

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

**TEMEL BİYOTEKNOLOJİ DOKTORA TEZİ**

**AKUT MYELOİD LÖSEMİDE BETA KATENİN PROTEİNİNİN DÜZENLEDİĞİ  
GENLERİN GENOM EBADINDA İNCELENMESİ VE OLASI İLAÇ  
HEDEFLERİNİN BELİRLENMESİ**

**Tülin ÖZKAN**

**Danışman Öğretim Üyesi  
Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU**

**ANKARA**

**2013**

Prof.Dr.Asuman SUNGUROĞLU danışmanlığında, Tülin ÖZKAN tarafından hazırlanan bu çalışma /2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan:

Üye :

Üye :

Üye :

Üye :

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Prof.Dr.**

**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Akut Myeloid Lösemi (AML), erken hematopoetik kök hücrelerde gerçekleşen bir dizi genetik değişiklik sonucunda normal hematopoetik büyüme ve farklılaşmanın bozulması, kemik iliği ve periferik kanda çok sayıda anormal olgunlaşmamış myeloid hücrenin (myeloblast) birikimi ile karakterize olan bir hastalıktır.

**Wnt/beta katenin** sinyal yolağı, embriyogenez esnasında kök hücre düzeyinde hücrenin kaderine ilişkin kararları kontrol eden, evrimsel olarak korunmuş bir sinyal iletim yolağıdır. Hem erken embriyolojik dönemde hem de çeşitli kanser türlerinde aktive olduğu bilinen Wnt sinyal ileti yolu son yıllarda kanser araştırmacıları tarafından oldukça dikkat çekmeye başlamıştır, çünkü bu sinyal yolağındaki birçok genin neoplastik transformasyona neden olduğu bilinmektedir. Bu sinyal yolağında merkezi rolü  $\beta$ -katenin oynar.  $\beta$ -katenin sitoplazmada bulunan bir protein olup, Wnt sinyal aktivasyonu ile çekirdeğe taşınır. Böylelikle çoğu onkogen olan pek çok genin transkripsiyonunu aktive eder.

**ChIP-chip** metodu, hücrelerde meydana gelen DNA-protein etkileşimlerini belirlemek için kromatin immunopresipitasyonunu (ChIP) mikrodizinlerle (chip) kombine eden yeni bir metottur. Genom boyunca transkripsiyon faktör hedeflerini veya kromatin modifikasyon bölgelerini belirlemek için ideal bir yaklaşım haline gelmiştir.

Bu araştırmada AML hastalarında artmış  $\beta$ -katenin proteininin çekirdeğe girdikten sonra genom boyunca hangi promotor bölgelere bağlandığı ChIP-chip yöntemiyle araştırılmıştır. Bu amaçla  $\beta$ -katenin gen ekspresyonu yüksek olan AML hastalarının CD34+ hematopoetik kök hücrelerinin primer kültürleri yapılmış, bu hücrelerde ChIP-chip metoduyla  $\beta$ -katenin proteininin genomik DNA'da hastalarda yaklaşık 16.834 hedef gen, sağlıklılarda yaklaşık 8.788 hedef gene bağlandığı tespit edilmiş ve ilk kez genom ebadındaki olası bütün hedef genlerin profili çıkarılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** AML,  $\beta$ -katenin, ChIP-chip

## **ABSTRACT**

Acute Myeloid Leukemia (AML) is a disease characterized with impairment of normal hematopoietic proliferation and differentiation and accumulation of abnormal immature myeloid cells in bone marrow and peripheral blood which occurs as a result of genetic changes in early hematopoietic stem cells.

**Wnt/ $\beta$ -catenin** signaling is an evolutionarily conserved signal transduction pathway that governs cell fate decisions during embryogenesis at the stem cell level. Wnt signaling which is known to be activated both in the early embryonic period and various cancer types has been taking serious attention because it is known that lots of genes in this pathway causes neoplastic transformation.  $\beta$ -catenin plays the central role in this pathway.  $\beta$ -catenin is a cytoplasmic protein which translocates to the nucleus via Wnt signal activation. Thus it activates transcription of lots of genes most of which are oncogenes.

**ChIP-chip** is a new technology which combines chromatin immunoprecipitation(ChIP) and microarrays (chip) to determine DNA-protein interactions in cells. It has become an ideal approach to define genome-wide transcription factor targets or chromatin modification regions.

In this study, genome-wide promoter binding regions of  $\beta$ -catenin translocated to nucleus was identified by ChIP-chip method. For this purpose, CD34+ hematopoietic stem cells of AML patients with high  $\beta$ -catenin gene expressions were cultured and genome-wide promoter binding sites of  $\beta$ -catenin were determined. It was found that  $\beta$ -catenin bound approximately 16,000 target genes in AML patients and 8,000 target genes in the control group. The results showed all probable genome-wide targets of  $\beta$ -catenin protein in AML for the first time.

**Keywords: AML,  $\beta$ -catenin, ChIP-chip**

## ÖNSÖZ

Doktora eğitimim boyunca ve tezin oluşturulması ve yapılması sırasında engin bilgi ve yardımlarıyla beni başından sonuna kadar yönlendiren, bilimsel çalışmanın gereklerini üstün hoşgörü anlayışıyla bana öğreten, yapıcı ve yaratıcı düşünme şeklinin yanısıra her konudaki özverili davranışlarını örnek almaya çalıştığım, desteğini ve en önemlisi güvenini benden asla eksik etmeyen, emeklerini hiçbir zaman unutamayacağım, Değerli Hocam Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU'na,

Tez çalışmamın her aşamasında değerli katkıları ve fikirlerini paylaşan, bütün örneklerin temin edilmesinde büyük bir özveriyle çalışan, Sayın Hocam Prof. Dr. Nilgün SAYINALP'e,

Tezin oluşturulması ve yapımı sırasında her konuda beni destekleyen, fikirlerini ve eleştirilerini benimle paylaşarak beni yönlendiren, emeklerini hiçbir zaman unutamayacağım Değerli Hocam Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ'a,

Tez çalışmam sırasında birlikte çalışmaktan her zaman büyük mutluluk ve gurur duyduğum, sadece çalışma arkadaşları değil hayatım boyunca yanımda olacaklarına inandığım dostlarım Uzm. Bio. Aynur KARADAĞ'a, Dr. Buket ALTINOK'a, Dr. Arzu Zeynep KARABAY'a, Dr. Aslı KOÇ'a ve tezim sırasında bana büyük destek veren Uzm. Bio. Işıl YÜKSELEN'e, Yüksek Lisans Öğrencisi Yalda HEKMATSHOAR'a, Sibel ARAT'a ve tüm Tıbbi Biyoloji Ailesine,

Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde titizlikle ve sabırla emek veren Zeynep ÖZKESERLİ'ye ve Dr. Beyza DOĞANAY'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı 109S117 nolu proje olarak destekleyen TÜBİTAK'a maddi katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Ayrıca, her adımında yanımda olan ve bana her türlü desteği vererek bu günlere gelmemi sağlayan, haklarını asla ödeyemeyeceğim sevgili aileme sonsuz teşekkür ve sevgilerimle...

Tülin ÖZKAN

Ankara, Ocak 2013

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No:

ONAY SAYFASI .....	ii
ÖZET .....	iii
ABSTRACT .....	iv
ÖNSÖZ .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xi
SİMGELER DİZİNİ .....	xii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>	<b>4</b>
2.1. Lösemi .....	4
2.2. Hematopoez .....	4
2.2.1. Hematopoezin Regülasyonu .....	5
2.2.2. Hematopoez-Lösemi İlişkisi Ve Lösemilerin Sınıflandırılması .....	6
2.3. Akut Miyeloid Lösemi (AML) .....	9
2.3.1. AML'nin Epidemiyolojisi .....	12
2.3.2. AML'nin Moleküler Biyolojisi .....	12
2.3.3. AML'de Myeloid Transkripsiyon Faktörlerinin Fonksiyonu .....	12
2.3.4. AML Patogenezinde Tanımlanmış Gen Mutasyonları.....	15
2.3.4.1. Flt3 Gen Mutasyonları.....	15
2.3.4.2. c-KIT Gen Mutasyonları.....	16
2.3.4.3. RAS Gen Mutasyonları .....	16
2.3.4.4. PTPN11 Gen Mutasyonları.....	17
2.3.5. AML Patogenezinde Tanımlanmış Sitogenetik Değişiklikler .....	19
2.4. AML: Hematopoetik Kök Hücre Hastalığı .....	19
2.5. Bir Kök Hücre Ve AML Sinyal Yolağı: Wnt .....	20
2.5.1. Wnt/ $\beta$ -katenin (Kanonikal) sinyal yolağı .....	21
2.5.2. $\beta$ -katenin .....	21
2.5.2.1. $\beta$ -kateninin kanser oluşumundaki yeri .....	23

2.5.2.2.Solid tümörlerde beta katenin .....	25
2.5.2.3.Hematolojik malignansilerde beta katenin .....	26
2.6.Genom boyu moleküler biyolojik analizler .....	27
2.6.1. ChIP-Chip .....	28
2.6.1.1. ChIP-Chip Çalışmaları .....	31
2.7. Biyoinformatik analiz ve veri madenciliği .....	35
2.7.1. Gen Anotasyonu ve Ontoloji .....	35
2.7.2. Yolak Analizleri.....	39
2.8. Çalışmanın Hipotezinin Bilimsel Temelleri ve Amacı .....	40
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>43</b>
3.1. ÇALIŞMA GRUBUNUN OLUŞTURULMASI .....	43
3.2. CD34+ Hematopoetik Kök Hücre (HKH) Seçimi ve Primer Kültürü .....	43
3.3. Flow Sitometri Analizi ile Hücre Farklılaşmasının Kontrolü .....	45
3.4. RNA Ekstraksiyonu .....	45
3. 5. Agaroz Jel Elektroforezi.....	46
3. 6. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time PCR ) .....	47
3. 7. Kromatin İmmün Presipitasyonu (ChIP).....	51
3. 8. Bütün Genomun Çoğaltılması .....	51
3. 9. Kromatin İmmün Presipitasyonu (ChIP) Yapılan Örneklerin Promotor Arrayleri ile Hibridizasyonu .....	53
3.2.10. Biyoinformatik Değerlendirme .....	54
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....</b>	<b>55</b>
4.1 İzole Edilen CD34+ Hücrelerin Mikroskopik Görüntüleri .....	55
4.2. Flow Sitometri Analizi ile Hücre Farklılaşmasının Kontrolü .....	55
4.3. RNA Bütünlük, Kalite ve Miktar Tayini .....	56
4.4. Eş Zamanlı PCR (Real Time PCR, qRT-PCR) Bulguları .....	58
4.5. Kromatin İmmün Presipitasyonu (ChIP) Bulguları .....	61
4.6. Bütün Genomun Çoğaltılması .....	61
4.7. ChIP-chip Sonuçları .....	64
4.8. Biyoinformatik Analiz Sonuçları .....	65
4.8.1. Görüntü işleme .....	65
4.8.2. CHER (Chip Enriched Region)'lerin bulunmasına yönelik Analizler .....	65
4.8.3. Yolak Analizleri .....	66
4.8.4. Bulunan Genler ve İlişkili Olduğu Yolaklar .....	66

<b>5.TARTIŞMA.....</b>	<b>83</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>103</b>
<b>7. KAYNAKLAR .....</b>	<b>105</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>123</b>
EK-1 .....	123
EK-2 .....	125
EK-3 .....	127
EK-4 .....	128
EK-5 .....	134
ÖZGEÇMİŞ.....	140



## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa No:

Şekil 2.1.	Hematopoez.....	5
Şekil 2.2.	Normal ve Anormal hematopoez.....	9
Şekil 2.3.	Transkripsiyon faktörleri.....	14
Şekil 2.4.	Wnt / $\beta$ -katenin Sinyal Yolağı.....	23
Şekil 2.5.	Kanser Kök Hücre Özellikleri ve Terapötik Direnç.....	26
Şekil 2.6.	ChIP-chip tekniğinin Özeti .....	32
Şekil 2.7.	Gen Ontolojisi Hiyerarşik sınıflandırma.....	38
Şekil 3.1.	CD34+ HKH İzolasyon Protokolünün Şematik Gösterimi.....	45
Şekil 4.1.	İzole edilen CD34+ Hücrelerinin Mikroskopik Görüntüleri.....	55
Şekil 4.2.	Flow sitometri Analiz Sonuçları.....	56
Şekil 4.3.	CD34+ HKH'den izole edilen RNA'ların %1'lik Agaroz Jel görüntüsü.....	57
Şekil 4.4.	Beta Katenin gen Ekspresyonu Yüksek Olan 10 Hasta.....	58
Şekil 4.5.	$\beta$ -katenin amplifikasyon eğrisi grafiği.....	59
Şekil 4.6.	$\beta$ -katenin amplifikasyon eğrisi grafiği.....	59
Şekil 4.7.	$\beta$ -katenin erime eğrisi .....	60
Şekil 4.8.	Hprt erime eğrisi.....	60
Şekil 4.9.	ChIP örneğin Jel görüntüsü.....	61
Şekil 4.10.	DNA miktarının çoğaltılması .....	63
Şekil 4.11.	Sağlıklı ve Hasta bireylerdeki $\beta$ -katenin proteinin hedef genleri.....	64
Şekil 4.12.	Akirin-2 geninin validasyonu.....	65
Şekil 4.13.	Beta katenin proteininin bağlandığı hedef genlerin kromozomal dağılımı .....	69
Şekil 4.14.	Sağlıklı bireylerdeki hedef genlerin hücrel rolleri .....	70
Şekil 4.15.	Hasta bireylerdeki hedef genlerin hücrel rolleri.....	71
Şekil 4.16.	Anotasyon kümelerine göre yığılma gösteren genlerin transkriptom verileriyle karşılaştırılması sonucu bulunan genlerin ifadelerindeki değişiklikler.....	72
Şekil 4.17.	DAVID Programı İle Anotasyon Kümelerine Ayrılan Genlerden, Kanserle İlişkili Çıkan Clusterların Yolak Analizleri ve İçerdikleri Gen Sayıları.....	76
Şekil 4.18.	Kanserle İlişkili Bulunan Yolaklar .....	77

<b>Şekil 4.19.</b>	DAVID Programı ile Yapılan Yolak Analizleri Sonucunda Tespit Edilen Yolaklar ve Bu Yolaklarda Tespit Edilen Genler .....	78
<b>Şekil 5.1.</b>	Akış Şeması.....	85
<b>Şekil 5.2.</b>	$\beta$ -katenin proteininin hedefi olarak tespit edilen 15 gen.....	86
<b>Şekil 5.3.</b>	$\beta$ -Katenin Proteininin Hedefi Olarak Tespit Edilen 15 Genin Ekspresyonlarındaki Kat Artışı. ....	86
<b>Şekil 5.4.</b>	$\beta$ -Katenin Proteininin Hedefleri Arasında Yer Alan Genlerin Çeşitli Kanser Yolaklarındaki Gösterimi.. ....	87
<b>Şekil 5.5.</b>	PI3K-Akt ve MAPK Sinyal Yolakları. ....	88
<b>Şekil 5.6.</b>	PI3K-Akt Yolağı ve GSK3B.....	91
<b>Şekil 5.7.</b>	MAPK Sinyal Yolaklağı. ....	92
<b>Şekil 5.8.</b>	Apoptoz ve BAD geni.....	95
<b>Şekil 5.9.</b>	Hücre döngüsü, P53, CDK6 ve E2F3. ....	99
<b>Şekil 5.10.</b>	$\beta$ -katenin Proteininin Hedef Genleri ve Aktive Ettiği Yolakların Gösterimi .....	101

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa No:

<b>Çizelge 2.1.</b> AML tanısı ve tiplendirilmesi .....	10
<b>Çizelge 2.2.</b> AML'nin biyolojik sınıflandırılması tedavi için ip uçları ve testler.....	11
<b>Çizelge 2.3.</b> AML'deki moleküler lezyonlar ve malignansi .....	18
<b>Çizelge 2.4.</b> Çeşitli Kanserlerde Wnt/ $\beta$ -Katenin sinyal yolağındaki bozukluklar.....	24
<b>Çizelge 3.1.</b> c-DNA sentez protokolü. ....	48
<b>Çizelge 3.2.</b> Eş Zamanlı (qRT-PCR) PCR protokolü .....	50
<b>Çizelge 4.1.</b> İzole edilen RNA örneklerinin spektrofotometrik okumaları.....	57
<b>Çizelge 4.2.</b> Örneklerin Özellikleri.....	62
<b>Çizelge 4.3.</b> Yalnızca hasta bireylerde hedef olarak tespit edilen genlerin Fonksiyonel Anotasyon Clusterları .....	72
<b>Çizelge 4.4.</b> Yalnızca sağlıklı bireylerde hedef olarak tespit edilen genlerin Fonksiyonel Anotasyon Clusterları .....	72
<b>Çizelge 4.5.</b> İfade Profilleri Karşılaştırılan Genlerin DAVID Programı ile Anotasyon Clusterlarına Ayrılması (devamı Ek-4'te).....	73
<b>Çizelge 4.6.</b> DAVID Programı İle Anotasyon Clusterlarına Ayrılan Genlerden, Kanserle İlişkili Çıkan Clusterların Yolak Analizleri.....	74
<b>Çizelge 4.7.</b> DAVID Programı İle Anotasyon Clusterlarına Ayrılan Genlerden, Kanserle İlişkili Çıkan Clusterların Yolak Analizlerinden elde edilen 15 genin detaylandırılmış hali.....	75

## SİMGELER DİZİNİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
ABCB1	ATP'ye bağlanan kaset alt familya B üye 1
ABL	V-abl Abelson sıçan lösemi viral onkogen homologu 1
ALL	Akut Lenfoid Lösemi
AML	Akut Miyeloid lösemi
AP-1	Aktivatör protein-1
AP2-α	Aktive edici arttırıcı bağlanma protein 2 alfa
APC	Adenomatöz polipozis koli
BAD	BCL-2 ilişkili hücre ölümünün agonisti
Bcl11b	B-hücre lösemi/lenfoma 11B
BCL-2	B hücre lenfoma-2
BCL-x1	B hücre lenfoma ekstra büyük
BCR	Kırık noktası küme bölgesi
BCR/ABL	Kırık noktası küme bölgesi/Abelson
BDNF	Beyin kökenli nörotropik faktör
BFB	Bromfenol mavisi
BiP	Bağlanan immünoglobulin protein
Bmi	Mo-MLV insersiyon bölge 1 homologu
BRCA1	Meme kanseri tip 1 yatkınlık proteini
CACNA1B,	Drosophila kaktüsle interaksiyonda olan protein homologu
CBP/P300	Creb'e bağlanan protein/Ela'ya bağlanan protein p300
CDK	Siklin bağımlı kinaz
CDK6	Siklin bağımlı kinaz 6
cDNA	Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
CGH	Karşılaştırmalı genom hibridizasyonu
ChIP	Kromatin immunopresipitasyonunu
ChIP-Chip	Kromatin immünpresipitasyon-ekspresyon array
CKIε	Kazein kinazIε
cMyc	Myelostomatozis viral onkogen homologu
Cp	Crossing point

Ct	Döngü eşik değeri
ddH2O	Deiyonize su
dk	Dakika
DLD1 CRC	DLD1 kolorektal kanser
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
Dsh/Dvl	Dishevelled
E2F3	Transkripsiyon faktörü 3
ECM	Ekstraselüler matriks
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
EMSA	Elektroforetik mobilite shift assay
EMT	Epitelial-mezenkimal geçiş
Epo	Eritropoietin
Er	Eritroid hücreler
FAB	Fransız-Amerikan-İngiliz
FCS	Fetal Kalf Serum
FLT-3	FMS benzeri tirozin kinaz 3
FLT3-ITD	FLT3- internal tandem duplikasyon
FLT3-TKD	FLT3-tirozin kinaz domain mutasyonu
Fz	Frizzled
GATA-1	GATA bağlanan protein 1 (globin transkripsiyon faktörü 1)
GEF	Guanin nükleotid değişim faktörü
GNL3	Guanin nükleotidine bağlanan protein benzeri-3
GO	Gen Ontolojisi
GRB2	Büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein-2
GSA	Gen Set Analizi
GSEA	Gen Set Zenginleştirme Analizi
GSK-3	Glikojen sentaz kinaz-3
GTPaz	Guanozin trifosfataz
HCT116	Kolon kanser hücre serisi
HEF1	İnsan filamentasyon 1'in arttırıcısı
Hh	Hedgehog
HKH	Hematopoetik kök hücreler
hprt	Hypoksantin-guanin fosforibozil transferaz
Hsp70	Isı şoku proteini

IKK $\alpha$	I $\kappa$ B kinaz alfa
IL-3	Interlökin-3
JAK2	Janus kinaz 2
K.İ	Kemik iliği
KEGG	Genlerin ve genomların Kyoto ansiklopedisi
KLL	Kronik Lenfositik Lösemi
KML	Kronik Miyeloid Lösemi
KRAS v-Ki-ras2	Kirsten sıçan sarcomoma viral onkogen homologu
LEF	Lenfoid arttırıcı faktör
LIMMA	Mikrodizin verisi için lineer modeller
LKH	Lösemik kök hücre
LRP5/6	Düşük densite lipoprotein reseptörü ile ilişkili protein
MAPK	Mitojenle aktive olan protein kinaz
MD	Miyelodisplastik hastalıklar
MDS	Miyelodisplastik sendromlar
mg	Miligram
MiRNA	MikroRNA
MM	Multiple Myeloma
MPD	Miyeloproliferatif hastalıklar
MPH	Miyeloproliferatif hastalıklar
MPN	Miyeloproliferatif neoplasm
MT1-MMP	Matriks Metalloproteinaz
NFKB1	B-hücreleri 1'deki kappa hafif polipeptid gen arttırıcının nükleer faktörü
NFKBIA	B-hücreleri inhibitörde kappa hafif polipeptid gen arttırıcının nükleer faktörü, alfa
ng	Nanogram
NPM1	Nükleofosmin 1
NRAS	Nöroblastoma RAS viral (v-ras) onkogen homologu
NSCLC	Küçük hücre olmayan akciğer karsinoma
°C	Santigrat derece
OST	Oligosakkaril-transferaz kompleksi
PAR1	Proteazla aktive edilen reseptör 1
PBS	Fosfat tampon solusyonu

PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Ph1	Philadelphia kromozom
PI3K	Fosfotidilinositol 3-kinaz
PIK3R2	Fosfoinositid-3-kinaz, düzenleyici alt ünite 2
PIK3R5	Fosfoinositid-3-kinaz, düzenleyici alt ünite 2
PKC	Protein kinaz C
PML-RAR $\alpha$	Füzyon proteini
PP2A	Protein fosfataz 2A
PRKCB	Protein kinaz C, beta
PTEN	Kromozom 10 üzerinde silinmiş fosfataz ve tensin homoloğu
PTPaz	Protein tirozin fosfataz
PTPN11	Protein tirozin standart fosfataz nonreseptör 11
qRT-PCR	Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rb	Retinoblastoma
REAL	Revize edilmiş Avrupa-Amerikan lenfoid neoplazmlar sınıflandırması
RGS	G protein sinyalinin regülatörü
RNA	Ribonükleik asit
RTK	Reseptör tirozin kinaz
SCF	Kök hücre faktörü
sFRP	Salınan frizzled-ilişkili protein
SHC	(Src homoloji 2 bölgesi içeren) transforming protein 1
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi
TAC	Tetramerik Antikor Kompleksi
TBE	Tris/Borat/EDTA
TCF	T-hücre faktörü
TCF/LEF	T hücre faktörü/Lenfosit arttırıcı bağlanma faktörü
TCF4	T-hücre faktörü 4
TF	Transkripsiyon faktörü
TGF- $\beta$	Transforming büyüme faktörü- $\beta$
TP53	Tümör protein p53
TPO	Trombopoietin
UPD	Uniparental dizomi
WHO	Dünya sağlık organizasyonu

WIF-1	Wnt-inhibitör faktör-1
Wnt	Kanatsız tip MMTV integrasyon bölgesi aile üyesi
$\beta$ -TRCP	$\beta$ -transdusin tekrar içeren protein
$\beta$	Beta



## I. GİRİŞ

Karsinogenez, çok faktörlü ve çok basamaklı bir olgudur. Karsinogeneze yol açtıkları belirlenen protoonkogenler ve tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar, gen amplifikasyonları ve delesyonları ve füzyon proteinleri ile sonuçlanan translokasyonlar kanser genomu üzerine yapılan çalışmalar sayesinde tanımlanmaya devam etmektedir. (Holliday vd 2006). Birden fazla gendeki mutasyonlar nedeniyle oluştuğu bilinen bu nedenle genetik bir hastalık olan kanserin yaklaşık %85-90'ı sporadik olarak ortaya çıkarken, %10-15'lik bir kısmı kalıtsal karakterdedir.

Her yıl teşhis edilen kanser vakalarının yaklaşık %7'sini hematolojik malignansiler oluşturmaktadır. Bu malignansiler arasında yer alan akut miyeloid lösemi (AML), erişkinlerde görülen en yaygın lösemidir. 2010 yılında AML teşhisi koyulan 12330 yeni vaka olduğu ve AML' ye bağlı 8950 ölüm gerçekleştiği belirlenmiştir (Jemal vd 2010). Lösemnin, normal hematopoetik kök hücrelerden farklı olarak, anormal ve zayıf olarak düzenleme gösteren bir organogenez sürecine uğrayan birkaç lösemik kök hücre tarafından başlatıldığı ortaya konulmaktadır (Passegue vd 2003). Bu bağlamda, lösemnin tedavisine yönelik yaklaşımların geliştirilebilmesi için öncelikle, olgunlaşmamış kan hücre tiplerinden olgunlaşmış ve özelleşmiş kan hücrelerinin oluşumu olarak tanımlanan hematopoezis sürecinin iyi anlaşılması gerekmektedir. Bu süreçte özellikle lösemik kök hücre oluşumuna yol açan sinyal yollarının aydınlatılarak, bu hücre popülasyonunun kaderinin yönlendirilmesi önem kazanmaktadır.

Lösemik kök hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşmaları arasındaki hassas dengeyi, çeşitli genler ve bu genlerin düzenlediği sinyal yolları kontrol etmektedir. Wnt/ $\beta$ -katenin, Notch, Hh (Hedgehog), TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ), PTEN (Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) ve Bmi bu dengeden sorumlu başlıca sinyal yollarıdır ve anormal aktivasyonları lösemi gelişimiyle ilişkilendirilmektedir (Woodward vd 2005).

Bu sinyal yolları arasında yer alan Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağı, embriyonik gelişimde ve erişkinlerde organ ve dokuların devamlılığın sağlanmasında önemli rol oynamaktadır. Geçtiğimiz 20 yıl boyunca yapılan pek çok çalışma, Wnt kanonikal sinyal yolağının,

çeşitli kanserlerin de aralarında bulunduğu geniş bir hastalık grubunun patogenezinde görev yaptığını ortaya koymuştur. Wnt  $\beta$ -katenin sinyal yolağının önemli bir bileşeni olan  $\beta$ -kateninin delesyonunun embriyonik olarak öldürücü olduğunun (Tan vd 2008) belirlenmesinin ardından Reya ve ark., hematopoetik hücrelerde  $\beta$ -katenin genini silmişler ve  $\beta$ -katenini tükenmiş olan hematopoetik kök hücrelerin, hücre döngüsündeki dağılım, çoklu hücre farklılaşması ve görev yerlerine dağılım yeteneği açısından normal hematopoetik kök hücrelere kıyasla farklılık göstermediklerini, sadece bu hücrelerin kendini yenileme potansiyellerinin açıkça bozulduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, miyeloid projenitörlerdeki  $\beta$ -katenin aktivasyonu tarafından gerçekleştirilen kendini yenileme yeteneğinin kazanılmasının kronik faz KML'nin (Kronik Miyeloid Lösemi), blast krizi KML'ye dönüşümünde de, önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Jamieson vd 2004). Bu bulgular, KML lösemik kök hücrelerinin (LKH) kendini yenilemesindeki başlıca oyuncu olan Wnt sinyal yolağını KML hastalığının ortadan kaldırılmasında önemli bir hedef haline getirmektedir.

Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal mekanizması incelendiğinde, istirahat halindeki normal hücrede, Wnt aktivasyonu yokluğunda,  $\beta$ -kateninin hücre membranında yerleşik olduğu ve hücre yüzeyinde E-kaderin ve  $\alpha$ -katenin ile kompleks oluşturarak hücre iskeleti ile bağlantı yaptığı (Perez-Moreno vd 2003) Wnt sinyal aktivasyonunun ardından  $\beta$ -kateninin çekirdeğe taşındığı ve bir transkripsiyon faktörü gibi çekirdekte TCF/LEF (T Cell Factor/Lenfosit enhancer binding factor)'e bağlanarak çok sayıda genin transkripsiyonunu aktive ettiği belirlenmiştir (Ilyas vd 2005).

Günümüze değin, Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağının lösemideki rolüne ilişkin olarak yapılmış çalışmalar arasında, bu sinyal yolağının spesifik oligonükleotidlerle inhibe edilmesi sonucunda lösemik hücrelerin hayatta kalmalarına ilişkin parametrelerin incelendiği, çok çeşitli kimyasal ve kemoterapötik ajanın bu sinyal yolağı üzerindeki etki mekanizmalarının aydınlatılmaya çalışıldığı ve Wnt/ $\beta$ -kateninin epigenetik ve transkripsiyonel regülasyonunun incelendiği çalışmalar yer almaktadır. Bütün bu çalışmalarla, Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağının, ilişkide olduğu çeşitli önemli gen ve proteinler ortaya konulmaya çalışılmış, bu sinyal yolağının sessizleştirilmesinin hücre davranışı üzerindeki etkileri açıklığa kavuşturulmuştur. Ancak, bu çalışmalar Wnt/  $\beta$ -katenin yolağının ilişkide olduğu genler, bu genlerin görev yaptıkları sinyal yolları ve genlerin ürünleri olan proteinlere

dair sınırlı bilgi sunmaktadır ve bu sinyal yolağının genom ebadındaki etkilerine ilişkin bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır.

Günümüzde, insan genom projesinin tamamlanması, dizin teknolojisinin ve yakın zamanda yoğun paralel sekanslama teknolojilerinin keşfedilmesi, genom ebadındaki çalışmaların sayısının artmasına yol açmış, bu çalışmalarla elde edilen geniş veri setleri, çok geniş bir hastalık grubunda yeni hedeflerin ortaya çıkmasına olanak sağlamış ve hastalıkların tedavisinde bir umut ışığı yaratmıştır. Genom ebatlı bu teknolojilerden biri de DNA'ya bağlanarak fonksiyon gören transkripsiyon faktörlerinin bütün genomda nerelere bağlandığını ortaya koyabilen kromatin immünpresipitasyon-mikroarray (ChIP-Chip) analizidir.

Bu tez çalışmasında Wnt/  $\beta$ -katenin yolağının patogenezinde önemli rol aldığı bilinen AML'de  $\beta$ -kateninin etki mekanizmasını, bu proteinin genom ebadındaki hedeflerinin belirlenmesi yoluyla açığa çıkarılması hedeflenmiştir. Bu amaçla çalışmamızda AML hastalarında  $\beta$ -katenin proteininin bağlandığı genler genom ebadında belirlenmiş ve bu genler görev aldığı yollar çerçevesinde AML patogenezi tartışılmıştır.

## **2. KAYNAK ÖZETLERİ**

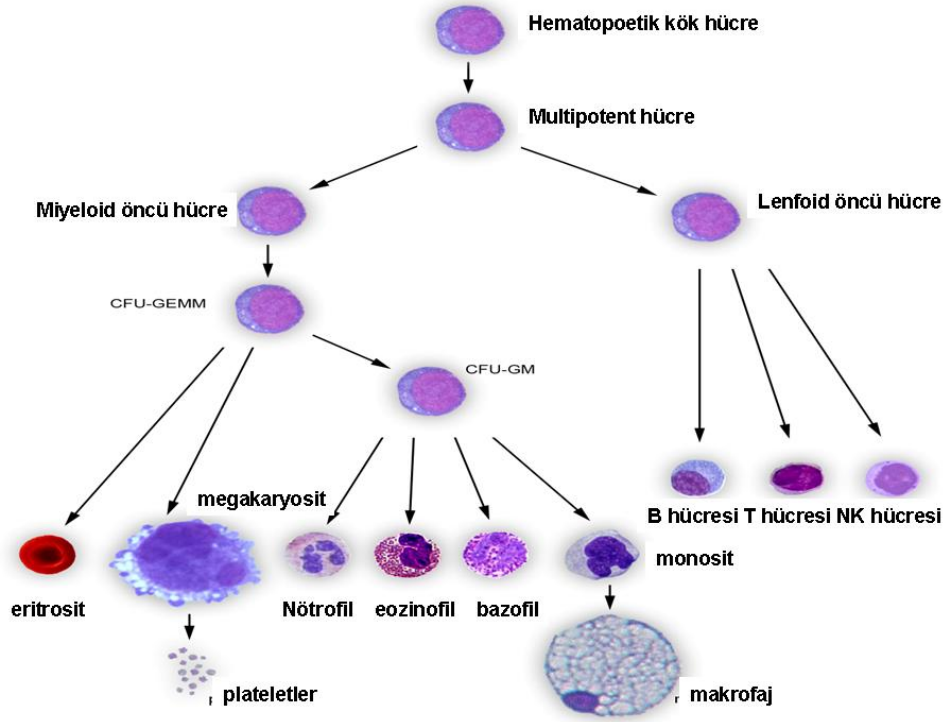
### **2.1. LÖSEMİ**

Lösemi, hematopoetik malignansilerin bir toplamıdır ve genellikle farklı diferansiasyon aşamalarında tutulan lenfositik veya miyelositik lineaj öncül hücrelerin birikimi ile karakterizedir. Bu öncül hücreler hızla çoğalmakta, ölümsüzlük yeteneği kazanmakta ve daha sonra olgunlaşmamış hücrelere dönüşmektedirler (Beksaç 1997). Olgunlaşmamış kan hücre tiplerinden (lineajlarından) olgunlaşmış ve özelleşmiş kan hücrelerinin oluşumu olarak tanımlanan hematopoezis sürecinin iyi anlaşılması, lösemnin ortaya çıkması ve ilerlemesinin anlaşılması ve bu hastalığın tedavisi için büyük önem taşımaktadır.

### **2.2. HEMATOPOEZ**

Tüm kan hücre tiplerinin (lineajların), kemik iliğinde bulunan olgunlaşmamış hücrelerden hiyerarşik bir düzende, adım adım oluşmaları ve daha ileri olgunlaşma basamakları ve/veya efektör fonksiyonları üstelenmek üzere dolaşıma ve periferel organlara salınmaları süreci hematopoez olarak adlandırılmaktadır (Orkin ve Zon 2008).

Bu hiyerarşinin en tepesinde, tüm kan hücre lineajlarının hayat boyunca üretiminden sorumlu olan ve kendilerini yenileyebilen yegane hücreler olan hematopoetik kök hücreler (HKH) yer almaktadır (Şekil 2.1). Hematopoetik kök hücreler, kendini yenileme ve farklılaşmalarını doğrudan veya dolaylı olarak düzenleyen çoklu hücre tiplerinin nişlerinden oluşan ve yüksek düzenleme sergileyen endosteal bölgelerde yerleşim göstermektedirler (Morrison ve Spradling 2008). Normal şartlarda, sessiz bir populasyon olarak bulunan ve kemik iliği ve dolaşımdaki sayıları sıkı bir şekilde düzenlenen HKH'ler (Jude vd 2008), farklılaşma işaretlerine yanıt olarak kendini yenileme özelliği taşımayan multipotent öncülleri (MPÖ) oluştururlar. Bu öncüller ise daha sonra farklılaşarak aslında en yüksek özelleşme ve farklılaşma sergileyen olgun kan hücrelerini oluştururlar. Bu kan hücreleri, miyeloid (monositler, makrofajlar, nötrofiller, bazofiller, eozinofiller, eritrositler, megakaryositler/plateletler, dendritik hücreler) ve lenfoid (T-hücreleri, B-hücreleri, NK-hücreleri) seri olarak adlandırılan hücre tipleridir.



