst.*, **3:** 5–12. doi:10.1186/1746-1448-3-5
7. Friedl, T. and O'Kelly, C. J. 2002. Phylogenetic Relationships of Green Algae Assigned to the Genus Planophila (Chlorophyta): Evidence from *18S rDNA* Sequence Data and Ultrastructure. *Eur. J. Phycol.*, **3:** 373-384
8. Gaeta, J. W., Sass, G. G. and Carpenter, S. R. 2014. Drought-driven Lake Level Decline: Effects on Coarse Woody Habitat and Fishes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **71(2):** 315-325. doi:10.1139/cjfas-2013-0451
9. Gomez, P., Gonzalez, M. and Becerra, J. 1999. Quantity and Quality of *β*-Carotene Produced by Two Strains of *Dunaliella salina* (Teodoresco, 1905) from the North of Chile. *Bol. Soc. Chil. Quim.*, **44:** 463–468
10. González, M. A., Gómez, P. I. and Montoya, R. 1999. Comparison of PCR-RFLP Analysis of the ITS Region with Morphological Criteria of Various Strains of *Dunaliella*. *J. Appl. Phycol.*, **10:** 573-80
11. Hejazi, M. A., Barzegari, A., Hosseinzadeh Gharajeh, N. and Hejazi, M. S. 2010. Introduction of a Novel *18S rDNA* Gene Arrangement along with Distinct ITS Region in the Saline Water Microalga *Dunaliella*. *Saline Syst.*, **6**: 4-14
12. Hosseinzadeh Gharajeh, N., Hejazi, M. A., Nazeri, S. and Barzegari, A. 2012. Characterization of an Indigenous Isolate, *Dunaliella tertiolecta* ABRIINW-G3, from Gavkhooni Salt Marsh in Iran Based on Molecular and Some Morpho-physiological Attributes. *J. Agr. Sci. Tech.*, **14:** 1579-1590
13. Olmos, J., Paniagua, J. and Contreras, R. 2000. Molecular Identification of *Dunaliella sp.* Utilizing the *18S rDNA* Gene. *Lett. Appl. Microbiol.*, **30**: 80-84
14. Olmos, S. J., Ochoa, L., Paniagua-Michel, J. and Contreras, R. 2009. DNA Fingerprinting Differentiation between *β*-Carotene Hyperproducer Strains of *Dunaliella* from around the World. *Saline Sys.*, **5:** 5–15. doi: 10.1186/1746-1448-5-5
15. Olmos-Soto, J., Paniagua-Michel, J., Contreras, R. and Trujillo, L. 2002. Molecular Identification of *β*-Carotene Hyper-producing Strains of *Dunaliella* from Saline Environments Using Species-specific Oligonucleotides. *Biotechnol. Lett.*, **24:** 365-369
16. Pröschold, T., Marin, B., Schlosser, U. G. and Melkonian, M. 2001. Molecular Phylogeny and Taxonomic Revision of *Chlamydomonas* (Chlorophyta). I. Emendation of *Chlamydomonas ehrenberg* and *Chloromonas gobi*, and Description of *Oogamochlamys* gen. nov. and *Lobochlamys* gen. nov. *Protist.*, 152: 265-300
17. Wilcox, L. W., Lewis, L. A., Fuerst, P. A. and Floyd, G. L. 1992. Group I Introns within the Nuclear-encoded Small-subunit