

**SİTOKİN SİNYAL BASKILAYICI (SOCS)
GENLERİNİN İFADESİNİN
METİLPREDNİZOLON VE VİTAMİN-D3
UYGULANMIŞ KRONİK MİYELOBLASTİK
LÖSEMİ (K-562) HÜCRELERİNDE
ARAŞTIRILMASI**

BURCU REYHANI

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MERSİN
HAZİRAN-2011**

**SİTOKİN SİNYAL BASKILAYICI (SOCS)
GENLERİNİN İFADESİNİN
METİLPREDNİZOLON VE VİTAMİN-D3
UYGULANMIŞ KRONİK MİYELOBLASTİK
LÖSEMİ (K-562) HÜCRELERİNDE
ARAŞTIRILMASI**

BURCU REYHANI

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ
ANA BİLİM DALI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

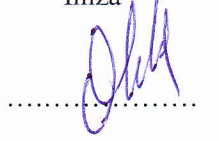
**Danışman
Yrd. Doç. Dr. A. Ata ÖZÇİMEN**

**MERSİN
HAZİRAN-2011**

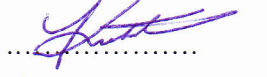
Burcu REYHANI tarafından Yrd. Doç. Dr. A. Ata ÖZÇİMEN danışmanlığında hazırlanan “Sitokin Sinyal Baskılayıcı (SOCS) Genlerinin İfadesinin Metilprednizolon ve Vitamin-D3 Uygulanmış Kronik Miyeloblastik Lösemi (K-562) Hücrelerinde Araştırılması” başlıklı bu çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

İmza

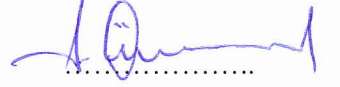
Prof. Dr. H. Barbaros ORAL



Doç. Dr. Yasemin KAÇAR



Yrd. Doç. Dr. A. Ata ÖZÇİMEN



Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 08/09/2011 tarih ve 2011-19/342 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. Ahmet Murat GİZİR
Enstitü Müdürü



Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, çizelge ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

SİTOKİN SİNYAL BASKILAYICI (SOCS) GENLERİNİN İFADESİNİN METİLPREDNİZOLON VE VİTAMİN-D3 UYGULANMIŞ KRONİK MİYELOBLASTİK LÖSEMİ (K-562) HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI

Burcu REYHANI

ÖZ

Lösemilerin oluşum mekanizmasında rol oynayan sinyal moleküllerinin hücresel ilişkileri ve bu moleküller tarafından kontrol edilen genlerin ifadelerinin değişimi ile ilgili yoğun bir şekilde hematolojik çalışmalar yapılmasına rağmen, antiproliferatif, apoptotik ve farklılaştırıcı ajanların hangi genler üzerinde etki ettikleri hala tartışmalıdır. Bu çalışmada, Metilprednizolon (MP) ve Vitamin D3 (VD-3)'ün birlikte kullanımlarının, K562 hücre hattında SOCS genlerinin ifadesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada, K562 hücrelerine üç farklı zamanda (6. saat, 12. saat ve 24. saat) 8 farklı doz uygulanmıştır. Belirtilen zaman ve doz aralıklarında, MP ve VD-3'ün SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin ifadesi üzerindeki etkileri niceliksel gerçek zamanlı RT-PCR ile ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar 'Pfaffl' metoduna göre hesaplanmıştır. Hesaplamalar sonucunda, SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin ifadesinin, 6. saatte yüksek doz MP ve düşük doz VD-3'ün beraber uygulandığı örneklerde en fazla oranda arttığı tespit edilmiştir (SOCS-1; 675 kat, SOCS-3; 1833 kat). Sadece MP'un uygulandığı örneklerde orta derecede (SOCS-1; 0.68 kat, SOCS-3; 2.34 kat) artış olduğu belirlenmiştir. VD-3'ün tek başına SOCS genlerinin ifadesinde önemli bir etki yaratmadığı belirlenmiştir. SOCS-1 geninin ifadesinde en yüksek doz MP ile en düşük doz VD-3 birlikte uygulandığında, sinerjistik etki göstererek yüksek derecede artışa neden olmuştur. Çalışmada, SOCS-3 geninin ifadesinin SOCS-1'e göre daha fazla ifade edildiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: K562 hücre hattı, Metilprednizolon, Vitamin D-3, SOCS-1 geni ifadesi, SOCS-3 geni ifadesi

Danışman: Yrd. Doç. Dr. A. Ata ÖZÇİMEN, Mersin Üniversitesi, Biyoloji Ana Bilim Dalı

THE INVESTIGATION OF SUPPRESSOR OF CYTOKINE SIGNALLING (SOCS) GENE EXPRESSION IN CHRONIC MYELOBLASTIC LEUKEMIA (K562) CELLS TREATED METHYLPREDNISOLONE AND VITAMINE D-3

Burcu REYHANI

ABSTRACT

The cellular relation of signal molecules that play roles in the mechanisms of leukemogenesis, and the change of the gene expression that controlled by this molecules concerning antiproliferative, apoptotic and differentiation agents were affected on to the genes is still controversial despite an intensive hematological studies have carried on some agents. In this study, the effect of methylprednisolone and vitamin D-3 were co-treated in K562 cells thought to be possible changes on expression of SOCS genes. In this study, eight combinations of two drugs were applied in to the K562 cells in three different times (6 hr, 12 hr, and 24 hr). Time and dose dependent effect of MP and VD-3 on the SOCS-1 and SOCS-3 gene expression measured by quantitative real-time RT-PCR. The results were calculated according to 'Pfaffl method'. The result of calculations, SOCS-1 gene expression and SOCS-3 gene expression was strictly high determined in samples co-treated with high dose MP and low dose VD-3 in 6th hr (SOCS-1; 675 fold, SOCS-3; 1833 fold). The effect of MP alone was moderately determined in samples (SOCS-1; 0.68 fold, SOCS-3; 2.34 fold). The effect of VD-3 alone was determined a null significant impact. Apart from gene expression is dramatically upregulated under the synergistic effect of high dose MP and low dose VD-3. SOCS-1 gene expression was generally not upregulated. In this study SOCS-3 gene expression was detected significant upregulation than SOCS-1 gene expression.

Key words: K562 cell line, Methylprednisolone, Vitamin D-3, SOCS-1 gene expression, SOCS-3 gene expression

Advisor: Ass. Proffesor A. Ata ÖZÇİMEN, Department of Biology, Universty of Mersin

TEŞEKKÜR

Bana bu çalışmayı yapma fırsatı veren, her konuda desteğini eksik etmeyen ve bana karşı her zaman sabır ve hoşgörü ile yaklaşan çok değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN'e, tez çalışması süresince bana laboratuvarlarında çalışma imkanı sağlayan değerli hocam Doç. Dr. Yasemin KAÇAR'a, çalışmamın kantitatif revers transkriptaz real-time PZR ölçümü sırasında laboratuvarlarında çalışma olanağı sağlayan Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İmmünoloji Bilim Dalından değerli hocam Prof. Dr. Güher GÖRAL'a, Prof. Dr. Haluk Barbaros ORAL'a, Doç. Dr. Ferah BUDAK'a ve laboratuvar çalışanlarına ve özel olarak, çalışma sırasında tecrübelerini paylaştan çok değerli Figen AYMAK'a ve Uludağ Üniversitesi İmmünoloji Bilim Dalı çalışanlarına, Uludağ Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndan Görkem UMUT'a, çalışmamız sırasında bana karşı desteklerini esirgemeyen Mersin Üniversitesi Farmakoloji Anabilim Dalından değerli hocam Prof. Dr. Kansu BÜYÜKAŞAR ve laboratuvar çalışanlarına ve Mersin Devlet Opera ve Balesi'nden Yağmur ARINLI'ya teşekkür ederim.

Yüksek lisans tez çalışmam süresince benden manevi yardımlarını esirgemeyen Mersin Üniversitesi Kimya Bölümü'nden Muhammet DEMİREL'e, Biyoloji Bölümünden Pınar KÜCE'ye, Sertan ÇEVİK'e, Elif ERDOĞAN'a, çok değerli arkadaşım Ümit YAŞAR'a, Oya GÜRSES'e, Hatice SEVGİ'ye ve Biyoloji Bölümü çalışanlarına, Mersin Üniversitesi Metsim çalışanlarından Kerime BAYDAN'a teşekkürlerimi borç bilirim. Benden maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen anneme, kardeşlerime, bütün aileme ve ayrıca her zaman bana destek olan eşim İlker REYHANI'ye edeceğim teşekkür hiçbir zaman yeterli olmayacaktır. Desteklerinden dolayı tüm arkadaşlarıma en içten sevgilerimle teşekkür ederim.

Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı BAP birimine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. HEMATOPOEZ VE LÖKOSİTLER.....	3
2.1.1. Hematopoez	3
2.1.2. Lökositler	5
2.2. LÖSEMİ.....	7
2.2.1. Kronik Miyeloid Lösemi.....	10
2.2.1.1. KML’de klinik fazlar	12
2.3. JANUS KİNAZ AİLESİ- SİNYAL İLETİCİ VE TRANSKRİPSİYON AKTİVATÖRLERİ	13
2.4. SİTOKİN SİNYAL BASKILAYICILARI	16
2.4.1. SOCS-1 ve SOCS-3 Proteinleri ve Mekanizmaları	18
2.4.1.1. SOCS-1 proteini	18
2.4.1.2. SOCS-3 proteini	20
2.5. K562 HÜCRE HATTI	21
2.6. NÜKLEER HORMON RESEPTÖRLERİ VE STEROİDLER.....	21
2.6.1. Nükleer Hormon Reseptörleri	21
2.6.1.1. Steroidler ve Mekanizmaları	22
<i>Metilprednizolon</i>	24
<i>Vitamin D3</i>	25
2.7. NİCELİKSEL GERÇEK ZAMANLI REVERS TRANSKRİPTAZ PZR TEKNİĞİ	26
2.7.1. Niceliksel Gerçek Zamanlı RT-PCR Tekniğinde Genel Olarak Kullanılan Cihazlar	27

2.7.2. Kullanılan Kimyasallar	27
2.7.2.1. Moleküler işaretleyiciler	27
2.7.2.2. DNA'ya bağlanan boyalar.....	28
2.7.2.3. Hibridizasyon problemleri	29
2.7.2.4. Hidroliz problemleri.....	29
2.7.3. Revers Transkripsiyon	31
2.7.4. Treshold Döngüsü	32
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	33
3.1. MATERYAL	33
3.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasallar	33
3.1.2. Cihazlar	35
3.2. YÖNTEM.....	36
3.2.1. Hücre Kültürü ve Total RNA Saflaştırması	36
3.2.2. cDNA Sentezi	38
3.2.3. Gerçek Zamanlı PZR Ölçümü.....	39
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	42
4.1. BULGULAR.....	42
4.1.1. SOCS-1 ve SOCS-3 Genlerinin İfadesinin Gerçek Zamanlı RT-PZR'da Niceliksel Ölçümü	42
4.1.1.1. Birinci çalışma tam niceliksel ölçüm	42
4.1.1.2. İkinci çalışma tam niceliksel ölçüm	45
4.1.2. SOCS-1 ve SOCS-3 Genlerinin İfadesi Üzerinde MP ve VD-3'ün Birlikte Kullanımlarının Etkileri.....	47
4.1.3. MP ve VD-3'ün SOCS-1 ve SOCS-3 Genleri Üzerindeki Sinerjistik Etkisinin Delta-Delta CT Metoduna Göre Değerlendirilmesi	51
4.1.4. İstatistiksel Analiz.....	55
4.2. TARTIŞMA	56
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	62
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ.....	71

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Kemik iliğindeki kök hücre tipleri.....	4
Çizelge 2.2. Lökosit tipleri.....	6
Çizelge 3.1. Örnek numaraları	37
Çizelge 3.2. Birinci grup çalışma örneklerinin 96 well plate'e yüklenmesi	40
Çizelge 3.3. İkinci grup çalışma örneklerinin 96 well plate'e yüklenmesi.....	41
Çizelge 4.1. Örnek ve referans genlerin birinci çalışma sonucunda elde edilen tam niceliksel eşik değerleri	43
Çizelge 4.2. Hedef genin birinci çalışma sonucunda elde edilen göreceli ölçüm değerleri	44
Çizelge 4.3. Örnek ve referans genlerin ikinci çalışma sonucunda elde edilen tam niceliksel eşik değerleri	46
Çizelge 4.4. Hedef genin ikinci çalışma sonucunda elde edilen göreceli ölçüm değerleri	47
Çizelge 4.5. BA;SOCS-1 ve BA;SOCS-3'ün 6. saatteki ifadesinin ortalama göreceli ölçüm değerleri.....	48
Çizelge 4.6. BA;SOCS-1 ve BA;SOCS-3'ün 12. saatteki ifadesinin ortalama göreceli ölçüm değerleri.....	49
Çizelge 4.7. BA;SOCS-1 ve BA;SOCS-3'ün 24. saatteki ifadesinin ortalama göreceli ölçüm değerleri.....	50
Çizelge 4.8. SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin 6. saatteki ifadesinin CP değerlerinin standart sapmaları	52
Çizelge 4.9. SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin 6. saatteki ifadesinin $\Delta\Delta CT$ ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonuçları	52
Çizelge 4.10. SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin 12. saatteki ifadesinin CP değerlerinin standart sapmaları	53
Çizelge 4.11. SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin 12. saatteki ifadesinin $\Delta\Delta CT$ ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonuçları	53
Çizelge 4.12. SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin 24. saatteki ifadesinin CP değerlerinin standart sapmaları	54
Çizelge 4.13. SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin 24. saatteki ifadesinin $\Delta\Delta CT$ ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonuçları	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. Hematopoetik kök hücre gelişimi ve lösemik dönüşümü sırasında hücrelerin kendini yenilemelerinin karşılaştırılması	3
Şekil 2.2. Hematopoetik kök hücreden kanın şekilli elemanların Oluşumu	5
Şekil 2.3. Lösemi tipleri	7
Şekil 2.4. Lösemi hücrelerinin lösemi kök hücrelerinden gelişimi	10
Şekil 2.5. Bcr ve Abl genlerinin moleküler yapısı ve p210 onkogeninin oluşumu	11
Şekil 2.6. Kronik faz-Blastik faz KML ve normal hematopoez arasında kök hücre gelişiminin karşılaştırılması	13
Şekil 2.7. JAK/STAT Mekanizmasının işleyişi	15
Şekil 2.8. SOCS protein ailesi	17
Şekil 2.9. SOCS proteinlerinin yapısı	17
Şekil 2.10. JAK-STAT sinyal yolunun SOCS proteinleri tarafından düzenlenmesi	18
Şekil 2.11. SOCS-1 geninin genel olarak etkileştiği reseptörler ve aktivasyonu	19
Şekil 2.12. SOCS-3 geninin genel olarak etkileştiği reseptörler ve aktivasyonu	20
Şekil 2.13. Steroid hormonlar aracılığıyla biyolojik yanıt oluşumu	24
Şekil 2.14. Vitamin D ₃ sentezi, aktivasyonu ve katabolizması	25
Şekil 2.15. Moleküler Beacon yöntemi	28
Şekil 2.16. Light cyler metoduna göre uyarlanmış yöntem	28
Şekil 2.17. Hibridizasyon Prob yöntemi	29
Şekil 2.18. Taq Man Yöntemi	30
Şekil 4.1. Hedef ve referans genlerin eşik değerine girdikleri döngüyü gösteren amplifikasyon eğimi	42
Şekil 4.2. Hedef ve referans genlerin eşik değerine girdikleri döngüyü gösteren amplifikasyon eğimi	45
Şekil 4.3. BA;SOCS-1 ve BA; SOCS-3'ün 6. saatteki ifadesinin ortalama göreceli ölçüm tablosu	48
Şekil 4.4. BA;SOCS-1 ve BA;SOCS-3'ün 12. saatteki ifadesinin ortalama göreceli ölçüm tablosu	49
Şekil 4.5. BA;SOCS-1 ve BA;SOCS-3'ün 24. saatteki ifadesinin ortalama göreceli ölçüm tablosu	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi
AML	: Akut Miyeloblastik Lösemi
BA	: Beta Aktin
Ba/F3	: Öncül B hücre hattından köken alan immortalize mürin Hücre Dizisi
Bcr/Abl	: Breakpoint cluster region/Abelson Mürin Lösemi
cDNA	: Komplementer DNA
CP	: (Crossing Point) Eşik Değer
CT	: (Treshold Cycle) Treshold döngüsü
FBS	: Fötal Bovin (Dana) Serum
GR	: Glukokortikoid Reseptörleri
HKH	: Hematopoetik Kök Hücresi
HL-60	: İnsan Akut Miyeloyid Lösemi Hücre Dizisi
IFN	: İnterferon
JAK/STAT	: Janus Kinaz/ Sitokin iletiliciler ve transkripsiyon aktivatörleri
K562	: Kronik Miyeloyid Lösemi Hücre Hattı
Kİ	: Kemik İliği
KLL	: Kronik Lenfoid Lösemi
KML	: Kronik Miyeloyid Lösemi
LKH	: Lösemi Kök Hücresi
MAPK	: Mitojen Aktive Edici Kinaz
MP	: Metilprednizolon
Ph	: Philadelphia Kromozomu
PI3	: Fosfoinositid 3 Kinaz
RPMI	: Rosswell Park Memorial Institute
RT-PZR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SOCS	: Sitokin Sinyalleri Baskılayıcıları
U937	: Miyelomonositik Lösemi Hücre Dizisi
VD3	: Vitamin D3

1. GİRİŞ

Lökositler çekirdekli hücreler olup, organizmanın savunma sisteminin elemanları olan beyaz kan hücreleridir. Çekirdek ve sitoplazma yapılarına göre granüositler, monositler ve lenfositler olmak üzere üç gruba ayrılırlar. Granüositler ve monositler yalnızca kemik iliğinde üretilirken, lenfositler ise az miktarda kemik iliğinde, yoğun olarak lenfoid doku ve organlarda üretilmektedir [1].

Lösemi, olgunlaşmamış ve blast formda kalmış öncül veya fonksiyonunu kaybetmiş olgun lökositlerin aşırı çoğalması şeklinde gerçekleşir. Hücreler benzer gelişim süreci geçirir ve atasal tipten belirgin olarak ayırt edici özellikler taşırlar. 1990'lı yıllarda lösemnin tek tip hastalık olduğu değil, bunun yerine kendi içinde de iki temel kola ayrılan iki ana bölümden oluştuğu sonucuna varılmıştır. Bunlardan biri, kanda ve kemik iliğinde farklı özellik taşıyan ve ayrıca ya olgunlaşmamış miyeloblast formda gerçekleşen akut miyeloyid lösemi, ya da olgun miyeloyid formda gerçekleşen kronik miyeloyid lösemidir. Diğeri de, kan ve kemik iliğinde B ve T lenfoid kök hücrelerinin ya da olgun B veya T hücrelerinin sürekli çoğalması ile meydana gelen akut ve kronik lenfositik lösemidir [2].

Orijinlerine rağmen, bütün lösemi tipleri benzer belirtiler gösterir. Anormal beyaz hücreler çoğalır veya kırmızı kan hücrelerinin fonksiyonunu engeller. Beyaz kan hücreleri hastalıklarla verimli bir şekilde savaşamaz. Lösemiyle birlikte, kan pulcuklarının fonksiyonunun bozulması yaşamı tehdit eden kanamalara sebep olmaktadır. Vücudun çeşitli kısımlarında toplanan lösemi hücreleri kemik veya eklem bölgelerinde ağrılara yol açar [2].

Akut lösemi, hematopoetik sürecin herhangi bir basamağında normal miyeloyid veya lenfoid hücrelerindeki farklılaşmanın durması ve hücrelerin diğerkanser hücreleri gibi klonal olarak çoğalması sonucunda oluşan bir hastalıktır. Ancak, birçok solid tümörlerin aksine, kromozomal translokasyonlar ve inversiyon gibi oluşumların da akut lösemiye neden olduğu bilinmektedir [3-4].

Kronik lösemide, hücreler kısmen olgunlaşırlar. Hücreler normal olarak görülebilir ancak, normal lökositler gibi fonksiyon gösteremezler. Akut lösemiye göre daha uzun bir yaşam periyoduna sahiptir ve hastaların çoğu, birçok yıl yaşayabilmektedir. Ancak, kronik lösemilerin tedavisi akut lösemiye göre daha ağırdır [5].

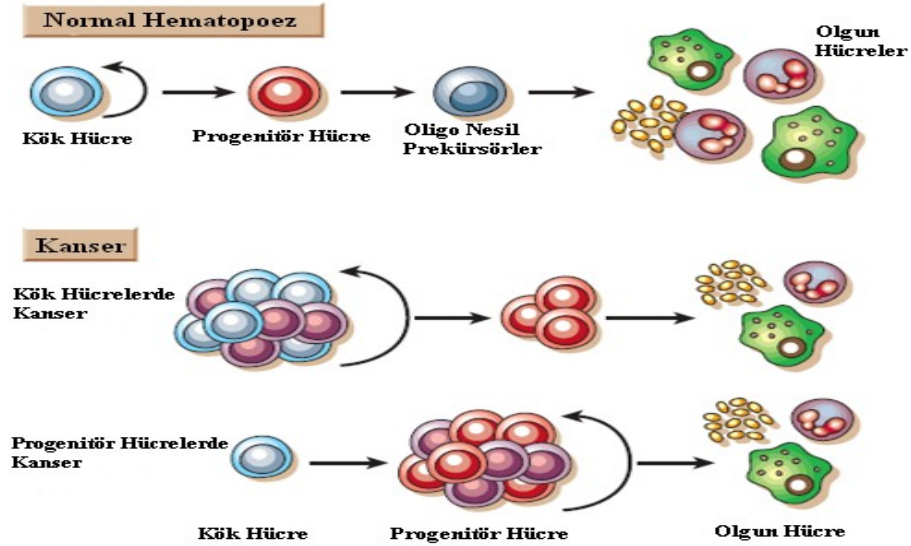
Kesin nedenleri bilinmemesine rağmen, hem genetik hem de çevresel faktörlerin önemli etkisi olduğu düşünülmektedir. Günümüzdeki çalışmalar lösemi hücrelerinin büyümesini, farklılaşmasını ve fonksiyonunu uyaran hücresel sinyaller ve bu sinyallerin etkileştiği genetik faktörler üzerine yoğunlaşmıştır. Yapılan çalışmalar arasında, hücre bölünmesi ve farklılaşmasında düzenleyiciler olarak görev yapan sitokin proteinlerinin sitoplazmik tirozin kinazları sürekli uyarması sonucunda onkojenik sinyal iletimi, dönüşüm (transformasyon) gibi maliyn hücresel olayların oluşumu da yer almaktadır. Bu çalışmada, K562 hücre hattına MP ve VD-3 ajanlarının tek başına ve birlikte kullanımlarının, sitokin sinyal baskılayıcıları olarak bilinen sitokin sinyal baskılayıcı (Suppressor of Cytokine Signalling = SOCS) genlerinin ifadesi üzerindeki etkileri hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. HEMATOPOEZ VE LÖKOSİTLER

2.1.1. Hematopoez

Kan hücrelerinin ömürleri sınırlı olduğundan sürekli olarak yerine yenilerinin üretilmesi gerekmektedir. Kan hücreleri kök hücrelerden köken alarak oluşur ve bu süreç 'hematopoez' olarak adlandırılır. Hematopoezin oluşumunu anlamak büyük önem taşır. Çünkü hematopoezde oluşabilecek hatalar miyeloid ve lenfoid kökenli lösemilerin oluşumuna neden olabilmektedir (Şekil 2.1) [6].



