

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**VİTAMİN D₃ (1,25 (OH)₂ D₃) İLE İŞLENMİŞ HL-60
HÜCRELERİNDE GEN ANLATIMININ
ZAMANA KARŞI DEĞİŞİMİNİN ANALİZİ**

Aylin (ÖZÖN) KANLI

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Biyoloji Programı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
olarak hazırlanmıştır

**KOCAELİ
2007**

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**VİTAMİN D₃ (1,25 (OH)₂ D₃) İLE İŞLENMİŞ HL-60
HÜCRELERİNDE GEN ANLATIMININ
ZAMANA KARŞI DEĞİŞİMİNİN ANALİZİ**

Aylin (ÖZÖN) KANLI

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Tıbbi Biyoloji Programı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
olarak hazırlanmıştır

Danışmanlar:
Prof. Dr. M. Doğan GÜLKAÇ
Yrd. Doç Dr. Hakan SAVLI

KOÜ Bilimsel Araştırmalar Birimi
Tarafından desteklenmiştir.
Proje No: 2004/31

**KOCAELİ
2007**

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

İşbu çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ali SAZCI
Başkan

İMZA

Prof. Dr. M. Doğan GÜLKAÇ
Üye

İMZA

Prof. Dr. Hakkı DALÇIK
Üye

İMZA

Prof. Dr. Sema BOLKENT
Üye

İMZA

Yard. Doç. Dr. Hakan SAVLI
Üye

İMZA

ONAY

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

...../...../ 200..

Prof. Dr. Ümit BİÇER
Enstitü Müdürü

ÖZET

Vitamin D₃ (1,25 (OH)₂ D₃) İle İşlenmiş HL-60 hücrelerindeki gen anlatımının zamana karşı değişiminin analizi

Akut myeloid lösemisinin, 1,25(OH)₂D₃'ün farklılaştırma etkisiyle tedavisi son yılların ön plana çıkan araştırma konularındandır. D vitamini tedavisiyle ilişkili gen anlatımındaki değişikliklerin tayini için en etkin yol, miyeloid hücrelerin farklılaşmasında rol oynayan mekanizmalar ve hedef genlerin anlaşılmasıdır.

Bu tezin amacı HL-60 hücrelerinde lösemi hücre farklılaşması ve apoptozunda 1,25(OH)₂D₃'ün rolünü araştırmaktır. Dört farklı zamanda (18, 36, 48, 72. saatler) vitamin D ile indüklenmiş ve indüklenmemiş HL-60 hücrelerinde TNFR1, Bcl-w, Bax, Bak, Kaspaz-6, Kaspaz-8, AIF, Survivin, Cdk1 (Cdc2), Cdk2, Cdk4, Siklin D1 ve Siklin E genlerinin gen anlatımları gerçek zamanlı kantitatif PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

Deneylemiz boyunca incelenen genlerde dramatik düşüş ve yükselişler gözlenmemiştir. Elde edilen değerler, incelenen genlerin, vitamin D bağımlı etkiye yüksek düzeyde duyarlı olmadığını düşündürmektedir. Gerçek zamanlı PZR analizlerinin sonucu, 72. saat sonunda TNFR1, Cdk-4, Siklin D1, Siklin E, Survivin genlerinin anlatımında azalma, Kaspaz-8 ve Bak genlerinin anlatımında artma olduğu gözlenmiştir. Hücre siklusu ile ilişkili genlerin anlatımında 18. saatten 72. saate doğru azalma eğiliminin olması, hücrelerin proliferasyon sürecinden çıkıp farklılaşma sürecine girdiğini düşündürmektedir. Antiapoptotik genler Bcl-w ve Survivin gen anlatımlarının genelde azalan bir çizgi izlemesi ve pro-apoptotik bir gen olan Bak ve Kaspaz-8'in anlatımlarında artış eğilimi apoptotik sürecin 72. saat civarında başladığını düşündürmektedir. AIF gen anlatımında 72. saate doğru azalmanın olması da, bu genin HL-60 hücrelerinde apoptotik süreçte yer almadığının bir göstergesi olabilir.

Sonuç olarak, bu genlerin yanı sıra hücre döngüsü ve apoptozis ile ilişkili diğer genlerin çeşitli zamanlarda incelenmesi ve *in vitro* çalışmalara ilaveten hasta örneklerinde de çalışmaların yapılması, lösemisinin tedavisinde yeni yaklaşımların geliştirilmesi için aydınlatıcı olacaktır.

Anahtar kelimeler: HL-60, 1,25 (OH)₂ D₃, Hücre Döngüsü, Farklılaşma, Apoptozis, Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR

ABSTRACT

Analysis of The Changes of Time Dependent Gene Expression in HL-60 Cells Treated with vitamin D₃ (1,25 (OH)₂ D₃)

The treatment of acute myeloid leukemia (AML) with differentiation effect of 1,25(OH)₂D₃ has been one of the popular research topics recently. The most effective way to determine changes of gene expression related to vitamin D treatment is to determine mechanisms and target genes which play a role in differentiation of myeloid cells.

The aim of this thesis was to investigate the role of 1,25 (OH)₂D₃ in leukemia cell differentiation and apoptosis in HL-60 cells. At different time periods (18, 36, 48, 72. hours), TNFR1, Bcl-w, Bax, Bak, Caspase-6, Caspase-8, AIF, Survivin, Cdk1 (Cdc2), Cdk2, Cdk4, Cyclin D1 and Cyclin E genes expression were analyzed in HL-60 cells which were treated and un-treated vitamin D using a real time quantitative polymerase chain reaction (RQ-PCR) method.

We observed that expression of the genes which was investigated during our experiments were not dramatically decreased and increased. What we have seen was that the investigated genes were not markedly effected by the supplementation of vitamin D. RT-PCR analysis revealed that 72 hour time period was a critical time for the investigated genes. The expression of TNFR1, Cdk4, Cyclin D1, Cyclin E and Survivin genes was reduced whereas the expression of Caspase-8 and Bak genes were increased at the end of 72 hour period. Time dependent reduction of cell cycle related gene expression from 18 hrs to 72 hrs implied that the cells go through proliferation process and pass into the differentiation process. The decrease in antiapoptotic Bcl-w and Survivin genes expression and the increase in Bak (pro-apoptotic) and Caspase-8 genes expression illustrate that apoptosis process was initiated around 72 hours. Moreover, reduction of AIF gene expression towards to 72. hours could indicate that this gene did not participate in the apoptosis of HL 60 cells.

In conclusion, investigation of other cell cycle and apoptosis related genes in different times should be carried out. Furthermore, aside from *in vitro* studies, *in vivo* studies should be carried out. These studies may shed light on the development of new approaches for the treatment of leukemia.

Key words: HL-60, 1,25 (OH)₂ D₃, Cell Cycle, Differentiation, Apoptosis, Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (RQ-PCR)

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam* boyunca çok değerli bilgileri, ilgileri ve destekleri ile her zaman yanımda olan değerli hocalarım Prof. Dr. M. Doğan GÜLKAÇ ve Yrd. Doç. Dr. Hakan SAVLI' ya,

Katkı ve yardımlarından dolayı tez çalışmamın bir kısmını gerçekleştirdiğim İstanbul Üniversitesi DETAE öğretim üyelerinden Prof. Dr. Uđur ÖZBEK ve Dr. Duran USTEK' e,

Tez çalışmamın bir kısmında gösterdiği ilgi ve yardımlarından dolayı Kocaeli Üniversitesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Haluk VAHABOđLU' na,

Tez çalışmam boyunca gösterdikleri sevgi ve hoşgörüden dolayı eşim Levent KANLI, yaşama sevincim kızım Nehir KANLI'ya ve de bugünlere gelebilmem için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan sevgili aileme teşekkür ederim.

* Bu çalışma KOÜ Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir.
(Proje No: 2004/31)

İÇİNDEKİLER

ÖZET	IV
ABSTRACT	V
TEŞEKKÜR	VI
İÇİNDEKİLER	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
ÇİZELGELER DİZİNİ	XI
1. GENEL BİLGİ VE İLGİLİ ÇALIŞMALAR	1
1.1. Hücre Döngüsü	1
1.1.1. Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları	1
1.1.2. Hücre Döngüsünün Düzenlenmesi	3
1.1.2.1. Siklinler ve Siklin Bağımlı Kinazlar	4
1.1.2.2. Büyüme Faktörleri ve D-tip Siklinler	4
1.1.2.3. Hücre Döngüsü İnhibitörleri	5
1.1.2.4. MPF ve Hücre Döngüsünün İlerlemesi	6
1.1.3. Hücre Döngüsüyle İlişkili Bazı Genler	6
1.2. Apoptozis	9
1.2.1. Apoptozis ve Nekrozis	9
1.2.2. Apoptoziste Rol Oynayan Majör Oyuncular	11
1.2.2.1. Ölüm Faktörleri ve Ölüm Reseptörleri	11
1.2.2.2. Bcl-2 Ailesi	12
1.2.2.3. Kaspazlar	14
1.2.2.3.1. Kaspaz İnhibitörleri	15
1.2.2.4. Sitokrom-c	16
1.2.3. Apoptozis Mekanizmaları	16
1.2.3.1. Kaspazlara-Bağımlı Gelişen Apoptozis Mekanizması	17
1.2.3.1.1. Ölüm Reseptörü Aracılı (Extrinsic) Apoptotik Yol	17
1.2.3.1.2. Mitokondriyal (Intrinsic) Apoptotik Yol	17
1.2.3.2. Kaspazlara Bağımlı Olmadan Gelişen Apoptozis Mekanizması	18
1.2.4. Apoptozis İlişkili Bazı Genler	19
1.3. Hematopoez ve Hücre Farklılaşması	22

1.3.1. Lösemi ve HL-60 Hücre Hattı	25
1.3.2. D vitamini ve Akut Myeloid Lösemi Hücresinin Farklılaşması	26
1.4. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu	27
2. AMAÇ VE KAPSAM	31
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	33
3.1. Gereçler	33
3.1.1. HL-60 Hücre Hattı	33
3.1.2. Vitamin D Analogu	33
3.1.3. Kullanılan Kitler	33
3.1.4. Primerler	33
3.1.5. Kullanılan Kimyasallar	35
3.1.6. Kullanılan Tamponlar ve Solüsyonlar	35
3.1.7. Kullanılan Araçlar	36
3.2. Yöntemler	37
3.2.1. HL-60 Hücrelerinin Çoğaltılması ve D vitamini ile İndüklenerek Hücre Kültürü	37
3.2.2. HL-60 Hücrelerinden Total RNA Elde Edilmesi	37
3.2.3. RNA Konsantrasyonu ve Saflığının Ölçülmesi	38
3.2.4. cDNA Elde Edilmesi	39
3.2.5. Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR Deneyi (Real-time Kantitatif RT- PCR)..	39
3.2.5.1. Deneyin Yapılışı	39
3.2.5.2. Sonuçların Okunması	40
3.2.6. Sonuçların REST ile Değerlendirilmesi	41
4. BULGULAR	42
4.1. RNA Konsantrasyonu ve Saflığı	42
4.2. Gerçek zamanlı PZR deneyi	42
4.3. Real-Time Kantitatif RT-PCR Sonuçları (18, 36, 48, 72. saatler)	43
5. TARTIŞMA	47
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	54
KAYNAKLAR	56
ÖZGEÇMİŞ	68

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AIF	: Apoptosis inducing factor (Apoptozisi indükleyen faktör)
AML	: Acute Myeloid Leukemia (Akut Myeloid Lösemi)
Apaf-1	: Apoptotic protease activating factor 1 (Apoptotik proteaz aktive edici faktör)
Bak	: Bcl-2 antagonist killer (Bcl-2 antagonist öldürücü)
Bax	: Bcl-2 associated X (Bcl-2 ilişkili X)
Bcl-2	: B-cell CLL/Lymphoma 2 (B-hücre Kronik Lenfositik Lösemi/Lenfoma 2)
CAD	: Caspase-activated deoxyribonuclease (kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz)
Cdk	: Cyclin dependent kinase (Siklin bağımlı kinaz)
CKI	: Cyclin-dependent kinase inhibitor (Siklin bağımlı kinaz inhibitörü)
FADD	: Fas Associated Death Domain (Fas ile ilişkili ölüm bölgesi)
IAP	: Inhibitors of apoptosis (Apoptozis inhibitörü)
ICAD	: Caspase-activated deoxyribonuclease inhibitor (kaspazla aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörü)
IMDM	: İscove Modification Dulbeccos Medium
MPF	: Maturation Promoting Factor (Olgunlaşmayı teşvik eden faktör)
PCNA	: Proliferating Cell Nuclear Antigen (Çoğalan hücre nüklear antijeni)
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RQ-PCR	: Real Time Quantitative-Polymerase Chain Reaction (Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
REST	: Relative Expression Software Tool (Göreceli Gen Anlatımı Yazılımı)
TNF	: Tumor Necrosis Factor (Tümör Nekrozis Faktör)
TNFR1	: Tumor Necrosis Factor Receptor 1 (Tümör Nekrozis Faktör Reseptör 1)
TRADD	: TNFR1 Associated Death Domain (TNFR1 ilişkili ölüm bölgesi)
VDR	: Vitamin D Receptor (Vitamin D Reseptörü)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1: Hücre döngüsünün kontrol noktaları	3
Şekil 1.2: Apoptozis ve nekrozis	10
Şekil 1.3: Ölüm faktörleri ve reseptörleri	12
Şekil 1.4: Ölüm reseptörü aracılı (extrinsic) apoptotik yol	17
Şekil 1.5: Mitokondriyal (intrinsic) apoptotik yol	18
Şekil 1.6: Hematopoetik hücre farklılaşması	23
Şekil 1.7: 1,25 (OH) ₂ D ₃ 'ün yapısı	26
Şekil 3.1: Dış standartların (beta-globin) azalan 10 kat seyreltikleri ile elde edilen bağıl ışınma değerleri ve standart eğri	41
Şekil 4.1: Vitamin ile indüklenmiş ve indüklenmemiş HL-60 hücrelerinden elde edilen RNA'ların %1 agaroz jel elektroforez görüntüsü	42
Şekil 4.2: Çalışılan gen ürünlerinin ayrışma ısıları	42
Şekil 4.3.: 18, 36, 48 ve 72 saatlerde apoptotik genlerin anlatım seviyeleri	44
Şekil 4.4: 18, 36, 48 ve 72 saatlerde hücre döngüsü ilişkili genlerin anlatım seviyeleri	45
Şekil 4.5: 18, 36, 48 ve 72 saatlerde tüm genlerin anlatım seviyeleri	46

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1: Bcl-2 ailesi üyeleri	13
Çizelge 1.2: Kaspaz ailesi üyeleri	14
Çizelge 3.1: Primer dizileri	34
Çizelge.4.1: Real-Time kantitatif RT-PCR sonuçları (18, 36, 48, 72. saatler) ...	43

1. GENEL BİLGİ VE İLGİLİ ÇALIŞMALAR

Her hücre, doğar, çoğalır (proliferasyon), farklılaşır (diferansiyasyon) ve ölür (apoptozis). Bütün bu olaylar doğal bir denge halinde sürer gider. Doku homeostazisi (dengeleşim), yani yeniden yapım ve yıkımın bir düzen içinde oluşu, apoptozis ve proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır (Thompson,1995; Nagata and Golstein, 1995).

Bazı hücre döngüsü regülatörleri (c-myc, p53, pRb, Ras, PKA, Bcl-2, NF-κB, CDK, siklinler ve CKI'lar) hem hücre bölünmesini hem de programlı hücre ölümünü etkileyebilir (Vermeulen et al. 2003). Pozitif ve negatif sinyaller arasındaki denge, yaşam ve ölüm arasındaki kararı belirler. Bir dengesizlik istenmeyen apoptozis veya istenmeyen hücre büyümesi ile ilişkili hastalıklara neden olabilir. Örneğin; artmış proliferasyon ve azalmış apoptozisin karsinogenezisde rol oynadığı düşünülmektedir (Thompson, 1995).

1.1. HÜCRE DÖNGÜSÜ

Tek hücreli ve çok hücreli organizmaların büyüme, gelişme ve çoğalmaları hücre bölünmesiyle sağlanır. Ökaryotik hücrelerde hücre döngüsü G₁ (ilk aralık), S (sentez), G₂ (ikinci aralık) ve M (mitoz) olmak üzere dört evreden meydana gelir ve G₁, S, G₂ evrelerinin hepsine birden interfaz adı verilir. Mitoza hazırlık evresi olan İnterfazın G₁ evresinde; hücre için gerekli RNA ve proteinler sentezlenir, DNA için sentez hazırlığı yapılır. S evresinde; RNA sentezi devam ederken protein sentezi en yüksek düzeye ulaşır. DNA sentezi yapılarak DNA miktarı iki katına çıkar. G₂ evresinde; DNA sentezi tamamlanmıştır fakat RNA ve protein sentezi G₁ evresindeki kadar olmamakla birlikte devam eder (Cooper, 1997; Jahn and Bar, 2000; Alberts et al, 2002).

1.1.1. Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları

Hücre döngüsünün bu farklı evreleri arasındaki koordinasyon, kontrol noktası sistemi tarafından sağlanır. Bu kontrol noktalarının görevi, tamamlanmamış veya

hasarlı kromozomların replikasyonunu engellemek ve bunların yavru hücrelere geçişini önlemektir. Hücre döngüsü boyunca belirlenmiş birkaç kontrol noktası vardır. (Cooper, 1997; Jahn and Bar, 2000; Alberts et al. 2002).

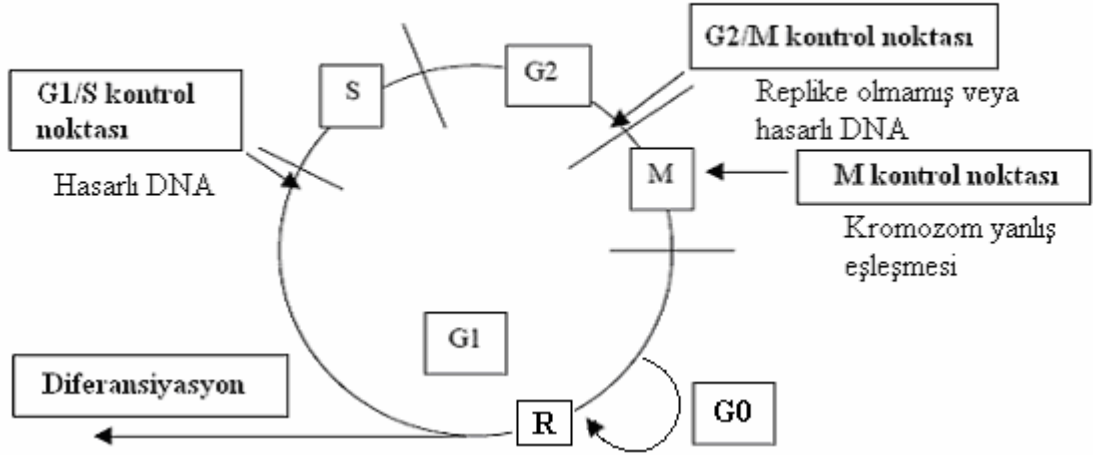
Restriksiyon Noktası: Birçok hücrede ortaya çıkan önemli bir kontrol noktası G_1 evresinde görülür ve G_1 evresinden S evresine geçişi kontrol eder. Bu nokta ilk olarak *Saccharomyces cerevisiae*'de belirlenmiş ve START olarak adlandırılmıştır. Bütün hücreler normalde bu noktayı geçerek bölünmelerine devam ederler. Bu nokta hücre büyüklüğü ve besin gibi dış uyarılar tarafından kontrol edilir. Birçok hayvan hücresinin çoğalması da hücre döngüsünün G_1 evresinde düzenlenir. G_1 'deki bu karar noktası hayvanlarda Restriksiyon (R) noktası olarak adlandırılır. Uygun faktörlerinin varlığında hücreler R noktasını geçerek S evresine girerler. Uygun faktörler olmadığında olaylar R noktasında durur ve G_1 'de kalırlar. Hücre döngüsüne devam edemeyen bu hücreler G_0 evresindeki hücreler olarak adlandırılır. G_0 hücreleri büyümelerini durdurmuş olsalar da metabolik aktiviteye sahiptirler ve çok az protein sentezi yaparlar. G_0 evresindeki olan hücreler uygun faktörlerin varlığında tekrar çoğalabilir hale gelirler (Cooper, 1997; Jahn and Bar, 2000; Alberts et al. 2002).

G_1 Kontrol Noktası: Bu kontrol noktası, DNA'da bir hasar varsa, döngünün G_1 'de durmasını sağlar. Memeli hücrelerinde bu noktada durmayı p53 proteinin faaliyeti etkili olur. DNA hasarı olduğu zaman, bu hasar hızlıca p53 üretimini artırır. Bu artan p53 seviyesi de hücrenin G_1 evresinde kalarak S evresine geçmesini önleyen sinyalleri oluşturur. (Cooper, 1997; Jahn and Bar, 2000; Alberts et al. 2002).

G_2 Kontrol Noktası: DNA replikasyonunda bir hata olur ve ortamda replike olmamış DNA bulunursa, bu kontrol noktası döngünün G_2 'de durmasını sağlar. Böylelikle DNA replikasyonu tamamlanmadan hücrenin mitoz girmesi önlenir. DNA'da hasar varsa tamir edilene kadar mitoz engellenir ve böylece hasarlı DNA'nın yavru hücrelere geçmesi önlenir. (Cooper, 1997; Jahn and Bar, 2000; Alberts et al. 2002).

M Kontrol Noktası: M kontrol noktası, mitoz esnasında yavru kromozomlar mitotik içcik üzerinde uygun şekilde dizilmezlerse, döngüyü M evresinde durdurur. Mitotik içcik üzerinde yer alan kromozomlardan biri veya birkaçı eksilirse, bu kontrol noktası mitozun metafaz evresinde kalmasını sağlar ve böylece

kromozomların eksik olarak yavru hücrelere geçmeleri önlenir (Cooper, 1997; Jahn and Bar, 2000; Alberts et al. 2002).



Şekil.1.1: Hücre döngüsünün kontrol noktaları (Cooper, 1997’den uyarlanmıştır).

1.1.2. Hücre Döngüsünün Düzenlenmesi

Ökaryotik hücrelerin hücre döngüsünün kontrolünde görev alan protein kinazlar, kontrol noktalarından geçişte önemli rol oynarlar. Bu kontrol noktalarında maturation promoting factor (MPF) olarak adlandırılan ve iki alt birimden oluşan bir kompleks görev almaktadır. Bu dimerik yapıyı oluşturan alt birimler siklin B ve Cdc2 (cycline dependent kinase 2, Cdk1) dir. Siklin B düzenleyici alt birimdir ve fonksiyon yapabilmek için bir protein kinaz olan Cdc2’nin katalitik aktivitesine gereksinme duyar. MPF aktivitesi, hücre döngüsü olayları boyunca siklin B’nin periyodik olarak dağılıp toplanmasıyla kontrol edilir. Bütün bu olaylar Cdc2’nin fosforilasyon ve defosforilasyonu ile gerçekleşir (Cooper, 1997; Jahn and Bar, 2000; Alberts et al. 2002). MPF’yi oluşturan siklin ve cdk’ların çalışma prensiplerini çeşitli organizmalarda çalışarak ortaya çıkaran üç bilim adamı Timoty Hunt, Paul Nurse ve Leland Hartwell, bu çalışmalarından ötürü 2001 yılında Nobel ödülünü kazanmışlardır (Gupta PK, 2001).

Memeli hücrelerinde siklin B sentezi hücre döngüsünün S evresinde başlar. Sentezlenen siklin B ile Cdc2 bir kompleks oluşturur. Bu kompleks hücre

döngüsünün S ve G₂ evresi boyunca görev yaparak, G₂ evresinden M evresine geçiş gerçekleşir (Cooper, 1997; Jahn and Bar, 2000; Alberts et al. 2002).

Cdc2 protein kinazın aktifleşmesi, hedef proteinlerin fosforlanmasını sağlar, böylece M evresi olayları başlar. Aynı zamanda Cdc2'nin aktivitesi siklin B'nin dağılmasını sağlar. Siklin B'nin bu proteolitik dağılımı Cdc2'yi inaktive eder ve böylece mitozun sonlanıp sitokinez tamamlanarak hücrenin interfaza dönmesi sağlanır (Cooper, 1997; Jahn and Bar, 2000; Alberts et al. 2002).