Şekil 2.1. Hematopoez

### 2.2.1. HEMATOPOEZİN REGÜLASYONU

Hematopoetik kök hücre (HKH) sayılarının düzenlenmesi, proliferasyon, apoptoz, ve/veya kemik iliği mikroçevresinde tutulum gibi fenomenlerin doğrudan modülasyonu aracılığı ile gerçekleştirilmektedir. HKH davranışını kontrol eden asıl moleküler mekanizma hala ortaya çıkarılamamış olmakla birlikte, kan hücrelerinin homeostatik üretiminde rol oynayan mekanizmaların bir kısmı günümüzde artık bilinmektedir.

Günümüze değin yapılmış olan çok sayıdaki araştırma, HKH fonksiyonlarının sürdürülmesinde görev yapan moleküler ağlara ait iki majör yolak için hayati roller belirlemiştir: Hücre-içsel (intrinsik) yolaklar (örn. Hücre döngüsü düzenleyicileri ve PI3-kinaz sinyal yolağı) ve hücre-dışsal (ekstrinsik) gelişimsel yolaklar (transforme edici büyüme faktörü beta (TGF- $\beta$ ), Wnt, Hedhegog, ve Notch). Bu düzenleyici ağların hayatsal bileşenlerinin, kanser olgusunda sıklıkla düzenleme bozukluğu sergilemeleri göz önüne alındığında, HKH' nin kontrolündeki bozuklukların hematolojik malignansilerin gelişimi ile sıkı ilişkisi şaşırtıcı değildir (Warr vd 2011).

## 2.2.2. HEMATOPOEZ-LÖSEMİ İLİŞKİSİ VE LÖSEMİLERİN SINIFLANDIRILMASI

Dünya Sağlık Organizasyonu (WHO)'nun verilerine göre Amerika'daki hematolojik malignansilerin %30.4'ünü lösemi oluşturmaktadır. Lösemi, kan hücrelerinde ya da öncülerinde mutasyon ve/veya kromozomal translokasyon meydana gelmesi sonucunda ortaya çıkan kontrol dışı çoğalmalar ile karakterize edilmekte olan (Crans ve Sakamoto 2001) kanser kök hücre kaynaklı bir hematolojik malignansidir (Şekil 2.2).

Bu malignansi, akut miyelositik lösemi (AML), akut lenfositik lösemi (ALL), kronik miyelosidik lösemi (KML) ve kronik lenfositik lösemi (KLL) olarak başlıca dört kategoriye ayrılmaktadır. Bu sınıflandırmalar lösemik blastın kökenleri (miyeloid/lenfoid) ve yayılma hızı (akut/kronik) temel alınarak yapılmaktadır. Bu alt türlerin sınıflandırılması ise temel olarak, morfolojik, sitokimyasal, immunofenotipik ve karyotipik özelliklere dayandırılmaktadır (Beksaç 1997).

Hematopatoloji Birliği ve Avrupa Hematopatolojistler Birliği, Dünya Sağlık Örgütü için hematolojik neoplazmları sınıflandırmak üzere ortak bir proje gerçekleştirmişlerdir. Hematolojik malignansilere ilişkin WHO tarafından teklif edilen sınıflandırma (1997) bu neoplazmları başlıca lineajlara (miyeloid neoplazmlar, lenfoid neoplazmlar, mast hücre bozuklukları ve histiosidik neoplazmlar) göre ayırmıştır. Her bir kategorinin içinde, morfoloji, immünofenotip, genetik özellikler ve klinik sendromların bir kombinasyonu olmak üzere farklı hastalıklar tanımlanmıştır. Bu kriterlerin her birinin göreceli önemi neoplazmlar arasında değişmekte ve bütün hematolojik malignansileri sınıflandırmak için altın bir standart bulunmamaktadır.

Fransız-Amerikan-İngiliz (FAB) sınıflandırmasında, miyeloid neoplazmların başlıca üç kategorisi bulunmaktadır: akut miyeloid lösemiler, miyelodisplastik sendromlar ve miyeloproliferatif bozukluklar (Bennett vd 1985). Morfolojik, sitokimyasal ve immünofenotipik özellikler kullanılarak saptanan neoplastik hücrelerin blast sayısı, lineaj bağlılığı ve farklılaşma derecesi tanımlanan kategorilerin başlıca belirleyicileridir. Yakın zamanda, sitogenetik ve moleküler genetik özelliklerin yanı sıra önceki tedaviler ve miyelodisplazi hikayesi gibi başka durumların da bu bozuklukların klinik davranışı

üzerinde anlamlı bir etkisi olduğu gösterilmiştir ve bu özellikler her zaman FAB kategorileriyle mükemmel bir korelasyon göstermemektedir. Böylece, genetik ve klinik özelliklerin patoloğlar tarafından kullanılabilir şekilde morfoloji, sitokimya ve immünofenotiple ne şekilde integre olabileceği başlıca tartışma konusu olmuştur. Patoloğlar, başlıca dört miyeloid hastalık grubunu öne sürmektedirler:

Miyeloproliferatif hastalıklar (MPD)

Miyelodisplastik/miyeloproliferatif hastalıklar (MD/MPD)

Miyelodisplastik sendromlar (MDS)

Akut miyeloid lösemiler (AML)

AML kategorisinin içinde dört temel grup tanımlanmaktadır:

1. Tekrar eden sitogenetik translokasyonlara sahip AML;
2. Miyelodisplazi ile ilişkili özelliklere sahip AML;
3. Terapi ilişkili AML ve MDS.
4. Başka şekilde kategorize edilmeyen AML.

Miyeloproliferatif hastalıklar (MPH), bir ya da daha fazla hücre serisinin artmış periferel kan düzeyleri ve hepatosplenomegali ile sonuçlanan 'etkin' hematopoezle karakterize edilen; kemik iliğinde olgunlaşma ile birlikte ve displazi olmaksızın hiperhücreliliğinin gözlemlendiği klonal kök hücre bozukluklarıdır. Miyeloproliferatif bozukluklar arasında prototip, Philadelphia kromozom (Ph1)+(BCR/ABL+) kronik miyeloid lösemidir (KML). Diğer kabul edilen sınıflar, polisitemi vera, idiyopatik miyelofibrozis ve esansiyel trombositemidir. Bu grup içindeki tartışmalar, gençlik kronik miyeloid lösemisi, kronik miyeloid lösemi ve atipik KML'nin sınıflandırılması ile ilgili olarak devam etmektedir.

Lenfoid neoplazmlara ilişkin WHO sınıflandırması ise, uluslararası lenfoma çalışma grubu tarafından teklif edilen, revize edilmiş Avrupa-Amerikan lenfoid neoplazmlar sınıflandırması (REAL)'i benimsemiştir. Bu sınıflandırma, morfoloji, immünofenotip, genetik özellikler ve klinik özellikler gibi ulaşılabilir bütün bilgilerin kullanıldığı farklı

hastalık gruplarını tanımlamak için kullanılmaktadır. Teklif edilen sınıflandırma B-hücre neoplazmları, T/NK-hücre neoplazmları ve Hodgkin hastalığını tanımlamaktadır. T ve B hücre neoplazmları, prekürsör veya lenfoblastik, neoplazmlar ve olgun B ve T-hücre neoplazmları olarak sınıflandırılmaktadır. Olgun B ve T hücre neoplazmları, başlıca klinik göstergelerine bağlı olarak resmi olmayan şekilde gruplandırılmışlardır: Ağırlıklı olarak yayılmış/lösemik, primer ektranodal ve ağırlıklı olarak nodal hastalıklar. Bu değişikliklerle ilgili ve foliküler lenfomanın derecelendirilmesi, Burkitt-benzeri lenfomanın tanımlanması, büyük B-hücre lenfoma, olgun T-hücre lenfomalarının alt sınıflandırılmaları ve non-Hodgkin lenfomaların klinik gruplandırılması gibi tartışmalı ve sorunlu konularla ilgili olarak patologlar klinisyenlerden görüş almışlardır. T ve B tiplerdeki prekürsör neoplazmların lösemik fazı için akut lenfoblastik lösemi (ALL) teriminin kullanılmasına karar verilmiştir.

2008 yılında gerçekleşen WHO sınıflandırmasında ise 'miyeloid' terimi, granülositik (nötrofil, özinofil, bazofil), monosidik/makrofaj, eritroid, megakaryositik ve mast hücre lineajlarına ait olan tüm hücreleri içermektedir. Miyeloid neoplazmlar için WHO kriteri, şüphelenilen bir hematolojik neoplazm için herhangi bir tanımlayıcı tedavi almamış başlangıç diagnostik periferal kan ve kemik iliği örneklerine uygulanmaktadır. Morfolojik, sitokimyasal ve/veya immünofenotipik özellikler neoplastik hücrelerin lineajının belirlenmesi ve olgunlaşmalarının değerlendirilmesi için kullanılmaktadır. Blast yüzdesi miyeloid neoplazmları kategorize etmek ve ilerlemelerini belirlemek için pratik bir araçtır. WHO'nun değerlendirmesine göre, de novo olarak periferal kan veya kemik iliğinde %20 veya daha fazla blast içeren miyeloid bir neoplazm akut miyeloid lösemi olarak kabul edilmektedir. Blastlar, miyelodisplastik sendromun morfolojisi üzerindeki uluslararası çalışma grubu tarafından teklif edilen kriterler kullanılarak tanımlanmaktadır (Mufti vd 2008). Akut lösemi için, blast lineajını saptamak üzere çok parametrelili (3 ya da daha fazla renk) akım sitometri tercih edilen bir metoddur.

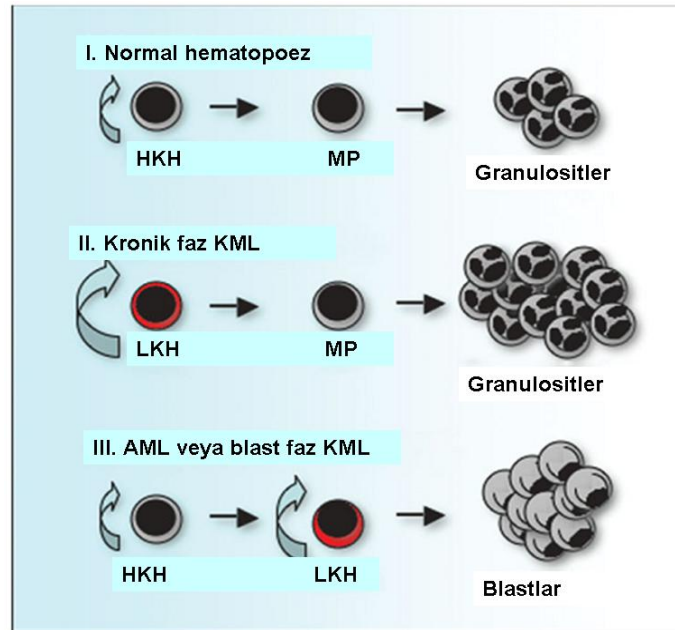
Ayrıca, 1997 yılında sunulan WHO raporunda KML' nin diaagnozunun doğrulanması için Ph kromozomunun ve/veya BCR-ABL1 füzyon geninin saptanmasının kullanıldığı, BCR-ABL1-negatif MPN alt tiplerinin ise klinik ve laboratuvar bulgularına göre teşhis edildiği bildirilmiştir. MPN alt tiplerinin birbirlerinden ve MPN'yi taklit eden reaktif granülositik, eritroid ve/veya megakaryositik hiperplaziden ayrılması için bir dizi kritere ihtiyaç



duyulmaktadır. KML gibi diğer MPN'lerde, anormal proliferasyonun, klonal tekrar düzenlemelere veya konstitütif olarak aktif olmuş sinyal ileti yollarına yol açan yüzey veya sitoplazmik protein tirozin kinazları kodlayan genlerin mutasyonlarına bağlı olarak gerçekleşmektedir.

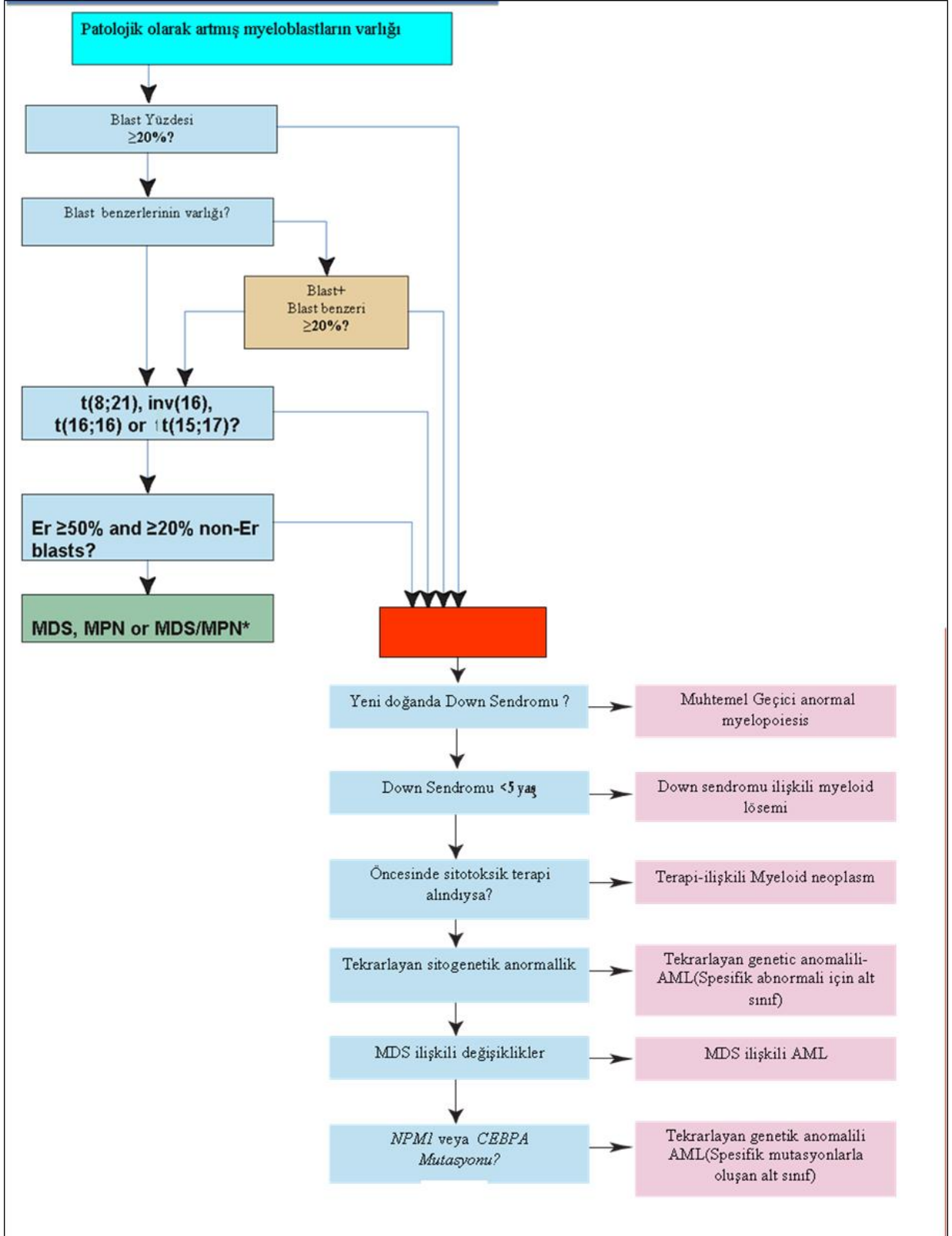
### 2.3. AKUT MİYELOİD LÖSEMİ (AML)

AML, erken hematopoetik kök hücrelerde bir dizi genetik değişiklik sonucunda normal hematopoetik büyüme ve farklılaşmanın bozulması sonucunda, kemik iliği ve periferik kanda çok sayıda anormal olgunlaşmamış miyeloid hücrenin (miyeloblast) birikimi ile karakterize olan bir hastalıktır (Stone vd 2004).



Şekil 2.2. Normal ve Anormal Hematopoez

**Çizelge 2.1. AML Tanısı ve Tiplendirilmesi**



**AML= Akut Miyeloid Lösemi; Er = Eritroid hücreler; MDS = miyelodisplastik sendrom; MPN = miyeloproliferatif neoplazm; E=evet; H=hayır**

**Cizelge 2.2.AML'nin biyolojik sınıflandırılması tedavi için ip uçları ve testler**

AML Alt Tipi	Klinik Özellikleri	CBC/ Kan Morfolojileri	Kemik İliği Aspiratı	Flow Sitometri
<b>AML t(8;21) (q22;q22); (RUNX1- RUNX1T1)</b>	Genç Erişkinlerde, Erişkin AML'nin %7'si Pediatrik AML'nin %10-%15'i	Sitopeni, Nötrofilik olgunlaşmayla blastların sirkülasyonu	Blast < %20 Somon renkli sitoplazma Uzun konik Auer çubuklar	Blastlar: CD34+, CD117+, CD13+, CD33+, CD19+, CD79a+, TdT+ Veya CD56+
<b>AML inv(16) (p13.1;q22), t(16;16) (p13.1;q22) CBFB-MYH11</b>	Genç Erişkinlerde, Erişkin AML'nin %8'si Pediatrik AML'nin %6-%12'i	Sitopeni, t(8;21) e gore Yüksek WBC ve Blast Sayısı, Ağırlıklı monositik hücreler, miyeloid blastlar	Blast < %20 Karışmış eozinofil –bazofil granüllü anormal eozinofiller, Değişken monositik bileşenler	2 farkı popülasyon mevcuttur: 1.Blastlar (CD34+, CD117+, zayıf CD45+, miyeloid antijenleri +) 2.monositik hücreler (CD45+,yüksek CD36/CD64 koekspresyonu, yüksek CD33+, CD34-, CD117-, HLA-DR+)
<b>AML t(15;17) (q22;q21); PML-RARA*</b>	yaygın damar içi pıhtılaşma Genç Erişkinlerde, Erişkin AML'nin %5-%12'si Pediatrik AML'nin %8-%15'i	Lökositöz-Mikrogranüller değişiklikler Lökopeni-Hiper granüler değişiklikler Derin trombositopeni Nadir hiperbazofilik değişiklikler	Anormal premyelositler baskındır (Blast<%20), Hipergranüler değişiklikler (Vakaların çoğunluğunda): Tek bir hücrede granüller çok sayıda auer çubuklar ile dolu, Mikrogranüller değişiklikler (Vakaların %20 si): Böbrek tipinde loblu çekirdekli granüller,Güçlü üniforma sitokimyasal MPO pozitifliği	Klasik olarak CD34-, HLA- DR-, CD33+ 2dir. Mikrogranüler varyanlar CD2 ve CD34 ekspresyonları yüksektir Vakaların %20'sinde CD56 ; kötü cevap ile ilişkilidir.
<b>AML t(9;11) (p22;q23); MLLT3-MLL</b>	Çocuklarda çok fazla yaygın Pediatrik AML'nin 5% - 20% Erişkin AML'nin 4% - 5%	Anemi, trombositopeni Değişen WBC sayısı ve blastlar	Monositik blastlar/blast benzeri yapılar	CD36/CD64'nın koekspresyonu mevcuttur, HLA-DR+, güçlü CD33 +, zayıf CD4+, CD56+, CD45+, CD34-, CD117- Değişken CD14, genelde negatif
<b>AML t(6;9) (p23;q34); DEK-NUP214</b>	Genç erişkinler (ortalama 30 yaş) Pediatrik ve erişkin AML'nin %1'i	Vakaların 50%'sinde Basofil (≥2%), WBC oranı tipik AML'den daha düşük olabilmektedir.	Geçmiş miyelodisplazi, Monositik özellikler ve arada halka sideroblastlar görülebilmektedir.	Tipik miyeloid fenotip: Zayıf CD45 +, CD34+, CD117+, CD13+, CD33+
<b>AML inv(3) (q21;q26.2) veya t(3;3) (q21;q26.2) RPN1-EVI1</b>	Muhtemel hepatosplenomegali	Normal veya artmış dev trombositler, Hipogranüler trombositler; dolaşan çıplak megakaryositik çekirdekler	Oldukça küçük hipoloblu megakaryositler, Multilineage displazi	Blastlar CD34, CD13, CD33 ekspresye eder; CD7, CD41 ve CD61 ekspresye edebilirler.
<b>AML t(1;22) (p13;q13); RBM15-MKL1</b>	Down sendromlu olmayan bebeklerin ve küçük çocuklar (yaş <3 ) ile sınırlıdır, Organomegali taşıyan	Bazofilik sitoplazma ve sitoplazmik loblu Megakaryoblastlar; Küçük blastlar daha lenfoblastik görünüm gösterebilir.	Mikromegakaryositler; Granülositik ve eritroid displazi belirgin değildir.	Blastlar CD41 ve CD61; CD42b oldukça değişken. CD36 +olabilir. CD34, MPO, CD45 genelde negatif
<b>NPM1 mutasyonlu AML</b>	Yaşlı erişkinlerde de-novo Akut lösemi	WBC oldukça yüksek olabilir	Hepsinde olmamakla beraber Bir çok vakada monositik farklılaşma vardır, Akut monositik lösemilerin% 80- %90'ı NPM1 mutasyona uğramıştır. Blast yüzdesi oldukça yüksektir.	Blastlar CD34 negative, CD14, CD11b ve CD68 ekspresye ederler. Tipik Monositik antijenleri ekspresye ederler (CD36/CD64)
<b>CEBPA mutasyonlu AML</b>	De novo AML'nin %5-%6 sında oluşur,yaş ve cinsiyet etkilemez	Oldukça yüksek hemoglobin ve kan blast sayısı Oldukça düşük trombosit sayımı	Bir çok vaka maturasyonlu veya değil AML'nin özelliklerini gösterir. Özel morfolojik özellikleri yoktur.	Blastlar tipik miyeloid antijenleri ekspresye ederler genelde CD34+, vakaların çoğunda da CD7 ekspresye ederler.

### **2.3.1 AML'NİN EPİDEMİYOLOJİSİ**

Amerika'da AML insidansı 100.000 kişide 3.4 vaka olarak gerçekleşmekte (Deschler vd 2006), her yaştaki kişide görülebilmekte, fakat genellikle miyeloid kökenli olan akut lösemilerin toplam görülme insidansı ve oranı yaşla artmaktadır. Buna karşın akut lenfoblastik lösemi (ALL) çocuklarda daha çok görülmekte iken teşhis edilen her 5 ALL vakasına karşılık sadece 1 AML teşhis edilmektedir. Çocukluk AML'si için pik insidansı hayatın birinci yılı için ortaya çıkmakta, daha sonra 4 yaşına kadar azalmakta ve erişkinlik boyunca sabit kalmaktadır (Gurney vd 1995). AML insidansı daha sonra, %70-80 akut lösemilerin AML olduğu erişkinlik boyunca artmakta ve yaşlılarda belirgin yüksek bir artış sergilemektedir. Bu artan insidansın çoğu miyelodisplazi ile ilişkili değişikliklerin görüldüğü, yaşla daha yaygın olarak ortaya çıkan AML'ye atfedilmektedir. De novo AML insidansı ise tüm erişkin yaş gruplarında hemen hemen aynı kalmaktadır (Deschler vd 2006). AML, tüm yaş gruplarında benzer klinik özellikler göstermekte olup, semptomlar blastik hücrelerin kemik iliği hücrelerinin yerini alması sonucu bozulmuş hematopoezis ve buna bağlı gelişen sitopenilere dayanır (Beksaç vd 1997).

### **2.3.2 AML'NİN MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ**

#### **2.3.3. AML'DE MİYELOİD TRANSKRİPSİYON FAKTÖRLERİNİN FONKSİYONU**

Transkripsiyon faktörleri DNA üzerinde belli bir diziyeye bağlanabilen ve genlerin transkripsiyonunu düzenleyen diziyeye-öзgün DNA'ya bağlanma proteinleridir. Transkripsiyon faktörleri tek başına veya bir komplekste yer alan başka proteinlerle beraber, genin transkripsiyonunu kolaylaştırır veya engeller (Sekil 2.3).

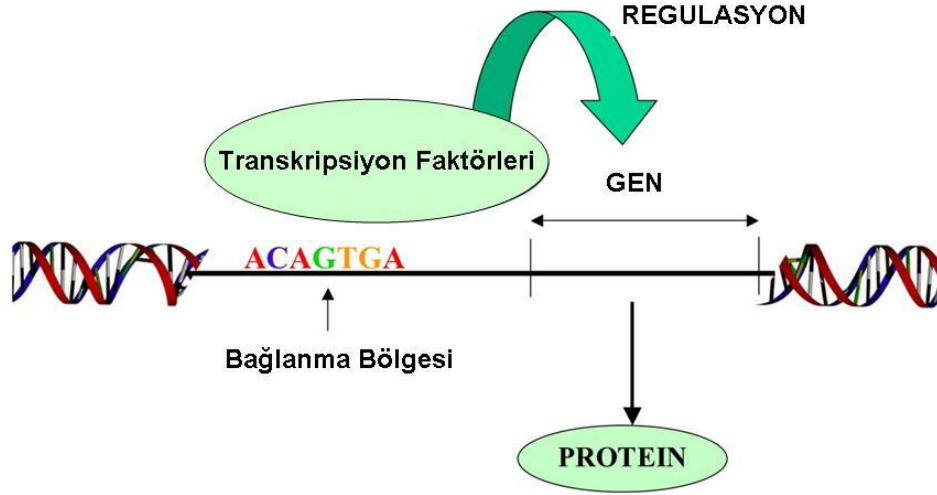
Hematopoetik öncül hücrelerin proliferasyon ve hayatta kalma durumları, büyüme faktörü reseptörleri ve onların sinyalleme ara ürünleri tarafından düzenlenmektedir. Ancak, bunun yanında transkripsiyon faktörlerinin bir ağı ise hücre tipine spesifik bir gen ifade profilini düzenlemekte ve hücreler ile erken öncülleri çeşitli lenfoid ve miyeloid serinin tamamen farklılaşmış hücrelerine doğru yönlendirmektedir. Multipotent projenitör hücrelere dair yakın zaman önce öne sürülen bir model, kök hücrelerin farklı seri spesifik transkripsiyon

faktörlerini düşük düzeylerde ifade ettiğini ortaya koymaktadır (Tenen vd 1997; Voso vd 1994). Bir sonraki basamakta, çevreyle ve stromayla olan ilişkiler ve büyüme faktörlerinin konsantrasyonundaki lokal farklılıklar seriye-özü transkripsiyon faktörü yolaklarının aktivasyonuna yol açarak özgün bir hematopoetik seride farklılaşmayı yönlendiren düzenlenmiş bir gen ekspresyon değışiklik programını başlatmaktadır (Rekhtman vd 1999; Zhang vd 1999; Zhang vd 2000).

Hematopoetik bozuklukların analizleri ve tek transkripsiyon faktörlerinin hedeflenerek bozulması, hematopoetik öncüllerin hücre kaderini belirleyen transkripsiyonel olarak aktif başlıca iki sınıfı ortaya koymuştur: ilk grup, transkripsiyon faktörü AML1 gibi hemen hemen bütün hematopoetik serilerin gelişimi ile ilişkili olan transkripsiyon faktörlerinden oluşmaktadır. AML1, hematopoetik kök hücrelerin oluşumu olan hematopoiezin ilk basamağını kontrol eden başlıca düzenleyici bir proteindir (Okuda vd 1996; Wang vd 1996). Diğer grup transkripsiyon faktörleri ise daha seriye özgüdür, bu da, c/EBP $\alpha$ , ve  $\epsilon$ , veya GATA-1 eritroid transkripsiyon faktörleri gibi erken ve geç davranan granülositik transkripsiyon faktörleri gibi tanımlamaya izin vermektedir.

Transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesinde hücre tipine özgülük ve ifade düzeylerinin yanı sıra fosforilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlar da görev yapmaktadır. Transkripsiyon faktörleri genellikle fonksiyonlarını, çoklu seviyelerde regülasyon sağlayan multiprotein-DNA komplekslerinde gösterirler. Bu komplekslerin fonksiyonlarından bir tanesi transkripsiyon faktörlerini hücrenin temel transkripsiyonel makinesine bağlamaktır. Diğer taraftan, bu kompleksler bazal transkripsiyonel makinenin DNA'ya genel erişebilirliğini değıştiren proteinleri içermektedirler. Bu mekanizmalar, epigenetik modifikasyonlar olarak adlandırılırlar. Bir nükleer hormon reseptörü olan RAR $\alpha$ 'nın regülasyonu da buna örnektir.

Doğru olarak regüle olan veya bozulan transkripsiyon faktörlerinin en son çıktısı, seriye-özü genlerin regülasyonudur. Bu da, kromatinin tekrar modellenmesi gibi epigenetik değışiklikler tarafından veya hedef promotorların doğrudan aktivasyonuna bağlı olarak gerçekleşebilmektedir.



**Şekil 2.3** Transkripsiyon faktörleri, özgün bağlanma bölgesinden DNA'ya bağlanır ve genden protein üretimini regüle eder.

Genel ve seriye özgü olan transkripsiyon faktörlerinin dengede olması, hematopoetik progenitörlerin spesifik lineajlara yönlenmesi için ihtiyaç duyulan gen ifade profillerinin indüklenmesi için gereklidir. Bu sürecin inhibisyonu, AML' nin başlıca işaretleri arasında yer almaktadır. Bu nedenle, AML-spesifik kromozomal translokasyonların ve mutasyonların sıklıkla bu transkripsiyon faktörlerini hedeflediklerinin anlaşılması, AML'deki farklılaşma bloğu ile olan ilişkilerini de güçlü bir şekilde ortaya koymuştur. Bu mutasyonlar, sadece miyeloid hücrelerin farklılaşmasını etkilemekle kalmaz, aynı zamanda, hücre döngüsü ve apoptozun önemli düzenleyicilerinin ifadesini etkileyerek veya transkripsiyon faktörleri ile fiziksel birlikteliğe girerek veya fonksiyonlarının modifikasyonu aracılığı ile proliferasyon ve hayatta kalmalarını da etkilerler.

Bütün bu bilgiler bir araya getirildiğinde, miyeloid transkripsiyon faktörleri yüksek düzenleme gösteren sinyal iletim yolları ağının bir parçasıdır ve belirli bir kan hücresinin fenotipini tanımlayan gen ekspresyonunun regülasyonu için gerekli hücre programlarının önemli bir kısmını oluşturmaktadır.

### **2.3.4. AML PATOGENEZİNDE TANIMLANMIŞ GEN MUTASYONLARI**

1. Hücre proliferasyonunda payı olan genleri etkileyen mutasyonlar (FLT-3, c-KIT, RAS, protein tirozin standart fosfataz nonreseptör 11)
2. Miyeloid farklılaşmada yer alan genleri etkileyen mutasyonlar (AML1 ve CEBPA)
3. Apoptoz ya da hücre siklusunun düzenlenmesinde yer alan genleri etkileyen mutasyonlar (P53, NPM1)

#### **2.3.4.1 FLT3 GEN MUTASYONLARI**

FMS benzeri tirozin kinaz 3 (FLT3) geni, kromozom 13q12 üzerinde lokalize olur ve RTK subclass III ailesine ait olan, membran bağlı resptör tirozin kinaz (RTK)'yı kodlar(Agnes vd 1994). FLT3, normal olarak miyeloid ve lenfoid progenitör hücrelerde eksprese edilir ve hematopoetik hücre farklılaşmasında ekspresyon kaybolur. FLT3, proliferasyonda, farklılaşmada ve multipotent kök hücrelerin hayatta kalmasında önemli rol oynar ve AML blastlarında protein ve RNA seviyesinde yüksek ifade edilir (Gilliland vd 2002, Carow vd 1996). FLT3, AML'de en sık rastlanan somatik değişikliklerden biridir, AML hastalarının %25-45'inde bulunur. FLT3 mutasyonları FLT3-ITD ve FLT3-TKD mutasyonları olmak üzere iki major tipten meydana gelir (Whitman vd 2001, Zwaan vd 2003, Yamamoto vd 2001)

FLT3 mutasyonları, FLT3 ligandı yokluğunda reseptörün konstitüf fosforilasyonuna ve janus kinaz 2 (JAK2/STAT5), ras/mitojen activated protein kinaz (MAPK) ve fosfatidilinositol 3 kinaz/AKT gibi yolların downstream aktivasyonuna yol açar. Bununla beraber, FLT3-ITD ve FLT3-TKD mutasyonlarına downstream hücresel cevabın eşit olmadığını destekleyen kanıtlar giderek artmaktadır. Sıçan kemik iliği transplantasyon modellerinde, transgenik fareler gibi, FLT3-ITD, insan kronik miyeloid lösemiye benzeyen miyeloproliferatif hastalıkları, FLT3-TKD, oligoklonal lenfoid hastalığı indükler fakat ne FLT3-ITD ne de FLT3-TKD mutasyonları AML'yi indüklemeyebilir. Ayrıca, FLT3 mutasyonlarının, hastalığın yeniden nüksünde ya da hastalığın ilerlemesinde, kazanılabilir ya da kaybedilebilir olması durumu, FLT3 mutasyonlarının lösemiyogenezde ikincil olaylar olması hipotezi ile uyumludur (Kottaridis vd 2002, Shih vd 2002)

#### **2.3.4.2. c-KIT GEN MUTASYONLARI**

Kit protoonkogeni, kromozom band 4q12 de lokalizedir ve ligandı kök hücre faktörü (SCF) olan, tip III RTK ailesinin üyesi olan transmembran glikoproteini kodlamaktadır(Blume-Jensen vd 2001, Reilly vd 2003). SCF bağlanması, c-KIT dimerizasyonunu ve özellikle hematopoetik kök hücrelerin, proliferasyon, farklılaşma, migrasyon ve hayatta kalmasında yer alan downstream sinyalleme yollarının aktivasyonuna neden olan transfosforilasyonu tetikler. c-KIT'in ligand bağımsız aktivasyonu, AML ve ayrıca diğer insan malignansilerinde (mast hücre disorları, gastrointestinal stromal tümörler ve testikular eşey hücre tümörlerinin dahil olduğu) bildirilen farklı tip mutasyonlar tarafından tetiklenir(Lennartsson vd 2005).

c-KIT mutasyonları, AML'nin spesifik sitogenetik altgruplarında (CBF AML ve trisomy 4 AML) yüksek insidans ile tanımlanmıştır ve genellikle diğer AML alttiplerinde gözlenmez (Care vd 2003).

CBF AML'de, c-kit mutasyonlarının tespiti, sonucun önceden belirlenmesinde ve ayrıca c-kit aktive edici mutasyonlar tirozin kinaz inhibitörleri için hedef olduklarından dolayı, terapötik implikasyonlar için önemlidir(Renneville vd 2008).

#### **2.3.4.3. RAS GEN MUTASYONLARI**

RAS onkogeni, c-KIT ve FLT3'ün dahil olduğu, pek çok membran resptörüne bağlanan sinyal transdüksiyonunu regüle eden, guanin nükleotid bağlama protein ailesini kodlar ve proliferasyonda, farklılaşmada ve apoptozda önemli rol oynar. RAS proteinleri normalde aktif (GTP bağlı) ve inaktif (GDP bağlı) formlar arasında dengededir (Mitin vd 2005 , Ayllon vd 2000).

Üç fonksiyonel Ras geni vardır. N (nöroblastoma hücre serisinden), K (Kirsten) ve H (Harvey) RAS. Her biri dört ekzon içerir. N ya da K deki mutasyonlar, intrinsik RAS GTPaz aktivitesini baskılayan, RAS kodon 12, 13 ya da 61'de tek baz değişimi tarafından gerçekleşir ve böylece ras proteinlerinin ve RAF ve MAPK/ERK kinazlar gibi downstream efektörlerin konstitüf aktivasyonu gerçekleşir (Beaupre vd 1999).



N ve K RAS genlerindeki nokta mutasyonlar AML hastalarının sırasıyla %10-15 ve %5'inde bulunur. Sıklıkla mutasyona uğrayan kodonlar N-RAS kodon12 (%43),(çoğunlukla glisinin asparajine dönüşümü ile sonuçlanır), N-RAS kodon 13 (%21) ve K-RAS kodon 12(%21). (Bowen vd 2005 , Bacher vd 2006). Mutasyonlu hastaların tümü, mutasyon bakımından heterozigot bulunur. MDS çalışmalarında, RAS mutasyonları, MDS'den AML'ye ilerleme ile önemli derece ilişkili bulunmuştur (Christiansen vd 2005). AML'de, RAS mutasyon sıklığı önemli derecede yaş, cinsiyet, initial leukocytosis ile değişmiyor görünmektedir (Bowen vd 2005, Bacher vd 2006, Neubauer vd 1994).