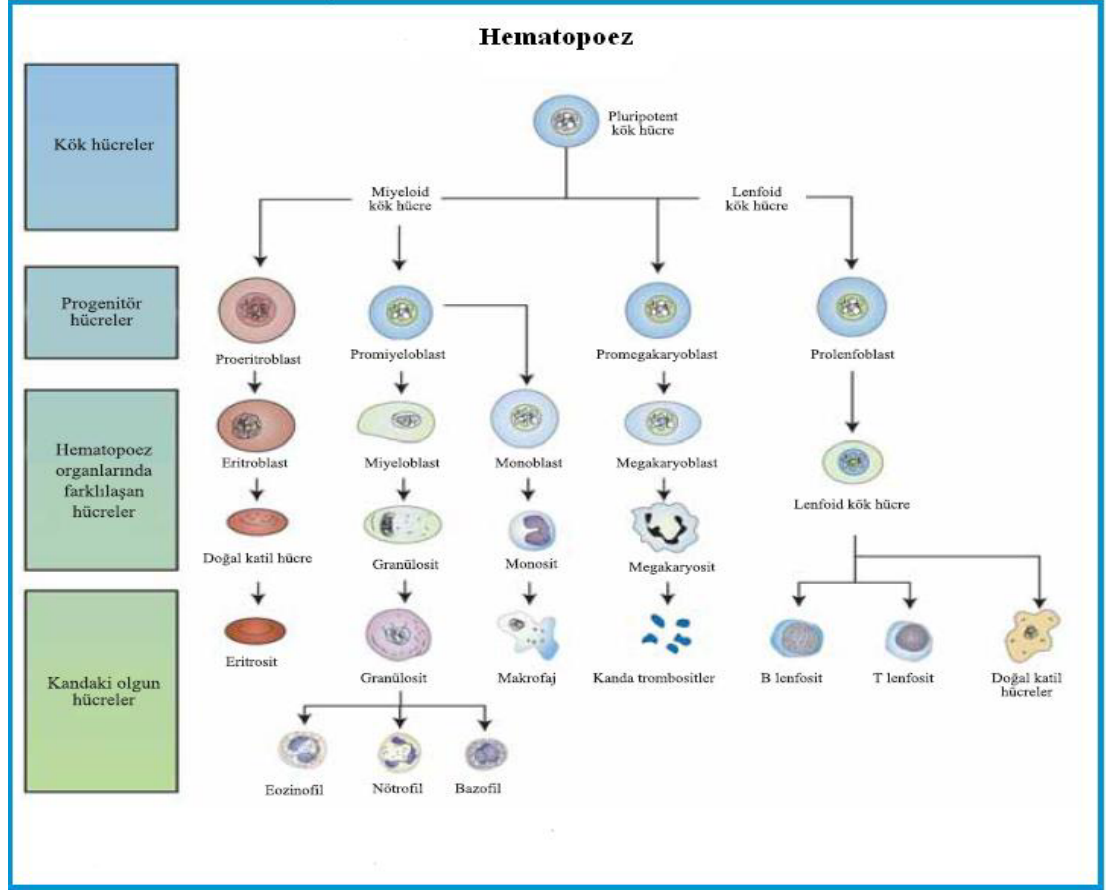
Şekil 2.1. Hematopoetik kök hücre gelişimi ve lösemik dönüşümü sırasında hücrelerin kendini yenilemelerinin karşılaştırılması [7].

Hematopoez, fetus gelişimi boyunca karaciğer, dalak, timus ve lenf düğümlerinde meydana gelir. Hamileliğin son 3 ayından itibaren kemik iliği (Kİ) kan hücrelerinin merkez üretim yeri olur. Kırmızı Kİ içinde kan hücreleri pluripotent kök hücrelerinden köken alır. Pluripotent kök hücreler birçok hücre tipine farklılaşabilen hücrelerdir. Pluripotent kök hücreler de miyeloid ve lenfoid kök hücrelerine farklılaşır (Şekil 2.2, Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Kemik iliğindeki kök hücre tipleri [6].

Kemik İliğindeki Kök Hücre Tipleri	
Kök Hücre Tipi	İşlevleri
Miyeloid	Kırmızı kemik iliğinde gelişir Eritrositler, monositler, makrofajlar, nötrofiller, eozinofiller, bazofiller ve trombositlerin kökenidir
Lenfoid	Kırmızı kemik iliğinde gelişmeye başlar ancak tam farklılaşma lenf dokularında (lenf düğümleri, timus, dalak) olur B ve T lenfositlerinin kökenidir

Miyeloid ve lenfoid kök hücreler bu dönemden sonra progenitör (öncül) hücrelere farklılaşır. Progenitör hücreler kanın özelleşmiş elemanlarına farklılaşma gösteren hücrelerdir. Bundan sonraki aşamalarda 'blast' hücresi olarak bilinen prekürsör (öncül) hücrelerin birkaç hücre bölünmesiyle kanın terminal farklılaşan elemanları oluşur (Şekil 2.2) [6].



Şekil 2.2. Hematopoetik kök hücreden kanın şekilli elemanların oluşumu [6].

2.1.2. Lökositler

Çekirdekli kan hücreleridir. Genellikle vücudu enfeksiyona karşı korumada, ölü veya hasarlı hücrelerin uzaklaştırılmasında rol alırlar. Sitoplazmalarında granül bulunup bulunmamasına göre iki çeşit lökosit vardır:

- Granülositler
- Agranülositler (Çizelge 2.2) [6].

Çizelge 2.2. Lökosit tipleri

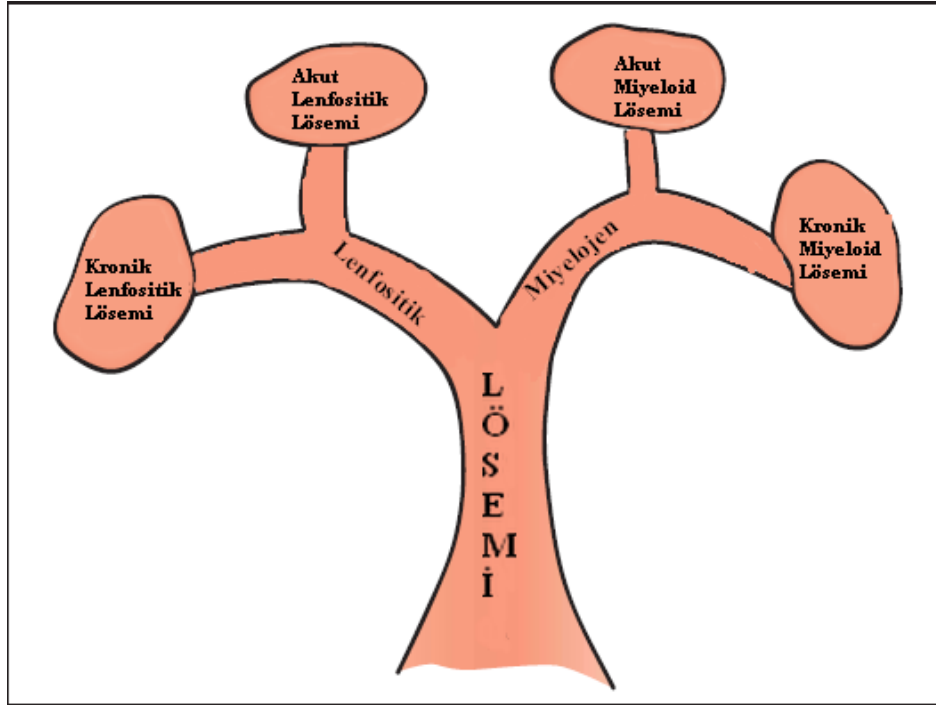
Lökosit Tipleri		
Hücre Tipi	Özelliği	Fonksiyonları
Granülositler		
Nötrofiller	Lökositlerin yaklaşık %55'ini oluşturur	Mikroorganizmaları ve artıkları fagositoz yoluyla yok eder
Eozinofiller	Lökositlerin %1-4'ünü oluşturur	Fagositoz yapar, ayrıca enflamasyon (yangı) ve alerjenlere karşı aşırı duyarlılık reaksiyonlarının düzenlenmesinde rol alır
Bazofiller	Lökositlerin %1'inden azını oluşturur	Yaralanma ya da enfeksiyonda lokal yangı reaksiyonunu artırır, nötrofilleri buraya çeker, alerjik reaksiyonları başlatır
Agranülositler		
Monositler ve makrofajlar	Birlikte lökositlerin %3-7'sini oluştururlar. Monositler olgunlaşmamış makrofajlardır	Fagositozda görevlidir ve doğal bağışılığa (innate) yanıtta antijenleri lenfositlere sunar
Lenfositler	Lökositlerin %36'sını oluşturur Çoğu kan dolaşımından ziyade lenf dokusunda bulunur	B hücreleri: Enfeksiyon ya da toksik maddelere direnç sağlayan antijenlere bağlanan antikolar yapar T hücreleri: Enfeksiyon ya da toksik maddelere direnç sağlayan antijenlerin ifade edildiği hücrelere saldırır Doğal katil hücreler: Bazı tümör hücrelerini ve virüsle enfekte edilmiş hücreleri öldürür

2.2. Lösemi

Lösemi kemik iliği ve kan kanseri olarak adlandırılmaktadır. 19. yy'da Avrupalı hekimler, beyaz kan hücrelerinin önemli oranda arttığı hastaları gözlemlediklerinde bu hastalığı 'beyaz kan' olarak adlandırmışlardır. Daha sonraki çalışmalarda da anlamı 'beyaz' olan Yunanca'da 'Leukos' kelimesini, 'kan' anlamına gelen 'haima' kelimesiyle birleştirerek 'leukemia (lösemi)' olarak isimlendirmişlerdir [8].

Hücre tipine göre lösemiler 'miyeloid' ve 'lenfositik' olarak ikiye ayrılmaktadır. Miyeloid ve lenfositik lösemilerin her biri 'akut' veya 'kronik' olarak ilerlemektedir. Bu özelliklerine göre lösemiler dört gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.3) [8]:

1. Akut Lenfositik (Lenfoblastik) Lösemi (ALL)
2. Akut Miyeloid Lösemi (AML)
3. Kronik Lenfositik Lösemi (KLL)
4. Kronik Miyeloid Lösemi (KML) [9].



Şekil 2.3. Lösemi tipleri [2].

AML ve ALL'de hücreler normal fonksiyon gösterememektedir. Ayrıca kemik iliğinde normal hücrelere yer bırakmaz ve bu yüzden kemik iliğinde yeni oluşan normal hücrelerin sayısında azalma görülür. Bu durum kırmızı kan hücrelerinin azalmasıyla sonuçlanır (anemi) [9].

KML'de hücreler neredeyse normal hücreye benzer fonksiyon gösteren kan hücreleri (eritrositler, lökositler ve kan pulcukları) yapar. Alyuvarların sayısı genellikle normalin altındadır ve anemiye neden olur. Ama birçok akyuvar ve bazen de kan pulcuğu üretimi devam etmektedir. Akyuvarların çalışmaları normale yakın olsa da sayıları yüksektir ve artmaya devam etmektedir. Hasta tedavi edilmezse bu durum ciddi problemlere neden olabilir. Eğer tedavi yapılmazsa, beyaz hücre sayısı kan akışını yavaşlatacak kadar yükselebilir ve şiddetli anemi gelişir [9].

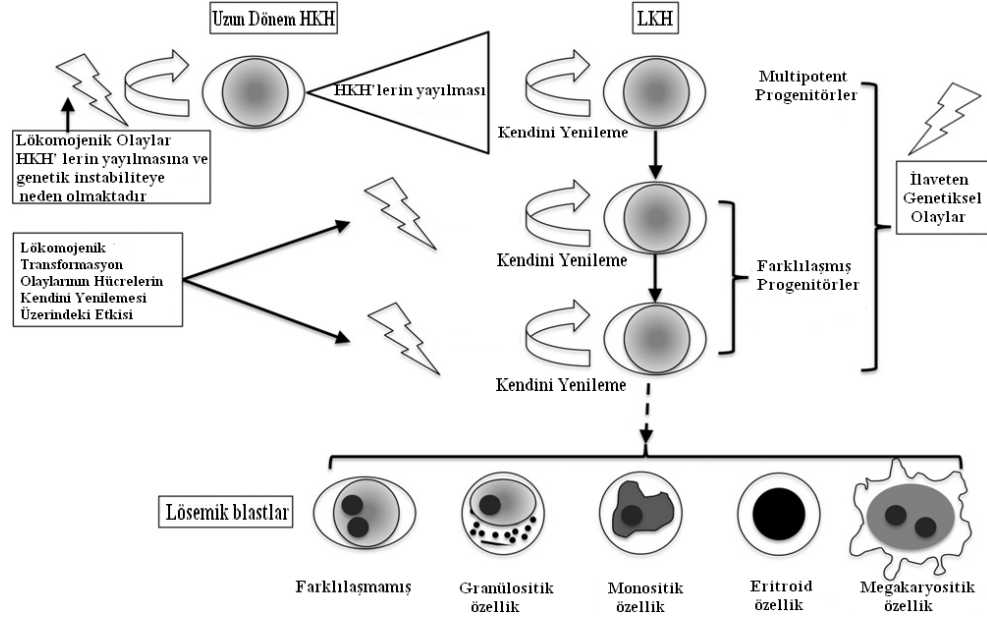
KLL'de lösemi hücresi fonksiyon göstermeyen çok sayıda lenfosit oluşturur. Bu hücreler kemik iliği ve lenf nodlarındaki normal hücrelerin yerini alır. Lenfositlerin normal çalışmasına müdahale eder ve bu nedenle hastanın immün cevabı zayıflar. Kemik iliğinde bulunan çok sayıda lösemi hücresi normal kan hücrelerini sıkıştırır ve anemiye neden olur. Ayrıca kemik iliğinde oluşan çok sayıda lösemi hücresi beyaz küre (nötrofil) ve trombosit sayılarının düşmesine de neden olmaktadır [9].

Erişkinlerde en sık görülen tipler AML ve KLL'dir. ALL lösemisinin çocuklarda en yaygın görülen şeklidir [9].

Sitogenetik çalışmalarda lösemilerin yaklaşık yarısında sık tekrarlayan translokasyonlar, inversiyonlar ve delesyonlar şeklinde kromozom anormalliklerinin bulunduğu tespit edilmiştir. Etkilenen bölgelerde bulunan genler incelendiğinde hematopoetik sistemin gelişimi ve normal işlevi sırasında olduğu belirlenmiştir [10].

Lösemilerin moleküler biyolojisi hakkında bu güne kadar yapılmış olan çalışmalar sonucunda şu genel bilgiler yapılmıştır; [10]

- Somatik dokularda kromozom anomalisi sonucu gen ifadesi kontrol mekanizmalarının bozulması ya da kesilmesiyle özel bir hematopoetik farklılaşma hattının gelişimi lösemiyle sonuçlanabilir.
- Gen düzenlenmesinin kesilmesi ya da bozulmasıyla oluşan lösemi hücrelerinde farklı kromozomlardaki genlerin birleşmesiyle kimerik gen bölgelerinin olduğu da tespit edilmiştir. Bu gen bölgelerinin maliyn dönüşümüne etken olabileceği tespit edilmiştir.
- Hücrede normal transkripsiyonu kontrol eden bir genin başka bir genin kontrolüne girmesiyle oluşan anormal gen aktivasyonları gerçekleşmektedir. Bunun sonucunda lenfositte kromozomal translokasyonlar meydana gelir ve gen ifadesinin kontrolü bozulur. Ayrıca nokta mutasyonları, gen delesyonları ve epigenetik değişiklikler de lösemnin başlaması ya da ilerlemesinde etkili olabilmektedir.
- Lösemiler monoklonal (tek bir hücreden) çoğalırlar. Translokasyonların bir kısmı, hematopoetik farklılaşmada rol oynayan transkripsiyon faktörlerini etkiler ve böylece diğer normal hücrelerin farklılaşma mekanizması durdurulur.
- Bazı lösemiler, lösemiye farklılaşmış “lösemi kök hücreleri”nden gelişmektedir (Şekil 2.4.) [10].



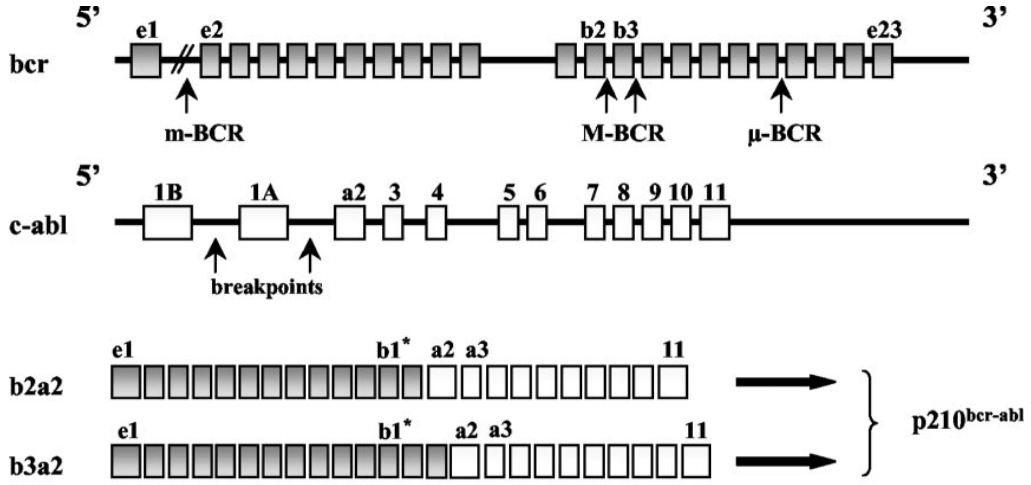
Şekil 2.4. Lösemi hücrelerinin lösemi kök hücrelerinden gelişimi [11].

2.2.1. Kronik Miyeloid Lösemi

Kronik miyeloid lösemi miyeloid, eritroid ve megakaryositik hücrelerinin çoğalmasıyla oluşan klonal bir hastalıktır [15]. Kemik iliğinde aşırı çoğalma, periferel kanda olgun miyeloid hücrelerden oluşan yüksek lökosit sayısı ile karakterize edilmektedir [12]. Akut lösemide görülen patolojik durumun aksine, kronik miyeloid lösemi hücreleri farklılaşma yeteneklerini kaybetmemişlerdir [12].

KML terimi bugüne kadar; kronik granülositik lösemi, kronik miyelojen lösemi ve kronik miyelositik lösemi olarak da isimlendirilmiştir. KML araştırmalarında en önemli olay, Nowell ve Hungerford tarafından 1960 yılında *Philadelphia kromozomu*'nun bulunması olmuştur. İlik hücrelerinde G grubu kromozomda (9. kromozom) uzun kolun büyük parçasının koparak kaybolduğunu tanımlamış, ancak kopan parçaya ne olduğunu anlayamamışlardır [14-15]. Rowley 1973 yılında yaptığı bir çalışmada giemsa boyama yaparak, kromozom bantlama yöntemi ile 9. kromozomdaki kopan parçanın kaybolmadığını 22. kromozomun uzun koluna transloke olduğunu belirtmiştir. 1980'li yıllarda bu translokasyon sonucunda, 210 kd'luk bir onkoprotein ürettiği tespit edilmiştir (Şekil 2.5) [16]. Bu

onkoprotein hücresel çoğalmayı olumsuz yönde etkileyen proteinleri fosforile etmektedir. Özellikle de miyeloid hücre dizisi boyunca, farklılaşan hücrelerin farklılaşma mekanizmasını etkileyip hücrelerin çoğalmasına ve KML hücre klonlarının artmasına neden olmaktadır. Bu proteinler hücrenin bir takım özelliklerini değiştirip hücrenin apoptozunu inhibe etmektedir [17-18].



Şekil 2.5. Bcr ve Abl genlerinin moleküler yapısı ve p210 onkogeninin oluşumu [19].

Bcr-abl kimerik onkogeni ras, MAP kinaz, STAT ailesi, PI3 kinaz gibi çoklu sinyal iletim yollarıyla etkileşmektedir [18].

KML hastalarında normal hematopoetik kök hücreleri hayatta kalmaktadır, ancak KML hücrelerinin çoğalması sonucunda bu hücrelerin hücre döngüsünün G₀ fazında dinlenme durumuna geçebildikleri düşünülmektedir. Belirli koşullar altında bu hücrelerin çoğalmaya gidebildikleri bilinmektedir ve bu nedenle otolog kök hücre naklinde önemli olmaktadır (otolog kök hücre: canlının kendisinden alınan kök hücre) [13].

2.2.1.1. KML’de klinik fazlar

KML’de hastalığın başlangıcı ve seyrine göre; *başlangıç (kronik) faz*, *hızlanmış (accelerated) faz* ve *blast faz* olmak üzere üç klinik faz karakterize edilmiştir [3, 13, 21]:

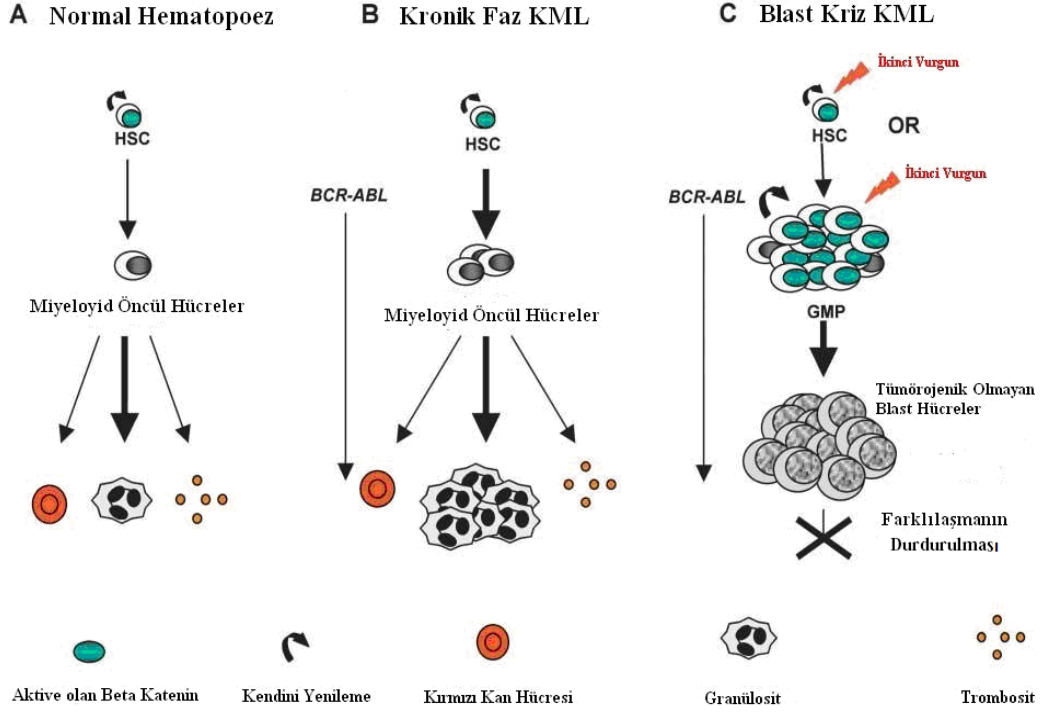
1. *Kronik Faz*: Başlangıç faz olarak da bilinir. Kronik fazda genellikle kemik iliği ve kanda miyeloid öncül hücrelerinin sayısı önemli derecede artmaktadır [3]. Hastaların %90’ından fazlası erken kronik fazda teşhis edilebilmektedir. Kan miktarı genel olarak sabit olup, blast hücrelerinin kemik iliği ve kandaki miktarı genel olarak %5’in altındadır. KML’nin ilk teşhis edildiği dönemlerde, insanların çoğunda dalak büyümesi ve beyaz kan hücrelerinin miktarında artış görülmektedir [20]. Bazofil ve eozinofil sayısı artar. Trombosit sayısı normal veya artmış olabilir [3, 22].

2. *Hızlanmış (Akselere) Faz*: Kronik faz genellikle 2-4 yıl sonra akselere veya blastik faza geçer [19]. Kemik iliği veya periferik kanda blast sayısı %10-19 arasındadır. Tedaviye rağmen dalakta büyüme ve lökosit sayısında artış gözlenir.

3. *Blast Faz*: En son aşamadır. Blastik kriz olarak da bilinmektedir. Kemik iliği ve kanda blast hücrelerinin sayısının hızlı bir şekilde artmasına bağlı olarak, hastalık hızlı bir şekilde ilerlemektedir. Normal kan hücrelerinin üretiminin düşmesi ve kanamaların artmasıyla anemi oluşur. Blast hücreleri dalakta, lenf düğümlerinde, deride ve merkezi sinir sisteminde birikebilir [21]. Bu fazdaki hücreler kemoterapiye oldukça dirençlidir. Ayrıca kök hücre nakli önemli bir yarar sağlamamaktadır ve 5 yıla kadar yaşama olasılığı yaklaşık olarak % 6’dır. Blast dönemi daima öldürücü olmaktadır [22].