1.1.2.1. Siklinler ve Siklin-Bağımlı Kinazlar (Cyclin-dependent kinase)

Cdc2 ve siklin B birbirleriyle ilişkili geniş ailelerin üyeleridir. Bu ailelerin farklı üyeleri hücre döngüsünün farklı evreleri boyunca kontrolü sağlamaktadırlar. Yüksek ökaryotlarda hücre döngüsü hem farklı siklinler ile hem de Cdc2 ile akraba farklı protein kinazlar tarafından kontrol edilir. Yüksek ökaryotlarda bu kinazlar Cdk (cyclin-dependent kinase) olarak adlandırılır. Cdk üyeleri özel siklinler ile birleşerek hücre döngüsünün farklı evrelerinin düzenlenmesini sağlarlar (Cooper, 1997; Jahn and Bar, 2000; Alberts et al. 2002).

- G₁'den S evresine geçiş, Cdk2 ve Cdk4 (bazı hücrelerde Cdk6) ile birleşmiş Siklin E ve Siklin D ile sağlanır. Cdk2, Cdk4 ve Cdk6 ile birleşen D-tip siklinler (Siklin D1, D2, D3) G₁ evresindeki R noktasını geçişte çok önemli rol oynarlar. Siklin E, G₁'in sonlarına doğru devreye girer ve oluşan Cdk2/Siklin E kompleksi, S evresine geçişi sağlar ve DNA sentezini başlatır.

- DNA sentezinin başlamasında ve S evresinin tamamlanarak G₂ evresine geçişte Cdk2/Siklin A kompleksi görev yapar.

- G₂'den M evresine geçiş ise Cdk2 ile Siklin B kompleksi tarafından gerçekleştirilir. Ayrıca bu evrede Cdk1 ile Siklin A kompleksi de görev yapabilir (Cooper, 1997; Jahn and Bar, 2000; Alberts et al. 2002).

1.1.2.2. Büyüme Faktörleri ve D-tip Siklinler

Hayvan hücrelerinin çoğalması, genellikle G₁ evresindeki R noktasında ekstraselüler büyüme faktörleri tarafından düzenlenir. Büyüme faktörlerinin

yokluğunda hücreler R (restriksiyon) noktasını geçemez ve dinlenme haline (G_0) geçerler. G_0 'daki bu hücreler eğer büyüme faktörleri uyarısı alırlarsa, yeniden bölünmeye başlarlar. Büyüme faktörleri tarafından hücre döngüsünün bu tür kontrolü, büyüme faktörleri reseptörlerinin uyarılmasıyla hücre içi uyarı yolları kullanılarak gerçekleştirilir (Cooper, 1997; Alberts et al. 2002).

Büyüme faktörleri uyarısına bağlı olarak siklin D sentezi artmakta ve büyüme faktörleri ortamda olduğu sürece siklin D sentezi de devam etmektedir. Büyüme faktörleri ortamdaki uzaklaştırılırsa D-tip siklinler yıkılmakta ve hücre içi konsantrasyonu hızlıca düşmektedir. Normal durumda G_1 süresince hücrede büyüme faktörleri mevcuttur ve Cdk/Siklin D kompleksi hücre döngüsünün R noktasını geçmesini sağlar. Eğer büyüme faktörleri, hücre döngüsü R noktasına gelmeden önce ortamdaki uzaklaştırılacak olursa, hücre G_1 'den S evresine geçemez ve dinlenme durumuna (G_0) girer. Siklin D, büyüme faktörleri uyarısının hedefi olduğundan siklin D düzenlenmesindeki bir bozukluk, kanser hücrelerinin bir karakteristiği olan büyüme faktör düzenlenmesinin bozulmasına neden olur. Hücre döngüsündeki bu bozukluk sonucu bazı insan kanserlerinin arttığı bulunmuştur (Cooper, 1997; Alberts et al. 2002).

1.1.2.3. Hücre Döngüsü İnhibitörleri

Hücre çoğalmasının kontrolü büyüme faktörlerinin yanında, hücre döngüsünü inhibe edici faaliyet gösteren uyarılar tarafından da yapılır. Örneğin; eğer bir DNA hasarı oluşursa, bu hasar tamir edilmedikçe hücre döngüsü kesilir. Yine, bir takım hücre dışı faktörler, hedef hücrelerin çoğalmasını uyarmaktansa inhibe eder. Bu tür inhibitör uyarıcıların etkisi özellikle Cdk inhibitörleri tarafından artırılır (Cooper, 1997; Jahn and Bar, 2000; Alberts et al. 2002).

Hücrede bir DNA hasarının oluşması, hücre içi p53 proteini seviyesinde artmaya neden olur. Bu p53 proteinleri de bir Cdk inhibitörü olan p21'i kodlayan genin transkripsiyonunu sağlar. p21 proteini bazı Cdk/Siklin komplekslerini inhibe ederek hücre döngüsünün durmasına neden olur. p21'ler, Cdk'larla ilişkiye girerek hücre döngüsünü durdurmanın yanında, doğrudan DNA replikasyonunu da inhibe eder. Gerçekten de p21, DNA polimeraz δ 'nın bir alt birimi olan PCNA (proliferating cell nuclear antigen)'ya bağlanarak DNA replikasyonunu

inhibe eder, böylece hasarlı DNA'nın döngüye devamını engeller (Cooper, 1997; Jahn and Bar, 2000; Alberts et al. 2002).

Bunlar dışında yine birçok uyarı, hücre döngüsü sistemiyle ilişki kurarak döngüyü durdurmaktadır. Bunlar arasında çoğunlukla diğer Cdk inhibitörlerini sayabiliriz. Örneğin; bazı memeli hücrelerinde, bir ikinci mesajcı olan cAMP, bir Cdk inhibitörü olan p27'yi uyararak hücre çoğalmasını G₁'de durdurur (Cooper, 1997; Jahn and Bar, 2000; Alberts et al. 2002).

1.1.2.4. MPF ve Hücre Döngüsünün İlerlemesi

Mitoz bölünme hücre bileşenlerinde birçok değişikliğin ve sonra yeniden düzenlenmelerin ortaya çıkmasına neden olur. Bu olayların büyük çoğunluğu bir protein kinaz olan MPF (Cdc2/Siklin B) aktivitesiyle gerçekleşir. MPF sadece mitoz evreleri arasındaki geçişleri değil, hücrede yer alan diğer bazı protein kinazları da fosforlayarak aktifleşmelerini ve dolayısıyla hücrede bazı olayların gerçekleşmesini sağlar (Cooper, 1997; Alberts et al. 2002).

İnterfazda kromatinin yoğunlaşarak kompleks bir kromozom oluşturması, kromatin yoğunlaşmasında H1 histonunun Cdc2 (Cdk1) protein kinaz tarafından fosforlanması ile olur. Mitozun profaz evresinde nuklear laminlerin Cdc2 tarafından fosforlanmasıyla çekirdek zarının dağılması da MPF'nin aktivitesinin olduğu diğer bir olaydır. Hücre bölünmesi sırasında çekirdek zarı gibi Golgi kompleksi ve endoplazmik retikulumun da küçük veziküller halinde ayrışarak yavru hücrelere dağılmasında MPF etkilidir ama mekanizma tam olarak bilinmemektedir. Profaz sırasında mikrotübüllerin davranışındaki değişikliklerle sentrozomlardan uzanan çok sayıda mikrotübülün ortaya çıkarak mitoz iğciğini oluşturması da MPF ya da MPF tarafından aktifleştirilen başka bir kinaz tarafından olduğu düşünülmektedir (Cooper, 1997; Alberts et al. 2002).

1.1.3. Hücre Döngüsüyle İlişkili Bazı Genler

Cdk1 (Cdc2) (Cyclin Dependent Kinase 1)

Cdk1 geni 10q21.1 kromozomal bölgede bulunur ve 34.000 moleküler ağırlıklı bir protein kinazı üretir. Cdk1 geni ürünü, MPF'nin katalitik altbirimidir. Mitoza girişi indükler ve tüm ökaryotlarda aynıdır. Hücre döngüsünde G₁ fazından S fazına ve G₂ fazından M fazına geçişi kontrolden sorumludur. Bu genin kodladığı protein, Ser/Thr protein kinaz ailesinin bir üyesidir. Mitotik siklinler bu protein ile bağlanır ve regülatör alt ünite olarak fonksiyon yapar. Bu proteinin kinaz aktivitesi siklin birikimiyle ve hücre döngüsü sırasında bozulmasıyla kontrol edilir. Bu proteinin fosforilasyonu ve defosforilasyonu da hücre döngüsü kontrolünde önemli regülatör roller oynayabilir (Cooper, 1997; Alberts et al. 2002; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=116940>).

Cdk2 (Cyclin Dependent Kinase 2)

Cdk2 geni 12q13 kromozomal bölgede bulunur ve 33.000 moleküler ağırlıklı bir protein kinaz üretir. İnsan endotel hücrelerinin apoptozisi, Cdk2'nin aktivitesinde artış ve upregülasyonla ilişkilidir. Bu genin kodladığı protein, Ser/Thr protein kinaz ailesinin bir üyesidir. Bu protein kinaz *S. cerevisiae* cdc28 ve *S.pombe* cdc2 gen ürünlerine çok büyük oranda benzer. Cdk2, siklin-bağımlı protein kinaz kompleksinin katalitik altbirimidir. Cdk2'nin aktivitesi G₁-S fazı için sınırlıdır ve hücre siklusu G₁-S fazı geçişi için önemlidir. Bu protein siklin A veya E içeren kompleksin regülatör altbirimine, CDK inhibitörü p21 Cip1 (CDKN1A) ve p27Kip1 (CDKN1B) ile bağlanır ve onlar tarafından düzenlenir. Cdk2'nin aktivitesi proteinin fosforilasyonu tarafından da regüle edilir (Cooper, 1997; Alberts et al. 2002; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=116953>)

Cdk4 (Cyclin Dependent Kinase 4)

Cdk4 geni 12q14 bölgesinde bulunur ve 303 aminoasitlik bir protein kodlar. Bu genin kodladığı protein, Ser/Thr protein kinaz ailesinin bir üyesidir. Bu protein

kinaz *S. cerevisiae* cdc28 ve *S.pombe* cdc2 gen ürünlerine çok büyük oranda benzer. Protein kinaz kompleksinin katalitik altbirimi, hücre döngüsü G₁ fazı progresyonunda önemlidir. Bu kinazın aktivitesi D-tip siklinler ve CDK inhibitörü p16 (INK4a) regülatör altbirimler tarafından kontrol edilen G₁-S fazı ile sınırlıdır. Bu kinaz retinoblastoma gen ürünü (Rb) fosforilasyonundan sorumlu olduğu da gösterilmiştir. Cdk4'ün ilişkili proteinleri D-tip siklinler, p16(INK4a) ve Rb'daki gibi bu gendeki mutasyonların çeşitli kanserlerin tümörigenezisi ile ilişkili olduğu bulunmuştur (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=123829>; (Cooper, 1997; Alberts et al. 2002).

Cdk'ların apoptozisdeki rolüne dair çelişkili sonuçlar mevcuttur. Bazı çalışmalar Cdk için bir pro-apoptotik aktivite bildirmiştir, (Gil-Gomez et al. 1998; Hakem et al. 1999). Cdk2 aktivite kaybının, timositleri apoptozisten, mitokondriyal değişikliklerden ve kaspaz aktivasyonundan koruduğu gösterilmiştir (Hakem et al. 1999). Bir grup çalışmada Cdk inhibisyonu ile haematopoietik hücrelerde apoptozisin indüksiyonu gösterilmiştir (Arguello et al. 1998; Byrd et al. 1998; Vermeulen et al, 2002a; 2002b). Bazı apoptozis uyaran ajanlar (staurosporine, kafein), hücre ölümü öncesinde Cdk1 ve Cdk2 aktivitesinin artmasına neden olabilir (Meikrantz et al. 1994).

Siklin D1 (B-Cell Leukemia 1, BCL1; Parathyroid Adenomatosis 1, PRAD1):

11q13 kromozomal bölgede bulunan Siklin D1 geni ürünü, hücre döngüsünün G₁-S geçişinde gerekli olan Cdk4 ve Cdk6 ile kompleks yaparak bunların regülatör altbirimi olarak işlev görür. Bu protein tümör supresör protein Rb ile etkileşime girerek, bu genin ekspresyonunu pozitif olarak düzenler. Bu genin mutasyonları, amplifikasyonu ve artmış gen anlatımı hücre döngüsü ilerlemesini değiştirerek, çeşitli tümörlerde sıklıkla görülmektedir ve tümörigenezise katılabilir (Cooper, 1997; Alberts et al. 2002; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=168461>).

Siklin E:

Siklin E geni 19q12-q13 kromozomal bölgede bulunur ve bu genin ürünü, hücre döğüsünün G₁-S geçişinde gerekli olan Cdk2'ye bağlanarak onun regülatör alt-birimi olarak görev yapar. S fazında da görevi vardır. Siklin E, G₁'in sonlarına doğru devreye girer ve oluşan Cdk2/Siklin E kompleksi, S evresine geçişi sağlar ve DNA sentezini başlatır. Bu genin artmış anlatımı kromozom instabilitesine neden olur ve pek çok tümörde gözlenmiştir. Bu nedenle tümörigenezise katkısı olabilir (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/disposim.cgi?id=123837>; Cooper, 1997; Alberts et al. 2002).

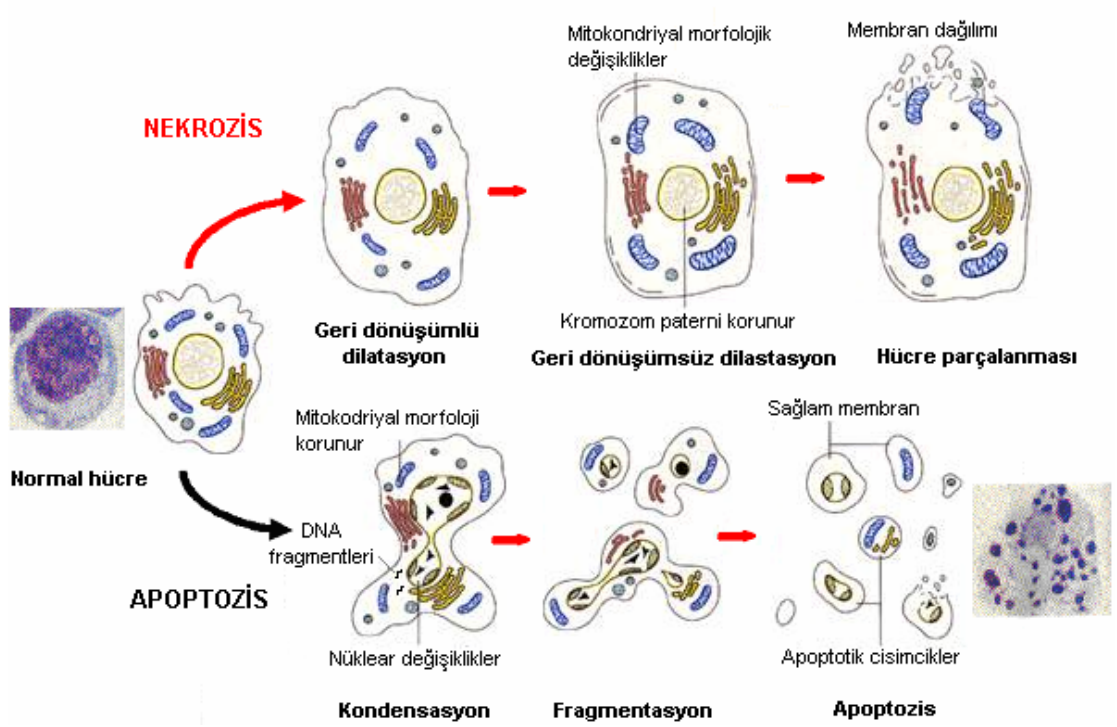
1.2. APOPTOZİS

Yunanca'da "ağaçların yapraklarını dökmesi" anlamına gelen apoptozis, ilk kez literatürde 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından "mitozun karşıt anlamı" olarak kullanılmıştır (Kerr et al, 1972). Apoptozis (programlanmış hücre ölümü), hücre intiharı olarak da bilinir ve fizyolojik bir olaydır. Programlanmış hücre ölümü, embriyolojik gelişim ve erişkin dokunun gelişiminin sürdürülmesinde anahtar rol oynar. Apoptozis, organizmada hasar görmüş veya organizma için tehlikeli olabilecek hücrelerin yok edilmesinde de görev alır. Malign hastalıklar, klasik olarak kontrolsüz aşırı hücre proliferasyonunun olduğu hastalıklar olarak bilinir. Oysa aşırı proliferasyonun yanında azalmış apoptotik hücre ölüm hızının da malignite gelişimine katkıda bulunduğu görülmüştür. Zamanı geldiğinde normal olarak apoptozise gidemeyen, beklenenden daha uzun süre yaşayan hücreler, genomlarında biriktirdikleri mutasyonların etkisi ile malign hücrelere dönüşme potansiyeli taşırlar. (Cooper, 1997; Alberts et al, 2002).

1.2.1. Apoptozis ve nekrozis

Apoptozis, klasik hücre ölüm şekli olan nekrozisden birçok özelliği açısından oldukça farklı bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Nekrozis, fizyolojik bir ölüm şekli olmamasına rağmen, apoptozis hem fizyolojik hem de patolojik şartlar altında

meydana gelebilir. Diğer bir ifadeyle, apoptozis hem sağlıkta hem de hastalıkta karşımıza çıkmaktadır. Apoptozis, morfolojik olarak özğündür. Nekrozisde hücre içine aşırı sıvı girmesi sonucu hücre şişerken (cell swelling), apoptotik hücre tam tersine küçülür (cell shrinkage). Nekrozisde kromatin patterni hemen hemen normal hücredeki görüntüye benzerdir ama apoptotik hücrenin kromatini nükleus membranının çevresinde toplanır (chromatin aggregation) ve kondanse olur (chromatin condensation). Nekrotik hücrenin plazma membranı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içinden dışına hücre içi materyallerinin çıkışı gerçekleşir. Oysa apoptotik hücre membranı bütünlüğünü korur ve üzerinde küçük cepçikler (membrane blebs) oluşur. Nekrotik hücre sonra lizise uğrar ama apoptotik hücre küçük cisimciklere (apoptotik bodies) parçalanır. Apoptotik cisimcikler membranla kaplıdır, değişen miktarlarda çekirdek veya diğer hücre içi yapılar içerirler. Nekrozisde plazma membranının bütünlüğünün bozularak hasarlanması nedeniyle hücre içeriğinin dış ortama saliverilmesi sonucu inflamasyon uyarılır. Oysa apoptozisde apoptotik hücre veya cisimcikler plazma membranları hasarlanmadan komşu hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edildiklerinden inflamasyon oluşmaz. Apoptozisin en önemli özğün yönü DNA'nın internukleozomal bölgelerden yaklaşık 180–200 baz çifti veya bunun katları boyutunda DNA parçaları oluşturacak şekilde parçalanmasıdır. Bu durum agaroz jel elektroforezinde merdiven görüntüsü imajının (ladder pattern) ortaya çıkmasına neden olur. Apoptotik hücrede görülen önemli değişikliklerden biri normalde plazma membranının iç yüzünde bulunan fosfatidilserin'in erken evrede membranın dış yüzüne doğru transloke olmasıdır (phosphatidylserine translocation). Bu mekanizma apoptotik hücrelerin komşu hücreler ve makrofajlar tarafından tanınmasını sağlar. (Thompson, 1995; Cooper, 1997; Jahn and Bar, 2000; Alberts et al, 2002).



Şekil 1.2: Apoptozis ve nekrozis (Cooper GM, 1997 ve http://anatomy.iupui.edu/courses/histo_D502/D502f03/f03_lectures/Cell.f03/Cell.html'den uyarlanmıştır).

1.2.2. Apoptozisdeki Major Oyuncular

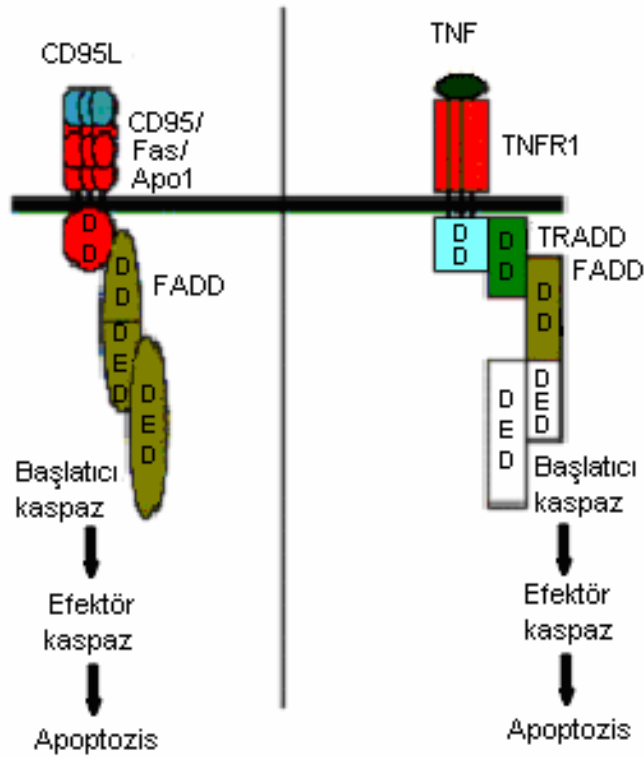
1.2.2.1. Ölüm Faktörleri ve Ölüm Reseptörleri (TNF Ailesi ve TNFR Ailesi)

Sitokinler, protein yapısında olup hedef hücrelerde özgül reseptörlere bağlanarak hücre çoğalması ve farklılaşmasını kontrol ederler. Önemli apoptotik faktörlerden Fas Ligand (FasL) ve TNF- α (Tümör Nekrozis Faktör-alfa), sitokinlerin bir grubu olan TNF ailesinin üyesidirler. (Nagata and Golstein, 1995; Holtz and Darmer, 2000).

FasL ve TNF- α , apoptozisi başlatmak üzere hedef hücrede özgül reseptörlere bağlanırlar. FasL'in reseptörü olan Fas, APO-1 veya CD-95 adıyla da bilinen bir tip-1 membran proteinidir. Fas, TNF reseptör ailesinin bir üyesidir ve bu ailenin diğer üyeleri arasında TNFR-1, TNFR-2 sayılabilir. TNF ligandı, reseptörleri TNFR-1 veya TNFR-2 ile bağlandığında apoptozisi aktive eder. TNFR-1, pek çok

dokuda bu sinyalin aktivasyonundan ve iletiminden sorumludur. TNF, TNFR-1 ile bağlandıktan sonra apoptotik sinyal iletimi gerçekleşir ve bu apoptotik yolun sonunda kromozomal DNA yıkımı ile hücre ölümü meydana gelmektedir. (Behnia et al. 2000).

TNFR-1 ve Fas'ın sitoplazmik parçasında bulunan yaklaşık 80 aminoasitlik homolog bölgeler, ölüm sinyalinin iletimini sağladıklarından ölüm bölgeleri olarak adlandırılmışlardır. Bu bölgeler, FADD (Fas ile ilişkili ölüm bölgesi) veya MORT1 ve TRADD (TNFR-1 ile ilişkili ölüm bölgesi) olarak adlandırılır. TRADD, TNFR-1 ve TNFR-2 reseptörlerinin, FADD ise Fas reseptörünün ölüm bölgesidir. Bu bölgeler aracılığıyla kaspaz-8'i aktive ederek kaspaz kaskadını başlatıp apoptozise neden olurlar. (Nagata and Golstein, 1995; Holtz and Darmer, 2000). (Şekil 1.3.)



Şekil 1.3: Ölüm faktörleri ve reseptörleri ([http://www.vhsd.org/docs/apoptosis-AT-o4B\(2\).ppt#21](http://www.vhsd.org/docs/apoptosis-AT-o4B(2).ppt#21)'den uyarlanmıştır).