#### **2.3.4.4. PTPN11 GEN MUTASYONLARI**

PTPN11 geni(protein tirozin standart fosfatase nonreseptör 11), kromozom 12q24 üzerinde lokalize olur ve SHP2 diye bilinen, stoplazmik protein tirozin fosfatase (PTP)'ı kodlar.

Pediyatrik AML hastalarının yaklaşık %4,4'ü PTPN11 mutasyonu gösterir (Tartaglia vd 2005, Loh vd 2004 ). PTPN11 mutasyonlarının yetişkin AML hastaları arasındaki prevalansı daha az görünmektedir. Sekonder ya da de novo AML hastası 340 bireyin sadece 9'unda gözlenmiştir (Tartaglia vd 2004, Johan vd 2004, Watkins vd 2004 ).

**Çizelge 2.3.** AML'deki moleküler lezyonlar ve malignansi

Özellik	Otonom hücre proliferasyonu	Farklılaşma bloğu	Apoptozdan kaçmak	Artmış Kendini yenileme	Hücre siklus kontrolünün kaybı	Yayma
Moleküler lezyon	<p>-Aktive edici mutasyonlar: FLT3, Ras, c-Kit, c-FMS, Jak2, PTPN11</p> <p>İnaktive eden mutasyon: NF1</p> <p>-Autocine loops: (Trk-A, upregülasyonu RUNX1-MTG8 tarafından gerçekleştirilmektedir)</p>	<p>-Füzyon transkripsiyon faktörleri</p> <p>-Retinoik asit reseptörü</p> <p>PML-RAR<math>\alpha</math>, PLZF-RAR<math>\alpha</math></p> <p>-Core binding factor (çekirdek bağlama faktörü) RUNX1-MTG8</p> <p>CBF<math>\beta</math>-MYH11</p> <p>RUNX1-EVI1</p> <p>-MLLfüzyonlar</p> <p>-Hox genifüzyonları ve yüksek ifadesi</p> <p>-Transkripsiyon faktörlerindeki nokta mutasyonu</p> <p>Pu.1, C/EBP<math>\alpha</math>, RUNX1</p> <p>-FLT3, C/EBP<math>\alpha</math> ekspresyonunu inhibe etmektedir.</p>	<p>-RTK aktivasyonu izleyen AKT yolağının aktivasyonu, BAD deaktivasyonuna neden olmaktadır.</p> <p>-Yaşlı AML hastalarındaki P53 mutasyonları</p> <p>-Füzyon proteinleri, NPM mutasyonları neden olduğu P53, regülasyon bozukluğu</p> <p>-Bcl2'nin yüksek ifadesi</p> <p>-Survivin (IAP)'nin yüksek ifadesi</p>	<p>-<math>\beta</math>-catenin mutasyonları</p> <p>-Füzyon transkripsiyon faktörleri tarafından aktive olan Wnt Catenin yolağı</p> <p>-Aktive olmuş RTK yolları kendini yenilemeyi indüklemek üzere iş birliği yapmaktadır</p>	<p>-P53'ün fonksiyon bozukluğu</p> <p>-Rb kaybı</p> <p>-P15, P16 siklin bağımlı kinaz genlerinin metilasyonu</p>	<p>Lösemik blastlardan TNF'nin salgılanması endotelii uyandır.</p> <p>Artan selektin, kaderin ve integrin ifadesi, adhezyonu ve damardan çıkışı artırmaktadır.</p>

### **2.3.5. AML PATOGENEZİNDE TANIMLANMIŞ SİTOGENETİK DEĞİŞİKLİKLER**

Lösemik hücrelerin genomik instabilitesi kısmen çeşitli mekanizmalarla p53'ün dönüşümü aracılığıyla açıklanabilmektedir. AML'de solid organ ve hematopoetik kök hücre transplantından (Offman vd 2004) sonra defektif mismatch tamiri belirlenmiştir ve MSH2'de gözlenen polimorfik bir splice bölgesi, artmış AML riski ile ilişkilendirilmektedir. Buna ek olarak, AML füzyon transkripsiyon faktörleri DNA tamiri ile ilişkili olan genleri repress etmektedir (Alcalay vd 2003).

Akut Miyeloid Lösemi'de sıklıkla sitogenetik anomaliler gözlenmektedir. En sıklıkla görülen anomali t(8;21) (q22;q22) translokasyonu (AML1-ETO füzyon proteini) iken bu anomaliyi, t(15;17) (q22:22) (PML-RAR $\alpha$  füzyon proteini) translokasyonu izlemektedir (Estey vd 2006). Çok sayıdaki çalışmada, t(15;17), inv(16)/t(16;16), veya t(8;21) taşıyan hastaların kompleks karyotip ve monozomi 7 taşıyan hastalara göre daha iyi prognoz gösterdikleri belirlenmiştir (Mrozek vd 2008). Buna ilaveten, t(8;21), inv(16)/t(16;16), veya t(15;17) taşıyan kromozomal değişiklikler de gözlenmekte ancak bu değişikliklerin prognozu etkilemediği belirlenmiştir (Kelly vd 2009, Schlenk vd 2004). 60 yaşın üzerindeki de novo AML hastalarında, bazı sitogenetik risk gruplarının önemi daha genç hastalardan farklılık gösterebilmektedir.

### **2.4. AML: HEMATOPOETİK KÖK HÜCRE HASTALIĞI**

Günümüzde kök hücre çalışmalarının kanser araştırmalarını yakından aydınlattığı bilinmekte olup, kök hücrelerle kanser hücreleri arasında birçok benzerlik ortaya çıkarılmıştır. Sonsuza kadar çoğalabilme ve farklılaşmadan yaşamını sürdürebilmeleri kök hücrelerin kanser gelişimindeki rolünü belirleyici özellikler arasında yer almaktadır (Reguart vd 2005).

AML hastalığının kökeninde ve ilerlemesinde, lösemik kanser kök hücreleri de önemli rol oynamaktadır. AML, kanser kök hücrelerinin ilk kez 1997 yılında Dick ve arkadaşları tarafından tanımlandığı hastalık olması (Hope vd 2004, Bonnet vd 1997) ile ayrı bir önem taşımaktadır. Sonraki yıllarda yapılan çeşitli çalışmalarda kanser kök hücrelerinin solid

tümörler şeklinde gelişen beyin (Yuan vd 2004, Singh vd 2004), meme (Al-Hajj vd 2003), ovaryum (Bapat vd 2005) kanserlerinin gelişimiyle de ilişkili oldukları gösterilmiştir. Normal HKH gibi kendini yenileyebilen ve farklılaşabilen bu kanser kök hücre popülasyonunun hematolojik malignansilerde gözlenen şekli lösemik kök hücre olarak ifade edilmekte, anormal bir şekilde kendini çoğaltmakta ve tümörde bulunan pek çok hücreye benzer bir şekilde farklılaşmış öncünün oluşmasına yol açmaktadır. LKH, fonksiyonel olarak, transplante edildikleri farede seri bir biçimde hastalığın yayılmasına yol açan özgün yetenekleri ile de tanımlanmaktadır. LKH'nin, hastalığın evresine (kronik neoplazm, akut lösemi), immünofenotipine (myeloid, lenfoid) ve transforme edici olayın doğasına (pediyatrik akut miyeloid lösemi ile ilişkilendirilen MLL füzyon genleri gibi kromatini tekrar modelleyen faktörler, KML ile ilişkili olan BCR/ABL gibi aktive olmuş tirozin kinazlar) bağlı olarak, transforme HKH'den veya daha yaygın olarak bulunan transforme projenitör hücrelerden köken alabildiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.

Lösemik kök hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşmaları arasındaki hassas dengeyi, çeşitli genler ve bu genlerin düzenlediği sinyal yolları kontrol etmektedir. Bu yollar arasında yer alan Wnt/ $\beta$ -katenin, Notch, Hh (Hedgehog), TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ), PTEN (Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) ve Bmi sinyal yollarının anormal aktivasyonlarının kanser gelişimiyle ilişkilendirildiği de gösterilmiştir (Woodward vd 2005). Bu yollar arasında yer alan Wnt yolağı, hematopoez sırasında kemik iliği nişinde HKH proliferasyonunu düzenleme ve kendini yenileme kapasitesini sürdürme gibi çok önemli fonksiyonlar üstlenmekle birlikte, kanonikal Wnt sinyal yolağının aktivasyonunun çeşitli malignansilerde onkogenik rol oynadığı bildirilmiştir.

## **2.5. BİR KÖK HÜCRE VE AML SİNYAL YOLAĞI: WNT**

Wnt proteinlerinin, proto-onkogenik özelliklerinin yanı sıra hücre büyümesi, hücre adezyonu, hücre hareketi, hücre polaritesi ve farklılaşmasını düzenlediği bilinmektedir. Ayrıca kök hücrelerin özelleşmesinde ve pek çok dokunun embriyonik gelişiminde (özellikle merkezi sinir sistemi, böbrek, meme bezleri ve dokusu, ve ekstremitelerde) de Wnt proteinleri önemli rol oynamaktadır (Prunier vd 2004). Hem erken embriyolojik dönemde hem de çeşitli kanser türlerinde aktive olduğu bilinen Wnt sinyal ileti yolu son

yıllarda kanser araştırmacıları tarafından oldukça dikkat çekmeye başlamıştır, çünkü bu sinyal yolağındaki birçok genin neoplastik transformasyona neden olduğu bilinmektedir.

### **2.5.1. WNT/ $\beta$ -KATENİN (KANONİKAL) SİNYAL YOLAĞI**

Wnt/ $\beta$ -katenin (Kanonikal) sinyal yolağı, üç farklı Wnt sinyal yolağından birisi olup kanser gelişiminde rol oynayan en temel yolaktır. Bu yolağın anlaşılmasında merkez rolü  $\beta$ -katenin oynar.  $\beta$ -katenin sitoplazmada bulunan bir proteindir, Wnt sinyal aktivasyonu ile çekirdeğe taşınır. Böylelikle çok sayıda genin transkripsiyonunu aktive eder. Aynı zamanda bu yolak çok sıkı bir şekilde kontrol edilir, ancak ihtiyaç duyulduğu zaman aktive olur (Ilyas vd 2005). Bu yolağın en temel komponentleri; multiprotein kompleksini (yıkım kompleksini) oluşturan Axin-Adenomatous Polyposis Coli (APC)-Glikojen Sentaz Kinaz 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) ve bu yıkım kompleksinin antagonistleri olan Dishevelled (Dvl)-Kazein kinaz $\epsilon$  (CKI $\epsilon$ )-GBP/Frat ve de  $\beta$ -katenin'den oluşur (Miller vd 2003). Wnt sinyali varlığında veya yıkım kompleksi elemanlarının mutasyona uğraması gibi  $\beta$ -katenin'in yıkılamadığı durumlarda,  $\beta$ -katenin sitoplazmadan nükleusa geçer ve TCF/LEF (T Cell Factor/Lenfosit enhancer binding factor) ile birleşerek bir çok genin aktivasyonunu sağlar.

### **2.5.2 $\beta$ -KATENİN**

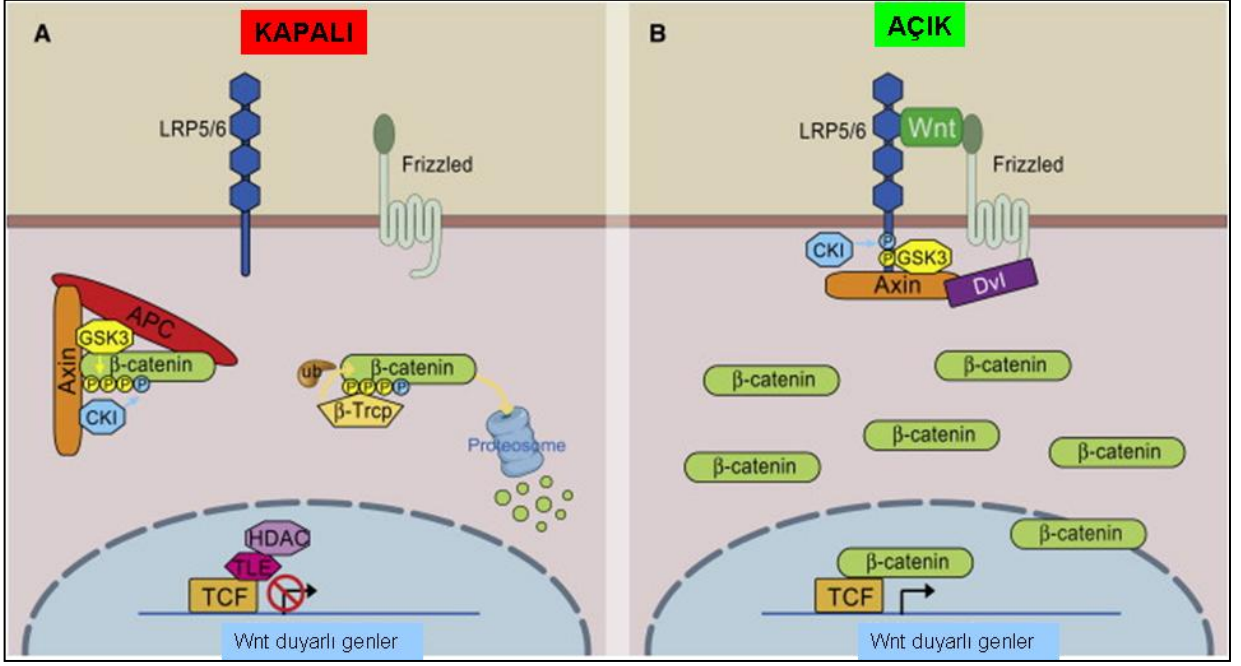
1989 yılında transmembran kaderinler ile bağlı plazma membranındaki intraselüler yüzey proteinleri olarak tanımlanmıştır (Novak vd 1999). Sinyal iletiminde ve hücre adezyonunda önemli rolü olduğu bilinmektedir.

İstirahat halindeki normal hücrede, Wnt aktivasyonu yokluğunda,  $\beta$ -katenin hücre membranında yerleşiktir, yani hücre yüzeyinde E-kaderin ve  $\alpha$ -katenin ile kompleks oluşturarak hücre iskeleti ile bağlantı yapmıştır (Perez-Moreno vd 2003). Serbest  $\beta$ -katenin sitoplazmik seviyeleri E-kaderin tarafından tüketilir ve Wnt sinyali inhibe edilir ve de hücre içi serbest sitoplazmik  $\beta$ -katenin düzeyi  $\beta$ -katenin'inin ubiquitin proteozom yıkılımından dolayı çok düşük düzeydedir. Ancak E-kaderin- $\beta$ -katenin kompleksi bozulursa serbest  $\beta$ -katenin seviyeleri artar ve sonuğa transkripsiyonel aktivite artar. Dolayısıyla bu sonuç  $\beta$ -katenin ile kaderin arasında dinamik bir ilişki olduğunu göstermektedir (Ilyas vd 2005). Buna ek olarak bir de  $\beta$ -katenin'in fosforlanmasına bağlı

olmayan bir yol daha mevcuttur. Bu yolda ise Siah-1, p53 tarafından uyarılarak  $\beta$ -katenin ve APC'nin C terminali ile ilişki kurar.  $\beta$ -katenin'in ubiquitinasyonuna neden olur. Böylelikle  $\beta$ -katenin degrade olur ve sitoplazmik seviyeleri düşer (Ilyas vd 2005)(şekil 2.4).

$\beta$ -katenin fiziksel olarak DNA'ya bağlanamadığı için, TCF/LEF transkripsiyon faktörleri,  $\beta$ -katenin ve hedef genlerin aktive edilmesi için temel bir kofaktördür (Ilyas vd 2005). TCF/LEF proteinleri sekansa spesifik DNA bağlanma proteinleri olup, DNA'nın (A/T) (A/T) CAA (A/T) G heptamerik konsensus motifi ile kompleks oluştururlar.  $\beta$ -katenin-TCF/LEF kompleksi diğer birtakım faktörlerle de; CBP/P300 asetil transferaz TATA bağlayıcı protein, DNA helikaz Pontin 52 kombinasyona girerek hedef genleri aktive ederler (Es vd 2003). Ancak ortamdaki Wnt sinyal yokluğunda TCF/LEF proteinleri, Groucho denilen transkripsiyonel represörler ya da başka transkripsiyonel represörlere bağlanarak hedef genlerin aktive olmasını engellemektedirler (Ilyas vd 2005). TCF/LEF/ $\beta$ -katenin kompleksinin hedef aldığı hücre proliferasyonunu düzenleyici ve gelişimi kontrol eden genlerdir. Dolayısıyla bu genlerin çoğu bilinen onkogenler olup kanser tedavisinde güçlü birer hedeftirler. Bu genler siklin D1, c-myc, matriks metalloproteinaz vb. genlerdir (Lustig vd 2003).

$\beta$ -katenin proteininin AML hastalığının moleküler patolojisindeki yeri son yıllarda yapılmış birçok çalışmada ortaya konmuştur. Bunlardan olmak üzere, 2004 yılında Serinsöz ve ark. yaptığı çalışmada  $\beta$ -katenin gen ekspresyon seviyelerinin akut miyeloid hastalarında oldukça yüksek olduğu ve bu AML hastalarında akut lenfoid lösemi (ALL) ve kronik miyeloid lösemi (KML) hastalarına oranla daha çok arttığı gösterilmiştir. Ysebaert ve ark. 2006 yılında AML hastalarında Wnt3a'ya cevap olarak  $\beta$ -katenin ekspresyon seviyelerinin özellikle AML'nin M1 ve M4 fazlarında arttığını bulmuşlardır.



Şekil 2.4. Wnt / β-katenin sinyal yolağı (MacDonald vd 2009'dan düzenlenmiştir).

### 2.5.2.1. β-KATENİNİN KANSER OLUŞUMUNDAKİ YERİ

Pek çok kanserde anormal Wnt/β-Katenin sinyal aktivasyonu gözlenmektedir. Bu anormal aktivasyonun başlıca sorumlusu ise Wnt sinyal yolağının genetik mutasyonlarıdır. β-Katenin yıkım kompleksinin bileşenlerinin genetik mutasyonları insan kanserlerinde son derece yaygındır (Çizelge 2.4). Bunların arasında, ilk olarak ailesel adenomatöz polipozisin etkeni olarak keşfedilen APC mutasyonları da yer almaktadır. Kolorektal kanserde β-Katenin' in kendisindeki mutasyonlar da belirlenmiştir. Sporadik kolorektal kanserlerin yaklaşık %80-90'ında APC gen mutasyonları, APC mutasyonu gözlenmeyen vakaların %50'sinde ise β-Katenin mutasyonları belirlenmiştir (Lustig ve Behrens 2003; Herbst ve Kolligs 2007). Bu mutasyonlar, β-Katenin'in degradasyondan kaçmasına ve nükleer stabilize β-Katenin'in birikimine yol açmaktadır. Benzer şekilde Wnt ligantlarının aşırı ekspresyonu veya Wnt antagonistlerinin (Dkk, SFRP ve WIF) downregülasyonu da çeşitli kanserlerde bildirilmiştir. Wnt ligantlarının uyarılması β-Katenin'i stabilize etmekte ve hedef genlerin transkripsiyonunu uyarmaktadır.

**Çizelge 2.4.** Çeşitli Kanselerde Wnt/ $\beta$ -Katenin sinyal yolağındaki bozukluklar

Gen	Değişiklik	Kanser Tipleri
WNT ligandları	Artmış ekspresyon	Kolon Kanseri Meme Kanseri Başboyun Kanseri Akciğer Kanseri Gastrik Kanserler Melanoma Prostat Kanseri
Frizzled reseptörü	Artmış ekspresyon	Kolon Kanseri Gastrik Kanserler Sarkoma
SFRP	CpG metilasyonu ve azalmış ekspresyon	Kolon Kanseri Meme Kanseri Akciğer Kanseri Gastrik Kanserler Lösemi İdrar kesesi Kanseri
DKK	CpG metilasyonu ve azalmış ekspresyon	Kolon Kanseri Meme Kanseri Gastrik Kanserler
WIF	CpG metilasyonu ve azalmış ekspresyon	Meme Kanseri Akciğer Kanseri İdrar kesesi Kanseri Prostat Kanseri
APC	İnaktive edici mutasyonlar	Kolon Kanseri Barrets özafagus Kanseri
B- Katenin	Aktive edici mutasyonlar	Kolon Kanseri Hepatoseluler Kanserler Gastrik Kanserler Over Kanseri Wilms Tümörü
Axin	İnaktive edici mutasyonlar	Kolon Kanseri Hepatoseluler Kanserler

APC, adenomatous polyposis coli; Dkk-1, Dickkopf-1; Fz, frizzled; Wnt, Wingless-type MMTV integration site; SFRP1, Secreted frizzled-related protein 1; WIF-1 , Wnt inhibitory factor

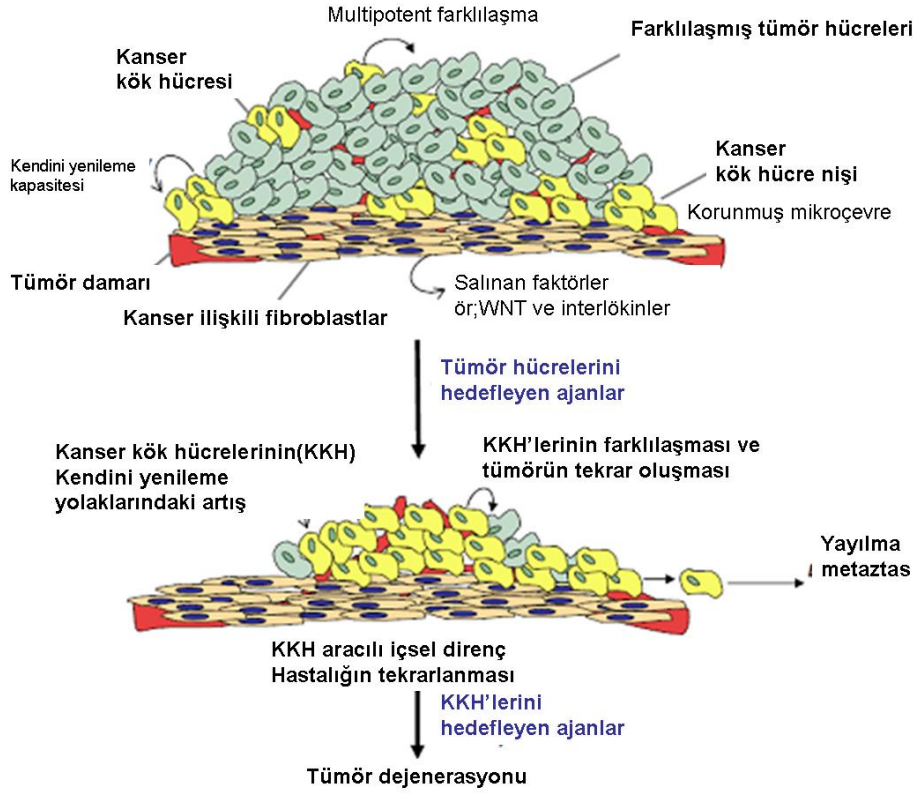


Kemoterapiye direnç ve minimal rezidüel hastalık, hayatta kalma yüzdelerinin iyileştirilmesinin önündeki en büyük engellerdir. Kanser kök hücreler, pek çok açıdan normal kök hücrelere benzerlik göstermekte ve projeni hücreleri oluşturma kapasitesi ve kendini yenileme yeteneği sergilemekte, bu özellikleri de hastalığın nüksü ve kemodirence yol açmaktadır (Dean vd 2005, Donnenberg ve Donnenberg 2005). Wnt/ $\beta$ -Katenin sinyal yolağı, kolon, cilt, meme kanseri ve lösemi gibi pek çok kanserde kanser kök hücrelerin devamlılığında hayatsal bir rol oynamaktadır (De sousa vd 2011; Vermeulen vd 2010; Malanchi vd 2008; Jamieson vd 2004).

Çeşitli çalışmalarda, epiteliyal-mezenkimal geçişin tümörün ilerlemesinde önemli rol oynadığı ortaya konulmuştur (Thiery vd 2009; Yılmaz vd 2009). Epiteliyal-mezenkimal geçiş (EMT), epiteliyal hücrelerin epiteliyal karakteristiklerini kaybederek mezenkimal özellikler kazanmalarınıdır. EMT, kanser hücrelerinin tümör kütlelerinden ayrılarak diğer dokulara yayılmasına izin verir (Thiery vd 2009; Micalizzi vd 2010). Yakın zamanda yapılan çalışmalar, nükleer  $\beta$ -Katenin'in EMT için gerekli olduğunu, ancak buna rağmen EMT'yi indüklemek için yeterli olmadığını ortaya koymuştur (Onder vd 2008; Schmalhofer vd 2009).

#### **2.5.2.2. SOLİD TÜMÖRLERDE $\beta$ -KATENİN**

İlk kez hematolojik malignansilerde tanımlanmış olan kanser kök hücrelerin, günümüzde, NSCLC, meme ve kolorektal kanser gibi çok çeşitli solid tümörlerde de önemli rol oynadıkları düşünülmektedir. Normal bir kök hücre tarafından başlatılan farklılaşma süreci proliferatif bir potansiyel göstermeyen özelleşmiş bir projeniyle sonuçlanırken, bir kanser kök hücre, terminal farklılaşmaya uğramayan fakat bunun yerine kontrolsüz proliferasyon sergileyen projeniye yol açmaktadır. Solid tümörlerde bu süreç, büyük tümör kütlelerinin oluşumunu tetiklemektedir (Curtin ve Lorenzi, 2010; Shackleton vd 2009).



**Şekil 2.5.** Kanser kök hücre özellikleri ve terapötik direnç (Curtin ve Lorenzi, 2010). Solid bir tümörün, farklılaşmış tümör kütlesi, az sayıdaki kanser kök hücre ve tümör vaskülatüründen oluşan hücresel ortamdaki gösterimi.

Kanser kök hücre nişi kanser kök hücrelerin, kanser kök hücre alt-populasyonunu sağlamak veya solid tümörlerde tümör kütlelerini oluşturmak üzere farklılaşmaya uğramak üzere kendini yenilemesini sağlamak üzere yönlendirmektedir. Geleneksel kemoterapötik yaklaşımlar tümör kütlelerini hedeflerler fakat inherent kemodirence bağlı olarak, kanser kök hücreler büyük ölçüde bundan etkilenmezler ve potansiyel olarak tümörün tekrar oluşumuna ve/veya metastaza yol açarlar. Kanser kök hücreyi hedefleyen terapiler ise, kanser kök hücrelerdeki Wnt gibi kritik düzenleyici yolları hedeflerler ve böylece tümör repopulasyonu ve metastazı inhibe etme yetenekleri vardır (Curtin ve Lorenzi, 2010).

### 2.5.2.3. HEMATOLOJİK MALİGNANSİLERDE $\beta$ -KATENİN

Hematopoez, kök/projenitör hücrelerin olgun kan hücre bileşenlerine geliştiği sürekli bir süreçtir. Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağının, hematopoetik hücrelerin proliferasyon, hayatta kalma ve farklılaşmasının kontrolü üzerinde etki gösterdiği belirlenmiştir (Reya vd 2003).

Wnt yolağının gen ürünleri, hematopoetik büyüme faktörleri gibi fonksiyon göstererek erken projenitör hücreler için daha yüksek spesifikite sergileyebilmektedir (Van den Berg vd 1998). Hematopoetik kök hücrelerde konstitütif olarak aktif olan  $\beta$ -kateninin, B hücre farklılaşmasının erken basamaklarında multilineaj farklılaşmasını bloke ettiği gösterilmişti ve böylece normal B hücre gelişimi ve fonksiyonu için Wnt/  $\beta$ -katenin sinyal yolağının ince ayarlamasının önemi ortaya konulmuştur (Reya vd 2000, Baba vd 2006)  $\beta$ -kateninin konstitütif aktivasyonu multipotansiyel hematopoetik kök hücrelerin yayılmasını teşvik etmektedir (Baba vd 2006, Baba vd 2005). Wnt yolağının aşırı uyarılması hematopoetik kök hücrelerin transformasyonuna yol açabilmektedir (Baba vd 2006, Baba vd 2005) ve bu da miyeloid ve lenfoid lineajların neoplazmlarında görülmektedir. Böylece, bu yolak aracılığıyla gerçekleşen herhangi anormal sinyalin hematopoez üzerinde negatif bir etkide bulunabilmekte ve lenfomajeneze yol açabilmektedir. Wnt yolağı ve ilişkili proteinlerdeki anomaliler pek çok hematolojik hastada saptanmaktadır (Weerkamp vd 2006) Wnt sinyal yolağının aktivasyonu, lösemilerin patogeneğinde de belirlenmiştir. GSK3  $\beta$  inaktivasyonu ile kenetli bir şekilde gerçekleşen  $\beta$ -katenin aktivasyonu KML blast krizinde ve prekürsör B-hücre akut lenfoblastik lösemide (ALL) gösterilmiştir (Khan vd, 2007). Kanonikal Wnt yolağının fonksiyonu, Wnt antagonistlerinin metilasyonu tarafından epigenetik olarak düzenlenmekte ve AML'de prognostik öneme sahip olmaktadır (Valencia vd 2009). Sıklıkla,  $\beta$ -katenin aşırı ekspresyonu ve akümüasyonu kütanöz lenfomaların gelişiminde gözlenmektedir (Bellei vd 2004). Bu bilgilerden yola çıkıldığında, kanonikal Wnt/ $\beta$ -katenin yolağı hematolojik malignansiler için yararlı bir terapötik hedef olabilir ve Wnt sinyaline müdahale etmek üzere daha ileri araştırmaların yapılması yeni anti-kanser terapilere olanak sağlayacaktır.

## **2.6. GENOMBOYU MOLEKÜLER BİYOLOJİK ANALİZLER**

Günümüzde, insan genom projesinin tamamlanması, dizin teknolojisinin ve yakın zamanda yoğun paralel sekanslama teknolojilerinin keşfedilmesi, genom ebadındaki çalışmaların sayısının artmasına yol açmış, bu çalışmalarla elde edilen geniş veri setleri, çok geniş bir hastalık grubunda yeni hedeflerin ortaya çıkmasına olanak sağlamış ve hastalıkların tedavisinde bir umut ışığı yaratmıştır.

Array teknolojileri; bir organizmaya ait bütün DNA dizisini temsil eden organizma

genomunun taranması için (SNP arrayler); organizmadaki organ, doku spesifik gen ifade profillerinin ortaya konulması için (ekspresyon arrayler); gen ifade regülasyonunda etkin olan transkripsiyon faktörlerinin genomda hangi genleri etkilediğinin belirlenmesi için (ChIP-chip) ve genomdaki metilasyon profilinin belirlenmesi için (metilasyon arrayler) etkin olarak 2000’li yılların başından beri kullanılmaktadır.

### **2.6.1. ChIP-Chip**

Canlı hücrelerde meydana gelen DNA-protein interaksiyonlarını belirlemek için kromatin immunopresipitasyonunu (ChIP) mikrodizinlerle (chip) kombine eden yeni bir metottur. Bu metodun doğasından gelen yüksek verim, metodu genom boyunca transkripsiyon faktör hedeflerini veya kromatin modifikasyon bölgelerini belirlemek için ideal bir yaklaşım haline getirmektedir (Kim vd 2007).

İlk yapılan kromatin immünpresipitasyon-ekspresyon (ChIP-Chip) çalışmaları mayada DNA’ya bağlanan proteinler üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmaları, memeli hücrelerinde ve özellikle lenfomadaki çalışmalar izlemiştir. Lösemik kök hücrelerin de aralarında bulunduğu embriyonik kök hücreler, sınırsız bir totipotent hücre kaynağı sunmaları sebebiyle bu çalışmalar için yine çok dikkat çekici hedefler olarak ortaya çıkmaktadırlar.

Kromatin immunopresipitasyon metodu(ChIP); canlı hücreleri, formaldehit gibi hücre içindeki proteinleri DNA substratlarına fikse eden çapraz bağ yapıcı bir ajanla muamele etmeyi içerir. Bu aşamadan sonra kromozomlar, fiziksel kesme ya da enzimatik sindirim ile parçalara ayrılırlar. Belirli bir proteinle bağlı olan spesifik DNA sekansları, proteine karşı spesifik bir antikorun kullanıldığı immunoaffinite pürifikasyonu ile izole edilirler. Pürifiye DNA parçaları daha sonra, ilgilenilen proteinle belirli bir DNA sekansının bağlantısını belirlemek üzere Southern blot ya da PCR gibi çeşitli moleküler teknikler aracılığı ile analiz edilirler (Kim vd 2007).

DNA’ da kodlanmış olan genetik bilgi, hücrelerin büyümesi, farklılaşması, bölünmesi ve çevresel uyaranlara yanıt vermesi gibi hücresel fonksiyonları gerçekleştirmek üzere kusursuz bir şekilde transkribe edilmektedir. Sekans-spesifik protein-DNA interaksiyonları

gen transkripsiyonunu regüle etmekte merkezi rol oynarlar; transkripsiyon faktörleri gibi DNA'ya bağlanan proteinlerdeki mutasyonlar insanlarda sıklıkla hastalıklara ve kansere yol açabilmektedir. Bu nedenle, sekans-spesifik protein DNA interaksyonlarını kontrol eden mekanistik kuralların belirlenmesi, gen ekspresyonunun ne şekilde düzenlendiğinin anlaşılması için gerekli bir basamaktır.

Biyokimyasal yaklaşımlar, protein-DNA interaksyonlarını ortaya çıkarmak üzere uzun zamandır kullanılan birincil mekanizmadır. Bu amaçla yapılmış olan pek çok çalışma, EMSA (elektroforetik mobilite shift assay) ve nükleaz footprinting gibi, sınırlı sayıda aday DNA sekansları ile bir ya da az sayıdaki proteinin interaksyonlarının karakterizasyonu üzerinde odaklanmıştır. Geçtiğimiz yıllarda yapılmış olan çalışmalar, pek çoğu TRANSFAC ve JASPAR data bankalarında ulaşılabilir durumda olan önemli protein DNA interaksyon datalarını biriktirmiştir. Ancak, bu tip geleneksel yaklaşımların çeşitli sınırları da bulunmaktadır. Bu çalışmalar genellikle 'low-throughput' data üretmektedir ve zahmetlidir ve daha da önemlisi test edilen sınırlı sayıdaki DNA sekansına bağlı olarak daha düşük rezolusyonda konsensus DNA-bağlanma bölgeleri oluşturmaktadır. Geçtiğimiz 10 yıl içinde, high-throughput teknolojilerin geliştirilmesi protein-DNA interaksyonlarının karakterizasyonunda devrim yaratmış ve çok fazla sayıdaki DNA-bağlanan proteinler için DNA sekans tercihleri için eşsiz data setleri oluşturmuştur.

Transkripsiyon faktörlerinin spesifik DNA hedef sekanslarına bağlanmaları, gen regülatör ağlarının temelini oluşturmaktadır. DNA tiling arraylerle veya high-throughput sekanslama ile kombine edilen kromatin immünpresipitasyon (sırasıyla ChIP-chip ve ChIP-sekans), çeşitli transkripsiyon faktörlerinin bağlanma durumunun detaylandırıldığı yakın zamanda yapılmış çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır. Şaşırtıcı olacak şekilde, çeşitli model organizmalardan ve dokulardan elde edilen bulgular, transkripsiyon faktörlerinin genomik bağlanma bölgelerinin sayısı açısından büyük ölçüde değişkenlik gösterebilmekte ve bu bağlanma olayları bilinen ya da olası direkt gen hedeflerinin sayısını anlamlı olarak aşabilmektedir. Böylece, transkripsiyon faktör fonksiyonunun günümüzdeki ifadesinin, direkt transkripsiyonel hedef regülasyonunun dışında bir rolünün olup olmadığının ortaya çıkarılması şeklinde genişletilmesi gerekmektedir.