Bazı hastalarda kronik fazdan hızlandırılmış faza ve en son olarak blastik faza geçiş görülürken, hastaların %20-25’inde hızlandırılmış faz görülmeden blastik faza geçiş gözlemlenmiştir. Hastalığın ilerlemesiyle birlikte hastaların %50-75’inde **Ph** (*Philadelphia*) kromozomunun dışında, farklı kromozomal değişimler de görülmektedir. Örnek olarak; trizomi 8, trizomi 19 gibi [22].

Deininger ve ark. Bcr-Abl onkogeninin sürekli olarak, hematopoetik hücrelerin dönüşümüne neden olan protein tirozin kinazı aktive ettiğini tespit etmişlerdir (Şekil 2.6) [23].



Şekil 2.6. Kronik faz-blastik faz KML ve normal hematopoez arasında kök hücre gelişiminin karşılaştırılması. HSC; hematopoetik kök hücre [23].

2.3. JANUS KİNAZ AİLESİ – SİNYAL İLETİCİLER VE TRANSKRİPSİYON AKTİVATÖRLERİ

Janus kinaz (JAK) / Sinyal ileticiler ve transkripsiyon aktivatörleri (Signal transducers and activators of transcription = STAT) yolu dış etkenlere karşı hayvanlarda metabolizmanın korunması (homeostaz) ve hayvanların gelişimi için çok sayıda sinyal ile ilişkili olan karmaşık bir sinyal iletim yoludur. Sitokinler ve büyüme faktörleri için temel bir sinyal mekanizmasını oluşturmaktadır [24].

Hüresel düzenleyici proteinler olan sitokinler çeşitli uyarılara karşı cevap olarak özel hücreler tarafından salgılanarak hedef hücrelerinin davranışını

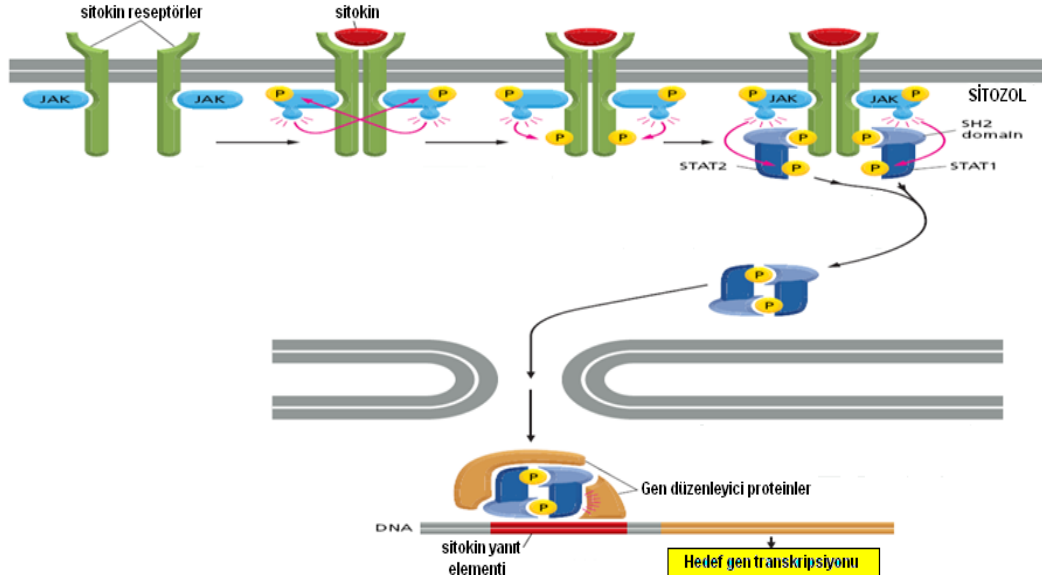
etkilemektedirler. Sitokinler hücre bölünmesi ve farklılaşmasının kontrolünde, hematopoez ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde, yaraların iyileşmesinde, kemik şekillenmesi ve hücrel metabolizmanın değiştirilmesinde rol oynamaktadır [25].

Sitokinler başlıca altı ana gruba ayrılır:

- 1) Büyüme faktörleri (Epidermal büyüme faktörü, EGF; Trombosit orijinli büyüme faktörü, PDGF; insülin benzeri büyüme faktörü-1, IGF-1; İnsülin benzeri büyüme faktörü-2, IGF-2; Sinir büyüme faktörü (NGF); Asidik fibroblast büyüme faktörü, aFGF; Bazik fibroblast büyüme faktörü, bFGF; Nörolökin; Hepatosit büyüme faktörü, HGF v.b.) [25].
- 2) Lenfokinler (İnterlökin-1a, IL-1a; II-1b; IL-2; IL-3; IL-4; IL-5; IL-6; IL-7; IL-8; IL-9; IL-10; IL-11; IL-12; IL-13; IL-14; IL-15,...,37) [26].
- 3) Koloni uyarıcı faktörler (Granülosit/makrofaj koloni teşvik eden faktör, GM-CSF; Granülosit-CSF; Multi-CSF; Eritropoetin, EPO; Lösemi inhibitör faktör, LIF)
- 4) Transforme edici büyüme faktörleri (TGF-a; TGF-b)
- 5) Tümör nekroz faktörleri (TNF-a; TNF-b)
- 6) İnterferonlar (IFN-a; IFN-b; IFN-g) [25].

Janus kinazlar hücre yüzey reseptörlerine bağlı olan sitoplazmik tirozin kinazları oluşturmaktadırlar. Bugüne kadar memelilerde dört farklı janus kinaz olduğu saptanmıştır: JAK-1, JAK-2, JAK-3, ve TYK-2. Sitokinlerin reseptörle etkileşimi sonucu reseptörlerde dimerizasyon veya oligomerizasyon gerçekleşir ve bunun sonucunda JAK'lar otomatik olarak fosforillenir ve STAT molekülleri olarak bilinen ve sitosolde bulunan transkripsiyon faktörlerinden iki tanesi sitosoldan gelip janus kinazlara bağlanır. STAT proteinleri, yapılarındaki SH2 (Src homoloji bölgesi) ile JAK'ların korunmuş Tyr bölgesine bağlanarak fosforillenir. Fosforillenmiş iki STAT molekülü de bu reseptörden ayrılır ve SH2 bölgeleri

aracılığıyla birbirine bağlanıp çekirdeğe doğru hareket ederek sitokin yanıt bölgelerinde bulunan DNA yanıt gen elementlerine bağlanarak transkripsiyonu başlatır (Şekil 2.7) [24, 27-28].



Şekil 2.7. JAK/STAT Mekanizmasının İşleyişi [27].

Bugüne kadar yedi STAT molekülü tanımlanmıştır: STAT-1, STAT-2, STAT-3, STAT-4, STAT-5a, STAT-5b ve STAT-6 [24, 27-28].

STAT proteinlerinin bir N-uç oligomerizasyon bölgesi, SH2 ve SH3 bölgesi, DNA bağlama bölgesi ve C- uç transaktivasyon bölgesi bulunmaktadır [24, 27-28].

STAT'lar hücre içinde birbirine zıt olaylara aracılık edebilmektedirler. Apoptozu uyarabildikleri gibi hücrenin çoğalmasını da uyarabilmektedirler. Örneğin interferon molekülünün hücre çoğalmasını durdurucu etkisinde STAT1 proteini görev alırken, STAT5 de IL-3 molekülünün hücre çoğalması üzerindeki etkisine yardımcı olmaktadır [29].

STAT proteinlerinin hücrel dönüşümde ve onkogeneze de rol aldıkları bilinmektedir. Çünkü STAT'ların hücre döngüsü kontrol noktalarında, DNA

tamirinde önemli rollerinin olduğu bilinmektedir. İmmün yanıtta da anahtar rolleri vardır. STAT sinyalindeki herhangi bir hata, tümör gelişimine neden olabilmektedir [30].

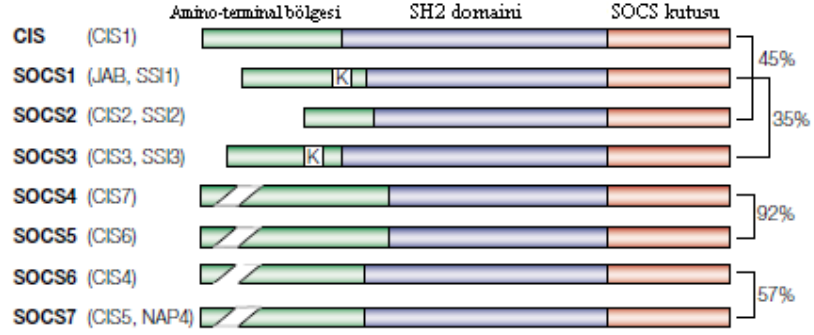
Primer kanserlerde ve tümör kökenli hücre hatlarında STAT proteinlerinin sürekli olarak forforile edildiği belirtilmiştir. Bazı tümör kökenli hücre hatlarında özellikle de STAT-3, transforme fenotipin korunmasında gerekli olmaktadır. STAT-5 molekülü özellikle de lösemi ve lenfomalarda yaygın olarak görülmektedir. BCR/ABL füzyon geninin oluşumundan sonra ABL genine bağlı olarak, STAT5'in sürekli aktive edildiği gözlenmiştir [31]. Bunun bir sonucu olarak JAK-STAT mekanizması sürekli olarak açık kalmaktadır [32].

2.4. SİTOKİN SİNYAL BASKILAYICILARI

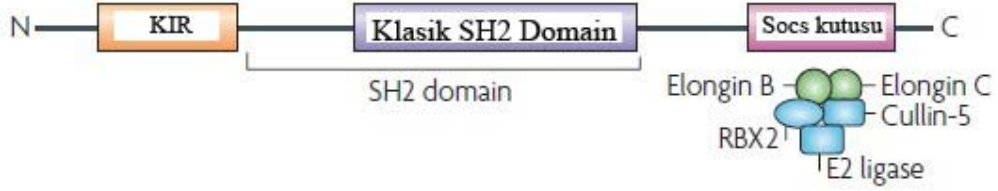
Hücrede birçok sitokin sinyal iletiminin kısıtlı olduğu açıkça bilirse de, düzenlenmesinin altında yatan mekanizmalar iyi anlaşılammaktadır. Sitokin aktivitesindeki en önemli sınırlama, sitokinin kendi düzenlenme ürünü ile sağlanabildiği düşünülmektedir [33].

JAK/STAT mekanizması ile oluşan sitokin sinyal iletimi kısmi olarak, sitokin sinyal baskılayıcı genler olarak (SOCS) veya sitokin uyarıcı SH2 proteinleri (CIS) olarak bilinen endojen JAK kinaz inhibitör proteinleri tarafından düzenlenmektedir [34].

Bugüne kadar SOCS ailesinin tanımlanmış 8 üyesi bulunmaktadır: SOCS-1, SOCS-2, SOCS-3, SOCS-4, SOCS-5, SOCS-6, SOCS-7 ve CIS (Sitokin uyarıcı Src homoloji-2 proteini). Bunlardan CIS, SOCS-1, SOCS-2 ve SOCS-3 özellikleri en iyi araştırılmış olanlarıdır. Şekil 2.8.'de belirtildiği gibi SOCS proteinlerinin her birinde SOCS kutusu olarak adlandırılan bir C-terminalinde yer alan "40-amino asit modülü", merkezi bir SH2 domaini ve çeşitli uzunlukta N-terminal domaini bulunmaktadır [35-36-37].



Şekil 2.8. SOCS protein ailesi. Literatürde yer alan alternatif isimleri: JAB, Janus kinaz bağlayıcı domain; NAP4, Nck Ash ve fosfolipaz-C bağlayıcı protein; SH2, Src homoloji domaini; SSH, STAT tarafından uyarılmış STAT inhibitörü. SOCS proteinleri SH2 domaini ve SOCS kutusu bakımından benzerlik gösterebilir de benzerlik oranları farklılık göstermektedir. SOCS-1 ve SOCS-3 proteinlerinde kinaz inhibitör bölgesi (K) bulunmaktadır [35].

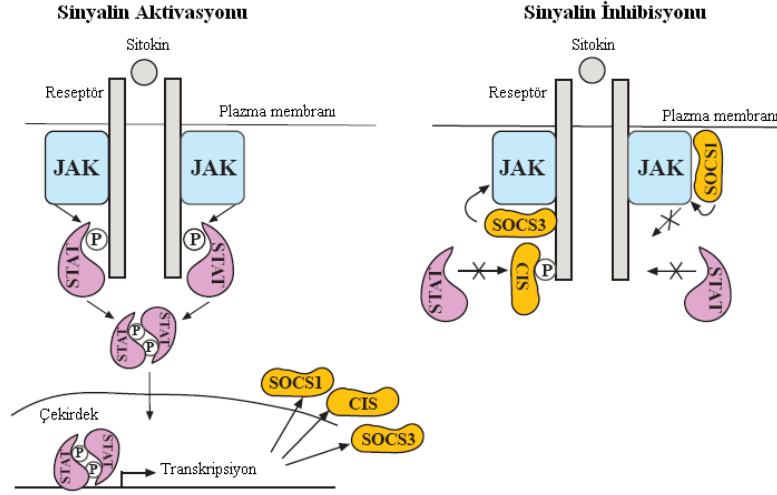


Şekil 2.9. SOCS proteinlerinin yapısı, KIR (K): Kinaz inhibitör bölgesi (Kinase Inhibitor Region)

SOCS kutusu, elongin B ve elongin C, cullin-5, yüzük-kutu-2 (RBX2) ile etkileşime girmekte (Şekil 2.9) ve böylece, etkileştikleri proteinlerin parçalanmasına neden olmaktadır [38, 72].

SOCS proteinleri normalde aktif değildirler. Ancak sürekli aktif JAK-STAT sinyali sonucunda çekirdekte hızlı bir şekilde transkribe olurlar ve JAK-STAT mekanizmasını durdurmaya yönelik aktive olurlar [34].

SOCS proteinleri ya JAK'a bağlanarak JAK aktivitesini durdurur ya da STAT moleküllerinin bağlanması gereken bölgelere bağlanarak sinyal iletimini durdururlar (Şekil 2.10) [39].



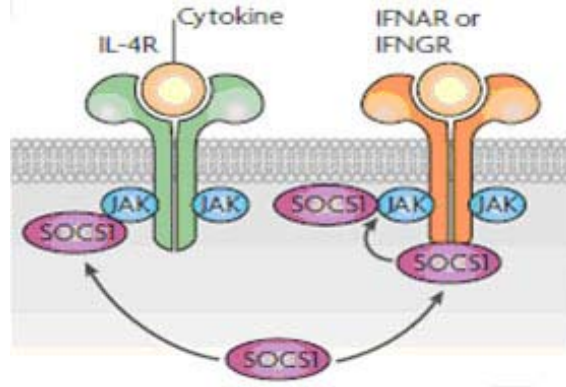
Şekil 2.10. JAK-STAT sinyal yolunun SOCS proteinleri tarafından düzenlenmesi [36].

2.4.1. SOCS-1 ve SOCS-3 Proteinleri ve Mekanizmaları

2.4.1.1. SOCS-1 proteini

SOCS-1 proteini, JAK-bağlanan protein (JAB), STAT tarafından uyarılmış STAT inhibitörü-1 (STAT-induced STAT inhibitor-1=SSI-1) olarak da isimlendirilmektedir. STAT-1, STAT-3 ve STAT-6 bağlama bölgesi bulunmaktadır [38].

SOCS-1 geni SH2 domainiyle JAK'ın tüm üyelerine bağlanabilir ve tirozin kinaz aktivitesini inhibe eder. SOCS-1'in N- terminal domainindeki "K" bölgesi JAK'ın psödo-substrat inhibitör bölge sekansı ile homoloji gösterir. Bu bölge JAK aktivasyon bölgesine bağlanır ve JAK'ın katalitik aktivitesini durdurmaktadır (Şekil 2.11) [34-35].



Şekil 2.11. SOCS-1 geninin genel olarak etkileştiği reseptörler ve aktivasyonu [38].

In vitro çalışmalarda IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-12, IFN γ , eritropoetin, granülosit-koloni teşvik edici faktör (G-CSF), granülosit monosit koloni teşvik edici faktör (GM-CSF), lösemi inhibitör faktör, prolaktin, büyüme hormonu (GH) gibi çeşitli moleküller tarafından SOCS-1 geninin uyarıldığı tespit edilmiştir. Yine bu moleküllerin devamlı olarak uyardığı sinyallerin de SOCS-1 tarafından durdurulabileceği düşünülmüştür [40].

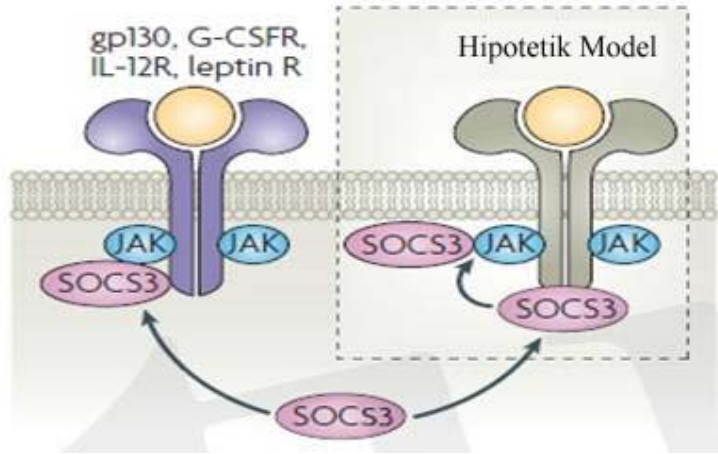
Yapılan çalışmalarda transgenik farelerin T hücrelerinde sürekli aktif olan SOCS-1 geninin çoklu sitokin sinyallere yanıtı durdurduğu belirlenmiştir. SOCS-1^{-/-} farelerin karaciğer hücrelerinde yağların bozunması ve bazı organlarda hematopoetik birikim olduğundan dolayı bu farelerin doğumdan yaklaşık üç hafta sonra öldükleri tespit edilmiştir. Lenfoid organlarda da lenfositlerin apoptozunu hızlandırması ve periferik kan dolaşımında lenfositlerin azalması sonucunda lenfopeninin oluştuğu tespit edilmiştir. Bu hastalıklarda IFN γ 'ya karşı duyarlılığın arttığı belirlenmiştir [35, 41].

SOCS proteinlerinin aktivitelerinin düzensiz olması bir takım hastalıkların başlamasına neden olabileceği gibi, SOCS genlerinin işlevinin değişmesi potansiyel terapötik seçenekler de sağlayabilir. Örneğin; akut lenfoblastik lösemi gibi hematolojik hastalıklarda JAK-STAT mekanizmasının sürekli olarak aktif olduğu bilinmektedir. Bu tip hastalıklarda JAK-STAT sinyal iletiminin 12. kromozomda bulunan TEL (Translocation ETS Leukemia: ETS lösemi translokasyonu) geni ile 9.

kromozomda bulunan JAK2 genlerinin translokasyonu ile oluşan TEL-JAK2 füzyon bölgesi tarafından sürekli olarak uyarıldığı ve bunun sonucu olarak STAT-5 molekülünün devamlı aktif olduğu tespit edilmiştir. Kamizono ve ark. Ba/F3 (öncül B hücre hattından köken alan ölümsüz mürin) hücrelerinde SOCS-1 proteinindeki SOCS kutusunu genetik olarak modifiye etmişlerdir. SOCS-1'in bu şekilde TEL-JAK2 füzyon proteinini proteozomal olarak parçaladığı görülmüştür. Ayrıca hücrelerin apoptoza girdiği de tespit edilmiştir. Bunun sonucunda da bazı lenfoid maliyenlerde tedaviye yönelik yarar sağlayabileceği düşünülmüştür [35, 42-43].

2.4.1.2. SOCS-3 proteini

Sitokin reseptörü üzerinde Janus kinaza yakın bir bölgeye bağlanarak JAK'ın aktivitesini durdurmaktadır (Şekil 2.12). Ayrıca JAK2 genine de bağlanabilmektedir ancak SOCS-1 genine göre daha zayıf bağlanmaktadır. SOCS-3 geninin promoter bölgesinde STAT-1 ve STAT-3'e bağlanan bir element bulunmaktadır [40].



Şekil 2.12. SOCS-3 geninin genel olarak etkileştiği reseptörler ve aktivasyonu [38].

STAT-5b'nin de SOCS-3'ün ifadesinde düzenleyici olduğu belirlenmiştir. STAT-5b'nin hatalı olarak çalıştığı farelerde karaciğerde büyüme hormonu tarafından uyarılmış SOCS-3 mRNA'sının ifadesinin azaldığı görülmüş ve STAT-5b'nin SOCS-3 promoter bölgesindeki STAT-1 ve STAT-3 elementine bağlanabildiği tespit edilmiştir [40].

2.5. K562 HÜCRE HATTI

K562 hücre hattı, eritroid hücrelerinin farklılaşmasında in vitro deney çalışmalarında en iyi bilinen bir hücre hattıdır. Lozzio ve Lozzio tarafından, K562 hücre hatlarının blast dönemindeki bir KML hastasının plevral sıvısından geliştiği belirtilmiştir [44]. K562 hücre hattı standart hücre büyüme koşulları altında düşük oranda hemoglobin hücreleri sentezler. Ancak hemin, sitozin arabinozot, bütirik asit ve 5-azasitidin gibi çeşitli bileşenlerle muamele edildiğinde eritroid farklılaşma gerçekleşmektedir. Böylece, K562 hücre hattı embriyonik ve fetal globin genlerinin ifadelerinin düzenlenmesinde moleküler çalışmaların yanı sıra farklılaştıran yeni bileşenlerin tedavi edici özelliklerinin tanımlanmasında ve anti tümör ilaçların geliştirilmesinde çok kullanışlı bir model oluşturmaktadır [45].

2.6. NÜKLEER HORMON RESEPTÖRLERİ ve STEROİDLER

2.6.1. Nükleer Hormon Reseptörleri

Nükleer hormon reseptör ailesi steroid hormonlar, retinoik asitler, tiroid hormonları, yağ asitleri, lökotrienler ve prostaglandinler gibi molekülleri kapsamaktadır [28, 46].

Nükleer reseptörler transkripsiyonel düzenleyicilerin çoğunluğunu oluşturmaktadır. Homeostaz, üreme, gelişim ve metabolizma gibi çok çeşitli fonksiyonları düzenlemekle beraber, asıl fonksiyonu baskılama, baskılamayı kaldırma ve transkripsiyon aktivasyonu ile ilişkilidir [46]. Küçük lipofilik moleküllere bağlanarak gen ifadesini düzenlerler. Bu proteinler sitoplazma ve çekirdekte bulunan transkripsiyon faktörleridir. Steroid hormonlar, tiroid hormon, vitamin A ve D'den oluşan hormonlar gibi nükleer reseptör ligantları lipofilik özelliktedir. Ligantlar bu özelliklerinden hücre zarını difüzyon yolu ile geçerler ve sitoplazma veya çekirdekte bulunan reseptörlerine bağlanmaktadır. Genlerin kontrol bölgelerinde bulunan DNA elementlerine bağlanarak bu genlerin transkripsiyonunu etkileyerek hormonal sinyali gen ifadesi düzeyinde değiştirmektedirler [28].

Nükleer reseptörler değişken bir N-uç bölgesi, korunmuş bir DNA bağlama bölgesi, değişken bir menteş bölgesi, korunmuş bir ligand bağlama bölgesi ve değişken bir C uç bölgesi içermektedir [46-47]. DNA'ya bağlanan bölge hormon yanıt elementleri olarak bilinen özgül DNA sekanslarına bağlanır ve yüksek olarak korunmuş iki çinko parmak modelinden oluşmaktadır [48]. Ayrıca nükleer reseptörlerin dimerizasyonundan sorumludur [46]. Liganda bağlanan bölge hormon tanımlayıcıdır ve fizyolojik yanıt oluşturur. Liganda bağlanan bölge moleküler bir saat gibi düşünülür ve bu bölgeye ligand bağlandığı zaman reseptörü transkripsiyonel olarak aktif duruma getirir [49].

Nükleer hormon reseptörleri gen ifadesini DNA düzeyinde kontrol edebildiklerinden kanser gibi birçok hastalıklarda, organizma gelişiminde ve temel hücresel olaylarda önemli roller oynamaktadır [47]. Ayrıca, ilaç tasarımı ile kolayca değiştirilebilir küçük moleküllere bağlanabildiklerinden umut verici hedefler oluşturmaktadır [46].

