

← Adınızı soyadınızı giriniz

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



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

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**( YÜKSEK LİSANS)**

**AKUT MİYELOİD LÖSEMİ(AML) VE KRONİK  
MİYELOİD LÖSEMİ(KML) HASTALARINDA *FOXO3A*  
GEN İFADESİNİN ARAŞTIRILMASI**

**DEMET AKDENİZ**

**DANIŞMAN  
PROF.DR.NEJAT DALAY**

**TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI  
KANSER GENETİĞİ PROGRAMI**


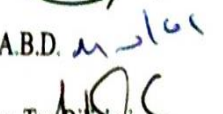



**İSTANBUL-2012**

**TEZ ONAYI****TEZ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı  
Kanser Genetiği Programında Demet AKDENİZ tarafından hazırlanan "Akut Miyeloid  
Lösemi (AML) ve Kronik Miyeloid Lösemi (KML) Hastalarında FOXO3A Gen  
İfadesinin Araştırılması" başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz  
tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

27 / 06 / 2012

**Tez Sınav Jürisi**

- Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı) İmzası
1. Prof. Dr. M. Nejat DALAY / İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı / Danışman 
  2. Prof. Dr. Meliha NALÇACI / İ.Ü. İst. Tıp Fak. / Dahili Tıp Bilimleri / İç Hastalıkları A.B.D. 
  3. Prof. Dr. Ahmet DİRİCAN / İ.Ü. İst. Tıp Fak. / Temel Tıp Bilimleri / Biyoistatistik ve Tıp Bilimleri A.B.D. 
  4. Prof. Dr. Fatma Canan ALATLI / İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Klinik Onkoloji Anabilim Dalı 
  5. Doç. Dr. Uğur GEZER / İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı 

**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

DEMET AKDENİZ

## İTHAF

Annem ve Babam'ın Anısına...

## TEŞEKKÜR

İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Müdürü Prof.Dr. Ahmet Kızır'e,

Çalışmalarında bana yön veren, tez danışmanım, değerli hocam Prof.Dr. Nejat Dalay'a,

Prof.Dr. Hülya Yazıcı Özbek'e

Prof.Dr. Vildan Yasasever'e

Doç.Dr. Uğur Gezer'e

Prof.Dr. Canan Alatlı'ya

Prof.Dr. Meliha Nalçacı'ya

Prof.Dr. Ahmet Dirican'a

Prof.Dr. Nur Buyru'ya, yüksek lisans programı süresince ders aldığım tüm hocalarım'a,

Dr.Ebru Esin Yörüker'e ve istatistiksel analizler konusunda yardımlarını esirgemeyen Dr. Sevda Özel'e,

Fikirlerine sıkça başvurduğum değerli meslektaşlarım; MSc. Zübeyde Yalnız Kayım, MSc. Orkun Gürbüz, MSc. Seda Kılıç, MSc. Özge Şükrüoğlu, Buğra Tunçer, Ufuk Mert, Tayfur Eren, Emre Özgür, Mukaddes Avşar, Elif Bilgin, Ceren Yasasever, Ege Uysaler, Duygu Tiryakioğlu, Hüsniye Yılmaz, Türkan Şen Feradoğlu, Harun Fırtına, Arzu Burnuva, Necmiye Koçak'a ve tüm biyokimya laboratuvarı ekibine,

Her zaman yanımda olan sevgili arkadaşım Mehmet Emin Ödemiş ve yeğenim Can Polat Güleç'e

Destekleri için canım ailem'e teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 14286

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	Xİ
ÖZET .....	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. LÖSEMİLER .....	3
2.1.1. Tarihçesi.....	3
2.2. AKUT LÖSEMİLER.....	3
2.2.1. Tanım .....	3
2.2.2. Etyoloji ve Patogenez.....	4
2.2.3. Sınıflama .....	4
2.3. AKUT MİYELOİD LÖSEMİ (AML) .....	5
2.3.1. Genel Özellikler .....	5
2.3.2. Klinik Özellikler .....	6
2.3.3. Genetik ve Moleküler Biyoloji .....	6
2.3.3.1. Delesyonlar .....	6
2.3.3.2. Kromozomal Translokasyonlar .....	7
2.3.3.3. Nokta Mutasyonları.....	7
2.4. KRONİK LÖSEMİLER.....	8
2.5. KRONİK MİYELOİD LÖSEMİ (KML).....	8
2.5.1. Genel Özellikler .....	8
2.5.2. Klinik Özellikler .....	8
2.5.3. Genetik ve Moleküler Biyoloji .....	9

2.5.3.1. <i>ABL</i> Geni.....	9
2.5.3.2. <i>BCR</i> Geni .....	9
2.5.3.3. <i>BCR-ABL</i> Translokasyonu .....	9
2.5.4. Prognoz .....	12
2.6. ÇATAL BAŞLI TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİ .....	13
2.6.1. FOXO Ailesi .....	13
2.6.2. Memeli Hücrelerinde FOXO Fonksiyonları .....	14
2.6.2.1. FOXO'nun DNA'ya Bağlanması .....	14
2.6.2.2. Hücrel İşlevleri .....	15
2.6.3. İnsülin ve Büyüme Hormonlarına Karşı FOXO Transkripsiyon Faktörleri'nin Düzenlenmesi.....	16
2.6.4. FOXO Proteinlerinin 14-3-3 Proteini ile Düzenlenmesi.....	17
2.6.5. FOXO Yerleşiminin Düzenlenmesi .....	17
2.6.6. Stres ile Aktifleşen Kinazlar ve Diğer Fosforillenme Olayları.....	18
2.6.7. FOXO'nun Asetillenme ile Düzenlenmesi .....	19
2.6.8. FOXO'nun Metillenme ve Ubikitinlenme ile Düzenlenmesi .....	19
2.6.9. Kanser Gelişiminde FOXO .....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. GEREÇ .....	21
3.1.1. Materyal .....	21
3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler .....	21
3.1.3. Kullanılan Cihazlar .....	22
3.1.4. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler .....	22
3.2. Yöntem.....	23
3.2.1. Tam Kandan Lenfosit İzolasyonu .....	23
3.2.2. Lenfosit'ten RNA İzolasyonu .....	24
3.2.3. Agaroz Jelde RNA'ların Kontrolü .....	25
3.2.3.1. Agaroz Jelin Hazırlanması .....	25
3.2.3.2. Agaroz Jelde Örnekleri Yürütme İşlemi .....	25
3.2.4. RNA'nın Spektrofotometre ile Ölçülmesi .....	25
3.2.5. RNA'dan cDNA Sentezi .....	25
3.2.6. Gerçek-Zamanlı PZR .....	26
3.2.7. İstatistiksel Değerlendirme .....	27



3.2.7.1. $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Testi .....	27
3.2.7.2. Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) .....	28
4. BULGULAR.....	29
4.1. Gen İfadelerinin Değerlendirilmesi .....	30
5. TARTIŞMA .....	40
KAYNAKLAR .....	44
ETİK KURUL KARARI .....	59
PATENT HAKKI İZİNİ .....	61
TELİF HAKKI İZİNİ.....	62
ÖZGEÇMİŞ .....	63

## TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: AML gelişiminde rol oynayan faktörler .....	5
Tablo 2-2: KML hastalarında en sık görülen ikincil değişiklikler.....	13
Tablo 3-1: Hasta ve Kontrol gruplarının özellikleri .....	21
Tablo 3-2: Termal döngü reaksiyon koşulları.....	25
Tablo 3-3: Gerçek-zamanlı PZR koşulları.....	27
Tablo 4-1: Hasta grubunda araştırılan <i>FOXO3A</i> geni'ne ait $C_T$ , $\Delta C_T$ , $\Delta\Delta C_T$ , $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri .....	30
Tablo 4-2: Sağlıklı kontrol grubunda araştırılan <i>FOXO3A</i> geni'ne ait $C_T$ , $\Delta C_T$ , $\Delta\Delta C_T$ , $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri.....	32
Tablo 4-3: KML, AML ve Sağlıklı kontrol gruplarına ait $C_T$ , $\Delta C_T$ , $\Delta\Delta C_T$ , $2^{-\Delta\Delta C_T}$ genel ortalama değerleri .....	33
Tablo 4-4: Değişkenlerin homojenlik testi .....	34
Tablo 4-5: Kolmogorov-Smirnov testi .....	34
Tablo 4-6: ANOVA testi.....	35
Tablo 4-7: Post-hoc test istatistiği .....	35
Tablo 4-8: KML, AML ve Sağlıklı kontrol grupları için yaş, hedef $C_T$ , referans $C_T$ ve $\Delta C_T$ değerlerinin ortalama, standart sapma, medyan, minimum ve maksimum değerleri .....	39

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: ABL ve BCR genlerindeki kırık noktalarının konumu ve alternatif kırılmalar sonucunda ortaya çıkan kimerik mRNA'ların yapısı. ....	10
Şekil 2-2: FOXO ailesi'nin filogenetik sınıflandırılması. ....	14
Şekil 2-3: FOXO hedef genleri ve hücrel roller. ....	16
Şekil 2-4: FOXO transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesi. ....	17
Şekil 2-5: Akt ve 14-3-3 proteinleri tarafından FOXO proteinleri'nin düzenlenmesi. ..	18
Şekil 2-6: <i>FOXO3</i> fosforillenme noktaları. ....	18
Şekil 2-7: Kanser gelişiminde FOXO fonksiyonu. ....	20
Şekil 4-1: Hastalarda <i>FOXO3A</i> geni'ne ait gerçek-zamanlı PZR eğrileri. ....	29
Şekil 4-2: Sağlıklı kontrollerde <i>FOXO3A</i> geni'ne ait gerçek-zamanlı PZR eğrileri. ....	29
Şekil 4-3: KML hastalarında hedef $C_T$ , referans $C_T$ ve $\Delta C_T$ değerleri. ....	37
Şekil 4-4: AML hastalarında hedef $C_T$ , referans $C_T$ ve $\Delta C_T$ değerleri. ....	37
Şekil 4-5: Sağlıklı kontrollerde hedef $C_T$ , referans $C_T$ ve $\Delta C_T$ değerleri. ....	37
Şekil 4-6: KML, AML ve Kontrol gruplarının $\Delta C_T$ ortalama değerleri. ....	38
Şekil 4-7: KML, AML ve Kontrol gruplarının gen ifade düzeyleri. ....	38
Şekil 4-8: KML, AML, Kontrol gruplarında <i>FOXO3A</i> ifade düzeylerini ve standart sapmalarını gösteren çubuk grafiği. ....	38

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

- KML: Kronik Miyeloid Lösemi  
AML: Akut Miyeloid Lösemi  
KLL: Kronik Lenfositik Lösemi  
ALL: Akut Lenfoblastik Lösemi  
FOX: Forkhead Box  
PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu  
FAB: French American British  
WHO: World Health Organization  
RNA: Ribonükleik asit  
DNA: Deoksiribonükleik asit  
MDS: Miyelodisplastik Sendrom  
PBS: Fosfat Bufer Salın  
BFB: Brom Fenol Mavisi  
TEB: Tris Edta Borik Asit  
RPM: Dakikada Devir Sayısı  
EtBr: Etidyum Bromür  
ANOVA: Tek Yönlü Varyans Analizi

## ÖZET

Akdeniz D. Akut Miyeloid Lösemi (AML) ve Kronik Miyeloid Lösemi (KML) Hastalarında *FOXO3A* Gen İfadesinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji ABD. Yüksek Lisans. İstanbul. 2012.

FOXO proteinleri Çatal başlı (FOX) transkripsiyon faktör ailesinin bir alt grubudur. FOXO genleri birçok sinyal yolağı ile bağlantılı olup hücre döngüsünün durdurulması, hücre ölümü, DNA tamiri ve stres uyarısı ile ilişkili birçok fizyolojik ve patolojik aşamada kritik rollerde görev alır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, FOXO inhibisyonunun hematolojik malinitelerde önemli rol oynadığını göstermiştir.

Kronik miyeloid lösemi (KML), hematopoetik kök hücrelerin neoplastik transformasyonu sonucu oluşan bir kan hastalığıdır. Philadelphia kromozomuna yol açan dengeli t(9;22)(q34;q11) translokasyonu, KML'nin karakteristik anomalisidir. Bu translokasyon sonucunda BCR-ABL füzyon geni oluşur. BCR-ABL, Akt sinyalini aktifleştirerek FOXO'yu baskılar. Bu durum sonucunda KML hücrelerinin apoptozu inhibe edilerek çoğalması desteklenir.

Akut miyeloid lösemi (AML), hematopoetik kök hücrelerin klonal malinitesidir. Akut miyeloid lösemide *FOXO3A* ve *p53*; Puma, Bim, Bax ve p27 pro-apoptotik proteinlerinin seviyelerini düzenleyen temel transkripsiyon faktörleridir.

Yaptığımız araştırmada *FOXO3A* geninin akut miyeloid lösemi(AML) ve kronik miyeloid lösemi(KML) gibi hematolojik tümörlerdeki ifade düzeyinin ve buna bağlı olarak üstlendiği tümör baskılayıcı rolün incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, AML ve KML'li 101 hasta incelenmiş, elde edilen veriler 34 sağlıklı birey ile karşılaştırılarak değerlendirme yapılmıştır. Hastaların kanlarından elde ettiğimiz cDNA'lar, *FOXO3A* hedef geni ve *ACTB* referans genine özgü hazırlanan primer ve probler kullanılarak Gerçek-Zamanlı PZR yöntemiyle çoğaltıldı ve *FOXO3A* gen ifadesi sağlıklı kontrollerle karşılaştırılarak incelendi.

Çalışma sonucunda, KML ve AML ( $p>0,05$ ) hasta grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmazken; KML ve Kontrol ( $p<0,05$ ) ile AML ve Kontrol ( $p<0,05$ ) grupları arasında istatistik açıdan anlamlı fark bulunduğu görülmüştür. KML'li hastalarda kontrol grubuna göre *FOXO3A* ifadesinde yaklaşık 6 kat artış görülürken AML grubunda ise yaklaşık 5 kat artış gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler : Akut Miyeloid Lösemi (AML), Kronik Miyeloid Lösemi (KML), Çatal başlı transkripsiyon faktörleri, gen ifadesi, *FOXO3A*

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 14286

## ABSTRACT

Akdeniz D. The Investigation Of *FOXO3A* Gene Expression In Acute Myeloid Leukemia(AML) And Chronic Myeloid Leukemia(CML).İstanbul University, Institute of Health Science, Basic Oncology Department Master Thesis. İstanbul (2012)

Forkhead O transcription factors (FOXO) constitute one of the largest subgroups of the forkhead family. Forkhead transcription factors of the FOXO subfamily are emerging as shared components of pathways that regulate a variety of cellular functions, including cell cycle arrest, cell death, DNA repair and stress stimuli and play critical roles in variety of related physiological and pathological processes. Recent studies have revealed that inhibition of FOXO has implications in hematological malignancies.

Chronic myeloid leukemia (CML) is a blood disease caused by neoplastic transformation of hematopoietic stem cells. The t(9;22) (q34;q11) balanced reciprocal translocation that leads to the Philadelphia chromosome, is a characteristic abnormality of CML. The molecular consequence of this translocation is the generation of the BCR-ABL fusion gene that activates Akt signalling and also suppresses FOXO's activity. As a result, apoptosis of CML cells is inhibited and their proliferation is stimulated.

Acute myeloid leukemia (AML) is the clonal malignancy of the hematopoietic stem cells. *FOXO3A* and p53 are basic transcription factors regulating the levels of Puma, Bim, Bax and p27 pro-apoptotic proteins in acute myeloid leukemia.

In this study, expression of the *FOXO3A* gene and its role in acute myeloid leukemia (AML) and chronic myeloid leukemia (CML) have been investigated.

We analyzed 101 patients with AML and CML and 34 healthy individuals. The cDNAs were obtained from blood of patients or healthy controls were amplified by the Real-Time PCR using specific primers and probes for the *FOXO3A* and *ACTB* genes. *FOXO3A* gene expression in the patients were compared with healthy controls.

*FOXO3A* gene expression revealed no statistically significant difference ( $p > 0.05$ ) between the CML and AML patient groups; but we observed a significant difference between the patients and the controls ( $p < 0.05$ ) for both groups. *FOXO3A* expression was observed nearly six-fold higher in CML patients and five-fold higher in AML group than the control group.

**Key Words:** Acute Myeloid Leukemia, Chronic Myeloid Leukemia, Forkhead Transcription Factors, Gene expression, *FOXO3A*

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 14286

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Lösemi miyeloid veya lenfoid progenitör hücrelerin malin transformasyona uğraması ve bu transforme hücrelerin çoğalarak gittikçe büyüyen bir klon oluşturması sonucu gelişen kan ya da kemik iliği kanser çeşididir. Lösemiler olgunlaşma ve sağkalım özelliklerine göre akut ve kronik olarak iki gruba ayrılırlar. Akut Miyeloid Lösemi (AML), hematopoetik kök hücrelerin klonal malinitesi iken Kronik Miyeloid Lösemi (KML), hematopoetik kök hücrelerin neoplastik transformasyonu sonucu oluşan bir kan hastalığıdır [1].

Globocan 2002 verilerine göre lösemiler tüm kanserlerin % 3'ü kadarını oluştururlar. Lösemiler, erkeklerde %5,9 görülme sıklığı ve %4,3 ölüm oranı ile 9.sırada; kadınlarda ise %4,3 görülme sıklığı ve %3,1 ölüm oranı ile 10. sırada yer alır [2].

Lösemiler diğer birçok kanser türü gibi DNA'daki somatik mutasyonlar sonucunda oluşur. Onkogen aktivasyonu ya da tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonunda etkili bu mutasyonlar hücre ölümü, farklılaşma ya da bölünmenin düzenlenmesinde hasara yol açarak lösemi oluşumuna neden olabilirler. Bu mutasyonlar kendiliğinden gerçekleşebildiği gibi radyasyona ya da karsinojenik ajanlara maruz kalınması sonucunda da görülebilir [3-4].

Hücre farklılaşmasında ve gelişmesindeki mekanizmalarda meydana gelen bozukluklar lösemilerin oluşmasında rol oynar [5]. En sık görülen genetik değişiklikler; kromozomal translokasyonlar, tümör baskılayıcı genlerde oluşan mutasyonlar, farklılaşma esnasındaki hücrelerarası sinyal bozuklukları ve hücre döngüsündeki bozukluklardır [4].

Çatal başlı(FOX) transkripsiyon faktörleri ailesinin bir alt grubunu kodlayan *FOXO* genleri birçok sinyal yolağı ile bağlantılı olup hücre döngüsünün durdurulması, hücre ölümü, DNA tamiri ve stres uyarısı ile ilişkili birçok fizyolojik ve patolojik aşamada kritik rollerde görev alır [6]. FOXO transkripsiyon faktörleri gelişim, farklılaşma , tümör gelişimi ve anjiyogenezde etkilidir ve PI3K/Akt yolağının doğrudan hedefidir [7-9]. FOXO3A proteini, Akt tarafından fosforillenmediği durumlarda hücre çekirdeğindeki konumunu koruyarak, proapoptotik *FasL* ve *Bim-1*

hedef genlerinin aktivasyonunu sağlar. FOXO faktörleri, Fas bağımlı hücre ölüm yolağı ligandı olan *FasL* ve pro-apoptotik Bcl-2 ailesinin bir üyesi olan *Bim*'in aktivasyonu ile apoptoza neden olur [10].

Ph(Philadelphia) kromozumuna yol açan dengeli t(9;22)(q34;q11) translokasyonu, KML'nin karakteristik anomalisidir. Bu translokasyon sonucunda BCR-ABL füzyon geni oluşur. BCR-ABL, Akt sinyalini aktifleştirerek FOXO'yu baskılar. Bu durum sonucunda KML hücrelerinin apoptozu inhibe edilerek çoğalması desteklenir. *FOXO3A*, KML lösemi başlangıç hücrelerinin (LICs) dengelenmesinde önemli role sahiptir. TGF- $\beta$ , lösemi başlangıç hücrelerinde Akt aktivasyonunu düzenleyerek *FOXO3A*'nın hücre içindeki konumunu kontrol eder [11]. FOXO proteinlerinin etkinliğı PKB (Akt), SGK, JNK, DYRK1A, CDK2, ve I $\kappa$ B gibi kinazların aktivasyonu ile düzenlenir [12]. Büyüme faktörleri ve insülin varlığında PI3K aktivasyonunun uyarılması ile FOXO Akt tarafından fosforillenir ve 14-3-3 proteinlerine bağlanarak çekirdekte sitoplazmaya geçerler. Böylece FOXO'nun hedef genlerin transkripsiyonu önlenir ve tümör gelişmesi için uygun bir ortam oluşur [13].