1.2.2.2. Bcl-2 ailesi

Bcl-2 ailesi, üyelerinin bir kısmının apoptozisi indüklediği (proapoptotik: Bax, Bad, Bid, Bcl-xS, Bak, Bim), bir kısmının ise inhibe ettiği (Antiapoptotik: Bcl-2, Bcl-xL, Mcl1) geniş bir ailedir. Bu ailenin üyeleri kendi aralarında homo- veya hetero-dimerler oluştururlar. Hücrenin yaşayabilirlik durumu (survival) bu ailenin pro-apoptotik (apoptozisi indükleyici) ve anti-apoptotik (apoptozisi baskılayıcı) üyelerinin rölatif oranına bağlıdır. Bu heterodimerlerden biri olan Bcl-2/Bax'ın (ikisinin oranının) bazı hematolojik malignensilerde prognostik değer taşıdığı rapor edilmiştir. Çünkü oranın artması ya da azalması apoptozisin aktivasyonu veya inhibisyonu ile sonuçlanır. Bu da prognozu belirleyici bir değer taşıyabilir (Cooper, 1997; Alberts et al. 2002).

Proapoptotik Bcl-2 üyeleri mitokondriden sitokrom-c salınmasını indüklerken, antiapoptotik üyeleri sitokrom-c salınmasını baskılar. Bu iki zıt etkili grubun işleyişi, yapılarında bulunan iki bölgeye (hidrofobik cep ve amfipatik α -heliks) bağlıdır. Yapılarındaki BH1, BH2 ve BH3 bölgeleri hidrofobik cepi oluşturur. Amfipatik α -heliks, BH3 bölgesinde yer alır. Hidrofobik cep sayesinde bir diğer Bcl-2 ailesinin BH3 bölgesine bağlanırlar Pro-apoptotik üyeler kendi içlerinde iki alt gruba ayrılırlar. Bu alt gruplardan biri yapılarında her üç bölgeyi (BH1, BH2, BH3) de içeren üyelerden (Örn; Bax, Bak), diğeri ise sadece BH3 bölgesini içeren üyelerden (Bid, Bad, Bim) oluşur. Anti-apoptotik üyelerde ayrıca BH4 bölgesi bulunur. Bu bölgenin, apoptozisin diğer hücrel yollarla ilişki kurduğu düşünülmektedir. Anti-apoptotik üyeler, doğal olarak "intrinsic" sitokrom-c'nin salınmasını baskılama özelliğine sahiptir. Bu durumda, pro-apoptotik üyelerin anti-apoptotik üyelerle bağlanması halinde bu inhibitör etki ortadan kalkar ve sitokrom-c salınması gerçekleşir. Bu yüzden, pro ve anti-apoptotik üyelerin dengesi yaşam ile ölüm arasındaki seçeneği belirler. Anti-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonlarının apoptozisi baskıladığı oysa pro-apoptotik üyelerin aşırı ekspresyonunun ise hücreleri öldürdüğü görülmektedir (Schlootmann and Schölmerich, 2000).

Çizelge 1.1: Bcl-2 ailesi üyeleri

Pro- apoptotik Bcl-2 Üyeleri		Anti-apoptotik Bcl-2 Üyeleri
Bax	Bak	Bcl-2
Bid	Bcl-xS	Bcl-xL
Bad	Bik	Bcl-w
Bim	Bmf	Mcl-1

Bcl-2 geni ilk olarak insan B hücreli foliküler lenfomada tanımlanmıştır. Bu lenfoma tipinde, Bcl-2, hücrelerin normalden uzun yaşam sürelerine neden olur. Böylece malignite oluşumuna zemin hazırlamaktadır. Bcl-2 özellikle mitokondri dış membranında bulunmakta ve iyon transportunu düzenlemektedir. Bax ve Bad sitozolde bulunur ve apoptotik uyarı alınması halinde mitokondri membranına bağlanır, burada küçük delikçikler (pore) oluşumunu indükler, böylece seçici iyon geçirgenliği kaybolur, sonuçta sitokrom-c ve apoptozis-indükleyici faktör olarak bilinen AIF'ün mitokondriden sitozole çıkmasını sağlar. Bcl-2'nin ayrıca mitokondri ile olan ilişkisinden dolayı antioksidan bir etkiye sahip olduğu ve böylece oksidan stresin neden olduğu apoptozisi baskılayabildiği bulunmuştur (Behnia et al. 2000; Alberts et al., 2002; Schlootmann and Schölmerich, 2000).

1.2.2.3. Kaspazlar

Kaspaz ("caspase")'lar, zimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından sistein proteazlar olarak adlandırılan bir grup enzimdir. Kaspazlar, aspartik asitten sonraki peptid bağımlı kırarlar. Şu ana kadar 14 tanesi tanımlanmıştır ve çoğu apoptozisde rol almaktadır. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir kaskad (şelale tarzı reaksiyon dizisi)'a neden olurlar. Kaspaz kaskadı, sitokrom-c'nin sitoplazmaya salıverilmesiyle prokaspaz 9'un aktivasyonu yoluyla aktifleştirildiği gibi, kaspazlar da sitokrom-c'nin salıverilmesine neden olabilirler (Rudel, 2000).

Kaspazların bazıları (Kaspaz-2, -8, -9, -10) başlatıcı (initiator) kaspazlar olarak bilinirken bazıları da (Kaspaz-3, -6, -7) efektör (effector) kaspazlar olarak bilinir. Başlatıcı kaspazlar apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör

kaspazlara nakledeleler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri (örneğin, hücre iskeleti proteinleri aktin veya fodrin, nüklear membran proteinini lamin A, DNA tamirinde rol alan poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP))'ı parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar (Rudel, 2000).

Çizelge 1.2: Kaspaz Ailesi Üyeleri

Başlatıcı Kaspaz Üyeleri		Efektör Kaspaz Üyeleri
Kaspaz-2	Kaspaz-1	Kaspaz-3
Kaspaz-8	Kaspaz-4	Kaspaz-6
Kaspaz-9	Kaspaz-5	Kaspaz-7
Kaspaz-10	Kaspaz-11	
Kaspaz-12	Kaspaz-13	
Kaspaz-14		

Kaspazlar dizi, yapı ve substrat spesifitesi bakımından benzerlikler gösterirler. Hepsi N-terminal pro-domain, büyük altünite (~20 kDa) ve küçük altünite (~10 kDa) içeren inaktif prekürsörler olarak üretilir. N-terminal domain farklı üyeler arasında değişiklik gösterir ve bu domain subsellular lokalizasyon ve aktivasyonu için önemlidir. (Rudel, 2000).

1.2.2.3.1. Kaspaz İnhibitörleri

Bir kaspaz inhibitörleri ailesi olan IAP ("inhibitors of apoptosis")'ler, kaspazları selektif olarak inhibe ederler, böylece apoptotik mekanizmayı durdururlar. Bu inhibitörler birçok malign hücreler tarafından aşırı eksprese edilmektedirler. IAP'ler ayrıca hücre döngüsünü de etkileyerek apoptozisi durdurabilirler. Kaspazlardaki defektler otoimmün hastalıklara, kansere ve bazı nörolojik bozuklukların oluşumuna katkıda bulunabilir (Kidd et al. 2000). Hatta kaspaz 8'in nöroblastomada tümör supressörü olarak işlev gördüğü bulunmuştur (Teitz et al. 2000).

IAP'ler prokaspazların aktivasyonunu önleyerek ve olgun kaspazların enzimatik aktivitesini inhibe ederek apoptozisi baskılayabilir. Birkaç farklı memeli IAP proteini (XIAP, c-IAP1, c-IAP2 ve survivin) tanımlanmıştır ve bunların hepsi

hücre kültüründe anti-apoptotik aktivite göstermektedir (Deveraux et al. 1999; Miller et al. 1999).

IAP'ler, apoptoziste hem mitokondriyal (intrinsic) hem de ölüm reseptörü aracılı (extrinsic) yolları regüle eden antiapoptotik protein ailesidir. IAP'lerin antiapoptotik aktivitesi, bu protein ailesinin tüm üyelerinde bulunan, korunmuş baculovirus IAP tekrar domainine atfedilir. İnsan IAP'lerinin bazıları (XIAP, c-IAP1, c-IAP2) direkt olarak pro-kaspaz-9'a bağlanıp sitokrom-c'ye karşılık pro-kaspaz-9'un aktivasyonunu önlediği gösterilmiştir (Holcik and Korneluk, 2001). Ya da efektör kaspazlardan kaspaz-3 ve kaspaz-7'nin proteaz aktivitesini direkt olarak baskırlar (Deveraux et al. 1997). Onun için, IAP'ler, apoptozisin ölüm reseptörü aracılı (extrinsic) ve mitokondriyal (intrinsic) yollarında iş gören downstream proteazlar gibi bazı kaspazların endojen (içsel) antagonistleri olarak görev yapar. Bazı IAP'lerin artmış gen anlatımı, istenmeyen klinik sonuçları olan kanserlerde bildirilmiştir. (Grossman et al. 2001).

1.2.2.4. Sitokrom-c

Sitokrom-c, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteindir. Son yıllarda anlaşılan önemiyle apoptozis sürecinde merkezi bir konuma oturmuştur. Bu yüzden de sitokrom-c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesi apoptozis yoluna girmiş bir hücrede geri dönüşümsüz bir döneme girildiğini işaret eder. Sitokrom-c, mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamış bir şekilde mitokondriden apoptozis-indükleyici faktör ("AIF, apoptosis-inducing factor") ile birlikte sitoplazmaya salınır. Sitokrom-c sitoplazmik protein olan Apaf-1 ("apoptotic protease activating factor-1")'e bağlanır ve onu aktive eder, ardından ATP'nin de katılımıyla apoptozom adı verilen bir kompleks oluşur. Bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz-3'ü aktive eder. Aktif kaspaz-3, kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü ("ICAD, inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease") inaktifleştirir, böylece ICAD'ünün bağladığı kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz ("CAD, caspase-activated deoxyribonuclease") serbestleşir ve bu da apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin

kondensasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur (Cooper, 1997; Alberts et al. 2002).

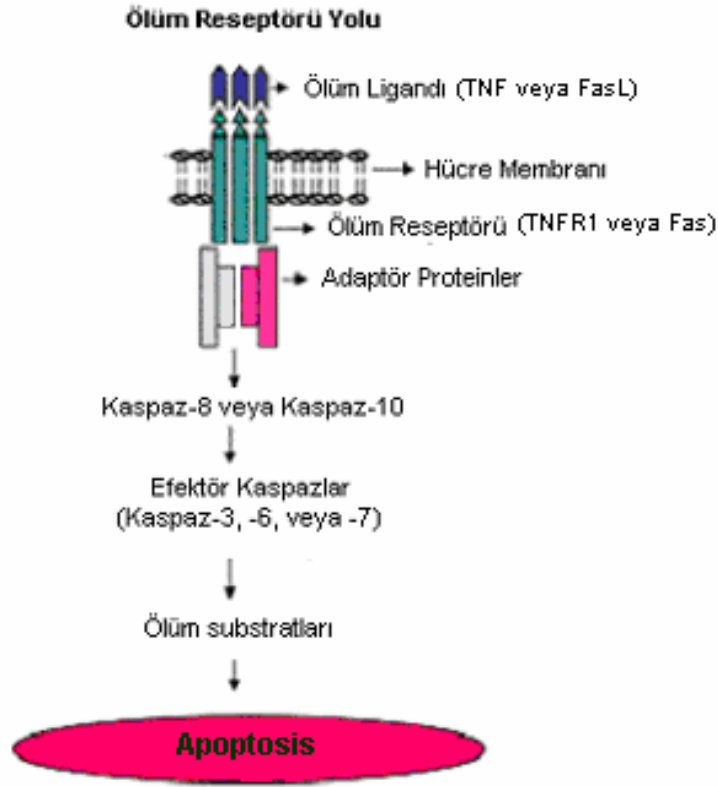
1.2.3. Apoptozis Mekanizmaları

Apoptozis, hücre dışı ve hücresele seviyede oluşan çeşitli sinyaller yoluyla tetiklenebilir (Thompson, 1995). Hücresele düzeyde etkili ana fizyolojik aktivatörler, Fas Ligand (FasL) ve Tümör nekrozis faktör (TNF) isimli proteinlerdir. Ölüm faktörü olarak da adlandırılan bu proteinlerin, ilgili reseptörlerine bağlanması ile hücre ölümü gerçekleşir. Bunun dışında apoptozis viral enfeksiyonlar, bakteriyel toksinler, onkogenler, kemoterapötikler, radyasyon gibi bazı faktörler ile de başlatılabilir. Ağır DNA hasarına yanıt olarak aktive olan p53 geni ve reaktif oksijen radikalleri (hem mitokondri, hem plazma membranı, hem de genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak) apoptozisi tetikleyebilmektedir (Cooper, 1997; Alberts et al. 2002).

1.2.3.1. Kaspazlara-Bağımlı Gelişen Apoptozis Mekanizması

1.2.3.1.1. Ölüm Reseptörü Aracılı (Extrinsic) Apoptotik Yol:

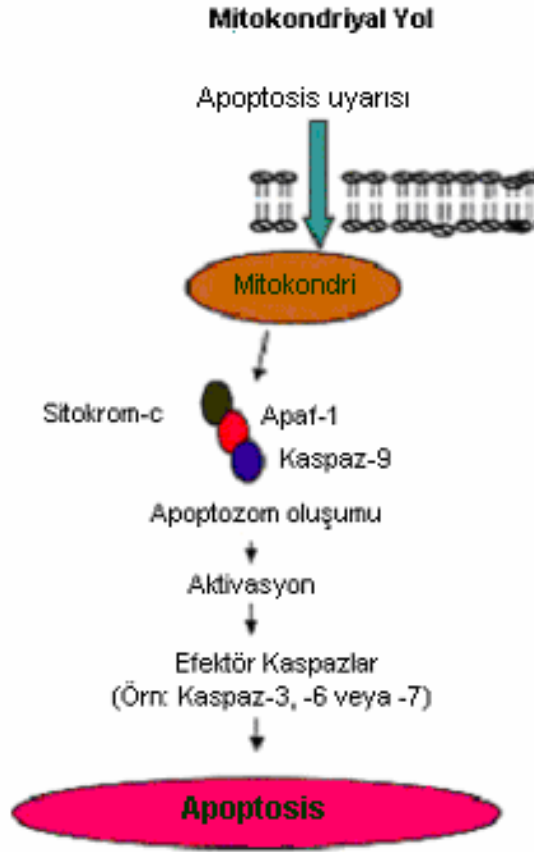
Bu yolda, hücre yüzeyindeki dış sinyaller yoluyla apoptozis tetiklenir. Bu yol ölüm reseptörlerinin (Fas veya TNFR1) hücre dışı uyarımına bağlıdır. Bu reseptörler aldıkları sinyali Kaspaz-8'e iletirler ve Kaspaz-3, Kaspaz-6, Kaspaz-7 gibi kaspazların aktivasyonuna neden olarak kaspaz kaskadını başlatırlar (Gruss and Dower, 1995; Wallach et al, 1999). (Şekil 1.4)



Şekil 1.4: Ölüm reseptörü aracılı (extrinsic) apoptotik yol ([http://www.vhsd.org/docs/apoptosis-AT-o4B\(2\).ppt#15](http://www.vhsd.org/docs/apoptosis-AT-o4B(2).ppt#15)'den uyarlanmıştır).

1.2.3.1.2. Mitokondriyal (Intrinsic) Apoptotik Yol

Bu mekanizmada apoptotik sinyaller hücre içinde ortaya çıkar. Bu mekanizma mitokondriler aracılığıyla çalışır ve Bcl-2 ailesi tarafından kontrol edilir. Bu yol, Bcl-2 ailesinin pro- ve anti-apoptotik üyeleri arasındaki dengenin kaybolmasına neden olabilen hipoksik stres, büyüme faktörlerinin yokluğu veya radyasyon gibi faktörler tarafından aktive olur (Yang, 1997). Mitokondrinin dış membranı yüzeyinde Bcl-2 proteini eksprese olur. Bcl-2 Apaf-1 proteinine bağlanır. Hücrenin internal hasarı, Bcl-2'nin Apaf-1 ve sitokrom-c'nin mitokondriden salınımına neden olur. Sitokrom-c ve Apaf-1, prokaspaz-9'u aktive ederek kaspaz kaskadının aktifleştirilmesini sağlar ve apoptozis gerçekleşir (Cooper, 1997; Alberts et al. 2002) (Şekil 1.5)



Şekil 1.5: Mitokondriyal (intrinsic) apoptotik yol ([http://www.vhsd.org/docs/apoptosis-AT-o4B\(2\).ppt#15](http://www.vhsd.org/docs/apoptosis-AT-o4B(2).ppt#15)'den uyarlanmıştır).

1.2.3.2. Kaspazlara Bağımlı Olmadan Gelişen Apoptozis Mekanizması

Apoptozise neden olabilen diğer pathwayler henüz tamamen karakterize edilememiştir. Kaspaz-bağımlı iki mekanizma dışında kaspazlara bağımlı olmadan gelişen yollar da olabilir. Mitokondri membranı hasar gördüğü zaman canlı hücrede mitokondri zarları arasında yerleşmiş olan Apoptosis inducing factor (AIF) sitokrom-c gibi aynı yolla mitokondriden salınır. AIF nukleusa girer ve kromatin kondensasyonu yoluyla hücrel apoptozisi indükler (Susin et al. 1999).

1.2.4. Apoptozis İlişkili Bazı Genler

TNFR1:

Tümör Nekrozis Faktör Reseptör Superailesinin bir üyesi olan TNFR1, 12p13.2 kromozomal bölgede bulunur. Bir sitokin olan TNF- α 'nın bağlandığı reseptördür. TNFR1, aldığı sinyali Kaspaz-8'e iletir ve Kaspaz-3, Kaspaz-6, Kaspaz-7 ve Bid gibi genlerin aktivasyonuna neden olur. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=191190>).

Bax (Bcl-2-associated X protein)

Bax geni 19q13.3-13.4 kromozomal bölgede bulunur ve proapoptotik bax proteini mitokondri üzerine etki ederek hücre ölümünü indükler. Oltvai ve ark. (1993) Bax'ı Bcl-2'ye eşlik eden bir protein olarak tanımlamıştır. Bax, Bcl-2 ile oldukça fazla aminoasit homolojisi gösterir ve in vivo Bcl-2 ile homo- ve heterodimerler yapar. Bax fazla olduğu zaman programlı hücre ölümü hızlanır ve Bcl-2'nin ölüm represör aktivitesi karşı koyamaz. Bcl-2/Bax oranı apoptotik stimulan sonra yaşam veya ölümü belirler. Bcl-2 protein ailesi, apoptozis sırasında mitokondriyal membran geçirgenliğini kontrol ederek hücre ölümünü regüle eder. Proapoptotik Bax ve Bak mitokondri porlarını açarken, antiapoptotik Bcl-xL kapar. Bax ve Bak sitokrom-c nin çıkmasına izin verirken Bcl-xL geçişi önler (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=600040>).

Bak (Bcl-2 antagonist killer 1)

Bak geni 6p21.3-21.2 kromozomal bölgede bulunur. Chittendau ve ark. (1995) ve Kiefer ve ark. (1995) yeni bir Bcl-2 homologue Bak'ı klonlamışlardır. Bak hücre ölümünü indükler. P53 proteini önemli bir proapoptotik regülatördür. Leu ve ark. (2004) hücre stresinden sonra p53'ün Bak ile etkileşime girdiğini bulmuştur. Bu etkileşim Bak'ın oligomerizasyonuna ve mitokondriden sitokrom-c'nin salınmasına neden olur (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=600516>).

Bid, Bak ve Bax gibi pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri normalde hücrelerde sessiz “latent” halde bulunurlar. Bu proapoptotik üyeler aktive edildiklerinde sitokrom-c'nin sitoplazmaya salıverilmesini sağlarlar. Bid'in kırılmasına, dolayısıyla aktifleşmesine, yol açan etken kaspaz-8'in aktivasyonudur (Schlootmann and Schölmerich, 2000).

Bcl-w (Bcl2-like 2, Bcl2L2):

Bcl-w geni 14q11.2-q12 kromozomal bölgede bulunur. İlk kez Gibson ve ark. (1996) tarafından klonlanmıştır. Fare hematopoetik hücre hatlarında myeloid hücrelerde eksprese olurken, lenfoid hücrelerde daha az eksprese olduğu bulunmuştur. Bcl-w eksprese olduğu zaman çeşitli sitotoksik şartlar altında hücrenin sağ kalımını sağlar (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=631931>).

AIF (Apoptosis Inducing Factor)

AIF, Xq25-q26 kromozomal bölgede bulunur. İlk kez Susin ve ark (1999) tarafından klonlanan (kopyalanan) AIF geni, sağlıklı hücrelerde mitokondriyal intermembran aralıkta bulunan, apoptotik hücrelerde nükleus bütünlüğünün bozulması için önemli 57 kDa moleküler ağırlıkta bir flavoproteini kodlar. Çekirdeğe taşındığında apoptozisi indükler. Apoptozis indüksiyonuyla bu protein nükleusa transloke olur ve kromozom kondensasyonu ve fragmentasyonunu etkiler. Ayrıca, bu genin ürünü mitokondriden sitokrom-c salınmasını indükler (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=300169>).

AIF, kaspaz-bağımsız yol aracılığıyla apoptozisi ve nuklear kromatin kondensasyonunun indüklenmesinde önemli bir role sahiptir. AIF, memeli apoptozis olayları sırasında sitokrom-c ve kaspazlar ile de interaksiyona girer. (Lu et al. 2003).

Survivin (IAP: Inhibitors of Apoptosis grubu üyesi)

Survivin 17q25 kromozomal bölgede olup, bir apoptozis inhibitörüdür ve pek çok insan kanserinde artmış gen anlatımı (overeksprese) olur. Survivin gen anlatımı

(ekspresyonu) hücre döngüsü bağımlıdır. Çoğalan hücrelerde hücre döngüsünün G₂/M fazında yüksek seviyelerde eksprese olur ve hücre döngüsü durduktan sonra hızla gen anlatımı düşer. Mitozun başlangıcında survivin mitotik iğ ipliklerinin mikrotübülleri ile bağlanır. Survivin-mikrotübül interaksiyonlarının bozulması, survivinin antiapoptotik fonksiyonu kaybına neden olur ve mitoz sırasında hücre ölümünde gerekli bir mekanizma olan kaspaz-3 aktivitesinde bir artışa neden olur. Kanserde survivin artmış gen anlatımı (overekspresyonu) apoptotik bir kontrol noktası olabilir. Survivin tarafından yürütülen antiapoptotik yolun manipulasyonu kanser terapisi için yararlı olabilir (Li et al. 1998; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=603352>).

Survivin, upstream ve terminal kaspazları inhibe ederek hücre ölümünü baskılayan protein ailesi IAP'lerin bir üyesidir (Duckett et al. 1996; Liston et al. 1996; Ambrosini et al. 1997; Roy et al. 1997; Deveraux et al. 1997; Deveraux et al. 1998; Tamm et al. 1998) Bu proteinler çeşitli uyarılar (TNF- α , Fas, growth faktörün olmayışı gibi) ile indüklenerek apoptozisi baskılar (Ambrosini et al. 1997; Duckett et al. 1996; Liston et al., 1996; Li et al. 1998). Survivin, hem hücre ölümü hem de hücre çoğalmasıyla ilişkilidir (Altieri et al. 1999). Survivin olgun, terminal olarak farklılaşmış dokularda eksprese olmaz, fakat çoğu insan kanserinde ve kanser hücre hatlarında eksprese olur (Ambrosini et al. 1997; Altieri et al. 1999). Survivin ekspresyonunda bir bozulma hücre ölümü ve hücre döngüsü bozukluklarına neden olur (Fraser et al. 1999; Li et al. 1999; Li et al. 2000). Çeşitli çalışmalarla Survivin ekspresyonunda artışın, AML'de ve bazı kanserlerde kötü prognoz ve tümör yinelenmesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Adida et al. 1998; Adida et al. 2000; Sarela et al. 2000). Carter ve ekibinin gerçekleştirdiği iki çalışmada da Survivin artmış gen anlatımı AML hastalarının blastlarında tespit edilmiştir (Carter et al. 2001).