2.6.1.1. Steroidler ve Mekanizmaları

Steroid hormonlar nükleer hormon reseptör ailesinin alt grubudur. Steroidler lipofilik moleküllerdir ve kolesterolden köken alırlar.

Vücut içerisinde Steroidler;

Adrenal kortekste → glukokortikoidler, mineralokortikoidler ve adrenal androjenler,

Testislerde → Testiküler androjenler ve östrojen,

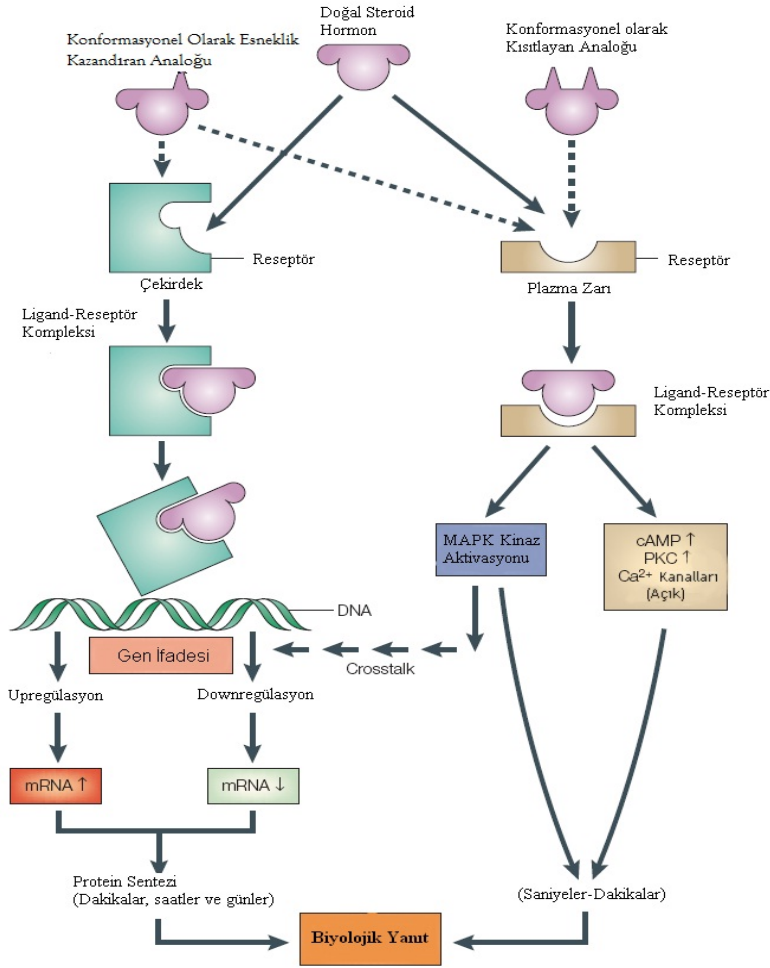
Ovaryum ve plasentada → progesteronlar veya progesteronlar ve östrojen olarak sentezlenirler [48].

Steroid hormonların hepsi hücre içerisinde birçok fizyolojik ve patolojik olayları düzenleyici faktörler olarak görev alır [48]. Ayrıca bazı siklin ve siklin bağımlı kinaz inhibitörlerinin ifadesini de düzenlediklerinden hücre bölünmesini de kontrol etmektedirler. Hedef genlerin ifadesinin düzenlenmesinde rol oynayan

transkripsiyon faktörleri gibi davranmaktadırlar [50]. Hücre farklılaşmasında potansiyel düzenleyiciler olarak da görev almaktadırlar [49].

Steroid hormonlar kan plazmasında ‘Steroid Bağlı Protein’lerle veya albuminler gibi özgül olmayan proteinlerle taşınmaktadırlar. Lipofilik özelliklerinden dolayı, hücre zarından kolaylıkla geçerek steroid hormon reseptörlerine bağlanmaktadırlar [48, 51]. Aktif reseptör hormon bileşiği çekirdek içine transfer olur ve kromatine bağlanarak mRNA ve protein sentezini başlatmaktadır [51].

Steroid hormonlar reseptörlere bağlanmadığında, reseptörler birbirlerine bağlı bir kompleks oluşturmaktadır. Bu kompleks içerisinde ısı şok proteinleri olarak bilinen ‘şaperon proteinleri’ de yer almaktadır. Şaperonlar, proteinlerin katlanmasına yardımcı olur ve reseptörü korur. Ayrıca şaperonlar steroid hormon reseptörlerinin aktivasyonu için gereklidir. Steroid hormonlar reseptöre bağlandığında şaperonlar reseptörden ayrılmaktadır. Steroid hormon ligant-reseptör kompleksi, kromatide organize olmuş ve hormon yanıt elementi olarak da isimlendirilen DNA sekans bölgelerine bağlanarak kromatin düzenlemelerini başlatmaktadır. Böylece genlerin transkripsiyonunu baskılayıcı veya aktive edici sinyallerin iletimi sağlanmış olmaktadır (Şekil 2.13) [48].



Şekil 2.13. Steroid hormonlar aracılığıyla biyolojik yanıt oluşumu. cAMP; Siklik Adozin Mono Fosfat, MAPK; Mitojen (Hücre Döngüsü) Aktive Edici Kinaz, PKC; Protein Kinaz C [52]

Metilprednizolon

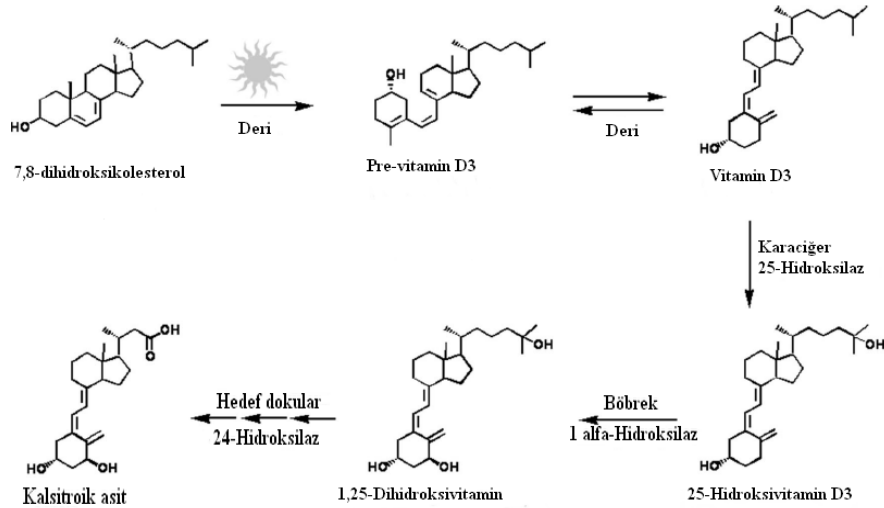
Metilprednizolon (MP) steroid hormon ailesinin bir üyesidir ve nükleer hormon reseptörlerinin çinko parmak içeren üyelerine bağlanmaktadır. Bu reseptör proteinleri hedef hücredeki özgül DNA promoter bölgelerine bağlanarak çoğalma, farklılaşma ve apoptoz mekanizmalarını düzenlemektedir ve transkripsiyon başlama hızında doğrudan değişime yol açmaktadır [53-55]. Böylece, farklılaşan hücrelerde transkripsiyon başlangıcının değişmesi söz konusudur. Bu şekilde, steroid bileşiklerin fare blast hücrelerinin granülositik ve monositik farklılaşmasını uyardığı için lösemi hücrelerinin farklılaşmasında rol aldığı düşünülmektedir [53-55].

Çocuklarda farklı AML (akut miyeloid lösemi) tiplerinde yüksek doz MP (20-30 mg/kg/gün) tedavisinin miyeloid lösemi hücrelerinin farklılaşmasını ve apoptozunu uyardığı tespit edilmiştir. Özçimen ve ark. yüksek doz MP'un (10^{-3} M) U937 (miyelomonositik lösemi) hücrelerinde farklılaşmayı uyardığını gözlemlemişlerdir [53].

Saydam ve ark. MP'un HL-60 (insan akut miyeloid lösemi) ve K562 hücrelerinin çoğalmasını baskıladığı ve kısmi olarak terminal granülositik ve monositik farklılaşmayı uyardığını göstermişlerdir [56].

Vitamin D₃

Vitamin D₃ (VD-3) deride kolesterolün oksitlenmiş formu olan 7-dehidroksikolesterolden türemektedir. Kolekalsiferol olarak da bilinir. Şekil 2.14'te belirtildiği üzere cildin güneş ışınlarının UV radyasyonuna maruz kalması sonucunda 7-dehidroksikolesterol previtamin-D₃'e dönüşmektedir [56]. D vitamini serum vitamin D bağlayıcı protein aracılığıyla karaciğere taşınarak burada 25-hidroksivitamin D₃ formuna dönüşmektedir. En sonunda da böbrekte vitaminin hormonal formu olan 1,25-dihidroksivitamin D₃ şekline dönüşmektedir [57].



Şekil 2.14. Vitamin D₃ sentezi, aktivasyonu ve katabolizması [57].

1,25 vitamin D₃ sitozolik vitamin D reseptörüne bağlanır ve 9-cis-retinoid X reseptörleriyle heterodimer bir yapı oluşturur. 9-cis-retinoid X reseptörleri genlerin

‘promoter’ bölgesindeki vitamin D yanıt elementleriyle etkileşmektedir. 1,25 vitamin D₃ kalsiyum kanallarını uyararak hücre zarı reseptörlerine de bağlanarak protein kinaz C ile etkileşir ve MAPK’ ları (Mitojen aktive edici protein kinaz) aktive ederek hücre bölünmesini etkilemektedir [58].

Kasukabe ve ark. 1 α -25(OH)₂D₃’ün miyeloid lösemi hücrelerinin çoğalmasını inhibe ettiğini ve bu hücrelerin farklılaştığını belirtmişlerdir. AML-M1 (akut miyeloid lösemi-M1) hücre hattının 24 nM dozunda (20 gün sürekli olarak) ve 48 nM dozunda (10 gün sürekli olarak) 1 α -25(OH)₂D₃ ile muamele edildiğinde, hücrelerin çoğalmasının ve büyümesinin inhibe olduğunu tespit etmişlerdir [59].

2.7. NİCELİKSEL (KANTİTATİF) GERÇEK ZAMANLI (REAL-TİME) REVERS TRANSKRİPTAZ PZR (POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU) TEKNİĞİ

PZR, herhangi bir organizmaya ait genomik DNA’daki özgül bölgelerin çoğaltılması için kullanılan bir yöntemdir ve bunun için sadece DNA örnekleri kullanılmaktadır. Ancak, hücrelerden elde edilen RNA’lar PZR’da kullanılmadıklarından, önce revers transkriptaz (rt) ile komplementer DNA’ya (cDNA) çevrilirler. Bu olaya *revers transkripsiyon* denir. Bu olayda RNA bağımlı DNA polimeraz (revers transkriptaz; RT) görev almaktadır [60].

1988 yılında ‘thermus aquaticus’ bakterisinden saflaştırılan ve ısıya dayanıklı bir polimeraz olan *taq* polimerazın kullanılmasıyla polimeraz zincir reaksiyonlarında (PZR) otomatize termal döngü cihazları geliştirilip, floresan ışığa tekniklerinin de kullanıma girmesiyle revers transkriptaz-PZR (RT-PZR) da önemli bir dönüm noktası olmuştur [61].

Bu gelişim sayesinde gen kopya ürünlerinin düzeylerini sayısal değerlere dönüştürerek ölçmek, devam eden PZR tepkimesini ekranda izleyerek ‘Real Time’ (gerçek zamanlı) olarak tepkimenin gidişine müdahale etmek ve PZR döngülerindeki sayısal verileri düzenleyebilmek açısından gerçek zamanlı RT-PZR klasik PZR yönteminden farklıdır. Birçok adlandırmayla anılan bu teknolojiye floresan okuma

yapması nedeniyle yabancı yayınlarda ‘Floresan Niceliksel RT-PZR’, ‘Niceliksel-kinetik PZR’ gibi çeşitli adlar altında rastlamak mümkündür [61].

2.7.1. Niceliksel Gerçek Zamanlı RT-PCR Tekniğinde Genel Olarak Kullanılan Cihazlar

ABI Prism 7700: 96 örnek alabilen bir termal blok içerir ve 500nm - 660 nm dalga boyundaki floresans ışımasını ölçebilmektedir. Analiz süresi 2 saat olup, çok sayıda örneği aynı anda sonuçlandırabilmektedir. Ancak tam olarak “RT” yöntemi olduğunu söylemek zordur çünkü RT-PZR analizi çoğalma (amplifikasyon) süreci sonunda yapılabilmektedir. Sistem plastik tüplere eklenmiş bir kamera yardımıyla floresansı algılamaktadır.

Light Cycler: 20 dk.’ya kadar inebilen RT-PZR olanağına karşın yalnızca 32 reaksiyon gerçekleştirebilen bir sistemdir. Üç foto saptama ucuyla farklı dalga boylarına yayılabilen bir görsellik avantajı vardır ve PZR döngülerinin her biri sonunda ekrana bilgi yansınmasıyla tam bir “RT” yöntemidir.

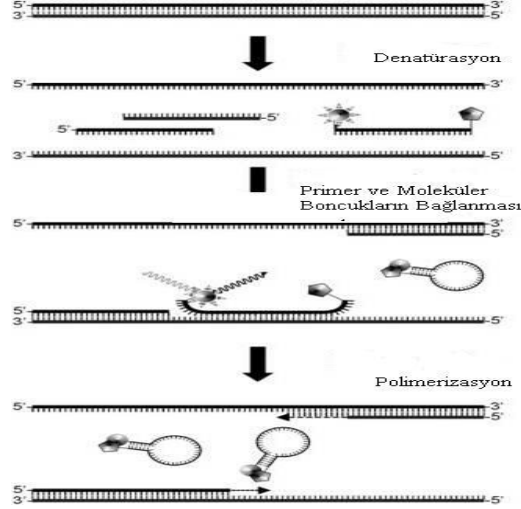
BioRad cihazı: Bir ‘thermal-cycler’ cihazını optik bir parçaya bağlayan, hem ABI 7700 hem de Light Cycler’den daha geniş bir dalga boyunda saptama yapabilmektedir. Dört ayrı floresans bildircisiyle alternatif RT-PZR seçeneklerine olanak sağlar. Üstelik 96 örneği ABI 7700’deki gibi gerçek zamanlı değil ardışık olarak tarayabilme olanağı da sağlamaktadır [60].

2.7.2. Kullanılan Kimyasallar

2.7.2.1. Moleküler işaretleyiciler (Beacon)

Gövde ve düğüm kısmı vardır. Düğüm kısmı, çoğaltılacak DNA ile komplementer tek zincirli DNA dizisini içerir. Bu yapının düz olan uç kısımlarında 2 adet florokrom boya içermektedir. Baskılayıcı florofor diğer boyanın floresansını engeller. Moleküler beacon’lar serbest haldeyken ışımazlar. Hedef nükleik

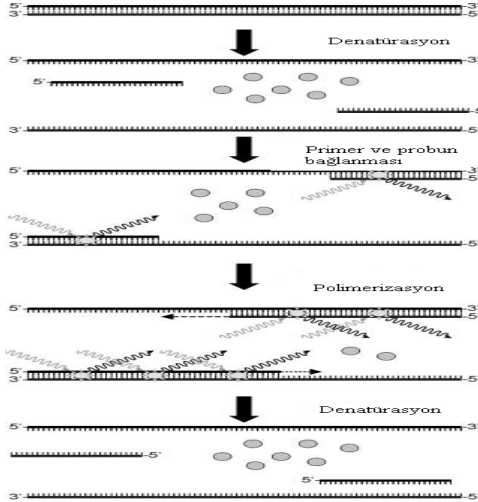
asit dizisi ile hibridize olduklarında yapısı değiştiğinden ve boyalarda birbirlerinden uzaklaştığından floresans miktarı artmaktadır (Şekil 2.15).



Şekil 2.15. Moleküler Beacon yöntemi [60].

2.7.2.2. DNA'ya bağlanan boyalar

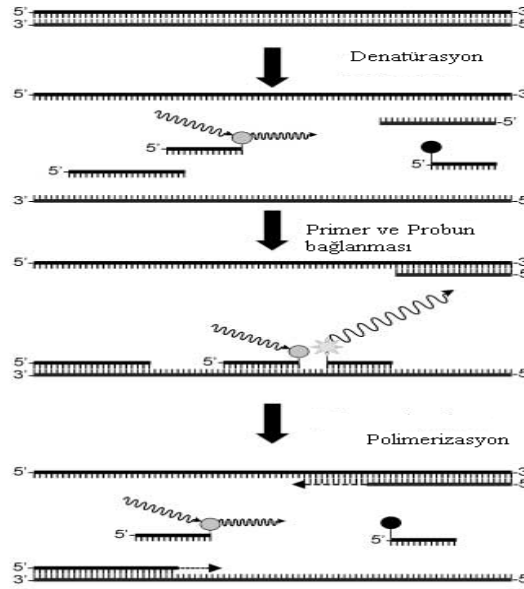
Genel olarak *SYBR green-I* kullanılmaktadır. Amlifikasyona bağlı DNA artışı, ortaya çıkan floresansın miktarı ile ölçülmektedir. *SYBR green-I*, yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresans veren boyalardır (Şekil 2.16) [60].



Şekil 2.16. Light cyclers metoduna göre uyarlanmış yöntem, boyaların birleşmesi [60].

2.7.2.3. Hibridizasyon problemleri

İki farklı prob tasarlanmıştır. 3' ucunda floresans işaretli boya, 5' ucunda alıcı boya bulunmaktadır. PZR reaksiyonu sırasında bu iki prob hedef nükleik asit dizisine bağlanıp birbirine yaklaştığında bir enerji yayılımı olur. Enerji “donor” boyadan “acceptor” boyaya transfer olur. Bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans (Fluorescence resonance energy transfer, (FRET)) miktarı PZR süresince oluşan ürün miktarı ile doğru olarak artmaktadır (Şekil 2.17) [60].



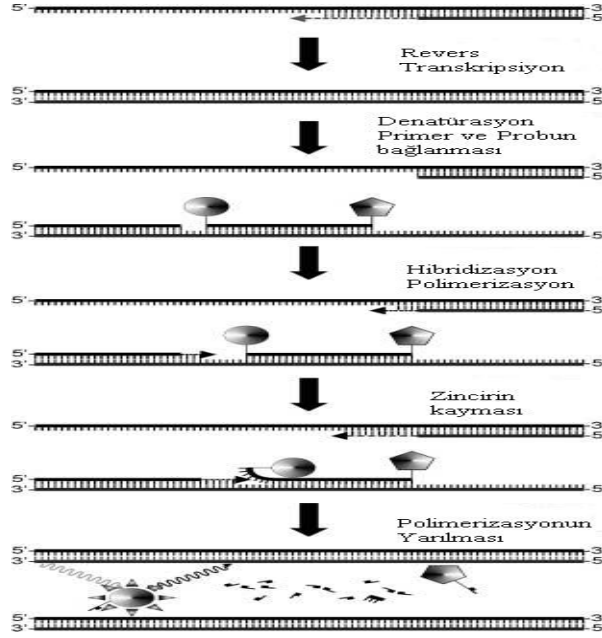
Şekil 2.17. Hibridizasyon Prob yöntemi [60].

2.7.2.4. Hidroliz problemleri

TaqMan

TaqMan sisteminde 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır. Prob'un 5' ucunda haber veren ‘raportör (haber veren)’ florokrom, 3' ucunda ise “*quencher* (baskılayan)” florokrom bulunmaktadır. Şekil 2.18’de belirtildiği gibi prob, tek zincir haldeki hedef moleküle, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanmaktadır. Prob-hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom molekülünün sinyal

oluşturması, 3' uçtaki quencher florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasından sonra başlatılan primer uzaması prob'un bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için *Taq* DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Raportör florokrom serbest hale geldiğinde sinyal oluşturmaktadır.



Şekil 2.18. *TaqMan* Yöntemi [60].

Bir RT-PZR'da;

Niceliksel ölçümde miktarı belirlenmek istenen örnekler, içerdiği cDNA miktarı bilinen standartlarla PZR sonunda karşılaştırılmaktadır. Bu standartlar genellikle 10¹ lu dilüsyonlar halinde hazırlanır ve amplifikasyonları, her dokuda aynı düzeyde anlatıma girdiği bilinen genlerle (housekeeping genler) gerçekleştirilir (Housekeeping genler; bir tür veya organizmanın her hücresi için her zaman sabit düzeylerde eksprese olan genlerdir). Bu standart örneklerin eşik değerine (CP) girdikleri döngü PZR cihazı tarafından saptanmaktadır [60].

Reaksiyon sonunda, standartların eşik değerleri belirlenerek bir eğri oluşturulur. Miktarları bilinmeyen örneklerin bu eğriyi kestiği döngüler belirlenerek miktar sayımı yapılabilmektedir [60].

Göreceli (relative) sayıma göre çalışılacak her iki örnek için farklı karışım hazırlanır. Bu karışımlardan birinde housekeeping genlerine ait primerler bulunurken, diğerinde hedef genin primerleri bulunmaktadır. PZR sonunda hedef genin değeri, referans genin değerine oranlanarak ölçülür ve normalize edilir [60].

PZR sonucu elde edilen ürünlerin gerçek PZR ürünü olup olmadığı “erime eğrisi” yöntemi ile kontrol edilmelidir.

Erime ısı (T_m), bir amplifikasyon ürünü genin %50’sinin bozunduğu sıcaklık değeridir ve bu değer, gen dizisine ve %GC oranına bağlı olarak farklılık göstermektedir. Erime eğrisi yönteminde bu özellikten yararlanılarak, PZR sonunda elde edilen amplifikasyon eğrilerinin gen ürününe mi ait olduğu yoksa primer dimer ya da kontaminasyon sonucunda mı meydana geldiği belirlenmektedir.

2.7.3. Revers Transkripsiyon

RNA transkriptleri revers transkriptazı etkileyen sekonder yapılar sergilerler. Bu da RT-PZR’ın niceliksel ölçümünü etkilemektedir.

Yaygın olarak iki RT kullanılmaktadır:

- AMV-RT (Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase-Kuş miyeloblastozis virüs revers transkriptaz)
- MMLV-RT (Moloney Murine Leukaemia Virus Reverse Transcriptase-Moloney mürin lösemi virüs revers transkriptaz)

Revers transkripsiyonda genellikle Taq DNA polimeraz kullanılmaktadır [60].