Geleneksel ChIP metodu, bir protein ile genomdaki sınırlı sayıdaki bilinen ya da

şüphelenilen hedef bölgeler arasındaki interaksiyonların araştırılması ile sınırlıdır, fakat özellikle genom-ebadı boyutunda yeni protein bağlanma bölgelerinin keşfine izin vermez. DNA sekanslarının milyonlarca baz dizileri boyunca dağılan protein-DNA interaksiyon bölgelerinin saptanmasına izin veren, ChIP ile DNA mikrodizinlerini kombine eden bir metodun ortaya çıkması ile bu sınırlamanın da üstesinden gelinmiştir. ChIP ile purifiye olan DNA, spesifik olarak amplifiye edilir, floresanla işaretlenir ve total genomik DNA sekanslarını içeren DNA mikrodizinlerine hibridize edilir. Protein için genomik bağlanma bölgelerine karşılık gelen dizin elemanları, ChIP DNA kanalında kontrole göre anlamlı olarak daha güçlü floresan sinyal gösterenler olarak belirlenirler. Bu metod, ChIP ve DNA mikrodizinlerini (chips) kombine ettiği için ChIP-on-chip ya da ChIP-chip olarak da adlandırılır. ChIP-chip kullanarak bir genom içinde bulunan tekrar etmeyen bütün DNA sekansları analiz edilerek gelişim ve spesifik hastalık durumlarında hangi proteinin bu sekanslarla ilişkili olduğu belirlenebilir (Kim vd 2007).

Post-genom alanında, dikkatler genom sekanslarının fonksiyonu ve bunların nasıl düzenledikleri üzerinde toplanmıştır. Ortaya çıkan epigenomik değişiklikler ve cis-hareketli elementlerle protein faktörleri arasındaki ilişki gen regülasyonunda esas role sahiptirler (Wu vd 2006).

DNA mikrodizinlerin gelişimi, hücrelerin, çevresel değişiklikler ve gelişimsel olaylara yanıt olarak, genomlarının transkripsiyonu nasıl koordine ettikleri hakkında ayrıntılı bilgi sağlamıştır. Bu global incelemeler kadar bilgilendirici ve etkileyici olan RNA düzeylerinin ölçümü, oluşan yanıtların temelinde yatan kromatin dinamikleri ve transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu ile ilgili indirekt bilgi sağlamaktadır. DNA ve proteinler arasındaki direkt etkileşimi incelemek için ise ChIP-chip tekniğinin keşfi önemli bir gelişme olmuştur (Şekil 2.6) (Ren vd 2000, Iyer vd 2001). Bu yöntemle yapılan son çalışmalar, transkripsiyon faktörü (TF) bağlanması ve kromatin organizasyonunun kompleks dinamiklerini ve bu proseslerin birbirleri ile çevresel ve gelişimsel olaylara karşı hücrel bir yanıt oluşturmak üzere nasıl etkileştiğini göstermeye başlamıştır. Bu yeni yüksek veri stratejisi, İnsan Epigenom Projesi gibi geniş çaplı çalışmalara uygulanabilirliği olan kritik transkripsiyon faktörlerinin hedeflerini göstermeye ve histon modifikasyonlarının genomal dağılımlarının profillenebilmesine yardımcı olmaktadır.

ChIP deneyleri, kompleman RNA transkripsiyon çalışmalarında etkili bir araç olarak kullanılabilir, çünkü bu deneyler araştırmacılara, gen ekspresyonunu regüle eden DNA-protein ilişkilerini çalışabilme imkanı sağlamaktadır.

### **2.6.1.1. ChIP-Chip ÇALIŞMALARI**

İlk ChIP-chip çalışmaları ile, bilinen çeşitli maya transkripsiyon faktörlerinin, Ste12p, Gal4p, Swi4p, Swi6p ve Rap1p, genomdaki lokasyonu (Ren vd 2000, Iyer vd 2001, Lieb vd 2001) ve hücre siklusu progresyonu için gerekli çeşitli transkripsiyon faktörlerinin bağlanma şekli incelenmiştir (Simon vd 2001, Horak vd 2002). Çok sayıdaki yeni bağlanma bölgelerine ilave olarak, bu başlangıç transkripsiyon faktörü lokalizasyon çalışmaları, bilinen bağlanma bölgelerini tanımlayarak, metodun etkinliğini deneysel olarak kanıtlamıştır (Ren vd 2000, Iye vd 2001, Lieb vd 2001). ChIP-chip tekniği, bundan sonra, bakteriden insana kadar değişen organizmalardaki çok sayıda transkripsiyon faktörüne uygulanmıştır.

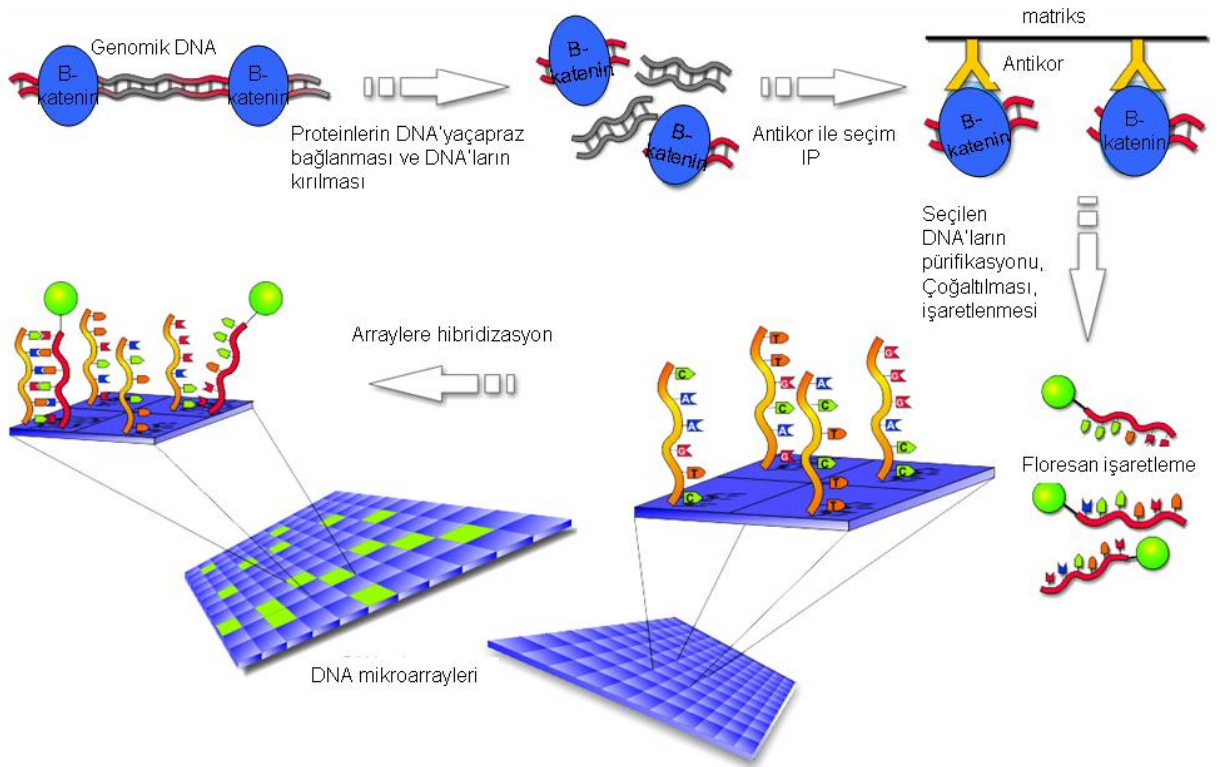
ChIP-chip çalışmaları, hücrenin, tek bir transkripsiyon faktörü kullanarak, nasıl çoklu transkripsiyonel yanıtlar elde edebildiği sorusuna dikkat çekmeye başlamıştır. Bu kompleks durum, bu alandaki temel sorulardan biridir. Zeitlinger ve ark., *Saccharomyces cerevisiae* transkripsiyon faktörü Ste12p'yi model alarak önemli bir tespit yapmışlardır. 'mating pheromone' varlığında, Ste12p, çiftleşme yolağındaki genlerin aktivasyonuna neden olurken (Roberts vd 2000), spesifik açlık koşullarında, filamentöz büyüme yolağındaki genlerin ekspresyonunu indüklemektedir (Madhani vd 1999). ChIP-chip analizi, Ste12p ile olan bu farklı regülasyonun, Ste12p'nin yapısal olarak bağlandığı genlerin farklı aktivasyonundan ziyade, Ste12p'nin bağlanma modeli ile ilgili olduğunu kanıtlamıştır (Zeitlinger vd 2003). Bundan başka, filamentöz büyüme genlerine Ste12p'nin bağlanmasının, Tec1p transkripsiyon faktörü ile kooperatif bağlanmasına bağlı olduğu gösterilmiştir (Zeitlinger vd 2003).

Carroll vd (2006), meme kanser hücrelerinde östrojen reseptör ve RNA Polimeraz II bağlanma bölgelerinin genomal haritasını yayınlamışlardır. Bu çalışmada, genomun daha önceden keşfedilmemiş bölgelerinde cis-bağlanma bölgelerini tanımlamışlar ve östrojen sinyalizasyonundaki transkripsiyon faktörleriyle meme kanseri arasındaki ilişkiyi

bulmuşlardır. 15 rastgele seçilmiş bağlanma bölgesinin Q-PCR doğrulaması yapılmış, ChIP-chip ile tanımlanan ve hiçbir negatif kontrolde olmayan bütün östrojen reseptörleri onaylanmıştır.

Cawley vd (2004), transkripsiyon faktörleri Sp1, cMyc ve p53 için Affymetrix Tiling Arrays ile bağlanma bölgelerinin haritalarını çıkarmışlardır. Daha önceden bilinmeyen binlerce transkripsiyon faktör bağlanma bölgesi tanımlanmış (sadece %22'si protein kodlama genlerinin 5' ucunda yerleşiktir) transkripsiyon faktör bağlanma bölgelerinin bulunduğu bölgeye yönelik tahminler de çürütülmüştür.

Yang ve ark. (2006), tüm insan genom setini kullanarak, p63'ün bağlanmaya dair davranışlarını ve p63 bağlanma bölgelerinin evrimsel olarak korunmuşluğunu tanımlamışlardır.



Şekil 2.6. ChIP-chip tekniğinin özeti (en.wikipedia.org'dan düzenlenmiştir)



Chip on CHIP teknolojisinin kullanıldığı çalışmalar hızla devam etmektedir. 2011 yılında yapılmış olan çalışmalar arasında yer alan bir çalışmada Spicuglia ve ark. tarafından PLZF/RARA füzyon proteinine bağlı lösemiyoenezin moleküler mekanizmaları araştırılmış ve U937 hematopoetik hücre serisinde, bir füzyon proteini olan PLZF/RARA'nın hedef genleri ChIP-on-chip ile belirlenmiştir (Spicuglia vd 2011).

FANG ve ark., ise yapmış oldukları çalışmada, oktamer motife bağlanan bir transkripsiyon faktörü olan OCT4'ün canlı kanser hücrelerindeki direkt hedeflerini CHIP-seq ile belirlemişlerdir. Çalışmada elde edilen sonuçlar, glioblastoma kanser genomunda 5438 OCT4 bağlanma bölgesinin lokalize olduğunu ve bu bölgelerin, 2312 OCT4 bağlanma bölgesinde 3931 kez ortaya çıkan bir konsensus sekans içerdiğini ortaya koymuştur. Böylece çalışmada, OCT4'ün glioblastoma kanserindeki fonksiyonunun altında yatan gen regülasyon mekanizmalarının anlaşılmasına yönelik değerli bir veri seti elde edilmiştir (Fang vd 2011).

Striatumda baskın olarak ekspresyon gösteren Bcl11b (B-hücre lösemi/lenfoma 11B) transkripsiyon faktörünün sinir sitemindeki hedeflerinin ortaya konulduğu bir başka 2011 tarihli çalışmada da yine ChIP-seq metodolojisi kullanılmıştır. Transkriptom-ebadındaki bu çalışmada 694 genin, Bcl11b'yi aşırı ekspresse eden hücrelerde anlamlı olarak değiştiği, bu genlerin arasında Bcl11b'ye benzer olarak striatal-zengin ekspresyon gösteren genlerin de bulunduğu belirlenmiştir. Bcl11b-DNA interaksyonunun spesifik hedeflenmesinin spesifik olarak striatal hücrelerde BDNF sinyalizasyonunu azaltmak üzere yeni bir terapötik yaklaşım ortaya koyabileceği de çalışmada sunulmaktadır (Tang vd 2011).

Gorski ve ark., BRCA1'in transkripsiyonal regülasyon üzerindeki etkisini incelemek üzere genom-ebadında profillemeye ve ChIP-chip analizini kullanmışlar, ve BRCA1 delesyonunun 1294 gende transkripsiyonel değişikliklerle sonuçlanmasına rağmen, bu genlerin sadece 44 tanesinin BRCA1 tarafından promotora bağlı bulunduğunu belirlemişlerdir. Ancak bu transkriptlerin %27 sinin transkripsiyonel regülasyonla bağlantılı oluşu, mikroarray analizi ile gözlenen çok sayıdaki indirekt transkripsiyonel değişiklikleri kısmen açıklamaktadır. Çalışmanın sonuçları, BRCA1 DNA bağlanması için hiçbir spesifik konsensus sekans bulunmadığını ve BRCA1 bağlı promotor üzerinde yaygın olarak bulunan bir dizi bilinen ya da yeni transkripsiyon faktörlerinin varlığını ortaya

koymaktadır. Ko-immünopresipitasyonlar, BRCA1'in, AP2- $\alpha$ , PAX2 ve ZF5 gibi bir dizi transkripsiyon faktörü ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Gorski vd 2011).

Bütün bu çalışmalar ile, protein-DNA interaksyonları aydınlatılmaya ve kompleks transkripsiyonel düzenleyici ağlara anlamlı bakış açısı oluşturulmaya çalışılmıştır.

Literatürde, CHIP teknolojisi kullanılarak  $\beta$ -kateninin hedef genlerinin belirlendiği çeşitli çalışmalara da rastlanmaktadır. Bu çalışmalar arasında, anormal Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolu regülasyonu sergileyen kolon kanseri üzerinde yapılan çalışmalar da yer almaktadır. Pek çok kolorektal kanser vakasında Adenomatöz polipozis kolu (APC) geninde mutasyonlar ortaya çıktığı ve bu mutasyonların hücrel transformasyonda başlatıcı olarak davrandıkları bildirilmiştir. Mutant APC taşıyan hücrelerin, çekirdekte  $\beta$ -katenin transkripsiyon koaktivatörünü yüksek düzeylerde içerdikleri ve yüksek düzeydeki koaktivatör  $\beta$ -katenin/T-hücre faktörü 4 (TCF4) kompleksleri tarafından kontrol edilen genlerin anormal ekspresyonuna yol açtıkları da belirlenmiştir. Bu bilgilerden hareketle, kromatin immünpresipitasyonunun ve buna paralel olarak sekanslama ile bir arada yürütüldüğü bir çalışmada HCT116 kolon kanser hücrelerinde  $\beta$ -katenin bağlanma bölgeleri saptanmıştır.  $\beta$ -katenince zengin olan 2168 bölge, çoklu pik algoritmalarından alınan output un integrasyonu için kullanılan uygun bir yaklaşımla yerleştirilmiştir. Motif keşif algoritmaları bir çekirdek TCF4 motifi, bir uzamış TCF4 motifi ve bir AP-1 motifi belirlemiştir. Bunun da ötesinde 417 bölgenin TCF4 ve AP-1 motiflerinin her ikisini de içerdikleri belirlenmiştir. TCF4 ve AP-1 motifleri ile ilişkili genlerin  $\beta$ -katenin, TCF4 ve c-Jun' a in vivo olarak bağlı oldukları ve Wnt sinyali ve serum büyüme faktörleri ile aktive oldukları belirlenmiştir. Bu çalışma, Wnt/ $\beta$ -katenin ve mitojen sinyal yollarının, tanımlı bir set hedef genleri doğrudan düzenlemek üzere kesiştiğini ortaya koymaktadır (Bottomly vd 2010).

Kolorektal kanser hücrelerinin kullanıldığı 2011 yılında Schepeler ve ark tarafından yapılmış olan bir diğer çalışmada ise bu kez Wnt ile regüle olan kodlama yapmayan RNA ların kanser ile olası ilişkisi araştırılmıştır. Söz konusu çalışmada, DLD1 CRC hücrelerinde  $\beta$ -katenin/TCF4 aktivitesinin bozulmasının ardından miRNA transkriptomundaki değişiklikleri tanımlamak üzere 664 özgün insan mikro RNA sını saptayabilme yeteneğine sahip TaqMan Array Mikro RNA Kartları kullanılmıştır. miRNA ların çoğunun,

ekspresyon mikroarray ve ChIP-chip bulgularından elde edilmiş olan proksimal TCF4 kromatin okkupansisi ve konak gen regülasyonundan bağımsız olarak yanıt verdikleri ortaya çıkmıştır. Bozulmuş Wnt sinyali tarafından indüklenen mRNAların bir modülünün *in vitro* iki bağımsız insan primer CRCs de (n=76), normal komşu mukozaya (n=34) göre down regüle olduğu belirlenmiştir. Bu miRNAların bir kısmı (miR-145, miR-126, miR-30e-3p ve miR-139-5p) ektopik olarak eksprese olduklarında CRC hücre büyümesini *in vitro* anlamlı olarak inhibe etmiştir. Proteomiks ve ekspresyon mikroarraylerinin bir arada kullanıldığı integratif bir yaklaşımla ektopik miR-30e-3p düzeyleri tarafından etkilenen çeşitli mRNAlar ve proteinler belirlenmiştir. Bunlar arasında yer alan HELZ ve PIK3C2A'nın çeşitli miRNA bağlanma bölgelerinde represe edildiği lusiferaz reporter assayler ve mutasyonel analizlerin kombinasyonu ile belirlenmiş ve son olarak, siRNA aracılığı ile PIK3C2A'nın downregülasyonunun tek başına CRC hücre büyümesini sınırlamada yeterli olduğu da ortaya çıkarılmıştır. Kolektif olarak, bu çalışma ile CRC hücrelerinde Wnt sinyalinin azaltılmasının sonucu olarak çoklu miRNA ların upregüle olduğu ve bu miRNA ların bir kısmının, çeşitli büyümeyi uyarıcı kanser-ilişkili genlerin supresyonu ile birlikte hücre büyümesini inhibe ettikleri belirlenmiştir (Schepeler vd 2011).

Kolon kanser hücrelerinde Wnt sinyal yolağının bileşenlerinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise, HEF1, yeni bir Wnt sinyal hedefi olarak belirlenmiştir. HEF1 in ekspresyonunun Wnt-3a,  $\beta$ -katenin, ve Dvl2 tarafından doz bağımlı olarak upregüle edildiği ve shRNA ile  $\beta$ -katenin downregülasyonunun ardından baskılandığı bildirilmiştir. Buna ilaveten kolorektal kanser hücre serilerinde ve primer tümör dokularının yanı sıra ApcMin/+ farelerin kolon ve adenom poliplerinde artmış HEF1 mRNA ve protein düzeylerinin gözlemlendiği de bildirilmiştir. Bunun da ötesinde, insan kolorektal tümör dokularında HEF1 düzeylerinin tümör evresi ile artış gösterdiği ortaya konulmuştur. Kromatin immünpresipitasyon (ChIP) assayleri ve promotor analizleri Wnt sinyali tarafından HEF1 indüksiyonundan sorumlu olan HEF1 promotorunda üç fonksiyonel T-hücre faktörü (TCF)-bağlanma bölgesini ortaya çıkarmıştır. HEF1' in ektopik ekspresyonunun hücre proliferasyonu ve koloni oluşumunu arttırırken, SW480 hücrelerinde HEF1' in shRNA ile downregülasyonunun zıt etkiler gösterdiği ve ksenograft tümör büyümesini inhibe ettiği belirlenmiştir. Ayrıca, SW480 hücrelerinde HEF1' in aşırı ekspresyonunun hücre migrasyonunu ve invazyonu teşvik ettiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, bir arada değerlendirildiklerinde HEF1' in, hücre proliferasyonu, migrasyonu ve

tümörigenezi için bilinen kanonikal Wnt/  $\beta$ -katenin sinyal yolağının bir aracısı ve kolorektal tümörigenezin önemli bir bileşeni olarak yeni rolü CHIP teknolojisi kullanılarak ortaya konulmuştur (Li vd 2011).

$\beta$ -katenin proteininin hedef genlerinin araştırıldığı bir başka çalışmada ise şizofreni ve bipolar bozukluk için aday genler belirlenmiştir. Söz konusu çalışmada, lityum tuzlarının terapötik konsantrasyonlarının glikojen sentaz kinaz 3 beta ve fosfoinositid sinyali üzerindeki inhibe edici etki sergilemesinin, bu yolakların anormal aktivasyonunun bipolar bozukluğun patofizyolojisinde bir faktör olabileceğini ortaya koymaktadır. Bu yolakların ilişkisi aynı zamanda genom ebadındaki assosiasyon çalışmaları ile araştırılmaktadır. Bir grup araştırmacı bipolar bozukluğun moleküler temelini ve lityumun terapötik etkisini mikroarray ekspresyon çalışmaları ile araştırmıştır çünkü hem GSK3 $\beta$  hem de fosfoinositid aracılı sinyal uyarım yolakları transkripsiyonal aktivasyon ve inhibisyon ile kenetlenmiştir. Buna rağmen, ekspresyon profillemenin bazı limitasyonları bulunmaktadır ve araştırmacılar bu yaklaşımı, genetik temelli psikiyatrik bozuklukların gelişimi ile ilişkili en uygun biyolojik yapıya sahip olan fetal beyin dokusunu analiz etmek için kullanamamışlardır. Bu sorunların üstesinden gelmek üzere, araştırmacılar CHIP-chip ile 640 genin promotorunun  $\beta$ -katenin ile bağlı olduğu ve bu genlerin pek çoğunun şizofreni, otizm spektrum bozukluğu ve bipolar bozukluk için aday genler oldukları (*CACNA1B*, *NRNG*, *SNAP29*, *FGFR1*, *PCDH9*) ve diğer dokuz genin ise yakın zamanda yayınlanmış olan genom ebadındaki assosiasyon çalışmalarında ve genom ebadındaki kopya sayı varyantları araştırmalarında belirlendikleri bildirilmiştir. Bu bulgular önermektedir ki, şizofreni ve bipolar bozukluk için farklı aday genler, GSK3 $\beta$ / $\beta$ -katenin sinyalinin etrafında dönen ortak bir moleküler ağa dahil olabilmektedirler. Buna ek olarak, varsayılan lityum-yanıt yolağının şizofreni ve otizm aday genlerin bir alt grubunu etkileyebileceği bulgusu terapötik sonuçlar oluşturabilmektedir (Pedrosa vd 2010).

Biz de bu çalışmamızda kanser gelişiminde en önemli yolaklardan biri olan Wnt/ $\beta$ -katenin yolağındaki başrol oyuncusu  $\beta$ -katenin proteininin AML'de hangi genleri düzenlediğini CHIP-chip teknolojisi ile ilk kez tespit ederek AML tedavisinde yeni hedeflerin ortaya çıkmasına olanak sağlamayı amaçlamaktayız.

## 2.7. BİYOİNFORMATİK ANALİZ VE VERİ MADENCİLİĞİ

Özellikle 1980'li yıllardan itibaren, moleküler biyoloji alanındaki ve genomik teknolojilerdeki ilerlemeler, bilim insanları tarafından oluşturulan biyolojik bilginin çok yoğun bir şekilde büyümesine yol açmıştır. Bu genomik bilgi tufanı, bilgileri analiz etmek ve görüntülemek için özelleşmiş gereçlere ve bilgileri saklamak, organize etmek ve indekslemek için bilgisayar donanımlı veritabanlarına yönelik bir ihtiyaç yaratmıştır.

Biyoinformatik, biyoloji, bilgisayar bilimi ve bilgi teknolojisinin tek bir disiplini oluşturmak üzere birleştiği bir bilim alanıdır. Bu alanın temel hedefi, yeni biyolojik yaklaşımların keşfedilmesinin yanısıra global bir perspektifin yaratılmasıdır. Genomik devrimin başlangıcında, nükleotid ve aminoasit dizilerinin saklanması bir biyoinformatik ilgi alanını oluşturmaktaydı ve bu tip veritabanının oluşturulması ile, sadece konuların dizaynını değil, aynı zamanda araştırmacıların, var olan ya da yeni ve tekrar gözden geçirilen bilgilere ulaşabilecekleri kompleks arayüzlerin geliştirilmesi de sağlanmıştır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/bioinformatics.html>).

### 2.7.1. GEN ANOTASYONU VE ONTOLOJİ

Gen anotasyonu, DNA dizilerine biyolojik bilgilerin ilintilendirildiği bir süreçtir. 3 aşamadan oluşur. 1. Aşama Protein kodlamayan bölgelerin tanımlanması 2. aşama genomdaki gen bölgelerinin tanımlanması 3. aşama ise biyolojik bilginin ilintilendirilmesi'dir.

Genlerin birbirleriyle ilişkilerini ve etkileşimlerini daha üst seviyede gözlemlemek için araştırmacılar gen ontolojisi inisiyatifi başlatmışlardır. Gen ontolojisinin tanımını yapmadan önce ontolojinin tanımını yapmak gerekir. Felsefi bir disiplin olan ontoloji varlıkların nasıl gruplandırılacaklarını, benzerliklerine ve farklılıklarına göre bir hiyerarşi içinde nasıl alt gruplara ayrılacaklarını sorgulamaktadır.

Genler ve ürünleri bir çok canlı türünde homoloji gösterirler. Bu nedenle gen ontolojisi bütün türler tabanında gen ve gen ürünlerinin niteliklerini standartize edecek şekilde genlerin ve ürünlerinin anotasyonunu yapar. Ve bu kapsamda oluşturulan verilere ulaşmayı

ve verileri analiz etmeyi hedefleyen araçlar sunmaktadır (Tablo 4.1). Gen ontolojisi genleri 3 ana yeti içerisinde inceler.

1. Hücresel Bileşenler
2. Moleküler farklılaşma
3. Biyolojik süreç

(www.geneontology.org, [http://wiki.geneontology.org/index.php/Annotation\\_FAQ](http://wiki.geneontology.org/index.php/Annotation_FAQ))

GEN ONTOLOJİSİ	
Biyolojik Süreç	<ul style="list-style-type: none"><li>GO:0008150 : biological_process [470600 gene products]</li><li>GO:0022610 : biological adhesion [8262 gene products]</li><li>GO:0051825 : adhesion to other organism involved in symbiotic interaction [813 gene products]</li><li>GO:0007155 : cell adhesion [7945 gene products]</li><li>GO:0043708 : cell adhesion involved in biofilm formation [152 gene products]</li><li>GO:0061343 : cell adhesion involved in heart morphogenesis [2 gene products]</li><li>GO:0060519 : cell adhesion involved in prostatic bud elongation [0 gene products]</li><li>GO:0003392 : cell adhesion involved in retrograde extension [0 gene products]</li><li>GO:0033627 : cell adhesion mediated by integrin [291 gene products]</li></ul>
Hücresel Bileşenler	<ul style="list-style-type: none"><li>GO:0005575 : cellular component [440787 gene products]</li><li>GO:0005623 : cell [272228 gene products]</li><li>GO:0030054 : cell junction [5969 gene products]</li><li>GO:0070161 : anchoring junction [1455 gene products]</li><li>GO:0005911 : cell-cell junction [3080 gene products]</li><li>GO:0043296 : apical junction complex [927 gene products]</li><li>GO:0005913 : cell-cell adherens junction [407 gene products]</li></ul>
Moleküler Fonksiyon	<ul style="list-style-type: none"><li>GO:0003674 : molecular_function [498284 gene products]</li><li>GO:0016209 : antioxidant activity [3151 gene products]</li><li>GO:0045174 : glutathione dehydrogenase (ascorbate) activity [21 gene products]</li><li>GO:0004362 : glutathione-disulfide reductase activity [68 gene products]</li><li>GO:0004601 : peroxidase activity [1772 gene products]</li><li>GO:0019806 : bromide peroxidase activity [1 gene product]</li><li>GO:0004096 : catalase activity [351 gene products]</li></ul>

Şekil 2.7. Gen Ontolojisi Hiyerarşik sınıflandırma (www.amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/browse.cgi)

## 2.7.2. YOLAK ANALİZLERİ

Ekspresyon mikrodizini, promotor mikrodizini, proteomik bilgiler ve ChIP-on-CHIPler gibi yüksek verimli genomik, proteomik ve biyoinformatik tarama yaklaşımları, hastalıklarla ilişkiler gibi çok çeşitli biyolojik mekanizmaların çalışılması için anlamlı imkanlar sunmaktadır. Bu teknolojiler genellikle, çalışılan biyolojik koşullarla ilişkili olan ve sayıları yüzlerden binlere kadar değişen büyük ve ilginç bir gen listesi ile sonuçlanmaktadır. Büyük gen listelerinin bilgi analizi, çıkan gen listelerinin biyolojik anlamlılığının anlaşılabilmesi için yüksek verimli teknolojileri izleyen en önemli aşamadır. Bu tip çok karmaşık ve büyük hacimli veri setlerinin analizi, özgün biyoinformatik software paketlerinden desteğe ihtiyaç duyulan oldukça zorlu bir süreçtir. Bu paketler arasında, biyoinformatik kaynaklarının anotasyonu, görünür hale getirilmesi ve buna entegre şekilde keşfi için veritabanı olarak ifade edilen, büyük gen listeleri ile ilişkili biyolojik özelliklerin ve anlamın elde edilmesine olanak tanıyan DAVID de yer almaktadır.

DAVID’te kullanılan başlıca istatistiksel metodlar ve ilişkili parametrelerden bir tanesi zenginleştirme skorudur. DAVID, zenginleştirme skoru hesaplayan bu ara yüzlerden bir tanesidir. DAVID zenginleştirme skoru hesaplarken şöyle bir kıyas yapar: örnek olarak DAVID’E 3000 adet genin bulunduğu bir liste verildiğinde DAVID bu listedeki genlerin ontolojilerine bakar ve mesela bu listede ki genlerin %20’sinin kinaz olduğunu saptar. 2. Aşamada normalde insan genomunda kinazların bütün genoma oranını hesaplar ve bu oranın %5 iken verilen listedeki oranın %20 olduğunu gördüğünde bunun bir tesadüf olamayacağı öngörülür ve zenginleştirme olarak kabul edilir.

DAVID, kendisine benzerlik gösteren erişilebilir diğer gereçlere benzer şekilde, büyük gen listelerini fonksiyonel olarak analiz etmenin çeşitli yönlerini adreslemektedir. Her aracın farklı özellikleri ve güçleri olmasına rağmen birleştikleri noktalar da bulunmaktadır. İlişkili biyolojik anotasyona (örneğin gen ontoloji terimleri) ait çok sayıdaki ilginç geni sistematik olarak haritalamak ve daha sonra binlerce terim ve içerik arasından en çok temsil edilen (enriched) biyolojik anotasyonu istatistiksel olarak vurgulamak üzere ortak bir çekirdek stratejisi bu veritabanlarının ortak özelliğidir (Huang vd 2009).

İstatistiksel önemi olan sonuçların biyolojik bağlama oturtulması GO (Gene Ontology) analizi, Gen Set Zenginleştirme Analizi (GSEA), Gen Set Analizi (GSA) ve yolak analizi gibi yöntemlerle yapılabilir. Biyolojik ağlar, tanımlanan genlerin türe özgü yolak etkileşim veri tabanlarının kullanılmasıyla etkileşim modelleri çıkarılarak oluşturulabilir (Kanehisa vd 2004).

u yolların belirlenmesi amacıyla "KEGG" (The Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes) (<http://www.genome.jp/kegg/>) veri tabanı kullanılmaktadır. "KEGG" bir yolak üzerindeki genlerin araştırılmasını sağlamaktadır (Curtis vd 2005).

## **2.8. ÇALIŞMANIN HİPOTEZİNİN BİLİMSEL TEMELLERİ VE AMACI**

AML, farklı genetik anomaliler gösteren bir grup klonal hematopoetik kök hücre bozukluğunu temsil etmektedir. Herhangi bir AML hastasındaki spesifik biyolojik anomalinin anlaşılması güç olsa da moleküler biyolojideki ilerlemeler, AML'nin prognozunda önem taşıyan çeşitli genetik belirteçlerin ve/veya anahtar sinyal yollarının anormal aktivasyonunun belirlenmesine olanak tanımaktadır. Buna rağmen bu belirteçler tek başına hastalığın klinik seyrini aydınlatamamakta ve klinik heterojenitesinde rol oynayan moleküler mekanizmalar hakkında çok az şey bilinen AML için yeni prognostik moleküler belirteçlerin araştırılmasına ilişkin çabalar gittikçe artmaktadır.

Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağı, embriyogenez esnasında kök hücre düzeyinde hücrenin kaderine ilişkin kararları kontrol eden, evrimsel olarak korunmuş bir sinyal iletim yolağıdır (Wodarz vd 1998). Wnt sinyal yolağının bozulması ile çeşitli insan kanserleri arasındaki bağlantı çeşitli araştırmalarla ortaya konmuştur. Son zamanlardaki çalışmalar Wnt yolağının aynı zamanda,  $\beta$ -kateninin regülasyonu aracılığıyla hematopoetik kök hücrelerin kendilerini yenilemelerini de kontrol ettiğini göstermektedir (Reya vd 2003, Murdoch vd 2003). AML, normal erken hematopoetik hücrelere benzeyen farklılaşmamış öncü hücre kümelerinin varlığı ile karakterize olmasından dolayı bu hastalığın lösemiogenezinde Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağının kritik bir rol oynayacağına inanılmaktadır.



Muller-Tidow ve ark. (2004), AML patogenezinde Wnt/ $\beta$ -katenin yolağının rolünü ilk kez ortaya koymuştur. FLT3 mutasyonlarının aktivasyonları wnt bağımlı sinyal yolağı ile sinerjik etki göstererek miyeloid transformasyon ve lösemiye yol açtığı tespit edilmiştir. Bundan başka, AML vakalarının anlamlı bir kısmında Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağının sürekli aktivasyonu belirlenmiştir(Simon vd 2005).

Normal hematopoezde,  $\beta$ -katenin başlıca primer CD34+ hücreleri tarafından ekspresye edilmekte fakat farklılaşma sürecinde hızla kaybedilmektedir böylece CD33+ ve CD34- hücreleri çok düşük veya saptanamayacak protein düzeyleri sergilemektedir (Simon vd 2005, Ysebaert vd 2006). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, AML blastlarında  $\beta$ -katenin ekspresyonunun yaygın olarak saptanabildiği gösterilmiştir (Tichenbrock vd 2005, Simon vd 2005, Ysebaert vd 2006, Serinsöz vd 2004). Bu durum, AML de  $\beta$ -kateninin farklılaşma sürecindeki normal 'down regulasyon' mekanizmasının bozulduğunu göstermektedir. AML'deki anormal  $\beta$ -katenin ekspresyonu, modern kemoterapötik ajanlarla ortadan kaldırılması güç olan ve bu nedenle hayatta kalmayı güçleştiren 'lösemik kök hücre' aktivitesine sahip AML hücrelerinin bir alt popülasyonunun varlığını ortaya koymaktadır. Lösemik kök hücrelerin, anormal  $\beta$ -katenin ekspresyonunun aracılık ettiği bu yüksek klonojenik kapasiteleri ve artmış kendini yenileme potansiyelleri hastalığın agresifliğine ve/veya hızlı nüksüne yol açmaktadır (Ysebaert vd 2006). Jamieson ve ark. (2004), Wnt  $\beta$ -katenin yolağının anormal aktivasyonunun KML blast krizinin granulosit-makrofaj progenitörlerinde artmış kendini yenileme kapasitesi ile sonuçlandığını göstermiştir. Ysebaert ve arkadaşları da yapmış oldukları çalışmada,  $\beta$ - katenin ekspresye eden AML hücrelerinin yüksek klonojenik kapasiteye ve kendini yenileme potansiyeline sahip olduğunu ve bu tip anormal Wnt  $\beta$ -katenin sinyalinin kötü prognoz ile ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır. AML'de Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağının önemini gösteren bu sonuçlar ışığında AML'de  $\beta$ -katenin ekspresyonunun potansiyel prognostik rolü daha da önem kazanmaktadır.