Kaspaz-6

4q25-q26 kromozomal bölgede bulunan kaspaz-6 geni kaspaz proteaz ailesinin bir üyesidir. 34 kDa'luk bir protein kodlar. Efektör kaspazlardandır. Kaspaz-6'nın en iyi bilinen substratı Lamin A'yı keserek apoptotik hücre görünümüne neden olduğu bilinmektedir (Cohen, 1997).

Kaspaz-8

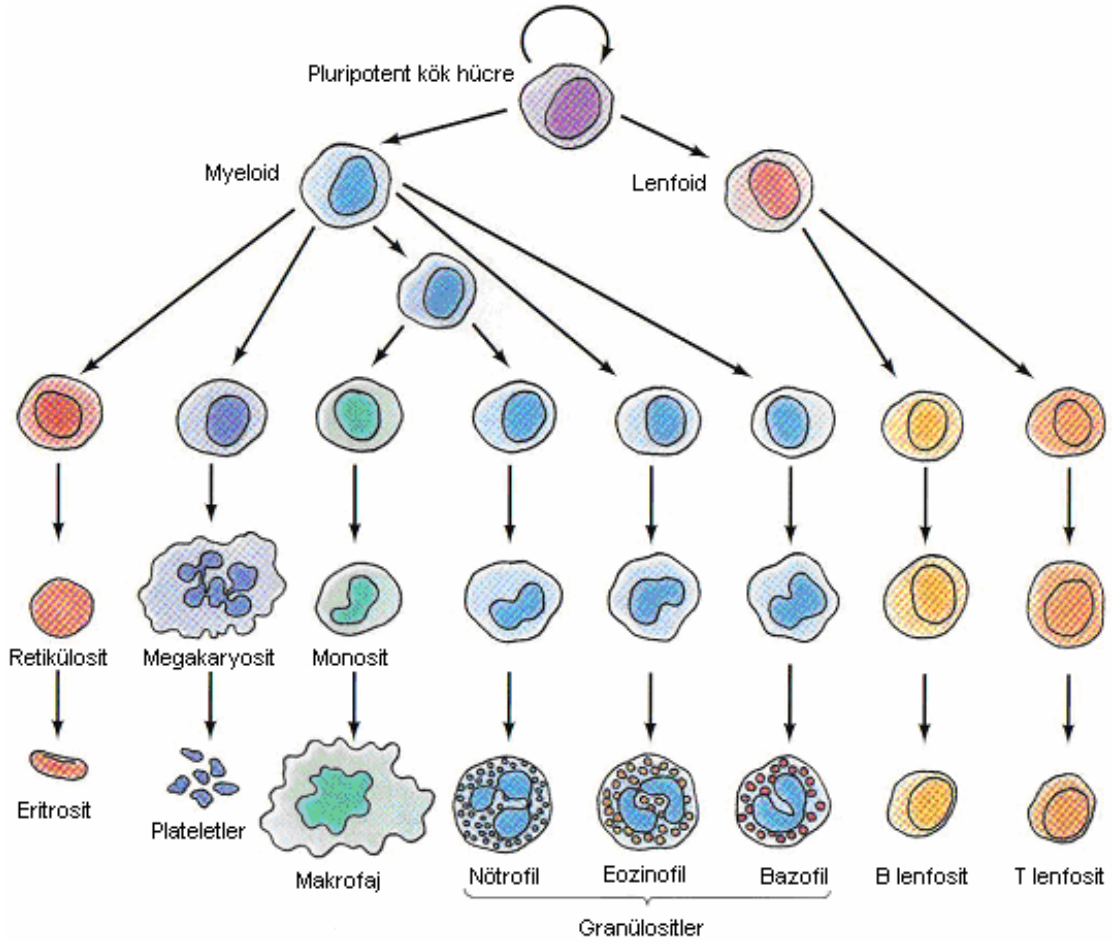
2q33-q34 kromozomal bölgede bulunan kaspaz-8 geni kaspaz proteaz ailesinin bir üyesidir. Başlatıcı kaspazlardan olan Kaspaz-8'in substratları diğer pro-kaspazlardır. TNFR1 tarafından aktive edilen kaspaz-8 diğer efektör pro-kaspazları aktive ederek kaspaz kaskadını başlatır (Cohen, 1997).

1.3. HEMATOPOEZ VE HÜCRE FARKLILAŞMASI

Hematopoez, kök hücrelerin kendi kendini yenilemesini (self-renewal), lineage-committed (lineage-bağımlı) progenitör (öncül) populasyonun büyümesi (expansion), ve bu düzenle terminal elementlere olgunlaşmasını içeren bir süreçtir (Ogawa, 1993; Furukawa, 1997). Hematopoetik farklılaşma; miyeloid ya da lenfoid yollarını kapsar. Periferel kanda az sayıdaki stem hücreler yaklaşık olarak 10 farklı hücre tipini oluşturur. Hematopoetik hattın son 3 elementi, yani kırmızı kan hücreleri, beyaz kan hücreleri (granülositler, monositler ve lenfositler) ve plateletler, hem morfolojik olarak ayırtedilebilirler hem de tamamen farklı fonksiyonlara sahiptirler (Şekil 1.6). Hematopoetik farklılaşma sırasında bu hücre çeşitliliği elde edilir (Watowich et al. 1996).

Hücre biyolojisi çalışmaları, hücre döngüsünün hücrelerin fonksiyonu ile sıkı bağlantı içinde olduğunu ortaya koymuştur. Hücre döngüsündeki yavaşlama kök hücrelerin kendini yenilemesi için gereklidir, hızlanma ise öncül populasyonun etkili genişlemesi için gereklidir ve terminal olarak farklılaşmış hücrelerin çeşitli fonksiyonları için bazen önkoşuldur (Furukawa, 1997; Furukawa, 1998). Eğer hücreler bu düzenlemeden kurtulursa, sonuç kötüdür, malignant hücrelere transforme olabilirler veya transformasyondan kaçınmak için, hücreler apoptotik programa göre elimine edilirler (Drexler and Minowada, 1998). Bu nedenle hematopoetik hücre döngüsünün normal kan gelişimi sırasında sıkı düzenlemesi altında olduğu varsayılır. Bu kavramı destekleyen pek çok biyolojik delil olmasına rağmen, hematopoetik hücre farklılaşması sırasında hücre döngüsü düzenlemesinin moleküler temeli hakkında çok az şey bilinmektedir. Memeli hücre döngüsü mekanizmasının başlıca major komponentleri, (cdklar, siklinler ve cdk inhibitörleri) tanımlanmış ve

karakterize edilmiştir (Morgan, 1997). Bu moleküllerin rolleri, hücre hatlarının kullanıldığı model sistemlerde aydınlatılmış olmasına rağmen, hematopoetik farklılaşma sırasında her komponentin kesin fonksiyonu tamamen anlaşılamamıştır (Burger et al. 1994; Liu et al. 1996; Schwaller et al. 1997; Gao and Zelenka, 1997; Liu et al. 1999). Hücre hatlarından elde edilen sonuçlar direkt olarak normal hematopoeze uygulanamaz. Çünkü hücre siklusunda ve hücre farklılaşmasında defektlere sahip olan hücre hatlarına ait analiz sonuçları, normal hücre fizyolojisini bire bir yansıtmaz (Drexler and Minowada, 1998).



Şekil.1.6. Hematopoetik hücre farklılaşması. (Cooper GM. The Cell 1997'den uyarlanmıştır).

Hücre döngüsü mekanizmasının aktivasyonu, *in vivo* kan havuzunun etkili genişlemesi için gerekli olabilir. Hücre-hücre interaksiyonu etkisiyle transkripsiyonel aktivasyonun yönetildiği daha önce bildirilmesine rağmen, hematopoetik progenitörlerde cdk/siklin indüksiyonunun düzenlemesi hakkında az şey bilinmektedir (Philips et al. 1999).

Çeşitli bildirilerde, insan hematopoetik stem (kök) hücrelerde hücre döngüsü genlerinin ekspresyonuna değinilmiştir (Della Ragione et al. 1997; Dai et al 2000; Marone et al. 2000). Bu çalışmalar, cdk'ların ve siklinlerin ekspresyonlarının genellikle taze olarak izole edilen CD34+ hücrelerde baskılandığını göstermiştir. Dai ve ark.(2000) kord kanı kaynaklı CD34+ hücrelerin cdk2 veya siklin D2, D3 ve E'yi eksprese etmediğini, halbuki küçük miktarda siklin D1'in flow sitometri ile bulunduğunu bildirmişlerdir (Dai et al 2000). Tersine, Della Ragione ve ark (1997) kemik iliğinden izole edilen CD34+ hücrelerde immunoblotting ile yüksek seviyede siklin D3 bulurken siklin D1 bulamadıklarını; bu hücrelerde cdk6'nın eksprese olurken cdk4'ün eksprese olmadığını bildirmişlerdir (Della Ragione et al. 1997). Marone ve ark (2000), Cdk2 ve Cdc2 (Cdk1)'nin kinaz aktivitesinin hematopoetik stem hücrelerde çok düşük bulmuşlardır (Marone et al. 2000).

Hücre döngüsü kontrol genlerinden siklin D1'in forbol esterleri ile muamele edilmiş HL-60 hücrelerinde up-regüle olduğu gösterilmiştir (Burger et al 1994; Akiyama et al. 1993; Horiguchi-Yamada et al. 1994) Bununla birlikte, terminal olarak farklılaşmış myeloid hücrelerde siklin D1'in fonksiyonel önemi hakkında çok az şey bilinmektedir (Furukawa, 2002). Zwijsen ve arkadaşları Siklin D1'in, direkt olarak östrojen reseptörü ile interaksiyona girdiği ve östrojen-yanıtlayan elementlere bağlanmasını artırdığı ve böylece östrojenle-yönlendirilmiş transkripsiyonun aktive olduğunu bildirmiştir. Benzer mekanizmalar yoluyla, Siklin D1, myeloid-özellik genlerin regülasyonunda da gerekli olabilir (Zwijsen et al. 1997).

1.3.1. Lösemi ve HL-60 hücre hattı

Malign hastalıklar klasik olarak kontrolsüz aşırı hücre proliferasyonunun olduğu hastalıklar olarak bilinir. Oysa aşırı proliferasyonun yanında azalmış apoptotik hücre ölüm hızının da malignite (kötücül hastalık) gelişimine katkıda bulunduğu görülmüştür. Zamanı geldiğinde normal olarak apoptozise gidemeyen

dolayısıyla beklenenden daha uzun süre yaşayan hücreler, genomlarında biriktirdikleri mutasyonların etkisiyle malign (kötücül) hücrelere dönüşme potansiyeli taşırlar. Hematolojik maligniteler, kan hücrelerinin neoplastik çoğalmaları ya da kanserleridir. Bütün kanserlerde olduğu gibi, malign dönüşümün, tek bir hücrenin büyüme ya da yaşam avantajı kazandığı çok basamaklı bir süreç olduğu düşünülmektedir. Bu hücre ve aynı soydan gelen hücrelerin kontrolsüz büyümesi klonal ya da özdeş hücre popülasyonunun genişlemesiyle sonuçlanır. Bu süreç lökosit hücre soylarından birinde meydana geldiğinde sonuçta ortaya çıkan kanser, lösemidir. Yani lösemi; hematopoetik soya ait olan hücrelerin kontrol edilemeyen proliferasyonudur.

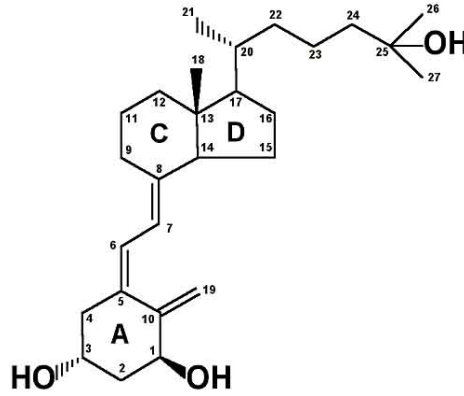
Lösemnin sık görülen formları, hücre dizilerine (miyeloid ya da lenfoid) ve hastalığın klinik seyriyle ilişkili olan terminal farklılaşma derecesine göre sınıflandırılır. Akut lösemi daha ileri mutasyon için sınırlı kapasitesi olan progenitör hücrenin transformasyonundan ortaya çıkar. Bu formlar miyeloid (akut miyeloid lösemi, [AML]) ya da lenfoid (akut lenfositik lösemi [ALL]) diziden gelebilir. Bir insan akut myeloid lösemi hücre hattı olan HL-60 hücreleri, bazı indükleyici moleküller ile muamele edildiği zaman granulositik veya monositik yol boyunca diferansiye olurlar. HL-60 hücrelerinin bu karakteristik özellikleri araştırmacıların ilgisini çekmiştir ve in vitro lösemik diferansiyasyon için sıklıkla başvurulan bir model sistem olmuştur (Collins et al. 1980; Collins,1987).

1.3.2. D vitamini ve Akut Myeloid Lösemi Hücresinin Farklılaşması:

Vitamin D₃, güneş ışığına maruz kalındığında deride üretilir ve daha sonra karaciğerde hidrosillenerek 25(OH)D₃'e ve böbrekte 1,25(OH)₂D₃'e dönüşür. 1,25(OH)₂D₃'ün kemik, barsak ve böbrekte etkileri vardır ve bu organlardan kana kalsiyum transportunu stimüle eder (Lips, 2006).

Vitamin D₃'ün fizyolojik olarak aktif metaboliti 1 α ,25 dihydroxyvitamin D₃ [1,25(OH)₂D₃], insan myeloid lösemi hücrelerinde, hücre diferansiyasyonu için güçlü bir uyarandır. HL-60 hücrelerinde Vitamin D₃'ün, monosit ve makrofajlara diferansiyasyonu indüklediği gösterilmiştir (Mangelsdorf et al. 1984). Vitamin D₃ hücrelerdeki bu etkisini vitamin D reseptörü (VDR) ile interaksiyonları sayesinde

gerçekleştirir (Bar-Shavit et al. 1983; Murao et al. 1983; Tanaka et al. 1983; Djulbegovic et al. 1986; Amir et al. 1999; James et al. 1999). Vitamin D reseptörleri myeloid hücre ve meme ve kolonik epitelyumdaki pek çok hücre tipinde tanımlanmıştır (Eisman et al. 1981; Kizaki et al. 1991; Meggouh et al. 1991). Vitamin D bazı tümör tiplerinin insidansını düşürebilir (Garland et al. 1985; Corder et al. 1993). Vitamin D lösemi (Koeffler et al. 1985; Elstner et al. 1994), meme (Elstner et al. 1995), kolon (Wali et al. 1995) ve prostat (Miller et al. 1995) kanser hücre hatlarının büyümesi sürecini engeller (Colston K et al 1981; Frampton et al. 1983).



Şekil.1.7: 1,25 (OH)₂D₃'ün yapısı (Hansen et al, 2001'den uyarlanmıştır).

Vitamin D ile ilgili yapılan klinik deneyler az olmakla birlikte, birkaç yanıt 2 mg/gün doz ile tedavi edilen myelodisplastik sendromlu hastaların bir çalışmasında gözlenmiştir, fakat tolere edilemeyen hiperkalseminin kısıtlayıcı olduğu ispatlanmıştır (Koeffler et al. 1985). Son zamanlarda kalsiyum metabolizmasında minimal etkiye neden olurken diferansiyasyon aktivitesini koruyan yeni Vitamin D3 analogları kullanılabilir hale gelmiştir (Perlman et al. 1990; Dore et al. 1994; Pakkala et al. 1995).

Proliferasyon ve olgunlaşma (maturasyon) arasındaki bir dengesizlik, olgunlaşmanın farklı aşamalarında blokların görüldüğü akut myeloid lösemisinin özelliğidir. Bununla birlikte, in vitro ortamda lösemik hücrelerin rastgele spontan diferansiyasyonundan elde edilen deliller, diferansiyasyondaki bu bloğun geri

dönüşümlü olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, AML tedavisinde farklılaşmayı indükleyen ajanların kullanılabilir olduğunu göstermektedir (Tenen, 2003).

Vitamin D₃'ün bu etkileri, ciddi in vivo hiperkalsemiye sebep olan genellikle 10⁻⁶ ve 10⁻⁷ M seviyelerinde sağlanır. Vitamin D₃ ve analoglarının, tek çekirdekli ve T lenfosit hücre kültürlerinde TNF- α 'nın üretimini inhibe ettiği de bulunmuştur (Muller, 1992). Myeloid lösemi hücre hattı HL-60 hücrelerinin farklılaşmasını indükleme yeteneği olan, düşük kalsiyum tekrar emilim aktivitesi olan 1,25(OH)₂ Vitamin D₃ ve analogları da bazı araştırmacılar tarafından değerlendirilmiştir (Srivastava et al., 1994; Srivastava et al., 1995; Behringer et al., 2001; Nakagawa et al., 2001; Savli ve ark. 2002).

1,25(OH)₂ Vitamin D₃'ün 10⁻⁹ ve 10⁻⁸ M seviyede in vitro olarak bu hücrelerin büyümesini inhibe ettiği ve farklılaşmasını indüklediği gösterilmiştir. Bununla birlikte AML hastalarından elde edilen primer hücrelerde (blast) vitamin D₃'ün etkisi çok az çalışılmıştır (Yamada et al, 2001).

1.4. Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu

DNA zincirinin önceden belirlenen bir bölgesini çoğaltmak için kullanılan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR), moleküler genetik alanında devrim niteliği taşıyan bir yöntemdir. Son yıllarda PZR reaksiyonlarında sıcaklık döngüleri sağlamak için kullanılan cihazların (thermocycler) hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, gerçek zamanlı (real-time) polimeraz zincir reaksiyonu olarak adlandırılan yeni bir yöntemin gelişmesine neden olmuştur. Gerçek zamanlı PZR, geleneksel PZR'ın uygulama alanlarını arttırırken PZR'la ilişkili pek çok laboratuvar sorununa da çözüm getirmiştir. Bu yöntem sayesinde DNA ve RNA örnekleri kalitatif ve kantitatif olarak kısa sürede analiz edilebilmekte, çok sayıda örnek son derece az kontaminasyon riskiyle güvenle çalışılabilmektedir (<http://www.iontek.com.tr/?id=11>).

Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu; başlangıç miktarına göre oluşan, son PZR ürününün ölçümünün özgün, hassas ve diğer metodlara göre daha kolay tespit edilebildiği bir yöntemdir (Freeman et al., 1999; Raeymaekers, 2000). Bu yöntemde; her bir PZR döngüsünde oluşan flouresan ışınımı aracılığı ile

son ürün miktarı tespit edilebilir (eş zamanlı olarak) (Higuchi et al., 1992; Higuchi et al., 1993). Reaksiyon, bazı sistemlerde real time = eş zamanlı olarak izlenebilir. Gerçek zamanlı kantitatif PZR bizi klasik PZR sonrası yapılması zorunlu diğer değerlendirme çalışmalarından da kurtarır (jel elektroforez gibi). Bu, doğruluğu arttırdığı gibi kontaminasyon riskini de azaltır. Klasik PZR yöntemleriyle karşılaştırıldığında 10^7 kat daha güvenilirdir. Geniş bir uygulama alanı, özgünlük ve doğru miktar tayini (kuantifikasyon) olanağı sunar.

Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu sisteminin temelini flouresan reporter moleküllerinin ışınımlarının tespiti ve miktarının belirlenmesi (kuantifikasyon) oluşturur. Sinyal artışı PZR ürün artışıyla direkt orantılıdır. Her bir PZR döngüsündeki flouresan ışınımının kaydedilmesi ile başlangıçtan itibaren üstel fazda ürün artışına hangi noktada ulaşıldığı, eş zamanlı (real time) izlenebilir. Nükleik asit hedef molekülünün çok sayıdaki kopyasının oluşturulabildiği anda artan miktarda flouresan ışınım gözlenir. Ölçülebilir ışınım 3-15 döngüde oluşur (Lee et al., 1993; Livak et al., 1995).

Önemli artışı işaret eden eşik değer kullanıcı tarafından ayarlanabilir. CT (cycle threshold) parametresi, tespit edilen flouresan ışınım eşik değerinin aşıldığı döngü sayısını belirtir. DNA amplifikasyonunu belirlemek için fluoressansa dayanan iki metod kullanılır. Hibridizasyon problemleri ve DNA bağlayıcı boya SYBR Green I. (Wittwer, 1997). Hibridizasyon problemleriyle DNA kantifikasyonu duyarlı olmakla kalmaz, aynı zamanda yüksek özgüllüğe de sahip olur (Siraj et al., 2002).

Hibridizasyon problemleriyle çalışmaya göre daha ucuz bir alternatif ise SYBR green I veya Ethidium bromid gibi çift zincirli DNA'ya bağlanan (non-spesifik amplifikasyon ve primer dimerizasyonu dahil), diziye spesifik olmayan bir kimyasal kullanmaktır. Bunlar ssDNA'ya bağlanmazlar. SYBR green solüsyon halinde çok az ışınım yapar, fakat çift zincir DNA'ya bağlanınca ışınımı güçlüdür. SYBR Green I boyası çift sarmal DNA'nın küçük girintisine bağlanır. Ayrıca uzun süre dayanıklıdır (30 amplifikasyon döngüsü sonrası yalnızca aktivitesinin %6'sını kaybeder). Total DNA ölçümlerinde tercihen kullanılır. Amplifikasyon öncesi reaksiyon karışımı denatüre edilmiş DNA'yı, primerleri ve boyayı içerir. Bağlanmamış olan boya az miktarda fluoressans yayarak, daha sonraki bilgisayar analizlerinden çıkartılan, minimum arka fon fluoressans sinyalini oluşturur.

Primerlerin tutunmasıyla az sayıdaki boya molekölü çift sarmal DNA'ya bağlanır. DNA'ya bağlanması, SYBR Green I moleküllerinin uyarılma sonucu ışık saçmalarını etkili şekilde artmasına neden olur. Uzama aşaması esnasında çift sarmal DNA oluştuğunda, daha fazla sayıda boya molekülleri bağlanır. Reaksiyon devamlı denetlenerek, fluoresansdaki artış gerçek zamanlı (real-time) olarak izlenir. Diğer döngünün ısıtma basamağında DNA denatüre edildiğinde boya molekülleri serbest kalır ve fluoresans sinyali düşer. Erime eğrisinin incelenmesiyle spesifik fluoresans sinyalleri, spesifik olmayan sinyallerden ayırt edilebilir (Siraj et al., 2002).

Relatif gen ekspresyonu karşılaştırma çalışmalarında en iyi sonuç; endojen/internal kontrolün örnek içerisinde fazla ve sabit oranda (total RNA'ya göre) bulunmasıyla elde edilir. Her bir reaksiyondaki farklı hedef mRNA'ların kuantifikasyonu için değişmeyen bir endojen kontrol kullanılabilir. Bu amaç için genellikle 18S RNA, GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenas), β -actin gibi housekeeping genler seçilir (Suzuki et al., 2000). Normal değerleri ifade eden referans gen ekspresyonunun kararlı olması, hedef genin inceleneceği deney koşullarının oluşturulmasında çok önemlidir (Schmittgen and Zakrajsek, 2000). Bu konuda yapılan diğer çalışmalarda göstermiştir ki çoklu internal kontrol kullanılması iyi ve güvenilir sonuca ulaşmak için gereklidir (Schmid et al., 2003). Değişik hücre ve doku tiplerine bağlı olarak, birden fazla ve değişik gen ekspresyonlarının referans olarak kullanılması genel kullanıma uygundur (Vandesompele et al., 2002).

Klinik uygulamaları giderek artan gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu sistemleri, infeksiyon hastalıklarının tanısında ve nokta mutasyonlarının belirlenmesinde sağladığı üstünlükler nedeniyle tercih edilmektedir. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de yaygınlaşan real-time PCR sistemleri, hız ve kaliteye önem veren moleküler genetik laboratuvarlarının pek çok sorununa çözüm olmaktadır (<http://www.iontek.com.tr/?id=11>).