Bu çalışmada bir transkripsiyon faktörü olan *FOXO3A* geninin akut miyeloid lösemi (AML) ve kronik miyeloid lösemi (KML) gibi hematolojik tümörlerdeki ifade düzeyinin ve buna bağılı olarak üstlendiğı tümör baskılayıcı rolün incelenmesi amaçlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. LÖSEMİLER

#### 2.1.1. Tarihçesi

Lösemi ilk olarak 1827 tarihinde Dameshek ve Gunz tarafından tanımlanmıştır. Ateş, güçsüzlük, karın şişliği olan bir hastanın otopsisinde dalak ve karaciğerinin çok büyük olduğu ve kanının kıvamının aşırı artmış, adeta lapa gibi olduğu bildirilmiştir. 1845 yılında Benlet tarafından “tüm kan hücrelerinde bir takım değişiklikler ve değişik büyüklükte yuvarlak hücrelere asetik asit eklendiğinde çekirdeğin, bir büyük granül ve genellikle de birden fazla granül içerdiği” şeklinde tanımlanan lösemik blastlar, sonraki yıllarda Virchow tarafından beyaz küre anlamına gelen “leukemia” olarak tanımlanmıştır [14-16]. 1900 yılında Naegelli, lenfoblastların lenfoid hücre dizisine, miyeloblastların ise miyeloid hücre dizisine ait olduğunu belirtmiştir [15]. 1873'te lösemi tedavisinde ilk kez kan transfüzyonu kullanıldıktan sonra Röntgen tarafından X ışını'nın bulunması ile tedavi sürecinde önemli yol katedilmiştir. İlerleyen yıllarda lösemi patofizyolojisinin incelenmesiyle heterojen özellik gösteren bir hastalık olduğunun anlaşılması tedavi yöntemlerinin gelişmesine olanak sağlamış ve bu durum lösemi hastalarının yaşam sürelerini uzatmıştır [14-17].

Lösemiler hemotopoetik hücrelerin malin transformasyonu sonucu oluşan heterojen bir neoplastik hastalıklar grubudur. Köken aldıkları hücre tipine göre lenfoid ve miyeloid; sağkalım ve olgunlaşma özelliklerine göre de akut veya kronik olarak iki ana gruba ayrılırlar [1].

### 2.2. AKUT LÖSEMİLER

#### 2.2.1. Tanım

Akut lösemiler miyeloid ya da lenfoid hücrelerin kan, kemik iliği ve diğer dokuların infiltrasyonu ile karakterize bir hastalık grubudur. Akut lösemiler Akut Myeloid Lösemi (AML) ve Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) olmak üzere iki ana sınıfa ayrılır.

Akut lösemiler tüm kanserlerin yaklaşık olarak %3'ünü oluşturur ve ABD verilerine göre 35 yaş altında kanser nedeniyle ölümlerde ilk sırada yer alır. Erkeklerde ve beyaz ırkta daha fazla görülür. ALL, 15 yaşın altındaki çocuklarda en sık görülen

kanser türü ve ikinci ölüm sebebidir. AML olgularının yaklaşık yarısı 50 yaşın altında görülür [18].

### **2.2.2. Etiyoloji ve Patogenez**

Akut lösemili hastalarda çok sayıda somatik mutasyon oluşur ve bu mutasyonlar hücrelere proliferasyon ve yaşam avantajı kazandırır. AML patogenezinde çeşitli çevresel ajanların da rol oynadığı bilinmektedir. İyonlaştırıcı radyasyon ve alkilleyici ajanlar çift sarmallı DNA'da kırılmalara neden olur ve bu yolla genomik delesyonlar, nokta mutasyonları ve kromozom translokasyonları gerçekleşir. Benzen içeren kimyasalların da genetik hasara yol açarak lösemi gelişmesine neden olduğu düşünülmektedir. Kimyasal ajanlara maruz kalmış olan AML hastalarının birçoğunda RAS mutasyonları saptanmıştır [19].

Lösemiye neden olan malin değişim mekanizması temel olarak bilinmemesine rağmen hastalığın genlerdeki hasarlar sonucu geliştiği düşünülmektedir. Yapılan sitogenetik çalışmalarda akut lösemilerin yaklaşık yarısında translokasyon, inversiyon ve delesyon gibi sık tekrarlayan kromozom anomalilerinin olduğu gösterilmiş ve bu anomalilerin lökomogenezde etkili rol oynadıkları belirtilmiştir. Akut lösemilerde de diğer lösemilerde olduğu gibi onkogen aktivasyonu ve tümör baskılayıcı gen inaktivasyonu gibi çeşitli mekanizmalar etkilidir [20-21].

### **2.2.3. Sınıflama**

Akut lösemiler 1976 yılında Fransız, Amerikalı ve İngiliz (French-American-British, FAB) bir grup hematopatolog tarafından sınıflandırılmış ve aynı sınıflama 1985 yılında tekrar gözden geçirilmiştir [5]. FAB sınıflamasında akut lösemiler, morfolojik ve sitokimyasal boyanma özelliklerine göre gruplandırılır ve akut miyeloid lösemi (AML) ve akut lenfoblastik lösemi (ALL) olmak üzere 2 gruba ayrılır [22-23]. Akut lösemide sitogenetik ve moleküler genetik anomalilerin bariz bir hale gelmesi ve bunların prognostik önem gösterdiklerinin belirlenmesiyle yeni bir sınıflandırma ihtiyacı olduğu gözlenmiş ve 2001 yılında Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) tarafından akut lösemiler de dahil olmak üzere hemopoetik ve lenfoid neoplazileri içeren yeni bir sınıflama yapılmıştır. WHO sınıflamasında; morfoloji, immünofenotipleme, sitogenetik ve moleküler biyolojik özellikler göz önüne alınmış ve akut lösemi tanısı için kemik iliğinde blastik hücre sayısı % 30'dan %20'ye indirilmiştir [22].

## 2.3. AKUT MİYELOİD LÖSEMI (AML)

### 2.3.1. Genel Özellikler

Akut miyeloid lösemi (AML), hematopoez sürecinde farklılaşmanın durmasıyla karakterize olan bir hematopoetik kök hücre bozukluğu olup, blast hücre popülasyonunun çoğalmasıyla sonuçlanan bir hastalıktır. Hematopoetik hücrelerdeki bu malin değişim, bu hücrelerde fonksiyon kaybına neden olur ve tedavi edilmezse klinik seyrine bağlı olarak haftalar ve aylar içinde ölümlerle sonuçlanır [24].

AML'ler için ilk kez 1976'da oluşturulan ve 1985'de revize edilen FAB sınıflaması kullanılmaktadır [25-26]. 2001 yılında yapılan WHO sınıflaması prognostik ve tedaviye yönelik anlamı olan translokasyonların varlığına göre AML'leri ayırır. FAB sınıflaması'nda kemik iliğindeki miyeloblast sayısı %20-30 arasında olan olgular miyelodisplastik sendrom (MDS) olarak adlandırılırken, WHO sınıflamasında bu olgular AML tanısı almaktadır [27-28].

AML en sık görülen lösemi türüdür ve 40 yaşından itibaren yaşla artar, prevalansı 100 binde 2,4'den, yaş ile 100 binde 17,9'a yükselir, erkeklerde kadınlara göre daha sıktır (3:2). İnsidans oranları gelişmiş ülkeler ve endüstrileşmiş şehirlerde daha fazladır [29].

AML etiyojisinde, Tablo 2-1'de belirtilen, kromozomal bozukluklar, radyasyon, çevresel faktörler, kanser ilaçları, hematolojik ve kalıtsal hastalıklar gibi faktörler rol oynar [30-31].

**Tablo 2-1: AML gelişiminde rol oynayan faktörler**

<u>Radyasyon /Çevresel Faktörler</u>	<u>Kalıtsal Hastalıklar</u>
iyonize radyasyon Benzen ve türleri	Konjenital amegakaryositik trombositopeni Bloom Sendromu Kostman Sendromu
<u>İlaçlar</u>	Down Sendromu Nörofibromatozis Werner Sendromu
Alkilleyici ajanlar(Melfalan, karmustin vb.) Topoizomeraz II inhibitörleri(doksorubisin vb.) Diğer ilaçlar(fludarabin, prokarbazin vb.)	Fanconi Anemisi Noonan Sendromu Shwachman Sendromu Turner Sendromu
<u>Hematolojik Hastalıklar</u>	Klinefelter Sendromu Kseroderma Pigmentosum
Kronik miyeloid lösemi İdiyopatik miyelofibrozis Primer trombositemi Polistemia vera Aplastik anemi	

### 2.3.2. Klinik Özellikler

AML hastalarının birçoğunda yorgunluk, iştahsızlık ve kilo kaybı mevcuttur. Bunların yanında AML hastaları genellikle sitopeni (anemi, nötropeni ve trombositopeni) ile ilişkili semptom ve bulgularla başvururlar [32]. AML hastalarında anemiyle ilişkili solukluk ve halsizlik yaygın olarak gözlenir. Ayrıca çarpıntı, çabuk yorulma ve nefes darlığı gibi diğer anemi ile ilişkili semptom ve bulgular da ortaya çıkabilir. Trombositopeniye bağlı olarak gelişen peteşi, epistaksis, diş eti kanamaları, konjonktival kanamalar ve deri yaralanmaları sonrası durmayan kanamalar hastalığın erken bulgularındandır ve tanı anında hastaların yaklaşık yarısında bulunur. AML hastalarında, ALL hastalarının aksine kemik ağrıları sık değildir. Lösemik cilt infiltrasyonları (miyeloid sarkom) hastalığın seyri boyunca hastaların %13'ünde meydana gelir [33].

Laboratuvar incelemelerinde AML'li hastaların kan değerleri büyük farklılıklar gösterir [34]. Kemik iliği örneğinde yapılan çalışmalarda AML tanısı konulabilmesi için blast oranının %20'nin üzerinde olması gerekir. Bununla birlikte t(15;17), t(8;21), inv(16) veya t(16;16) translokasyonlarının varlığında blast sayısı %20'nin altında olsa da AML tanısı konulabilmektedir [35].

AML hastalarında prognoz ile ilişkili en önemli parametre sitogenetiktir. Yeni tanı almış erişkin AML hastalarının yaklaşık %55'inde kromozom anomalileri tespit edilir [36-37]. Serum ürik asit düzeyi AML vakalarının yaklaşık yarısında yüksektir [38]. Ayrıca serum ve idrarda lizozim düzeyi yüksek bulunabilir [39].

AML tedavisi 2 gruba ayrılabilir; ilk grup remisyon indüksiyonu ikinci kısım ise remisyon sonrası tedavidir [40]. Retinoik asitlerin tedavide kullanılması ile %90 oranında tam remisyon elde edilmekte ama bu remisyonlar kalıcı olmamaktadır. Önerilen tedavi retinoik asit ve bunu takiben kemoterapidir [41].

### 2.3.3. Genetik ve Moleküler Biyoloji

#### 2.3.3.1. Delesyonlar

AML'de rutin sitogenetik inceleme ile en sık saptanan değişiklikler, 7. ve 5. kromozomların bir parçasının veya tamamının kaybıdır. 7. ve 5. kromozomlardaki bu anormallikler kötü prognoz ile ilişkilidir [23].

### 2.3.3.2. Kromozomal Translokasyonlar

AML’de görülen translokasyonların çoğu kimerik füzyon gen ürünleri oluşmasıyla sonuçlanır. AML’de en sık görülen kromozom bozukluğu inv(16) ve t(8;21) translokasyonudur. Bu translokasyonlar *CBF* genini (core bağlanma faktörü) hedef alır. *CBF*’nin DNA’ya bağlanarak işlev gören alfa ve DNA’ya bağlanmadan transkripsiyonel aktiviteyi arttıran beta alt birimleri vardır. t(8;21) translokasyonu, 21. kromozomdaki *CBF $\alpha$*  alt birimini kodlayan bölge ile, 8. kromozomdaki *ETO* geninin füzyonuna sebep olur. İnv(16) ise 16.kromozomun q kolundaki *CBF $\beta$*  alt birimi ile p kolundaki *MYH11* geninin füzyonuna sebep olur. *AML1-ETO* ve *CBF $\beta$ -MYH11* translokasyonları AML’li olguların yaklaşık olarak sırasıyla, %2-12 ve %1-5 kadarında görülür ve her ikisi de iyi prognozla ilişkili olarak hastalığın tanısı ve takibinde belirteç olarak kullanılır [42].

AML’de görülen diğer bir translokasyon olan t(15;17), *PML* ve *RAR $\alpha$*  ( $\alpha$ -retinoik asid reseptörünü kodlayan gen) genlerini kapsar. *PML-RAR $\alpha$*  füzyon proteini DNA’ya bağlanma ve dimerizasyon yeteneğini yitirmemesine rağmen retinoik aside bağlanma yeteneği etkilenmekte ve hedef genlerin transkripsiyonu bozulmaktadır [43]. Ancak yine *CBF*’de olduğu gibi, lösemi gelişimi için *RAR $\alpha$*  mutasyonlarının yanında başka mutasyonların da gerçekleşmesi gerekir [42].

### 2.3.3.3. Nokta Mutasyonları

AML’de en sık rastlanan nokta mutasyonları *N-* ve *K- RAS* genlerinin 12, 13 ya da 61. kodonlarında oluşan *RAS* gen ailesi mutasyonlarıdır. Yapılan çalışmalarda bu mutasyonlara %25-44 arasında değişen oranlarda rastlandığı belirtilmiş; ayrıca mutasyon varlığının kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir [42].

AML olgularının oldukça yaygın bir bölümünde *FLT3* (FMS benzeri tirozin kinaz 3) ve *c-KIT* genlerinde aktive edici mutasyonların varlığı gösterilmiştir. *FLT3* mutasyonları “*de novo*” AML’lerin %20-30’unda görülür [44]. Olguların yaklaşık %20-25’inde ITD (İç Ardışık Tekrarlar) adı verilen tekrar sayısında değişiklikler AML olgularının yaklaşık %5-10’unda da *c-KIT* geninde proteinin kinaz aktivitesini arttıran mutasyonlar bildirilmiştir.

*AML1* geni lösemilerde sıklıkla transloke olmakla birlikte, bazı kalıtsal AML olgularının %3-5’lik bölümünde gende fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlar gösterilmiştir. Bunlar daha çok *AML1* ve trizomi 21 ile birlikte görülen AML ya da

MDS (miyelodisplastik sendrom) olgularıdır. Normal miyeloid hücre gelişimi için gerekli bir faktör olan *CEBPa* genindeki mutasyonların iyi prognozla ilişkisi olduğu gösterilmiştir [45].

## 2.4. KRONİK LÖSEMİLER

Kronik lösemiler, akut lösemilere göre daha olgun hücrelerin proliferasyonu ile gelişen hastalıklardır. Kronik lösemilerde, KML (kronik miyeloid lösemi) ile KLL (kronik lenfoblastik lösemi) hastalığın en sık görülen iki alt tipidir [4].

## 2.5. KRONİK MİYELOİD LÖSEMİ (KML)

### 2.5.1. Genel Özellikler

Kronik Miyeloid Lösemi (KML), farklılaşmanın tüm aşamalarında miyeloid seri hücrelerinin artışı ile ortaya çıkan klonal bir hematopoetik kök hücre hastalığıdır. İlk olarak 19. yüzyıl'da tanımlanmıştır. Sonraki yüzyıllarda yapılan araştırmalar hastalığın klinik ve morfolojik özelliklerine odaklanmıştır [46]. KML'nin karakteristik özelliği, t (9;22) (q34;q11) sonucunda oluşan Ph(**Philadelphia**) kromozomudur. Bu translokasyonun moleküler temelinde *BCR* ve *ABL* genlerinin füzyonu yatar [47-49].

KML tüm lösemilerin %20'sini oluşturur. Yıllık insidansı 1/100.000'dir. Hastalık erkeklerde kadınlara oranla biraz daha sık olup E/K oranı yaklaşık 1,7/1'dir. En sık yaşamın 5.ve 6. dekatlarında görülür ve erişkin lösemi olgularının % 15-20 sini oluşturur. Türkiye'deki sıklığı bilinmemektedir [50].

Hastalık ile ilişkili olarak etyolojik olarak belirtilmiş bir ajan yoktur ve vakaların birçoğu sporadiktir. İyonizan radyasyonun KML riskini artırabileceği bildirilmiştir. Nitekim Japonya'da 1945'teki atom bombası patlamasından sonra radyasyona maruz kalanlarda artmış KML insidansı saptanmıştır. Diğer çevresel faktörlerin ise herhangi bir etkisi gösterilmemiştir [51-52].

### 2.5.2. Klinik Özellikler

Hastalık kronik faz olarak nitelendirilen ilk faz ile başlar, daha sonra ikinci ve üçüncü faz olan akselere faz ve blastik krize doğru ilerler. Hastaların %40-50'si asemptomatiktir ve hastalık rutin testler sırasında saptanır [46]. Tedavi uygulanmazsa, progresyon kaçınılmazdır [53-54]. KML'deki primer genetik kusur *BCR-ABL* gen füzyonu olmakla birlikte hastalığın blastik krize doğru ilerlemesi için yeni ek mutasyonlar ve epigenetik modifikasyonlar gereklidir [55].

Vakaların %85'i kronik fazda tanı alır. Kronik fazda en sık görülen semptomlar halsizlik, iştahsızlık, kilo kaybı ve abdominal dolgunluk hissidir. Baş ağrısı, kemik ağrısı, artralji, splenik enfarkta bağlı ağrı ve ateş KML'nin erken evrelerinde nadir görülmesine rağmen hastalığın ilerlemesiyle birlikte görülme sıklığı artar. Solunum yetmezliği, koordinasyon bozukluğu ve konfüzyon gibi pulmoner ve serebral perfüzyon bozukluğu gösteren lökostatik semptomlar kronik fazda az görülür, akselere ve blastik fazda ise olgunlaşmamış hücrelerin artmasıyla birlikte görülme sıklıkları artar [51-52, 56-57].

### **2.5.3. Genetik ve Moleküler Biyoloji**

#### **2.5.3.1. ABL Geni**

9q34 bölgesinde yer alan *ABL* geninin ifadesi sonucunda molekül ağırlığı 145-kD olan, 11 ekzona sahip ABL proteini oluşur. ABL proteini bir tirozin kinaz olup sinyal iletimi ve hücre çoğalmasının düzenlenmesinde önemli role sahiptir. Proteinin ilk ekzonunda farklı alternatif birleşmeler gerçekleşir. ABL proteininin yapısında bulunan 3 farklı SRC homoloji alanı (SH1-SH3), proteinin NH2 ucunda yer alır. SH1 alanı, tirozin kinaz fonksiyonuna sahip iken SH2 ve SH3 alanları ABL proteinlerinin diğer proteinlerle etkileşimini sağlar [58]. Normal ABL proteini, hücre döngüsünü, programlı hücre ölümünü, hücre büyüme ve çoğalmasını ve hücrelerin strese yanıtını kontrol eder.

#### **2.5.3.2. BCR Geni**

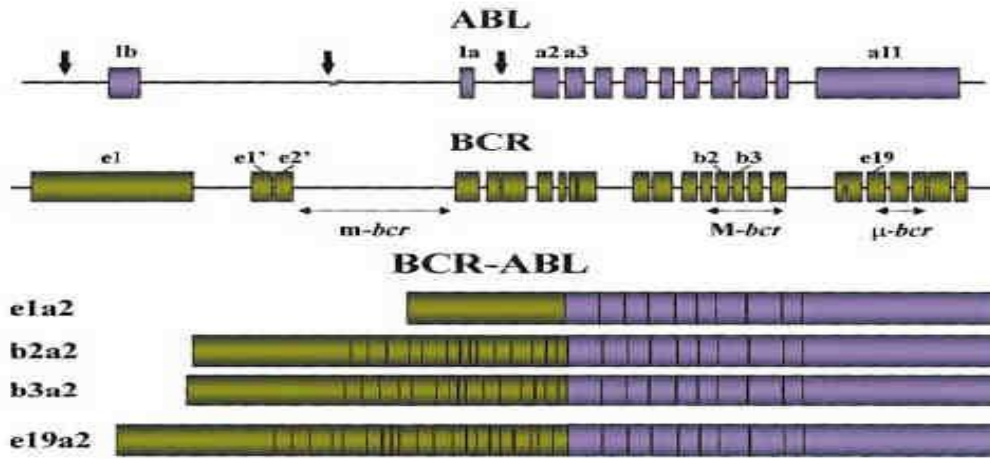
22. kromozom üzerinde yer alan *BCR* geni, 160-kD ağırlığında bir protein üretir. BCR proteini'nin NH2 ucundaki ilk ekzon, 14-3-3 protein ailesinin bir üyesi olan Bap-1 proteini'ni ve BCR proteinini hedefleyen serin treonin kinazı kodlar. BCR proteininin merkezinde Rho-Guanidin bağlanma bölgesi bulunur. Rho-Guanidin faktörleri, NF-κB gibi transkripsiyon faktörlerini aktif hale getirir. BCR proteini'nin C- ucu GTPaz aktivitesine sahiptir. BCR proteini, 177. tirozin amino asidi başta olmak üzere birçok tirozinden fosforlanabilir. Bu durum BCR'nin RAS sinyal yolağı'nın aktivitesini etkileyen GRB-2 proteinine bağlanmasını kolaylaştırır [59].