Çeşitli kanser gruplarında, normalde sitoplazmada görev alan  $\beta$ - katenin ( $\beta$ -katenin) proteininin fazla ekspresyon ya da mutasyonlar nedeni ile sitoplazmada birikmesi sonucu nükleusa geçerek birtakım genleri aktive ettiği bilinmektedir. Hedef aldığı genler hücre proliferasyonunu düzenleyici ve gelişimi kontrol eden genlerdir. Dolayısıyla bu genlerin çoğu bilinen onkogenler olup kanser tedavisinde güçlü birer hedefirler. AML vakalarının

anlamli bir kisiminda Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağının sürekli aktivasyonu belirlenmiş (Simon vd 2005) yakin zamanda yapilan çalışmalarda, AML blastlarında  $\beta$ -katenin ekspresyonun yaygın olarak saptanabildiği gösterilmiştir (Tichenbrock vd 2005, Simon vd 2005, Ysebaert vd 2006, Serinsöz vd 2004). Artan  $\beta$ -katenin gen ekspresyonu sonucu sitoplazmada biriken  $\beta$ -katenin proteini çekirdeğe geçerek çoğu onkogen olan çeşitli genleri aktive etmektedir. Bu verilerden yola çıkararak, planlanan bu çalışmada protein faktörlerinin genom ebadında bağlanma yerlerini tespit etmede kullanılabilen, kromatin immnopresipitasyonu (ChIP) ve mikrodizinin (chip) birleştirilmesiyle ortaya çıkan ChIP-chip metodu kullanılarak AML hastalarında  $\beta$ -katenin proteininin genom ebadında bağlanma yerleri araştırılmış ve yaklaşık 30.000 promotor bölgesi taranarak bunlardan hangilerine bağlandığı ilk kez tespit edilmiş olacaktır.

Bu alışma kapsamında akut miyeloid lösemi tanısı almış (yeni tanı) ve  $\beta$ -katenin gen ekspresyonu yüksek olan 10 hasta ve 5 sağlıklı birey çalışılmış. Kişilerden alınan kemik iliği/kan örneklerinden CD34+ hematopoetik kök hücreler izole edilmiş ve primer kültürleri yapılmıştır. Kültüre edilen bu hücreler daha sonra ChIP-chip metoduyla analiz edilmiş, araştırmada bu sayede AML hastalığındaki  $\beta$ -katenin proteini ile düzenlenen tüm genlerin profili ilk kez çıkarılmış, tanı ve tedavide olası hedefler ortaya çıkarılmıştır. Böylelikle ilk defa olarak  $\beta$ -kateninin bağlandığı genler genom ebadındaki bir tarama ile ortaya çıkarılmış, AML'nin tanı ve öncelikle tedavisi için biyobelirteçlerin tanımlanmasına yardımcı veriler elde edilmiştir. Bu biyobelirteçlerin yeni ilaç hedefleri olacağı, olası antisens teknolojilerinin geliştirilmesine imkan tanıyacağı açıktır.

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması**

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı Laboratuvar'ında gerçekleştirilmiştir. Hacettepe Üniversitesi Hematoloji Bilim Dalından AML tanısı almış,  $\beta$ - katenin gen ifade düzeyleri laboratuvarımızda belirlenen 10 hasta ve daha önceden her hangi bir malign hastalık tanısı almamış 5 sağlıklı bireyin kemik iliği (K.İ)/kan örnekleri projeye dahil edilmiştir.

RNA'ları çalışılacak bireylerin çalışmaya dahil edilmelerine dair izin kağıtları kendilerinden ve/veya yakınlarından alınmıştır. (Hacettepe Ü. Tıp Fak. Etik kurul tarafından 26.02.2009 tarih ve TBK 09/9-47 karar nolu etik kurul ile onaylanmıştır.)

#### **3.2 CD34<sup>+</sup>Hematopoetik Kök Hücre İzolasyonu ve Primer Kültürü**

İlk olarak hasta ve sağlıklı bireylerden alınan örneklerden (kemik iliği ya da kan) CD34<sup>+</sup> hematopoetik kök hücre izolasyonu yapılmıştır (Şekil 3.1). İzolasyon aşağıda anlatılan şekilde gerçekleştirilmiştir:

-Gelen kemik iliği /kan miktarına göre üzerine aynı volümde “phosphate buffer solution (PBS)” (Thermo Scientific Hyclone, USA) eklenir. Üzerine kan/kemik iliği ile aynı volümde olmak üzere ficoll (PAA, Avusturya) tüpün yan duvarından çok yavaşça sızdırılarak bırakılır. Örneğin; 5 cc kemik iliği/kan + 5 cc PBS ve sonra 5 cc ficoll ilave edilir.

-Tüpler karıştırılmadan ve sarsmadan 1200 x g'de 20 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında en altta eritrositler, eritrositlerin üzerinde yoğunluğu yüksek olan ficoll ve en yukarıda PBS ve plazma vardır. Ficoll ve PBS birleşim yerinde bir bulut şeklinde mononükleer hücreler yer almaktadır.

- Pastör pipeti ile sıvının içine girilerek mononükleer hücreler toplanır ve bu mononükleer

hücrelerden, CD34+ hücrelerin eldesi için EasySep CD34+ izolasyon kiti (Stem cell, Kanada) kullanılmıştır.

-Bu kit, CD34+ hücrelerin magnetik olarak ayırımında kullanılmak üzere "EasySep CD34+ selection kokteyl"(Stem cell, Kanada) ve "EasySep magnetik nanopartiküller"(Stem cell, Kanada) içerir.

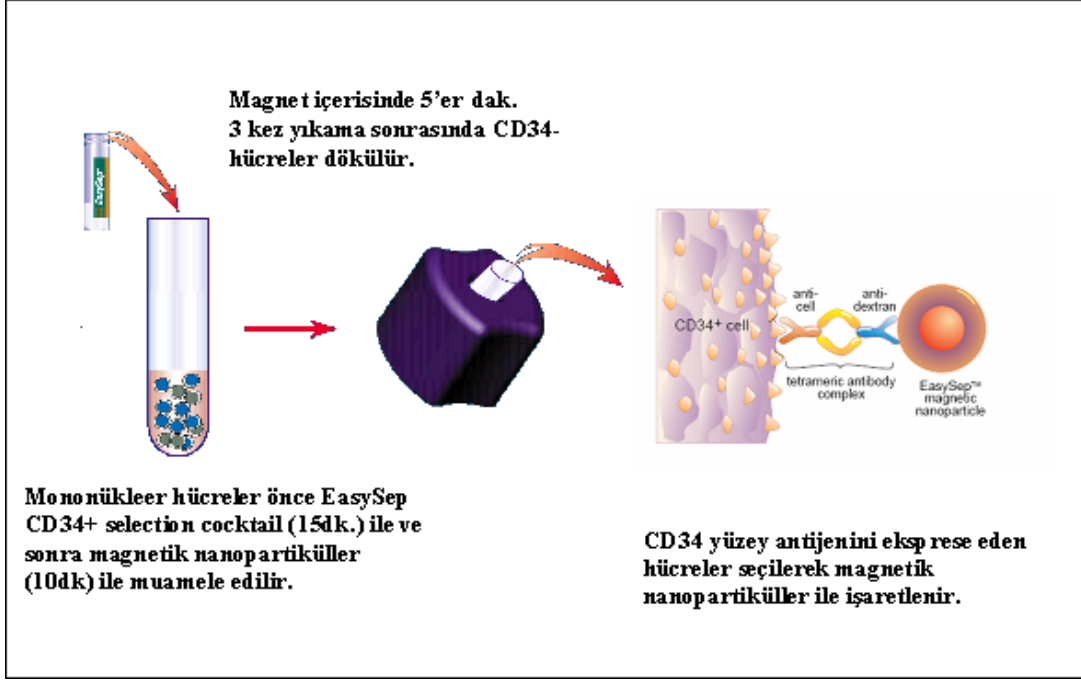
-Mononükleer hücreler öncelikle kokteyl ile karıştırılır ve 15 dk oda sıcaklığında magnet içerisinde inkübe edilir. İnkübasyon sonrasında "EasySep magnetik nanopartiküller" tüp içerisine ilave edilerek magnet dışında 10 dk bekletilir.

-Daha sonra PBS-%2FCS-EDTA karışımı ile tüp içerisindeki volüm 2.5 ml'ye tamamlanıp, tüp tekrardan magnet içerisine koyularak 5 dk. oda sıcaklığında bekletilir.

-5 dk.nın sonunda tüp magnetin içerisinde iken magnet ters çevrilip nanopartiküller ile işaretlenmemiş hücreler dökülür (CD34- hücreler). Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlanır.

-Artık tüpün dibinde kalan istenilen CD34+ hücreleridir. Bu CD34+ hücreler üzerine 1 ml besiyeri ilave edilerek, 6'lı plaklara (Orange Scientific, Belçika) ekim yapılır.

-Bu CD34+ hücreler, hematopoetik hücreler için özel bir besiyeri olan Stemspan H3000 (Stem cell, Kanada) ve Stemspan CC100 (Stem cell, Kanada) sitokin karışımı kullanılarak 37°C de ve % 5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda 1-2 gün boyunca inkübe edilir.



Şekil 3.1 CD34+ hematopoetik kök hücre izolasyon protokolünün şematik gösterimi

### 3.3 Flow Sitometri Analizi ile Hücre Farklaşmasının Kontrolü

CD34+ hücrelerin kültüre edildikten sonra da ilk tanıdaki fenotipini koruyup korumadığını yani hala lösemik hücreler mi yoksa farklılaşmış hücreler mi olduklarını anlamak için farklılaşma yüzey belirteçleri olan CD33, CD34, CD45 antikoru(BD, San Jose USA) kullanılarak Flow Sitometri (FACS Calibur, BD, San Jose USA) analizi ile değerlendirilmiştir (Şekil3.2).

### 3.4 RNA Ekstraksiyonu

Hasta ve sağlıklı bireylerden alınan örneklerden CD34+ hücre izolasyonu ve kültürü yapıldıktan sonra  $\beta$ -katenin gen ekspresyonu yüksek hastaları tespit etmek ve CHIP-chip analizlerinden elde ettiğimiz sonuçları valide etmek amacıyla tüm örneklerden RNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon sırasında aşağıdaki prosedür takip edilmiştir.

-Kültür ortamındaki hücreler 300 x g'de 5 dk santrifüj edilir ve supernatant kısım atılır.

-Pelet üzerine ( $1 \times 10^6$  hücreye 1 ml Trizol) Trizol (Invitrogen, ABD) eklenir ve

homojenize edilmiş hücreler 15-30°C'de 5 dk inkübe edilir.

-Her tüpe 200 µl kloroform (Merck, Almanya) eklenir. Tüpler elle 15 sn. boyunca sallandıktan sonra 15-30°C'de 10 dk inkübe edilir. 12,000 x g.'de 2-8°C, 13 dk santrifüj edilip Santrifüj sonrası alttaki faz kırmızı fenol-kloroform fazı, ara faz ve renksiz-akıcı üst faz olmak üzere 3 faz oluşur. RNA üst fazdadır. (DNA ara fazda ve protein ise alt fazdadır. Bu fazlar saklanır.) Bu faz yeni bir tüpe aktarılır.

-Üzerine 0.5mL izopropil alkol (Merck, Almanya) eklenir. 15-30°C'de 10dk inkübe edilip tüpler 12,000 x g.de 10 dk 2-8°C'de santrifüj yapılır. Süpernatant atılıp, 1 ml %75'lik etanol (Merck, Almanya) eklenir örnekler vortekslenir ve 7,500 x g.de 5 dk 2-8°C'de santrifüjlenir.

-RNA pelleti oda sıcaklığında bekletilerek kurutulup sonrasında RNA, RNaz içermeyen DEPC'li (Applichem, Almanya) su içinde çözülür.

Elde edilen RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrik yöntemle belirlenir (çizelge 4.1). Daha sonra %1'lik Agaroz Jel'de yürütülerek görüntülenir (Şekil 4.3).

### **3.5. Agaroz Jel Elektroforezi**

Agaroz (Pronase) kullanılacağı amaca uygun olarak belirli yüzdelerde hazırlanır. Biz bu çalışmamızda elde edilen RNA ürünlerini %1'lik agaroz jelde değerlendirildi. %1'lik agaroz jel için 0,60 g agaroz tartılıp, TBE 1X solüsyonu ile 60 ml'ye tamamlandı. TBE 1X solüsyonu; TBE 5X solüsyonunun 1/5 oranında ddH<sub>2</sub>O ile seyreltilmesiyle hazırlanır.

#### **TBE 5X solüsyonunun hazırlanışı:**

54 g Trizma<sup>®</sup> (Biobasic, Kanada),

27,5 g Borik asit (Amresco, USA),





20 ml 0,5 M EDTA (Merc, Almanya) ve deiyonize su (ddH<sub>2</sub>O) ile 1 L'ye tamamlanarak hazırlanır.

Agaroz istenilen yüzdelerde hazırlandıktan sonra mikrodalga fırında (Arçelik, Türkiye) kaynatıldı. zerine Etidyum Bromid'in (İnvitrogen, ABD) %5'lik stok solüsyonundan 3 µl ilave edildikten sonra iyice karıştırıldı ve jel tabağına (Qwl Scientific, ABD) döküldü. Jel dökülmeden önce jel tabağı uygun taraklar kullanılarak hazırlandı. Agarozun donması için yaklaşık 30 dk beklendi. Agaroz donduktan sonra jel tabağıyla birlikte jel elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankı TBE 1X solüsyonu ile jelin üstünü kapatacak Şekilde dolduruldu. RNA ürünlerinden 2 µl alınarak, 2 µl Brom-Fenol Mavisı (BBF, Amresco, USA) ile karıştırılıp jele yüklendi. 70 V akımda 20 dk kadar yürütüldü. Ultraviyole ışıkta incelendi. Quantum-ST4 100/26MX, Vilber/Courmat jel grntlme cihazında fotoğraflandı (Şekil 3.4).

### **3.6 Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time PCR)**

Bu çalışmada qRT-PCR yöntemi kullanılarak β- katenin ifadesi kantitatif olarak analiz edilmiştir. İlk olarak CD34+ HKH'den izole edilen RNA örneklerinden 500 ng kullanılarak "Transcriptor High Fidelity c-DNA synthesis kit" (Roche, Almanya) ile c-DNA sentezlendi (izelge 3.1).

**Çizelge 3.1** c-DNA sentez protokolü

<b>Kalıp-Primer Mix Hazırlanışı:</b>		
<b>Komponentler</b>	<b>Hacim</b>	<b>Final Konsantrasyon</b>
Total RNA	Değişken	500 ng
Random Hexamer Primer	2µl	60µM
H <sub>2</sub> O, PCR-grade	Değişken	Son hacim H <sub>2</sub> O ile 11.4 µl' ye tamamlanır.
<b>Toplam Hacim</b>	<b>11.4 µl</b>	
<b>65 °C' de 10 dk  inkübasyon</b>		
<b>Master Mix Hazırlanışı:</b>		
<b>Komponentler</b>	<b>Hacim</b>	<b>Final Konsantrasyon</b>
Transcriptor High Fidelity Revers Transkriptaz Reaksiyon Buffer (5X)	4 µl	1X
Protector RNaz İnhibitor (40 U/ µl)	0.5 µl	20 U
Deoksınükleotid Karışımı (10 mM her bir dNTP)	2 µl	1 mM her bir dNTP
DTT	1 µl	5 mM
Transcriptor High Fidelity Revers Transkriptaz	1.1 µl	10 U
<b>Toplam Hacim</b>	<b>20 µl</b>	
<b>29 °C' de 10 dk  inkübasyon</b>		
<b>48 °C' de 60 dk  inkübasyon</b>		
<b>85 °C' de 5 dk  revers transkriptaz inaktivasyon</b>		



qRT-PCR uygulamalarında kullanılacak olan  $\beta$ -katenin ve hprt (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) (Housekeeping/referans gen: Her dokuda hücre hayatiyetini temin için mutlak suretle ifadelenen genlerdir.) genlerine özgü primerler(Alpha DNA,USA) . "Perl Primer" programı kullanılarak tasarlandı.

Beta Katenin: 5'F: ATTACAACTCTCCACAACCT

Beta Katenin: 5'R: CAGACAGATAGCACCTTCAG

Hprt: 5'F: TGACACTGGCAAACAATGCA

Hprt: 5'R: GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT

"SYBR Green" (Roche, Almanya) floresans boyası kullanılarak primerlerin optimize edildiği sıcaklık olan 60°C'de kantitasyon (qRT-PCR) yapıldı (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2 qRT-PCR protokolü

<b>Master Mix Hazırlanışı:</b>	
<b>Komponentler</b>	<b>Hacim</b>
H <sub>2</sub> O, PCR-grade	2µl
Primer (10xconc) (Forward)	0.5 µl
Primer (10xconc) (Reverse)	0.5 µl
Sybr Green (2xconc)	5 µl
c-DNA	2µl
<b>Toplam Hacim</b>	<b>10 µl</b>
<b>qRT-PCR Programı:</b>	
<b>Denaturasyon</b>	95°C 5 dak
<b>Amplifikasyon</b>	95°C 30 sn
	60°C 30 sn
	72°C 30 sn
	50 siklus
<b>Melting</b>	95°C 10 sn
	65°C 1 dak
	95°C continuous
<b>Cooling</b>	40°C 10 sn

### 3.7 Kromatin İmmün Presipitasyonu (ChIP)

B- katenin gen ifadesi yüksek bulunan 10 hasta ve 5 sağlıklı bireyde CD34+ hematopoetik kök hücrelerinin izolasyonu ve bu hücrelerin kültürü, RNA izolasyonları, cDNA sentezleri, eş zamanlı PCRLarı ve ardından ChIP denemeleri tamamlanmıştır.

Kromatin immünopresipitasyonu (ChIP) aşağıdaki protokole uygun olarak yapılmıştır. Yöntemin ana hatları kısaca özetlenmiştir.

- Hücreler ilk olarak, herhangi bir şekilde ilişkide bulunduğu proteinle çapraz bağ yapan DNA'ya formaldehid ile fikse edilerek çapraz bağlanmıştır.
- Hücreler daha sonra lizis edilmiştir.
- DNA, sonikasyon ile küçük fragmanlara parçalanmıştır.
- Protein-DNA kompleksleri,  $\beta$ - katenin proteinine/pozitif kontrole/negatif kontrole karşı olan antikolarla immünopresipitatlanmıştır.
- İmmünopresipitasyonu takiben, çapraz bağlanma tersine döndürülmüş ve örnekler, proteaz ile muamele edilmiştir.
- Bu işlemi takiben DNA'lar pürifiye edilmiştir
- Pürifiye edilen DNA'lar pozitif kontrol(Ig) ve negatif kontrole özgü primerlerle çoğaltılmıştır.
- Pürifiye edilen DNA'lar miktarlarını mikroarray çalışmaları için uygun konsantrasyonlara getirmek için genom boyu amplifikasyon yapılmıştır.

### 3.8 Bütün Genomun Çoğaltılması

B- Katenin proteini ile çöktürülen örneklerden elde edilen DNA miktarlarını mikroarray çalışmaları için uygun konsantrasyonlara getirmek için genom boyu amplifikasyon yapılmıştır.

10ng DNA örneğimizin yaklaşık 10µg'a çıkarabildiğimiz yöntem fragmentasyon, Omniplex kütüphane oluşturulması ve PCR amplifikasyonu olmak üzere 3 basamaktan oluşmaktadır.

#### **Fragmentasyon aşaması:**

- Öncelikle örnekler spektrofotometre cihazında ölçüldü, DNA konsantrasyonu 1ng/µl olacak şekilde sulandırıldı.
- 10µl örneğin üzerine 1µl 10x fragmentasyon buffer eklendi.
- Daha sonra bu örnekler 95 derecede 4 dakika PCR cihazında inkübe edildi.
- 4 dakika sonunda örnekler hemen buza alınıp kısa bir spin edildi.

#### **Kütüphane hazırlama:**

- Örneklerin üzerine 2µl 1x library preparation buffer eklendi.
- Üzerine 1µl library stabilization solusyonu eklendi.
- Kısa bir vortex ve ardından spin yapıldı daha sonra 95 derecede 2 dakika PCR cihazında inkübe edildi.
- 2 dakikanın ardından hemen buza alınıp, kısa bir spin yapıldıktan sonra tekrar buza alındı.
- Üzerine 1µl library preparation enzyme eklendikten sonra kısa bir vortex ve spin edildi.
- Bu örnekler PCR cihazında aşağıdaki koşullarda inkübe edildi.

16 derecede 20 dakika

24 derecede 20 dakika

37 derecede 20 dakika

75 derecede 5 dakika

4 derecede bekleme

- PCR cihazından alınan örnekler kısa bir spin yapıldı ve amplifikasyon aşamasına geçildi.

### **Amplifikasyon aşaması:**

- Her 15 µl örneğin üzerine aşağıdaki karışım hazırlanıp eklendi.

7.5 µl 10x Amplification master mix

47.5 µl dH<sub>2</sub>O

5 µl WGA DNA polimeraz

Kısa bir vortex ve spin edilen örnekler aşağıdaki şartlarda PCR cihazına koyuldu.

95 derecede 3 dakika

94 derecede 15 saniye }  
65 derecede 5 dakika } 14 siklus

4 derecede bekleme

Inkübasyon sonrasında örnekler %1.5'lik agaroz jele yüklenerek görüntülendi (Şekil 3.10)

### **3.9 Kromatin İmmün Presipitasyonu (ChIP) Yapılan Örneklerin Promotor Arrayleri ile Hibridizasyonu**

Nimble Gene Human ChIP-chip 2.1M Deluxe Promoter Array platformu kullanılmıştır. B-katenin proteini ile çöktürülen örnekler genom boyu amplifikasyon yapıldıktan sonra arraye verilmiştir.

### **Deluxe promoter array:**

HG18 (Build 36) - Mart 2007

30,893 transkripsiyon başlama bölgesi RefSeq (UCSC, 7 May 2009),

28.266 CpG adası promotor bölgesi.

7.250kb yukarıbölge - 3.250kb aşağıbölge

475 miRNA promotor

100bp prob boşluğu 50-75mer proplar (~25-50bp boşluk proplar arası)

### **3.10. Biyoinformatik Değerlendirme**

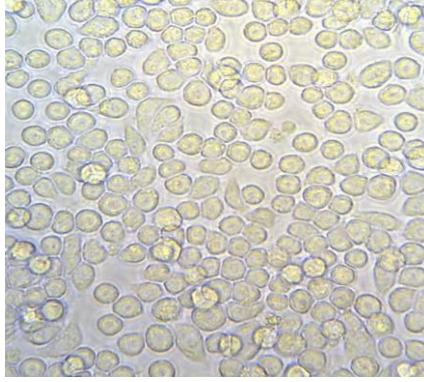
Mikroarray verisinin analizinde, istatistiksel analize yönelik geliştirilmiş bir açık yazılım platformu olan “R” kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

DAVID programı kullanılarak yolak analizleri yapılmıştır (DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis [david.abcc.ncifcrf.gov](http://david.abcc.ncifcrf.gov)).

## 4. BULGULAR

### 4.1 İZOLE EDİLEN CD34+ HÜCRELERİN MİKROSKOBİK GÖRÜNTÜLERİ

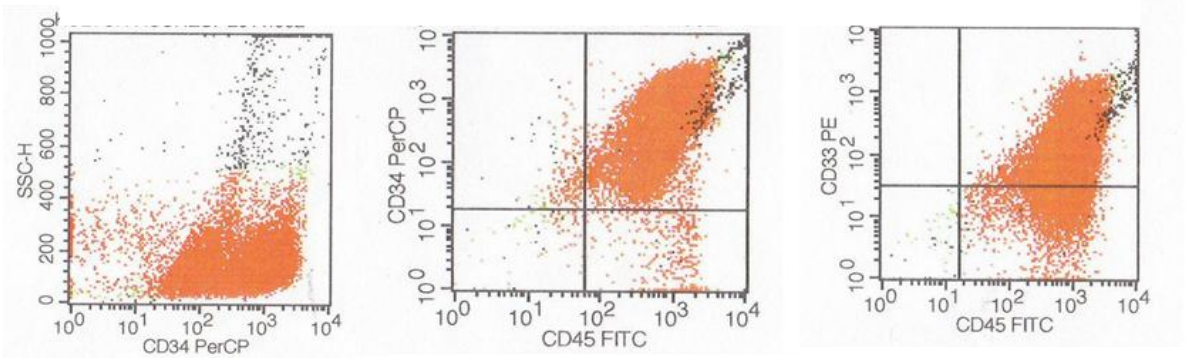
Ficolle mononükleer hücre ayırımından sonra izole edilen CD34+ hematopoetik kök hücreler, bu hücreler için özel bir besiyeri olan Stemsplan H3000 ve Stemsplan CC100 sitokin karışımı kullanılarak 37°C de ve % 5 CO<sub>2</sub> içeren ortamda 1-2 gün boyunca inkübe edilmiştir. İzole edilen ve inkübe edilen hücrelerin morfolojik görüntüleri inverted mikroskopta görüntülenmiştir.



Şekil 4.1 İzole edilen CD34+ hücrelerin mikroskopik görüntüleri (10X 40 büyütme)

### 4.2 FLOW SİTOMETRİ ANALİZİ İLE HÜCRE FARKLILAŞMASININ KONTROLÜ

CD34+ hücrelerinin izolasyonunun doğruluğunu ve hücrelerin farklılaşmadığını tespit etmek için flow sitometri analizi gerçekleştirilmiştir. Bu CD34+ hücrelerin kültüre edildikten sonra da ilk tanıdaki fenotipini koruyup korumadığını yani hala lösemik hücreler mi yoksa farklılaşmış hücreler mi olduklarını anlamak için farklılaşma yüzey belirteçleri olan CD33, CD34, CD45 antikoları kullanılarak Flow Sitometri analizi ile değerlendirilmiştir (şekil 3.2) Analiz sonuçlarına göre 1-2 günlük kültürü yapılan hücrelerin %98 oranında blastik hücreler olduğu yani CD34+ fenotipini koruduğu ve farklılaşmaya gitmediği gösterilmiş olmuştur. Bundan sonraki kültür süreleri hücre yoğunluna bağlı olarak 1 veya 2 gün olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.2 Flow sitometri analiz sonuçları

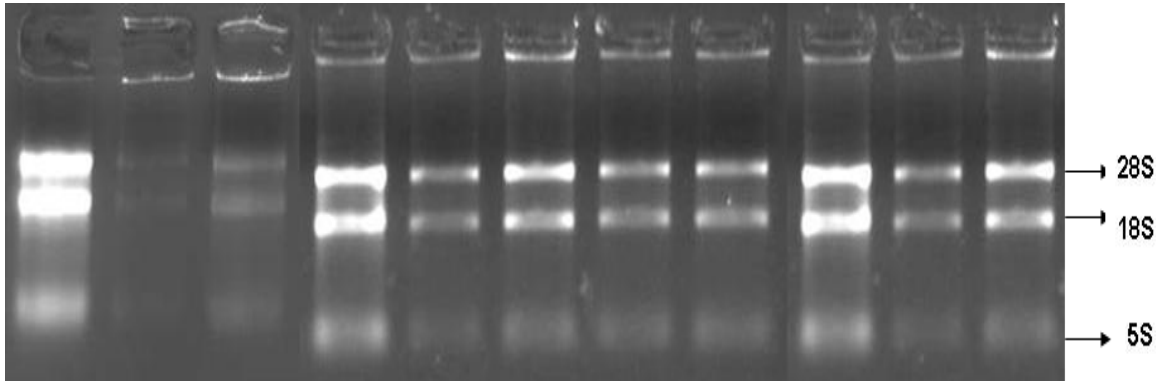
### 4.3 RNA BÜTÜNLÜK, KALİTE VE MİKTAR TAYİNİ

İzole edilen örnekler spektrofotometrik olarak ölçüldü (Çizelge 4.1), ardından %1'lik jele yüklenerek görüntülendi (şekil 4.3).



**Çizelge 4.1** İzole edilen RNA örneklerinin spektrofotometrik okumaları

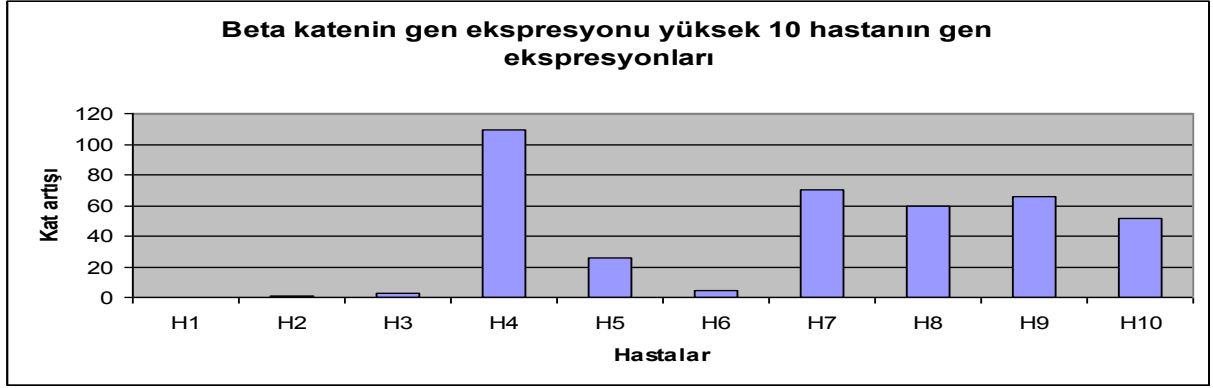
Örnek ismi	ng/ul	OD 260/280
AML 1	72,27	1,73
AML 2	112,32	1,75
AML 3	96,26	1,88
AML4	15,47	1,88
AML5	11,99	1,92
AML6	23,24	1,83
AML7	6,26	1,82
AML8	6,8	1,83
AML9	25,76	1,81
AML10	26,18	1,76
Sağlıklı 1	10,33	1,85
Sağlıklı 2	11,45	1,8
Sağlıklı 3	12,33	1,68
Sağlıklı 4	12,76	1,78
Sağlıklı 5	6,76	1,79



**Şekil 4.3** CD34+ Hücrelerden izole edilen RNA'ların %1'lik Agaroz Jel görüntüsü

#### 4.4 EŞ ZAMANLI PCR (Real Time PCR, *qRT-PCR*) BULGULARI

Eş Zamanlı PCR sonuçlarına göre, 19 hasta ile 5 sağlıklı örnek karşılaştırıldığında bu hastalardan 10 tanesinde  $\beta$ - katenin gen ekspresyon seviyesi yüksek bulunmuştur (Şekil 4.4).

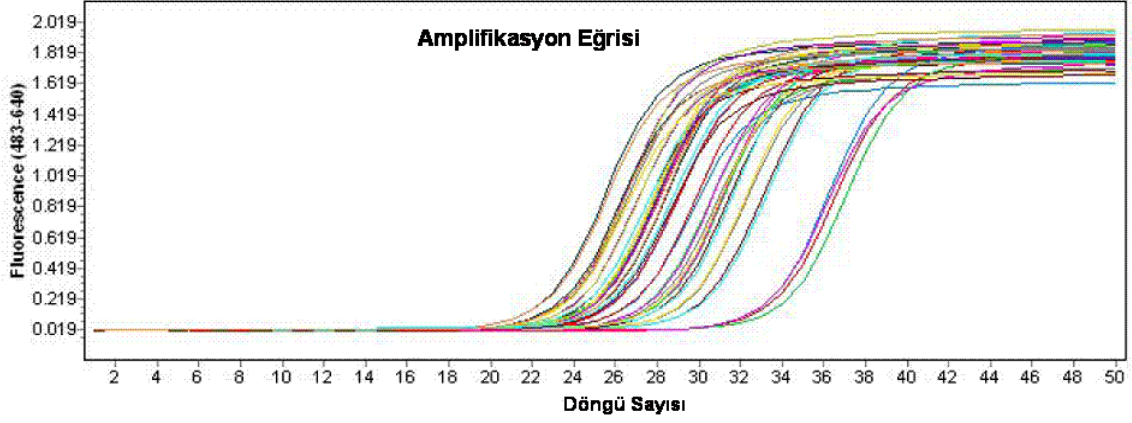


Şekil 4.4 B- katenin gen ekspresyonu yüksek olan 10 hasta

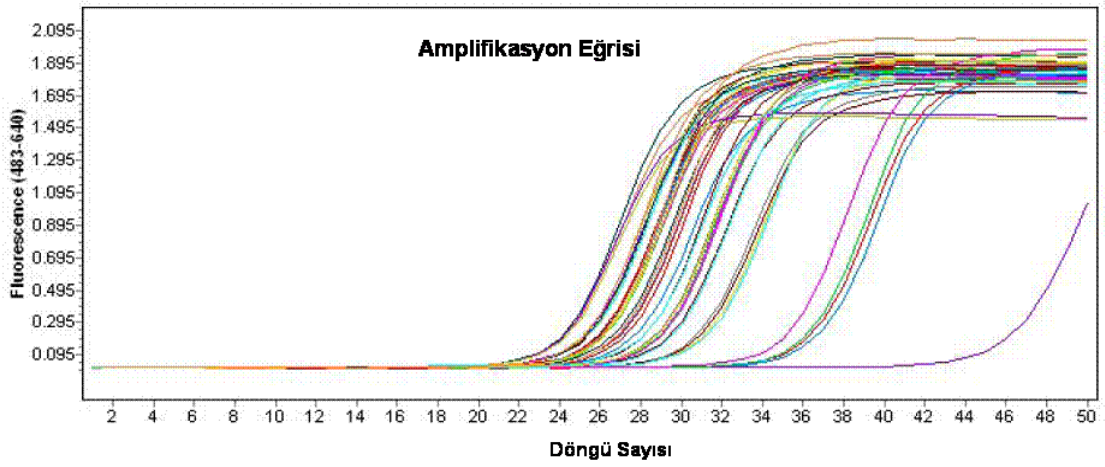
Birbirinden farklı RNA konsantrasyonuna sahip her bir örneğin, başlangıç RNA miktarı 500 ng olacak biçimde ayarlanmıştır ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

$\beta$ -katenin (hedef gen) ve hprt (housekeeping gen) genleri için tasarlanmış primerlerin optimizasyonu amacıyla yapılan PCR'ların ardından, elde edilen cDNA'lar ile qRT-PCR analizi gerçekleştirilmiştir.

qRT-PCR sonucu oluşan ürün miktarının artmasıyla beraber SYBR Green I daha çok bağlanmakta ve böylelikle floresan ışımaya artmaktadır. Eşik değerinin üzerinde anlamlı floresan artışı gözlenen ilk döngü sayısına sayısına Ct (Cycle Threshold) veya Cp (Crossing point) denilmektedir. Şekil 4.5'de  $\beta$ -katenin'e ve şekil 4.6'da hprt'ye ait amplifikasyon eğrisi grafikleri gösterilmektedir.



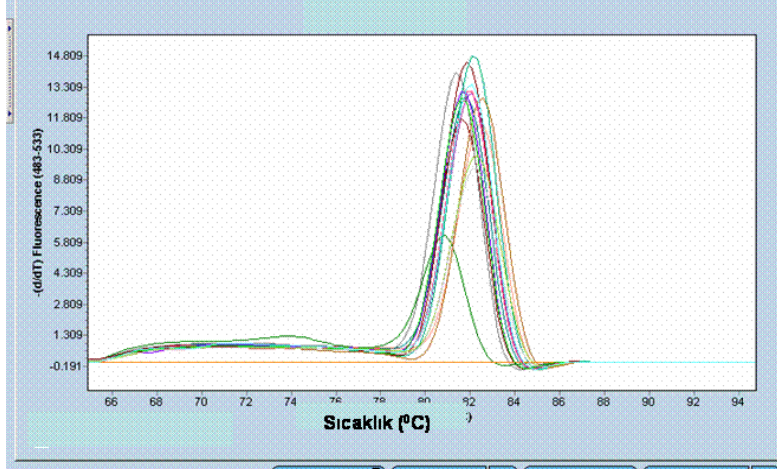
Şekil 4.5 β-katenin amplifikasyon eğrisi grafiği



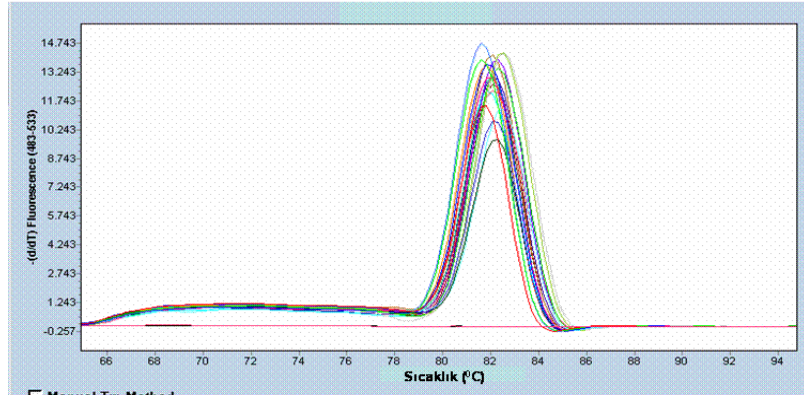
Şekil 4.6 Hprt amplifikasyon eğrisi grafiği

qRT-PCR analizi sonucunda her bir örnek için üç adet Cp değeri oluşmuştur ve bu değerlerin ortalaması kullanılmıştır.