2. AMAÇ VE KAPSAM

Akut myeloid Lösemi (AML)'nin differansiyasyon etkisiyle olgunlaşmamış hücre formundan daha olgun formasyonlara taşınması yoluyla tedavisi son yılların ön plana çıkan araştırma konularındandır. D vitaminleri bu yüzyılın ilk yarısından bu yana kanda kalsiyum dengesi, immünoloji, hücre farklılaşması gibi hücrel bir çok alanda önemli bir regülatör olarak saptanmakta ve incelenmektedir. Monosit ve makrofajlarda D vitamini reseptörlerinin $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ile indüklenerek differansiyasyona uğradıkları gösterilmiştir (Abe et al. 1981). Bu gözlem daha sonraları diğer doku ve hücrelerde, özellikle de hematolojik hücre hatlarında geliştirilmiştir (Eisman et al. 1983). Lösemi hücre hatlarından olan HL-60, özellikle bu amaçla kullanılmaktadır. HL-60 hücre hattı, 1976 yılında biçimlendirilmiş ve uzun yıllar boyunca tek lösemik hücre hattı olarak kullanılmıştır (Koeffler et al. 1980). Promiyelositik bir hat olan HL-60, sitotoksikite ve differansiyasyon indükleyici ajanların insan lösemi hücreleri üzerindeki etkilerini incelemeye bir model olarak kullanılmaktadır. Bu yaklaşım sayesinde kültüre edilen hücrelerdeki değişiklikler moleküler düzeylere inilerek irdelenebilmektedir (Simpson et al. 1989). Özellikle $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ etkisiyle HL-60 hücrelerinin proliferasyonunda gözlenen azalmalar ve monosit-makrofaj altyolu üzerinden ilerleyen differensiyasyonel değişiklikler konu üzerinde daha geniş araştırmaların yolunu açmıştır (Studzinski, 1989). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ yalnızca lösemik hücre hatlarının in vitro farklılaşmasını indüklememektedir, aynı zamanda kemik iliğinin progenitör hücrelerini de monosit-makrofajlara doğru farklılaştırmaktadır (Mc Carthy et al. 1983; Miyaura et al. 1982). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, differansiyasyon sinyalini bir DNA bağlanmalı transkripsiyon faktörü üzerinden ve nükleer hormon reseptörleri ailesine bağlı VDR reseptörü aracılığıyla iletmektedir (Evans, 1988) Doğrudan VDR regülasyonunu etkilediği gösterilen genlerin sayısındaki azlık ve D vitaminine yanıt veren elemanların karakterizasyonundaki yetersizlik, VDR reseptörlerinin nasıl tanındığı ve gen düzenlenmesi-farklılaşma etkisinin nasıl oluştuğu konularında uygun modeller oluşturulmasını olumsuz etkilemektedir.

Tanımlanan bazı genler olmasına rağmen konu hala tümüyle aydınlatılmış değildir. D vitamini tedavisiyle ilişkili gen anlatımındaki değişikliklerin tayini için en etkin yol miyeloid hücrelerin differansiyasyonunda rol oynayan moleküler mekanizmalar ve hedef genlerin anlaşılmasıdır. Farklılaşmaya başlayan hücre, doğal gelişimini sürdürdükten sonra apoptozise girerek ölecektir. Bütün bu olayların deneysel ortamda yaklaşık olarak 72 saat gibi bir sürede olduğu daha önceki çalışmalarda izlenmiştir (Pakkala et al. 1997; Savlı ve ark. 2002; Savlı ve ark., 2003).

Biz bu çalışmada, lösemi hücre farklılaşması ve apoptozundaki rolünü anlamak amacı ile HL-60 lösemik hücrelerini vitamin D₃ ile indükledik. Dört farklı zamanda (18, 36, 48, 72. saatler) kültürden alınan vitamin D₃ ile indüklenmiş ve indüklenmemiş HL 60 hücrelerinde TNFR1, Bcl-w, Bax, Bak, Kaspaz-6, Kaspaz-8, AIF, Survivin, Cdk1 (Cdc2), Cdk2, Cdk4, Siklin D1 ve Siklin E genlerinin gen anlatımlarını inceledik.

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. HL-60 Hücre Hattı

HL-60 hücreleri Helsinki Üniversitesi Transplantasyon Laboratuvarı Kemik İliği Nakli Araştırma Ekibi üyesi Dr. Hakan Savlı tarafından sağlanmıştır ve önceki deneylerde kullanılan hücre hattıdır (Savlı ve ark. 2003).

3.1.2. Vitamin D analogu:

1 α ,25(OH)₂D₃ (Department of Chemical Research, Leo Pharmaceutical Products, Denmark) tarafından sentezlenerek bu araştırmalarda kullanılması için isopropanol (4 x 10⁻³M) içeren solusyonlarda -20°C’de kullanıma hazır halde temin edilmiş ve IMDM’ler içinde sulandırılarak kullanıma hazır halde depo edilmiştir.

3.1.3. Kitler

Light Cycler Faststart SYBR Green I (Roche)

First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche)

RNeasy Mini Kit (50’lik) (Qiagen)

Ligcycler Control Kit DNA (Roche)

3.1.4. Primerler

Primer dizileri IDT (Integrated DNA Technologies) firmasına sentezlettirilmiştir. Çeşitli kaynaklardan faydalanılan primer dizileri, NCBI’nin BLAST programında kontrol edilmiştir (Çizelge 3.1). Kaspaz-6’nın forward dizisi, Weinreb ve ark.(2003)’nın yayınından (5’-CTA ATC TTC AAT CAC GAG AGG TTC-3’) alınmış, ancak NCBI’nin BLAST programındaki diziyeye göre sentezlettirilmiştir.

Çizelge.3.1: Primer dizileri

Gen	Dizi	Kaynak
Cdk1 (Cdc2)	F: 5'-CCT TGC CAG AGC TTT TGG AAT ACC-3' R: 5'-GAC ATG GGA TGC TAG GCT TCC TGG-3'	Löhr et al. (2003) PCR Ürünü: 316 bp
Cdk2	F: 5'-GGC CCG GCA AGA TTT TAG TA-3' R: 5'-CTA TCA GAG TCG AAG ATG GG-3'	Furukawa et al. (1996) PCR Ürünü: 169 bp
Cdk4	F: 5'-TGA CAA GTG GTG GAA CAG TC-3' R: 5'-TAA GAG TGC TGC AGA GCT CG-3'	Fink and LeBien (2001) PCR Ürünü: 439 bp
Siklin D1	F: 5'-GAG ACC ATC CCC CTG ACG GC-3' R: 5'-TCT TCC TCC TCC TCG GCG GC-3'	Schmidt et al. (2001) PCR Ürünü: 484 bp
Siklin E	F: 5'-ATA CAG ACC CAC AGA GAC AG-3' R: 5'-TGC CAT CCA CAG AAA TAC TT-3'	Schmidt et al. (2001) PCR Ürünü: 301 bp
TNFR1	F: 5'- ACC AAG TGC CAC AAA GGA AC-3' R: 5'- CTG CAA TTG AAG CAC TGG AA-3'	Sawanobori et al.. (2003) PCR Ürünü: 263 bp
Bcl-w	F: 5'-ATG GTG GCC TAC CTG GAG AC-3' R: 5'-CCC CGT CAG CAC TGT CCT CA-3'	Metcalfe et al. (2004) PCR Ürünü: 153 bp
Bax	F: 5'-TGC TTC AGG GTT TCA TCC AG-3' R: 5'-GGC GGC AAT CAT CCT CTG-3'	Savli et al. (2003) PCR Ürünü: 170 bp
Bak	F: 5'-GGC CTG CTA AGG CTC CTC-3' R: 5'-GCT GTG CCA ATA GAG AAG GC-3'	Metcalfe et al. (2004) PCR Ürünü: 291 bp
AIF	F: 5'-GGA TCC TGG GGC CAG GGT ACT GAT-3' R: 5'-CTC GGG GAA GAG TTG AAT CAC TTC-3'	Zhang et al. (2003) PCR Ürünü: 550 bp
Survivin	F: 5'-TGC CTG GCA GCC CTT TC-3' R: 5'-CCT CCA AGA AGG GCC AGT TC-3'	Löhr et al. (2003) PCR Ürünü: 259 bp
Kaspaz-6	F: 5'-TTA ATC TTC AAT CAT GAG AGG TTC-3' R: 5'-CTC ACA CAA ATC TTG AAT GTA CCA-3'	Weinreb et al. (2003) PCR Ürünü: 561 bp
Kaspaz-8	F: 5'-AGA GCC TGA GAG AGC GAT G-3' R: 5'-CAC CAT CAA TCA GAA GGG AAG-3'	Grassi.et al. (2004) PCR Ürünü: 166 bp
Beta-2-mikro-globulin	F: 5'-GAT GAG TAT GCC TGC CGT GTG-3' R: 5'-CAA TCC AAA TGC GGC ATC T-3'	Wellmann et al. (2001) PCR Ürünü: 114 bp

3.1.5. Kullanılan Kimyasallar

1 α ,25(OH)₂D₃ (Leo Pharmaceutical)
Beta-Mercapto Ethanol (Sigma)
Iscove modification of Dulbeccos Medium (IMDM) (Sigma)
RPMI-1640 (Sigma)
Fetal Calf Serum (Biochrome)
L- Glutamine (Gibco)
Penicillin-Streptomycin (Gibco)
6X Loading Dye (Fermentas #R0611)
Ethidium Bromide (Sigma E-7637)
Tris base (Sigma)
Glasiyel asetik asit (Sigma)
EDTA (Disodium ethlendiaminetetraacetate.2H₂O) (Sigma)
NaOH (Sigma)

3.1.6 Kullanılan Tamponlar ve Solüsyonlar

Elektroforez yükleme tamponu

6X Loading Dye tamponu: 10mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.03% bromophenol blue, 0.03% xylene cyanol FF, 60% glycerol, 60mM EDTA.

Etidyum bromür stok solüsyonu

10 mg/ml etidyum bromür

50X TAE

Tris base	242 g
Glasiyel asetik asit	57,1 ml
EDTA (0,5 M)	100 ml

Distile su ile 1 L'ye tamamlanır.

0,5 M EDTA (pH 8,0)

Disodium ethlendiaminetetraacetate.2H₂O 186,1 g

Distile su ile 800 ml'ye tamamlanır

pH'sı NaOH ile 8,0'e ayarlanır.

3.1.7. Kullanılan Araçlar

Lamin Air Flow (Heraus ELB 2448)

CO₂'li etüv (Heraus)

Inverted Mikroskop (Olympus IM)

Vortex (VELP Scientifica)

Zaman Ayarlı Santrifüj (MSE Rotor)

Buzdolabı (+ 4°C) (AEG 1400 P)

Thoma Lamı (1/10mm, 1/400 mm²) (İsolab)

Puar

Santrifüj Tüpü (TPP)

Steril Doku Kültürü Flaskı (T-25)

Milipor (25mm, 0.22µm) (Costar)

Elektronik Pipet Controler (Rainin GlassMaster K7803)

Otomatik Pipet Seti (Eppendorf)

Mini Santrifüj (Eppendorf Mini Spin F45-12-11)

Soğutmalı Santrifüj (+ 4°C) (Hettich Zentrifugen, Rotanta 460 R)

Spektrofotometre (Biochrome WPA Biowave, S2100)

Spektrofotometrik ölçüm için küvet (Biochrome, Type 40 00 9143)

Steril Filtreli Pipet Ucu (Neptune)

Derin Dondurucu (- 86°C) (Nuare, Ultraflow Freezer)

Derin Dondurucu (- 20°C) (Arçelik 2031 D)

Hassas Terazi (Scaltec SBC31)

Mikrodalga Fırın (Vestel)

Yatay Elektroforez (BIORAD)

Güç Kaynağı (BIORAD Mod 200/2.0 Power Supply)

UV transilimünatör (Fotodyne Incorporated)

Tüp (15 ml'lik)
Thermal Cycler (Applied Biosystem 2720)
Quantica RT-PCR Cihazı (Techne)
Thermo-Sealor (AB gene)
Clear Heat Sealing Film (UK, SP-0088)
96 Low Profile Reaction Plate (UK, SP-0029/K)
Image Analysis System Image SCI (GeneLine)

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. HL-60 Hücrelerinin Çoğaltılması ve D Vitamini ile İndüklenerek Hücre Kültürü

D vitamini inkübasyonu çalışmaları için gerekli miktarda (on milyon hücre) hücreye ulaşabilmek için HL-60 hücreleri öncelikle lamin air flow içerisinde steril şartlarda, RPMI-1640 besiyeri (%10 FCS, %1 Pen/Strep, %1 L-Glutamin) içerisine ekilerek, %5 CO₂ 37°C'lik etüvde bir süre çoğaltılmıştır. Haftada 2 gün kültürler kontrol edilerek gerekli besiyeri değişimleri yapılmıştır. Yeterli miktarda HL-60 hücre sayısına ulaşıldıktan sonra, D vitamini inkübasyonu için RPMI-1640'tan daha zengin bir besiyeri olan IMDM (Iscove Modification of Dulbeccos Medium) besiyeri tercih edilmiştir.

Her zaman dilimi için (18, 36, 48, 72) D vitamini eklenmiş ve eklenmemiş IMDM besiyeri (%10 FCS, %1 Pen/Strep, %1 L-Glutamin) içerisine, D vitamini konsantrasyonu 4×10^{-8} M ve kültür flasklarında 10.000 hücre/10 ml besiyeri olacak şekilde HL-60 hücreleri T-25 flasklara ekilmiş ve inkübasyon süresi aynı anda başlatılmıştır. Daha sonra kültürün başlangıcından itibaren 18, 36, 48 ve 72. saatlerde D vitamini ile indüklenmiş ve indüklenmemiş HL-60 hücreleri kültürden harvest edilerek hemen RNA izolasyonu aşamasına geçilmiştir.

3.2.2. HL-60 Hücrelerinden Total RNA Elde Edilmesi

Kültürden harvest edilen D vitamini ile indüklenmiş ve indüklenmemiş HL-60 hücreleri, steril tüplerde 1000 rpm'de 5 dakika süre ile +4°C'de santrifüj edilerek süpernatant kısmı atılmıştır. Pelet halindeki HL-60

hücrelerinden RNA eldesi, RNeasy Mini Kit (50'lik) (Qiagen) ile üretici firmanın önerdiği şekilde yapılmıştır.

Hücre peleti, tüpe fiske vurularak çözdürülmüş, üzerine 500 µl RLT buffer eklenerek ve mikropipetle çekip bırakılarak iyice karıştırılmıştır. Üzerine 500 µl %70 Etanol eklenmiş ve mikropipetle çekip bırakılarak iyice karıştırılmıştır. 1000 µl'lik örnek, 2 ml'lik RNeasy mini kolona konarak tüp kapatılmış, tüp oda ısısında 10.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilip, alt sıvı atılmıştır. 500 µl RW1 Buffer, RNeasy mini kolona eklenmiş, tüp kapatılmış ve tüp oda ısısında 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip, alt sıvı atılmıştır. Kolon, yeni 2 ml'lik tüpe aktarılmış, üzerine 500 µl RPE buffer konmuş ve tüp kapatılmıştır. Tüp oda ısısında 10.000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilmiş ve alt sıvı atılmıştır. RPE ile bu aşama tekrarlanmıştır. Kolon dikkatlice alınıp, 1,5 ml'lik yeni tüpe aktarılmış, üzerine 30 µl RNase-free su membrana pipetlenmiş ve tüp kapatılmıştır. Oda ısısında 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Bu aşama kolon üzerine 20 µl RNase-free su konarak tekrarlanmıştır. Tüpün dibinde total 50 µl hacimde RNA solusyonu toplanmıştır. RNA izole edildikten hemen sonra, 260 ve 280 nm ultraviyole dalga boyunda absorpsiyon değerleri spektrofotometrede okunarak, konsantrasyon ve saflığı belirlenmiştir. Daha sonra %1 agaroz jelde yürütülerek DNA kontaminasyonu ve RNA bantları açısından değerlendirilmiştir.

3.2.3. RNA Konsantrasyonu ve Saflığının Ölçülmesi

1.Stok RNA tüpünden 1 µl RNA alınmış ve 1,5 ml'lik ependorf tüpüne aktarılmıştır.

2.Üzerine 299 µl distile su eklenerek 1/300 oranında sulandırılmıştır.

3.Spektrofotometrede 260 ve 280 nm ultraviyole dalga boyunda absorpsiyon değerleri okunmuştur.

4.RNA miktarı formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Konsantrasyon} = 300 (\text{Sulandırma Katsayısı}) \times 40 \times \text{OD}_{260} = \text{ng}/\mu\text{l}$$

5.OD₂₆₀/OD₂₈₀ değeri 1,9-2,1 arasında olması, saf RNA elde ettiğimizi göstermektedir. OD₂₆₀/OD₂₈₀<1,9 bulunduğu ise, protein kontaminasyonu olarak değerlendirilmiştir.

3.2.4. cDNA Elde Edilmesi

cDNA elde edilmesi Gerçek Zamanlı Time PZR amaçlı cDNA sentez kiti (First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR, AMV=avian myeloblastis virus, Roche) kullanılarak, üretici firmanın önerdiği biçimde yapılmıştır. Kit içerisinde AMV reverse transcriptase, deoxynucleotide mix, 10x reaction buffer, 25 mM MgCl₂ stok solusyon, random primer [p(dN)₆], RNase inhibitor ve steril su yer almaktadır. Toplam hacim 20 µl olacak şekilde üretici firmanın önerdiği biçimde malzemeler karıştırılarak, uygun miktarda RNA örneği tek siklusta 25°C'de 10 dakika, 42°C'de 60 dakika, 99°C'de 5 dakika ve 4°C'de 5 dakikada cDNA'ya dönüştürülmüştür. cDNA daha sağlam ve dayanıklı bir yapıdır, dolayısıyla -20°C'de saklanabilir.

3.2.5. Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR Deneyi (Real-time Kantitatif RT-PCR)

3.2.5.1. Deneyin Yapılışı

Deney 96 kuyulu bir ısıtıcı plaka ve ışık yansımalarını dört dalga boyunda ölçebilen bir PZR cihazı ile yapılmış (Quantica; Techne, UK), ışık yansıması için SYBR Green I boyası kullanılmıştır. SYBR Green I çift sarmal DNA'ya bağlanma kapasitesi olan ve bağlandığında floresan yansıması anlamlı olarak artan bir boyadır. Ortamda çift sarmal DNA miktarı arttıkça floresans yansıma da artar. Başka bir deyişle PZR döngülerinde ürün miktarı arttıkça ışıma artar. Hedef DNA'nın miktarı ne kadar fazla ise o kadar erken ve o kadar çok yansıma başlar (Ririe et al. 1997; Wittwer et al. 1997).

Bu amaçla LightCycler Faststart DNA Master SYBR Green I kiti içerisinde gelen LightCycler Faststart Enzim, LightCycler Faststart Reaction Mix SYBR Green (FastStart Taq DNA Polimeraz, Reaction buffer, dNTP Mix, SYBR Green I dye, 10 mM Mg Cl₂ içeren), 25 mM MgCl₂ stok solusyon ve H₂O (PCR grade) kullanılarak, gerçek zamanlı PZR deneyi yapılmıştır. Bu tür reaksiyonlarda Mg yoğunluğu deneyin etkinliğine katkıda bulunur (Oste, 1988). Bu deneyler esnasında reaksiyon karışımına 2,5mM MgCl₂ eklenmiş, primer yoğunlukları 5 pmol/µl olacak şekilde

ayarlanmış, kit içerisinde çıkan enzim, üretici firmanın önerdiği şekilde kullanılmıştır.

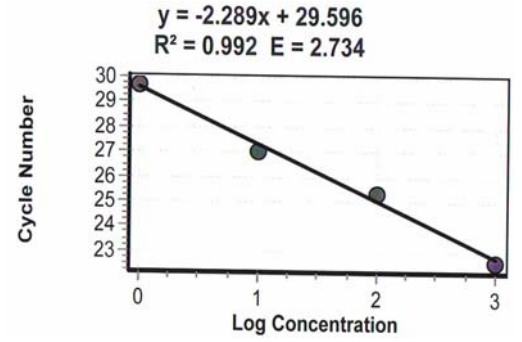
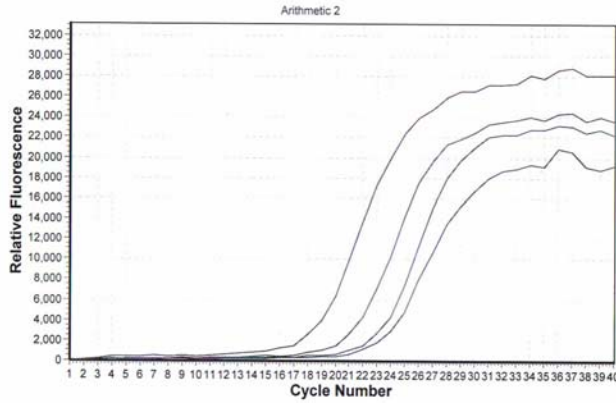
Deney döngüsü 95°C’de 10 dakikalık denatürasyonu takiben 95°C’de 30 saniye, 55°C’de 30 saniye, 72°C’de 1 dakika olarak ayarlanmıştır. SYBR ışması 83°C’de ölçülmüştür. Dimer oluşumu halinde kaynaklanacak ışma 83 derecede dimer sarmalları tamamen ayrıldığı için düşmekte ve dimer dolayısı ile oluşan yansıma kalmamaktadır. Bunun için okumalar 83°C’de yapılmıştır. Deneylerde amaç miktar tayini olmadığı için Pozitif kontrol sulandırılmaları kullanılmış olmasına karşın değerlendirmeye alınmamıştır. Ürün boyu ve primer dimerlerini ayırabilmek için erime noktası analizlerinden yararlanılmıştır. Reaksiyon bitiminde “melting curve” yani çift sarmal DNA ayrışma ısısı eğrisi analizleri yapılarak beklenen ürünlerin varlığı gözlemlenmiştir.

3.2.5.2. Sonuçların okunması

Sonuçlar crossing point (CP) denilen ışma seviyelerinin gerçek zamanlı PZR cihazı ile birlikte gelen program tarafından değerlendirilmesi esasına dayanmaktadır. Bu program her örneğin ışma değerinin artmaya başladığı döngüyü o örnek için CP değeri olarak belirlemektedir. CP değeri ne kadar küçükse, çoğalma o kadar erken başlamıştır. Yani gen miktarı fazladır.

Eğer amaç miktar tayini ise deneye içindeki gen miktarı bilinen pozitif kontrol miktarının katlı seyreltikleri eklenir ve bu örneklerden elde edilen değerler ile bir grafik çizilir (Şekil 3.1). Elde edilen standart eğri, bilinmeyen örneğin CP değerine karşılık o örneğe denk gelen gen miktarını gösterir.

Çalışmada, CP değerleri elde edilerek hesaplamalar yapılmış, deneyler boyunca deney etkinliğini ölçebilecek ek bir kantifikasyon belirteci olarak dış standartlar da reaksiyona sokulmuştur. Bu standartlar onlu dilasyonlar halinde PZR’den geçirilmiş olup elde edilen logaritmik veri kantifikasyonda kullanılmamıştır. Kantifikasyonda, CP değerleri tüm gen bölgeleri için informatif bulunmuş ve ikinci bir sonuç okuma sistemine gereksinim doğmamıştır (Şekil 3.1).



A.

B.

Şekil.3.1: Dış standartların (Beta-Globin) azalan 10 kat seyreltikleri ile elde edilen A. bağıl ışınma değerleri ve B. standart eğri

3.2.6. Sonuçların REST ile Değerlendirilmesi

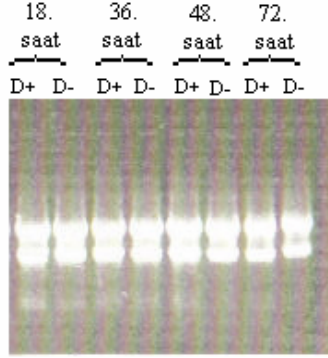
Amaç vitamin D ile indüklenmiş ve indüklenmemiş HL-60 hücreleri arasında genlerin anlatım düzeylerini belirlemek olduğu için, deneylerde elde edilen CP değerleri değişkenlik ve anlatım uyumlulukları açısından incelenmiştir.