#### **2.5.3.3. BCR-ABL Translokasyonu**

Yapılan moleküler genetik incelemeler sonucunda 9. kromozomun 9q34 bölgesinde yer alan *ABL* geni'nin 22. kromozoma transloke olduğu gösterilmiştir. 22. kromozomdaki kırılma noktalarının DNA'nın 5-6 kb'lık bir bölümünde meydana

geldiği bulunmuş ve buraya kırılma noktasının kümeleşmiş bölgesi (breakpoint cluster region (BCR)) denilmiştir. Doğal c-ABL proteini çekirdek içinde bulunur ve kinaz aktivitesi hücrenin gereksinimlerine göre düzenlenir. BCR-ABL füzyonu ise hiperaktif bir sitoplazmik tirozin kinaz oluşumu ile sonuçlanır. Bu tirozin kinaz farklılaşmayı bloke edemez ancak miyeloid seri hücrelerinin yaşam kabiliyetini ve proliferasyonunu artırır [60]. Ph translokasyonu sırasında *ABL* geni üzerindeki kırık her zaman *ABL* ekzon 2'nin 5' ucunda 300 kb'lık bir alanda gerçekleşirken (a2'den a11'e kadar), *BCR* geni üzerindeki kırık çeşitli bölgelerde oluşabilir ve farklı büyüklükte anormal füzyon tirozin kinaz genleri ile sonuçlanabilir [61-62]. Şekil 2-1'de *ABL* ve *BCR* genleri içindeki kırık noktalarının konumu ve kimerik mRNA'ların yapısı görülmektedir.

Kırılma noktalarının analizi *ABL* geninin sağlıklı hücreleri transformasyona uğratarak kanser hücresine dönüşmesini sağlarken *BCR* geninin de hastalığın fenotipini etkilediğini ortaya koymuştur [63].



Şekil 2-1: *ABL* ve *BCR* genlerindeki kırık noktalarının konumu ve alternatif kırılmalar sonucunda ortaya çıkan kimerik mRNA'ların yapısı.

BCR/ABL füzyon proteini malin değişimi 4 temel mekanizma ile gerçekleştirir [48, 64-65].

**1. Hücrenin Adezyon Özellikleri:** KML öncül hücrelerinin kemik iliği stroma hücreleri ve ekstraselüler matrikse adezyonu azalır. Son çalışmalar stroma ile öncül hücreler arasındaki etkileşimde dış ortamdan hücre içine normal sinyal iletimini başlatma yeteneğine sahip  $\beta$ - integrinlerin önemli rolü olduğunu göstermiştir. KML



hücrelerinin,  $\beta$ 1-integrinin normal öncül hücrelerde bulunmayan bir varyantını eksprese ettikleri belirtilmiştir [48].

**2. Mitojenik Aktivasyon:** BCR-ABL onkoproteini, RAS, JAK/STAT, PI3K/Akt ve NF- $\kappa$ B gibi birçok mitojenik sinyal yolağının aktivasyonuna sebep olur ve hücre çoğalmasını, apoptozun baskılanmasını ve ekstraselüler matris ile stroma arasındaki anormal etkileşimi uyarır [49, 66]. Etkileşimlerin birçoğu adaptör proteinlerin BCR-ABL'ye bağlanması ve tirozin fosforillenmesi aracılığıyla sağlanır [48].

**2.1. RAS Yolağı:** BCR-ABL'nin BCR bölgesinde yer alan Tirozin 177'nin fosforillenmesi adaptör protein GRB-2'nin bağlanmasını sağlar. GRB-2'nin Guanin nükleotid değişim faktörü olan SOS'a bağlanmasından sonra RAS aktif duruma geçer [67]. IL-3 gibi sitokin reseptörlerinin uyarılması da RAS'ın aktivasyonuna neden olur ve aktif RAS proteini RAF'a bağlanır. Hücre membranında toplanan RAF proteini fosforillenerek aktif hale geçer ve MAPK sinyal yolağını başlatır. BCR-ABL aracılı malin transformasyon için SAPK (stres ile aktifleşen protein kinaz)/JNK sinyal yolağının da gerekli olduğu bildirilmiştir [48].

**2.2. JAK-STAT Yolağı:** STAT (sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatörü) transkripsiyon faktörleri lösemi oluşumunda önemli role sahiptir. STAT ailesine ait transkripsiyon faktörleri (STAT1 ve STAT5) hücre büyümesi, farklılaşma, apoptoz, inflamasyon ve immün tepki gibi birçok aşamada görev alırlar. Sitokin ya da büyüme faktörlerine ligand bağlanması STAT fosforillenmesi, dimerizasyonu ve çekirdeğe translokasyonu gibi bir dizi sinyal olayını başlatır [68]. BCR-ABL-pozitif hücre serilerinde ve primer KML hücrelerinde STAT transkripsiyon faktörlerinin fosforillenmesi gözlenmiş ve STAT5 aktivasyonunun malin transformasyon ile ilişkili olduğu görülmüştür [69]. BCR-ABL-pozitif KML hücre soylarında STAT5'in Bcl-xL (ekstra büyük B-hücre lenfoma) proteininin transkripsiyonunu uyararak anti-apoptotik etki gösterdiği bilinmektedir [70].

**2.3. PI3K/Akt Yolağı:** BCR-ABL-pozitif hücrelerin proliferasyonu için PI3K aktivitesi gereklidir. PI3K yolağı sağkalım, proliferasyon, farklılaşma, adhezyon, metabolizma, ve hareketlilik gibi birçok olayda merkezi role sahiptir [71]. PI3K/Akt yolağının aktivasyonu çeşitli kanserlerde oldukça yaygın olarak görülür [72]. PI3K yolağının aktivasyonu Akt kaskadını aktifleştirir [73]. Akt Bcl-2 ailesinin proapoptotik bir üyesi olan BAD [74-75], kaspaz 9 [76], MDM2 [77], mTOR ve çatal başlı

transkripsiyon faktörleri olan FOXO1, *FOXO3A* ve FOXO4 gibi çeşitli hücresele substratları aktiveleştirerek hücre içi yerleşimi düzenler [48, 78].

**2.4. NF-κB Yolağı:** Bir κB inhibitörü olan IκB proteinlerinin fosforillenmesi ve yıkımı NF-κB'nin sitoplazmadan çekirdeğe geçerek inflamasyon, hücre döngüsü, apoptoz ve anjiyogenez gibi birçok hücresele olayda etkili olan genlerin transkripsiyonunu sağlar [79]. NF-κB'nin anti-apoptotik hedef genleri Bcl-2 aile üyeleri olan Bcl-xL, BFL1 ve apoptoz inhibitörleri olan IAP1, IAP2 ve XIAP'dır [80].

**3. Apoptozun İnhibisyonu:** İnsan hücre hatlarında BCR/ABL ifadesinin tirozin kinaz aktivitesi ve *RAS* onkogeninin aktiveleşmesi ile büyüme faktörü eksikliğinden kaynaklanan apoptozu engellediği gösterilmiştir [81]. Bunun yanısıra BCR/ABL-pozitif hücre hatlarında DNA'da oluşan hatalardan kaynaklanan apoptozu karşı bir direnç geliştiği belirtilmiştir. BCR/ABL, hücre içi dengeyi hücrenin büyümesi yönüne çevirirken apoptozu da engeller [65]. BCR/ABL nin başlattığı ve hücrelerin çoğalmasını tetiklerken apoptozu engelleyen kompleks sinyalleri tam anlamı ile birbirinden ayırmak güçtür. BCR/ ABL füzyon proteini, mitokondriden sitokrom c salınımını önleyerek kaspazların aktivasyonunu engeller, *Bcl-2* geni'nin ifadesini *RAS* veya PI3K yolu ile kontrol eder. BCR/ABL ile transfekte edilen hücrelerde BCR/ABL proteininin Fas reseptörü / Fas ligand sistemi ile apoptozu engellediği gösterilmiştir [82].

**4. BCR-ABL Tirozin Kinaz Aktivitesi:** BCR-ABL'nin tirozin kinaz aktivitesi Crk-L [83] gibi çeşitli hücresele substratların fosforillenmesine katkıda bulunur ve bu yolla hücresele proliferasyon ve yaşamı kontrol eden sinyal yollarının aktiveleşmesi sağlanır [48, 84].

#### **2.5.4. Prognoz**

Akselere ve blastik faza geçişte hastaların % 60-80'de yeni sitogenetik ve moleküler değişiklikler oluşur. KML hastalarında en sık görülen ikincil değişiklikler Tablo 2-2'de görülmektedir [85]. İkincil değişikliklerin prognoza etkisi konusunda farklı görüşler vardır. Birçok çalışmada ikincil değişikliklerin olmamasının daha iyi prognoz belirtisi olduğu bildirilmesine rağmen diğer çalışmalarda ikincil değişiklik olan ve olmayanlar arasında prognostik fark saptanmamıştır. i(17q) ve 17q kaybıyla sonuçlanan diğer değişikliklerin kötü prognoz göstergesi olabileceği belirtilmiştir. Ayrıca blastik fazda trizomi 8 ve + Ph\*'u da kötü prognozu görülebilir [86-88].

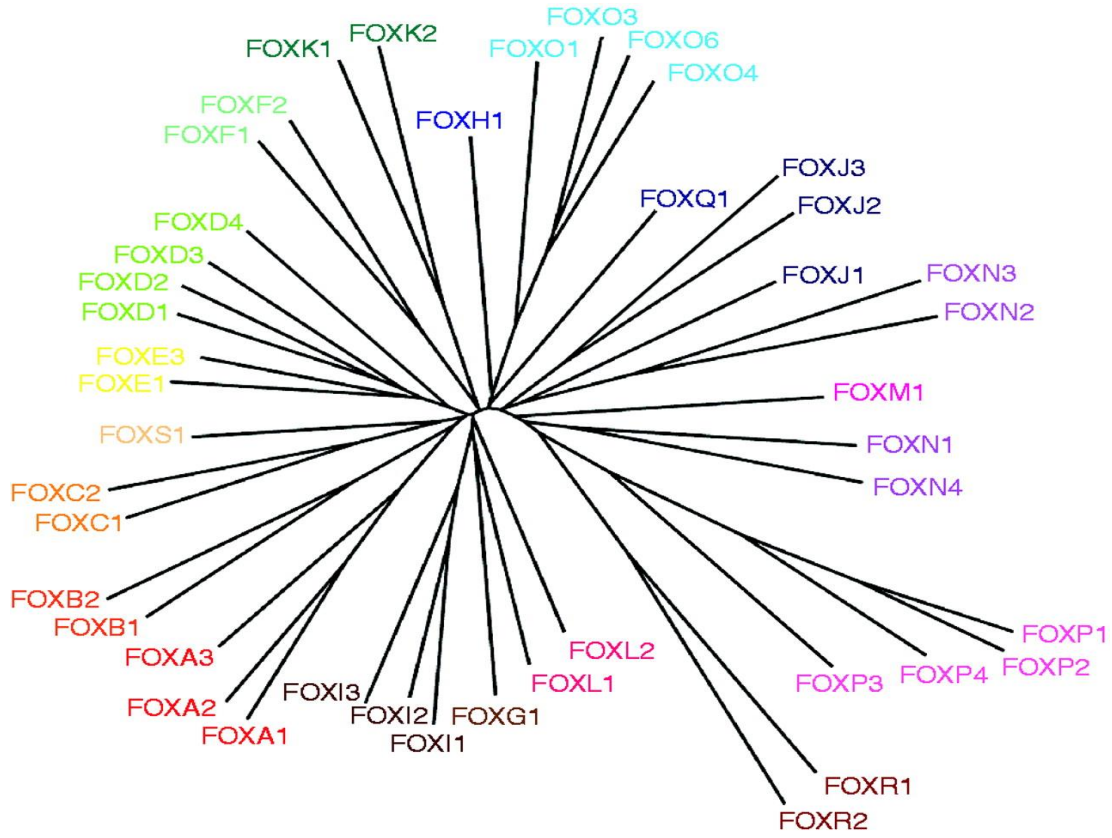
**Tablo 2-2: KML hastalarında en sık görülen ikincil değişiklikler**

Sitogenetik Değişiklikler	Görölme Sıklıkları	Sitogenetik Değişiklikler	Görölme Sıklıkları
+8 (Trizomi 8)	% 34	-Y (monozomi Y)	% 8
+Ph* (ek Ph* kromozomu)	% 30	+21 (Trizomi 21)	% 7
izokromozom i(17q)	% 20	+17 (Trizomi 17)	% 5
+19 (Trizomi 19)	% 13	-7(monozomi 7)	% 5

## 2.6. ÇATAL BAŞLI TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİ

### 2.6.1. FOXO Ailesi

FOXO transkripsiyon faktörleri çatal başlı protein ailesindedir. Bu aile ‘çatal başlı’ olarak adlandırılan yüksek derecede korunmuş 100 aminoasitlik DNA bağlanma bölgesi ile transkripsiyonu düzenler. FOXO transkripsiyon faktörleri 2 büyük halka ya da kanatlar ile 3  $\alpha$  heliks yapısı içeren DNA bağlanma bölgelerine sahip olmasından dolayı ‘winged helix’ transkripsiyon faktörleri olarak da adlandırılır. FOX ailesi 44 farklı üyeden ve A’dan S’ye kadar isimlendirilmiş 19 alt gruptan oluşur. ‘O’ alt grubunun *FOXO1 (FKHR)*, *FOXO2 (FOXO6)*, *FOXO3A (FKHRL1)* ve *FOXO4 (AFX)* olmak üzere 4 üyesi vardır [89-91]. FOXO ailesinin 3 üyesi (*FOXO1*, *FOXO3* ve *FOXO4*) ilk olarak insan tümörlerindeki kromozomal translokasyonlarda bulunmuştur. Bu ilk bulgular FOXO aile üyelerinin tümör gelişiminde kritik rol oynadıklarını desteklemektedir. *FOXO1*, *FOXO3A* ve *FOXO4* mRNA’ları tüm memeli dokularında çeşitli oranlarda eksprese olur. *FOXO1* mRNA’sı adipoz dokularda, *FOXO2* beyin gelişiminde, *FOXO3A* beyinde, *FOXO4* ise kalpte yüksek miktarda eksprese edilir [7]. Şekil 2-2’de çatal başlı transkripsiyon faktörlerinde yer alan aile üyelerinin protein dizilerindeki farklılıklara göre sınıflandırılmış filogenetik ağacı görülmektedir.



**Şekil 2-2: FOXO ailesi'nin filogenetik sınıflandırılması.**

## 2.6.2. Memeli Hücrelerinde FOXO Fonksiyonları

### 2.6.2.1. FOXO'nun DNA'ya Bağlanması

Çekirdekte FOXO proteinleri molekülün merkezi kısmına yerleşmiş 100 aminoasitlik 'Forkhead box' bölgesi yolu ile monomer olarak DNA'ya bağlanırlar [92]. FOXO'nun DNA üzerindeki konsensus tanıma bölgesi DBE olarak adlandırılan GTAAA(C/T)A'dır [93-94]. FOXO faktörleri genellikle transkripsiyonel aktivatör potansiyeli göstermelerine karşın dizi analizleri bu proteinlerin transkripsiyonu baskılayıcı rolü olabileceğini de göstermiştir. Transkripsiyonun aktifleştirilmesi veya baskılanması promotör bölgenin niteliğine bağlıdır [95].

### 2.6.2.2. Hücresel İşlevleri

FOXO transkripsiyon faktörlerinin hedef genlerin ifadesini düzenleyen farklı hücresel işlevleri vardır. FOXO hedef genleri ve hücresel işlevleri Şekil 2-3'de gösterilmiştir.

**1.Hücre Döngüsünün Durdurulması:** Bölünmekte olan hücrelerde FOXO ifadesinin artması hücre döngüsünü durdurur [96]. G1/S fazında hücre döngüsünün durdurulmasında etkili hedef genler p21 ve p27 iken G2/M fazında etkili olan genler ise *GADD45* ve *siklin G2*'dir [97-98].

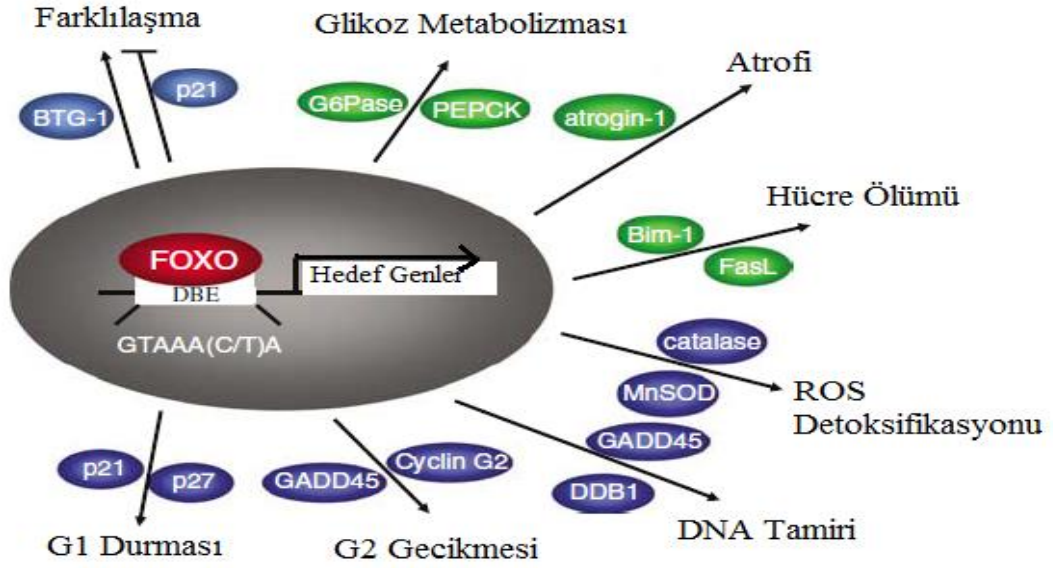
**2. DNA tamiri ve ROS Detoksifikasyonu:** FOXO transkripsiyon faktörleri strese karşı hücresel direnci 2 yolla gerçekleştirir. Ya ROS (reaktif oksijen türevleri) ile oluşmuş hataların tamirine ya da ROS detoksifikasyonuna yol açar. FOXO proteinleri *GADD45* ve *DDBI* gibi birçok genin ifadesini arttırarak DNA tamirini sağlar [98]. Ayrıca MnSOD ve katalaz gibi serbest radikal enzimlerinin ifadesini arttırarak da ROS detoksifikasyonuna yardımcı olurlar [99].

**3. Hücre Ölümü:** FOXO proteinlerinin ifadesi hücre ölümünü tetikler. FOXO faktörleri FasL ve bir pro-apoptotik Bcl-2 aile üyesi olan Bim-1 transkripsiyonu ile komşu hücrelerdeki ölüm yolaklarını tetikleyerek apoptozu başlatırlar [10, 100].

**4. Atrofi:** Farklılaşmış iskelet ve kalp kas hücrelerinde aktif *FOXO3*'ün ifadesi atrofiye yol açar. FOXO'nun neden olduğu atrofi apoptoza yol açmaz; sadece hücre büyüklüğünü azaltır [101-102].

**5. Glikoz Metabolizması:** FOXO transkripsiyon faktörleri glikoz metabolizmasını kontrol eden genlerin aşırı eksprese edilmesinde önemli role sahiptir. FOXO faktörleri glikoz 6 fosfotaz (G6Pase) ile fosfofenolpirüvat karboksikinaz enzimlerinin aşırı ifadesi ile glükogeneze neden olur [103-106].

**6. Farklılaşma:** Farklılaşmış hücrelerde FOXO faktörleri FOXO'nun izoformuna ya da hücre tipine göre farklılaşmayı ya baskılar ya da aktifleştirir. *FOXO3* hücre proliferasyonunda negatif düzenleyici role sahip olan B-hücre translokasyon geni 1 (*BTG1*) ile eritroid farklılaşmasını sağlar [107]. Hücre döngü inhibitörü p21 diğer hücresel olaylarda farklılaşmayı sağlarken adipoz dokularda FOXO'nun farklılaşmayı önlemesine aracılık eder [108].