Her qRT-PCR analizinin ardından, çoğaltılan bölgenin istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için erime eğrisi analizleri yapılmıştır. Şekil 4.7’de β-katenin’e ve şekil 4.8’de hprt’ye ait erime eğrisi grafikleri görülmektedir.



Şekil 4.7 β-kaatenin erime eğrisi



Şekil 4.8 hprt erime eğrisi

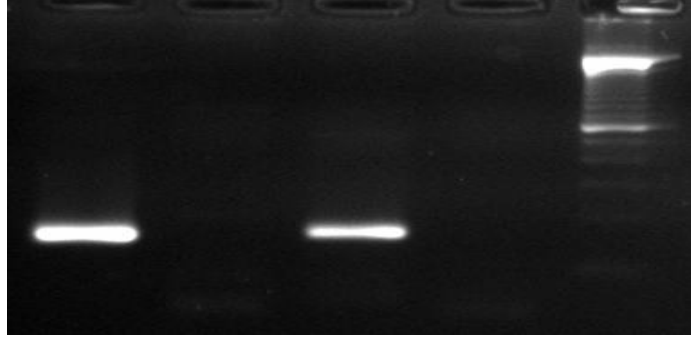
Gen ifade oranlarının hesaplanmasında;

$$R = \frac{(E_{Hedef})^{\Delta CP_{Hedef(Kontrol-Örnek)}}}{(E_{Ref})^{\Delta CP_{Ref(Kontrol-Örnek)}}}$$

formülü kullanılmıştır. Bu formül genlerin amplikasyon veriminin hesaplanıp, sonuca dahil edilmesini öngörür. Bu formül ile hesaplanan gen ifadesi oranları, log<sub>2</sub> tabanına çevrilmiştir.

#### 4.5 KROMATİN İMMÜN PRESİPİTASYONU (ChIP) BULGULARI

B- katenin proteininin kromatin immün presipitasyonu sonucu elde edilen DNA'ların pozitif kontrol ve negatif kontrol primeri ile çoğaltılması sonucu elde edilen bantlar aşağıdaki şekilde (Şekil 4.9) gösterilmiştir.



**Şekil 4.9.** ChIP yapılan örneğin jel görüntüsü; Sırasıyla:pozitif kontrol (161bp), negatif kontrol (159bp), %2input, no dna, 100bp marker

#### 4.6 BÜTÜN GENOMUN ÇOĞALTILMASI

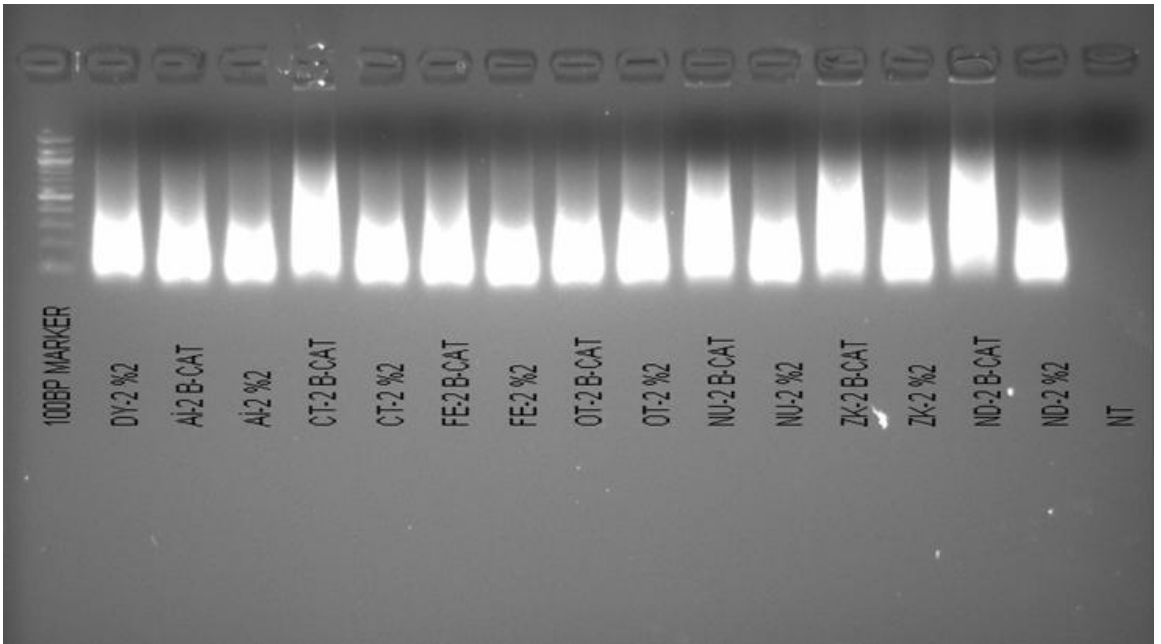
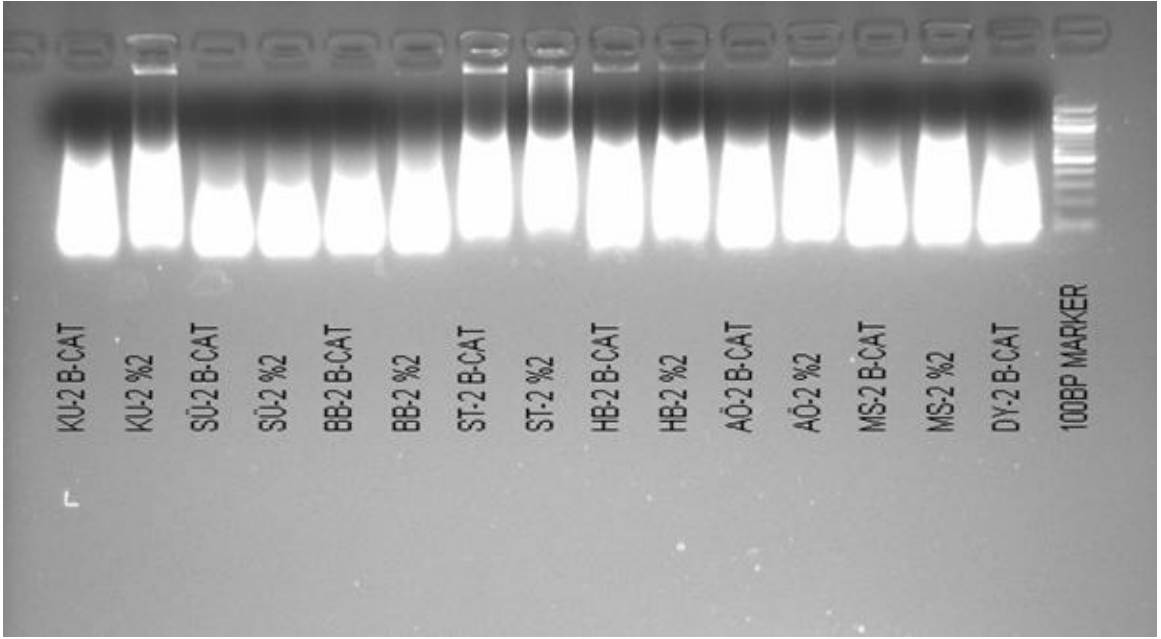
Reaksiyona giren ürün/DNA konsantrasyonunun ve kalitesinin daha da artırılması için yapılan bütün genomu çoğaltma işlemi 10 hasta ve 5 sağlıklı bireyin ChIP sonucu elde edilen DNA örnekleri ile yapılmıştır.

1ng/ $\mu$ l kontrol DNA sı ile başlanan denemede ürün miktarımız yaklaşık 1000 kata kadar arttırılmış bulunmaktadır (çizelge4.2).

**Çizelge 4.2 Örneklerin Özellikleri**

Örnek Numarası	Örnek İsmi	Örnek Hacmi	Konsantrasyon µg/ ml	Kalite Kontrol Yöntemi	
				A260/A280	A260/A230
1	KU-2 B-CAT	30ul	275,6	1,88	1,9
2	KU-2 %2	30ul	273,6	1,87	1,9
3	SÜ-2 B-CAT	30ul	193,7	1,89	2
4	SÜ-2 %2	30ul	202,2	1,84	2
5	BB-2 B-CAT	30ul	192,1	1,89	1,9
6	BB-2 %2	30ul	182,9	1,9	2
7	ST-2 B-CAT	30ul	261,3	1,87	2
8	ST-2 %2	30ul	311,4	1,87	2,1
9	HB-2 B-CAT	30ul	222,8	1,88	2
10	HB-2 %2	30ul	255,9	1,87	2,1
11	AÖ-2 B-CAT	30ul	170,2	1,88	1,9
12	AÖ-2 %2	30ul	213,5	1,88	2,1
13	MS-2 B-CAT	30ul	165,9	1,86	1,9
14	MS-2 %2	30ul	214,9	1,86	2,1
15	DY-2 B-CAT	30ul	159,2	1,87	2
16	DY-2 %2	30ul	132,9	1,87	2
17	Aİ-2 B-CAT	30ul	224,1	1,87	2
18	Aİ-2 %2	30ul	210,6	1,88	2
19	CT-2 B-CAT	30ul	291,3	1,84	2
20	CT-2 %2	30ul	224,9	1,88	1,9
21	FE-2 B-CAT	30ul	213,4	1,88	2
22	FE-2 %2	30ul	184,1	1,88	2
23	OT-2 B-CAT	30ul	238,34	1,88	2
24	OT-2 %2	30ul	201,2	1,88	2
25	NU-2 B-CAT	30ul	250,8	1,84	1,2
26	NU-2 %2	30ul	175,9	1,87	1
27	ZK-2 B-CAT	30ul	262,5	1,85	2,1

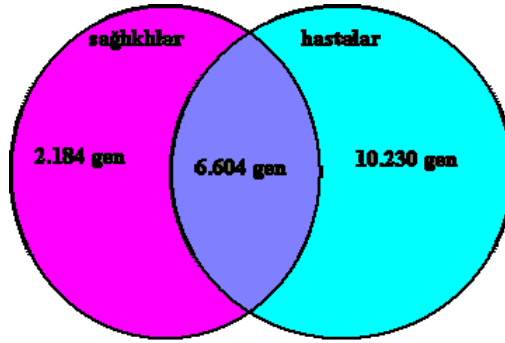
Örnek Numarası	Örnek İsmi	Örnek Hacmi	Konsantrasyon $\mu\text{g}/\text{ml}$	Kalite Kontrol Yöntemi	
				A260/A280	A260/A230
28	ZK-2 %2	30ul	167,663	1,88	2,1
29	ND-2 B-CAT	30ul	251,5	1,85	2
30	ND-2 %2	30ul	176,7	1,87	2



Şekil 4.10. DNA miktarının çoğaltılması. Sırasıyla:100bp marker ve DNA'lar

#### 4.7 ChIP-chip SONUÇLARI

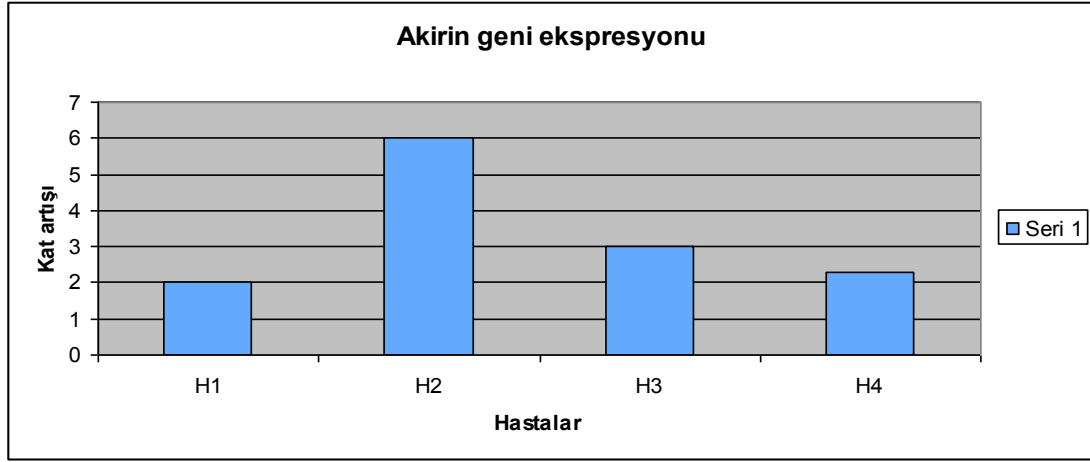
Çalışmamızda, AML hastalığının patogeneğinde kritik rol oynayan Wnt sinyal yolağının ana bileşeni olan  $\beta$ -katenin proteininin hedef genlerinin profili ilk kez belirlenmiştir. Yaklaşık 30.000 promotor bölge taranmış ve elde edilen sonuçlar,  $\beta$ -katenin proteininin sağlıklı ve hasta gruplarının her ikisinde aynı anda 6.604 gene bağlandığını, sadece sağlıklı bireylerde 2.184 gene bağlandığını, sadece hasta grubunda ise bu sayının 10.230' e yükseldiğini ortaya koymuştur (Şekil 4.11). Bulunan bütün genler ontolojilerine göre sınıflandırıldığında çok farklı yollarda görev aldıkları tespit edilmiştir.



Şekil 4.11. Sağlıklı ve hasta bireylerdeki  $\beta$ -katenin proteininin hedef genleri

Bu sonuçların eldesinin ardından, yalnızca hastada ve yalnızca sağlıklı grupta  $\beta$ -kateninin bağlandığı belirlenen genlerin arasından validasyon amacıyla rastgele 3 gen seçilerek bu 3 genin sağlıklı grupta ve hasta grubundaki ekspresyonu saptanmıştır. Bu üç gen arasında yer alan ve  $\beta$ -kateninin hasta grubunda bağlandığı, ancak sağlıklı grupta bağlanmadığı belirlenen Akirin-2 geninin, hasta grubunda sağlıklı gruba göre anlamlı olarak yüksek ekspresyon sergilediği (Şekil 4.12), her iki grupta da  $\beta$ -kateninin hedef geni olarak belirlenen ABCB1 ve GNL3 genlerinin ekspresyonunun ise sağlıklı ve hasta grubu arasında anlamlı farklılık göstermediği belirlenmiştir.





Şekil 4.12. Akirin-2 geninin validasyonu

## 4.8 BİYOİNFORMATİK ANALİZ SONUÇLARI

ChIP-chip mikrodizin data analizi:

### 4.8.1 GÖRÜNTÜ İŞLEME

Islak laboratuvar çalışmasının ardından elde edilen ChIP-Chip verisi üzerinde görüntü işleme analizi gerçekleştirilerek mikrodizin hibridizasyonundan elde edilen ışma verisi transkripsiyon faktörü bağlanma bölgelerinden elde edilen hibridizasyonu nicemleyen sinyal verisine dönüştürülmüştür. Bu işlem her durumda Nimblegen'in ChIP-Chip mikrodizin teknolojisine eşlik eden NimbleScan yazılımı kullanılarak standart görüntü işleme protokolü ile gerçekleştirilmektedir, proje kapsamında da görüntü işleme safhasında bu yol izlenmiştir.

### 4.8.2 CHER (CHIP ENRICHED REGION)' LERİN BULUNMASINA YÖNELİK ANALİZLER

ChIP-Chip mikrodizininin elde edilen veri, istatistiksel analiz platformu "R" üzerinde ChIP-Chip verisi ve ChIP-Chip sonuç çıkarımına yönelik olarak geliştirilmiş "Ringo" paketi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Analiz sonucunda, laboratuvarında  $\beta$ - katenin ile muamele edilmiş örnekler üzerinde, her bir birey için, genom boyunca Chip Enriched Region'lar tespit edilmiştir. Bu bölgeler belirlendikten sonra, deney grupları arasında ortak ve farklı olan CHER bölgeleri elde edilmiştir.

Bölgelerin belirlenmesinin ardından, bu bölgeleri biyolojik açıdan anlamlandırmak amacıyla gerçekleştirilecek diğer analizlere ön hazırlık niteliğinde, ön yolak analizleri gerçekleştirilmiştir.

Chip Enriched Region'lar için raporun devamında CHER kısaltması kullanılacaktır.

Özetle;

- Ön İşleme
- CHER'lerin Elde Edilmesi
- CHER'lerin Deney Grupları Arasında Kıyaslanması deneyleri gerçekleştirilmiştir.

#### **4.8.3 YOLAK ANALİZLERİ**

B- katenin hedef genleri hasta grupları ve sağlıklı kontrol grubunda KEGG yolak analizleri yapılarak genlerin ilişkili olduğu yollar bulunmuştur.

#### **4.8.4 BULUNAN GENLER VE İLİŞKİLİ OLDUĞU YOLAKLAR**

Saptanan bütün B-katenin hedef genleri için DAVID programı kullanılarak yolak analizleri yapılmıştır (DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis david.abcc.ncifcrf.gov).

Çalışmamızda öncelikle;

- AML tanısı almış, 10 hasta ve daha önceden herhangi bir malign hastalık tanısı almamış 5 sağlıklı bireyin kemik iliği (K.İ)/kan örneklerinden CD34+ hematopoetik kök hücre izolasyonu yapılmıştır (Şekil 4.1)
- CD34+ hücre izolasyonu ve kültürünü takiben hücrelerin hematopoetik kök hücre karakterlerini kaybetmediği ve CD34+ oldukları flow sitometri ile teyit edilmiştir (Şekil 4.2).
- Daha sonra bu hücrelerden  $\beta$ -katenin gen ekspresyonu yüksek hastaları tespit etmek ve ChIP-chip analizlerinden elde ettiğimiz sonuçları valide etmek amacıyla RNA izolasyonu yapılmıştır (Şekil 4.3, Çizelge 4.1).
- CD34+ hematopoetik kök hücrelerinin izolasyonu ve bu hücrelerin kültürü, RNA izolasyonları, cDNA sentezleri ve eş zamanlı PCR'larının ardından  $\beta$ -katenin gen ifadesi yüksek bulunan hasta(Şekil 4.4) ve normal olan sağlıklı bireylerden kromatin immünopresipitasyon (ChIP) deneyleri tamamlanmıştır.
- Kromatin immünopresipitasyon deneylerini takiben yani  $\beta$ -katenin proteini ile çöktürülen örneklerden, elde edilen DNA miktarlarını mikroarray çalışmaları için uygun konsantrasyonlara getirmek için genom boyu amplifikasyon yapılmıştır (Çizelge 4.2, Şekil 4.10).
- Daha sonra bu örneklerin Promotor Arrayleri ile Hibridizasyonu için Nimble Gene Human ChIP-chip 2.1M Deluxe Promoter Array platformu kullanılmıştır.
- Elde edilen mikroarray verisinin analizi sonrasında AML hastalığının patogenezinde kritik rol oynayan Wnt sinyal yolağının ana bileşeni olan  $\beta$ -katenin proteininin hedef genlerinin profili ilk kez belirlenmiştir. Yaklaşık 30.000 promotor bölge taranmış ve elde edilen sonuçlar,  $\beta$ -katenin proteininin sağlıklı ve hasta gruplarının her ikisinde aynı anda 6.604 gene bağlandığını, sadece sağlıklı bireylerde 2.184 gene bağlandığını, sadece hasta grubunda ise bu sayının 10.230'e yükseldiğini ortaya koymuştur(Şekil 4.11).
- Bu sonuçların eldesinin ardından, yalnızca hastada ve yalnızca sağlıklı grupta  $\beta$ -kateninin bağlandığı belirlenen genlerin arasından validasyon için 3 gen seçilerek bu 3 genin sağlıklı

grupta ve hasta grubundaki ekspresyonu saptanmıştır ChIP-chip deneyleri valide edilmiştir (Şekil 4.12).

- Daha sonra saptanan bütün  $\beta$ -kateninin hedef genleri için DAVID programı kullanılarak hangi kromozomlar üzerinde oldukları tespit edilmiştir (Şekil 4.13).

- Tespit edilen bütün genler için yine DAVID programı kullanılarak yolak analizleri yapılmıştır ve bu genlerin çok farklı yollarda görev aldıkları tespit edilmiştir (Şekil 4.14-15).

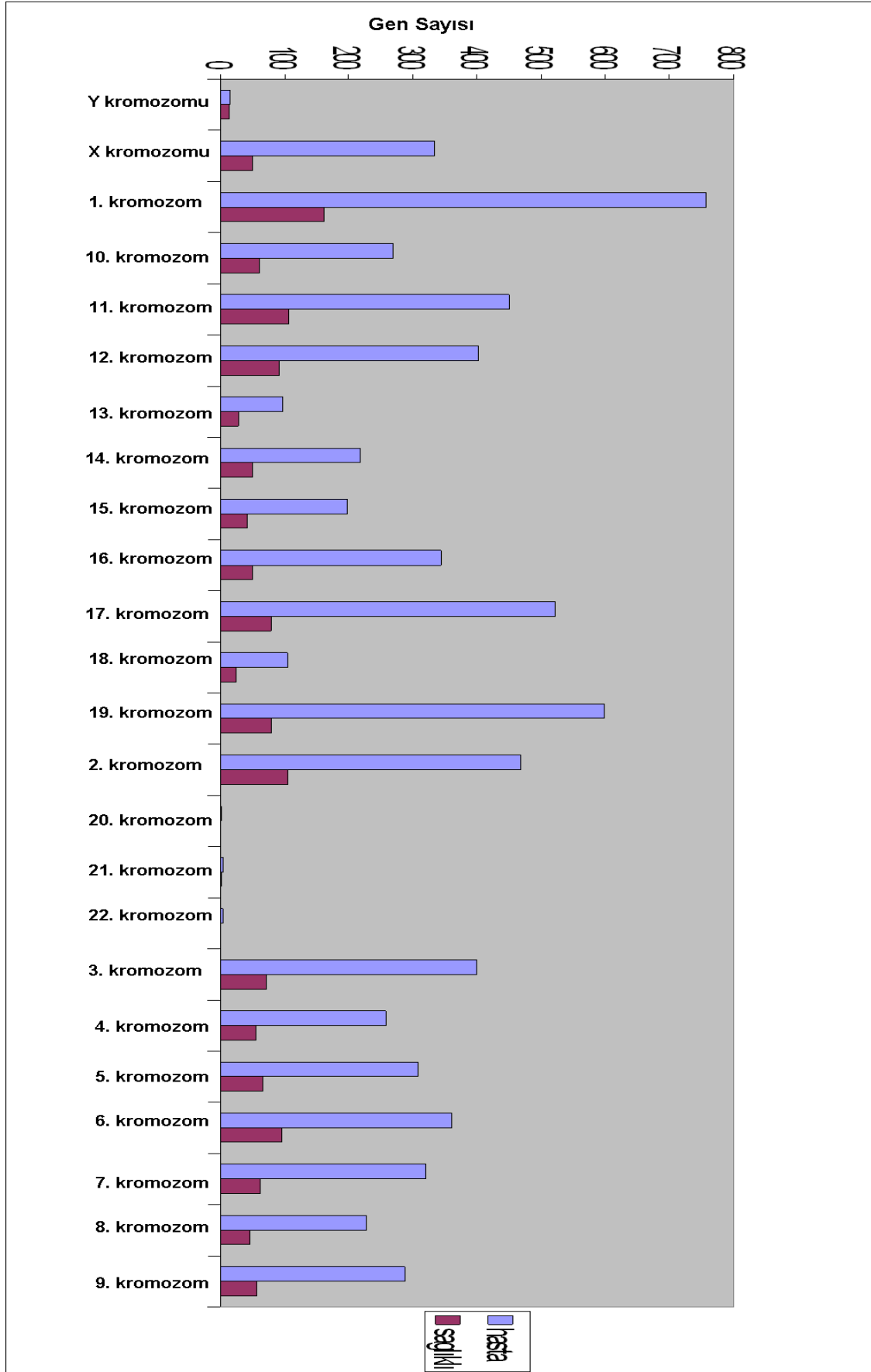
- Bu farklı yollardan, genlerin en çok yığılma gösterdikleri yollar (40-110gen içeren) seçilerek ekibimizin daha önceden bu hastalar ile yapmış olduğu transkriptom analizleriyle kıyaslanmıştır (Çizelge 4.3, 4.4).

- Kıyaslanan 1135 probun hepsinin ekspresyonlarında artış saptanmıştır (Şekil 4.16). Bu da  $\beta$ -katenin proteininin bir transkripsiyon faktörü gibi hareket etmesinden yola çıkarak, bağlandığı genlerin ekspresyonunu artırmasıyla uygun bir sonuç olarak değerlendirilmiştir.

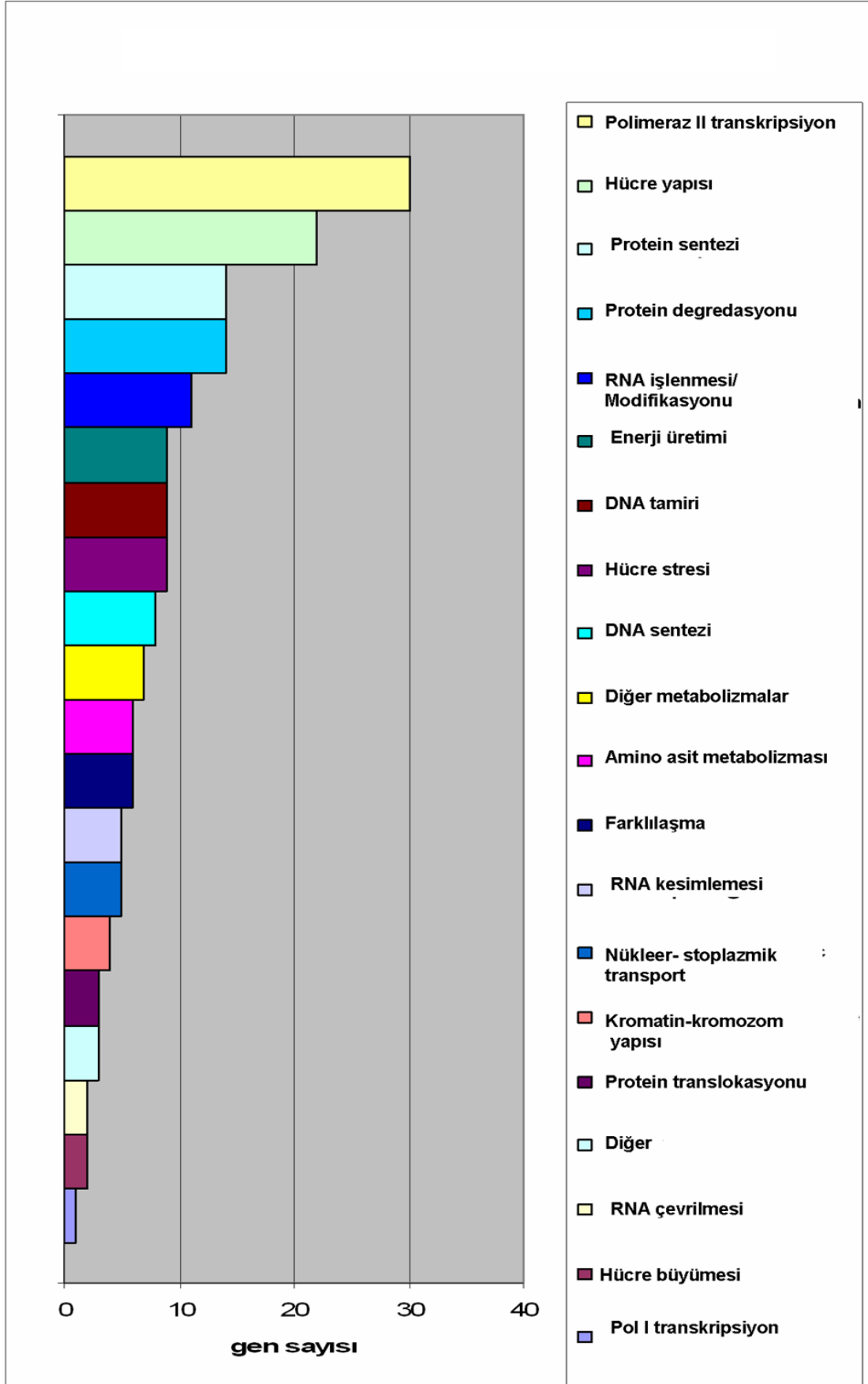
- Daha sonra bu 1135 probun DAVID programında tekrar Fonksiyonel Anotasyon Kümeleri (Clusterları) bulunmuş ve aralarında bir çok kanser grubunun da bulunduğu çok farklı Anotasyon Kümeleri elde edilmiştir (Çizelge 4.5).

- Bulunan bu kümeler içinden, kanserle ilişkili olan 26 yolak tespit edilmiş ve yapılan analizler sonrası bu yollarda yer alan genlerin tamamı belirlenmiştir (Çizelge 4.6, Şekil 4.17).

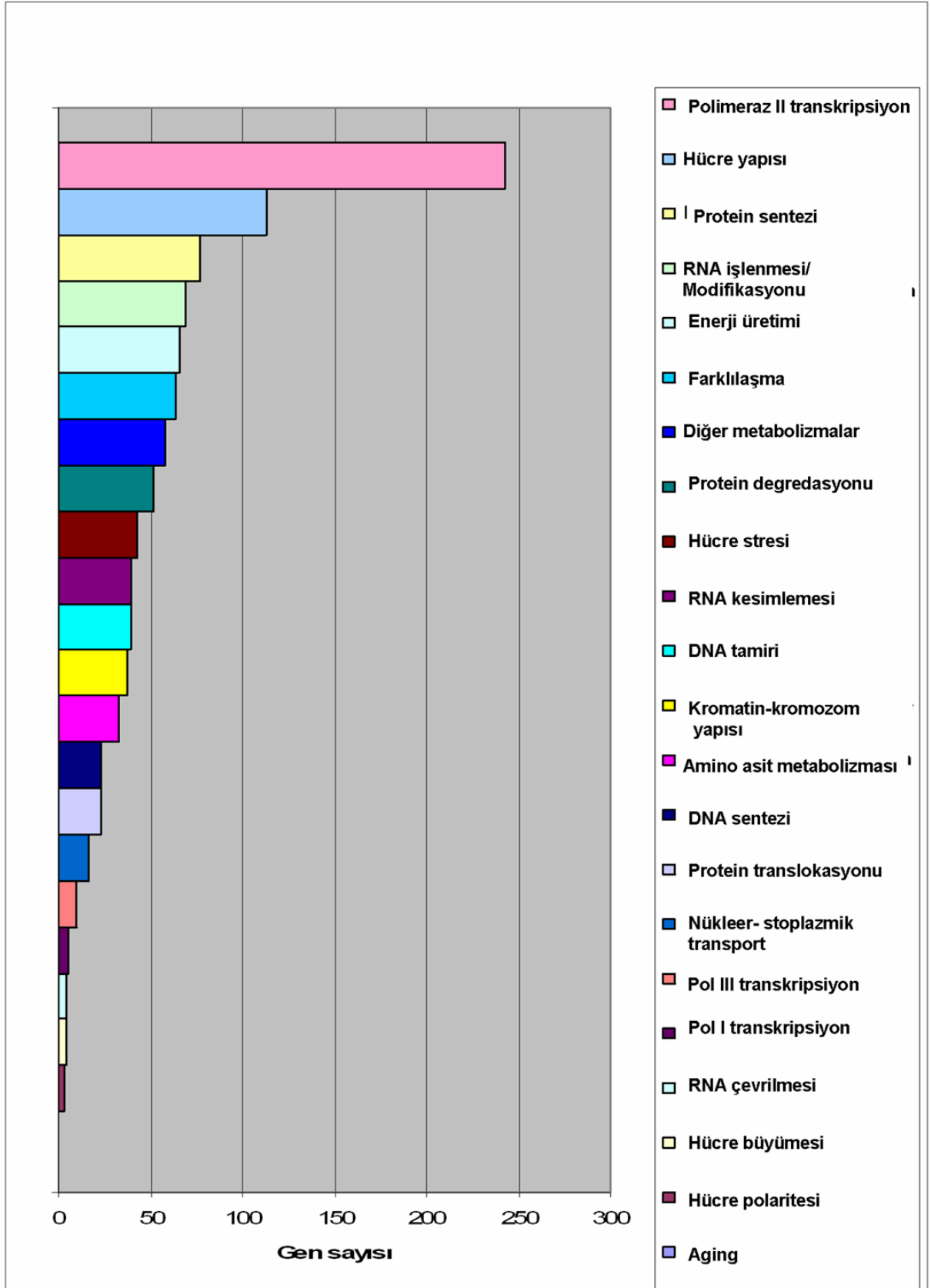
- Bu genler bir çok kanser yolağında aynı anda bulunanlara göre sıralanmış ve sonuç olarak  $\beta$ -katenin proteininin hedefleri olarak 15 adet olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.7).



Şekil 4.13. B-katenin proteininin bağlandığı hedef genlerin kromozomal dağılımı



Şekil 4.14. Sağlıklı bireylerdeki hedef genlerin hücresel rolleri



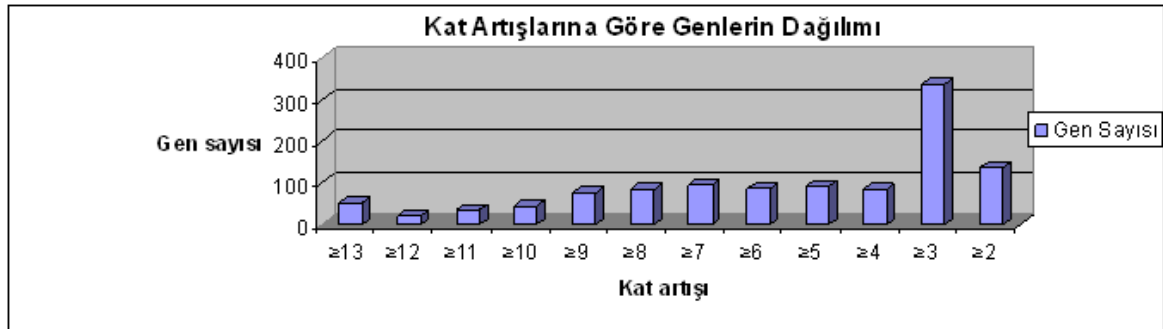
Şekil 4.15. Hasta bireylerdeki hedef genlerin hüresel rolleri

**Çizelge 4.3.** Yalnızca hasta bireylerde hedef olarak tespit edilen genlerin Fonksiyonel Anotasyon Kümeleri

Hastadaki Genler	Bulunan Anotasyon Küme sayısı	0-10 Gen İçeren Anotasyon Küme Sayısı	10-20 Gen İçeren Anotasyon Küme Sayısı	20-40 Gen İçeren Anotasyon Küme Sayısı	40-60 Gen İçeren Anotasyon Küme Sayısı	60-80 Gen İçeren Anotasyon Küme Sayısı	80-110 Gen İçeren Anotasyon Küme Sayısı
Bulunan Anotasyon Küme sayısı	136	66	35	20	4	7	2
Toplam Gen Sayısı	2231	268	483	591	203	481	205

**Çizelge 4.4.** Yalnızca sağlıklı bireylerde hedef olarak tespit edilen genlerin Fonksiyonel Anotasyon Kümeleri

Sağlıklındaki Genler	Bulunan Anotasyon Küme sayısı	0-10 Gen İçeren Anotasyon Küme Sayısı	10-20 Gen İçeren Anotasyon Küme Sayısı	20-40 Gen İçeren Anotasyon Küme Sayısı	40-60 Gen İçeren Anotasyon Küme Sayısı	60-80 Gen İçeren Anotasyon Küme Sayısı	80-110 Gen İçeren Anotasyon Küme Sayısı
Bulunan Anotasyon Küme sayısı	122	89	13	16	2	1	0
Toplam Gen Sayısı	1150	376	182	442	88	62	0



**Şekil 4.16.** Anotasyon kümelerine göre yığılma gösteren genlerin transkriptom verileriyle karşılaştırılması sonucu bulunan genlerin ifadelerindeki değişiklikler.