Sonuçlar elde edilen CP değerleri üzerinden ücretsiz bir program olan REST (Relative Expression Software Tool) version 2 (2002) aracılığıyla değerlendirilmiştir (Pfaffl, 2001).

4. BULGULAR

4.1. RNA Konsantrasyonu ve Saflığı

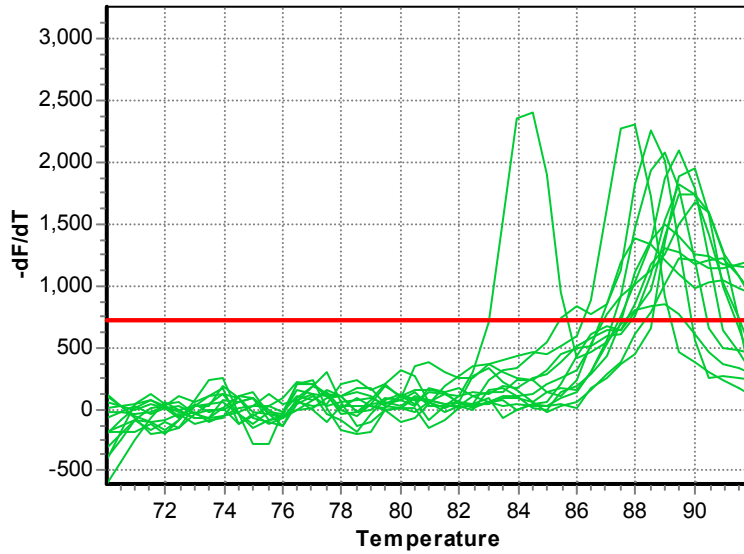
RNA örneklerinin konsantrasyonları spektrofotometrede ölçülmüş, $OD_{260/280}$ değeri 1,9-2,1 arasında bulunmuştur. Ayrıca RNA örnekleri %1 agaroz jel elektroforezde yürütülerek DNA kontaminasyonu açısından değerlendirilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Vitamin D ile indüklenmiş ve indüklenmemiş HL-60 hücrelerinden elde edilen RNA'ların %1 agaroz jel elektroforez görüntüsü.

4.2. Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR deneyi

Quantica cihazının programı ile CP değerleri “First Derivate Maximum” ayarında değerlendirilmiştir. Ayrışma ısıları uygun olan örneklerin CP değerleri esas alınmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: Çalışılan gen ürünlerinin ayrışma ısıları

4.3. Gerçek Zamanlı Kantitatif RT-PCR Sonuçları (18, 36, 48, 72. saatler)

18, 36, 48 ve 72. saatler olmak üzere dört farklı zamanda kültürden alınan vitamin D ile indüklenmiş ve indüklenmemiş HL 60 hücrelerinde TNFR1, Bcl-w, Bax, Bak, Kaspaz-6, Kaspaz-8, AIF, Survivin, Cdk1 (Cdc2), Cdk2, Cdk4, Siklin D1 ve Siklin E genlerinin gen anlatımlarına ilişkin sonuçlar, REST (Relative Expression Software Tool) version 2 (2002) aracılığıyla analiz edilmiştir. Bu analiz sonucunda gen anlatımlarına ilişkin elde edilen sonuçlar toplu olarak çizelge 4.1’de verilmiştir. Ayrıca 18, 36, 48 ve 72 saatlerde hücre döngüsü ilişkili genlerin anlatım seviyeleri şekil 4.4’de, 18, 36, 48 ve 72 saatlerde apoptotik genlerin anlatım seviyeleri şekil 4.5’de ve 18, 36, 48 ve 72 saatlerde tüm genlerin anlatım seviyeleri şekil 4.6’da verilmiştir.

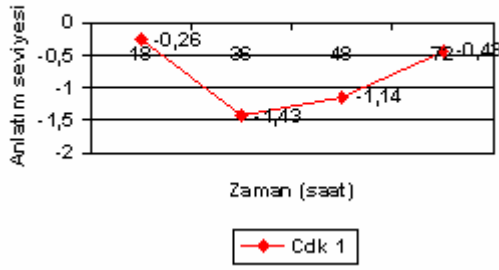
Çizelge.4.1: Gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR sonuçları (18, 36, 48, 72. saatler)

Genler	Gen anlatım analizi sonucu							
	18. saat		36. saat		48. saat		72. saat	
Cdk1	- 0,260	↓	- 1,430	↓	- 1,140	↓	- 0,430	↓
Cdk2	- 0,020	↓	- 0,3	↓	- 0,350	↓	- 0,750	↓
Cdk4	+ 0,190	↑	- 1,300	↓	- 0,9	↓	- 1,510	↓
Cyclin D1	+ 0,530	↑	- 0, 800	↓	- 0,870	↓	- 1,450	↓
Cyclin E	- 0,270	↓	- 0,950	↓	- 0,710	↓	- 1,940	↓
TNFR1	+ 0,020	↑	+ 0,060	↑	+ 0,170	↑	- 2,910	↓
Bcl-w	- 0,200	↓	- 0,700	↓	- 1,590	↓	- 0,440	↓
Bax	- 0,050	↓	- 0,280	↓	- 0,650	↓	- 0,850	↓
Bak	+ 0,040	↑	- 0,320	↓	- 1,000	↓	+ 2,620	↑
Caspase-6	- 0,370	↓	- 1,250	↓	- 1,350	↓	- 0,860	↓
Caspase-8	- 0,060	↓	- 0,710	↓	- 0,620	↓	+ 1,160	↑
AIF	- 0,030	↓	- 0,380	↓	- 1,020	↓	- 0,820	↓
Survivin	+ 0,480	↑	- 0,570	↓	- 1,230	↓	- 1,890	↓

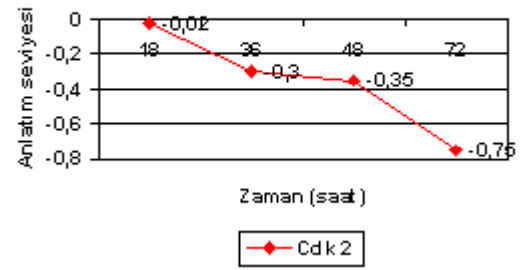
↑ : Up-regulation (Artmış gen anlatımı)

↓ : Down-regulation (Azalmış gen anlatımı)

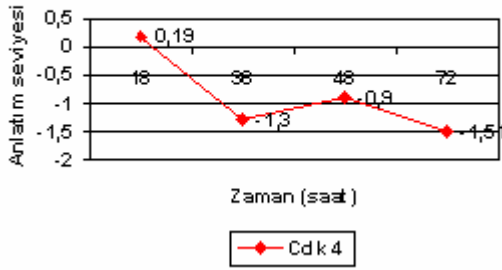
Cdk 1 (Cdk 2) gen anlatım seviyesi



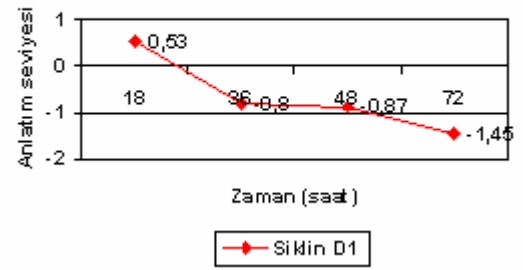
Cdk 2 gen anlatım seviyesi



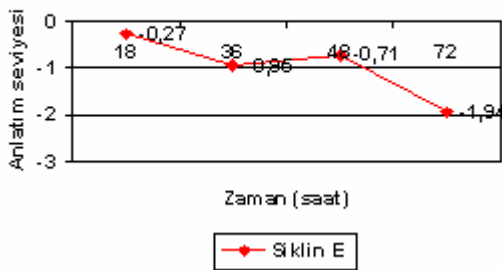
Cdk 4 gen anlatım seviyesi



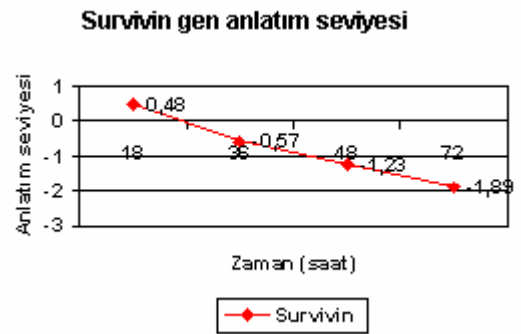
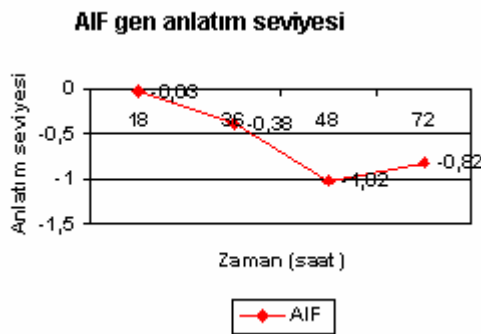
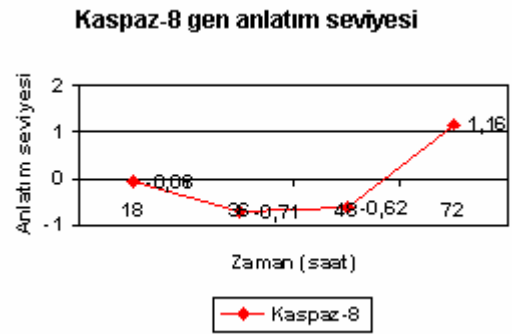
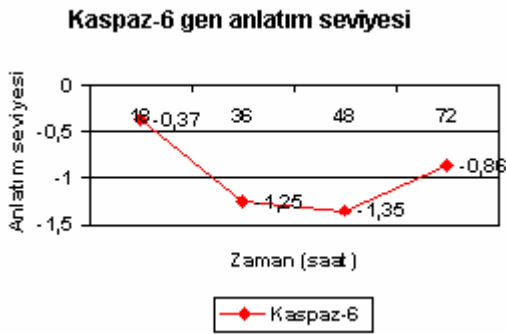
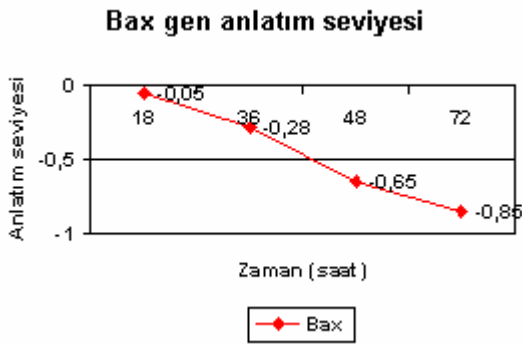
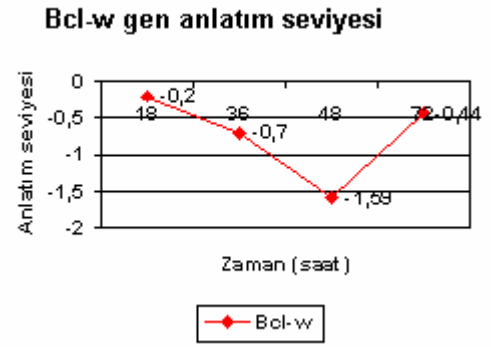
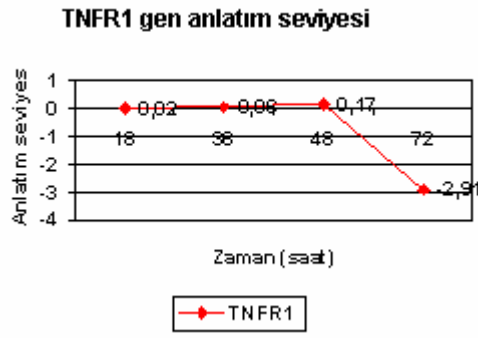
Siklin D1 gen anlatım seviyesi



Siklin E gen anlatım seviyesi

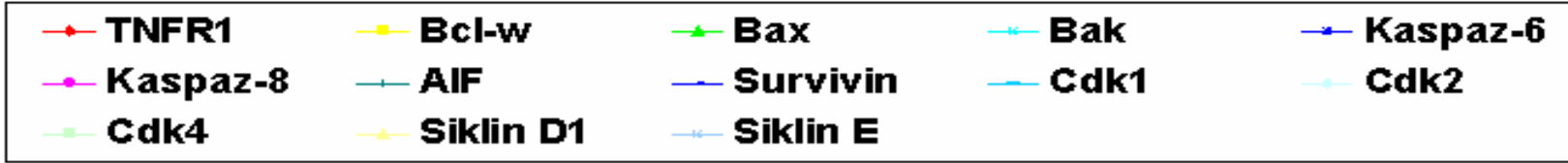
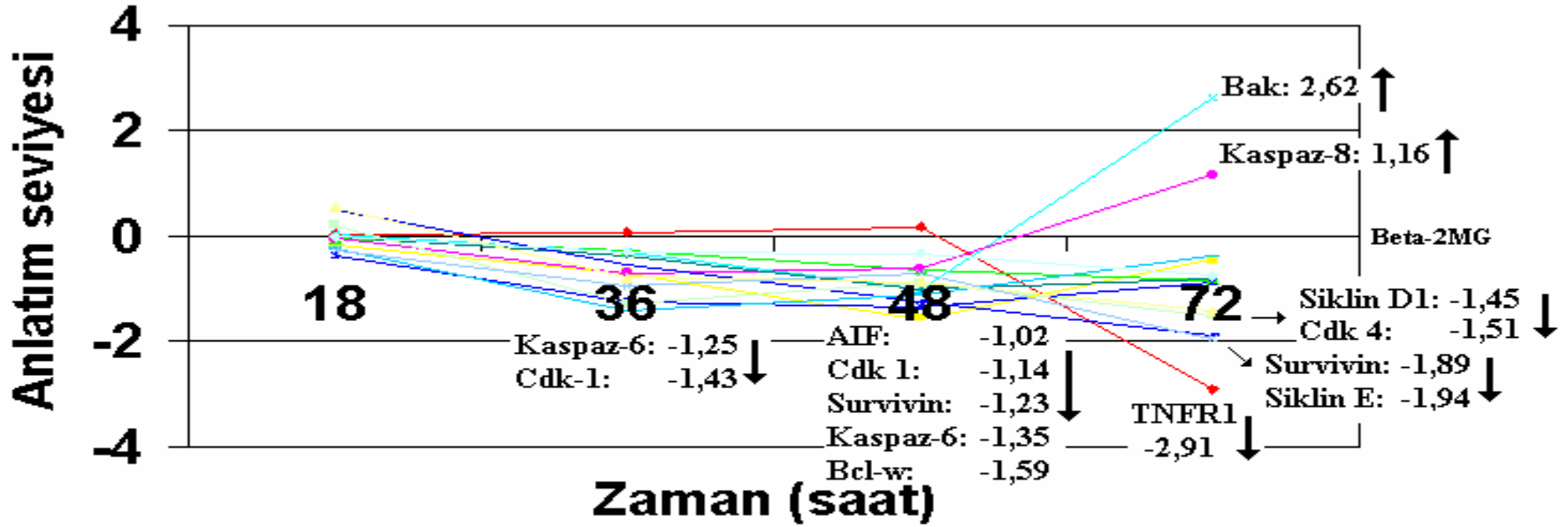


Şekil.4.3: 18, 36, 48 ve 72 saatlerde hücre döngüsü ilişkili genlerin anlatım seviyeleri



Şekil.4.4: 18, 36, 48 ve 72 saatlerde apoptotik genlerin anlatım seviyeleri

Genlerin Anlatım Seviyeleri



↑ : Artmış gen anlatımı
↓ : Azalmış gen anlatımı

Şekil.4.5: 18, 36, 48 ve 72 saatlerde tüm genlerin anlatım seviyeleri

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, bir AML M2 hücre hattı olan HL-60 hücrelerinde Cdk1 (Cdc2), Cdk2, Cdk4, Siklin D1, Siklin E, TNFR1, Bcl-w, Bax, Bak, AIF, Survivin, Kaspaz-6 ve Kaspaz-8 genlerinin anlatım düzeylerinin, Vitamin D işlenmesine karşı zaman içinde nasıl değiştiği araştırıldı.

Bu deneylere ait genlerin çoğu HL-60 hücre hattında, zaman bağımlı bir farklılaşma modelinde ilk kez çalışılmaktadır ve hücre döngüsünün farklılaşma yetisiyle ilgili temel bilgiler sağlamaktadır. Bununla birlikte, bu sonuçların lösemik blast hücrelere denk düşen bir hücre hattında elde edilmiş olduğu ve normal hücre döngüsünde elde edilen verilerle bire bir kıyaslanmasının yanlış olacağı akılda tutulmalıdır. Bu sonuçlar, bu genlerin gerek kanser hücrelerinin farklılaşması, gerek hücre döngüsündeki zamanlama ve gerek D vitaminiyle uygulanacak kanser terapisindeki olası genetik altyollar açısından bilgi sağlayabilecektir.

Vitamin D ile dört ayrı zaman noktasında yapılan inkübasyonlar sonunda, 72. saat sonunda TNFR1, Cdk-4, Siklin D1, Siklin E, Survivin genlerinin anlatımında azalma, kaspaz-8 ve Bak genlerinin anlatımında artma olduğu gözlenmiştir.

Deneylerimiz boyunca incelenen genlerin hiçbirinde dramatik düşüş ve yükselişler gözlenmemiştir. Elde edilen değerler, incelenen genlerin, vitamin D bağımlı etkiye yüksek düzeyde duyarlı olmadığını düşündürmektedir.

Genlere ait anlatım düzeylerindeki değişiklikler ilk olarak 18 ve 36. saatlerde ölçüldü. Bu süreç boyunca tüm genlerde zamana karşı izlenen düzenli anlatım azalması ve bu azalma trendinin 48. saate doğru duraklamaya girerek devam etmesi dikkat çekicidir. Bu tablo, lösemik hücrenin, beklenildiği gibi vitaminin etkisine maruz kaldığını ve tekrarlayan klonal gelişim sürecinin sonlanarak farklılaşma sürecinin başlayacağını göstermektedir. Bu dönem boyunca özellikle 36. saatte kaspaz-6 ve Cdk1, 48. saatte ise Bcl-w, Survivin ve Kaspaz-6 genlerinin anlatımındaki azalma daha belirgindir.

İlginç bir şekilde TNFR1 geni 48. saate dek vitamin D'nin etkisine karşı direnen ve anlatım düzeyini sabit bir şekilde koruyan bir tavır sergilemesine rağmen, 72. saat sonunda dramatik bir düşüşe geçerek deneyimiz sonundaki en düşük anlatım

düzeiy gösteren gen olarak dikkat çekmiştir. Bak geni de 72. saat sonunda en yüksek gen anlatımı göstererek dikkati çeken diğeri bir genidir.

Sonuçlarımızı hücre döngüsü ile ilişkili genlere yoğunlaşarak yorumlamak istersek Cdk1, Cdk2, Cdk4, siklin D1 ve siklin E genleri için şunlar söylenebilir.

Cdk1 geni, çalışmamızın erken evrelerinde göreceli olarak yüksek düzeydeyken (18. saatte -0,26), farklılaşmanın ilk dilimlerinde keskin bir düşüşe geçmiştir (36. saatte -1,43). 48. saate doğru bu düşüş eğilimini koruduğu (48. saatte -1,14) ve 72. saate doğru ise muhtemelen artmış diferansiyasyon kapasitesini yansıtarak 18. saatteki düzeylerine yaklaştığı izlenmiştir. (72. saatte -0,43). Harrison ve ark (1999) 1,25(OH)₂D₃ ile muamele görmüş HL-60 hücrelerinde 0 ve 96 saatte immunoblotting ile gen anlatım seviyelerine bakmışlar, 96. saatte Cdk1 gen anlatımının 10 kat azaldığını bulmuşlardır (Harrison et al. 1999). Bizim çalışmamızda 96. saat dilimi olmamakla birlikte Cdk1 gen anlatımının azalan bir eğilim göstermesi bu çalışmayla uyumluluk göstermektedir.

Bizim bulgularımıza göre, Cdk2 gen anlatımı 18. saatten (-0,020) itibaren 72. saate (-0,750) kadar azalan bir yön izlemektedir. Cdk4 ekspresyonu 18 saatte artmış gen anlatımı (+0,19) yönündeyken 36. saatten itibaren azalmış gen anlatımı gözlenmiştir. Özellikle 72. saatte daha belirgin bir azalmış gen anlatımı (-1,510) dikkati çekmiştir. Siklin D1 çok belirgin olmamakla birlikte 18. saatte (0,530) artmış gen anlatımı gösterirken, 36. ve 48. saatlerde azalma eğilimi göstererek 72. saatte (-1,45) bu azalma daha belirgin olarak görülmüştür. Aynı şekilde, siklin E gen anlatımı da 18. saatten (-0,270) itibaren 72. saate (-1,940) kadar azalma eğilimi göstermiştir. Seol ve ark. (2000), 3 gün süreyle EB1089 (1x10⁻⁸ M) ile HL-60 hücrelerini muamele etmişler ve 24. saatte Cdk2 ve Cdk6'nın down-regüle olduğunu, Cdk4'ün kademeli olarak arttığını, siklin D1'in zamana bağımlı olarak artış gösterirken, siklin E de bir değişiklik olmadığını bulmuşlardır (Seol et al. 2000). Bizim çalışmamızda da, Seol ve arkadaşlarının çalışmasıyla uyumlu olarak, Cdk2 gen anlatımının 18. saatten 72. saate doğru azalmakta olduğu gözlenmiştir. Cdk4, Siklin D1 ve siklin E genlerine ait gen anlatımı bulgularımız ise Seol ve arkadaşlarının bulgularıyla uyumlu değildir.

Horiguchi-Yamada ve ark (1994), 12-o-tetradecanoyl 13-acetate (TPA) ile HL 60 hücrelerini muamele etmişler ve çeşitli siklinler ve cdk2 gen değişikliklerini

incelemişlerdir. 12-36. saatler arasında Cdk2, siklin A ve siklin E gen anlatımının belirgin şekilde azaldığını, siklin D1 gen anlatımının ise arttığını bildirmişlerdir. (Horiguchi-Yamada et al, 1994). Bu çalışmada bizimkinden farklı bir farklılaştırma ajanı kullanılmış olmasına rağmen Cdk2 ve siklin E gen anlatımları sonucu bu çalışmayla uyumluluk göstermektedir.

Deneylerimiz sonucunda 18. saatten 72. saate doğru düzenli bir biçimde gen anlatımı azalması olduğu izlenen Siklin D1 geni düzeylerinin genel olarak kanser hücresinin farklılaşma sürecine denk düştüğünü düşünebiliriz ve zamana karşı doğrusal olarak oluşan bu hareketin düzenliliği bizim için dikkat çekici bir belirteçtir. Vurgulamak istediğimiz nokta, bu down regülasyonun 36 ve 48. saatler arasında bir duraklama fazı yaşadığıdır.

Siklin E düzeyleri 18-48. saatler arasında düşmekle birlikte 48. saatten sonra 72. saate kadar belirgin biçimde düşüş eğilimi göstermektedir. Bu durum Siklin E'nin AML hücresinin diferansiyasyonunun özellikle geç evresinde daha az düzeyde eksprese edildiğini düşündürmektedir.

Deney sonuçlarımızı apoptozis ile ilişkili genlere yoğunlaşarak yorumlamak istersek de TNFR1, Bcl-w, Bax, Bak, AIF, Survivin, Kaspaz-6 ve Kaspaz-8 genlerine ait şu şu sonuçlar ortaya çıkmaktadır.