2.7.4. Threshold Döngüsü (Treshold Cycle- C_t)

Threshold döngüsü veya CT değeri üründeki ilk anlamlı artışın olduğu noktayı belirtir. Sistem başladığından itibaren, üstel oranda ürün oluşması ve logaritmik lineer faza geçiş noktasıdır. Bu bize reaksiyon hakkında çok önemli bilgiler verir. Logaritmik faza yakınlık reaksiyonun gücünü gösterir. Bu ise %90 – 100 arasında olmalıdır. CT, daima üstel (exponential) faz sürecinde oluşmaktadır. Böylece niceliksel ölçüm, herhangi bir bileşenden etkilenmeyecektir. Daha sonra bu değer standart eğri oluşumuyla niceliksel sonuca dönüştürülebilir [60].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Hücre Kültüründe Kullanılan Kimyasallar

RPME-1640 hücre besiyeri ortamı (Sigma R-8758)

Fötal dana serumu (BIOCHROM AG S0113)

L-Glutamin (BIOCHROM AG 25030-032)

Penisilin/Streptomisin (10.000U/10.000 µg/ml) (BIOCHROM AG A2213)

Bu çalışmada uygulanan ajanlar;

- i) 6α-Metriprednizolon ve 1,25(OH)₂ vitamin-D₃ (Sigma M-0639 / D1530)
- ii) High Pure RNA izolasyon kiti (Roche Diagnostics, GmbH Roche Applied Science 68298 Mannheim, Germany)

Kitin içeriği;

- Lizis /bağlama tamponu (Lysis/Binding Buffer): 25 ml [4.5 M guanidin- HCL, 50 mM Tris-HCl, 300% Triton X-100 (w/v), pH 6.6 (25 °C)]
- DNaz-1, rekombinant, liyofilizat: 10 KU liyofilize DNaz-1 (0.55 ml elüsyon tamponunda süspanse edilmiş)
- DNaz inkübasyon tamponu: 10 ml [1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl ve 10 mM MnCl₂, pH 7.0 (25 °C)]
- Yıkama tamponu-1: 33 ml (İlk kullanımdan önce 20 ml etanol p.a. eklenir), [5 M guanidin hidroklorid ve 20 mM Tris-HCl, pH 6.6 (25 °C)]
- Yıkama tamponu-2: 10 ml (İlk kullanımından önce 40 ml etanol p.a. eklenir), [20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 7.5 (25 °C)]
- Elüsyon Tamponu: 30 ml

- iii) Transcriptor High Fidelity cDNA Sentez Kiti (Roche Diagnostics GmbH Roche Applied Science 68298 Mannheim, Germany)

Kitin içeriği;

- Random hexamer →1 vial, 200 µl (600 µM)
- H₂O, PCR grade (seviye) →2 vials, 1 ml
- Transkriptör revers transkriptaz reaksiyon tamponu →1 vial, 1 ml
- Protektör RNaz inhibitörü →1 vial, 50 µl (40 U/µl)
- Deoksinükleotid mix →1 vial, 200 µl
- DTT →1 vial, 1 ml, 0.1 M
- Transkriptör revers transkriptaz →1 vial, 110 µl

- iv) β-aktin housekeeping geni forward ve revers primer çifti ve prob dizisi

F'(141.4 nmol) →5'-CCT GGC ACC CAG CAC AAT-3'

R'(113.6 nmol)→5'-GCT GAT CCA CAT CTG CTG GAA-3'

P'(41.4 nmol) →5' Fam-ATC AAG ATC ATT GCT CCT CCT GAG CGC-TAMRA 3'

- v) SOCS-1 geni forward ve revers primer çifti ve prob dizisi

F'(50 nmol)→5' CCC TGG TTG TTG TAG CAG CTT-3'

R'(85 nmol) →5' CAA CCC CTG GTT TGT GCA A-3'

P'(27 nmol) →5' FAM-ACC TGA ACT CGC ACC TCC TAC CTC TTC ATG-TAMRA 3'

- vi) SOCS-3 geni forward ve revers primer çifti ve prob dizisi

F' (91.4 nmol)→5' - CTT CAG CAT CTC TGT CGG AAG-A-3'

R' (112.3 nmol)→5'-GCA TCG TAC TGG TCC AGG AACT-3'

P' (29.7 nmol) →Fam CGT CAA CGG CCA CCT GGA CTC CTA TAMRA3'

vii) Light Cycler Taq Man Master Mix (Roche Diagnostics GmbH Roche Applied Science 68298 Mannheim, Germany)

Kitin içeriği;

- Enzim (vial 1a): FastStart Enzim
- Reaksiyon Mix (vial 1b): FastStart TaqMan Reaksiyon Mix
- H₂O, PCR grade

3.1.2. Cihazlar

- -20°C derin dondurucu
- -80 °C derin dondurucu
- Termal Cycler
- Light Cycler 480 – II

3.2. YÖNTEM

Bu araştırmada kullanılan yöntemler aşağıda sıralanmıştır.

- K562 hücrelerine tek tek ve birlikte MP ve VD-3 uygulaması yapılmış ve inkübasyon sürelerinin sonunda hücreler hasat edilerek total RNA'ları saflaştırılmıştır.
- Niceliksel gerçek zamanlı RT-PZR yönteminde değerlendirilmeleri için, RNA'lardan komplementer DNA'lar (cDNA) sentezlenmiştir.
- K562 cDNA örneklerinde, SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin ifadelerini niceliksel gerçek zamanlı RT-PZR ile ölçmek için genlere ve referans genine (beta aktin) yönelik primer ve Taq Man hibridizasyon problemleri kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirilmiştir.
- Genlerin ifade düzeylerini belirleyebilmek için, niceliksel gerçek zamanlı RT-PZR tekniği Light Cycler cihazında gerçekleştirilmiştir.
- K562 hücre hattına uygulanan farklı dozlarda MP, VD-3 ve bu iki ajanın birlikte kullanımlarının SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin ifadesi üzerindeki etkilerini belirlemek üzere $2^{-\Delta\Delta CT}$ de elde edilen veriler, bağımsız iki veya daha fazla grubun karşılaştırılması şeklinde değerlendirilmiştir.

3.2.1. Hücre Kültürü ve Total RNA Saflaştırması

Bu çalışmada kullanılan K562 hücreleri kültür ortamında çoğaltılarak laboratuvar şartlarımıza uyumu sağlanmıştır. MP ve VD-3 dozları tek tek ve birlikte uygulanarak 6, 12, 24 saat sürelerde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sürelerinin ardından hücreler hasat edilerek total RNA'lar saflaştırılmıştır. Total RNA saflaştırması Roche Diagnostics firmasından temin edilen 'High Pure RNA İsolation kiti'ne uygun olarak yapılmıştır.

Çalışma solüsyonlarının hazırlanması:

Wash buffer I (Yıkama tamponu I)=20 µl absolut etanol

Wash buffer II= 40 µl absolut etanol

DNaz I → 550 µl elüsyon tamponu hazırlandı.

K562 hücrelerinin hasadının ardından tripan mavisi canlılık testi yapılmıştır ve 1×10^6 canlı hücre/ml olacak şekilde total RNA saflaştırması işlemi gerçekleştirilmiştir. Hücrelere 400 µl liziz/bağlama tamponu eklenip, tüpler 15 sn. vortekslenmiştir. Filtreli tüpler, toplama tüplerinin içine yerleştirilip, 15 sn. 8000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Filtreli tüpten toplama tüpüne akan sıvı boşaltılıp aynı toplama tüpü yeniden kullanılmıştır. Steril tüplere 10 µl DNaz I, 90 µl de DNaz inkübasyon tamponundan eklenerek karışım hazırlanmıştır. Hazırlanan solüsyondan her örnek için 100 µl eklenip, 15 dk. oda sıcaklığında (20-25°C) inkübe edilmiştir. Her tüpe 500 µl yıkama tamponu-I eklenmiştir. Tüpler 15 sn. 8000 devirde santrifüj edilip ardından filtrasyon tüpleri atılmıştır. Her tüpe 500 µl yıkama tamponu II konulup yeniden 15 sn. 8000 devirde santrifüj edilmiştir. Tüpler boşaltıldıktan sonra Her tüpe 200 µl yıkama tamponu II eklenip tüpler 2dk. 13000 devirde santrifüj edilmiştir. Toplama tüpleri atılarak, filtreli tüpler efendorf tüplere yerleştirilmiştir. Tüplere 50 µl elüsyon tamponu eklenip 1 dk. 8000 devirde santrifüj edilmiştir. Bu çalışmada toplam 27 K562 RNA örneğine bakılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Örnek numaraları

6 Saat	12 Saat	24 Saat
1) K562 Kontrol	10) K562 Kontrol	19) K562 Kontrol
2) K562/ 10^{-5} M MP	11) K562/ 10^{-5} M MP	20) K562/ 10^{-5} M MP
3) K562/ 5×10^{-9} M VD-3	12) K562/ 5×10^{-9} M VD-3	21) K562/ 5×10^{-9} M VD-3
4) K562/ 10^{-5} M MP/ 5×10^{-9} M VD-3	13) K562/ 10^{-5} M MP/ 5×10^{-9} M VD-3	22) K562/ 10^{-5} M MP/ 5×10^{-9} M VD-3
5) K562/ 10^{-4} M MP	14) K562/ 10^{-4} M MP	23) K562/ 10^{-4} M MP
6) K562/ 5×10^{-8} M VD-3	15) K562/ 5×10^{-8} M VD-3	24) K562/ 5×10^{-8} M VD-3
7) K562/ 10^{-4} M MP/ 5×10^{-8} M VD-3	16) K562/ 10^{-4} M MP/ 5×10^{-8} M VD-3	25) K562/ 10^{-4} M MP/ 5×10^{-8} M VD-3
8) K562/ 10^{-5} M MP/ 5×10^{-8} M VD-3	17) K562 / 10^{-5} M MP/ 5×10^{-8} M VD-3	26) K562/ 10^{-5} M MP/ 5×10^{-8} M VD-3
9) K562/ 10^{-4} M MP/ 5×10^{-9} M VD-3	18) K562/ 10^{-4} M MP/ 5×10^{-9} M VD-3	27) K562/ 10^{-4} M MP/ 5×10^{-9} M VD-3

3.2.2. cDNA Sentezi

RNA örnekleri -80°C derin dondurucudan çıkartılıp, buzları çözündürülmüştür. Örnekler kısa santrifüj edilmiştir. 1.5 ml'lik tüplere, Roche Diagnostics firmasından temin edilen 'Transcriptor High Fidelity cDNA Sentez Kiti'nde belirtilen ajanlardan, belirtilen miktarlar eklenerek Karışım-I hazırlanmıştır.

KARIŞIM-I İçeriği

Total RNA	4	µl
Random Hexamer	2	µl
H ₂ O	5.4	µl
Toplam	11.4	µl

Revers transkriptaz kontrol reaksiyonuna paralel olarak, negatif kontrol hazırlanmıştır. Negatif kontrolde, PCR tüpüne RNA örneği yerine aynı miktarda su kullanılmıştır. Karışım-I, daha önceden 65°C'de 10 dakika bekletilmiştir. Bu aşamadan sonra tüpler tekrar soğutulmuştur ve ardından Karışım-II hazırlanmıştır.

KARIŞIM-II İçeriği

Transcriptor reverse transcriptase reaction buffer	4	µl
Protector RNase inhibitor.....	0.5	µl
Deoksinükleotid mix	2	µl
DTT	1	µl
Transcriptor reverse transcriptase	1.1	µl
Toplam	8.6	µl

TOPLAM KARIŞIM= Karışım-I + Karışım-II = 11.4 µl + 8.6 µl = 20 µl

PZR tüpleri yavaş yavaş pipetaj edilmiştir. Tüpler termal cyclus cihazına kapakları kapalı bir şekilde yerleştirilerek bir döngü olacak şekilde 29 °C'de 10 dakika, 48°C'de 60 dakika ve 85°C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Tüpler -20°C derin dondurucuda muhafaza edilmiştir. İkinci grup için de, karışımlar hazırlanmıştır.

3.2.3. Gerçek Zamanlı PZR Ölçümü

Sentez edilen cDNA örneklerinin niceliksel ölçümü Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji-Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, İmmünoloji Bilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Genlerin niceliksel ölçümü ‘Roche Diagnostics’ firmasından önceden temin edilen ‘LightCycler 480 II’ Real-Time PZR cihazında gerçekleştirilmiştir.

SOCS-1 ve SOCS-3 genlerine uygun primerlerin hazırlanışı;

500 μM 'lık primerler 50 μM 'a seyreltilmiştir. Bu işlem sırasında 500 μM 'lık primerden 10 μl alınmıştır ve üzerine 90 μl su eklenerek 100 μl 'ye tamamlanmıştır.

Primerlerin kullanım derişimi;

50 μM 'lık primer 10 μM 'a seyreltilmiştir. Seyreltme işlemi sırasında 50 μM primerden 10 μl alınmıştır ve üzerine 40 μl su eklenerek 50 μl 'ye tamamlanmıştır.

Probların kullanım derişimi;

50 μM 'a seyreltilen problar kullanım amacına uygun olarak 5 μM 'a seyreltilmiştir. 50 μM 'lık primerden 10 μl alınmıştır ve üzerine 90 μl su eklenerek 100 μl 'ye tamamlanmıştır.

Bu çalışmada öncelik olarak kontrol K562 cDNA örneği su ile 1 (K562 kontrol), 1/10, 1/10², 1/10³, 1/10⁴ oranında seyreltilerek standartlar oluşturulmuştur. Light Cycler TaqMan Master Kit içerisinde bulunan ‘FastStart’ enziminden 10 μl alınıp, tepkime karışımına eklenerek master karışım hazırlanmıştır. Referans gen olarak β -aktin housekeeping gen kullanılmıştır.

Deney iki grup şeklinde gerçekleştirilmiştir. Light Cycler PCR 480 uyumlu 96'lık well plate'lere sırasıyla;

Master	4 µl
H ₂ O	8 µl
Forward	1 µl
Reverse	1 µl
Prob	1 µl
cDNA	5 µl
Toplam	20 µl

kimyasalları yüklenmiştir. Well plate'e kimyasallar SOCS-1, SOCS-3 ve β-aktin için ayrı ayrı yüklenmiştir.

Yükleme işleminden sonra 96'lık well plate Light Cycler 480 II cihazına yerleştirilip örneklerin niceliksel ölçüm miktarları belirlenmiştir.

Çizelge 3.2. Birinci grup çalışma örneklerinin 96 well plate'e yüklenmesi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1-SOCS1	9-SOCS1	17-SOCS1	25-SOCS1	1-SOCS3	9-SOCS3	17-SOCS3	25-SOCS3	1-Beta Actin	9-Beta Actin	17-Beta Actin	25-Beta Actin
B	2-SOCS1	10-SOCS1	18-SOCS1	26-SOCS1	2-SOCS3	10-SOCS3	18-SOCS3	26-SOCS3	2-Beta Actin	10-Beta Actin	18-Beta Actin	26-Beta Actin
C	3-SOCS1	11-SOCS1	19-SOCS1	27-SOCS1	3-SOCS3	11-SOCS3	19-SOCS3	27-SOCS3	3-Beta Actin	11-Beta Actin	19-Beta Actin	27-Beta Actin
D	4-SOCS1	12-SOCS1	20-SOCS1	NC SOCS1	4-SOCS3	12-SOCS3	20-SOCS3	NC SOCS3	4-Beta Actin	12-Beta Actin	20-Beta Actin	Standart1
E	5-SOCS1	13-SOCS1	21-SOCS1		5-SOCS3	13-SOCS3	21-SOCS3		5-Beta Actin	13-Beta Actin	21-Beta Actin	Standart2
F	6-SOCS1	14-SOCS1	22-SOCS1		6-SOCS3	14-SOCS3	22-SOCS3		6-Beta Actin	14-Beta Actin	22-Beta Actin	Standart3
G	7-SOCS1	15-SOCS1	23-SOCS1		7-SOCS3	15-SOCS3	23-SOCS3		7-Beta Actin	15-Beta Actin	23-Beta Actin	Standart4
H	8-SOCS1	16-SOCS1	24-SOCS1		8-SOCS3	16-SOCS3	24-SOCS3	NC Beta Actin	8-Beta Actin	16-Beta Actin	24-Beta Actin	Standart5

Birinci çalışmada uygulanan yöntemlerin aynısı ikinci çalışmada da uygulanmıştır ancak standartlar bir defa yüklendiği için ikinci defa yüklenmemiştir.

Çizelge 3.3. İkinci grup çalışma örneklerinin 96 well plate'e yüklenmesi

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1-Beta Actin	2-Beta Actin	3-Beta Actin	4-Beta Actin	5-Beta Actin	6-Beta Actin	7-Beta Actin	8-Beta Actin	9-Beta Actin	10-Beta Actin	11-Beta Actin	12-Beta Actin
B	13-Beta Actin	14-Beta Actin	15-Beta Actin	16-Beta Actin	17-Beta Actin	18-Beta Actin	19-Beta Actin	20-Beta Actin	21-Beta Actin	22-Beta Actin	23-Beta Actin	24-Beta Actin
C	25-Beta Actin	26-Beta Actin	27-Beta Actin	NC-Beta Actin								
D	1-SOCS1	2-SOCS1	3-SOCS1	4-SOCS1	5-SOCS1	6-SOCS1	7-SOCS1	8-SOCS1	9-SOCS1	10-SOCS1	11-SOCS1	12-SOCS1
E	13-SOCS1	14-SOCS1	15-SOCS1	16-SOCS1	17-SOCS1	18-SOCS1	19-SOCS1	20-SOCS1	21-SOCS1	22-SOCS1	23-SOCS1	24-SOCS1
F	25-SOCS1	26-SOCS1	27-SOCS1	7-SOCS1	NC-SOCS1				25-SOCS3	26-SOCS3	27-SOCS3	NC-SOCS3
G	1-SOCS3	2-SOCS3	3-SOCS3	4-SOCS3	5-SOCS3	6-SOCS3	7-SOCS3	8-SOCS3	9-SOCS3	10-SOCS3	11-SOCS3	12-SOCS3
H	13-SOCS3	14-SOCS3	15-SOCS3	16-SOCS3	17-SOCS3	18-SOCS3	19-SOCS3	20-SOCS3	21-SOCS3	22-SOCS3	23-SOCS3	24-SOCS3

96'lık well plate Light Cyler cihazına yerleştirilip örneklerin niceliksel ölçümü belirlenmiştir.

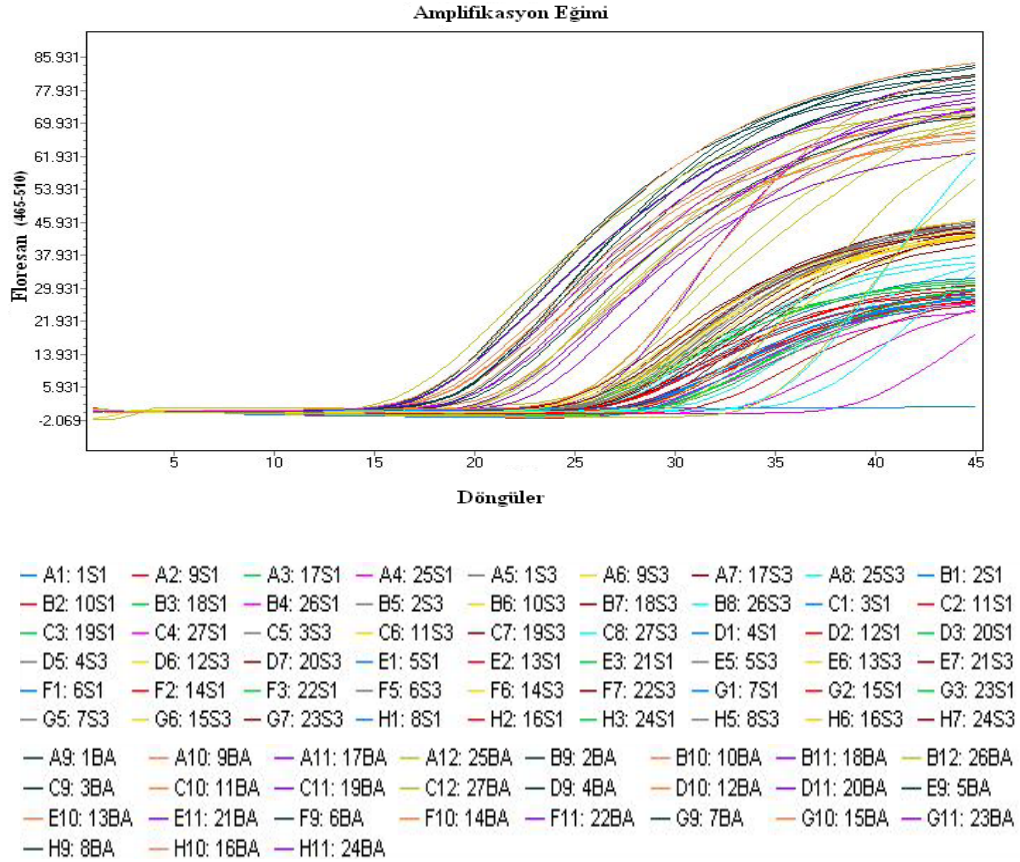
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. BULGULAR

4.1.1. SOCS-1 ve SOCS-3 Genlerinin İfadesinin Gerçek Zamanlı RT-PZR'da Niceliksel Ölçümü

4.1.1.1. Birinci çalışma absolut (tam) niceliksel ölçüm

Amplifikasyon aşamasında örnek ve referans genlerin 465-510 nm dalga boyundaki floresan aralığında eşik değerine girdikleri döngüler saptanmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Hedef ve referans genlerin eşik değerine girdikleri döngüyü gösteren amplifikasyon eğimi (BA: Beta Aktin, S1: SOCS-1, S3: SOCS-3)

İlk RT-PZR çalışmasında örnek ve referans genlerin 465-510 nm dalga boyundaki floresan aralığında tam niceliksel eşik değerleri (CP) ölçülmüştür (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Örnek ve referans genlerin birinci çalışma sonucunda elde edilen tam niceliksel eşik değerleri (CP)

Örnek	CP	Örnek	CP	Örnek	CP	Örnek	CP
1-SOCS1	26,99	1-SOCS3	26,62	1-Beta Actin	17,81	Standart1	16,53
2-SOCS1	28,19	2-SOCS3	25,97	2-Beta Actin	19,91	Standart2	21,42
3-SOCS1	27,29	3-SOCS3	26,61	3-Beta Actin	17,86	Standart3	25,05
4-SOCS1	28,04	4-SOCS3	25,33	4-Beta Actin	19,39	Standart4	31,26
5-SOCS1	28,54	5-SOCS3	26,18	5-Beta Actin	19,45	Standart5	34,87
6-SOCS1	27,71	6-SOCS3	26,88	6-Beta Actin	18,04		
7-SOCS1	30,07	7-SOCS3	27,12	7-Beta Actin	20,39		
8-SOCS1	28,64	8-SOCS3	26,21	8-Beta Actin	19,58		
9-SOCS1	27,48	9-SOCS3	25,18	9-Beta Actin	18,52		
10-SOCS1	26,11	10-SOCS3	25,85	10-Beta Actin	18,51		
11-SOCS1	28,75	11-SOCS3	27,25	11-Beta Actin	21,04		
12-SOCS1	27,13	12-SOCS3	26,16	12-Beta Actin	18,31		
13-SOCS1	27,97	13-SOCS3	26,85	13-Beta Actin	19,68		
14-SOCS1	27,88	14-SOCS3	26,32	14-Beta Actin	18,91		
15-SOCS1	26,8	15-SOCS3	25,5	15-Beta Actin	17,9		
16-SOCS1	31,55	16-SOCS3	29,84	16-Beta Actin	26,11		
17-SOCS1	29,59	17-SOCS3	27,39	17-Beta Actin	20,04		
18-SOCS1	30,09	18-SOCS3	29,04	18-Beta Actin	26,73		
19-SOCS1	25,2	19-SOCS3	25,62	19-Beta Actin	19,37		
20-SOCS1	29,01	20-SOCS3	27,19	20- Beta Actin	21,17		
21-SOCS1	25,91	21-SOCS3	25,85	21-Beta Actin	20,11		
22-SOCS1	30,21	22-SOCS3	28,01	22-Beta Actin	22,99		
23-SOCS1	29,92	23-SOCS3	27,81	23-Beta Actin	22,12		
24-SOCS1	25,75	24-SOCS3	24,84	24-Beta Actin	17,97		
25-SOCS1	33,74	25-SOCS3	31,56	25-Beta Actin	25,94		
26-SOCS1	29,03	26-SOCS3	27,08	26-Beta Actin	21,52		
27-SOCS1	29,56	27-SOCS3	27,42	27-Beta Actin	20,91		
NC-SOCS1	40	NC-SOCS3	36,85	NC-Beta Actin	35,57		

Hedef genin ve referans genin relative (göreceli) niceliksel ölçümü Pfaffl metoduna uygun olarak karşılaştırılıp [62], hedef genin göreceli ekspresyon oranı

(Ratios); kontrol gene karşı bilinmeyen bir örneğin CP sapması ve E değerine bağlı olarak elde edilmiştir (Çizelge 4.2).

$$R = \frac{(E_{\text{hedef}})^{\Delta CP_{\text{hedef}}(\text{kontrol-örnek})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta CP_{\text{ref}}(\text{kontrol-örnek})}}$$

(R : Relative ekspresyon oranı, E : Başlangıç fazda bir döngünün real-time RT-PZR etkinliği, $\Delta\Delta CP$: Hedef ve referans genlerin delta delta CP değerleri)

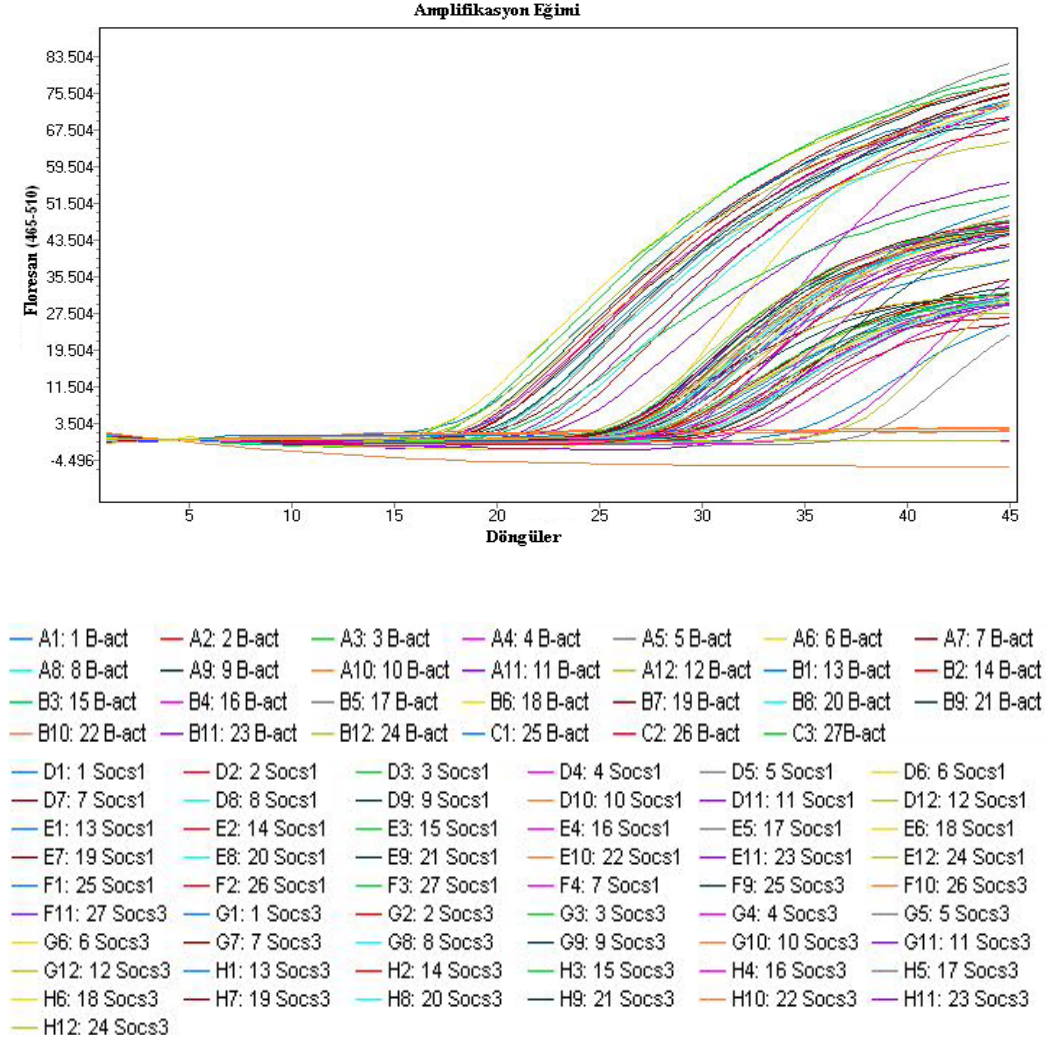
hesaplanmıştır.