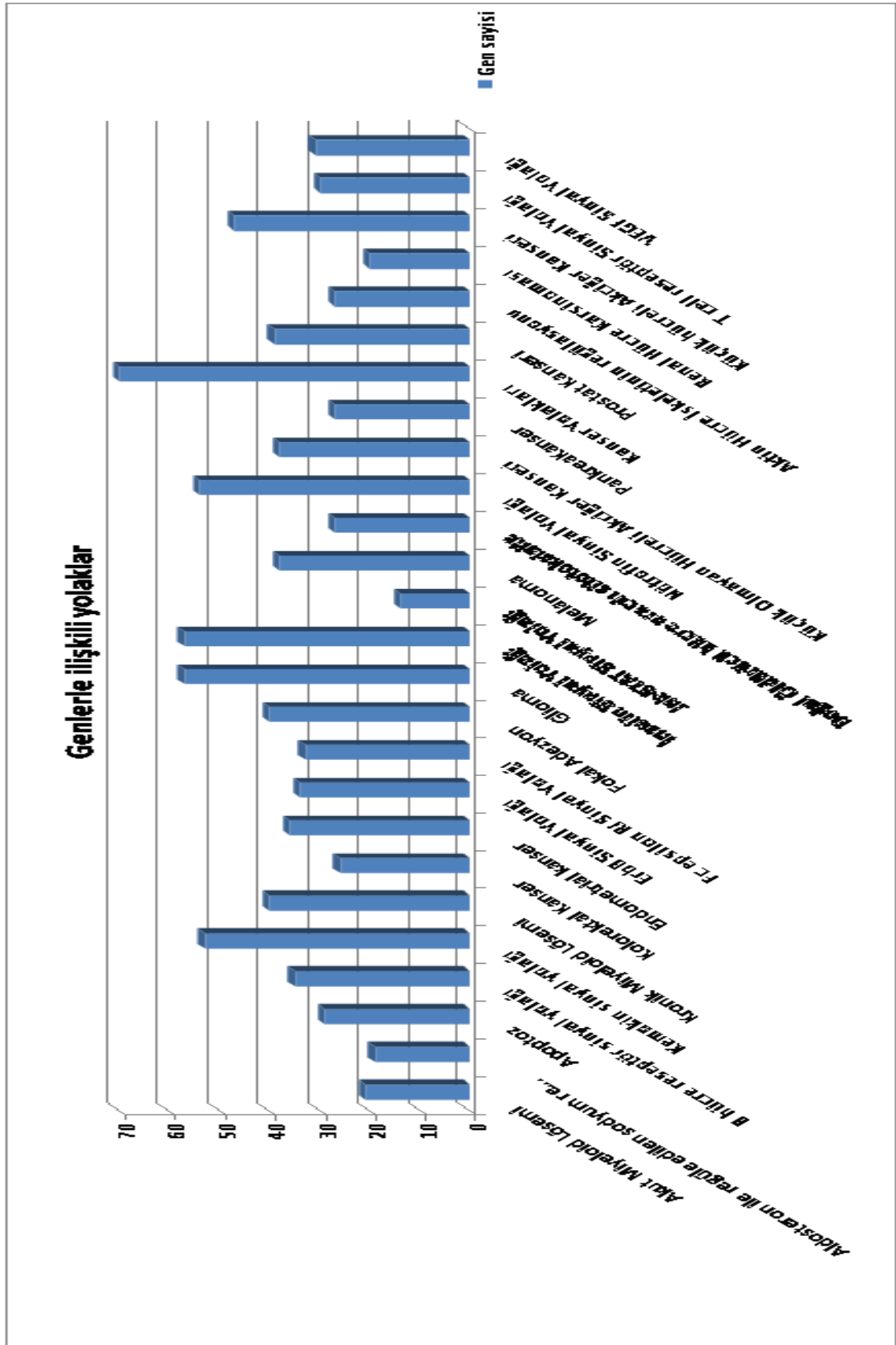
**Çizelge 4.5.** İfade Profilleri Karşılaştırılan Genlerin DAVID Programı ile Anotasyon Kümelerine (Clusterlarına) Ayrılması (devamı Ek-4'te)

Gen ID	Clusters								Genel Toplam
	Annotation Cluster 1 Enrichment Score: 10.79	Annotation Cluster 2 Enrichment Score: 3.16	Annotation Cluster 3 Enrichment Score: 2.96	Annotation Cluster 4 Enrichment Score: 0.97	Annotation Cluster 5 Enrichment Score: 0.95	Annotation Cluster 6 Enrichment Score: 0.55	Annotation Cluster 7 Enrichment Score: 0.37	Annotation Cluster 8 Enrichment Score: 0.05	
1553047 AT					0,95		0,37		2
1553048 A AT					0,95		0,37		2
1553387 AT					0,95				1
1554499 S AT	10,79								1
1554534 AT			2,96						1
1554536 AT			2,96						1
1554631 AT					0,95				1
1554719 AT	10,79								1
1554847 AT	10,79								1
1554855 AT	10,79								1
1555057 AT	10,79								1
1555114 AT	10,79								1
1555353 AT	10,79								1
1555504 AT						0,55			1
1555505 A AT						0,55			1
1555548 AT	10,79								1
1555612 S AT					0,95				1
1555668 A AT	10,79								1
1555834 AT	10,79								1
1556284 AT	10,79								1
1556285 S AT	10,79								1
1558346 AT	10,79								1
1559203 S AT					0,95	0,55	0,37		4
1559204 X AT					0,95	0,55	0,37		3
1559206 AT	10,79				0,95				2
1559496 AT	10,79								1
1560317 S AT	10,79								1
1560974 S AT	10,79					0,55	0,37		3
1561009 AT		3,16							1
1561010 A AT		3,16							1
1562028 AT					0,95				1
1562031 AT					0,95				1
1565731 AT		3,16							1
1567440 AT	10,79				0,95				2
1567443 X AT	10,79				0,95				2
1568629 S AT					0,95		0,37	0,05	3
1568943 AT					0,95		0,37		2
1569042 AT	10,79								1
1569748 AT					0,95		0,37		2
1569891 AT	10,79								1
1570352 AT					0,95				1
1861 AT	10,79				0,95		0,37		3
200081 S AT					0,95		0,37		2
200086 S AT	10,79								1
200096 S AT	10,79								1
200622 X AT	10,79				0,95	0,55	0,37		4
200623 S AT	10,79				0,95	0,55	0,37		4
200635 S AT					0,95				1
200636 S AT					0,95				1
200637 S AT					0,95				1
200653 S AT					0,95	0,55	0,37		3
200655 S AT	10,79				0,95	0,55	0,37		4
200744 S AT					0,95				1
200745 S AT					0,95				1
200746 S AT					0,95				1
200770 S AT					0,95				1
200771 AT					0,95				1
200784 S AT	10,79								1
200785 S AT	10,79								1
200925 AT	10,79								1
200954 AT	10,79								1
201030 X AT			2,96						1
201080 AT					0,95		0,37		2
201081 S AT					0,95		0,37		2
201089 AT	10,79								1
201134 X AT	10,79								1



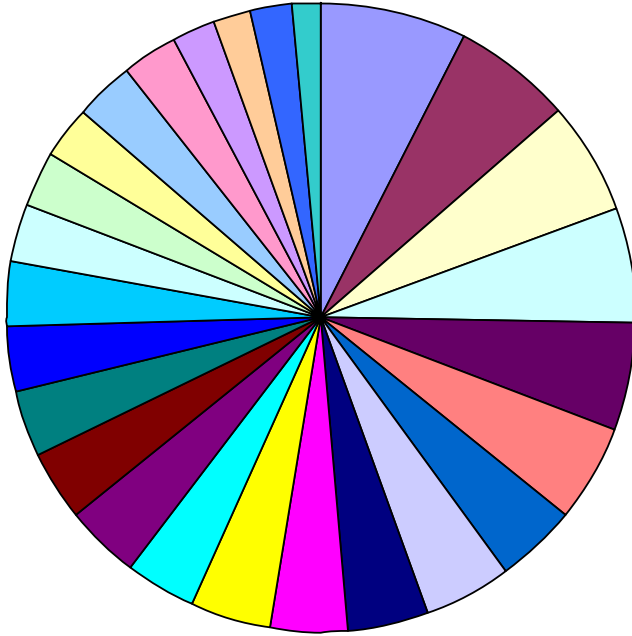
**Çizelge 4.7.** DAVID Programı İle Anotasyon Kümelerine Ayrılan Genlerden, Kanserle İlişkili Çıkan Kümelerin Yolak Analizlerinden elde edilen 15 genin detaylandırılmış hali.

prob id	Gen isimleri	log fc	score	Acute myeloid leukemia	Alkaloze regele id	B cell receptor	Chemo kinase	Chronic myeloid leukemia	Colorectal cancer	Endometrial cancer	ErbB signaling pathway	Fc epsilon R1 signaling pathway	Focal adhesion	Glioma	Insulin signaling pathway	Jak-STAT signaling pathway	Melanoma	Natural killer cell mediated cytotoxicity	Neurotrophin signaling pathway	Non-small cell lung cancer	Pancreatic cancer	Prostate cancer	Regulation of actin cytoskeleton	Renal cell carcinoma	Small cell lung cancer	T cell receptor signaling pathway	VEGF signaling pathway	Genel Toplam
220566_AT	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 5	0,271064	0,271064	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	26	
229392_S_AT	protein kinase C, beta	3,800503	12,39812	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	26	
207105_S_AT	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 2 (beta)	4,021279	12,39812	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	26	
1559204_X_AT	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma oncogene homolog and phosphatase	3,811815	8,600632	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22	
228572_AT	tensin homolog and phosphatase	3,815908	0,685677	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	19	
202647_S_AT	neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog	6,509758	21,67216	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	19	
223049_AT	growth factor receptor-bound protein 2	9,713978	0,685677	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	19	
232660_AT	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	3,792813	6,004068	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	15	
1861_AT	BCL2-associated agonist of cell death	5,008642	6,004068	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	15	
211300_S_AT	tumor protein p53	3,605692	24,31658	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12	
209945_S_AT	glycogen synthase kinase 3 beta	6,025984	1,284144	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	11	
209239_AT	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1	8,857232	1,005308	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	11	
231699_AT	cyclin-dependent kinase 6	3,280522	22,16055	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	
201469_S_AT	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1	3,382372	3,711463	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8	
205693_S_AT	E2F transcription factor 3	8,882664	2,437958	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8	



Şekil 4.17. DAVID Programı İle Anotasyon Kümelerine Ayrılan Genlerden, Kanserle İlişkili Çıkan Kümelerin Yolak Analizleri ve İçerdikleri Gen Sayıları.

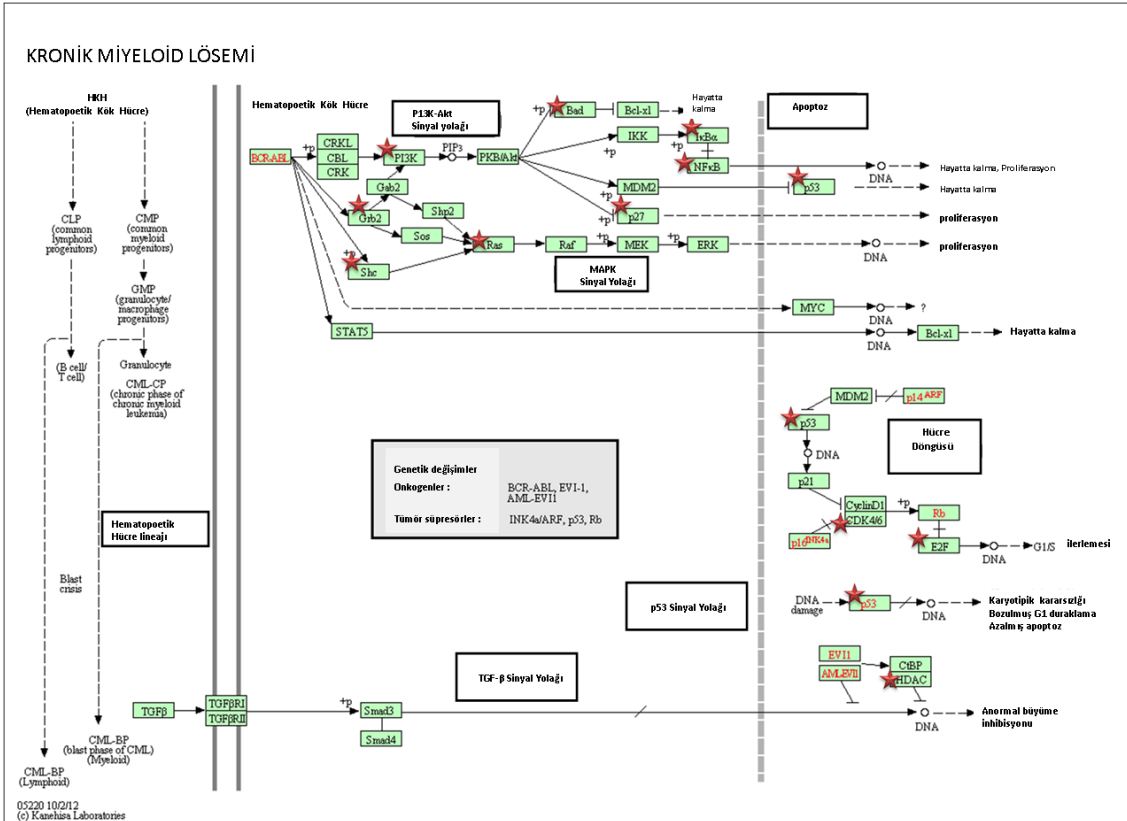
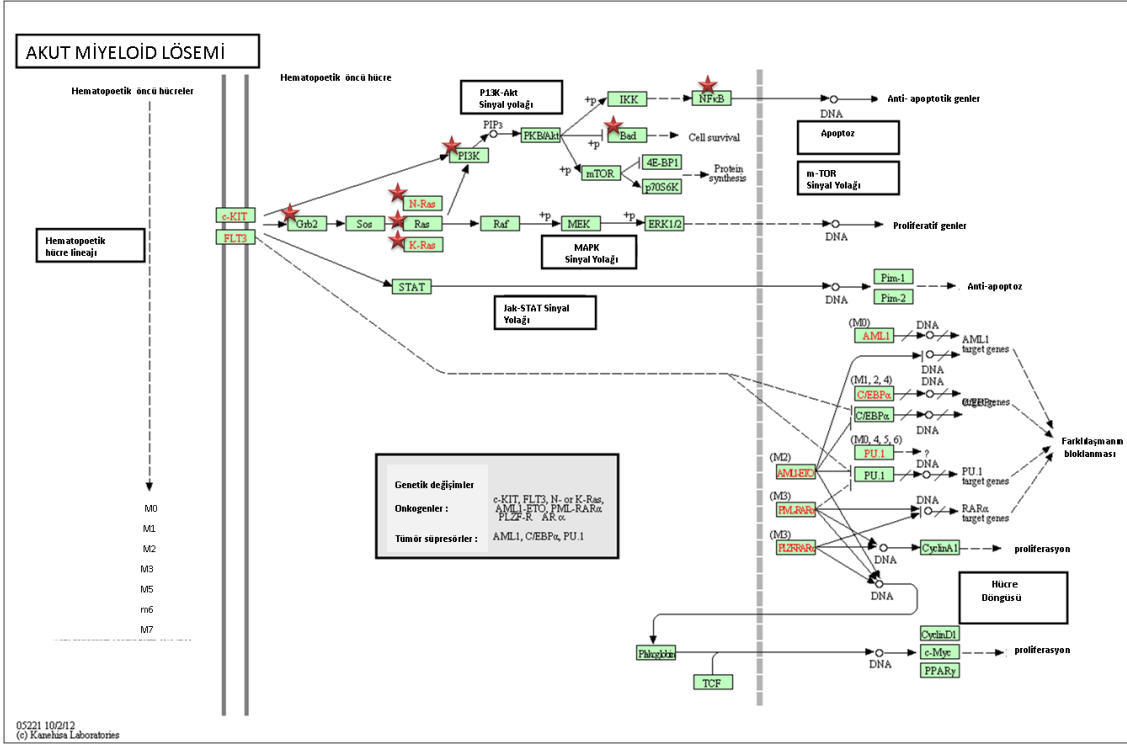
## Kanserle İlişkili Yolaklar

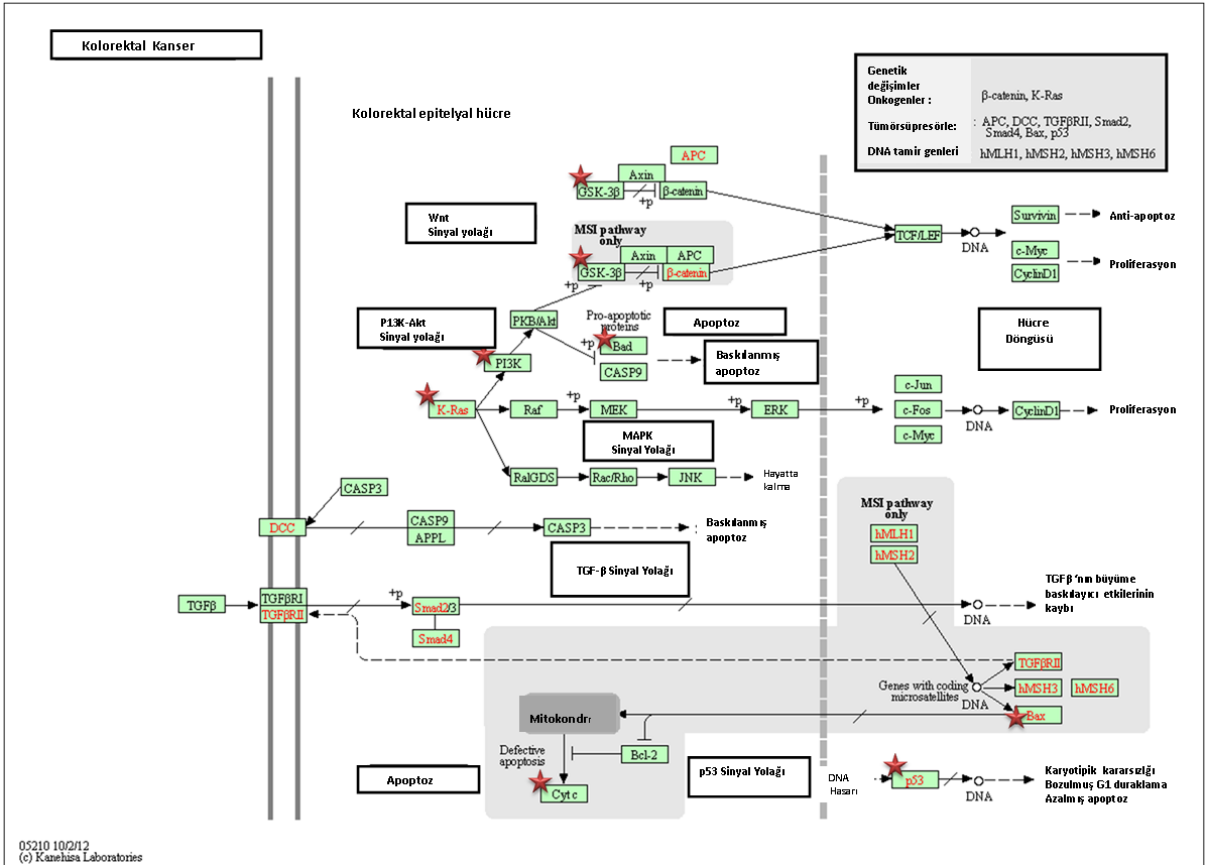
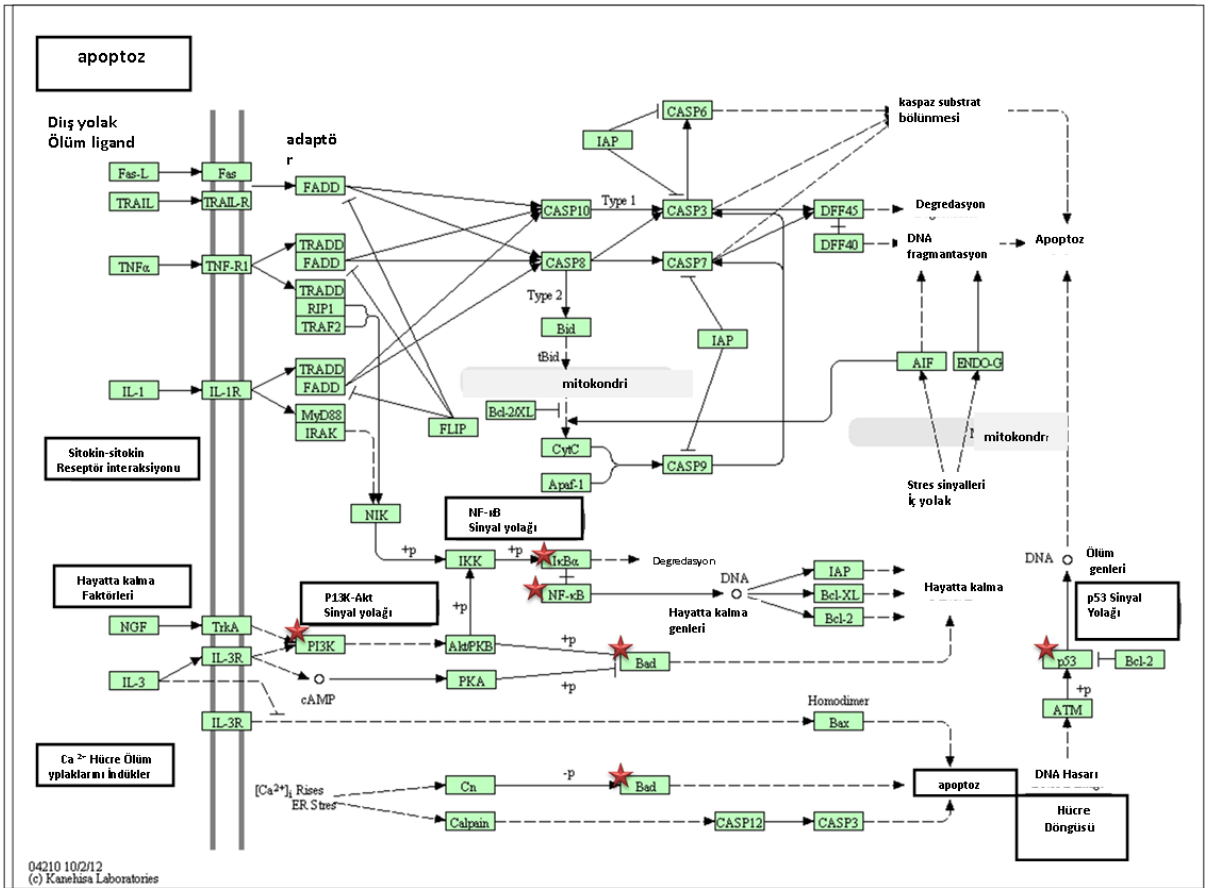


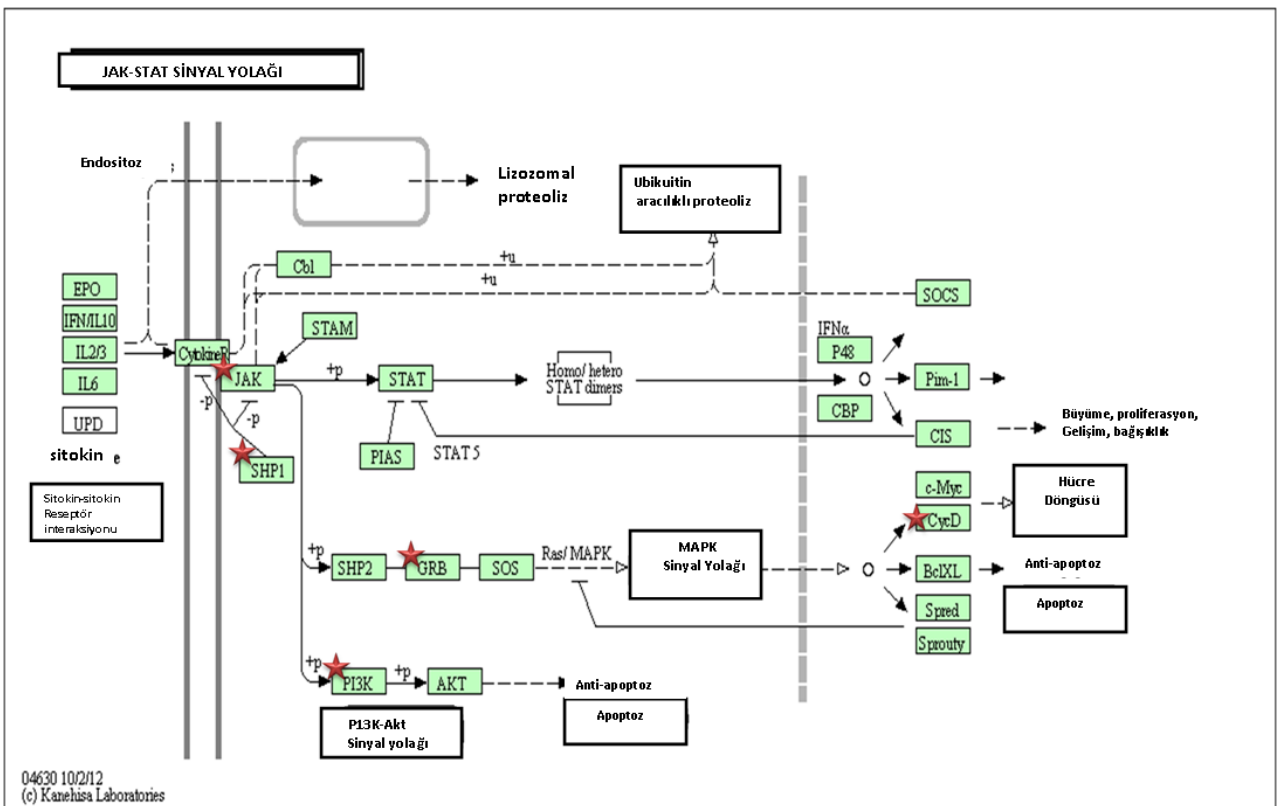
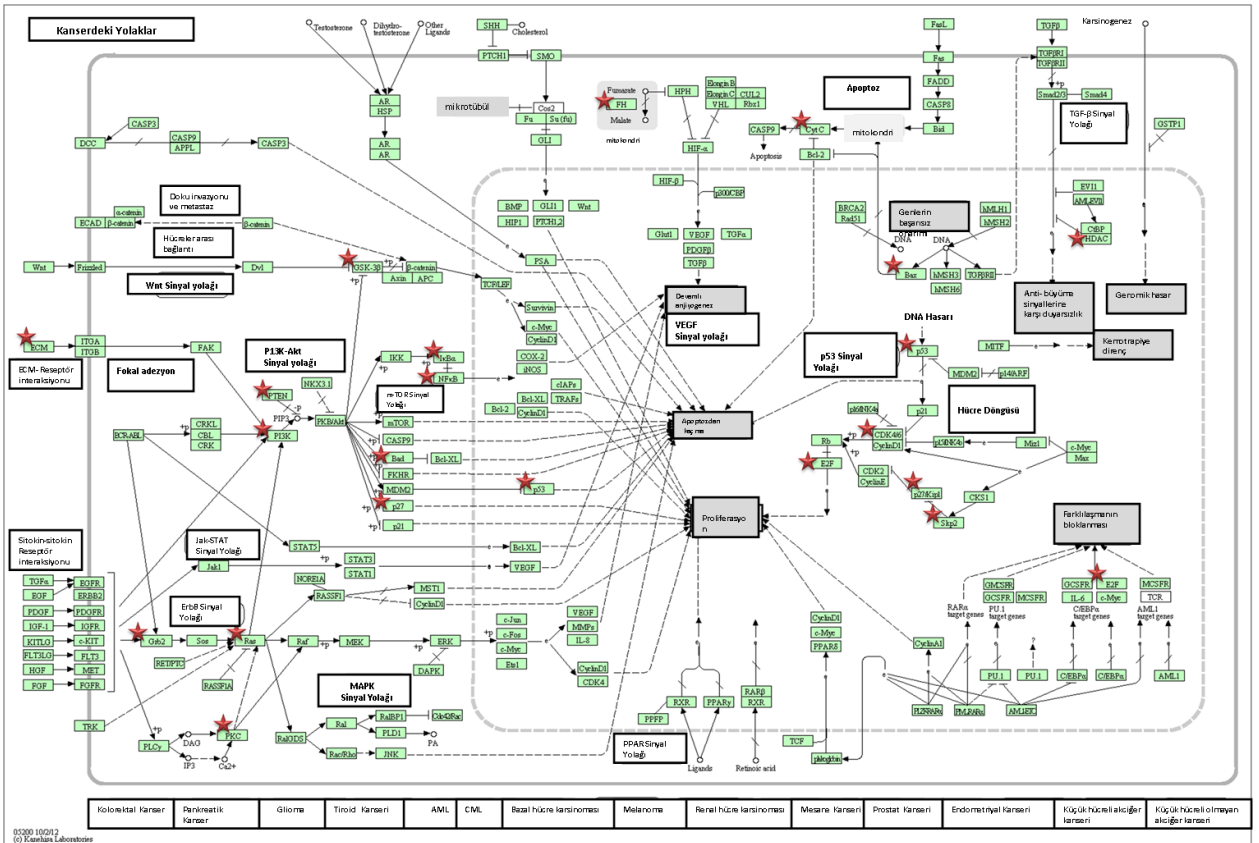
- Kanser Yolakları
- Glioma
- İnsulin Sinyal Yolağı
- Nötrofin Sinyal Yolağı
- Kemokin sinyal yolağı
- Küçük hücreli Akciğer Kanseri
- Kronik Miyeloid Lösemi
- Fokal Adezyon
- Prostat Kanseri
- Melanoma
- Küçük Olmayan Hücreli Akciğer Kanseri
- Endometrial kanser
- B hücre reseptör sinyal yolağı
- ErbB Sinyal Yolağı
- Fc epsilon RI Sinyal Yolağı
- VEGF Sinyal Yolağı
- T cell reseptör Sinyal Yolağı
- Apoptoz
- Doğal Öldürücü hücre aracılı sitotoksisite
- PankreaKanser
- Aktin Hücre İskeletinin regülasyonu
- Kolorektal Kanser
- Akut Miyeloid Lösemi
- Renal Hücre Karsinoması
- Aldosteron ile regüle edilen sodyum reabsorbsiyonu
- Jak-STAT Sinyal Yolağı

Şekil 4.18. Kanserle İlişkili Bulunan Yolaklar

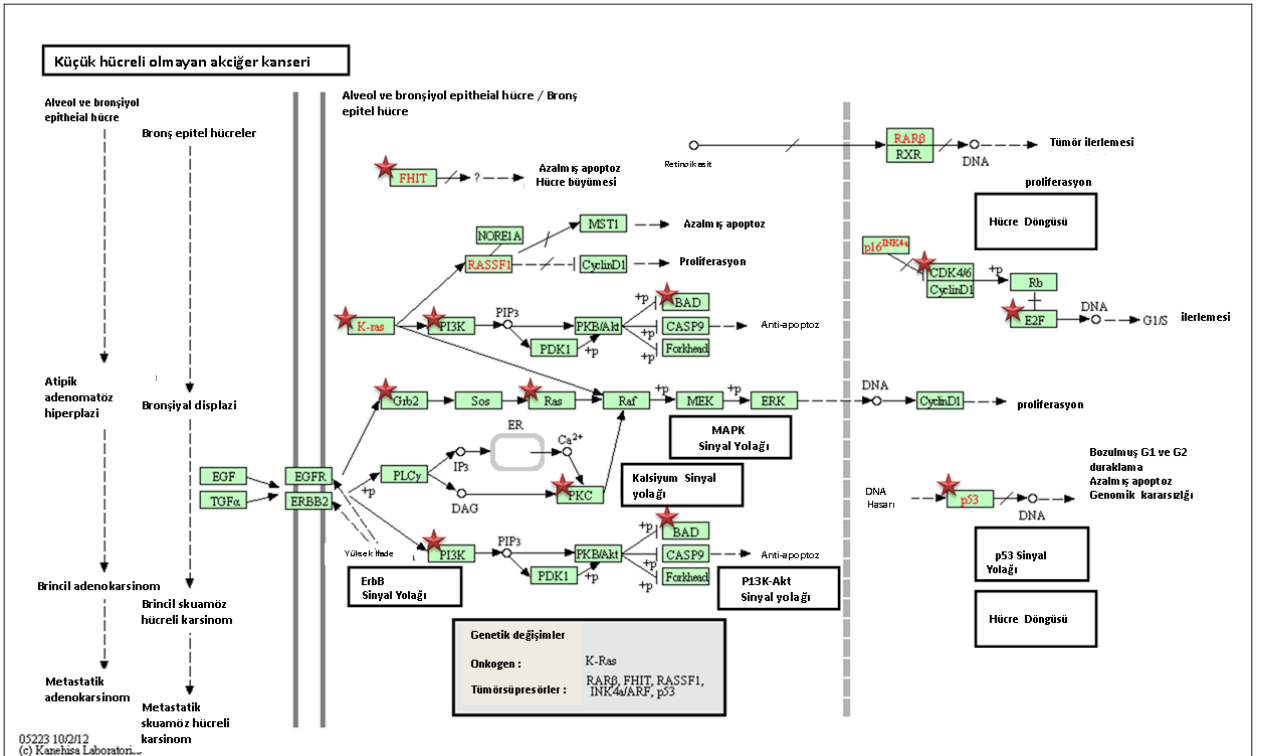
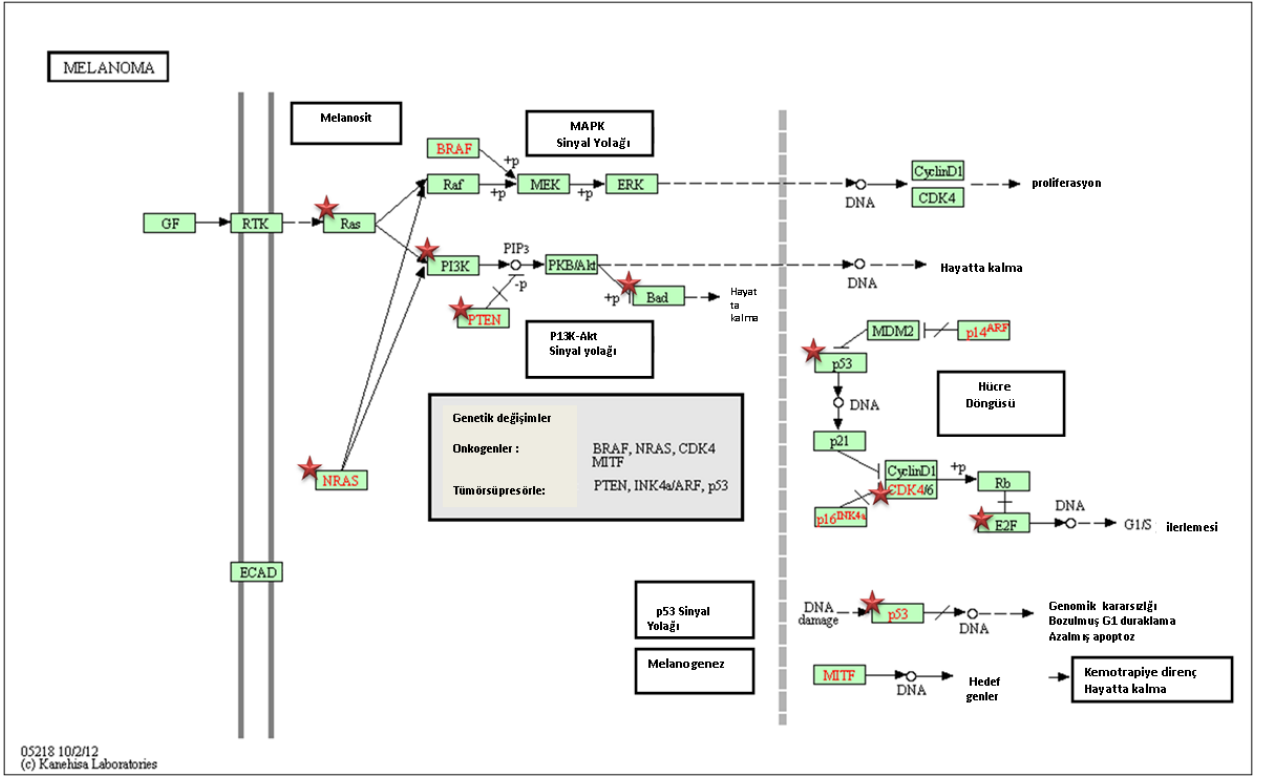
**Şekil 4.19.** DAVID Programı ile Yapılan Yolak Analizleri Sonucunda Kanslerle İlişkili Çıkan Yolaklar ve Bu Yolaklarda Tespit Edilen Genler (hedef genler yıldızla işaretlenmiştir).