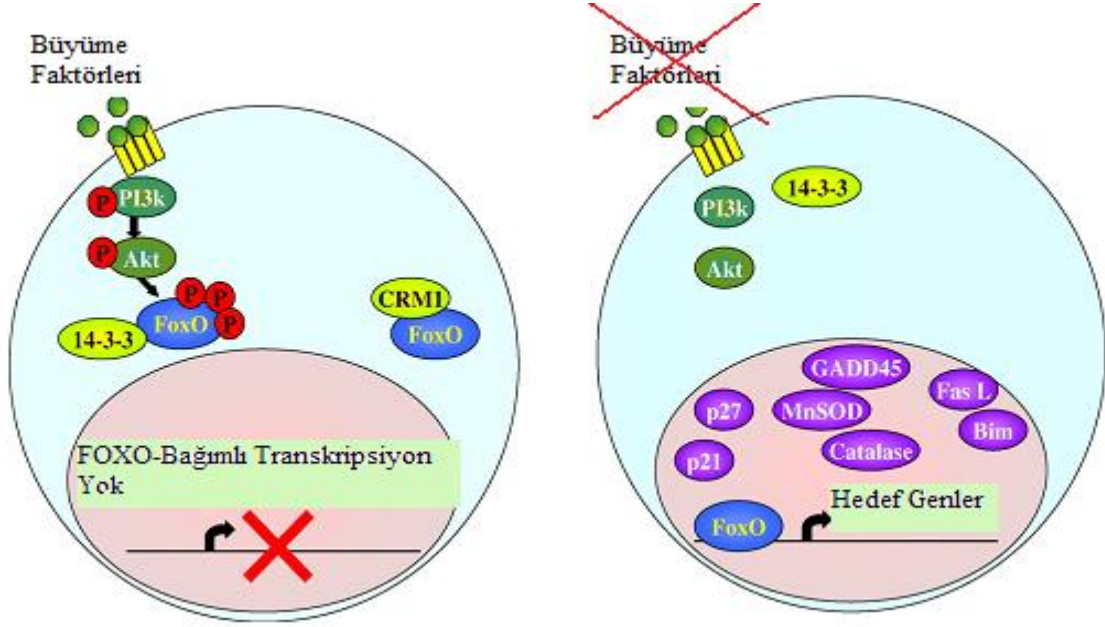


**Şekil 2-3: FOXO hedef genleri ve hücresel roller.**

FOXO transkripsiyon faktörleri, bölünen hücreler (mavi) ve postmitotik hücreler (yeşil)'de hedef genlerin transkripsiyonuna yol açar. BTG-1 (B hücre translokasyon geni-1); p21 (siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1A); p27 (siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1B); MnSOD (manganaz süperoksit dizmutaz); G6Pase (glikoz-6-fosfataz); PEPCK (fosfofenolpirüvat karboksikinaz); FasL (Fas ligandı); GADD45 (büyüme durdurucu ve DNA hasarı indükleyici protein 45); DDB1 (hasara özgü DNA bağlanma proteini 1); DBE (DAF-16 aile üyeleri bağlayıcı element)

### 2.6.3. İnsülin ve Büyüme Hormonlarına Karşı FOXO Transkripsiyon Faktörleri'nin Düzenlenmesi

Büyüme faktörlerinin yokluğunda FOXO proteinleri çekirdeğe yerleşir ve hedef genleri uyararak hücre döngüsünün durmasını, stres direncini ya da apoptozu tetikler. Büyüme faktörleri varsa PI3K/Akt yolağının aktivasyonu ile FOXO fosforillenir. Fosforillenmiş FOXO faktörleri şaperon molekül görevi gören 14-3-3 proteinlerine bağlanarak sitoplazmada kalır ve böylece FOXO'ya bağlı transkripsiyon engellenir. İnsülin ve büyüme faktörleri sinyalleri varlığında *FOXO3A*; Akt, IKK ve ERK onkokinazları tarafından farklı bölgelerde fosforile olur. *FOXO3A*'nın fosforillenmesi çekirdekte sitoplazmaya taşınmasına ve proteosomal yıkımı ile sonuçlanır. FOXO'nun CRM1'e bağlanması da çekirdekte sitoplazmaya geçmesini sağlayarak transkripsiyonu inhibe edebilir [109]. FOXO transkripsiyon faktörlerinin insülin ve büyüme faktörleri tarafından düzenlenme mekanizmaları Şekil 2-4'de görülmektedir.



Şekil 2-4: FOXO transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesi.

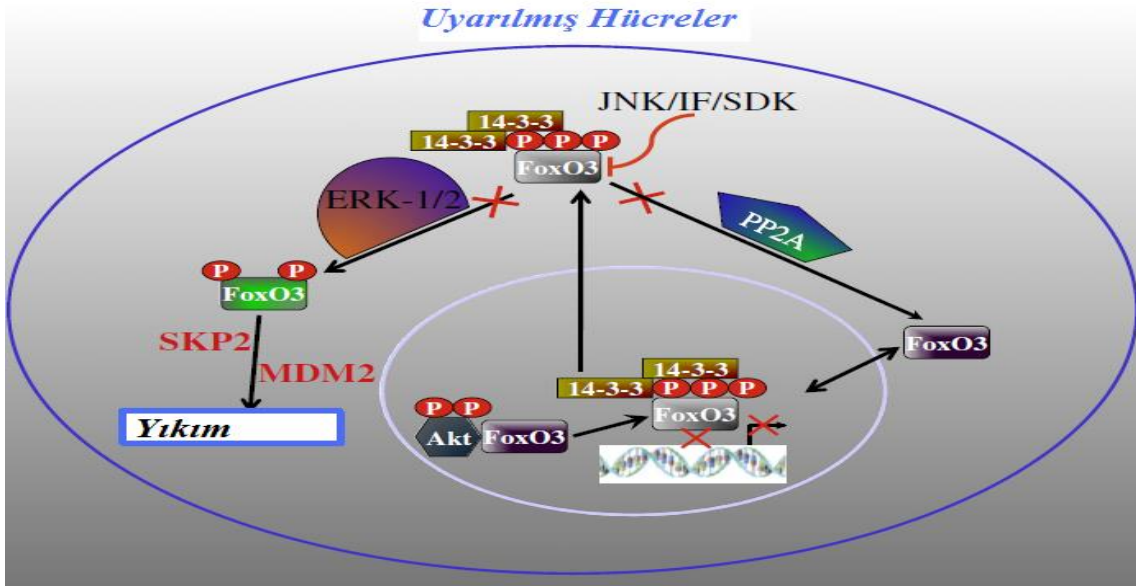
#### 2.6.4. FOXO Proteinlerinin 14-3-3 Proteini ile Düzenlenmesi

14-3-3 proteinleri hücrede birçok sinyal yolağını düzenleyen protein ailesindedir. 14-3-3 proteinleri, hedef FOXO proteini'nin enzimatik aktivitesini, stabilitesini, hücresel yerleşimini ve diğer proteinlerle etkileşimi gibi birçok fonksiyonları düzenler [110-111].

#### 2.6.5. FOXO Yerleşiminin Düzenlenmesi

Akt aktivasyonu, *FOXO3*'ün sitoplazmada kalmasına yol açarken; inhibe edilmesi ise çekirdek içinde kalmasına neden olur. Akt fosforillenme bölgesi bulunmayan *FOXO3* mutantları çekirdek içinde kalırlar. Ayrıca PP2A inhibitörleri, Akt inhibisyonuna yol açarak T32 ve S253 bölgelerinde *FOXO3*'ün fosforillenmesini engeller ve *FOXO3*'ün çekirdeğe tekrar taşınmasına ve transkripsiyonun aktivasyonuna neden olur [112-113] (Şekil 2-5).

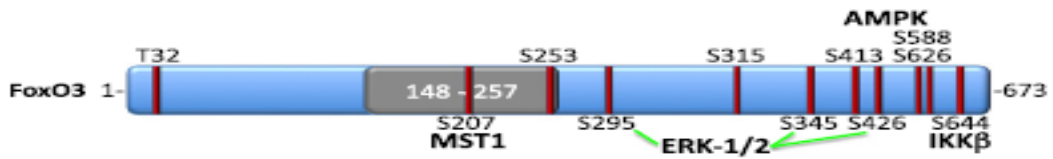
FOXO transkripsiyon faktörleri hücre içi konumlarındaki geri dönüşümlü değişimlerle düzenlenir. FOXO proteinlerinin yıkımı ise geri dönüşümsüz bir olaydır. Bu durum, bu düzenlenme mekanizmasının tümör oluşumu sürecinde en kritik aşamalardan biri olduğuna işaret eder [8, 114].



Şekil 2-5: Akt ve 14-3-3 proteinleri tarafından FOXO proteinleri'nin düzenlenmesi.

#### 2.6.6. Stres ile Aktifleşen Kinazlar ve Diğer Fosforillenme Olayları

FOXO proteinleri Akt fosforillenme bölgeleri dışında başka birçok bölgede de fosforillenebilir. Akt, *FOXO3* aile üyelerini 3 anahtar noktada fosforile eder. Bunlar T32, S253 ve S315'tir [115]. Oksidatif stres olduğu durumlarda *FOXO3*, MST1 ile S207 noktasında fosforillenir. Bu fosforillenme *FOXO3*'ün 14-3-3 ile bağlanmasını engelleyerek FOXO aktivitesini ve çekirdek yerleşimini artırır [116]. Ayrıca *FOXO3* ERK-1/2 tarafından S295/345/426 noktalarında fosforile edilir [117-118]. Besin eksikliğine karşı AMPK ile S413/588/626 noktalarında fosforile edilir ve bu fosforillenme hücre içindeki yerleşimini veya DNA bağlanmasını etkilemeden FOXO'nun hedef genlerinin transkripsiyonel aktivitesini pozitif yönde etkiler. Bir diğer *FOXO3* fosforillenme mekanizması ise IKK $\beta$  tarafından S644 noktasında gerçekleşir. Bu fosforillenme *FOXO3*'ün çekirdekten çıkmasını ve yıkımını sağlayarak *FOXO3* fonksiyonunu inhibe eder [8]. Şekil 2-6, *FOXO3* fosforillenme noktalarını göstermektedir.



Şekil 2-6: *FOXO3* fosforillenme noktaları.



### 2.6.7. FOXO'nun Asetillenme ile Düzenlenmesi

Asetillenmenin FOXO aktivitesi üzerindeki etkileri hakkında birtakım uyuşmazlıklar vardır. Bazı sonuçlar asetillenmenin FOXO aktivitesini arttırdığını bazıları ise azalttığını göstermektedir. FOXO asetillenmesi tek başına inhibe edici etki gösterirken, CBP/P300'ün FOXO promotor bölgesine bağlanması ile histon asetillenmesine yol açarak transkripsiyonun başlaması için pozitif sinyaller oluşturabilir. Ayrıca FOXO asetillenmesi, Akt tarafından S256 noktasında FOXO fosforillenmesini artırarak DNA'ya bağlanmasını engeller ve negatif düzenleyici etki gösterir [119]. FOXO deasetillenmesi, FOXO fonksiyonu üzerinde hem negatif, hem de pozitif etkiler gösterebilir. Bu durum hücre döngüsünün kontrolü ve senesans ile ilişkili FOXO hedef genlerinin aşırı eksprese olmasına yol açarken pro-apoptotik genlerin ifadesinin azalmasına da neden olur [120].

### 2.6.8. FOXO'nun Metillenme ve Ubikitinlenme ile Düzenlenmesi

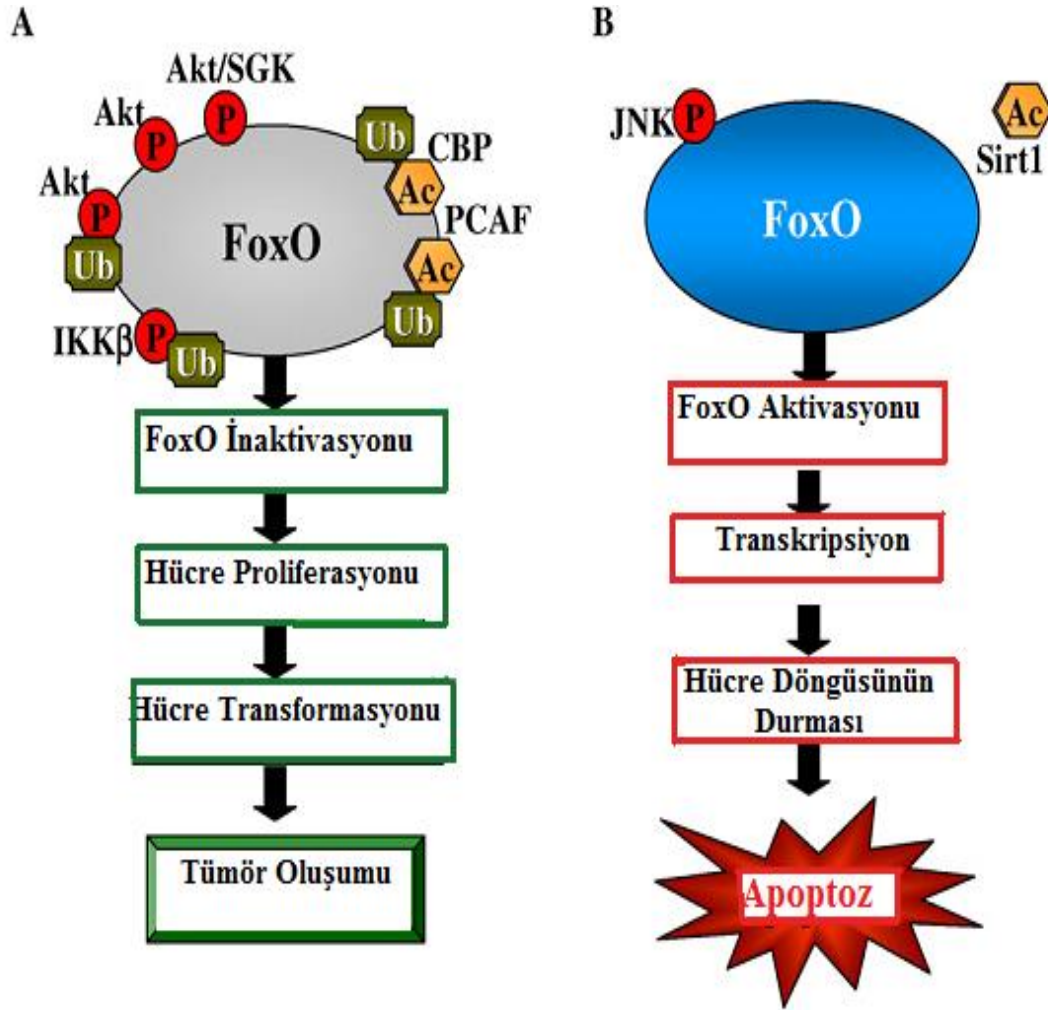
Akt/14-3-3/FOXO düzenleyici mekanizma ile çakıştığı görülen çevirim sonrası modifikasyonlardan biri arginin metillenmesidir. Arg248 ve Arg250 noktalarındaki FOXO1 metillenmesi, Akt tarafından S253 konumundaki fosforillenmeyi engeller. Ayrıca bir arginin metiltransferaz olan PRMT1 de, *FOXO1* metillenmesine yol açar. PRMT1 yokluğunda *FOXO1* etkinliği azalır ve protein çekirdekten sitoplazmaya geçerek yıkılır [121].

FOXO protein seviyeleri ubikitin bağımlı protein yıkımı ile düzenlenir [122]. Sinyallerin bazıları FOXO ubikitinlenmesine ve yıkımına neden olur. SKP2, Akt tarafından fosforillenmiş *FOXO1*'e bağlanırken; Mdm2, ERK ile fosforillenen FOXO'ya bağlanarak FOXO'nun ubikitinlenmesine neden olur [117-118, 123]. Böylece FOXO çekirdeğe geçerek hedef genlerin transkripsiyonel aktivitesini artırır [124].

FOXO transkripsiyon faktörlerinin yıkımı ubikitin-proteazom yolağı ile gerçekleşir [114]. IKK $\beta$ , *FOXO3*'ün Ser644 noktasında fosforillenmesine neden olur. Bu fosforillenme ubikitin bağlanması ve *FOXO3*'ün yıkımıyla sonuçlanır. IKK $\beta$  kaynaklı tümör oluşumu, *FOXO3*'ün aşırı eksprese olması ile baskılanabildiği için FOXO protein yıkımının IKK $\beta$  ile düzenlenmesi tümör oluşumunda önemli rol oynayabilir [8].

### 2.6.9. Kanser Gelişiminde FOXO

FOXO protein yıkımı hücrede değişikliklere yol açarak karsinogenezin ilk basamağını oluşturur [125]. FOXO'nun ubiquitinlenmesi ve yıkımı için Akt aktivasyonu ve FOXO'nun sitoplazmaya geçmesi gerekir [8]. FOXO'nun fosforillenmesi sitoplazmadan çekirdeğe geçmesine ve hedef genlerin transkripsiyonuna yol açtığı gibi FOXO'nun Sirt1 tarafından deasetillenmesi de aktifleşmesine neden olarak hücre döngüsünün durdurulmasını ve apoptozu tetikler [126]. FOXO'nun tümör gelişimindeki rolü Şekil 2-7'de özetlenmiştir.



Şekil 2-7: Kanser gelişiminde FOXO fonksiyonu.

(A)Akt ya da SGK tarafından FOXO fosforillenmesi. (B) JNK tarafından FOXO fosforillenmesi

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. GEREÇ

##### 3.1.1. Materyal

Tez çalışmamızda, 2009-2010 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı'na başvuran Akut Miyeloid Lösemi'li (AML) 50 ve Kronik Miyeloid Lösemi'li (KML) 51 hastanın kan örnekleri kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak yaş ve cinsiyet bakımından hastalara uygun olarak seçilmiş 34 sağlıklı bireyin periferik kanları kullanıldı. Hasta ve kontrol gruplarının özellikleri Tablo 3-1'de görülmektedir.

**Tablo 3-1: Hasta ve Kontrol gruplarının özellikleri**

Cinsiyet	KML n (%)	AML n (%)	KONTROL n (%)	KML Yaş Ort. Ort. (SD)	AML Yaş Ort. Ort. (SD)	KONTROL Yaş Ort. Ort. (SD)
<b>Kadın</b>	30 (%58,8)	26 (%52)	21 (%61,2)	51 (±13,9)	49 (±13,9)	51 (±16)
<b>Erkek</b>	21 (%41,2)	24 (%48)	13 (%38,3)	44 (±17,8)	43 (±11,1)	51 (±12,2)

Çalışma, 07.01.2011 tarihli ve 01 sayılı Etik Kurul toplantısında etik yönden uygun görülmüş ve İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

##### 3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Biocoll Separating Solution (Ficoll) [BIOCHROM]

Etilen-diamin-tetraasetikasit (EDTA),  $\beta$ -Merkaptoetanol, Tris (hidroksimetil aminometan), Borik Asit [MERCK]

Etidyum Bromid (EtBr), Bromfenol Mavisı (BFB) [SIGMA]

Tripure İzolasyon Ajanı (Trizol) [ROCHE]

Revertaid First Strand cDNA Sentez Kiti [FERMENTAS]

Primer 100 nmol [IDT]

Lightcycler UPL Prob Gerçek-Zamanlı PZR Probu [ROCHE]

Lightcycler 480 Probes Master, Master Mix [ROCHE]

Lightcycler 480 Multiwell Plate [ROCHE]

### 3.1.3. Kullanılan Cihazlar

Gerçek-Zamanlı PZR Light Cycler 480 [ROCHE]

Thermal Cycler TC 412 [TECHNE]

Santrifüjler [HERAUS, HETTICH, JUAN]

Mikropipetler [EPPENDORF]

Yatay elektroforez tankları ve jel dökme sistemleri [BRL]

Distile Su Üretim Cihazı [MILLIPORE]

Vortex [SNIJDERS]

Spektrofotometre NanoDrop 2000 [THERMO SCIENTIFIC]

### 3.1.4. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

#### **10X PBS Tampon Çözeltisi**

1 litre için;

- 80 gr NaCl
- 2 gr KCL
- 11,5 gr Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- 2 gr KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

#### **10X BFB Yükleme Tamponu**

2ml için ;

- %1 SDS
- 5mg Bromfenol Mavisi
- 2ml Gliserol

#### **10X TEB (Tris-EDTA-Borik Asit) Tampon Çözeltisi**

1 litre için;

- 0.88 M Borik Asit
- 5M Tris
- 0.02 EDTA (pH :8.00)

Etidyum Bromür: 10mg/ml

### 3.2. Yöntem

Öncelikle hastaların periferik kan örneklerinden lenfositler ve elde edilen lenfositlerden toplam RNA izole edildi. Bu RNA örneklerinden Ters Transkriptaz yöntemiyle cDNA sentezlendi, araştıracağımız genlere özgü hazırlanan primer ve probalar kullanılarak eş zamanlı referans bir gen ile birlikte Gerçek-Zamanlı PZR yöntemiyle çoğaltıldı ve ilgili genin ifadesi incelendi. Sonuçlar sağlıklı birey grubuyla karşılaştırıldı ve ifade düzeyleri kıyaslandı.

#### 3.2.1. Tam Kandan Lenfosit İzolasyonu

- EDTA'lı tüpe alınan yaklaşık 10 ml kan 1/1 oranında %0.9'luk NaCl ile dilue edilir.
- 2 ml Ficoll üzerine yavaş bir şekilde eklenir.
- 1970 RPM'de 30 dk. Santrifüj yapılır.
- Santrifüj sonunda orta pellette eritrosit ve diğer hücreler, süpernatantta ise serum kısmı kalacaktır. İkisinin arasında kalan beyaz kısımdan lenfositler pasteur pipet ile toplanarak temiz tüpe alınır.
- 1970 RPM'de 10 dk. Santrifüj yapılır.
- Süpernatant dökülerek pellet üzerine 4 ml PBS eklenerek pipetlenir.
- Cryo tüplere 1'er ml dağıtılır.
- 1970 RPM'de 5 dk. Santrifüj yapılır.
- Süpernatant dökülür.
- Elde edilen hücreler -80 °C'de saklanır.