Elde ettiğimiz gen anlatımlarının HL-60 hücre hattının farklılaşmasına ait verdiği bu hatta özgü (lineage-specific) özgün farklılaşma profili daha önce başka çalışmalarda da incelenmiştir. Razzouk ve Shapiro, insan kemik iliği stromal hücrelerini 28 gün süreyle Dexamethasone (DMSO) ile muamele ederek osteoblast fenotipin ekspresyonunu indüklemişlerdir. Daha sonra yüksek konsantrasyonlarda Ca^{2+} ve Pi ile hücreleri muamele ederek apoptozisi indüklemişler, 4 ve 8. saatlerde hücre döngüsü ve apoptozis ile ilişkili genlerin anlatım düzeylerine bakmışlardır. TNFR1 gen anlatımını 4. saatte 2,66 kat artmış, 8. saatte hafifçe düşerek 1,91 kat artmıştır. 4. saatteki bu artışın zaman ilerledikçe azalıyor olmasını, hücre siklusu ve hücre sinyal iletiminde gerekli genlerin, apoptozisin erken evrelerinde eksprese olduğu şeklinde yorumlamışlardır (Razzouk and Shapiro, 2003). Bizim çalışmamızda kullandığımız lösemik hücre hattında ise erken dönem 18. saatte ve hatta 36 ve 48. saatlerde TNFR1 gen anlatımı seviyesi normal düzeydeyken, ancak 72. saatte -2.91 kat anlatım azalması oluşmuştur. Gerek hücre hattı gerek diferansiyasyon ajanı ve

gerek zaman şeması farklı olmakla birlikte “zamana karşı anlatım azalması” çalışmamızla ortaklaşan bir bulgudur

Çalışmamızda 18-48. saatler arasından belirgin olmamakla birlikte artma eğiliminde olup 72. saatte ise belirgin düşüş vardı, bu da bize TNFR1 gen anlatımının apoptotik sürecin erken evrelerinde eksprese olduğunu düşündürmektedir.

Santos-Beneit ve Mollinedo (2000), HL-60 hücrelerini 4 gün süreyle DMSO ile muamele etmişler ve bcl-w, bak genlerinde basamaklı bir artış, Bcl-2 de ise azalma oluştuğunu göstermişlerdir (Santos-Beneit ve Mollinedo, 2000). Bizim bulgularımıza göre Bcl-w gen anlatımı, 18, 36 ve 48. saatlerde azalma yönünde olmakla birlikte, özellikle 48. saatte belirgin bir gen anlatımı azalışı (-1,59) görülmekte ve daha sonra 48-72. saatler arasında bu anlatım yukarı doğru yön değiştirerek -0,440 düzeyine çıkmaktadır. Bak geninin 72. saat civarında (2,620) anlatımı en belirgin genimiz olarak ön plana çıkması ve yukarıda anılan yayındaki sonuçla gösterdiği uyumluluk dikkat çekicidir. Santos ve arkadaşları bu apoptotik gen düzey artışlarını HL-60 hücrelerinde nötrofil apoptozisine giden bir kanıt olarak algılamaktadırlar. Bizim deneylerimiz ise, apoptozisi net bir olgunlukta oluşmuş olarak gösterecek zaman dilimine geçmemekle birlikte farklılaşmanın tamamlanıp apoptozisin başlamasıyla ilgili bir süreci incelemektedir.

Diaz ve arkadaşları (2000) kolon kanseri hücre hatlarını 1alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ ve vitamin D analogu EB1089 ile 2, 4 ve 7 gün süreyle muamele etmişler. Bu uzun inkübasyon süreçlerinin sonucunda Bcl-2 anlatım düzeyinin düştüğünü, Bak anlatım düzeyinin arttığını bulmuşlardır. (Diaz et al. 2000). Bu yayındaki Bak gen anlatımındaki artış bizim bulgularımıza uyumluluk göstermektedir. Bulgularımıza göre Bak gen anlatımı 36 ve 48. saatlerde azalma yönünde bir hareket izenirken, 72 saatte belirgin bir artış (+2,62) göstermiştir. Bak geninin 72. saatte anlatımı en belirgin gen olarak ön plana çıkmasına ve kullanılan hücre hattının farklı olmasına rağmen bu yayındaki sonuçla gösterdiği uyumluluk dikkat çekicidir.

Razzouk ve Shapiro, osteoblast hücrelerinde yaptıkları çalışmada, Bax'ın gen anlatımında 4. saatte 1,4 ve 8. saatte önemli ölçüde artarak, 2,99 kat artış olduğunu göstermişlerdir (Razzouk and Shapiro, 2003). Bizim çalışmamızda ise, 18, 36, 48 ve

72. saatlerde Bax'da belirgin bir değişiklik olmamakla birlikte, giderek azalan bir gen anlatımı görülmektedir. Farklı bir hücrede ve apoptozisi indükleyen farklı bir ajanı kullanmış olmaları, bulgularımızın Razzouk ve Shapiro'nun bulgularından farklı olmasının sebebi olabilir.

Savlı ve arkadaşları, ATRA ile tedavi edilmiş APL t(15,17) hastalarında apoptozisle ilişkili genlerin real time PCR analizini yapmışlar, Bcl2'ye göre bax'ın oranındaki artışla apoptozis ilişkisini göstermişlerdir (Savlı et al. 2003). Bizim çalışmamızda 18, 36, 48 ve 72. saatlerde Bax'da belirgin bir değişiklik olmamakla birlikte, giderek azalan bir gen anlatımı görülmektedir. Gerek farklı bir farklılaştırma ajanının kullanılmış olması, gerekse hasta örneklerinde bakılmış olması, bulgularımızın Savlı ve arkadaşlarının bulgularından farklı olmasının nedeni olabilir.

Kumagai ve arkadaşları çeşitli ajanlarla myeloid lösemi hücreleri (HL-60, NB-4 ve U937), myeloma hücreleri (NCI-H929, RPMI8228 ve ARH-77), prostat (LNCaP, PC-3 ve DU145), meme (MCF-7 ve MDA-MB-231) ve kolon (HT-29) kanser hücre hatlarını inkübe etmişler. Nonkalsemik vitamin D analogu (19-nor-1,25(OH)₂D₂; paricalcitol) ile NB-4 APL hücreleri ve HL-60 AML hücrelerini muamele etmişler ve HL-60 hücrelerinde Bcl-2 ve Bcl-xL antiapoptotiklerde anlatım düzeyini düşürdüğünü, Bax anlatım düzeyinde belirgin bir değişiklik yapmadığını bulmuşlardır. Bu ajanın AML'de büyümeyi düşürdüğü, diferansiyasyon ve apoptozisi indüklediği sonucuna varmışlardır (Kumagai et al. 2005). Bizim çalışmamızda Bax'da belirgin bir değişiklik olmamakla birlikte, giderek azalan bir gen anlatımının görülmesi Kumagai ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmanın sonuçlarıyla desteklenmektedir.

Antiapoptotik bir gen olan Bcl-w'nin gen anlatımının genelde azalan bir çizgi izlemesi, pro-apoptotik bir gen olan Bak'ın gen anlatımında artış eğilimi apoptotik sürecin 72. saat civarında başladığını düşündürmektedir. Proapoptotik bir gen olan Bax'da önemli bir değişiklik olmayıp yine proapoptotik bir gen olan Bak'ın anlatımında 72. saatte bir artış olması, yeni başlayan ilgili apoptotik sürecin Bak genini yakından etkilediğini düşündürmektedir.

AIF, proapoptotik bir fonksiyona sahiptir. Kaspaz-bağımsız yolla kromatin kondensasyonu ve DNA fragmentasyonu gibi apoptotik özelliklerin oluşmasına neden olur (Susin et al. 1996; Susin et al. 1999). Bizim çalışmamızda AIF gen

anlatımı 18, 36, 48 ve 72. saatlerde azalma eğiliminde olmakla birlikte en belirgin olarak 48. saatten (-1,020) itibaren azalmış gen anlatımı görülmüştür. 72. saatte gen anlatımı artma yönünde olmakla birlikte azalmış bir gen anlatımı devam etmektedir. Kaspaz-bağımsız bir yol izleyen AIF gen anlatımında 72. saate doğru azalmanın olması, bu genin HL 60 hücrelerinde apoptik süreçte yer almadığının bir göstergesi olabilir.

Wang ve ark. (2003), HL-60/ADR hücrelerinde 12 ve 48. saatlerde survivin gen anlatımına bakmışlar ve zamana bağımlı olarak survivin gen anlatımında azalma bulmuşlardır. Özellikle 48. saatte bu gen anlatımın %67 oranında azaldığını tespit etmişlerdir (Wang et al. 2003). Bizim çalışmamızda survivin gen anlatımı 18. saatte artma eğiliminde iken (0,48), 36. saatten itibaren azalmaya başlamış ve özellikle 48 ve 72. saatte (sırasıyla -1,230 ve -1,890) belirgin düzeyde azalmıştır. Bulgularımız Wang ve ark. nin bulgularıyla tutarlılık göstermektedir. Survivin, IAP (Inhibitor of Apoptosis Protein) ailesinin bir üyesidir ve antiapoptotik bir gendir. Bu açıdan survivin gen anlatımında azalmanın olması apoptotik süreçle ilişkisinin HL-60 hücrelerinde 48-72. saatlerde olduğunu düşündürmektedir.

Carter ve ark. (2001), yaptıkları bir çalışmada ATRA ile muamele edilmiş HL 60 hücrelerinde survivin gen anlatımında, ATRA ile muamele edilmemiş hücelere göre, 48. saatte belirgin bir etki yokken, 72. saatte %67, 96. saatte ise %96 oranında azalma bulmuşlardır (Carter et al. 2001). Çalışmamızda 96 saat çalışılmamış olunmasına karşın, özellikle 48 ve 72. saatte belirgin düzeyde gen anlatımlarının azalması, Carter ve ekibinin bulgularıyla da uyumluluk göstermektedir.

Kaspaz-8 initiator (başlatıcı) kaspazlardandır ve erken apoptotik sinyal iletiminden sorumludur. Kaspaz-6 ise efektör kaspazlardandır ve apoptozisin execution (uygulama) fazından sorumludur. Kaspaz-8, TNFR reseptör ailesinden olan Fas'ın indüksiyonu ile aktive olmakta diğer kaspazları da aktive ederek apoptozisin gerçekleşmesini sağlamaktadır. Kaspaz-8, aynı zamanda TNFR1 ile de aktive olmaktadır (Wolf and Green, 1999). Zhuang ve Simon (2000), HL 60 hücrelerinde peroksinitrit (ONOO⁻) ile apoptozisi indüklemişler ve çeşitli kaspazların aktivitelerini incelemişlerdir. Çalışmaları sonucunda özellikle initiator kaspazlardan Kaspaz-8 ve Kaspaz-9'un aktivitelerini tespit etmişlerdir (Zhuang and Simon, 2000). Bizim bulgularımıza göre Kaspaz-6 gen anlatımı 18. saatten itibaren azalma

eğiliminde bulunmuştur. Kaspaz-8 gen anlatımı ise 18, 36 ve 48. saatlerde azalma eğilimindeyken, 72. saatte 1,16 kat artmış gen anlatımı bulundu. Kaspaz-8'in anlatımında 72. saatte bir artışın görülmesi, apoptotik sinyal iletiminin başlamış olduğunu, ancak kaspaz-6'da anlamlı bir değişikliğin olmaması kaspaz kaskadın henüz başladığını düşündürmektedir.

Song ve ark. (2003), 827 geni içeren bir çalışmada 0, 6, 12, 24, 36, 48 ve 72. saatlerde HL-60 hücre monositik ve granülositik hücre hattına ait gen anlatım profillerini $1,25(OH)_2D_3$ ile diferansiyasyonun stimülasyonunu takiben elde etmişler, 72. saatte 45 genin ekspresyon seviyesinde belirgin değişiklik tanımlamışlardır (Song et al, 2003.) Bu genlerin hiçbiri bizim çalışmamızda incelediğimiz genlerle aynı değildir ve gerek farklılaşmaya gerek apoptoza ait daha pek çok genin bu modellerde saptanması muhtemeldir.

Özellikle apoptotik süreci inceleyecek olan yeni çalışmaların 72. saat ve daha ileri zaman dilimlerini kapsaması deneylerimizden çıkardığımız bir başka sonuçtur.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Deneylelerimiz boyunca incelenen genlerin hiçbirinde dramatik düşüş ve yükselişler gözlenmemiştir. Elde edilen değerler, incelenen genlerin, vitamin D bağımlı etkiye yüksek düzeyde duyarlı olmadığını düşündürmektedir.

AML M2 hücre hattı olan HL-60 hücrelerinin 18, 36, 48 ve 72 saat olmak üzere dört ayrı zaman noktasında Vitamin D ile işlenmesine karşı seçtiğimiz genlerin anlatım düzeyleri hakkındaki bulgularımızın sonucu, 72. saat sonunda TNFR1, Cdk4, Siklin D1, Siklin E, Survivin genlerinin anlatımında azalma, kaspaz-8 ve Bak genlerinin anlatımında artma olduğu gözlenmiştir.

Cdk1, Cdk2, Cdk4, Siklin D1 ve Siklin E gen anlatımlarında 18. saatten 72. saate doğru azalma eğiliminin olması bize hücrelerin proliferasyon sürecinden çıkıp farklılaşma sürecine girdiğini düşündürmektedir. TNFR1 gen anlatımının 18-48. saatler arasından belirgin olmamakla birlikte artma eğiliminde olup, 72. saatte belirgin bir düşüş göstermesi, TNFR1 gen anlatımının apoptotik sürecin erken evrelerinde eksprese olduğu kanısını güçlendirmiştir. Antiapoptotik bir gen olan Bcl-2'nin gen anlatımının genelde azalan bir çizgi izlemesi, pro-apoptotik bir gen olan Bak'ın gen anlatımında artış eğilimi apoptotik sürecin 72 saat civarında başladığı izlenimi yaratmıştır. Antiapoptotik bir gen olan survivin gen anlatımında azalmanın olması, apoptotik süreçle ilişkisinin HL-60 hücrelerinde 48-72 saatlerde olduğunu düşündürmektedir. Kaspaz-8'in anlatımında, 72. saatte bir artışın görülmesi, apoptotik sinyal iletiminin başlamış olduğunu, ancak kaspaz-6'da anlamlı bir değişikliğin olmaması kaspaz kaskadının henüz başladığını akla getirmektedir. Kaspaz-bağımsız bir yol izleyen AIF gen anlatımında 72. saate doğru azalmanın olması da, bu genin HL-60 hücrelerinde apoptik süreçte yer almadığının bir göstergesi olabilir.

Bu tablo, bize, lösemik hücrenin, beklenildiği gibi ilacın etkisine maruz kaldığını ve tekrarlayan klonal gelişim sürecinin sonlanarak farklılaşmanın tamamlanıp, apoptotik sürecin başladığını düşündürmektedir. Bununla birlikte, bu sonuçların lösemik blast hücrelere denk düşen bir hücre hattında elde edilmiş olduğu ve normal hücre siklusunda elde edilen verilerle bire bir kıyaslanmasının yanlış olacağı akılda tutulmalıdır. Bu sonuçlar bu genlerin gerek kanser hücrelerinin

farklılaşması, gerek hücre siklusundaki zamanlama ve gerek D vitaminiyle uygulanacak kanser terapisindeki olası genetik altyollar açısından bilgi sağlayabilir.

Sonuç olarak, seçilen bu genlere ilaveten hücre döngüsü ve apoptozis ile ilişkili daha fazla sayıda genlerin, daha erken ve daha ileri zamanlarda kültürlerde incelenmesi ve hatta hasta örneklerinde kültür ortamında bu çalışmaların yapılması, lösemnin tedavisinde yeni yaklaşımların geliştirilmesi için aydınlatıcı olacaktır.

KAYNAKLAR

- Abe, E., Miyaura, C., Sakagami, H., Takeda, M., Konno, K., Yamazaki, T., Yoshiki, S., Suda, T., (1981). Differentiation of mouse myeloid leukemia cells induced by 1,25-dihydroxyvitamin D₃, *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 4990-4994
- Adida, C., Berrebi, D., Peuchmaur, M., Reyes-Mugica, M., Altieri, D.C., (1998). Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet.* 351:882-883.
- Adida, C., Recher, C., Raffoux, E., Daniel, M.T., Taksin, A.L., Rouselot, P., Sigaux, F., Degos, L., Altieri, D.C., Dombret, H., (2000). Expression and prognostic significance of survivin in de novo acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.*111:196-203.
- Akiyama, N., Sasaki, H., Katoh, O., Sato, T., Hirai, H., Yazaki, Y., Sugimura, T., Terada, M., (1993). Increment of the Cyclin D1 mRNA Level in TPA-Treated Three Human Myeloid Leukemia Cell Lines: HEL, CMK, and HL-60 Cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 195:1041-1049.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., (2002). The Cell Cycle and Programmed Cell Death. In: *Molecular Biology of the Cell.* 4th ed. New York: Garland Science, Taylor and Francis Group. p.: 983-1025
- Altieri, D.C., Marchisio, P.C., Marchisio, C., (1999). Survivin apoptosis: an interloper between cell death and cell proliferation in cancer. *Lab Invest.* 79:1327-1333.
- Ambrosini, G., Adida, C., Altieri, D.C., (1997). A novel antiapoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med.* 3:917-921.
- Amir H, Karas, M., Giat, J., Danilenko, M., Levy R., Yermiahu, T., Levy, J., Sharoni, Y., (1999). Lycopene and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ cooperate in the inhibition of cell cycle progression and induction of differentiation in HL-60 leukemic cells. *Nutr Cancer.* 33:105-112.
- Arguello, F., Alexander, M., Sterry, J.A., Tudor, G., Smith, E.M., Kalavar, N.T., Grene, J.F. Jr., Koss, W., Morgan, C.D., Stinson, S.F., Siford, T.J., Alvord, W.G., Klanasky, R.L., Sausville, E.A., (1998). Flavopiridol induces apoptosis of normal lymphoid cells, causes immunosuppression, and has potent antitumor activity In vivo against human leukemia and lymphoma xenografts. *Blood.* 91:2482-2490
- Bar-Shavit, Z., Teitelbaum, S.L., Reitsma, P., Hall, A., Pegg, L.E., Trial, J., Kahn, A.J., (1983). Induction of monocytic differentiation and bone resorption by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80:5907-5911.
- Behnia, M., Robertson, K.A., Martin, W.J., (2000). Lung infections: Role of apoptosis in host defense and patogenesis of disease. *Chest* 117:1771-1777
- Behringer, D., Schaufler, J., Kresin, V., Lubbert, M., Lindemann, A. (2001). Differentiation associated modulation of the cytokine and chemokine expression pattern in human myeloid cell lines. *Leuk Res.* 25:141-149

- Burger, C., Wick, M., Muller, R., (1994). Lineage-specific regulation of cell cycle gene expression in differentiating myeloid cells. *J Cell Sci.* 107:2047-2054.
- Byrd, J.C., Shinn, C., Waselenko, J.K., Fuchs, E.J., Lehman, T.A., Nguyen, P.L., Flinn, I.W., Diehl, L.F., Sausville, E., Grever, M.R., (1998). Flavopiridol induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells via activation of caspase-3 without evidence of bcl-2 modulation or dependence on functional p53. *Blood.* 92:3804-3816.
- Carter, B.Z., Milella, M., Altieri, D.C., Andreeff, M., (2001). Cytokine-regulated expression of *survivin* in myeloid leukemia. *Blood.* 97:2784-2790.
- Cohen, G.M. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 326:1-16
- Cooper, G.M., (1997). Chapter 14: The Cell Cycle. In: *The cell. A Molecular Approach.* Washington: ASM Pres, p.:561-592.
- Collins, S.J., (1987). The HL-60 promyelocytic leukemia cell line; proliferation, and cellular oncogene expression. *Blood* 70:1233-1244
- Collins, S.J., Bodner, A., Ting, R., Gallo, R.C., (1980). Induction of morphological and functional differentiation of human promyelocytic leukemia cells (HL-60) by compounds which induce differentiation of murine leukemia cells. *Int J Cancer.* 25:213-218.
- Colston, K.W., Mackay, A.G., James, S.Y., Binderup, L., Chander, S., Coombes, R.C., (1992) EB1089: a new vitamin D analogue which inhibits the growth of breast cancer cells in vivo and in vitro. *Biochem. Pharmacol.* 42:1569-1575
- Corder, E.H., Guess, H.A., Hulka, B.S., Friedman, G.D., Sadler, M., Vollmer, R.T., Lobaugh, B., Drezner, M.K., Vogelstein, J.H., Orentreich, N., (1993). Vitamin D and prostate cancer: a prediagnostic study with stored sera. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2:467-472.
- Dai, M.S., Mantel, C.R., Xia, Z.B., Broxmeyer, H.E., Lu, L., (2000). An expansion phase precedes terminal erythroid differentiation of hematopoietic progenitor cells from cord blood in vitro and is associated with up-regulation of cyclin E and cyclin-dependent kinase. *Blood.* 96:3985-3987.
- Della Ragione, F., Borriello, A., Mastropietro, S., Della Pietra, V., Mono, F., Gabutti, V., Locatelli F., Bonsi, L., Bagnara, G.P., Iolascon, A., (1997). Expression of G1-phase cell cycle genes during hematopoietic lineage. *Biochem Biophys Res Commun.* 231(1):73-76.
- Deveraux, Q.L., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Reed, J.C., (1999). Endogenous inhibitors of caspases. *J Clin Immunol.* 19:388-98. Review.
- Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., Reed, J.C., (1997). X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature.* 388:300-304.
- Deveraux, Q.L., Roy, N., Stennicke, H.R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Salvasen, G.S., Reed, G.S., (1998). IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome *c* by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J.* 17:2215-2223.