Çizelge 4.2. Hedef genin birinci çalışma sonucunda elde edilen göreceli ölçüm değerleri

Örnek	Ratios	Örnek	Ratios
	Tgt/Ref		Tgt/Ref
1-BA;1-S1	1,72E-03	1-BA;1-S3	2,23E-03
2-BA;2-S1	3,22E-03	2-BA;2-S3	1,49E-02
3-BA;3-S1	1,45E-03	3-BA;3-S3	2,33E-03
4-BA;4-S1	2,48E-03	4-BA;4-S3	1,63E-02
5-BA;5-S1	1,84E-03	5-BA;5-S3	9,44E-03
6-BA;6-S1	1,23E-03	6-BA;6-S3	2,18E-03
7-BA;7-S1	2,24E-03	7-BA;7-S3	9,43E-03
8-BA;8-S1	1,88E-03	8-BA;8-S3	1,01E-02
9-BA;9-S1	2,00E-03	9-BA;9-S3	9,84E-03
10-BA;10-S1	5,13E-03	10-BA;10-S3	6,15E-03
11-BA;11-S1	4,80E-03	11-BA;11-S3	1,36E-02
12-BA;12-S1	2,21E-03	12-BA;12-S3	4,34E-03
13-BA;13-S1	3,20E-03	13-BA;13-S3	6,97E-03
14-BA;14-S1	2,00E-03	14-BA;14-S3	5,89E-03
15-BA;15-S1	2,09E-03	15-BA;15-S3	5,13E-03
16-BA;16-S1	2,31E-02	16-BA;16-S3	7,55E-02
17-BA;17-S1	1,34E-03	17-BA;17-S3	6,10E-03
18-BA;18-S1	9,74E-02	18-BA;18-S3	2,02E-01
19-BA;19-S1	1,76E-02	19-BA;19-S3	1,32E-02
20-BA;20-S1	4,38E-03	20-BA;20-S3	1,54E-02
21-BA;21-S1	1,80E-02	21-BA;21-S3	1,87E-02
22-BA;22-S1	6,70E-03	22-BA;22-S3	3,08E-02
23-BA;23-S1	4,50E-03	23-BA;23-S3	1,93E-02
24-BA;24-S1	4,55E-03	24-BA;24-S3	8,54E-03
25-BA;25-S1	4,46E-03	25-BA;25-S3	2,03E-02
26-BA;26-S1	5,49E-03	26-BA;26-S3	2,11E-02
27-BA;27-S1	2,49E-03	27-BA;27-S3	1,10E-02

4.1.1.2. İkinci çalışma tam niceliksel ölçüm

Amplifikasyon aşamasında örnek ve referans genlerin 465-510 nm dalga boyundaki floresan aralığında eşik değerine girdikleri döngüler saptanmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Hedef ve referans genlerin eşik değerine girdikleri döngüyü gösteren amplifikasyon eğimi.

465-510 nm dalga boyundaki floresan aralığında örneklerin ve referans genin absolut (tam) niceliksel eşik değerleri (CP) ölçülmüştür (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Örnek ve referans genlerin ikinci çalışma sonucunda elde edilen tam niceliksel eşik değerleri (CP)

Örnek	CP	Örnek	CP	Örnek	CP
1-SOCS1	28,46	1-SOCS3	27,29	1-Beta Actin	18,81
2-SOCS1	29,11	2-SOCS3	28,02	2-Beta Actin	19,56
3-SOCS1	28,3	3-SOCS3	26,88	3-Beta Actin	17,37
4-SOCS1	29,55	4-SOCS3	26,37	4-Beta Actin	18,89
5-SOCS1	30,19	5-SOCS3	27,12	5-Beta Actin	20,04
6-SOCS1	28,54	6-SOCS3	27,27	6-Beta Actin	17,42
7-SOCS1	30,28	7-SOCS3	27,41	7-Beta Actin	21,27
8-SOCS1	30,2	8-SOCS3	27,17	8-Beta Actin	20,02
9-SOCS1	28,2	9-SOCS3	26,08	9-Beta Actin	18,61
10-SOCS1	25,78	10-SOCS3	26,54	10-Beta Actin	17,86
11-SOCS1	29,95	11-SOCS3	27,78	11-Beta Actin	21,31
12-SOCS1	27,99	12-SOCS3	26,63	12-Beta Actin	18,22
13-SOCS1	29	13-SOCS3	26,95	13-Beta Actin	19,61
14-SOCS1	28,17	14-SOCS3	26,57	14-Beta Actin	19,03
15-SOCS1	27,83	15-SOCS3	26,06	15-Beta Actin	17,81
16-SOCS1	32,33	16-SOCS3	30,98	16-Beta Actin	28,37
17-SOCS1	30,36	17-SOCS3	27,89	17-Beta Actin	20,58
18-SOCS1	30,05	18-SOCS3	28,24	18-Beta Actin	26,63
19-SOCS1	25,91	19-SOCS3	26,31	19-Beta Actin	19,26
20-SOCS1	30,16	20-SOCS3	28,18	20-Beta Actin	22,06
21-SOCS1	27,27	21-SOCS3	26,5	21-Beta Actin	20,5
22-SOCS1	27,09	22-SOCS3	28,88	22-Beta Actin	19,7
23-SOCS1	31,11	23-SOCS3	29,21	23-Beta Actin	23,58
24-SOCS1	26,41	24-SOCS3	25,65	24-Beta Actin	18,18
25-SOCS1	34,65	25-SOCS3	31,84	25-Beta Actin	25,53
26-SOCS1	30,87	26-SOCS3	26,26	26-Beta Actin	23,1
27-SOCS1	29,55	27-SOCS3	28,04	27-Beta Actin	20,82
NC-SOCS1	38,24	NC-SOCS3	37,12	NC-Beta Actin	36,53

Pfaffl metoduna göre, hedef genin değeri referans genin relative (göreceli) niceliksel ölçümü karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. Hedef genin ikinci çalışma sonucunda elde edilen göreceli ölçüm değerleri

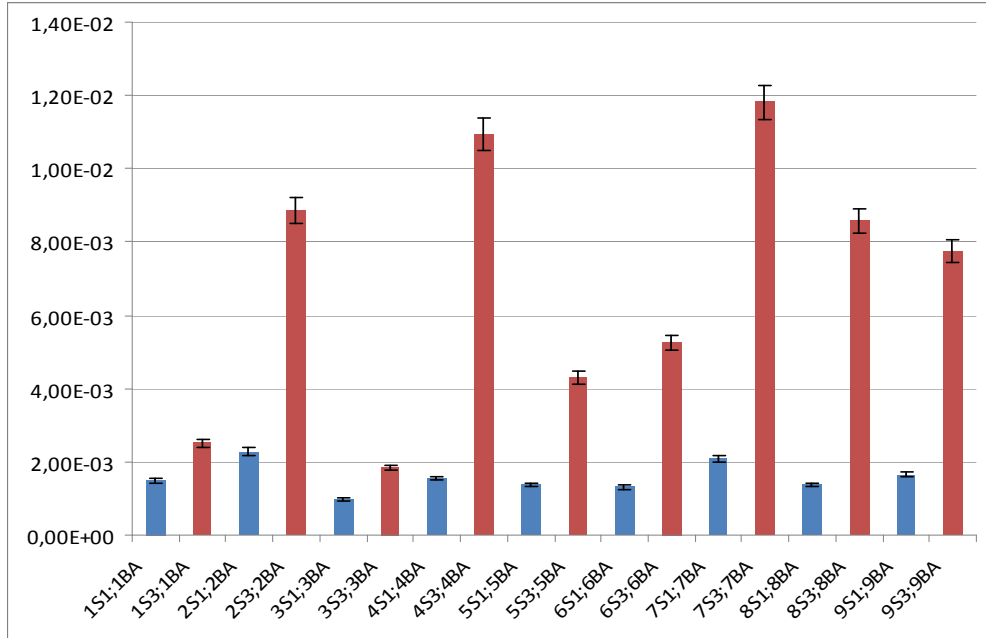
Örnek	Ratios	Örnek	Ratios
	Tgt/Ref		Tgt/Ref
1-BA;1-S1	1,25E-03	1-BA;1-S3	2,79E-03
2-BA;2-S1	1,34E-03	2-BA;2-S3	2,83E-03
3-BA;3-S1	5,13E-04	3-BA;3-S3	1,37E-03
4-BA;4-S1	6,19E-04	4-BA;4-S3	5,61E-03
5-BA;5-S1	8,83E-04	5-BA;5-S3	7,38E-03
6-BA;6-S1	4,50E-04	6-BA;6-S3	1,08E-03
7-BA;7-S1	1,93E-03	7-BA;7-S3	1,42E-02
8-BA;8-S1	8,60E-04	8-BA;8-S3	7,05E-03
9-BA;9-S1	1,30E-04	9-BA;9-S3	5,64E-03
10-BA;10-S1	4,14E-03	10-BA;10-S3	3,37E-03
11-BA;11-S1	2,51E-03	11-BA;11-S3	1,13E-02
12-BA;12-S1	1,15E-03	12-BA;12-S3	2,95E-03
13-BA;13-S1	1,49E-03	13-BA;13-S3	6,17E-03
14-BA;14-S1	1,77E-03	14-BA;14-S3	5,37E-03
15-BA;15-S1	9,65E-04	15-BA;15-S3	3,28E-03
16-BA;16-S1	6,41E-02	16-BA;16-S3	1,63E-01
17-BA;17-S1	1,14E-03	17-BA;17-S3	6,31E-03
18-BA;18-S1	9,37E-02	18-BA;18-S3	3,29E-01
19-BA;19-S1	9,96E-03	19-BA;19-S3	7,53E-03
20-BA;20-S1	3,64E-03	20-BA;20-S3	1,44E-02
21-BA;21-S1	9,14E-03	21-BA;21-S3	1,55E-02
22-BA;22-S1	5,97E-03	22-BA;22-S3	1,72E-03
23-BA;23-S1	5,42E-03	23-BA;23-S3	2,02E-02
24-BA;24-S1	3,33E-03	24-BA;24-S3	5,63E-03
25-BA;25-S1	1,79E-03	25-BA;25-S3	1,26E-02
26-BA;26-S1	4,58E-03	26-BA;26-S3	1,18E-02
27-BA;27-S1	2,35E-03	27-BA;27-S3	6,70E-03

4.1.2. SOCS-1 ve SOCS-3 Genlerinin İfadesi Üzerinde MP ve VD-3'ün Birlikte Kullanımlarının Etkileri

İki deney grubundaki BA;SOCS-1 ve BA;SOCS-3 oranlarının göreceli ekspresyon değerlerinin ortalaması alınarak (Çizelge 4.5-4.7, Grafik 4.1-4.3) doz / zaman bağımlı MP ve VD-3'ün birlikte kullanımlarının SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin ifadesi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir.

Çizelge 4.5. BA;SOCS-1 ve BA;SOCS-3'ün 6. saatteki ifadesinin ortalama göreceli ölçüm değerleri

Örnek	Ratios ort	Örnek	Ratios ort
1-Beta Actin;1-SOCS1	1,49E-03	1-Beta Actin;1-SOCS3	2,51E-03
2-Beta Actin;2-SOCS1	2,28E-03	2-Beta Actin;2-SOCS3	8,87E-03
3-Beta Actin;3-SOCS1	9,82E-04	3-Beta Actin;3-SOCS3	1,85E-03
4-Beta Actin;4-SOCS1	1,55E-03	4-Beta Actin;4-SOCS3	1,10E-02
5-Beta Actin;5-SOCS1	1,36E-03	5-Beta Actin;5-SOCS3	4,31E-03
6-Beta Actin;6-SOCS1	1,32E-03	6-Beta Actin;6-SOCS3	5,26E-03
7-Beta Actin;7-SOCS1	2,09E-03	7-Beta Actin;7-SOCS3	1,18E-02
8-Beta Actin;8-SOCS1	1,37E-03	8-Beta Actin;8-SOCS3	8,58E-03
9-Beta Actin;9-SOCS1	1,65E-03	9-Beta Actin;9-SOCS3	7,74E-03



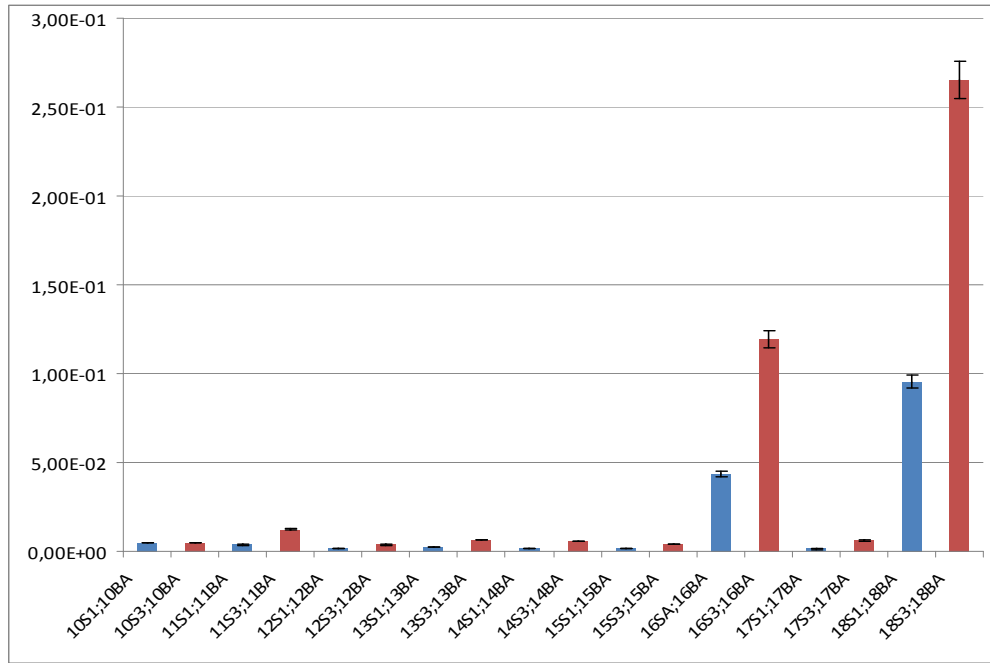
Şekil 4.3. BA;SOCS-1 ve BA; SOCS-3'ün 6. saatteki ifadesinin göreceli ölçüm tablosu

Çizelge 4.5 – Şekil 4.3 incelendiği zaman MP ve VD-3'ün birlikte kullanıldığı örneklerde 6. saatte SOCS-3 geninin ifadesinin önemli düzeyde arttığı tespit edilmiştir. 10^{-5} M derişimlerinde MP SOCS-1 geninin ifadesini arttırırken, 10^{-4} M derişimlerdeki MP SOCS-1 geninin ifadesini azaltmıştır. Ancak SOCS-3 geninin ifadesinde artış gözlenmiştir. 5×10^{-9} M derişiminde VD-3 hem SOCS-1'in hem de SOCS-3 geninin ifadesini azaltırken, 5×10^{-8} M VD-3 derişiminde ise sadece

SOCS-1 geninin ifadesi azalmıştır. Ajanların birlikte kullanıldığı örneklerde SOCS-3 geninin ifadesinin daha da arttığı, SOCS-1 geninin ifadesinin ise sadece 10^{-4} M MP / 5×10^{-8} M VD-3 derişiminde arttığı tespit edilmiştir. SOCS-3 geninin ifadesinin en çok 10^{-4} M MP / 5×10^{-8} M VD-3 derişiminde arttığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.6. BA;SOCS-1 ve BA;SOCS-3'ün 12. saatteki ifadesinin ortalama göreceli ölçüm değerleri

Örnek	Ratios ort	Örnek	Ratios ort
10-Beta Actin;10-SOCS1	4,64E-03	10-Beta Actin;10-SOCS3	4,76E-03
11-Beta Actin;11-SOCS1	3,66E-03	11-Beta Actin;11-SOCS3	1,25E-02
12-Beta Actin;12-SOCS1	1,68E-03	12-Beta Actin;12-SOCS3	3,65E-03
13-Beta Actin;13-SOCS1	2,35E-03	13-Beta Actin;13-SOCS3	6,57E-03
14-Beta Actin;14-SOCS1	1,89E-03	14-Beta Actin;14-SOCS3	5,63E-03
15-Beta Actin;15-SOCS1	1,53E-03	15-Beta Actin;15-SOCS3	4,21E-03
16-Beta Actin;16-SOCS1	4,36E-02	16-Beta Actin;16-SOCS3	1,19E-01
17-Beta Actin;17-SOCS1	1,24E-03	17-Beta Actin;17-SOCS3	6,21E-03
18-Beta Actin;18-SOCS1	9,56E-02	18-Beta Actin;18-SOCS3	2,65E-01

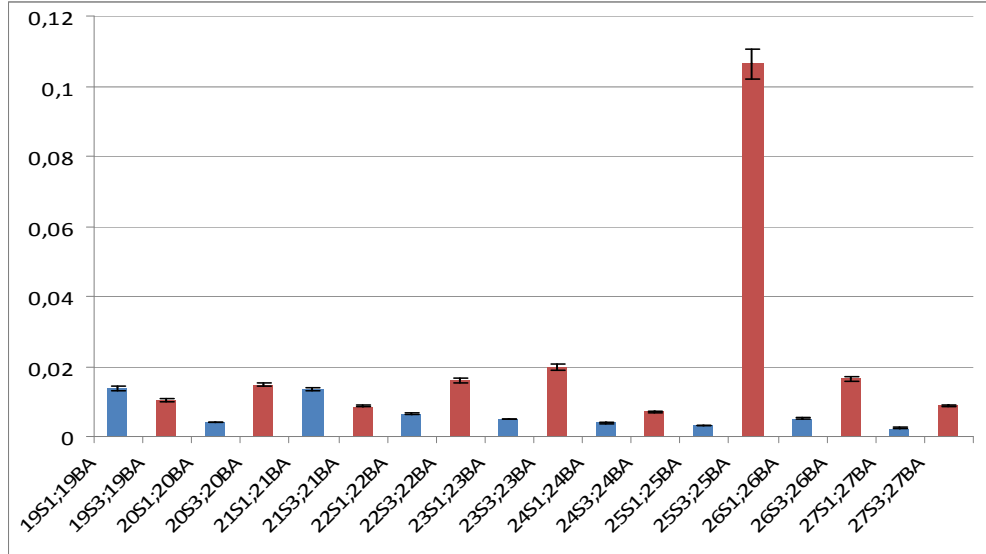


Şekil 4.4. BA;SOCS-1 ve BA;SOCS-3'ün 12. Saatteki ifadesinin ortalama göreceli ölçüm tablosu

Çizelge 4.6 – Şekil 4.4 incelendiği zaman 10^{-4} M MP/ 10^{-8} M VD-3 ve 10^{-4} M MP/ 10^{-9} M VD-3 derişimlerinde 12. saatte SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin ifadesinin arttığı tespit edilmiştir. MP'un ve VD-3'ün tek kullanıldıkları derişimlerde SOCS-1 geninin ifadesi azalırken, sadece 10^{-5} M derişimindeki MP'da SOCS-3 geninin ifadesinde az da olsa bir artış görülmüştür. Azalma VD-3'ün derişiminde daha yoğundur.

Çizelge 4.7. BA;SOCS-1 ve BA;SOCS-3'ün 24. saatteki ifadesinin ortalama göreceli ölçüm değerleri

Örnek	Ratios ort	Örnek	Ratios ort
19-Beta Actin;19-SOCS1	1,38E-02	19-Beta Actin;19-SOCS3	3,65E-04
20-Beta Actin;20-SOCS1	4,01E-03	20-Beta Actin;20-SOCS3	1,50E-02
21-Beta Actin;21-SOCS1	1,36E-02	21-Beta Actin;21-SOCS3	8,69E-03
22-Beta Actin;22-SOCS1	6,34E-03	22-Beta Actin;22-SOCS3	1,60E-02
23-Beta Actin;23-SOCS1	4,96E-03	23-Beta Actin;23-SOCS3	1,98E-02
24-Beta Actin;24-SOCS1	3,94E-03	24-Beta Actin;24-SOCS3	7,09E-03
25-Beta Actin;25-SOCS1	3,13E-03	25-Beta Actin;25-SOCS3	1,06E-01
26-Beta Actin;26-SOCS1	5,04E-03	26-Beta Actin;26-SOCS3	1,65E-02
27-Beta Actin;27-SOCS1	2,42E-03	27-Beta Actin;27-SOCS3	8,85E-03



Şekil 4.5. BA;SOCS-1 ve BA;SOCS-3'ün 24. saatteki ifadesinin ortalama göreceli ölçüm değerlerinin tablosu

Çizelge 4.7 – Şekil 4.5 incelendiği zaman 10^{-4} M MP/ 10^{-8} M VD-3 derişiminin SOCS-3 geninin ifadesini 24. saatte arttırdığı ve SOCS-1 geninin ifadesini ise azalttığı tespit edilmiştir. 10^{-4} M MP/ 5×10^{-9} M VD-3 derişimlerinde SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin ifadesinde önemli düzeyde azalma görülmüştür. VD-3'ün tek kullanıldığı derişimlerde genlerin ifadesinde önemli etki görülmemiştir. 10^{-5} M MP derişimlerde SOCS-1 geninin ifadesi azalırken, SOCS-3 geninin ifadesi artmıştır. 10^{-5} M MP / 5×10^{-9} M VD-3 derişiminde SOCS-1 geninin ifadesi azalırken, SOCS-3 geninin ifadesi artmıştır. Aynı durum 10^{-4} M MP için de geçerli olmaktadır. 10^{-5} M MP / 5×10^{-8} M VD-3 derişimi de aynı şekilde etki göstermektedir.