### 3.2.2. Lenfosit'ten RNA İzolasyonu

cDNA sentezinin başarısı için yüksek kalitede RNA kullanılması gerekmektedir. RNA'nın ribonükleazlar tarafından parçalanması ve genomik DNA ile kontaminasyonu mutlaka önlenmelidir. RNA'nın saf bir şekilde ve parçalanmadan izolasyonunda birçok yöntem olmasına karşın guanidium tiosiyanat-fenol kloroform (Trizol) yöntemi birçok araştırmacı tarafından önerilmektedir. Çalışmamızda trizol kullanılarak RNA izolasyonu yapılmıştır.

Yöntemin prensibi, RNA'nın su molekülleri ve guanidium tiosiyanat ile kompleks oluşturulmasının kolaylaştırılması; DNA ve proteinlerin hidrofilik etkileşimlerinin bozularak, DNA ve proteinlerin sulu fazdan uzaklaştırılmasına dayanır. Bu yöntemle toplam RNA elde edilir. Çok iyi kalitede RNA elde edildiğinde bu RNA'nın jelde yürütülmesi ile 28S ve 18S rRNA'lar da gözlenebilmektedir. İzole edilmiş lenfositlerin üzerine 1 ml Tripure İsolation Agent (Trizol) eklenir ve çözülene kadar pipetaj yapılır. Oda ısısında 5 dk. inkübe edilir.

- Örnekler 2 ml'lik polipropilen santrifüj tüplerine alınır ve üzerlerine 0.2 ml kloroform eklenir, pipetaj yapılır, kuvvetlice çalkalanır, oda ısısında 2-15 dakika inkübe edilir.
- +4 °C'de 12,000 g'de 15 dakika santrifüj yapılır ve solüsyon 3 faza ayrılır. En üstteki sulu faz RNA izole etmekte, arafaz ve alttaki organik faz ise DNA ve protein izole etmekte kullanılır.
- Üstteki sulu faz yeni bir 2 ml'lik polipropilen santrifüj tüpüne alınır, 0,5 ml izopropanol eklenir, kapağı kapatılır ve tüp baş aşağı birkaç kez çevrilir, oda ısısında 5-10 dakika inkübe edilir.
- +4 °C'de 12,000 g'de 10 dakika santrifüj yapılır ve sıvı faz uzaklaştırılır.
- Her bir santrifüj tüpüne 1 ml %75'lik etanol eklenir, 3 saniye vortekslenir. +4 °C'de 7,500 g'de 5 dakika santrifüj yapılır ve sıvı faz uzaklaştırılır.
- Alkolü RNA'dan uzaklaştırmak için 5-10 dakika oda ısısında kurumaya bırakılır.
- Pellet 0,25 ml RNaz-free su ile çözülür ve 55-60 °C'de 10-15 dakika inkübe edilir. İzole edilmiş RNA -80 °C'de 1 yıl süre ile depolanabilir.

### 3.2.3. Agaroz Jelde RNA'ların Kontrolü

#### 3.2.3.1. Agaroz Jelin Hazırlanması

Çalışmamızda, RNA örnekleri için uygun konsantrasyon olarak % 1.5'luk agaroz jel kullanıldı.

- 100ml %1.5 agaroz jel için 1,5 gr agaroz tartılır.
- 100ml 0.5X TEB ile karıştırılarak kaynatılır.
- Homojen hale gelen karışıma 5 µl EtBr(Etidyum bromür) eklenerek jel küvetine dökülür ve kuyuları oluşturacak tarak üzerine takılır.
- Jel donduğunda kullanıma hazırdır.

#### 3.2.3.2. Agaroz Jelde Örnekleri Yürütme İşlemi

Elde edilen RNA'lardan 6-7 µl örnek 0.5 µl BFB (brom fenol mavisi) ile karıştırılır ve jel üzerinde bulunan kuyucuklara yüklenir. 150 volt akımda 3 cm kadar yürütülür ve UV altında görüntülenir.

#### 3.2.4. RNA'nın Spektrofotometre ile Ölçülmesi

Elde edilen RNA'ların spektrofotometre ile ölçümleri yapılır ve RNA konsantrasyonu yaklaşık 120 ng/µl olacak şekilde ayarlanır.

#### 3.2.5. RNA'dan cDNA Sentezi

Gerçek-Zamanlı PZR için cDNA kalıbı Ters Transkriptaz enzimi kullanılarak RNA'dan sentezlenir.

**Tablo 3-2: Termal döngü reaksiyon koşulları**

Döngü	Sıcaklık (C <sup>0</sup> )	Süre
1	80	3 dk.
1	37	90 dk.
1	94	2 dk.

0,5 µl'lik PZR tüplerine 5 µl RNA, 1 µl Random Hexamer ve 6 µl dH<sub>2</sub>O eklenerek pipetlenir ve termal döngü cihazında ilk çevrimin bitiminde buza alınarak program dondurulur. Üzerine 4 µl 5X Reaksiyon tamponu, 1 µl RiboLock RNase inhibitör (20 U/µl), 2 µl 10Mm dNTP mix ve 1 µl RevertAid M-MuLV Ters Transcriptase (200 U/µl) eklenerek tekrar termal döngü cihazına konur ve program devam ettirilir. Elde edilen cDNA'lar -80 °C'de 1 yıl süre ile saklanabilir.

### 3.2.6. Gerçek-Zamanlı PZR

Gerçek-Zamanlı PZR'da oluşan ürün miktarı reaksiyon boyunca oluşan ürün miktarıyla orantılı olarak artan floresan boya ve problemlerin verdiği sinyalin izlenmesiyle değerlendirilir.

Çalışmamızda, cDNA'nın kontrolü amacıyla referans gen olarak *ACTB* kullanıldı. Sonuçları hem referans, hem de hedef genlerin birlikte çoğaltıldığı multipleks PZR deneylerinde elde edilen nicel ölçümlere göre değerlendirildi.

Kullandığımız primer dizileri:

#### *FOXO3A* geni

Forward: 5'-cttcaaggataagggcgaca-3' 20 bp GC içeriği %50

Reverse: 5'-cgactatgcagtgacaggttg-3' 21 bp GC içeriği %52.3

#### *ACTB* geni

Forward: 5'-accgagcgcggctacag-3' 17 bp

Reverse: 5'-cttaatgtcacgcacgattcc-3' 22 bp

### Gerçek-Zamanlı PZR Karışımı

- Master Mix → 10 µl
- UPL Prob → 0,4 µl
- Aktin Prob → 0,4 µl
- F Primer → 0,5 µl
- R Primer → 0,5 µl



- Aktin Primer → 0,5 µl
- cDNA → 3 µl
- dH<sub>2</sub>O → 4,7 µl

Toplam Reaksiyon Hacmi → 20 µl

**Tablo 3-3: Gerçek-zamanlı PZR koşulları**

Döngü	Sıcaklık (C <sup>0</sup> )	Süre
1	95	10 dk.
	95	10 sn.
45	60	30 sn.
	72	1 sn.
1	40	10sn

### 3.2.7. İstatistiksel Değerlendirme

#### 3.2.7.1. 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> Testi

Her örneğin ΔC<sub>T</sub> değeri aşağıdaki formülle belirlendi :

$$\Delta C_T = C_T (\text{hedef gen}) - C_T (\text{referans gen})$$

Örneklerin ΔC<sub>T</sub> değerleri hesaplandıktan sonra ΔΔC<sub>T</sub> farkları aşağıdaki şekilde bulundu :

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{hasta}) - \Delta C_T (\text{sağlıklı})$$

Sonuçlar Comperative C<sub>T</sub> yöntemi ile hesaplandı. Bu yöntemde önce hasta ve kontrol grubu örneklerinin ortalama C<sub>T</sub> değerleri hem *ACTB* hem de *FOXO3A* için ayrı ayrı hesaplandı. Daha sonra *FOXO3A* ortalama değerinden *ACTB* ortalama değeri çıkartılarak hasta ve kontrol gruplarının ayrı ayrı ΔC<sub>T</sub> (Delta C<sub>T</sub>) değerleri ve bunlara ait standart sapma değerleri hesaplandı. Daha sonra kontrol grubu ΔC<sub>T</sub> değeri hasta grubu

$\Delta C_T$  değerinden çıkarılarak  $\Delta\Delta C_T$  değeri bulundu. Bu değer  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  formülüne uygulanarak hasta grubuna ait *FOXO3A* ifadesinin kontrol grubuna göre kaç kez artmış ya da azalmış olduğu *ACTB* gen ifadesi referans olarak kullanılarak belirlendi.

### 3.2.7.2. Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA)

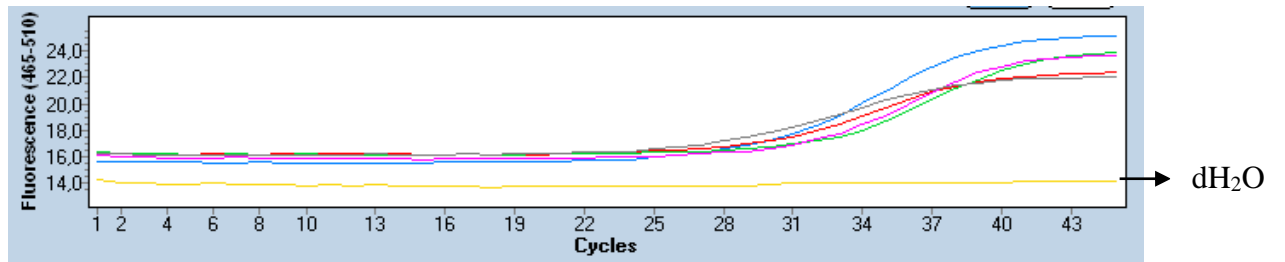
Karşılaştırması yapılacak gruplar arasındaki farkın belirlenmesinde ve grup sayısının ikiden fazla olması durumunda kullanılan istatistik yöntemlerden biri varyans analizidir (ANOVA; Analysis of Variance). Ancak, varyans analizinin yapılabilmesi için homojenlik, normallik ve toplanabilirlik gibi bir takım varsayımlar gerekmektedir. Varyans analizi ile gruplar arasındaki farkın anlamlılığı incelenir. Yapılan çalışmada, verilerin zmlenmesinde ANOVA testi kullanılmıştır. Parametrik bir test istatistiği olan ANOVA, genel anlamda bir farkın mevcut olup olmadığını tespit etmeye çalışırken, farklılığın hangi grup ya da gruplardan kaynaklandığını araştırmaz. Gruplararası farkların gözlendiği durumda, farklılığın hangi gruptan kaynaklı olduğunu tespit eden istatistik post-hoc olarak bilinmektedir. Gruplar içerisinde farklılık yaratan grup ya da grupları tespit etmek üzere birçok post-hoc istatistiği bulunmakla birlikte, bunların doğru bir şekilde seçimi bazı varsayımlar gerektirmektedir. Post-hoc'lara ait istatistik türlerinin seçiminde, önemli unsurlardan olan gruplararası varyansın eşit olup olmama özelliği önem taşımaktadır. Çalışma, gruplar arasında ortaya çıkan farkın kaynağını araştırmak amacıyla yaygın olarak kullanılan Tukey HSD, Bonferroni, Tamhane ve Dunnett-t testleri ile sınırlandırılmış, karşılaştırmalar bu testler arasında yapılmıştır.

#### 4. BULGULAR

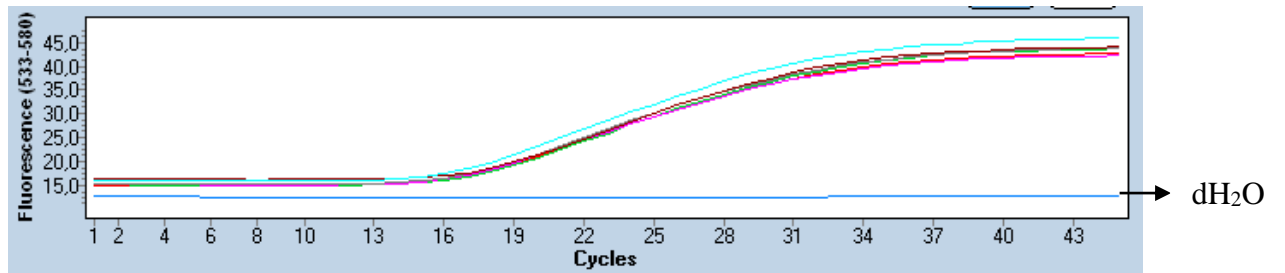
Tez çalışmamızda, 2009-2010 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı'na başvuran Akut Miyeloid Lösemi (AML) 50 ve Kronik Miyeloid Lösemi (KML)'li 51 hastanın kan örnekleri kullanıldı. Kontrol grubu olarak yaş ve cinsiyet bakımından hastalara uygun olarak seçilmiş 34 sağlıklı bireyin periferik kanları kullanıldı.

Hastaların periferik kan ve kemik iliği örneklerinden RNA elde edildi. Çalışmamızda kullanılan RNA örnekleri önce %1,5 agaroz jel elektroforezi ile değerlendirildi ve spektrofotometrik ölçümlere göre RNA konsantrasyonu yaklaşık 120 ng/μl olacak şekilde ayarlandı.

Çalışmada, akut ve kronik miyeloid lösemilerde, çatal başlı transkripsiyon faktör ailesinde yer alan *FOXO3A* geninin ifade düzeyi Gerçek-Zamanlı PZR yöntemiyle incelendi. Bunun için her hastaya ait RNA örneklerinden hazırlanan cDNA'lar, incelenmek istenen hedef genlere uygun primerler yardımıyla Gerçek-Zamanlı PZR sisteminde çoğaltıldı. Çalışmamızda gen ifadesi analizi için gereken normalizasyon işlemi ve cDNA'nın kontrolü amacıyla referans gen olarak *ACTB* geni kullanıldı. Light cyclers 480 cihazında deneyler sonucunda elde edilen ifade eğrilerinin bir örneği Şekil 4-1 ve 4-2'de görülmektedir.



Şekil 4-1: Hastalarda *FOXO3A* geni'ne ait gerçek-zamanlı PZR eğrileri.



Şekil 4-2: Sağlıklı kontrollerde *FOXO3A* geni'ne ait gerçek-zamanlı PZR eğrileri.

#### 4.1. Gen İfadelerinin Değerlendirilmesi

Her örnek için araştırılan genin ve referans genin çoğalmasını belirleyen  $C_T$  değerleri bulundu.  $C_T$  değerleri elde edilen her örnek için hedef gen ile referans gen arasındaki farklar hesaplanarak  $\Delta C_T$  değerleri bulundu. Daha sonra sağlıklı grupta her gene ait ortalama  $\Delta C_T$  değerleri hesaplandı. Her örnek için elde edilen  $\Delta C_T$  değerinden sağlıklı gruba ait ortalama  $\Delta C_T$  değerinin çıkartılmasıyla ilgili örneğe ait  $\Delta \Delta C_T$  değeri bulundu. Daha sonra  $2^{-\Delta \Delta C_T}$  formülü yardımıyla ifade düzeyleri hesaplandı.  $\Delta C_T$ ,  $\Delta \Delta C_T$  ve ifade düzeylerine ilişkin değerler Tablo 4-2 ve Tablo 4-3’de verilmektedir.

**Tablo 4-1: Hasta grubunda araştırılan *FOXO3A* geni’ne ait  $C_T$ ,  $\Delta C_T$ ,  $\Delta \Delta C_T$ ,  $2^{-\Delta \Delta C_T}$  değerleri**

Hasta no	<i>FOXO3A</i> Hedef $C_T$	<i>FOXO3A</i> Referans $C_T$	$\Delta C_T$	$\Delta \Delta C_T$	$2^{-\Delta \Delta C_T}$	Hastalık
1	28,99	18,67	10,32	-2,14	4,41	KML
2	32,08	18,84	13,24	0,78	0,59	KML
3	29,75	17,09	12,66	0,2	0,88	KML
4	29,94	22,74	7,2	-5,26	38,32	KML
5	34,48	22,04	12,45	-0,03	1,02	KML
6	33,07	21,15	11,93	-0,55	1,46	KML
7	35,05	22,52	12,54	0,07	0,96	KML
8	31,51	20,85	10,67	-1,8	3,49	KML
9	32,81	26,23	6,58	-5,88	58,9	KML
10	32,99	21,91	11,09	-1,38	2,61	KML
11	32,28	20,66	11,63	-0,85	1,8	KML
12	32,61	23,59	9,03	-3,43	10,78	KML
13	28,52	17,3	11,22	-1,24	2,37	KML
14	28,57	20,09	8,49	-3,98	15,78	KML
15	27,08	16,98	10,1	-2,37	5,17	KML
16	29,52	18,78	10,74	-1,72	3,3	KML
17	26,92	15,94	10,99	-1,48	2,79	KML
18	26,05	16,61	9,45	-3,02	8,12	KML
19	30,64	21,91	8,74	-3,72	13,18	KML
20	27,19	17,3	9,9	-2,57	5,94	KML
21	29,41	18,78	10,63	-1,84	3,59	KML
22	27,9	17,91	10	-2,46	5,51	KML
23	31,47	19,92	11,56	-0,91	1,88	KML
24	27,51	18,94	8,58	-3,88	14,73	KML
25	33,35	25,72	7,64	-4,83	28,45	KML
26	31,26	22,99	8,28	-4,19	18,26	KML
27	23,59	16,49	7,1	-5,36	41,07	KML
28	24,29	17,17	7,12	-5,35	40,79	KML
29	26,67	16,89	9,78	-2,68	6,41	KML

30	19,86	16,84	3,03	-9,44	694,59	KML
31	29,34	18,29	11,06	-1,4	2,64	KML
32	26,5	18,94	7,57	-4,89	29,66	KML
33	22,39	17,67	4,72	-7,74	213,79	KML
34	27,25	17,92	9,34	-3,13	8,76	KML
35	27,96	14,3	13,66	1,19	0,44	KML
36	30,89	18,29	12,6	0,14	0,91	KML
37	31,64	23,05	8,6	-3,87	14,63	KML
38	29,8	18,48	11,32	-1,14	2,21	KML
39	32,74	22,95	9,8	-2,66	6,33	KML
40	32,63	23,58	9,06	-3,41	10,63	KML
41	30,87	21,4	9,48	-2,99	7,95	KML
42	25,9	15,61	10,3	-2,17	4,51	KML
43	26,78	17,94	8,85	-3,62	12,3	KML
44	27,4	19,68	7,72	-4,74	26,73	KML
45	25,83	16,7	9,14	-3,33	10,06	KML
46	28,99	18,16	10,84	-1,63	3,1	KML
47	32,32	21,19	11,14	-1,33	2,52	KML
48	33,78	22,94	10,84	-1,62	3,08	KML
49	32,61	20,43	12,18	-0,29	1,22	KML
50	35,83	22,61	13,23	0,76	0,6	KML
51	35,08	27,96	7,12	-5,34	40,51	KML
52	29,73	18,79	10,95	-1,52	2,87	AML
53	37,69	26,86	10,84	-1,63	3,1	AML
54	24,72	24,84	-0,12	-2,43	5,39	AML
55	25,39	15,93	9,47	-3	8	AML
56	27,7	16,89	10,81	-1,65	3,14	AML
57	29,06	19,85	9,21	-3,26	9,58	AML
58	29,93	17,68	12,25	-0,22	1,16	AML
59	33,36	21,95	11,42	-1,05	2,08	AML
60	30,06	18,36	11,7	-0,77	1,7	AML
61	29,49	20,75	8,74	-3,72	13,18	AML
62	25,73	16,89	8,84	-3,63	12,39	AML
63	25,64	20,07	5,57	-6,89	118,61	AML
64	28,54	18,97	9,58	-2,89	7,42	AML
65	26,46	18,41	8,05	-4,41	21,26	AML
66	30,36	17,78	12,59	0,12	0,93	AML
67	23,34	18,28	5,06	-7,41	170,08	AML
68	28,49	20,8	7,7	-4,77	27,29	AML
69	25,79	16,44	9,35	-3,12	8,7	AML
70	24,64	16,9	7,74	-4,72	26,36	AML
71	25,48	16,77	8,71	-3,75	13,46	AML
72	27,13	16,69	10,45	-2,02	4,06	AML
73	27,39	17,63	9,77	-2,7	6,5	AML

74	33,87	20,45	13,43	0,96	0,52	AML
75	30,95	19,66	11,29	-1,17	2,26	AML
76	34,24	20,95	13,3	0,83	0,57	AML
77	33,56	19,57	14	1,54	0,69	AML
78	38,97	22,95	16,02	3,56	0,09	AML
79	37,74	23,98	13,77	1,3	0,41	AML
80	36,94	25,37	11,57	-0,9	1,86	AML
81	35,74	25,02	10,73	-1,74	3,35	AML
82	37,53	25,26	12,28	-0,19	1,14	AML
83	33,68	21,5	12,19	-0,28	1,21	AML
84	27,65	14,4	13,25	0,78	0,59	AML
85	31,7	23,3	8,4	-4,06	16,68	AML
86	25,52	16,96	8,56	-3,91	15,04	AML
87	29,57	20,93	8,64	-3,82	14,13	AML
88	30,4	20,82	9,58	-2,88	7,37	AML
89	29,15	21,28	7,88	-4,59	24,09	AML
90	28,49	22,99	5,51	-6,95	123,64	AML
91	26,09	16,5	9,6	-2,86	7,27	AML
92	26,99	17,64	9,36	-3,1	8,58	AML
93	29,7	19,75	9,95	-2,51	5,7	AML
94	25,76	17,61	8,15	-4,31	19,84	AML
95	34,61	25,23	9,38	-3,09	8,52	AML
96	27,24	17,91	9,33	-3,14	8,82	AML
97	28,21	18,48	9,73	-2,73	6,64	AML
98	26,74	17,21	9,54	-2,93	7,63	AML
99	25,32	17,82	7,5	-4,96	31,13	AML
100	31,29	19,97	11,32	-1,14	2,21	AML
101	31,72	19,25	12,48	0,01	1	AML