- Diaz, G.D., Paraskeva, C., Thomas, M.G., Binderup, L., Hague, A., (2000) Apoptosis is induced by the active metabolite of vitamin D3 and its analogue EB1089 in colorectal adenoma and carcinoma cells: possible implications for prevention and therapy. *Cancer Res.*60:2304-2312.
- Djulgovic, B., Christmas, S.E., Evans, G., Moore, M., (1986). Studies of the effect of 1,25-dihydroxycholecalciferol on the proliferation and differentiation of the human promyelocytic leukaemia cell line HL-60. *Biomed Pharmacother.* 40:407-416.
- Dore, B.T., Uskovic, M.R., Momparler, R.L., (1994). Increased sensitivity to a vitamin D3 analog in HL-60 myeloid leukemic cells resistant to all-trans retinoic acid. *Leukemia* 8:2179-2182.
- Drexler, H.G., Minowada, J., (1998). History and classification of human leukemia-lymphoma cell lines. *Leuk Lymphoma.* 31:305-316. Review.
- Duckett, C.S., Nava, V.E., Gedrich, R.W., Clem, R.J., Van Dongen, J.L., Gilfillan, M.C., Shiels, H., Hardwick, J.M., Thompson, C.B., (1996). A conserved family of cellular genes related to the baculovirus IAP gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J.* 15:2685-2694.
- Eisman, J.A., Suva, L.J., Sher, E., Pearce, P.J., Funder, J.W., Martin, T.J., (1981). Frequency of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in human breast cancer. *Cancer Res.* 41:5121-5124.
- Eisman, J.A., Frampton RJ, Omond SA, Eisman JA (1983). Inhibition of human cancer cell growth by 1,25-dihydroxyvitamin D3 metabolites. *Cancer Res* 43:4443-4447.
- Elstner, E., Lee, Y.Y., Hashiya, M., Pakkala, S., Binderup, L., Norman, A.W., Okamura, W.H., Koeffler, H.P., (1994). 1 alpha,25-Dihydroxy-20-epi-vitamin D3: an extraordinarily potent inhibitor of leukemic cell growth in vitro. *Blood.* 15;84(6):1960-1967.
- Elstner, E., Linker-Israeli, M., Said, J., Umiel, T., de Vos, S., Shintaku, I.P., Heber, D., Binderup, L., Uskokovic, M., Koeffler, H.P., (1995). 20-epi-vitamin D3 analogues: a novel class of potent inhibitors of proliferation and inducers of differentiation of human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 55:2822-2830.
- Evans, R.M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240:889-895
- Fink, J.R., LeBien, T.W. (2001). Novel expression of cyclin-dependent kinase inhibitors in human B-cell precursors. *Experimental Hematology.* 29:490-498
- Frampton, R.J., Omond, S.A., Eisman, J.A., (1983). Inhibition of human cancer cell growth by 1,25-dihydroxyvitamin D3 metabolites. *Cancer Res.* 43(9):4443-4447
- Fraser, A.G., James, C., Evan, G.I., Hengartner, M.O., (1999). *Caenorhabditis elegans* inhibitor of apoptosis protein (IAP) homologue BIR-1 plays a conserved role in cytokinesis. *Curr Biol.* 9:292-301
- Freeman, W.M.; Walker, S.J.; Vrana, K.E. (1999). Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques.*26(1):112-122, 124-125

- Furukawa, Y., Iwase, S., Terui, Y., Kikuuchi, J., Sakai, T., Nakamura, M., Kitagawa, S., Kitagawa, M., (1996). Transcriptional activation of the *cdc2* gene is associated with Fas-induced apoptosis of Human Hematopoietic Cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 271:28469-28477.
- Furukawa, Y., (1997). Cell cycle control during hematopoietic cell differentiation. *Hum Cell* 10:159-164.
- Furukawa, Y., (1998). Cell cycle regulation of hematopoietic stem cells. *Hum Cell*. 11(2):81-92. Review.
- Furukawa, Y., (2002). Cell cycle control genes and hematopoietic cell differentiation. *Leuk Lymphoma*. 43(2):225-231.
- Gao, C.Y., Zelenka, P.S., (1997). Cyclins, cyclin-dependent kinases and differentiation. *Bioessays*. 19(4):307-15. Review.
- Garland, C., Shekelle, R.B., Barrett-Connor, E., Criqui, M.H., Rossof, A.H., Paul, O., (1985). Dietary vitamin D and calcium and risk of colorectal cancer: a 19-year prospective study in men. *Lancet*. 1:307-309.
- Gil-Gomez, G., Berns, A., Brady, H.J., (1998). A link between cell cycle and cell death: Bax and Bcl-2 modulate Cdk2 activation during thymocyte apoptosis. *EMBO J*. 17:7209-7218.
- Grassi, F., Piacentini, A., Cristino, S., Toneguzzi, S., Facchini, A., Lisignoli, G., (2004). Inhibition of CD95 apoptotic signalling by interferon- γ in human osteoarthritic chondrocytes associated with increased expression of FLICE inhibitory protein. *Arthritis Rheum*. 50:498-506.
- Grossman, D., Kim, P.J., Schechner, J.S., Altieri, D.C., (2001). Inhibition of melanoma tumor growth in vivo by survivin targeting. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:635-640.
- Gruss, H.J., Dower, S.K., (1995). Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood*. 85:3378-404. Review.
- Gupta, P.K. 'Key regulators of the cell cycle': 2001 Nobel Prize for Physiology or Medicine. *Current Science* 81(10): 1280-1287.
- Hakem, A., Sasaki, T., Kozieradzki, I., Penninger, J.M., (1999). The cyclin-dependent kinase Cdk2 regulates thymocyte apoptosis. *J Exp Med*. 189(6):957-68.
- Hansen, C.M., Binderup, L., Hamberg, K.J., Carlberg, C., (2001). Vitamin D and cancer: effects of 1,25(OH)₂D₃ and its analogs on growth control and tumorigenesis. *Frontiers in Bioscience* 6:D820–D848.
- Harrison, L.E., Wang, Q.M., Studzinski, G.P., (1999). 1,25-dihydroxyvitamin D(3)-induced retardation of the G(2)/M traverse is associated with decreased levels of p34(*cdc2*) in HL60 cells. *J Cell Biochem* 75:226-234
- Higuchi, R.; Dollinger, G.; Walsh, P.S.; Griffith, R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)*. 10(4):413-417

Higuchi, R.; Fockler, C.; Dollinger, G.; Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (NY)*. 11(9):1026-1030

Holcik, M., Korneluk, R.G., (2001). XIAP, the guardian angel. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:550-556.

Holtz J and Darmer D. (2000). Death receptors and their ligands. In: Apoptosis in Cardiac Biology 1st ed. Eds: H. Schunkert, GAJ Riegger. U.S.A. Kluwer Academic Publishers. p: 5-28

Horiguchi-Yamada, J., Yamada, H., Nakada, S., Ochi, K., Nemoto, T., (1994). Changes of G1 cyclins, cdk2, and cyclin A during the differentiation of HL60 cells induced by TPA. *Mol Cell Biochem*. 132:31-37.

http://anatomy.iupui.edu/courses/histo_D502/D502f03/f03_lectures/Cell.f03/Cell.html

<http://www.iontek.com.tr/?id=11>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=116940> (Cdk1)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=116953> (Cdk2)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=123829> (Cdk4)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=123837> (Siklin E)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=168461> (Siklin D1)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=191190> (TNFR1)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=300169> (AIF)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=600040> (Bax)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=600516> (Bak)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=601532> (Kaspaz-6)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=601763> (Kaspaz-8)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=603352> (Survivin)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=631931> (Bcl-w)

[http://www.vhsd.org/docs/apoptosis-AT-o4B\(2\).ppt#15](http://www.vhsd.org/docs/apoptosis-AT-o4B(2).ppt#15)

[http://www.vhsd.org/docs/apoptosis-AT-o4B\(2\).ppt#21](http://www.vhsd.org/docs/apoptosis-AT-o4B(2).ppt#21)

Jahn, L., Bar, H., (2000). Cell Cycle regulation and Apoptotic Cell Death. In: Apoptosis in Cardiac Biology 1st ed. Eds: H. Schunkert, GAJ Riegger. U.S.A. Kluwer Academic Publishers. p.:101-108.

- James, S.Y., Williams M.A., Newland, A.C., Colston, K.W., (1999). Leukemia cell differentiation: cellular and molecular interactions of retinoids and vitamin D. *Gen Pharmacol.* 32:143-154.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 26: 239-57.
- Kidd, V.J., Lahti, J.M., Teitz, T. (2000). Proteolytic regulation of apoptosis. *Semin Cell Dev Biol.* 11(3):191-201.
- Kizaki, M., Norman, A.W., Bishop, J.E., Lin, C.W., Karmakar, A., Koeffler, H.P., (1991) 1,25-Dihydroxyvitamin D3 receptor RNA: expression in hematopoietic cells. *Blood.* 15;77(6):1238-1247.
- Koeffler, H.P., Golde, D.W., (1980). Human Myeloid Leukemia Cell lines: a review. *Blood* 56, 344-350
- Koeffler, H.P., Hirji, K., Itri, L., (1985). 1,25-Dihydroxyvitamin D3: in vivo and in vitro effects on human preleukemic and leukemic cells. *Cancer Treat Rep.* 69:1399-1407.
- Kumagai, T., Shih, L.Y., Hughes, S.V., Desmond, J.C., O'Kelly, J., Hewison, M., Koeffler, H.P., (2005). 19-Nor-1,25(OH)2D2 (a novel, noncalcemic vitamin D analogue), combined with arsenic trioxide, has potent antitumor activity against myeloid leukemia. *Cancer Res.* 65:2488-2497.
- Lee, L.G.; Connell, C.R.; Bloch, W. (1993). Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 21(16):3761-3766.
- Li, F., Ambrosini, G., Chu, E.Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P.C., Altieri, D.C., (1998). Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature.* 396:580-584.
- Li, F., Ackermann, E.J., Bennett, C.F., Rothermel, A.L., Plescia, J., Tognin, S., Villa, A., Marchisio, P.C., Altieri, D.C., (1999). Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function. *Nat Cell Biol.* 1:461-466.
- Li, F., Flanary, P.L., Altieri, D.C., Dohlman, H.G., (2000). Cell division regulation by BIR1, a member of the inhibitor of apoptosis family in yeast. *J Biol Chem.* 275:6707-6711.
- Lips, P., (2006). Vitamin D physiology. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 92: 4-8
- Liston, P., Roy, N., Tamai, K., Lefebvre, C., Baird, S., Cherton-Horvat, G., Farahani, R., McLean, M., Ikeda, J.E., MacKenzie, A., Korneluk, R.G., (1996). Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature.* 379:349-353.
- Liu, M., Iavarone, A., Freedman, L.P., (1996). Transcriptional activation of the human p21(WAF1/CIP1) gene by retinoic acid receptor. Correlation with retinoid induction of U937 cell differentiation. *J Biol Chem.* 271:31723-31728.
- Liu, Q., VanHoy, R.W., Zhou, J.H., Dantzer, R., Freund, G.G., Kelley, K.W., (1999). Elevated cyclin E levels, inactive retinoblastoma protein, and suppression of the

- p27(KIP1) inhibitor characterize early development of promyeloid cells into macrophages. *Mol Cell Biol.* 19:6229-6239.
- Livak, K.J.; Flood, S.J.; Marmaro, J.; Giusti, W.; Deetz, K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* 4(6):357-362.
- Löhr, K., Möritz, C., Contente, A., Dobbelstein, M., (2003). p21/CDKN1A Mediates Negative Regulation of Transcription by p53. *The Journal of Biological Chemistry* 278:35 32507-32516 (2003)
- Lu, C.X., Fan, T.J., Hu, G.B., Cong, R.S., (2003). Apoptosis-inducing factor and apoptosis. *Acta Biochemica et Biophysica Sinica.* 35:881-885.
- Mangelsdorf, D.J., Koeffler, H.P., Donaldson, C.A., Pike, J.W., Haussler, M.R., (1984). 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-induced differentiation in a human promyelocytic leukemia cell line (HL-60): receptor-mediated maturation to macrophage-like cells. *J Cell Biol.* 98:391-398.
- Marone, M., Pierelli, L., Mozzetti, S., Masciullo, V., Bonanno, G., Morosetti, R., Rutella, S., Battaglia, A., Rumi, C., Mancuso, S., Leone, G., Giordano, A., Scambia, G., (2000). High cyclin-dependent kinase inhibitors in Bcl-2 and Bcl-xL-expressing CD34+ proliferating haematopoietic progenitors. *Br J Haematol.* 110:654-662.
- Mc Carthy, D.M., San Miguel, J.F., Freake, H.C., Green, P.M., Zola, H., Catovsky, D., Goldman, J.M. (1983). 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits proliferation of human promyelocytic leukemia (HL60) cells and induces monocyte-macrophage differentiation in HL60 and normal human bone marrow cells. *Leuk Res.* 7:51-55
- Meggouh, F., Lointier, P., Saez, S., (1991). Sex steroid and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptors in human colorectal adenocarcinoma and normal mucosa. *Cancer Res.* 51:1227-1233.
- Meikrantz, W., Gissebrecht, S., Tam, S.W., Schlegel, R., (1994). Activation of cyclin A-dependent kinases during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:3754-3758.
- Metcalf, A.D., Hunter, H.R., Bloor, D.J., Lieberman, B.A., Picton, H.M., Leese, H.J., Kimber, S.J., Brison, D.R., (2004). Expression of 11 members of the Bcl-2 family of apoptosis regulatory molecules during human preimplantation embryo development and fragmentation. *Mol Reprod Dev.* 68:35-50.
- Miller, G.J., Stapleton, G.E., Hedlund, T.E., Moffat, K.A., (1995). Vitamin D receptor expression, 24-hydroxylase activity, and inhibition of growth by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ in seven human prostatic carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res.* 1:997-1003.
- Miller, L.K., (1999). An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends Cell Biol.* 9:323-328. Review
- Miyaura, C., Abe, E., Nomura, H., Nishii, Y., Suda, T., (1982). 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ suppress proliferation of murine granulocyte/macrophage progenitor cells. (CFU-C). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 108:1728-1733.

- Morgan, D.O., (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13:261-291. Review.
- Muller, K., Rieneck, K., Hansen, M.B., Bendtzen, K. (1992). 1,25-Dihydroxyvitamin D₃-mediated suppression of T lymphocyte functions and failure of T cell-activating cytokines to restore proliferation. *Immunol Lett.* 34:37-44.
- Murao, S., Gemmell, M.A., Callaham, M.F., Anderson, N.L., Huberman, E., (1983). Control of macrophage cell differentiation in human promyelocytic HL-60 leukemia cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and phorbol-12-myristate-13-acetate. *Cancer Res.* 43:4989-4996.
- Nagata, S., Golstein, P., (1995). The Fas death factor. *Science* 267:1449-1456.
- Nakagawa, K., Sowa, Y., Kurobe, M., Ozono, K., Siu-Caldera, M.L., Reddy, G.S., Uskokovic, M.R., Okano, T. (2001). Differential activities of 1 alpha,25-dihydroxy-16-ene-vitamin D(3) analogs and their 3-epimers on human promyelocytic leukemia (HL-60) cell differentiation and apoptosis. *Steroids* 66(3-5):327-337.
- Ogawa, M., (1993). Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 81:2844-2853.
- Oste, C., (1988). Polymerase chain reaction. *BioTechniques.* 6: 162-167.
- Pakkala, S., de Vos, S., Elstner, E., Rude, R.K., Uskokovic, M., Binderup, L., Koeffler, H.P., (1995). Vitamin D₃ analogs: effect on leukemic clonal growth and differentiation, and on serum calcium levels. *Leuk Res.* 19:65-72.
- Pakkala, I., Savli, H., Knuutila, S., Binderup, L., Pakkala, S., (1997). CB1093, a novel vitamin D analog; effects on differentiation and clonal growth on HL-60 and de novo leukemia cells. *Leuk Res.* 21:321-326.
- Perlman, K., Kutner, A., Prah, J., Smith, C., Inaba, M., Schnoes, H.K., DeLuca, H.F., (1990). 24-homologated 1,25-dihydroxyvitamin D₃ compounds: separation of calcium and cell differentiation activities. *Biochemistry.*9;29(1):190-6.
- Pfaffl, M.W., (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research.* 29:2005-2007.
- Philips, A., Huet, X., Plet, A., Rech, J., Vie, A., Blanchard, J.M. (1999). Anchorage-dependent expression of cyclin A in primary cells requires a negative DNA regulatory element and a functional Rb. *Oncogene.* 18:1819-1825.
- Raeymaekers, L. (2000). Basic principles of quantitative PCR. *Mol Biotechnol.* 15(2):115-122.
- Razzouk, S., Shapiro, I.M., (2003). Detection of apoptotic gene expression in human osteoblast-like cells by cDNA microarrays. *J Bone Miner Metab.* 21:261-267.
- Ririe, K.M., Rasmussen, R.P., Wittwer, C.T., (1997). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* 245:154-160.

- Roy, N., Deveraux, Q.L., Takahashi, R., Salvesen, G.S., Reed, J.C., (1997). The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J.* 16:6914-6925.
- Rudel, T., (2000). Caspase Cascades and Caspase Targets. In: Apoptosis in Cardiac Biology 1st ed. Eds: H. Schunkert, GAJ Riegger. U.S.A. Kluwer Academic Publishers pp: 111-121
- Santos-Beneit, A.M., Mollinedo, F., (2000). Expression of genes involved in initiation, regulation, and execution of apoptosis in human neutrophils and during neutrophil differentiation of HL-60 cells. *J. Leukoc. Biol.* 67:712-724.
- Sarela, A.I., Macadam, R.C., Farmery, S.M., Markham, A.F., Guillou, P.J., (2000). Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. *Gut.* 46:645-650.
- Savli, H., Aalto, Y., Nagy, B., Knuutila, S., Pakkala, S., (2002). Gene expression analysis of 1,25(OH)₂D₃-dependent differentiation of HL-60 cells: a cDNA array study. *British Journal of Haematology.* 118:1065-1070.
- Savli, H., Sirma, S., Nagy, B., Aktan, M., Dinçol, G., Özbek, U., (2003). Real-Time PCR analysis of the apoptosis related genes in ATRA treated APL t(15;17) patients. *Experimental and Molecular Medicine* 35:454-459.
- Sawanobori, M., Yamaguchi, S., Hasegawa, M., Inoue, M., Suzuki, K., Kamiyama, R., Hirokawa, K., Kitagawa, M., (2003). Expression of TNF receptors and related signaling molecules in the bone marrow from patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia Res.* 27:583-591
- Schlottmann, K., Schölmerich, J.,(2000) Bcl-2 family member and mitochondria. In: Apoptosis in Cardiac Biology 1st ed. Eds: H. Schunkert, GAJ Riegger. U.S.A. Kluwer Academic Publishers pp: 71-90.
- Schmid, H.; Cohen, C.D.; Henger, A.; Irrgang, S.; Schlondorff, D.; Kretzler, M. (2003). Validation of endogenous controls for gene expression analysis in microdissected human renal biopsies. *Kidney Int.* 64(1):356-360.
- Schmidt, B.A., Rose, A., Steinhoff, C., Strohmeyer, T., Hartman, M., Ackermann, R., (2001). Up-regulation of cyclin-dependent kinase 4/CyclinD2 expression but down-regulation of cyclin-dependent kinase 2/Cyclin E in Testicular Germ Cell Tumors. *Cancer Research* 61:4214-4221.
- Schmittgen, T.D. and Zakrajsek, B.A. (2000). Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J. Biochem. Biophys. Methods* 46:69-81.
- Schwaller, J., Pabst, T., Koeffler, H.P., Niklaus, G., Loetscher, P., Fey, M.F., Tobler, A., (1997). Expression and regulation of G1 cell-cycle inhibitors (p16INK4A, p15INK4B, p18INK4C, p19INK4D) in human acute myeloid leukemia and normal myeloid cells. *Leukemia.* 11:54-63.

- Seol, J.G., Park, W.H., Kim, E.S., Jung, C.W., Binderup, L., Koeffler, H.P., Kim, B.K., Lee, Y.Y., (2000). Effect of a novel vitamin D3 analog, EB1089, on G1 cell cycle regulatory proteins in HL-60 cells. *Int J Oncol.* 16:315-20.
- Simpson, R.U., Hsu, T., Wendt, M.D., Taylor, J.M., (1989). 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulation of c-myc protooncogene transcription. Possible involvement of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 264:19710-19715.
- Siraj, A.K.; Ozbek, U.; Sazawal, S.; Sirma, S.; Timson, G.; Al-Nasser, A.; Bhargava, M.; El Solh, H.; Bhatia, K.; Gutierrez, M.I. (2002). Preclinical validation of a monochrome real-time multiplex assay for translocations in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res.* 8(12):3832-3840.
- Song, J.H., Kim, J.M., Kim, S.H., Kim, H.J., Lee, J.J., Sung, M.H., Hwang, S.Y., Kim, T.S. (2003). Comparison of the gene expression profiles of monocytic versus granulocytic lineages of HL-60 leukemia cell differentiation by DNA microarray analysis. *Life Sci.* 73:1705–1719.
- Srivastava, M.D., Ambrus, J.L., Uskokovic, M.R. (1995) Calcitriol analogs cause differentiation of neoplastic cells in culture. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 88:79-85.
- Srivastava, M.D., DeLuca, H.F., Ambrus, J.L.(1994). Differentiation of neoplastic cells toward normal induced by vitamin D3 derivatives. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 83:115-123.
- Studzinski, G.P., (1989). Oncogenes, growth and the cell cycle: an overview. *Cell Tissue Kinet.* 22:405-424.
- Susin, S.A. Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M., Kroemer, G., (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397:441–446.
- Susin, S.A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M., Kroemer, G., (1996). Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J. Exp. Med.* 184:1331–1342
- Suzuki, T.; Higgins, P.J.; Crawford, D.R. (2000) Control selection for RNA quantitation. *Biotechniques.* 29(2):332-337
- Tamm, I., Wang, Y., Sausville, E., Scudiero, D.A., Vigna, N., Oltersdorf, T., Reed, J.C., (1998). IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. *Cancer Res.* 58:5315-5320.
- Tanaka, H., Abe, E., Miyaura, C., Suda T., (1983). 1,25-dihydroxyvitamin D3 induces differentiation of human promyelocytic leukemia cells (HL-60) into monocyte-macrophages, but not into granulocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 117:86-92.
- Teitz, T., Wei, T., Valentine, M.B., Vanin, E.F., Grenet, J., Valentine, V.A., Behm, F.G., Look, A.T., Lahti, J.M., Kidd, V.J. (2000) Caspase 8 is deleted or silenced

- preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med.* 6:529-535.
- Tenen, D.G. (2003) Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer.* 3:89-101. Review
- Thompson, C.B., (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1456-1462.
- Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 3(7):RESEARCH0034. Epub 2002 Jun 18
- Vermeulen, K., Strnad, M., Krystof, V., Havlicek, L., Van der, Aa A., Lenjou, M., Nijs, G., Rodrigus, I., Stockman, B., Van Onckelen, H., Van Bockstaele, D., Berneman, Z.N., (2002a). Antiproliferative effect on plant cytokinin analogues with an inhibitory activity on cyclin-dependent kinases. *Leukemia* 16:299-305.
- Vermeulen, K., Strnad, M., Havlicek, L., Van Onckelen, H., Lenjou, M., Nijs, G., Van Bockstaele, D., Berneman, Z.N., (2002b). Plant cytokinin analogues with inhibitory activity on cyclin dependent kinases (CDK) exert their antiproliferative effect through induction of apoptosis initiated by the mitochondrial pathway: determination by a multiparametric flow cytometric analysis. *Exp. Hematol.* 30:1107-1114.
- Vermeulen, K., Berneman, Z.N., Van Bockstaele, D.R. (2003). Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif.* 36:165-175.
- Wallach, D., Varfolomeev, E.E., Malinin, N.L., Goltsev, Y.V., Kovalenko, A.V., Boldin, M.P., (1999). Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanism. *Annu Rev Immunol* 17:331-367.
- Wali, R.K., Bissonette, M., Khare, S., Hart, J., Sitrin, M.D., Brasitus, T.A., (1995). 1 alpha,25-Dihydroxy-16-ene-23-yne-26,27-hexafluorocholecalciferol, a noncalcemic analogue of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃, inhibits azoxymethane-induced colonic tumorigenesis. *Cancer Res.* 55:3050-3054.
- Wang, L., Zhang, G.M., Feng, Z.H., (2003). Down-regulation of survivin expression reversed multidrug resistance in adriamycin-resistant HL-60 / ADR cell line. *Acta Pharmacol Sin.* 24:1235-1240.
- Watowich, S.S., Wu, H., Socolovsky, M., Klingmuller, U., Constantinescu, S.N., Lodish, H.F., (1996). Cytokine receptor signal transduction and the control of hematopoietic cell development. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 12:91-128
- Weinreb, O., Mandel, S., Youdim, M.B., (2003). cDNA gene expression profile homology of antioxidants and their antiapoptotic and proapoptotic activities in human neuroblastoma cells. *FASEB J.* 17:935-937
- Wellmann, S., Taube, T., Pall, K., Einsiedel, H.G., Geilen, W., Seifert, G., Eckert, C., Henze, G., Seeger, K., (2001). Specific reverse transcription-PCR quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants by LightCycler Technology. *Clinical Chemistry.* 47:654-660.

- Wittwer, C.T., Herrmann, M.G., Moss, A.A. Rasmussen, R.P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques*. 22:130-138.
- Wolf, B.B. and Green, D.R. (1999). Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases. *J Biol Chem* 274(29):20049-52
- Yamada, K., Honma, Y., Asahi, K.I., Sassa, T., Hino, K.I., Tomoyasu, S. (2001). Differentiation of human acute myeloid leukemia cells in primary culture in response to cotylenin A, a plant growth regulator. *Br J Haematol* 114(4):814-821.
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C.N., Ibrado, A.M., Cai, J., Peng, T.I., Jones, D.P., Wang, X. (1997). Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science*. 275:1129-32.
- Zhang, W., Shokeen, M., Li, D., Mehta, J.L. (2003). Identification of apoptosis-inducing factor in human coronary artery endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 301:147-151.
- Zhuang, S., Simon, G. (2000). Peroxynitrite-induced apoptosis involves activation of multiple caspases in HL-60 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 279:C341-C351.
- Zwijsen, R.M.L., Wientjens, E., Klompaker, R., van der Sman, J., Barnards, R, Michalides, R.J., (1997). CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell* 88:405-415.

ÖZGEÇMİŞ

1976 yılında Gölcük'te doğdum. İlk ve ortaokulu Değirmendere'de okudum. 1993 yılında Gölcük Barbaros Hayrettin Lisesi'nden mezun oldum. 1997 yılında Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldum. 1998 yılında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünün Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans programına başladım ve 2001 yılında Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünden Yüksek Lisansımı aldım. 2002 yılında Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda Doktora Programına kaydoldum. Halen Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktayım. Evliyim ve bir kız çocuk sahibiyim.