Pfaffl modeline uygun olarak, real time PZR'da uygulamalar arasındaki göreceli ifade oranları karşılaştırılarak Delta-Delta CT metodu oluşturulmuştur [61].

$$R = 2^{-(\Delta CP_{\text{örnek}} - \Delta CP_{\text{kontrol}})}$$

ve

$$R = 2^{-\Delta \Delta CP}$$

Bu metoda göre, referans gene karşılık istenilen genin verimliliği belirlenmektedir. Bu çalışmada MP ve VD-3'ün birlikte kullanımlarının SOCS-1 ve SOCS-3 genleri üzerindeki etkinliğini ölçmek üzere, delta-delta CT metodu uygulanmıştır.

4.1.3. MP ve VD₃'ün Sinerjistik Etkilerinin Delta-Delta CT Metoduna Göre Değerlendirilmesi

SOCS-1, SOCS-3 ve Beta Aktin genlerinin CP değerlerinin standart sapmaları hesaplanmıştır. İlaç uygulaması yapılmış örneklerdeki SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin CP değerleri, ilaç uygulaması yapılmamış kontrol grubundaki örneklerle karşılaştırılıp, kontrol grubuna göre genlerin ifadelerinin artış miktarları hesaplanmıştır (Çizelge 4.8 - 4.13).

Çizelge 4.8. SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin 6. saatteki ifadesinin CP değerlerinin standart sapmaları

1-SOCS1	27,72 ± 0,74	1-SOCS3	26,95 ± 0,34	1-Beta Actin	18,31 ± 0,5
2-SOCS1	28,65 ± 0,46	2-SOCS3	26,99 ± 1,03	2-Beta Actin	19,73 ± 0,18
3-SOCS1	27,79 ± 0,51	3-SOCS3	26,74 ± 0,14	3-Beta Actin	17,61 ± 0,25
4-SOCS1	28,79 ± 0,76	4-SOCS3	25,85 ± 0,52	4-Beta Actin	19,14 ± 0,25
5-SOCS1	29,11 ± 1,08	5-SOCS3	26,65 ± 0,47	5-Beta Actin	19,74 ± 0,3
6-SOCS1	28,12 ± 0,42	6-SOCS3	27,07 ± 0,2	6-Beta Actin	17,73 ± 0,31
7-SOCS1	30,17 ± 0,11	7-SOCS3	27,26 ± 0,15	7-Beta Actin	20,83 ± 0,44
8-SOCS1	29,42 ± 0,78	8-SOCS3	26,69 ± 0,48	8-Beta Actin	19,80 ± 0,22
9-SOCS1	27,84 ± 0,36	9-SOCS3	25,63 ± 0,45	9-Beta Actin	18,56 ± 0,05

Çizelge 4.9. SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin 6. saatteki ifadesinin $\Delta\Delta CT$ ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonuçları

SOCS1					
	CT B-actin	CT gene of interest	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
1) Kontrol	18,31	27,725	9,415	0	1
2) 10-5 MP	19,735	28,65	8,915	-0,5	1,41
3) 5X10-9 VD	17,615	27,795	10,18	0,765	0,59
4) 10-5MP/5X10-9VD	19,14	28,795	9,655	0,24	0,85
5) 10-4 MP	19,745	29,365	9,62	0,205	0,87
6) 5X10-8VD	17,73	28,125	10,395	0,98	0,51
7) 10-4MP/5X10-8VD	20,83	30,175	9,345	-0,07	1,05
8) 10-5MP/5X10-8VD	19,8	29,42	9,62	0,205	0,87
9) 10-4MP/5X10-9VD	27,825	27,84	0,015	-9,4	675,59*
SOCS3					
	CT B-actin	CT gene of interest	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
1) Kontrol	18,31	26,955	8,645	0	1
2) 10-5 MP	19,735	26,995	7,26	-1,385	2,61*
3) 5X10-9 VD	17,615	26,745	9,13	0,485	0,71
4) 10-5MP/5X10-9VD	19,14	25,85	6,71	-1,935	3,82*
5) 10-4 MP	19,745	26,65	6,905	-1,74	3,34*
6) 5X10-8VD	17,73	27,075	9,345	0,7	0,62
7) 10-4MP/5X10-8VD	20,83	27,265	6,435	-2,21	4,63*
8) 10-5MP/5X10-8VD	19,8	26,69	6,89	-1,755	3,38*
9) 10-4MP/5X10-9VD	27,825	25,63	-2,195	-10,84	1833,01*

*p<0,05

Çizelge 4.10. SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin 12. saatteki ifadesinin CP değerlerinin standart sapmaları

10-SOCS1	25,94 ± 0,17	10-SOCS3	26,19 ± 0,35	10-Beta Actin	18,18 ± 0,33
11-SOCS1	29,35 ± 0,6	11-SOCS3	27,51 ± 0,27	11-Beta Actin	21,17 ± 0,14
12-SOCS1	27,56 ± 0,43	12-SOCS3	26,39 ± 0,24	12-Beta Actin	18,26 ± 0,5
13-SOCS1	28,48 ± 0,52	13-SOCS3	26,9 ± 0,05	13-Beta Actin	19,64 ± 0,04
14-SOCS1	28,02 ± 0,15	14-SOCS3	26,44 ± 0,13	14-Beta Actin	18,97 ± 0,06
15-SOCS1	27,31 ± 0,52	15-SOCS3	25,78 ± 0,28	15-Beta Actin	17,85 ± 0,05
16-SOCS1	31,94 ± 0,39	16-SOCS3	30,41 ± 0,57	16-Beta Actin	27,24 ± 0,13
17-SOCS1	29,97 ± 0,39	17-SOCS3	27,64 ± 0,25	17-Beta Actin	30,31 ± 0,27
18-SOCS1	30,07 ± 0,02	18-SOCS3	28,64 ± 0,4	18-Beta Actin	26,68 ± 0,05

Çizelge 4.11. SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin 12. saatteki ifadesinin $\Delta\Delta CT$ ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonuçları

SOCS1					
	CT B-actin	CT gene of interest	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
10) Kontrol	18,185	25,945	7,76	0	1
11) 10-5 MP	21,175	29,35	8,175	0,415	0,75
12) 5X10-9 VD	18,265	27,56	9,295	1,535	0,35
13) 10-5MP/5X10-9VD	19,645	28,485	8,84	1,08	0,47
14) 10-4 MP	18,97	28,025	9,055	1,295	0,41
15) 5X10-8VD	17,855	27,315	9,46	1,7	0,31
16) 10-4 MP/5X10-8VD	27,24	31,94	4,7	-3,06	8,34*
17) 10-5MP/5X10-8VD	20,31	29,975	9,665	1,905	0,27
18) 10-4MP/5X10-9VD	26,68	30,07	3,39	-4,37	20,68*
SOCS3					
	CT B-actin	CT gene of interest	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
10) Kontrol	18,185	26,195	8,01	0	1
11) 10-5 MP	21,175	27,515	6,34	-1,67	3,18*
12) 5X10-9 VD	18,265	26,395	8,13	0,12	0,92
13) 10-5MP/5X10-9VD	19,645	26,09	6,445	-1,565	2,96*
14) 10-4 MP	18,97	26,445	7,475	-0,535	1,45
15) 5X10-8VD	17,855	25,78	7,925	-0,085	1,06
16) 10-4 MP/5X10-8VD	27,24	30,41	3,17	-4,84	28,64*
17) 10-5MP/5X10-8VD	20,31	27,64	7,33	-0,68	1,60
18) 10-4MP/5X10-9VD	26,68	28,64	1,96	-6,05	66,26*

*p<0,05

Çizelge 4.12. SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin 24. saatteki ifadesinin CP değerlerinin standart sapmaları

	19-SOCS1	25,55 ± 0,36	19-SOCS3	25,96 ± 0,35	19-Beta Actin	19,31 ± 0,06
24. saat	20-SOCS1	29,58 ± 0,58	20-SOCS3	27,68 ± 0,5	20-Beta Actin	21,61 ± 0,45
	21-SOCS1	26,59 ± 0,68	21-SOCS3	26,17 ± 0,33	21-Beta Actin	20,30 ± 0,2
	22-SOCS1	28,65 ± 1,56	22-SOCS3	28,44 ± 0,44	22-Beta Actin	21,34 ± 1,65
	23-SOCS1	30,51 ± 0,6	23-SOCS3	28,51 ± 0,7	23-Beta Actin	22,85 ± 0,73
	24-SOCS1	26,08 ± 0,33	24-SOCS3	25,24 ± 0,41	24-Beta Actin	18,07 ± 0,11
	25-SOCS1	34,19 ± 0,46	25-SOCS3	31,7 ± 0,14	25-Beta Actin	25,73 ± 0,21
	26-SOCS1	29,95 ± 0,92	26-SOCS3	26,67 ± 0,41	26-Beta Actin	22,31 ± 0,79
	27-SOCS1	29,55 ± 0,005	27-SOCS3	27,73 ± 0,31	27-Beta Actin	20,86 ± 0,05

Çizelge 4.13. SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin 24. saatteki ifadesinin $\Delta\Delta CT$ ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ sonuçları

SOCS1					
	CT B-actin	CT gene of interest	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
19) Kontrol	19,315	25,555	6,24	0	1
20) 10-5 MP	21,615	29,585	7,97	1,73	0,30
21) 5X10-9 VD	20,305	26,59	6,285	0,045	0,97
22) 10-5 MP/5X10-9VD	21,345	28,65	7,305	1,065	0,48
23) 10-4 MP	22,85	30,515	7,665	1,425	0,37
24) 5X10-8 VD	18,075	26,08	8,005	1,765	0,29
25) 10-4MP/5X10-8VD	25,735	34,195	8,46	2,22	0,21
26) 10-5MP/5X10-8VD	22,31	29,95	7,64	1,4	0,38
27) 10-4MP/5X10-9VD	20,865	29,555	8,69	2,45	0,18
SOCS3					
	CT B-actin	CT gene of interest	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
19) Kontrol	19,315	25,965	6,65	0	1
20) 10-5 MP	21,615	27,685	6,07	-0,58	1,49
21) 5X10-9 VD	20,305	26,175	5,87	-0,78	1,72
22) 10-5 MP/5X10-9VD	21,345	28,445	7,1	0,45	0,73
23) 10-4 MP	22,85	28,51	5,66	-0,99	1,99
24) 5X10-8 VD	18,075	28,245	10,17	3,52	0,09
25) 10-4MP/5X10-8VD	25,735	31,7	5,965	-0,685	1,61
26) 10-5MP/5X10-8VD	22,31	26,67	4,36	-2,29	4,89*
27) 10-4MP/5X10-9VD	20,865	27,73	6,865	0,215	0,86

*p<0,05

4.1.4. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmada K562 hücre hattından elde edilen RNA örneklerinin cDNA sentezi ve niceliksel eş zamanlı RT-PZR ölçümü iki kez tekrarlanmıştır. Ortalamaları alındıktan sonra (+) ve (-) standart sapmaları alınmıştır. SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin ifadelerinin 6., 12. ve 24. saat ortalama $\Delta\Delta CT$ ve $2^{-\Delta\Delta CT}$ değerleri, gruplar arasında ve saatler arasında karşılaştırılıp, istatistiksel olarak analiz edilmiştir. İstatistiksel analizde bağımsız iki grup karşılaştırılması yapılmıştır.

SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin $\Delta\Delta CT$ değerleri bakımından saatler arasında anlamlı bir fark görülmez iken, SOCS-3 geninin $\Delta\Delta CT$ değeri bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu belirtilmiştir.

4.2. TARTIŞMA

KML hematopoetik kök hücrelerin çoğalması ile oluşan klonal bir hastalıktır [3]. KML tüm lösemilerin yaklaşık %15'ini oluşturmaktadır ve ortalama 45-55 yaşlarda görülüp, yaş artışına bağlı olarak insidansı da artmaktadır. Hastaların yaklaşık olarak %30'u 60 yaş üzerindedir. Vakaların yaklaşık olarak %3'ü çocukluk çağında görülmektedir [12].

KML 9. kromozomdaki Abl geninin 22. kromozomdaki Bcr genine translokasyonu ile oluşan **Ph** kromozomu ile karakterize edilmektedir [3,12]. **Ph** füzyon proteini tarafından kodlanan p210 onkogeni, hücrenin apoptoz ve çoğalma mekanizmalarında bozukluklara yol açmaktadır [18-19]. Hastalığın tedavisinde ise ilk olarak IFN- α [63] kullanılmıştır. Ardından imatinib mesilat [64], arsenik trioksit [65], vitamin D türevleri [66], mitoksantron, sitozin arabinozot ve steroid türevleri [67] gibi ilaçlar kullanılmaktadır.

Steroid ve türevleri ile yapılan klinik çalışmalar, steroid bileşenlerinin blast hücreleri üzerinde granülositik ve monositik farklılaşmayı uyardıkları ve böylece, steroidlerin lösemi hücrelerinin farklılaşmasında önemli bir etken olabileceğini göstermiştir [54]. Bu çalışmada bir steroid türevi olan 6 α -metilprednizolon ve sterol türevi [67] olan 1 α -25 (OH) $_2$ D $_3$ 'ün KML hücre hattında SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin ifadesi üzerindeki, in-vitro sinerjistik etkilerinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, genlerin ifadesinin ölçümü niceliksel eş zamanlı RT-PZR yöntemi kullanılarak Light Cycler 480 II cihazı ile yapılmıştır.

SOCS-1 ve SOCS-3 genleri, sitokin sinyallerinin baskılayıcıları olarak bilinen SOCS genlerinin iki üyesi olup, özellikleri en çok bilinen genler arasındadır [34-35, 40]. Lösemi hücreleri üzerinde bu iki genin ifadesine yönelik çalışmalar başlatılıp, genlerin ifadelerinin ve etkileştikleri sinyallerin lösemi hücreleriyle ilişkileri araştırılmıştır. Roman ve ark. [68] yeni teşhis edilmiş KML hastalarında SOCS-1 geninin sürekli olarak ifade edilip edilmediği ve bunun, IFN- α ile ilişkisini araştırmışlardır. Kronik fazdaki 75 KML hastasından 49'unda (yaklaşık %65) SOCS-

1 geninin sürekli olarak ifade edildiğini ve bunun IFN- α 'ya yanıtının zayıf olduğunu göstermişlerdir.

Yamauchi ve ark. birçok KML hücre hattında SOCS-3 geninin ifadesinin sürekli artışında IFN α 'ya olan direnci araştırmışlardır [69]. KML blast dönemindeki hastaların periferal kanlarından, KML hücre hattının yeni bir serisi olan, SOCS-3 geninin ifadesinin neredeyse hiç belirlenemediği KT-1 hücre hattı hazırlamışlardır. KT-1 hücre hattı diğer hücre hatlarının aksine IFN α 'nın apoptoz uyarıcı ve çoğalmayı durdurucu etkilerine karşı duyarlıdır. Çalışmaları sonucunda KT-1 hücre hattında SOCS-3 geninin ifade düzeyinin zayıf olduğunu tespit etmişlerdir. Ancak K562 ve TK91 hücre hatlarının daha fazla SOCS-3 ifade ettikleri ve bunun sonucu olarak IFN α 'ya karşı daha dirençli olduklarını belirtmişlerdir [70-71].

Reddy ve ark. K562 hücre hattını Abl kinaz inhibitörü olan imatinib (2 μ M) ile bir gece muamele ederek SOCS genlerinin ifadesini test etmişlerdir. SOCS mRNA'nın ifadesini niceliksel PZR ile ölçmüşlerdir. SOCS1 ve SOCS3 mRNA'larının K562 hücrelerinde yoğun ifade edildiklerini ve söz konusu genlerin ifadelerinin Abl kinaz inhibisyonu ile azaldığını tespit etmişlerdir. SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin ifadeleri için BCR/ABL'nin kinaz aktivitesinin önemli olduğunu vurgulamışlardır [72].

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, MP'un insan miyeloid lösemi hücrelerinde (HL-60) farklılaşma ve apoptoz üzerinde [73], U-937 insan miyelomonositik lösemi hücrelerinin farklılaşması üzerinde [53], AML'nin çeşitli alt gruplarında farklılaşma mekanizması üzerindeki etkileri araştırılmıştır. VD-3'ün HL-60 ve osteoblast benzeri hücrelerin farklılaşma ve çoğalma mekanizması üzerindeki etkileri çalışılmıştır [57, 74]. Bu çalışmada K562 hücre hattında iki ajanın birlikte kullanımlarının SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin ifadesi üzerinde oluşturabileceği değişiklikleri gözlemleyip, bu değişikliklerden yola çıkarak K562 hücrelerinin çoğalma mekanizmasını etkileyip etkilemediklerine bakılmıştır.

Morales ve ark. [75] sıçanlarda osteoblast benzeri osteosarkoma hücre hattında (UMR 106) 1,25-(OH)₂D₃'ün JAK2/STAT5 yolu üzerinden büyüme hormonu sinyalinin etkisini uzattığı ve büyüme hormonu tarafından uyarılan SOCS-3 geninin ifadesini ise azalttığını belirtmişlerdir. Hücre özütleri Western blot ile analiz edilmiştir ve anti-SOCS-3 antikoru uygulanmıştır. 1,25-(OH)₂-D₃ ile muamele edilmemiş hücrelerde büyüme hormonunun etkisiyle 2. saatten itibaren SOCS-3 geninin ifadesinin arttığını belirtmişlerdir. 1,25-(OH)₂-D₃ ile muamele edilen hücrelerde büyüme hormonu tarafından uyarılan SOCS-3 geninin ifadesinin 4. saatten itibaren azaldığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada da VD-3'ün tek kullanıldığı örneklerde SOCS-3 geninin ifadesinin azaldığı gözlemlenmiştir.

Michael ve ark. [76] COS7 maymun mide hücrelerinde sitokin ve glukokortikoid sinyali arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Bu ilişkiden yola çıkarak glukokortikoid reseptörleri (GR) ve SOCS-1 geni arasındaki etkileşimin glukokortikoid sinyali üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Çalışmalarında, endojen SOCS-1 ve GR etkileşimini görebilmek için ayrıca 5 haftalık C57BL/6 farelerine 5 mg IFN γ enfekte etmişlerdir. SOCS-1 mRNA miktarını ölçmek için niceliksel gerçek RT-PZR yönteminde Taq Man metodunu uygulamışlardır. Genin rölatif ekspresyon düzeyini $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülüne göre hesaplamışlardır. IFN γ ile muamele edilmeyen farelerde SOCS-1 protein ekspresyonu gözlemlenmemiştir. IFN γ ile muamele edilmiş farelerin karaciğerlerinin anti-GR immüno-presipitantlarında SOCS-1 geninin ifade edildiğini tespit etmişlerdir. Ancak hücrelere GR ile agonist deksametazon eklenmesinden yaklaşık 4 saat sonra SOCS-1 geninin GR ile etkileşiminin azaldığı ortaya çıkmıştır. Aynı durum, GR ile antagonist olan RU486 ile muameleden yaklaşık 24 saat sonra ortaya çıkmıştır. Bu durumda GR ile ister agonist ister antagonist olsun, genel olarak glukokortikoidlerin reseptörlere uzun süreli bağlanması ile bu durumun ortaya çıktığını göstermektedir.

Bu çalışmada revers transkriptaz RT-PZR tekniği ve Taq-Man probu kullanılmıştır. Genlerin göreceli ifade düzeyi $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü ile hesaplanmıştır. Bu çalışmada 6. saatte MP, VD₃'ün tek ve birlikte uygulandıkları hücre hattında SOCS-3 geninin ifadesinin genel olarak arttığı tespit edilmiştir. 10^{-4} M MP'un 12. saatte

SOCS1 geninin ifadesini yoğun olarak azalttığı tespit edilirken, 10^{-5} M MP'un ise hafif olarak azalttığı tespit edilmiştir. MP'a göre VD3 ise SOCS-1 geninin ifadesini daha yoğun bir şekilde azaltmıştır. İkisinin sinerjistik etkilerinde ise, MP'un etkisine bağlı olarak SOCS-1 geninin ifadesinin arttığı gözlemlenmiştir. Ancak 24. saatte VD3 hariç, bütün örneklerde SOCS-1 geninin ifadesinin azaldığı gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada niceliksel eş zamanlı RT-PCR yöntemi sonucunda SOCS-3 geninin amplifikasyon döngüsüne SOCS-1 geninden daha önce girdiği tespit edilmiştir. SOCS-3 geninin SOCS-1 genine göre daha önce ifade edildiği tespit edilmiştir. Kontrol grubuna göre iki gen, rölatif ekspresyon değerleri bakımından karşılaştırıldığında 6. saatte 10^{-4} M MP ve 5×10^{-9} M VD-3'ün birlikte uygulandığı hücrelerde SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin ifadesinin arttığı tespit edilmiştir (SOCS-1: 675,59 kat, SOCS-3: 1833,01 kat) (Çizelge 4.8). Ancak SOCS-3 geninin SOCS-1 genine göre daha fazla ifade edildiği tespit edilmiştir. VD-3'ün tek kullanıldığı örneklerde her iki genin ifadesinin yoğun olarak azaldığı tespit edilmiştir. MP'un tek kullanıldığı örneklerde SOCS-1 geninin ifadesi MP'un artan dozuna bağlı olarak azalırken, SOCS-3 geninin ifadesi artmıştır. Sonuç olarak 6. saatte MP, VD-3'e göre daha güçlü etki göstermiştir ve SOCS-3 geninin ifadesini SOCS-1 genine göre daha fazla arttırmıştır. MP ve VD-3'ün birlikte uygulandığı örneklerde SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin ifadesi 10^{-4} M MP ve 5×10^{-9} M VD-3'te en fazla artış gösterirken, MP derişiminin düştüğü örneklerde genlerin ifadesinde azalma görülmüştür.

10^{-4} M MP ve 5×10^{-9} M VD-3'ün birlikte kullanımının SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin ifadesi üzerindeki etkileri 6. saate göre 12. saatte (Çizelge 4.11) azalmasına rağmen, diğer örneklere göre en fazla artışın olduğu söylenebilir (SOCS-1: 20,68 kat, SOCS-3: 66,26 kat). Ancak birlikte uygulandıkları örneklerde yüksek doz VD-3'ün uygulanması SOCS-1 geninin ifadesini 6. saate göre arttırırken, 12. saatte uygulanan 10^{-4} M MP/ 5×10^{-9} M VD-3'e göre de azaltmıştır. Düşük doz MP/VD-3'ün 12. saatte, VD-3 dozunun azaldığı örneklerde SOCS-1 geninin ifadesini 6. saate göre düşürdüğü tespit edilmiştir. Kısaca 12. saatte 10^{-4} M MP SOCS-1 geninin ifadesini azaltırken, düşük doz VD-3 ile birlikte uygulandığında arttırmıştır. Ancak 6. saate göre ifadesi azalmıştır. Yine VD-3'ün tek kullanıldığı

örneklerle göre MP, bu genlerin ifadeleri üzerinde daha fazla etki yaratmıştır. SOCS-3 geni 12. saatte tüm örneklerde ifade edilmiştir. MP tek başına VD-3'ten daha fazla etki göstermiştir. Ancak ikisinin birlikte kullanımında MP'un tek başına yarattığı etkiden daha fazla ifade olduğu, ancak bu değerlerin 6. saate göre azaldığı belirlenmiştir. İki ajanın birlikte kullanımında MP'un etkisine bağlı olarak ifadenin arttığı belirtilmiştir. Ancak 6. saate göre, VD-3'ün etkisinin de arttığı gözlemlenmiştir. Düşük doz MP SOCS-1 geninin ifadesini azaltırken, SOCS-3 geninin ifadesini ise arttırmıştır. VD-3'ün kullanıldığı örneklerde SOCS-1 geninin ifadesi azalırken, SOCS-3 geninin ifadesi artmıştır.

MP ve VD-3'ün beraber kullanımı 24. saatte SOCS-1 geninin ifadesini azaltmıştır. Özellikle de 10^{-4} M MP/VD-3'ün birlikte kullanımında bu durum daha belirgindir (10^{-4} M MP/ 5×10^{-9} M VD-3: 0,18 kat, 10^{-4} M MP/ 5×10^{-8} M VD-3: 0,21 kat). Ancak ilginç bir şekilde, 5×10^{-9} M VD-3'ün SOCS-1 geninin ifadesini arttırdığı tespit edilmiştir (0,97 kat).