**Tablo 4-2: Sağlıklı kontrol grubunda araştırılan *FOXO3A* geni'ne ait  $C_T$ ,  $\Delta C_T$ ,  $\Delta\Delta C_T$ ,  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  değerleri**

Hasta no	<i>FOXO3A</i> Hedef $C_T$	<i>FOXO3A</i> Referans $C_T$	$\Delta C_T$	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$	Hastalık
1	28,1	16,4	11,71	-0,77	1,7	KONTROL
2	28,4	16,08	12,33	-0,15	1,11	KONTROL
3	29,12	16,62	12,51	0,04	0,98	KONTROL
4	32,38	18,2	14,19	1,73	0,31	KONTROL
5	28,66	16,69	11,97	-0,49	1,41	KONTROL
6	25,33	16,23	9,11	-3,36	10,27	KONTROL
7	29,73	17,61	12,12	-0,35	1,27	KONTROL
8	31,06	18,32	12,75	0,28	0,83	KONTROL
9	32,29	18,3	14	1,53	0,35	KONTROL
10	29,72	17,68	12,04	-0,43	1,34	KONTROL
11	26,86	16,04	10,83	-1,64	3,12	KONTROL

12	29,98	16,93	13,06	0,6	0,66	KONTROL
13	29,81	16,51	13,3	0,84	0,56	KONTROL
14	29,93	16,78	13,16	0,7	0,62	KONTROL
15	32,28	18,95	13,34	0,87	0,55	KONTROL
16	27,62	15,67	11,95	-0,52	1,43	KONTROL
17	28,2	16,3	11,91	-0,56	1,48	KONTROL
18	28,52	15,92	12,6	0,14	0,91	KONTROL
19	27,36	15,85	11,52	-0,96	1,94	KONTROL
20	32,78	21,9	10,88	-1,58	2,99	KONTROL
21	29,69	16,69	13,01	0,55	0,69	KONTROL
22	27,5	15,33	12,17	-0,31	1,24	KONTROL
23	27,83	15,69	12,15	-0,32	1,25	KONTROL
24	25,44	16,09	9,35	-3,12	8,7	KONTROL
25	27	14,72	12,28	-0,2	1,15	KONTROL
26	30,57	16,27	14,3	1,84	0,28	KONTROL
27	30,45	16,52	13,94	1,48	0,36	KONTROL
28	32,66	17,02	15,65	3,18	0,12	KONTROL
29	30,4	18,07	12,34	-0,14	1,1	KONTROL
30	30,63	17,4	13,23	0,76	0,6	KONTROL
31	34,44	20,97	13,47	1,01	0,5	KONTROL
32	33,76	22,09	11,67	-0,8	1,73	KONTROL
33	31,99	18,46	13,54	1,07	0,48	KONTROL
34	31,76	20,42	11,34	-1,12	2,18	KONTROL

KML hasta grubunda *FOXO3A* gen ifadesinin 44 (%86) hastada arttığı, 7 (%14) hastada ise azaldığı gözlemlendi. AML hasta grubunda ise *FOXO3A* geni'nin ifadesinin 42 (%84) hastada arttığı, 8 (%16) hastada ise azaldığı görüldü. KML'li hastalarda kontrol grubuna göre *FOXO3A* ifadesinde yaklaşık 6 kat artış görülürken AML grubunda ise yaklaşık 5 kat artış gözlemlendi. Bu değerlerin ortalamaları baz alınarak yapılan hesaplamalar Tablo 4-3'de verilmiştir.

**Tablo 4-3: KML, AML ve Sağlıklı kontrol gruplarına ait  $C_T$ ,  $\Delta C_T$ ,  $\Delta\Delta C_T$ ,  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  genel ortalama değerleri**

	<i>FOXO3A</i> $C_T$	<i>ACTB</i> $C_T$	$\Delta C_T$	$\Delta\Delta C_T$	$2^{-\Delta\Delta C_T}$
KML	29,65	19,82	9,82	-2,64	6,21
AML	29,70	19,81	9,90	-2,35	5,09
KONTROL	29,77	17,3	12,46	0	1

SPSS v15.0 programı ile yapılan istatistiksel analizlere göre; araştırma kapsamında değerlendirilen gruplar arasında homojenlik (Levene Testi  $F=4,69$ ,  $P>0,05$ ) (Tablo 4.4) söz konusu olduğundan, dağılımın normallik varsayımını (Kolmogorov-Smirnov= $0,533$  (KML);  $0,738$  (AML) ve  $0,591$  (Kontrol)  $p>0,05$ ) (Tablo 4.5) yerine getirmesinden ve üç grup olmasından dolayı, verilerin çözümlenmesinde ANOVA testi kullanılmıştır (Tablo 4-6). ANOVA testi ile yapılan değerlendirmeye göre hasta ve kontrol grupları arasındaki  $\Delta C_T$  değerleri baz alınarak yapılan hesaplamalarda *FOXO3A* ifade düzeylerinin hastalarda sağlıklı kontrollere göre istatistiksel açıdan anlamlı [ $F(2,132)=17,54$ ,  $p< 0,05$ ] olduğu görülmüştür. Gruplar arasındaki yaş dağılımları arasında ise istatistiksel açıdan anlamlı [ $F(2,132)=0,25$ ,  $p> 0,05$ ] bir fark görülmemiştir (Tablo 4-6). Tamhane post-hoc test sonuçlarına göre; KML ve AML [ $F(2,132)=17,54$ ,  $p>0,05$ ] hasta grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmazken; KML ve Kontrol [ $F(2,132)=17,54$ ,  $p<0,05$ ] ile AML ve Kontrol [ $F(2,132)=17,54$ ,  $p<0,05$ ] grupları arasında istatistik açıdan anlamlı fark bulunduğu görülmüştür (Tablo 4-7).

**Tablo 4-4: Değişkenlerin homojenlik testi**

	Levene İstatistiği	df1	df2	Sig.
$\Delta C_T$	4,69	2	132	0,011
Yaş	3,199	2	132	0,044

**Tablo 4-5: Kolmogorov-Smirnov testi**

		yaş	$\Delta C_T$	
KML	N	51	51	
	Normal Parametreler <sup>a,b</sup>	Ortalama	48,51	9,82
		Std. Sapma	15,82	2,18
	En Aşırı Farklar	Mutlak	0,12	0,07
		Pozitif	0,09	0,04
		Negatif	-0,12	-0,07
	Kolmogorov-Smirnov Z		0,86	0,53
Asymp. Sig. (2-tailed)		0,45	0,94	
AML	N	50	50	
	Normal Parametreler <sup>a,b</sup>	Ortalama	46,8	9,90
		Std. Sapma	12,88	2,67
	En Aşırı Farklar	Mutlak	0,12	0,10
		Pozitif	0,12	0,08



		Negatif	-0,07	-0,10	
		Kolmogorov-Smirnov Z	0,87	0,74	
		Asymp. Sig. (2-tailed)	0,44	0,65	
Kontrol		N	34	34	
	Normal Parametreler <sup>a,b</sup>	Ortalama	46,41	12,46	
		Std. Sapma	16,62	1,32	
	En Aşırı Farklar	Mutlak	0,14	0,10	
		Pozitif	0,14	0,07	
		Negatif	-0,14	-0,10	
			Kolmogorov-Smirnov Z	0,84	0,59
			Asymp. Sig. (2-tailed)	0,49	0,88

Tablo 4-6: ANOVA testi

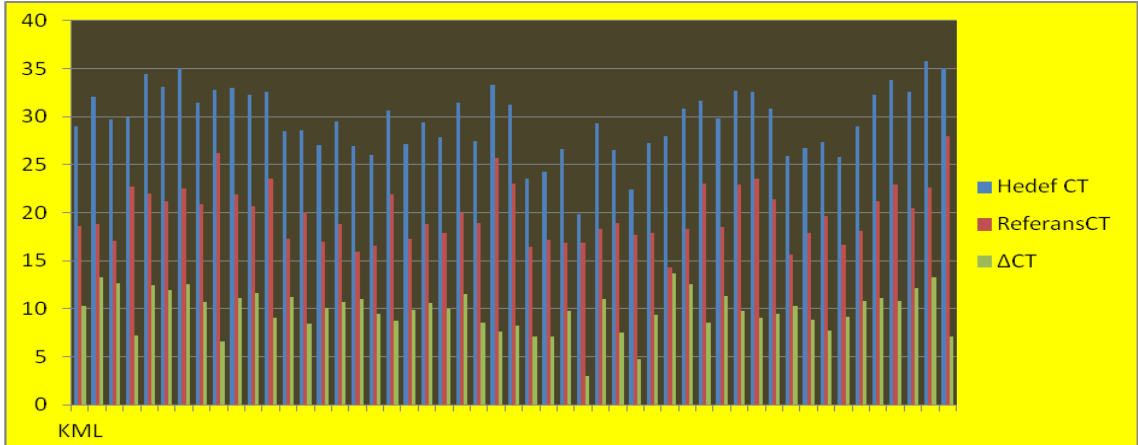
ANOVA						
		KARELERİN TOPLAMI	DF	ORTALAMALARIN KARESİ	F	SIG.
$\Delta C_T$	GRUPLAR ARASI	171,36	2	85,68	17,54	,000
	GRUP İÇİ	644,62	132	4,88		
	TOPLAM	815,98	134			
YAŞ	GRUPLAR ARASI	113,66	2	56,83	,25	,778
	GRUP İÇİ	29758,98	132	225,45		
	TOPLAM	29872,64	134			

Tablo 4-7: Post-hoc test istatistiği

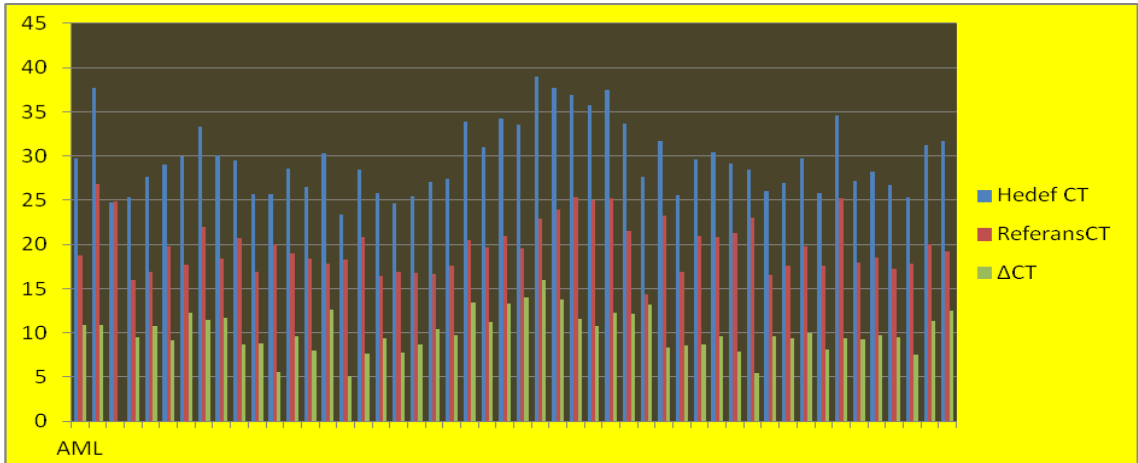
Bağımlı		(I) grup	(J) grup			
Değişken				Ortalama Farkı (I-J)	Std. Hata	Sig.
$\Delta C_T$	Tukey HSD	KML	AML	-0,08	0,44	0,982
			Kontrol	-2,63 <sup>*</sup>	0,49	0,00
		AML	KML	0,08	0,44	0,982
			Kontrol	-2,55	0,49	0,00

		Kontrol	KML	2,63	0,49	0,00
			AML	2,55	0,49	0,00
	Bonferroni	KML	AML	-0,08	0,44	1
			Kontrol	-2,63	0,49	0,00
		AML	KML	0,08	0,44	1
			Kontrol	-2,55	0,49	0,00
		Kontrol	KML	2,63	0,49	0,00
			AML	2,55 <sup>*</sup>	0,49	0,00
	Tamhane	KML	AML	-0,08	0,48	0,998
			Kontrol	-2,63 <sup>*</sup>	0,38	0,00
		AML	KML	0,08	0,48	0,998
			Kontrol	-2,55	0,44	0,00
		Kontrol	KML	2,63	0,38	0,00
			AML	2,55	0,44	0,00
Dunnett t (2-sided) <sup>a</sup>	KML	Kontrol	-2,63	0,49	0,00	
	AML	Kontrol	-2,55	0,49	0,00	

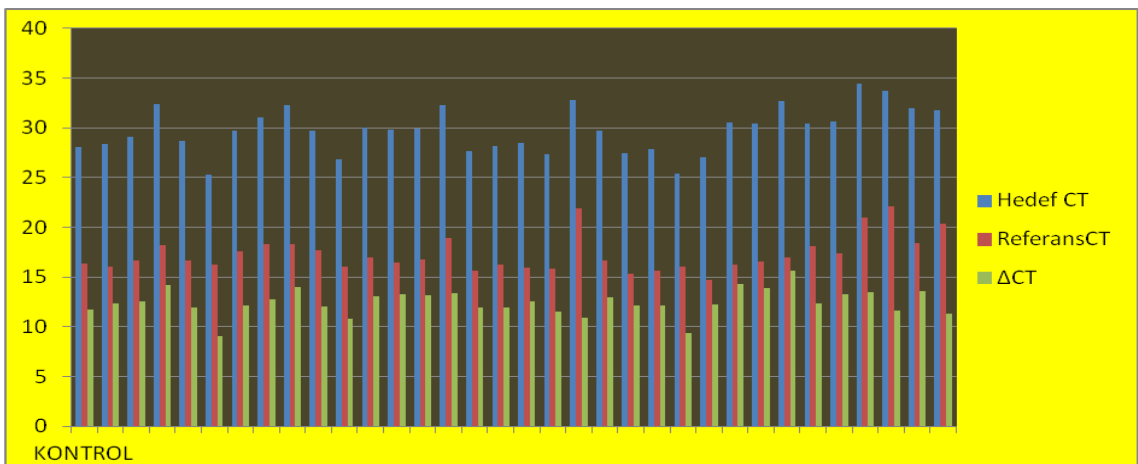
Yapılan istatistiksel analizleri daha iyi ifade etmesi açısından SPSS v15.0 ve Microsoft Excel programları kullanılarak KML, AML ve Kontrol gruplarında hedef  $C_T$ , Referans  $C_T$  ve  $\Delta C_T$  değerlerinin beraber gösterildiği grafikler Şekil 4-3, 4-4, 4-5’de görülmektedir.  $\Delta C_T$  ortalama değerlerinin dağılımı Şekil 4-6’da ve  $2^{-\Delta \Delta C_T}$  ortalama değerleri ayrı ayrı olarak Şekil 4-7’de verilmiştir. Ayrıca; KML, AML ve Kontrol gruplarında *FOXO3A* ifade düzeyleri de Şekil 4-8’de görülmektedir.



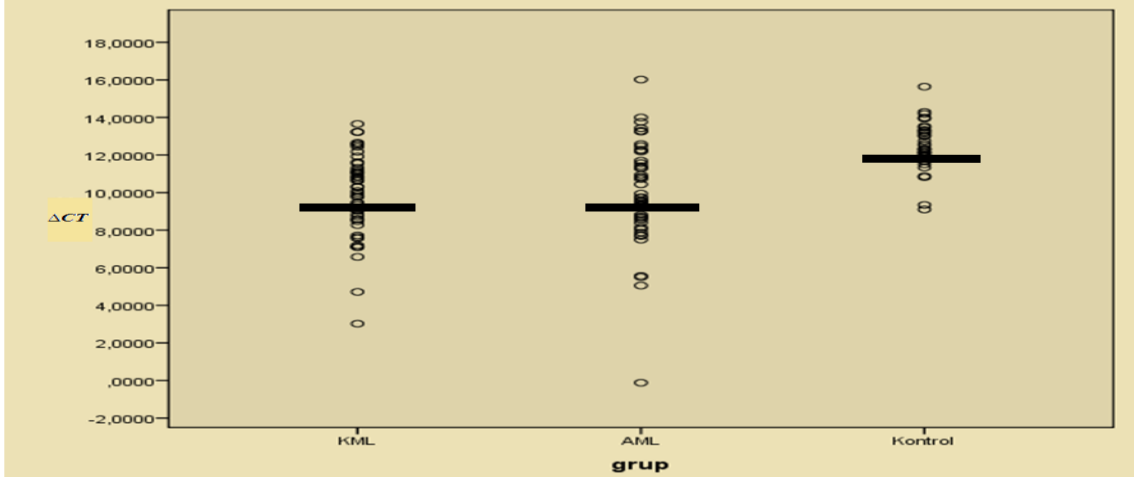
Şekil 4-3: KML hastalarında hedef  $C_T$ , referans  $C_T$  ve  $\Delta C_T$  değerleri.



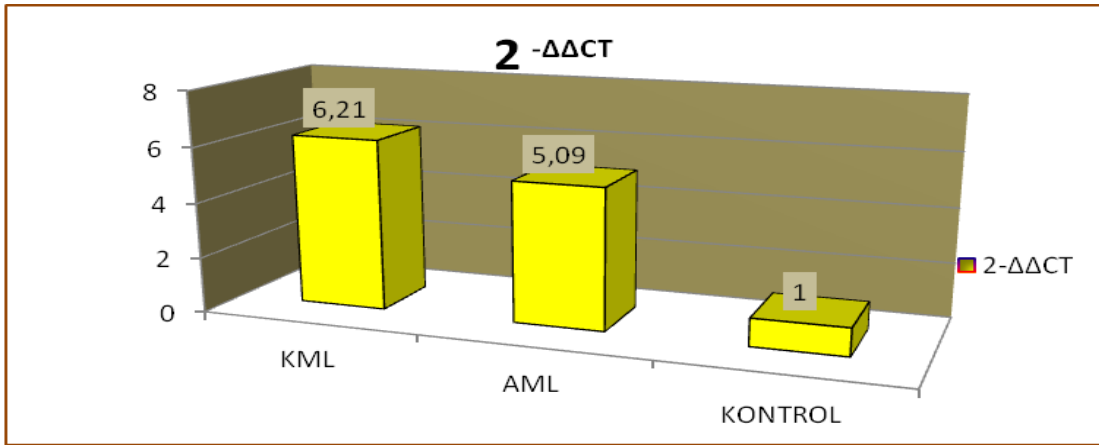
Şekil 4-4: AML hastalarında hedef  $C_T$ , referans  $C_T$  ve  $\Delta C_T$  değerleri.



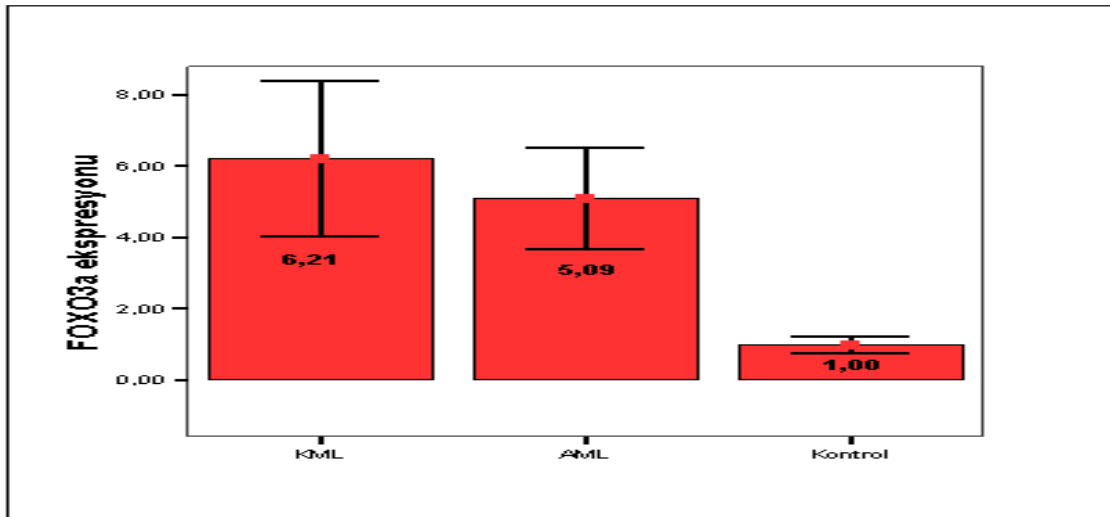
Şekil 4-5: Sağlıklı kontrollerde hedef  $C_T$ , referans  $C_T$  ve  $\Delta C_T$  değerleri.



Şekil 4-6: KML, AML ve Kontrol gruplarının  $\Delta C_T$  ortalama değerleri.