Doz ve zaman bağımlı olarak incelendiğinde, SOCS-3 geninin ifadesinin 24. saatte (Çizelge 4.13) 6. ve 12. saatlere göre azaldığı gözlemlenmiştir. VD-3'ün tek kullanıldığı durumlarda, dozun artmasıyla birlikte SOCS-3 geninin ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir. 10^{-4} M MP/VD-3'ün birlikte kullanımında VD-3'ün dozunun artmasıyla birlikte genin ifadesinin azaldığı tespit edilmiştir (10^{-4} M MP/ 5×10^{-9} M VD-3: 0,86 kat, 10^{-4} M MP/ 5×10^{-8} M VD-3: 1,61 kat). MP'un tek kullanıldığı durumlarda MP, SOCS-3 geninin ifadesini arttırmıştır. Kısacası, 24. saatte MP'un SOCS-1 geninin ifadesi üzerindeki etkisi gittikçe düşmüştür ancak düşük doz VD-3 arttırmıştır. SOCS-3 geninin ifadesinin artışında da 6. ve 12. saatlere göre, düşük doz VD-3'ün etkisi belirginleşmiştir.

Bu sonuçlardan da anlaşılıyor ki 6. saatte SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin ifadesi üzerinde YDMP (10^{-4} M) ve düşük doz (5×10^{-9} M) VD-3'ün birlikte kullanıldığı durumlarda, bu iki ajanın tek kullanıldığı durumlarda oluşturdukları etkiden daha fazla artış sağlamıştır. Ancak SOCS-3'ün ifadesi SOCS-1'e göre daha fazla olmuştur. Tek kullandıklarında, MP'un VD-3'ten daha fazla etkili olduğu

gözlemlenmiştir. 12. saatte de YDMP ve düşük doz VD-3'ün birlikte kullanıldığı örneklerde genlerin ifadesinin daha fazla arttığı ancak 6. saate göre bu ifadenin azaldığı tespit edilmiştir. Tek kullandıklarında MP'un yine VD-3'ten daha fazla etki yarattığı gözlemlenmiştir. İlginç bir şekilde 24. saatte, SOCS-1 ve SOCS-3 genleri üzerinde düşük doz MP ve yüksek doz VD-3'ün birlikte kullanıldığı örnekler üzerinde, YDMP ve düşük doz VD-3'ün birlikte kullanıldığı örnekler üzerinden daha fazla etki yarattığı gözlemlenmiştir. Ayrıca, düşük doz VD-3'ün tek başına, genlerin ifadesini arttırdığı gözlemlenmiştir. Yine 24. saatte de SOCS-3 geninin SOCS-1 geninden daha fazla ifade edildiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin ifadesinde MP'un VD-3'ten daha fazla etkisi olduğu tespit edilirken, genel olarak MP ve VD-3'ün birlikte kullanılmasıyla daha fazla upregülasyon tespit edilmiştir. Bundan da, bu iki ajanın birlikte kullanımlarının, tek kullandıkları durumdan daha fazla artış sağladığı belirlenmiştir. Ayrıca düşük doz VD-3'ün, genlerin ifadelerini 24. saatte arttırdığı ve en çok, SOCS-3 geninin ifadesinin arttığı tespit edilmiştir.

SOCS-3 geninin ifadesinin artışı, IL-6 tarafından oluşturulan sinyal ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. IL-6 glikoprotein 130 (gp130) reseptörlerine bağlanarak, JAK/STAT aracılığıyla STAT-1 ve STAT-3 moleküllerinin buraya bağlanmasını sağlamaktadır [77-78]. Bu çalışmada SOCS-3 geninin ifadesinin artışı bu sinyal aracılığıyla sağlanmış olabilir. Çünkü IL-6 ile uyarılmış STAT-3 moleküllerinin MAPK'ı (Mitojen aktive edici protein kinaz) aktive ettiği ve hücrelerin yaşamında ve farklılaşmasında da rol aldığı düşünülmektedir [77-78]. Bu çalışmada SOCS-3 geninin ifadesinin artışı belki de MAPK sinyalini inhibe ederek, hücrelerin çoğalmasını durdurabilmektedir. SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin her ikisi de STAT-3'e bağlanabilmesine rağmen, SOCS-1 geninin genel olarak IL-4, IFN α veya IFN γ reseptörleri ile SOCS-3 geninin ise genel olarak gp130 reseptörleriyle etkileştiği gösterilmiştir [38].

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Yüksek doz MP ve düşük doz VD-3'ün birlikte uygulandığı örneklerde SOCS-1 (675,59 kat) ve SOCS-3 (1833,01 kat) genlerinin ifadesinin 6. saatte arttığı tespit edilmiştir.
2. SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin ifadesinin artışında yüksek doz MP ve düşük doz VD-3'ün sinerjistik etki gösterdiği anlaşılmaktadır.
3. MP tek başına, genlerin ifadesini artırmaya yeterli olmuştur.
4. VD-3'ün yüksek dozu (5×10^{-8} M VD-3) düşük doz MP (10^{-5} M) ile kullanıldığında ancak 24. saatte SOCS-3 geninin ifadesini (4,89 kat) arttırmıştır.
5. Yapılan çalışma sonucunda, bu iki ajan SOCS-3 geninin ifadesini SOCS-1 geninin ifadesinden daha fazla arttırdığı tespit edilmiştir.

Bu çalışma, KML kanser hücresinin çoğalmasını durduran tedavilerdeki yolakları anlamada öncül çalışma niteliği taşımaktadır. Kullanılan bu iki ajanın hücreler üzerindeki potansiyel etkisinin, çoğalmayı durdurmasına yönelik olduğu ve JAK/STAT mekanizması ile gerçekleşen lösemi ve birçok kanser türlerinde bu çalışmanın alternatif bir bakış açısı sağlayabileceği düşünülmektedir. Ancak hücrelerin farklılaşması üzerindeki etkisi hala tartışmalıdır. Ayrıca in vitro çalışmalar ve diğer potansiyel antilösemik ve farklılaştırıcı ajanlar ile birlikte yapılacak çalışmaların gelecekteki tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde rol oynayacağı düşünülmektedir. Ancak in vivo hayvan çalışmaları ile birlikte de desteklenmesi gerekmektedir.

Gelecek çalışmalarda SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin fazla ifade edildiği AML alt gruplarında, B öncülü lösemilerde, U937 (miyelomonositik lösemi) ve HL-60 (İnsan akut miyeloid lösemi) gibi hücre hatlarında çoğalmayı durdurucu etkilerine bakılması yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

- [1] “Vücut Sıvıları Elektrolitleri ve Kan”, Milli Eğitim Bakanlığı, Ortaöğretim Projesi, 19-20 s., Ankara (2010).
- [2] Patlak, M., “Targeting Leukemia: From Bench to Bedside”, Breakthroughs in Bioscience, 3-4 s., FASEB, (2001).
- [3] Lanzkowsky, P., “Manual of Pediatric Hematology and Oncology, 4th ed.”, Elsevier Academic Press, 843 s., Burlington (2005).
- [4] Cimino, G., Rapanotti, M. C., Sprovieri, T., Elia, L. “ALL1 gene alterations in acute leukemia: biological and clinical aspects” *Haematologica*, **83**: 350-357, (1998).
- [5] American Cancer Society, “Leukemia-Chronic Lymphocytic”, 41 s., www.documents.cancer.org/6893.00/68.93.00.pdf (26/08/2010).
- [6] Bristol-Myers Squibb, “Hematolojiye Giriş ve Hematolojik Bozukluklar”, 7-15, (2005).
- [7] Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., Weissman, I. L., “Stem cells, cancer, and cancer stem cells”, *Nature*, **414**: 105-111 (2001).
- [8] Hematoloji Uzmanlık Derneği, “Akut Lenfositik Lösemi”, The Leukemia and Lymphoma Society, 30 s., (2010).
- [9] Hematoloji Uzmanlık Derneği, “Lösemiye Anlamak”, The Leukemia and Lymphoma Society, 12 s., (2010).
- [10] Yakıcıer, C., “Lösemilerin Moleküler Genetiği”, Türk Hematoloji Derneği Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi Temel Moleküler Hematoloji Kursu, Mersin, 43-45 s., (2005).
- [11] Lane, S. W., Gilliland, D. G., “Leukemia stem cell”, *Seminars in Cancer Biology*, **20**: 71-76, (2010).
- [12] Haznedaroğlu, İ. C., “Kronik Miyeloid Lösemi”, Türk Hematoloji Derneği-Hematoloji Kursu, 34-35, (2009).
- [13] Mughal, T. I., Goldman, J. M., and Mughal, S. T., “Understanding Leukemias and Lymphomas and Myelomas”, Taylor and Francis Group, UK, 274 s., (2006).
- [14] Nowell, P. C., and Hungerford, D. A., “A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia”, *Science*, **142**: 1497, (1960).

- [15] Koretzky, G. A., “The legacy of the Philadelphia chromosome”, *The Journal of Clinical Investigation*, **8(117)**: 2030-2032, (2007).
- [16] Rowley, J. D., “A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining”, *Nature*, **243**: 290-3, (1973).
- [17] Sessions, J., PharmD, BcOP, “Chronic Myeloid Leukemia in 2007”, *Journal of Managed Care Pharmacy*, **8(13)**: 4-7, (2007).
- [18] Nowell, P. C., “Progress With Chronic myelogenous Leukemia: A Personal Perspective over Four Decades”, *Annual Reviews*, **53**: 1–13, (2002).
- [19] Chasseriau, J., Rivet, J., Bilan, F., Chomel, J.-C., Guilhot, F., Bourmeyster, N., Kitzis, A., “Characterization of the Different *BCR-ABL* Transcripts with a Single Multiplex RT-PCR”, *Journal of Molecular Diagnostics*, **6(4)**: 343-347, (2004).
- [20] Telegeev, G.D., Dubrovska, A.N., Nadgorna, V.A., Dybkov, M. V., Zavelevich, M.P., Maliuta, S.S., Gluzman, D.F., “Immunocytochemical Study of Bcr and Bcr-Abl Localization in K562 Cells”, *Experimental Oncology*, **32**: 81-83 , (2010).
- [21] Daily, L., “Understanding Chronic Myeloid Leukaemia”, *Leukemia Foundation*, 17-18 s., (2010).
- [22] Morris, E. L., MD, and Janice, P. D., MD, “Blastic Phase Of Chronic Myelogenous Leukemia”, *Clinical Advances in Hematology and Oncology*, **3(7)**: 547-552, (2005).
- [23] Huntly, B, J. P., and Gilliland, D. G., “Blasts from the past: New lessons in stem cell biology from chronic myelogenous leukemia”, *Cancer Cell*, **6(3)**; 199-201, (2004).
- [24] Ward, A. C., Touw, I.,and Yoshimura, A., “The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis”, *Blood*, **2000(95)**: 19-29, (2009).
- [25] Güneş, H., “Sitokinlerin Hücre Döngüsü Üzerinde Etkileri”, *Tr. J. of Biology, TÜBİTAK*, **23**: 283–292, (1999).
- [26] Akdis, M., MD, PhD, Burgler, S., PhD, Cramer, R., PhD, Eiwegger, T., MD, Fujita, H., MD, PhD, Gomez, E., PhD, Klunker, S., PhD, Meyer, N.,

- MD, O'Mahony, L., PhD, Palomares, O., PhD, Rhyner, C., Quaked, N., PhD, Schaffartzik, A., PhD, Van De Veen, W., MSc, Zeller, S., PhD, Zimmermann, M., PhD, and Akdis, C. A., MD, "Interleukins, from 1 to 37, and interferon- γ : Receptors, functions, and roles in diseases", *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **127(3)**: 701-721, (2011).
- [27] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P., "Molecular Biology of the Cell, 5th ed.", Garland science, Taylor and Francis Group, UK, 1725 s., (2008).
- [28] Krauss, G., "Biochemistry of Signal Transduction and Regulation, 3th ed.", Germany, 541 s., (2003).
- [29] Yılmaz, Ö., Turgay, N., "Sitokin İlişkili Hücre İçi Sinyal İletimi ve Paraziter Enfeksiyonlardaki Önemi", *Türkiye Parazitoloji Derneği, Türkiye Parazitoloji Dergisi*, **33 (4)**: 301 - 306, (2009).
- [30] Bromberg, J., "Stat proteins and oncogenesis", *The Journal of Clinic Investigation*, **109**: 1139–1142 (2002).
- [31] Sexl, V., Piekorz, R., Morigg, R., Rohrer, J., Brown, M. P., Bunting, K. D., Rothhammer, K., Roussel, M. F., and Ihle J. N., "Stat5a/b contribute to interleukin 7-induced B-cell precursor expansion, but abl-and bcr/abl-induced transformation are independent of Stat5", *Blood*, **96(6)**: 2940-2954, (2000).
- [32] Benekli, M., Baer, M. R., Baumann, H., and Wetzler, M., "Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias", *Blood*, **101(8)**: 2940-2954, (2003).
- [33] Chen, X. P., Losman, J. A., and Rothman P., "SOCS Proteins, Regulators of Intracellular Signaling", *Immunity*, **13**: 287–290, (2000).
- [34] Hanada, T., Yoshimura A., "Regulation of cytokine signaling and inflammation", *Cytokine and Growth Factor Reviews*, **13**: 413–421, (2002).
- [35] Alexander, W. S., "Suppressors of Cytokine Signalling (SOCS) In The Immune System", *Nature Reviews, Immunology*, **2**: 1-7, (2002).
- [36] Krebs, D. L., and Hilton, D. J., "SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling", *Journal of Cell Science* **113**: 2813-2819 (2000).

- [37] Oral, H. B., “Sitokin Sinyal Süpresörleri ve Hastalıklarla İlişkisi”, Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences, **3(43)**: 26-32, (2007).
- [38] Yoshimura, A., Naka, T., and Kubo, M. “SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation”, Nature Reviews , Immunology, **7**: 1-14, (2007).
- [39] Tan, J. C., Rabkin, R., “Suppressors of cytokine signaling in health and disease”, Pediatric Nephrology, **20**: 567–575, (2005).
- [40] Krebs, D. L., Hilton, D. J., “SOCS Proteins: Negative Regulators of Cytokine Signaling”, Stem Cells, **19**: 378-387, (2001).
- [41] Marine, J.-C., Topham, D. J., McKay, C., Wang, D., Parganas, E., Stravopodis, D., Yoshimura, A., and Ihle, J. N., “SOCS1 Deficiency Causes a Lymphocyte-Dependent Perinatal Lethality”, Cell, **98**: 609–616, (1999).
- [42] Frantsve, J., Schwaller, J., Sternberg, D. W., Kutok, J., and Gilliland, D. G., “SOCS-1 Inhibits TEL-JAK2-Mediated Transformation of Hematopoietic Cells through Inhibition of JAK2 Kinase Activity and Induction of Proteasome-Mediated Degradation”, Molecular and Cellular Biology”, **21(10)**: 3547-3557, (2001).
- [43] Kamizono, S., Hanada, T., Yasukawa, H., Minoguchi, S., Kato, R., Minoguchi, M., Hattori, K., Hatakeyama, S., Yada, M., Moritai, S., Kitamura, T., Kato, H., Nakayama, K., and Yoshimura, A., “The SOCS Box of SOCS-1 Accelerates Ubiquitin-dependent Proteolysis of TEL-JAK2”, The Journal Of Biological Chemistry, **276(16)**: 12530-12538, (2001).
- [44] Lozzio CB and Lozzio BB, “Chromosome Human Chronic Myelogenous Leukemia Cell-Line With Positive Philadelphia”, Blood, **45**: 321-334, (1975).
- [45] Osti, F., Corradini, F. G., Hanau, S., Matteuzzi, M., Gambari, R., “Human Leukemia K562 Cells: Induction To Erythroid Differentiation By Guanine, Guanosine and Guanine Nucleotides”, Haematologica, **82**: 395-401, (1997).
- [46] Robinson-Rechavi , M., Garcia, H. E., and Laudet, V., “The nuclear receptor Superfamily”, Journal of Cell Science, **116**: 585-586, (2003).

- [47] Biggins, J. B., and Koh, J. T., “Chemical biology of steroid and nuclear hormone receptors”, *Chemical Biology*, **11**: 99–110, (2007).
- [48] Beato, M., Klug, J., “Steroid Hormone Receptors: an update”, *European Society of Human Reproduction and Embryology*, **6(3)**: 225-236, (2000).
- [49] Mangelsdorf, D J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., and Evan, R. M., “The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade”, *Cell*, **83**: 835-839, (1995).
- [50] White, R., and Parker, M. G., “Molecular mechanisms of steroid hormone action”, *Endocrine-Related Cancer*, **5**: 1-14, (1998).
- [51] Ergün, H., “Hormon Ve Hormon Benzeri Anabolik Ajanlar”, *Ankara Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, **35 (2-3)**: 353-363, (1988).
- [52] Norman, A. W., Mizwicki, M. T., and Norman, D. P. G., “Steroid-Hormone Rapid Actions, Membrane Receptors and A Conformational Ensemble Model”, *Nature Reviews , Drug Discovery*, **3**: 27-41, (2004).
- [53] Özçimen, A. A., Çetin, M., “Methylprednisolone Induce Terminal Differentiation in the U-937 Human Myelomonocytic Leukemia Cells”, *Turk J Immunol.*, **13(1)**: 10-14, (2008).
- [54] Lotem, J., and Sachs, L., “Induction of Specific Changes In The Surface Membrane of Myeloid Leukemic Cells By Steroid Hormones”, *International Journal of Cancer*, **15(5)**: 731-740, (1975).
- [55] Ham, J., Parker, M. G., “Regulation of gene expression by nuclear hormone receptors”, *Cell Biology* , **1**: 503-511, (1989).
- [56] Saydam, G., “Hematolojik Malignitelerde Sinyal İleti Sistemleri”, *Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi Temel Moleküler Hematoloji Kursu, İstanbul*, 49-60, (2005).
- [57] Dusso, A. S., Brown, A. J., and Slatopolsky, E., “Vitamin D”, *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, **289**: 8-28, (2005).
- [58] White, S. L., Belov, L., Barber, N., Hodgkin, P. D., Christopherson, R. I., “Immunophenotypic changes induced on human HL60 leukaemia cells by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 and 12-*O* tetradecanoyl phorbol-13-acetate”, *Leukemia Research* **29**: 1141–1151, (2005).

- [59] Kasukabe, T., Honma, Y., Hozumi, M., Suda, T., and Nishii, Y., “Control of Proliferating Potential of Myeloid Leukemia Cells during Long-Term Treatment with Vitamin D3 Analogues and Other Differentiation Inducers in Combination with Antileukemic Drugs: In Vitro and in Vivo Studies”, *Cancer Research*, **47**: 567-572, (1987).
- [60] Bustin, S. A., “Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays”, *Journal of Molecular Endocrinology*, **25**: 169–193, (2000).
- [61] Aydın-Saitoğlu, M., “Hematoloji’de Real Time PCR”, *Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi Temel Moleküler Hematoloji Kursu, İstanbul*, 20-22, (2005).
- [62] Pfaffl, M. W., “A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR”, *Nucleic Acids Research*, **29(9)**: 2002-2007, (2001).
- [63] Baccarani, M., Russo, D., Rosti, G., and Martinelli, G., “Interferon-Alfa for Chronic Myeloid Leukemia”, *Seminars in Hematology, USA*, **40**: 22-33, (2003).
- [64] Deininger, M., Buchdunger, E., and Druker, B. J., “The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia”, *Blood*, **105**: 2640-2653, (2005).
- [65] Puccetti, E., Güller, S., Orleth, A., et al., “*BCR-ABL* Mediates Arsenic Trioxide-induced Apoptosis Independently of Its Aberrant Kinase Activity”, *Cancer Research*, **60**: 3409-3413, (2000).
- [66] Kizildag, S., Ates, H., Kizildag, S., “Treatment of K562 cells with 1,25-dihydroxyvitamin D3 induces distinct alterations in the expression of apoptosis-related genes BCL2, BAX, BCLXL, and p21”, *Annals of Hematology*, **89**: 1–7, (2010).
- [67] Bolaman, Z., Köseoğlu, M., Ayyıldız, O., Kadıköylü, G., Sönmez, H. M., Demir, S., and Müftüoğlu, E., “Treatment of blastic phase chronic myeloid leukemia with mitoxantrone, cytosine arabinoside and high dose methylprednisolone”, *Haematologia*, **32(1)**: 49-57, (2002).
- [68] Uzunoglu, S., Uslu, R., Tobu, T., Saydam, G., Terzioglu, E., Buyukkececi, F., Omay, S. B., “Augmentation of methylprednisolone-induced

- differentiation of myeloid leukemia cells by serine:threonine protein phosphatase inhibitors”, *Leukemia Research*, **23**: 507–512, (1999).
- [69] Roman-Gomez, J., Jimenez-Velasco, A., Castillejo, J. A., Cervantes, F., Barrios, M., Colomer, D., Heiniger, A., Torres, A., “The suppressor of cytokine signaling-1 is constitutively expressed in chronic myeloid leukemia and correlates with poor cytogenetic response to interferon-a”, *haematologica*, **89(1)**: 42-48, (2004).
- [70] Yanagisawa, K., Yamauchi, H., Kaneko, M., Kohno, H., Hasegawa, H., and Fujita, S., “Suppression of Cell Proliferation and the Expression of a *bcr-abl* Fusion Gene and Apoptotic Cell Death in a New Human Chronic Myelogenous Leukemia Cell Line, KT-1, by Interferon-a”, *Blood*, **91(2)**: 641-648, (1998).
- [71] Sakai, I., Takeuchi, K., Yamauchi, H., Narumi, H., and Fujita, S., “Constitutive expression of SOCS3 confers resistance to IFN- α in chronic myelogenous leukemia cells”, *Blood*, **100(8)**: 2926-2931, (2002).
- [72] Pavan Kumar Reddy, N.G., “ Role of SOCS proteins in FLT3-ITD and BCR/ABLmediated leukemogenesis”, *Frankfurt am Main*, 107 s., (2010).
- [73] Omay, S. B., Saydam, G., Aydın, H. H., Selvi, N., Öktem, G., Sanlı, U.A., Tobu, M., Büyükkeçeci, F., “Potential Involvement of Calcineurin in Regulating the State of Differentiation and Apoptosis of HL-60 Cells During Methylprednisolone-Treatment”, *Turkish Journal of Haematology*, **20(3)**: 143-151, (2003).
- [74] Abe, E., Miyaura, C., Sakagami, H., Takeda, M., Konno, K., Yamazaki, T., Yoshiki, S., and Suda, T., “Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by $1\alpha,25$ dihydroxyvitamin D $_3$ ”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **78(8)**: 4990-4994, (1981).
- [75] Morales, O., Faulds, M. H., Lindgren, U. J., and Haldosen, L. A. “ $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D $_3$ Inhibits GH-induced Expression of SOCS-3 and CIS and Prolongs Growth Hormone Signaling via the Janus Kinase (JAK2)/Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT5) System in Osteoblast-like Cells”, *The Journal Of Biological Chemistry*, **277(38)**: 34879–34884, (2002).

- [76] Haffner, M. C., Jurgeit, A., Berlato, C., Geley, S., Parajuli, N., Yoshimura, A., and Doppler, W., “Interaction and Functional Interference of Glucocorticoid Receptor and SOCS1”, *The Journal Of Biological Chemistry*, **283(32)**: 22089–22096, (2008).
- [77] Hirano, T., Ishihara, K., and Hibi, M., “Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors”, *Oncogene*, **19**: 2548 - 2556, (2000).
- [78] Fukada, T., Ohtani, T., Yoshida, Y., Shirogane, T., Nishida, K., Nakajima, K., Hibi, M., and Hirano, T., “STAT3 orchestrates contradictory signals in cytokine-induced G1 to S cell-cycle transition”, *The EMBO Journal*, **17(22)**: 6670–6677, (1998).

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Burcu REYHANI

Doğum Tarihi: 04/03/1985

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lise		Atatürk Lisesi	1999-2002
Lisans	Biyoloji Bölümü	Mersin Üniversitesi	2003-2008
Yüksek Lisans	Biyoloji Bölümü/Moleküler Biyoloji ve Genetik	Mersin Üniversitesi	2008-2011