Şekil 4-7: KML, AML ve Kontrol gruplarının gen ifade düzeyleri.



Şekil 4-8: KML, AML, Kontrol gruplarında FOXO3A ifade düzeylerini ve standart sapmalarını gösteren çubuk grafiği.

Tablo 4-8’de ise KML, AML ve sağlıklı kontrol grupları için yaş ve  $\Delta C_T$  değerlerinin ortalama, standart sapma, medyan, minimum ve maksimum değerleri belirtilmiştir.

**Tablo 4-8: KML, AML ve Sağlıklı kontrol grupları için yaş, hedef  $C_T$ , referans  $C_T$  ve  $\Delta C_T$  değerlerinin ortalama, standart sapma, medyan, minimum ve maksimum değerleri**

		Grup		
		KML	AML	Kontrol
Yaş	Ortalama	48,51	46,80	46,41
	Standart Sapma	15,82	12,88	16,62
	Geçerli N	51	50	34
	Medyan	50,00	45,00	50,00
	Minimum	14,00	19,00	21,00
	Maksimum	70,00	90,00	70,00
Hedef $C_T$	Ortalama	29,64	29,70	29,77
	Standart Sapma	3,42	4,00	2,28
	Geçerli N	51	50	34
	Medyan	29,74	29,10	29,77
	Minimum	19,86	23,33	25,32
	Maksimum	35,82	38,96	34,43
Referans $C_T$	Ortalama	19,82	19,80	17,31
	Standart Sapma	2,94	2,94	1,79
	Geçerli N	51	50	34
	Medyan	18,93	19,40	16,68
	Minimum	14,30	14,39	14,71
	Maksimum	27,95	26,85	22,09
$\Delta C_T$	Ortalama	9,82	9,90	12,46
	Standart Sapma	2,18	2,67	1,32
	Geçerli N	51	50	34
	Medyan	9,10	9,59	12,32
	Minimum	3,02	-,12	9,10
	Maksimum	13,65	16,02	15,64

## 5. TARTIŞMA

Lösemiler hematopoetik hücrelerin malin transformasyonu sonucu oluşan heterojen bir neoplastik hastalıklar grubudur. Köken aldıkları hücre tipine göre lenfoid ve miyeloid; sağkalım ve olgunlaşma özelliklerine göre de akut veya kronik olarak iki ana gruba ayrılırlar [1].

Akut lösemiler miyeloid ya da lenfoid hücrelerinin kan, kemik iliği ve diğer dokuların infiltrasyonu ile karakterize bir hastalık grubudur. Akut lösemilerde de diğer lösemilerde olduğu gibi onkogen aktivasyonu ve tümör baskılayıcı gen inaktivasyonu gibi çeşitli mekanizmaların etkili olduğu bilinmektedir [20-21].

Kronik lösemiler farklılaşmanın tüm aşamalarında miyeloid seri hücrelerinin artışı ile ortaya çıkan klonal hematopoetik bir kök hücre hastalığıdır [46]. İyonizan radyasyonun kronik lösemi riskini arttırabileceği bildirilmiştir. Diğer çevresel ajanların ise herhangi bir etkisi gösterilmemiştir [51-52].

Çatal başlı transkripsiyon faktörleri birçok sinyal yolağı ile bağlantılı olup hedef genleri aktifleştirerek veya baskılayarak apoptoz, hücre döngüsünün durdurulması, stres direnci, glikoz metabolizması, hücresel farklılaşma, gelişim ve tümör baskılanması gibi birçok fizyolojik ve patolojik aşamalarda rol alırlar [6]. Büyüme faktörleri, besinler, oksidatif stres ve radyasyon gibi çevresel etkenler FOXO proteinlerinin aktivitesini hem pozitif hem de negatif yönde etkileyebilirler. Ayrıca FOXO transkripsiyon faktörlerinin aktiviteleri fosforillenme, asetillenme, metillenme, ubiquitinlenme, hücreler arası yerleşim ve doğrudan protein-protein etkileşimi gibi birçok çevirim sonrası modifikasyonla da kontrol edilir [127]. *FOXO3A* gen ifade düzeyinin tümör hücrelerinde azalması ile apoptozu baskılayarak tümör oluşumuna katkıda bulunması bir tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanmasına ve bu nedenle kanser terapisi için doğrudan ya da dolaylı hedef olarak düşünülmesine yol açmıştır [128]. Her ne kadar *FOXO3A*'nın kanser terapisinde kritik rol alabileceği düşünülse de son çalışmalar FOXO3A proteinlerinin hedef olarak kullanılmasının potansiyel geri bildirim mekanizmaları ile karmaşık bir hal alabileceğini göstermiştir [12]. Bununla beraber *FOXO3A*'nın stres koşullarında hücrenin hayatta kalmasını sağladığını kanıtlayan bazı çalışmalar vardır [99, 129]. Bir yayında *FOXO3A*'nın matriks metalloproteinazlar ile

kanser hücrelerinin yayılımına katkıda bulunduğu belirtilmiştir [130]. Bu durum *FOXO3A*'nın kanserdeki rolünün oldukça karmaşık olabileceğinin göstergesidir. *FOXO3A* ifadesi sınırlı sayıda tümör grubunda çalışılmış olduğu için tümör davranışı ile *FOXO3A* ifadesi arasındaki ilişki henüz netleşmemiştir.

Akut miyeloid lösemi ve kronik miyeloid lösemi hastalarının kan ve kemik iliği örnekleri kullanılarak yapmış olduğumuz çalışmamızda bir transkripsiyon faktörü olan *FOXO3A* geninin hematolojik tümörlerdeki ifade düzeyleri sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. İncelenen hasta gruplarında *FOXO3A* geninin ifadesinin gerek KML gerekse AML'li hastalarda anlamlı düzeyde arttığı görülmüştür.

Literatürler incelendiğinde akut ve kronik miyeloid lösemili hastalarda *FOXO3A* mRNA ifade düzeylerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ayrıca *FOXO3A* geninin ifade düzeylerinin hücre kültüründe incelendiği çalışmaların dışında kanda yapılmış bir tek çalışma mevcuttur [131]. *FOXO3A* geninin iki hasta grubunda da eş zamanlı olarak karşılaştırılması çalışmamızın özgün yönünü oluşturmaktadır. Hücre kültürü ile yapılmış birçok çalışmada kanser hücrelerinde *FOXO3A* proteininin etkisi ve ilişkili olduğu yollar araştırılırken az sayıda çalışmada, gen ifadesi hakkında bilgiye rastlanmaktadır. Bu nedenle bulmuş olduğumuz sonuçlar literatür verileri ile anlamlı bir şekilde karşılaştırılamamıştır. Diğer yandan, tümör baskılayıcı rolü olduğu bilinen *FOXO3A* geninin ifadesinin hasta gruplarında sağlıklı kontrollere göre artması genin baskılama fonksiyonunu tek başına gerçekleştiremediğini düşündürmektedir. *FOXO3A*'nın aşırı anlatımının hangi mekanizmayla meydana geldiği belli değildir. *FOXO3A* geninin fonksiyonunu düzenleyen birçok gen olduğu bilinmektedir. Bu genlerde oluşan bozukluklar da bu genin ifadesinde artışa yol açabilir. Gende oluşan bir mutasyonun da ifadeyi arttırırken proteinin işlevsiz kalmasıyla sonuçlanabilmesi mümkündür. Diğer yandan çalışmada incelenen hastaların tedavi geçmişleri bilinmediğinden *FOXO3A* ifade artışı hastaların almış oldukları kemoterapik ilaç etkileşimleri ile de ilişkili olabilir. Bu nedenle *FOXO3A*'nın anlatımını arttırıcı mekanizmayı tanımlamak önemlidir. Bu amaçla çevirim sonrası mekanizmalar üzerine eğilmek doğru bir yaklaşım olacaktır. FOXO aktivitesinin çevirim sonrası kontrolü ile ilgili kapsamlı çalışmalar yapılmıştır [8, 96, 116, 120, 132-134].

Tzivion ve ark.'ları 2011 yılında yapmış oldukları çalışmada Akt aktivasyonunun, *FOXO3*'ün sitoplazmaya geçmesine yol açtığı; inhibisyonunun ise çekirdek içinde

kalmasına neden olduğu belirtilmiş, Akt fosforillenme bölgesi bulunmayan *FOXO3* mutantlarının çekirdek içinde kaldıkları vurgulanmıştır [113]. Singh ve ark.'larının 2010 yılında yaptıkları çalışmada PP2A inhibitörlerinin, Akt inhibisyonuna yol açarak T32 ve S253 bölgelerinde FOXO3'ün fosforillenmesini engellediği ve FOXO3'ün çekirdeğe tekrar taşınmasıyla transkripsiyonel aktivasyonun sağlandığı belirtilmiştir [112]. Lehtinen ve ark. sitoplazmik FOXO3A'nın MST1 kinazlar tarafından oksidatif strese karşı S207 bölgesinde fosforillenerek yeniden aktifleştirilebildiğini ve çekirdeğe dönerek hücre ölümüne yol açabildiklerini bildirmişlerdir [116]. Yang ve ark.'larının çalışmasında ise, FOXO3'ün ERK-1/2 tarafından fosforile edilerek inaktif duruma geçtiği ve tümör oluşumuna yol açtığı vurgulanmıştır [135]. FOXO3'ün besin eksikliğine karşı AMPK tarafından fosforile edildiğinde hücre içindeki yerleşimini veya DNA bağlanmasını etkilemeden FOXO hedef genlerinin transkripsiyonel aktivitesini pozitif yönde etkilediği gösterilmiştir [136]. Tüm bu veriler FOXO3A ifade artışının aktive edici kinazlar yolu ile gerçekleşebileceğini göstermektedir.

İnsan tümörlerinde tümör baskılayıcı genlerde oluşan metillenmenin önemli bir gen inaktivasyon mekanizmasını oluşturduğu bilinmektedir. Literatürde, FOXO3A geninin lösemilerde metillenme durumu ile ilgili bir bilgi bulunmamaktadır. FOXO1'in PRMT1 tarafından metillendiği ve bu metillenmenin *in vitro* ve *in vivo* koşullarda FOXO1'in Akt tarafından fosforillesini bloke ettiği gösterilmiştir [121]. Ayrıca oksidatif stres, ubikitinlenme ya da MST-1 tarafından fosforillenmenin PI3K-Akt sinyal düzenlenmesinin aksine FOXO'nun çekirdeğe geçişine yol açtığı da vurgulanmıştır. Bu bulgular ışığında düşünüldüğünde metillenmenin FOXO'nun uzun süre çekirdekte tutulumuna ve böylece transkripsiyonel aktivite artışına neden olduğu düşünülebilir.

Literatürde Santamaria ve ark.'larının bir çalışması sonuçlarımızla uyumluluğu açısından dikkat çekmektedir. Bu çalışmada yüksek FOXO3A ifadesinin normal sitogenetiğe sahip AML hastalarında kötü prognoz ile ilişkili olduğu belirtilmiş, yüksek FOXO3A ifadesi gösteren AML hastalarında 2 yıllık genel sağkalım (OS) ve nüksüz sağkalım (RFS) oranlarının daha düşük olduğu gösterilmiştir. Ayrıca yine yüksek FOXO3A ifadesi saptanan AML hastalarında AKT gen ifadesinin de arttığı görülmüştür [131]. Bu sonuçlar tez çalışmamızdaki bulgularla uyumaktadır. Santamaria ve ark.'ları ile bizim bulgularımız FOXO3A protein aktivitesi bulunmayan kanser hücrelerinde Akt yolağı aktif olsa bile FOXO3A mRNA aşırı ifadesi görüldüğünü göstermektedir. Bu



durum daha önceki çalışmalarda Akt proteininin aktive edilmesinin doğrudan fosforillenmeye yol açarak FOXO3A'nın sitoplazmaya taşınmasına ve FOXO3A proteininin inhibe olmasına yol açtığı belirtilen proteomik bulgularla çelişmektedir [10]. FLT3wt/NPM1 mutasyonlu AML hastalarında FOXO3A ifadesinin yüksek olduğu ve genel sağkalım ve nüksüz sağkalım oranlarının azaldığı vurgulanmıştır. Çalışmamızda kullanmış olduğumuz hasta gruplarında FLT3 ve NPM1 mutasyonlarının da araştırılması ek bilgiler sağlayabilecektir.

Bulgularımızın aynı hasta gruplarında ilgili genin mutasyonları ve metillenme profillerinin karşılaştırılmasıyla genişletilmesi ve daha geniş ve farklı hasta grupları ile birlikte değerlendirilerek doğrulanması planlanmaktadır. Tümör baskılayıcı FOXO3A genindeki değişikliklerin hastalığın prognozu için değerlendirilmesi de araştırmaya değer bir konudur. Ayrıca bu transkripsiyon faktörü üzerinde etkili diğer hücre içi mekanizmaların da incelenmesi yerinde olacaktır.

## KAYNAKLAR

1. Franks LM, Teich NM. *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*. 3rd ed. New York: Oxford University Press, Inc.; 2001.
2. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. *GLOBOCAN 2002. Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide*. IARC Cancer Base. No. 5 Version 2.0. Lyon, France: IARC Press; 2004.
3. Houlston RS, Catovsky D, Yuille MR. Genetic susceptibility to chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2002;**16**:1008-1014.
4. O'Brien S, del Giglio A, Keating M. Advances in the biology and treatment of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 1995;**85**:307-318.
5. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, ve ark. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med*. 1985;**103**:620-625.
6. Arden KC. Multiple roles of FOXO transcription factors in mammalian cells point to multiple roles in cancer. *Exp Gerontol*. 2006;**41**:709-717.
7. Greer EL, Brunet A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene*. 2005;**24**:7410-7425.
8. Hu MC, Lee DF, Xia W, ve ark. I $\kappa$ B kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell*. 2004;**117**:225-237.
9. Potente M, Urbich C, Sasaki K, ve ark. Involvement of Foxo transcription factors in angiogenesis and postnatal neovascularization. *J Clin Invest*. 2005;**115**:2382-2392.
10. Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, ve ark. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 1999;**96**:857-868.
11. Naka K, Hoshii T, Muraguchi T, ve ark. TGF- $\beta$ -FOXO signalling maintains leukaemia-initiating cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature*. 2010;**463**:676-680.

12. Myatt SS, Lam EW. The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;**7**:847-859.

13. Reagan-Shaw S, Ahmad N. The role of Forkhead-box Class O (FoxO) transcription factors in cancer: a target for the management of cancer. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007;**224**:360-368.

14. Dohner H, Fischer K, Bentz M, ve ark. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood*. 1995;**85**:1580-1589.

15. Al-Lamki Z, Wali YA, Wasifuddin SM, ve ark. Identification of prognosis markers in pediatric high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol*. 2005;**22**:629-643.

16. Dordelmann M, Schrappe M, Reiter A, ve ark. Down's syndrome in childhood acute lymphoblastic leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in four consecutive BFM trials. Berlin-Frankfurt-Munster Group. *Leukemia*. 1998;**12**:645-651.

17. Lanzkowsky P. *Manual of Pediatric Hematology and Oncology*. New York: Churchill Livinstone; 2000.

18. Appelbaum FR, Gundacker H, Head DR, ve ark. Age and acute myeloid leukemia. *Blood*. 2006;**107**:3481-3485.

19. Levine EG, Bloomfield CD. Leukemias and myelodysplastic syndromes secondary to drug, radiation, and environmental exposure. *Semin Oncol*. 1992;**19**:47-84.

20. Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H, ve ark. WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood*. 1994;**84**:3071-3079.

21. Neubauer A, Dodge RK, George SL, ve ark. Prognostic importance of mutations in the ras proto-oncogenes in de novo acute myeloid leukemia. *Blood*. 1994;**83**:1603-1611.

22. DR H, *Classification and differentiation of the acute leukemias*. Greer JP FJ, Lukenks JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, ed. Wintrobe's Clinical Hematology. Philadelphia: Lippincott Williams-Wilkins; 2004.

23. Özkalemkaş F. *Akut lösemiler, İç Hastalıkları Kitabı*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi; 2005.
24. Shipley JL, Butera JN. Acute myelogenous leukemia. *Exp Hematol*. 2009;**37**:649-658.
25. Deschler B, Lubbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer*. 2006;**107**:2099-2107.
26. Argyle JC, Benjamin DR, Lampkin B, Hammond D. Acute nonlymphocytic leukemias of childhood. Inter-observer variability and problems in the use of the FAB classification. *Cancer*. 1989;**63**:295-301.
27. Brunning R, Vardiman J, Matutes E. *Acute myeloid leukemia*. Jaffe E, Haris, N., Stein, H., Vardiman, J., ed. World Health Organization classification of tumours pathology and genetics tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon, France: IARC Pres.; 2001.
28. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002;**100**:2292-2302.
29. Estey E, Dohner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*. 2006;**368**:1894-1907.
30. Schwartz CL, Cohen HJ. Preleukemic syndromes and other syndromes predisposing to leukemia. *Pediatr Clin North Am*. 1988;**35**:853-871.
31. Mufti G, Flandrin, G, Schaefer, HE. *An atlas of malignant haematology, cytology, histology and cytogenetics*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996.
32. Meyers CA, Albitar M, Estey E. Cognitive impairment, fatigue, and cytokine levels in patients with acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. *Cancer*. 2005;**104**:788-793.
33. Baer MR, Barcos M, Farrell H, Raza A, Preisler HD. Acute myelogenous leukemia with leukemia cutis. Eighteen cases seen between 1969 and 1986. *Cancer*. 1989;**63**:2192-2200.
34. Boggs DR, Wintrobe MM, Cartwright GE. The acute leukemias. Analysis of 322 cases and review of the literature. *Medicine*. 1962;**41**:163-225.

35. Dohner H, Estey EH, Amadori S, ve ark. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia Net. *Blood*. 2010;**115**:453-474.
36. Grimwade D. The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2001;**14**:497-529.
37. Mrozek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev*. 2004;**18**:115-136.
38. O'Regan S, Carson S, Chesney RW, Drummond KN. Electrolyte and acid-base disturbances in the management of leukemia. *Blood*. 1977;**49**:345-353.
39. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, ve ark. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. 1995;**9**:1783-1786.
40. Susman E. NCCN issues first guidelines for deep vein thrombosis treatment in cancer patients. *J Natl Cancer Inst*. 2006;**98**:515.
41. Tallman MS, Gilliland DG, Rowe JM. Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood*. 2005;**106**:1154-1163.
42. Sayitoğlu M, Sırma S, Özbek U. Akut lösemilerde moleküler genetik. *Türkiye Klinikleri Hematoloji Onkoloji*. 2007;**2**:9-11.
43. Rabbitts TH, Appert A, Chung G, ve ark. Mouse models of human chromosomal translocations and approaches to cancer therapy. *Blood Cells Mol Dis*. 2001;**27**:249-259.
44. Kottaridis PD, Gale RE, Linch DC. Flt3 mutations and leukaemia. *Br J Haematol*. 2003;**122**:523-538.
45. Frohling S, Dohner H. Disruption of C/EBPalpha function in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2004;**351**:2370-2372.
46. Rabinowitz I LR. *Chronic Myeloid Leukemia*. 11 th ed. Greer JP FJ, Lukens JN, ed. WINTROBE'S Clinical Hematology. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.

47. Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1999;**340**:1330-1340.
48. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2000;**96**:3343-3356.
49. Melo JV, Chuah C. Resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia. *Cancer Lett.* 2007;**249**:121-132.
50. Dinçol G. *Klinik Hemotoloji.* İstanbul:Nobel Tıp Kitapevi; 2003.
51. Goldman JM. Chronic myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol.* 1997;**4**:277-285.
52. Cecil R, Goldman L, Bennett JC. *Cecil Textbook of Medicine.* 21st ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 2000.
53. Radich JP. The Biology of CML blast crisis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2007:384-391.
54. Huntly BJ, Gilliland DG. Blasts from the past: new lessons in stem cell biology from chronic myelogenous leukemia. *Cancer Cell.* 2004;**6**:199-201.
55. Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet.* 2007;**370**:342-350.
56. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1999;**341**:164-172.
57. Larson SL, Wolff SN. Chronic myeloid leukemia in Wintrabes ve Maxwell M, Ed. *Clinical Hematology.* 10 th ed. Philadelphia:1999.
58. Cohen GB, Ren R, Baltimore D. Modular binding domains in signal transduction proteins. *Cell.* 1995;**80**:237-248.
59. Wu Y, Liu J, Arlinghaus RB. Requirement of two specific tyrosine residues for the catalytic activity of Bcr serine/threonine kinase. *Oncogene.* 1998;**16**:141-146.
60. Walz C, Sattler M. Novel targeted therapies to overcome imatinib mesylate resistance in chronic myeloid leukemia (CML). *Crit Rev Oncol Hematol.* 2006;**57**:145-164.

- 61.** Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, Kantarjian HM. Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy. *Ann Intern Med.* 1999;**131**:207-219.
- 62.** Litzow MR. Imatinib resistance: obstacles and opportunities. *Arch Pathol Lab Med.* 2006;**130**:669-679.
- 63.** Golub TR, Goga A, Barker GF, ve ark. Oligomerization of the ABL tyrosine kinase by the Ets protein TEL in human leukemia. *Mol Cell Biol.* 1996;**16**:4107-4116.
- 64.** Deininger MW, Vieira S, Mendiola R, Schultheis B, Goldman JM, Melo JV. BCR-ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia. *Cancer Res.* 2000;**60**:2049-2055.
- 65.** Deininger M, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2000;**96**:3343-3356.
- 66.** Bedi A, Zehnbauser BA, Barber JP, Sharkis SJ, Jones RJ. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood.* 1994;**83**:2038-2044.
- 67.** Pendergast AM, Quilliam LA, Cripe LD, ve ark. BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell.* 1993;**75**:175-185.
- 68.** Sternberg DW, Gilliland DG. The role of signal transducer and activator of transcription factors in leukemogenesis. *J Clin Oncol.* 2004;**22**:361-371.
- 69.** Nosaka T, Kawashima T, Misawa K, Ikuta K, Mui AL, Kitamura T. STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *EMBO J.* 1999;**18**:4754-4765.
- 70.** Horita M, Andreu EJ, Benito A, ve ark. Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. *J Exp Med.* 2000;**191**:977-984.
- 71.** Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem.* 1998;**67**:481-507.
- 72.** Luo J, Manning BD, Cantley LC. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell.* 2003;**4**:257-262.

**73.** Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M, ve ark. Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J.* 1997;**16**:6151-6161.

**74.** Datta SR, Dudek H, Tao X, ve ark. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell.* 1997;**91**:231-241.

**75.** Del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science.* 1997;**278**:687-689.

**76.** Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, ve ark. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science.* 1998;**282**:1318-1321.

**77.** Mayo LD, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;**98**:11598-11603.

**78.** Burgering BM, Medema RH. Decisions on life and death: FOXO Forkhead transcription factors are in command when PKB/Akt is off duty. *J Leukoc Biol.* 2003;**73**:689-701.

**79.** Karin M. The NF-kappa B activation pathway: its regulation and role in inflammation and cell survival. *Cancer J Sci Am.* 1998;**4**:92-99.

**80.** Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer.* 2002;**2**:301-310.

**81.** Puil L, Liu J, Gish G, ve ark. Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO J.* 1994;**13**:764-773.

**82.** McGahon AJ, Nishioka WK, Martin SJ, Mahboubi A, Cotter TG, Green DR. Regulation of the Fas apoptotic cell death pathway by Abl. *J Biol Chem.* 1995;**270**:22625-22631.

**83.** Oda T, Heaney C, Hagopian JR, Okuda K, Griffin JD, Druker BJ. Crkl is the major tyrosine-phosphorylated protein in neutrophils from patients with chronic myelogenous leukemia. *J Biol Chem.* 1994;**269**:22925-22928.

**84.** Sattler M, Griffin JD. Mechanisms of transformation by the BCR/ABL oncogene. *Int J Hematol.* 2001;**73**:278-291.



**85.** Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol.* 2002;**107**:76-94.

**86.** Derderian PM, Kantarjian HM, Talpaz M, ve ark. Chronic myelogenous leukemia in the lymphoid blastic phase: characteristics, treatment response, and prognosis. *Am J Med.* 1993;**94**:69-74.

**87.** Sokal JE, Gomez GA, Baccarani M, ve ark. Prognostic significance of additional cytogenetic abnormalities at diagnosis of Philadelphia chromosome-positive chronic granulocytic leukemia. *Blood.* 1988;**72**:294-298.

**88.** Griesshammer M, Heinze B, Hellmann A, ve ark. Chronic myelogenous leukemia in blast crisis: retrospective analysis of prognostic factors in 90 patients. *Ann Hematol.* 1996;**73**:225-230.

**89.** Katoh M. Human FOX gene family. *Int J Oncol.* 2004;**25**:1495-1500.

**90.** Jacobs FM, Van der Heide LP, Wijchers PJ, Burbach JP, Hoekman MF, Smidt MP. FoxO6, a novel member of the FoxO class of transcription factors with distinct shuttling dynamics. *J Biol Chem.* 2003;**278**:35959-35967.

**91.** Arden KC, Biggs WH. Regulation of the FoxO family of transcription factors by phosphatidylinositol-3 kinase-activated signaling. *Arch Biochem Biophys.* 2002;**403**:292-298.

**92.** Weigelt J, Climent I, Dahlman-Wright K, Wikstrom M. Solution structure of the DNA binding domain of the human forkhead transcription factor AFX (FOXO4). *Biochemistry.* 2001;**40**:5861-5869.

**93.** Takahashi S, Furuyama K, Kobayashi A, ve ark. Cloning of a coproporphyrinogen oxidase promoter regulatory element binding protein. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;**273**:596-602.

**94.** Biggs WH, Cavenee WK, Arden KC. Identification and characterization of members of the FKHR (FOX O) subclass of winged-helix transcription factors in the mouse. *Mamm Genome.* 2001;**12**:416-425.

**95.** Signoretti S, Di Marcotullio L, Richardson A, ve ark. Oncogenic role of the ubiquitin ligase subunit Skp2 in human breast cancer. *J Clin Invest.* 2002;**110**:633-641.

**96.** Medema RH, Kops GJ, Bos JL, Burgering BM. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature*. 2000;**404**:782-787.

**97.** Furukawa-Hibi Y, Yoshida-Araki K, Ohta T, Ikeda K, Motoyama N. FOXO forkhead transcription factors induce G(2)-M checkpoint in response to oxidative stress. *J Biol Chem*. 2002;**277**:26729-26732.

**98.** Tran H, Brunet A, Grenier JM, et al. DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science*. 2002;**296**:530-534.

**99.** Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, et al. Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature*. 2002;**419**:316-321.

**100.** Gilley J, Coffey PJ, Ham J. FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *J Cell Biol*. 2003;**162**:613-622.

**101.** Sandri M, Sandri C, Gilbert A, et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*. 2004;**117**:399-412.

**102.** Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, et al. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell*. 2004;**14**:395-403.

**103.** Schmoll D, Walker KS, Alessi DR, et al. Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase B $\alpha$  and the forkhead transcription factor FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity. *J Biol Chem*. 2000;**275**:36324-36333.

**104.** Nakae J, Kitamura T, Silver DL, Accili D. The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression. *J Clin Invest*. 2001;**108**:1359-1367.

**105.** Yeagley D, Guo S, Unterman T, Quinn PG. Gene- and activation-specific mechanisms for insulin inhibition of basal and glucocorticoid-induced insulin-like growth factor binding protein-1 and phosphoenolpyruvate carboxykinase transcription.

Roles of forkhead and insulin response sequences. *J Biol Chem.* 2001;**276**:33705-33710.

**106.** Puigserver P, Rhee J, Donovan J, ve ark. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 $\alpha$  interaction. *Nature.* 2003;**423**:550-555.

**107.** Bakker WJ, Blazquez-Domingo M, Kolbus A, ve ark. FoxO3a regulates erythroid differentiation and induces BTG1, an activator of protein arginine methyl transferase 1. *J Cell Biol.* 2004;**164**:175-184.

**108.** Nakae J, Kitamura T, Kitamura Y, Biggs WH, Arden KC, Accili D. The forkhead transcription factor Foxo1 regulates adipocyte differentiation. *Dev Cell.* 2003;**4**:119-129.

**109.** Burgering BM, Kops GJ. Cell cycle and death control: long live Forkheads. *Trends Biochem Sci.* 2002;**27**:352-360.

**110.** Tzivion G, Avruch J. 14-3-3 proteins: active cofactors in cellular regulation by serine/threonine phosphorylation. *J Biol Chem.* 2002;**277**:3061-3064.

**111.** Yaffe MB. How do 14-3-3 proteins work? Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS Lett.* 2002;**513**:53-57.

**112.** Singh A, Ye M, Bucur O, ve ark. Protein phosphatase 2A reactivates FOXO3a through a dynamic interplay with 14-3-3 and AKT. *Mol Biol Cell.* 2010;**21**:1140-1152.

**113.** Tzivion G, Dobson M, Ramakrishnan G. FoxO transcription factors; Regulation by AKT and 14-3-3 proteins. *Biochim Biophys Acta.* 2011;**1813**:1938-1945.

**114.** Lee-Huang S, Maiorov V, Huang PL, ve ark. Structural and functional modeling of human lysozyme reveals a unique nonapeptide, HL9, with anti-HIV activity. *Biochemistry.* 2005;**44**:4648-4655.

**115.** Alessi DR, James SR, Downes CP, ve ark. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol.* 1997;**7**:261-269.

**116.** Lehtinen MK, Yuan Z, Boag PR, ve ark. A conserved MST-FOXO signaling pathway mediates oxidative-stress responses and extends life span. *Cell.* 2006;**125**:987-1001.

- 117.** Yang JY, Zong CS, Xia W, ve ark. ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MDM2-mediated degradation. *Nat Cell Biol.* 2008;**10**:138-148.
- 118.** Yang W, Dolloff NG, El-Deiry WS. ERK and MDM2 prey on FOXO3a. *Nat Cell Biol.* 2008;**10**:125-126.
- 119.** Matsuzaki H, Daitoku H, Hatta M, Aoyama H, Yoshimochi K, Fukamizu A. Acetylation of Foxo1 alters its DNA-binding ability and sensitivity to phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;**102**:11278-11283.
- 120.** Brunet A, Sweeney LB, Sturgill JF, ve ark. Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science.* 2004;**303**:2011-2015.
- 121.** Yamagata K, Daitoku H, Takahashi Y, ve ark. Arginine methylation of FOXO transcription factors inhibits their phosphorylation by Akt. *Mol Cell.* 2008;**32**:221-231.
- 122.** Vogt PK, Jiang H, Aoki M. Triple layer control: phosphorylation, acetylation and ubiquitination of FOXO proteins. *Cell Cycle.* 2005;**4**:908-913.
- 123.** Fu W, Ma Q, Chen L, ve ark. MDM2 acts downstream of p53 as an E3 ligase to promote FOXO ubiquitination and degradation. *J Biol Chem.* 2009;**284**:13987-14000.
- 124.** Huang H, Tindall DJ. Regulation of FOXO protein stability via ubiquitination and proteasome degradation. *Biochim Biophys Acta.* 2011;**1813**:1961-1964.
- 125.** Accili D, Arden KC. FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell.* 2004;**117**:421-426.
- 126.** Van der Horst A, Tertoolen LG, de Vries-Smits LM, Frye RA, Medema RH, Burgering BM. FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2(SIRT1). *J Biol Chem.* 2004;**279**:28873-28879.
- 127.** Lu H, Huang H. FOXO1: a potential target for human diseases. *Curr Drug Targets.* 2011;**12**:1235-1244.
- 128.** Jagani Z, Singh A, Khosravi-Far R. FoxO tumor suppressors and BCR-ABL-induced leukemia: a matter of evasion of apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 2008;**1785**:63-84.

- 129.** Hui RC, Gomes AR, Constantinidou D, ve ark. The forkhead transcription factor FOXO3a increases phosphoinositide-3 kinase/Akt activity in drug-resistant leukemic cells through induction of PIK3CA expression. *Mol Cell Biol.* 2008;**28**:5886-5898.
- 130.** Storz P, Doppler H, Copland JA, Simpson KJ, Toker A. FOXO3a promotes tumor cell invasion through the induction of matrix metalloproteinases. *Mol Cell Biol.* 2009;**29**:4906-4917.
- 131.** Van der Heide LP, Smidt MP. Regulation of FoxO activity by CBP/p300-mediated acetylation. *Trends Biochem Sci.* 2005;**30**:81-86.
- 132.** Motta MC, Divecha N, Lemieux M, ve ark. Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell.* 2004;**116**:551-563.
- 133.** Van der Horst A, de Vries-Smits AM, Brenkman AB, ve ark. FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP. *Nat Cell Biol.* 2006;**8**:1064-1073.
- 134.** Yang JY, Zong CS, Xia WY, ve ark. ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FOXO3a via MCM2-mediated degradation. *Nature Cell Biology.* 2008;**10**:370-370.
- 135.** Greer EL, Oskoui PR, Banko MR, ve ark. The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *J Biol Chem.* 2007;**282**:30107-30119.
- 136.** Santamaria CM, Chillon MC, Garcia-Sanz R, ve ark. High FOXO3a expression is associated with a poorer prognosis in AML with normal cytogenetics. *Leuk Res.* 2009;**33**:1706-1709.

**FORMLAR**  
**GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME VE ONAY FORMU**

**ÇALIŞMANIN ADI:**

Akut Miyeloid Lösemi (AML) ve Kronik Miyeloid Lösemi (KML) Hastalarında *FOXO3A* Gen İfadesinin Araştırılması

**ÇALIŞMANIN AMACI:**

FOXO genleri birçok sinyal yolağı ile bağlantılı olup çeşitli fizyolojik ve patolojik aşamalarda kritik rollerde görev alır. Bu aşamalar; hücre döngüsünün durdurulması, hücre ölümü, DNA tamiri ve stres uyarısı ile ilişkilidir. FOXO transkripsiyon faktörleri gelişim, farklılaşma , tümör gelişimi ve anjiyogeneizde etkilidir. FOXO transkripsiyon faktörleri, PI3-K/Akt yolağının doğrudan hedefidir. Çalışmamızda, FOXO3a geninin PI3-K/Akt yolağıyla etkileşiminin lösemi üzerindeki etkileri araştırılacaktır.

**ÇALIŞMANIN İÇERİĞİ:**

Çalışma, akut ve kronik lösemili hastalarda yapılacaktır. Temel Onkoloji A.B.D. Araştırma Laboratuvarı rutin analizleri için başvurulmuş hastalardan alınmış stok periferik kan ve kemik iliği örnekleri çalışılacaktır. Yaklaşık hasta sayımız 100 olacaktır. Kan hücrelerinin apoptoza girmesini sağlayan ve tümör baskılayıcı etki gösteren genlerden olan FOXO3a gen anlatımı ile hücrelerin apoptoza girişini önleyen PI3-K/Akt sinyal yolağının bu gen ile ilişkisi araştırılacaktır. Araştırma, hastaların kan hücrelerinden elde edilen RNA ile sentezlenmiş cDNA'lardan Real-time PCR yöntemi kullanılarak yapılacaktır.

### **ÇALIŞMANIN BAŞLAMA TARİHİ VE SÜRESİ:**

Çalışmanın Haziran 2011’de başlaması ve 1 yıl sürmesi öngörülmektedir.

### **ACIKLAMALAR:**

Bu çalışmaya gönüllü olmaya karar verirseniz bu gönüllü bilgilendirilmiş onay formunu imzalamanız gerekecektir. Sadece kendi rızanız ile hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın, doktor kontrolünde alınacak kan ve doku örneğiniz ile bilimsel çalışmaya katılmış olacaksınız. Sizden ayrıca araştırmaya yardımcı olacak bazı kişisel bilgileriniz (yaş, meslek, sigara kullanımı vs.) istenebilir. Etik kurullar inceleme amacıyla medikal kayıtlardaki medikal kişisel bilgilerinize ve bu çalışmadan elde edilen bilgilere erişebilirler. Medikal bilgilerinize erişim çalışma için toplanan bilgilerle sınırlı olacaktır.

Bu çalışmanın sonuçları bilimsel toplantılarda veya yayınlarda sunulabilir, ancak bu sunumlarda kimliğiniz açıklanmayacaktır. Ayrıca sizden araştırmayla ilgili olarak herhangi bir maddi talepte bulunulmayacak ve size de herhangi bir ücret ödenmeyecektir. Ayrıca bu araştırmaya karar verdiğiniz takdirde ileriye dönük olarak hastalığınız hakkında elde edilecek bilgilerle bilim dünyasına konuyla ilgili olarak önemli derecede katkı sağlayacağınız kesindir. Gönüllü olmaya karar verdiğiniz ve bu bilgilendirilmiş gönüllü onay ve rıza formunu imzaladığınız takdirde yukarıda yazılanları okuyup kabul ettiğinizi ve hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın ailenizin bilgisi dahilinde sadece kendi rızanız ile karar verdiğinizi onaylamış olacaksınız.

Herhangi bir soru yada sorunuz olduğu takdirde ilgili Demet Akdeniz’e 0212 414 24 34 / 34188 no’lu telefondan ulaşabilirsiniz.

### **GÖNÜLLÜ ONAY FORMU**

Gönüllüye (hastaya) araştırmadan önce verilmesi gereken bilgiler tarafıma sözlü ve yazılı olarak aktarıldı. Bu koşullarda söz konusu çalışmaya kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Çalışma için alınan materyalimin ilerideki çalışmalarda da kullanılmasını

EVET  kabul ediyorum.

HAYIR  kabul etmiyorum.

**Hastanın:**

Adı Soyadı:

Telefonu:

Adresi:

İmza:

**Açıklamaları Yapan Doktorun:**

Adı Soyadı:

İmza:

**Tanıklık Eden Görevlinin:**

Adı Soyadı:

İmza:



**ETİK KURUL KARARI**

T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



Sayı : 148

Tarih : 14.01.2011

Konu : Prof. Dr. Nejat DALAY hk,

Sayın Prof. Dr. Nejat DALAY  
Onkoloji Enstitüsü Müdürlüğü  
Öğretim Üyesi  
İlgi : 23.12.2010 tarihli 2674 sayılı yazınız

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Yüksek Lisans Öğrencisi Demet AKDENİZ'in yürüteceği 2010/1104- 373 "Akut Miyeloid Lösemi (AML) ve Kronik Miyeloid Lösemi (KML) Hastalarında FOXO3a Gen İfadesinin Araştırılması" başlıklı tez çalışması kurumumuzun 07.01.2011 tarihli 01 sayılı toplantısında etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.  
Bilgilerinize saygılarımla rica ederim.

Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN  
İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar  
Etik Kurul Başkanı

Eki: Tutanak

T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ  
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



**Toplantı Tarihi** : 07 / 01 / 2011

**Toplantı Yeri** : Behçet Kütüphanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

**Toplantı Sayısı** : 01

Sorumlu araştırmacılığını Üniversitemiz Onkoloji Enstitüsü Müdürlüğü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Nejat DALAY'ın üslendiği ve Yüksek Lisans Öğrencisi Demet AKDENİZ'in yürüteceği 2010/1104-373 dosya numaralı "Akut Miyeloid Lösemi (AML) ve Kronik Miyeloid Lösemi (KML) Hastalarında FOXO3a Gen İfadesinin Araştırılması" başlıklı tez çalışması kurulumuzca incelenmiştir.

Etik yönden uygun bulunmuştur.

**Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN**  
İ.Ü. Farmakoloji ve Klinik Far. A.D.  
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

**Prof.Dr. Ayşen BULUT** (T.Katılmadı.)  
Halk Sağlığı (Emekli)

**Prof.Dr. Berrin UMMAN**  
İ.Ü. Kardiyoloji A.D. (Bşk. Yardımcısı)

**Doç.Dr. Tufan TÜKEK**  
Okmeydanı Eğitim ve Arş. Hast. İç Hast. 1. Dahiliye Kliniği

**Prof.Dr. Ahmet GÜL**  
İ.Ü. İç Hastalıkları A. D.

**Prof.Dr. Ünal KUZGUN**  
Şişli Etfal Eğitim ve Arş. Hast. Ortopedi

**Prof.Dr. Oğuzhan COBAN**  
İ.Ü. Nöroloji A. D.

**Prof.Dr. Ahmet O. ARAMAN** (T.Katılmadı)  
İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Dekanı

**Prof.Dr. Pınar SAİP**  
İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü

**Prof.Dr. Demir TIRYAKI**  
Biyofizik (Emekli)

**Prof.Dr. Rukiye Eker ÖMEROĞLU**  
İ.Ü. Çocuk Sağ. ve Hast. A. D.

**Av. Dilek TEMİZ ÖZBEK** (izinli)  
İstanbul Üniversitesi

**Uzm.Dr. Ahmet Rıza URAS**  
Haydarpaşa Numune Eğitim ve Arş. Hast. Biyokimya

**M. Kerim AKMAN**  
İİBF İktisat Bölümü (Özel)

**Doç. Dr. H. Hanzade DOĞAN** (T.Katılmadı)  
İ.Ü. Cerrahpaşa T.F. Deontoloji

## **PATENT HAKKI İZİNİ**

**TELİF HAKKI İZİNİ**

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Demet	<b>Soyadı</b>	Akdeniz
<b>Doğ.Yeri</b>	Dörtyol/Hatay	<b>Doğ.Tar.</b>	01.09.1985
<b>Uyruğu</b>	T.C.	<b>TC Kim No</b>	18064863196
<b>Email</b>	akdeniz_dmt@hotmail.com	<b>Tel</b>	0543 513 63 24

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>		
<b>Yük.Lis.</b>		
<b>Lisans</b>	Abant İzzet Baysal Üniversitesi	2009
<b>Lise</b>	Payas Süper Lisesi	2003

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
<b>1.</b>			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
<b>İngilizce</b>	Çok iyi	Orta	Çok iyi	62,5	

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>LES Puanı</b>	78.096	76.657	74.258
<b>(Diğer) Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi
EndNote	Çok iyi

### Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

**Özel İlgi Alanları (Hobileri):** Kitap okumak, Seyahat etmek, Sinemaya gitmek