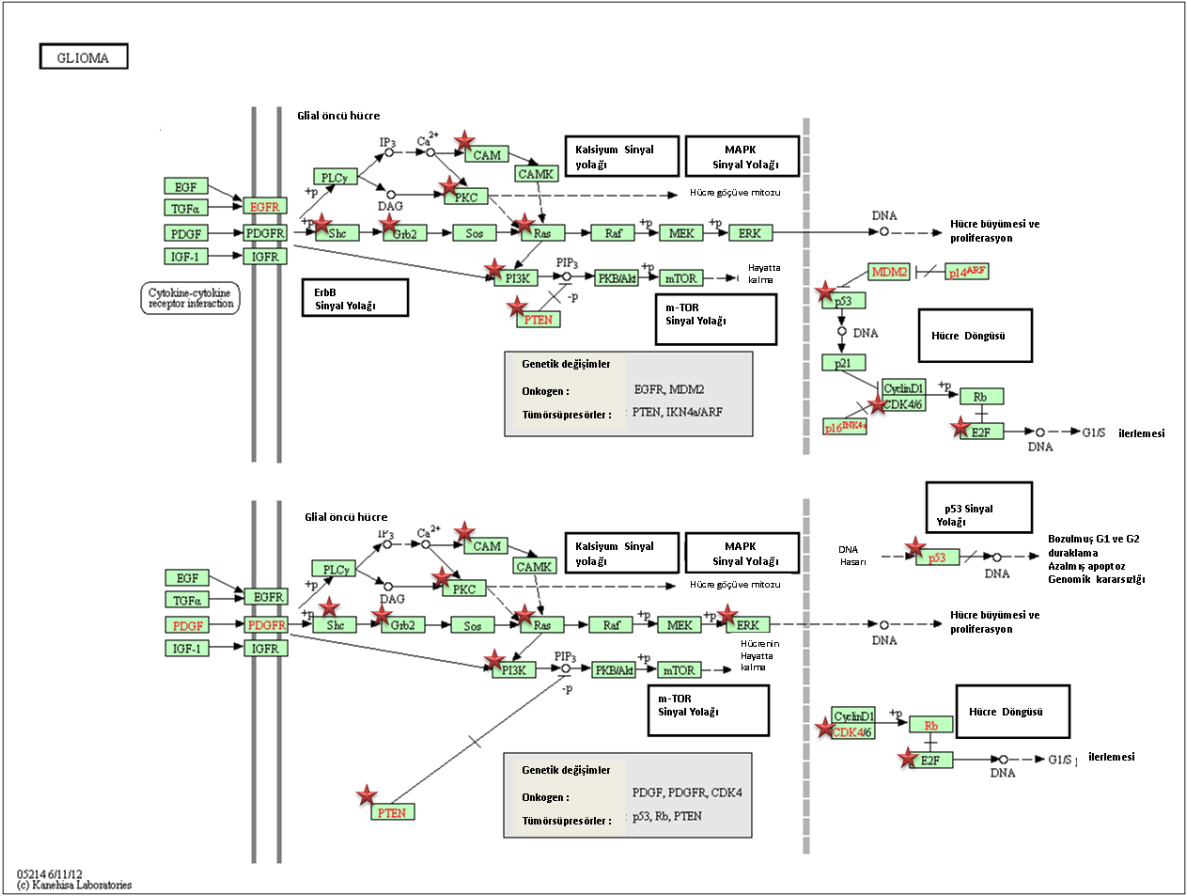












## 5. TARTIŞMA

Akut miyeloid lösemi (AML), kemik iliğinde ve periferel kanda olgunlaşmamış miyeloblastların birikimi ile tanımlanan heterojen bir hastalıktır. Bu hastalık, diğer kanserlere benzer şekilde, hücre proliferasyonu ve miyeloid farklılaşmasını etkileyen farklı yolakların değişikliği ile karakterize olan çok basamaklı bir süreçtir (Gilliland 2004). Geçtiğimiz birkaç yıl boyunca, AML' nin, lösemik büyümeyi başlatma ve sürdürme yeteneğine sahip lösemik kök hücreler tarafından gerçekleştiği fikri benimsenmiştir (Lapıdot 1994, Bonnet 1997, Ailles 1999, Feuring-Buske 2003). Bu lösemik kök hücreler, seri transplantasyon deneyleri ile gösterildiği üzere kendini yenileme kapasitesi sergilemektedirler. Lösemik kök hücrelerin kendini yenilemesinde farklı yolakların kritik oldukları belirlenmiştir. Bu yolaklar arasında Bmi1, Hox genleri, Hedgehog, Notch ve Wnt/ $\beta$ -katenin bulunmaktadır (Rızo 2008, Sengupta 2007, Dash 2002, Bansal 2006).

Primer akut miyeloid lösemi hücrelerinin, normal hematopoetik progenitörlere kıyasla anlamlı olarak yüksek  $\beta$ -katenin mRNA düzeyleri sergiledikleri bildirilmiştir (Serinsöz 2004). Primer AML örneklerinin nükleer fraksiyonlarında  $\beta$ -kateninin varlığı ve bununla ilişkili "TCF/LEF1 reporter aktivitesi" aktif Wnt sinyaline işaret etmektedir (Simon 2005). AML vakalarının büyük çoğunluğunun, gerek başlangıç gerek ilerleme aşamalarında yüksek düzeyde Wnt yolağına bağımlı oldukları izlenimi uyandırıyor olmaları, bu yolağı AML tedavisi için önemli bir hedef haline getirmektedir.

Geçtiğimiz 10 yıl içinde, 'high-throughput' teknolojilerin geliştirilmesi, protein-DNA interaksiyonlarının karakterizasyonunda devrim yaratmış ve pekçok DNA' ya bağlanan protein için DNA sekans tercihleri ile eşsiz veri setleri oluşturmuştur. CHIP-chip olarak da bilinen, 'mikrodizinler üzerinde kromatin immünpresipitasyonu', DNA' ya bağlanan proteinlerin genom ebadındaki lokalizasyonunun aydınlatılması için popüler bir tekniktir ve bu tez çalışmasında bu teknoloji kullanılarak AML hastalarında  $\beta$ -katenin transkripsiyon faktörünün DNA üzerinde bağlandığı genler belirlenmiştir.

Çalışmamızda, AML tanısı almış, 10 hasta ve daha önceden herhangi bir malign hastalık tanısı almamış 5 sağlıklı bireyin kemik iliği (K.İ)/kan örneklerinden CD34+ hematopoetik kök hücre izolasyonu yapılmıştır. CD34+ hücre izolasyonu ve kültürünü takiben  $\beta$ -katenin

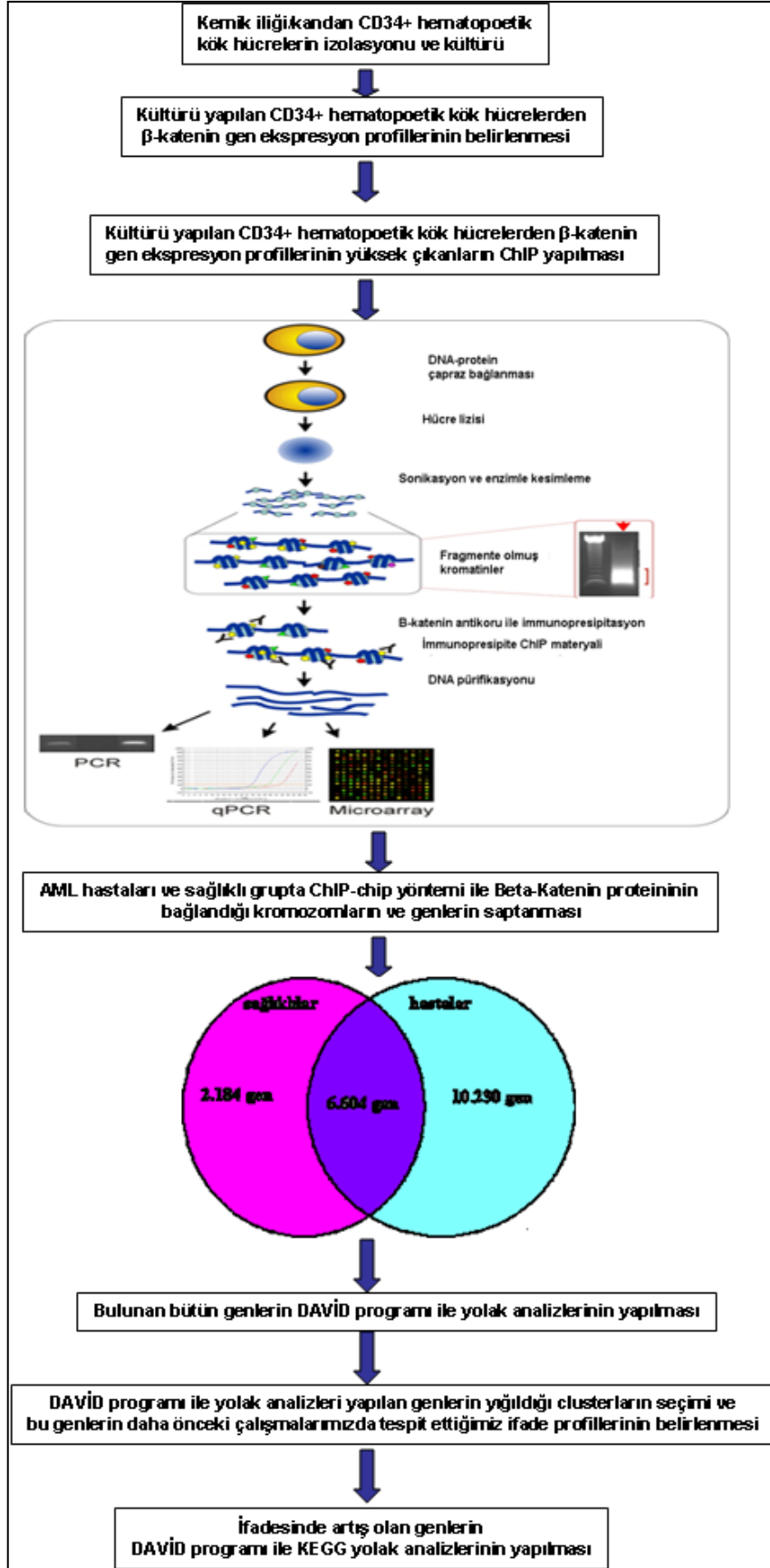
gen ekspresyonu yüksek hastalar seçilmiştir.  $\beta$ -katenin gen ifadesi yüksek bulunan hasta ve normal olan sağlıklı bireylerden kromatin immünopresipitasyon (ChIP) deneyleri yapılmıştır. “Promotor Arrayler” kullanılarak  $\beta$ -katenin’in AML’de genom ebadında bağlandığı genler araştırılmıştır. Bu araştırma sonucunda hasta ve sağlıklı grupta  $\beta$ -katenin’in bağlandığı bütün kromozom bölgeleri tespit edilmiştir (Şekil 4.13).

Elde edilen mikrodizin verisinin analizi sonrasında AML hastalığının patogenezinde kritik rol oynayan Wnt sinyal yolağının ana bileşeni olan  $\beta$ -katenin proteininin hedef gen profili ilk kez belirlenmiştir. Yaklaşık 30.000 promotor bölge taranmış ve elde edilen sonuçlar,  $\beta$ -katenin proteininin sağlıklı ve hasta gruplarının her ikisinde aynı anda 6.604 gene bağlandığını, sadece sağlıklı bireylerde 2.184 gene bağlandığını, sadece hasta grubunda ise bu sayının 10.230’ e yükseldiğini ortaya koymuştur (Şekil 4.11).

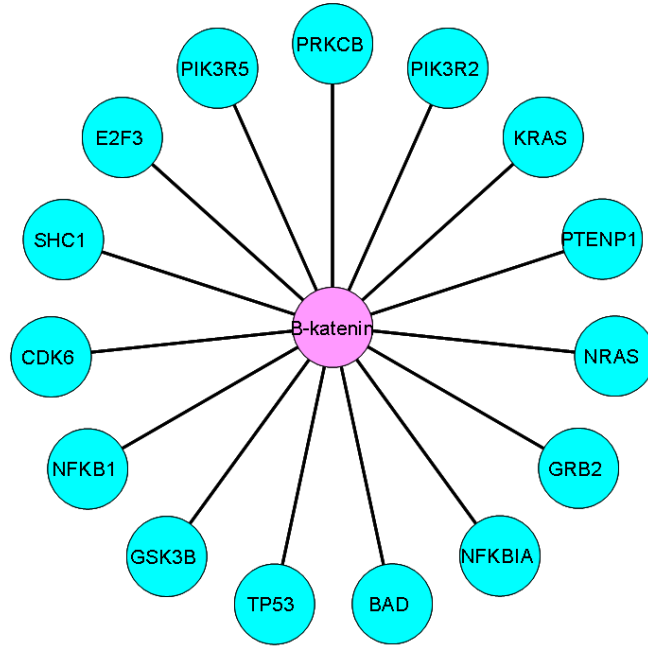
Yapılan bir sonraki analiz de saptanan bütün  $\beta$ -kateninin hedef genleri için DAVID programı kullanılarak yolak analizleri yapılmıştır ve bu genlerin çok farklı yolaklarda görev aldıkları tespit edilmiştir. Bu farklı yolaklardan, genlerin en çok yığılma gösterdikleri yolaklar (Çizelge 4.3, 4.4) seçilerek daha önce yapılan araştırmamızda elde ettiğimiz ekspresyon array sonuçlarıyla kıyaslanmıştır. Kıyaslanan 1135 probun hepsinin ekspresyonlarında artış saptanmıştır (Şekil 4.16). Bu da  $\beta$ -katenin proteininin bir transkripsiyon faktörü gibi hareket etmesinden yola çıkarak, bağlandığı genlerin ekspresyonunu artırmasıyla uygun bir sonuç olarak değerlendirilmiştir. Seçilen 1135 prob DAVID programında “Fonksiyonel Anotasyon Cluster” analizine tabi tutulmuş ve aralarında bir çok kanser grubunun da bulunduğu 8 farklı Cluster (Küme) elde edilmiştir (Çizelge 4.5). Bu tez çalışmasında gerçekleştirilmiş iş yükü Şekil 5.1’de özetlenmiştir.

Bulunan farklı kümeler arasından kanserle ilişkili olan 5. küme analiz edilerek bu kümenin içinde yer alan ve kanserle ilişkili olan 26 yolak tespit edilmiştir (Çizelge 4.6). Daha sonra bu yolaklarda yer alan bütün genler analiz edilerek, bu 26 farklı kanser yolağında en sık görülen 15 adet gen,  $\beta$ -katenin proteininin hedefi olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.7, Şekil 5.2).

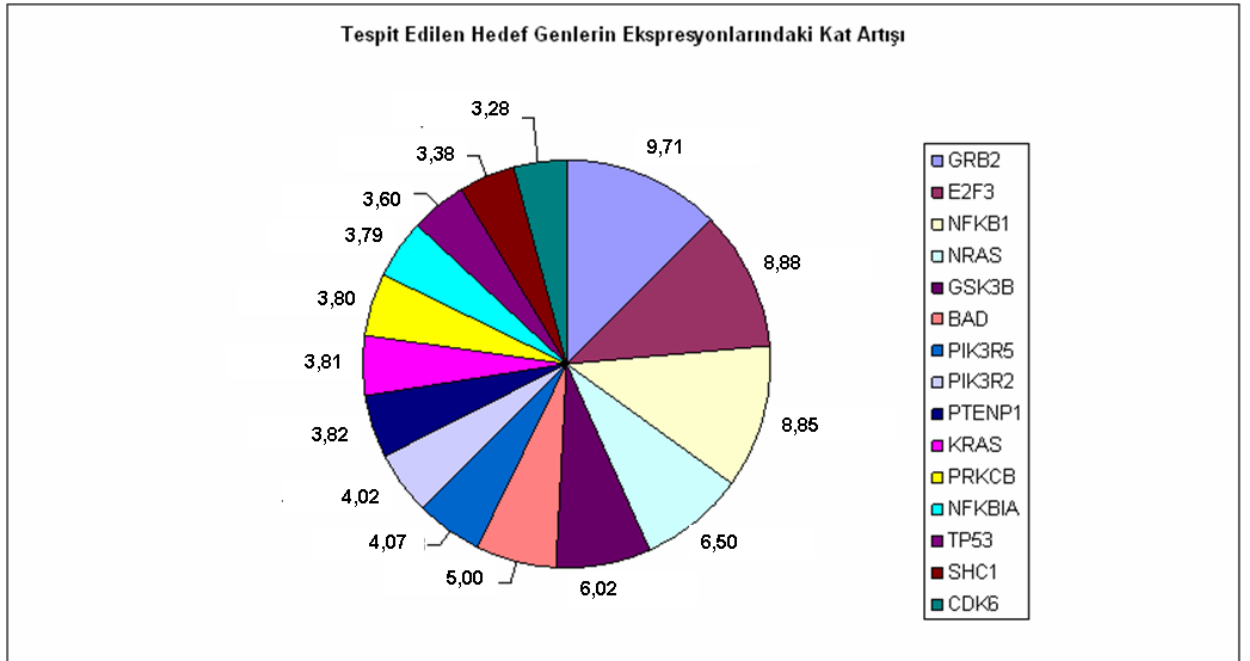
Bu 15 adet genin fonksiyonları ve buldukları yolaklar aşağıda tartışılmıştır. Ve bu yolakları özetleyen şema Şekil 5.4’te verilmiştir.



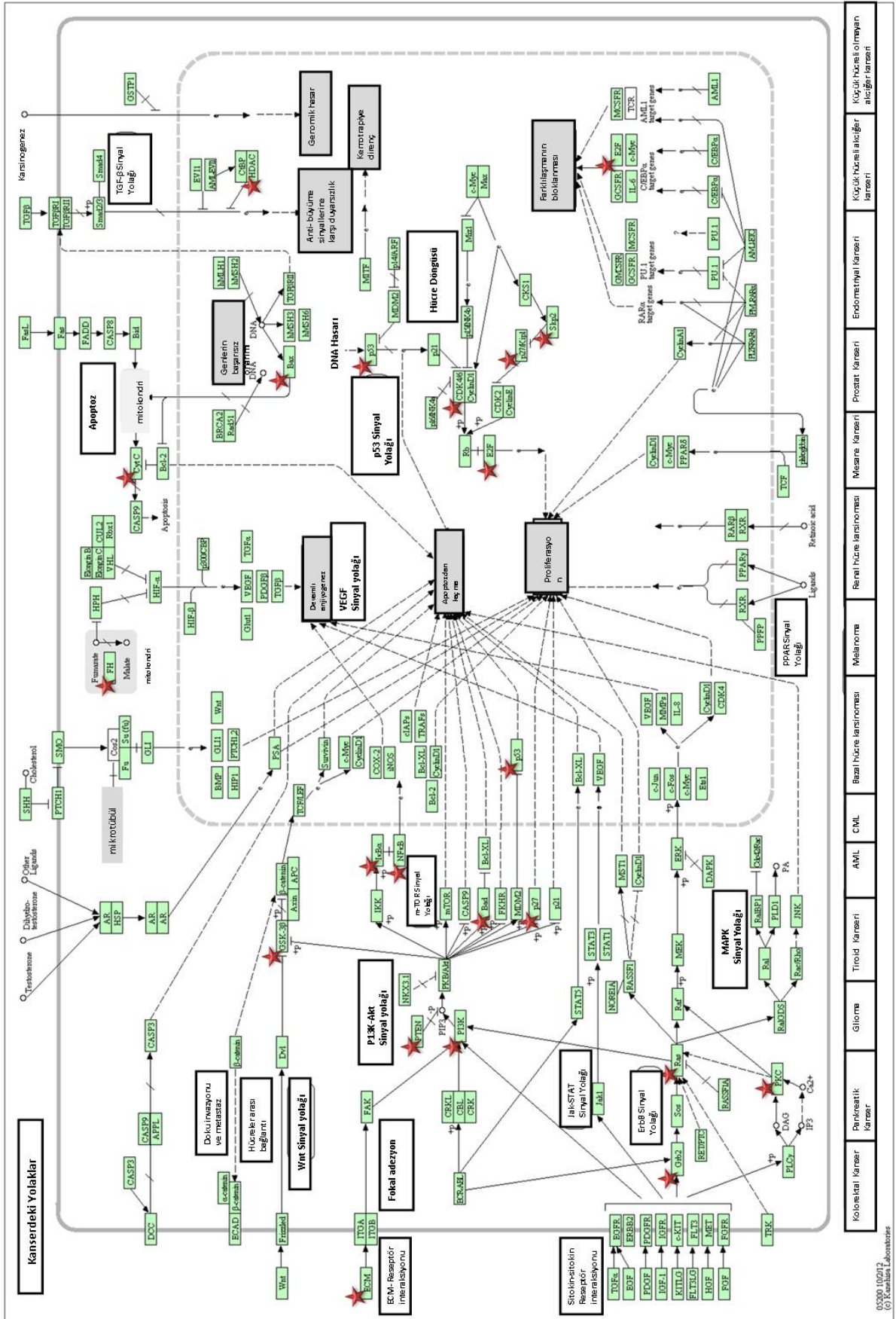
Şekil 5.1. Tez Çalışması Akış Şeması



Şekil 5.2.  $\beta$ -katenin proteininin hedefi olarak tespit edilen 15 gen



Şekil 5.3.  $\beta$ -Katenin Proteininin Hedefi Olarak Tespit Edilen Genlerin Ekspresyonlarındaki Kat Artışı.

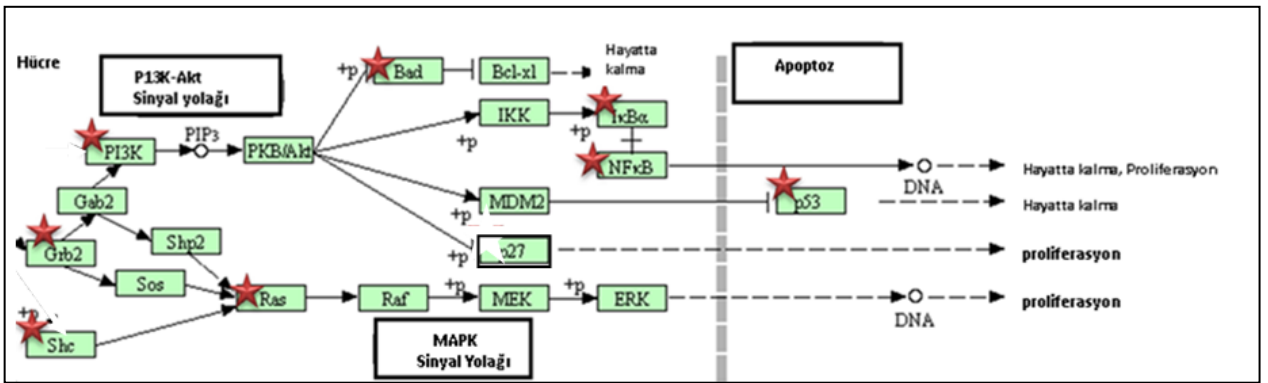


Şekil 5.4. β-Katenin Proteininin Hedefleri Arasında Yer Alan Genlerin Çeşitli Kanser Yolaklarındaki Gösterimi. “★” ile işaretlenmiş genler β-katenin proteininin hedefi olarak tespit edilmiştir.

**PI3K-Akt Sinyal Yolağı ile İlişkili Bulunan Genler (PIK3R5, PIK3R2, GRB2,NFKB1, SHC1,GSK3B):**

**PIK3R5 ve PIK3R2 Genleri:**

AML’de hücrenin hayatta kalması yönünde çalışan sinyal yolaklarından “PI3K-Akt sinyal yolağındaki” başrol oyuncusu fosfotidilinositol 3-kinazın (PI3K) düzenleyici alt ünitelerinden olan PIK3R5 ve PIK3R2 (phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 5 ve 2) genleri hedeflerimiz arasında tespit edilmiştir. PI3K’lar, 3. pozisyonda fosfotidilinositolün inositol halkasını fosforile etmekte ve hücre büyümesi, proliferasyon, farklılaşma, motilite, hayatta kalma ve hücre içi trafiğinde önemli roller üstlenmektedirler. PI3K’lar üç sınıfa ayrılmaktadırlar. 1, 2 ve 3 ve sadece sınıf 1 PI3K’lar onkogeneyle ilişkilidirler. Kromozomun 17p13.1 ve 19q13.2-q13.4 kromozom bölgesinde yer alan bu genler PI3K’nın düzenleyici bileşenleridir. Ekibimizin daha önce bu AML hastalarının kemik iliği örnekleri üzerinde yürüttüğü transkriptom analizlerinde, ifadelerinde yaklaşık 4 kat artış tespit ettiğimiz PIK3R5 ve PIK3R2 genleri bir transkripsiyon faktörü gibi davranan β-katenin proteininin hedefi olarak tespit edilmiştir (Şekil 5.5). Bu genlerin AML’de ifade artışı ve β-katenin ile ilişkisi konusunda herhangi bir çalışma bulunamadığından literatüre kazandırılan önemli bir bulgudur.



Şekil 5.5. PI3K-Akt ve MAPK Sinyal Yolakları



### **GRB2 Geni:**

Çalışmamızda  $\beta$ -katenin proteininin hedefi olarak tespit edilen bir diğer gen **GRB2**'dir (growth factor receptor-bound protein 2). Bu gen tarafından kodlanan protein epidermal büyüme faktörü reseptörüne bağlanır ve bir SH2 domaini ve iki SH3 domaini içerir. İki SH3 domaini diğer proteinlerin proline zengin bölgeleriyle kompleks oluşumuna yön verir ve SH2 domaini tirozin fosforillenmiş sekanslara bağlanır. 17q24-q25 kromozom bölgesinden kodlanan bu gen, MAPK sinyal iletim yolağında rol alarak proliferasyondan sorumlu bir çok genin aktivasyonunda görev almaktadır [RefSeq, Jul 2008]. Yürüttüğümüz transkriptom analiz çalışmasında ifadesinde 9 kat artış bulduğumuz bu genin  $\beta$ -katenin proteininin hedefi olarak tespit edilmesi (Şekil 5.7) iki çalışmanın birbirini desteklediğinin ve  $\beta$ -katenin proteininin transkripsiyon faktörü olarak bu gene bağlanıp ifadesini artırdığının bir kanıtıdır.

Crampton ve ark., tarafından 2009 yılında yapılan bir çalışmada; Grb2 proteini Wnt3A ile sinerjistik etki gösterdiği saptanmıştır. GRB2'nin Wnt3A ile uyarılan  $\beta$ -katenin sinyal yolağındaki TCF/LEF hedef genlerinin aktivasyonu için adaptör ve mutlak gerekli bir protein olduğu belirlenmiştir. AML'de  $\beta$ -katenin ve GRB2 ile ilişkili herhangi bir yayın bulunamamıştır. Çalışmamızda ChIP-chip analizi ile  $\beta$ -katenin'nin GRB2'nin promotoruna bağlanarak ifadesini 9 kat artırdığı ilk kez saptanmıştır.

### **NFKB1 Geni:**

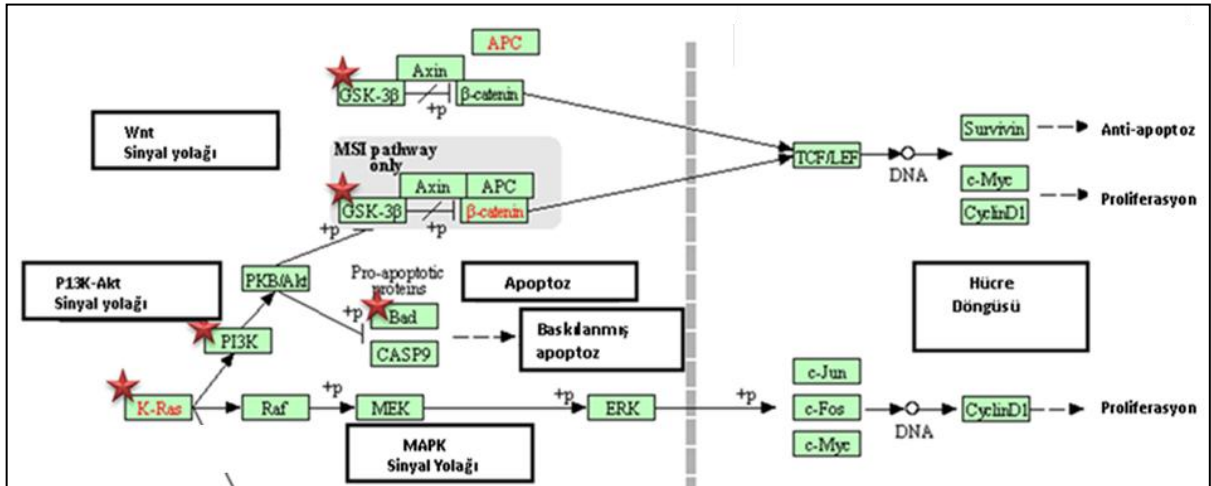
PI3K-Akt sinyal yolağında aktive edilen ve apoptozdan kaçış yollarından biri olan NFKB sinyal yolağı da hedeflerimiz arasında tespit edilmiştir (Şekil 5.5, 5.7). Bu yolaktaki kromozomun 4q24'ünde yer alan **NFKB1** (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1) geni, 50 kD protein üretmek için, 26S proteozom tarafından kotranslasyonel işlenmeye uğrayan 105 kDA'luk bir protein kodlar. 105 kD protein Rel protein spesifik transkripsiyon inhibitörüdür ve 50 kDA protein, NFkB protein kompleksinin DNA bağlanma alt ünitesidir. NFkB, sitokinler, oksidan serbest radikaller, ultraviyole ışınları ve bakteriyel ya da viral ürünler gibi çeşitli hücre içi ya da dışı uyarılar tarafından aktive olan transkripsiyonel bir regülatördür. Aktive olan NFkB nükleusa transloke olur ve çok çeşitli biyolojik fonksiyonlarda yer alan genlerin ekspresyonunu

stimule eder. NFkB'nin kalıcı inhibisyonu, uygun olmayan immun hücre gelişimine ya da geciken hücre büyümesine neden olurken, anormal NFkB aktivasyonu pek çok inflamatuvar hastalıklarla ve kanserle ilişkilidir [RefSeq, Sep 2009]. Çalışmamızda  $\beta$ -katenin proteininin hedefleri arasında yer alması (Şekil 5.5) ve daha önceki transkriptom çalışmamızda ifadesinde 8,9 kat artış çıkması bu genin de AML'de  $\beta$ -katenin ile düzenlendiğinin ve AML patogenezinde ne kadar önemli bir hedef olduğunun göstergesidir.

Günümüze kadar yapılmış olan çeşitli çalışmalar,  $\beta$ -katenin ve NFkB proteinleri arasındaki yakın ilişkiyi ortaya koymaktadır (Hwang vd 2010).  $\beta$ -katenin/Tcf ve NFkB yolaklarının çeşitli insan kanser hücre serilerindeki farklı etkileşimlerinin altında yatan mekanizmalarının araştırıldığı bir çalışmada, NFkB'nin insan glioblastomada,  $\beta$ -katenin/Tcf yolaklarını pozitif olarak düzenlerken, kolon, karaciğer ve meme kanser hücrelerinde ise zıt bir etki yarattığı bildirilmiştir (Cho vd 2008). Çalışmamızda  $\beta$ -katenin hedef genleri olarak NFkB ve NFKBIA(I $\kappa$ B $\alpha$ )'nın belirlenmesi literatürle uyumluluk göstermektedir. Bu tez çalışması AML'de  $\beta$ -katenin'nin NFkB'nin promotoruna bağlandığını gösteren ilk CHIP-chip çalışmasıdır.

## GSK3 $\beta$ Geni:

$\beta$ -katenin proteininin ve Wnt sinyal yolağındaki anormalliklerin sıklıkla eşlik ettiği bilinen kolorektal kanserlerde tespit edilen hedef genler arasında  $\beta$ -katenin yıkım kompleksinin ana bileşenlerinden biri olan **GSK3 $\beta$**  da (glycogen synthase kinase 3 beta) bulunmuştur. Bu gen tarafından kodlanan protein, glikojen sentaz kinaz alt ailesine ait olan bir serin-treonin kinazdır. Enerji metabolizması, nöronal hücre gelişimi ve vücut patterninin oluşumunda rol alır. 3q13.3 kromozom bölgesinden kodlanan bu gendeki polimorfizmler, Parkinson hastalığı riski ile ilişkilidir ve farelerde yapılan çalışmaları, bu genin aşırı ifadenmesinin Alzheimer hastalığının patogeneziyle ilişkili olduğunu göstermektedir. Çeşitli kanserlerde artmış ifade profili belirlenmiş ve GSK3 $\beta$ 'nın inhibisyonunun hücreleri apoptoza indüklediği gösterilmiştir[RefSeq, Sep 2009]. Daha önceden yapmış olduğumuz transkriptom çalışmasında ifadesini 6 kat artmış olarak bulduğumuz GSK3 $\beta$ 'nin,  $\beta$ -katenin proteininin hedefleri arasında yer alıyor olması GSK3 $\beta$ 'nin  $\beta$ -katenin yıkım kompleksinde olmasından dolayı beklenmedik bir sonuç olarak gözükse de aslında  $\beta$ -katenin, Ras ve PI3K-Akt aracılı GSK3 $\beta$ 'nin fosforillenmesini uyararak (Şekil 5.6) yıkım kompleksinin bozulmasına neden olduğu düşünülebilir.

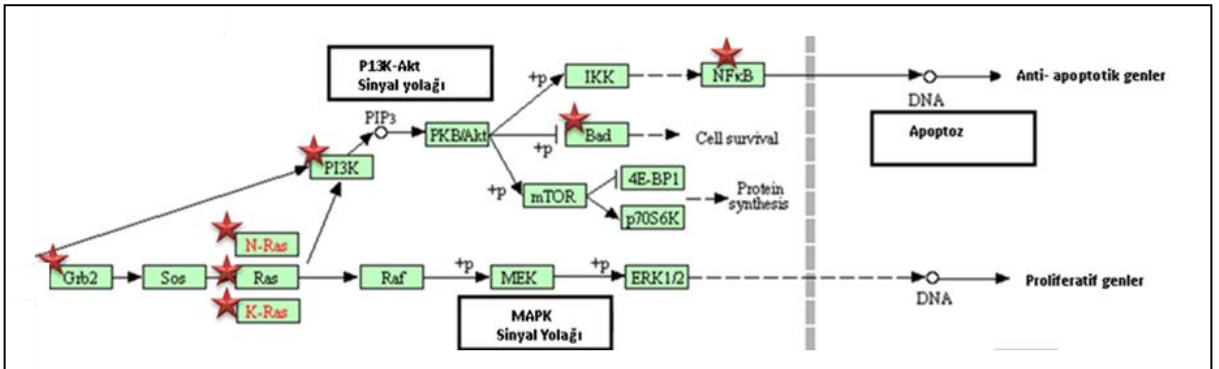


Şekil 5.6. PI3K-Akt Yolağı ve GSK3B

## MAPK Sinyal Yolağı ile İlişkili Bulunan Genler (NRAS, KRAS, SHC1, GRB2):

### NRAS Geni:

NRAS (neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog) geni çalışmamızda saptadığımız bir diğer  $\beta$ -katenin hedef genidir. 1p13.2 kromozom bölgesinden kodlanan bu gen, golgi aparatı ve plazma membranı arasında mekik yapan bir membran proteinini kodlayan N-ras onkogenidir. Bu mekik görevi ZDHHC9-GOLGA7 kompleksi tarafından palmitilasyon ve depalmitilasyon aracılığıyla düzenlenmektedir. İntrinsik GTPaz aktivitesine sahip olan NRAS, guanin nükleotid değişim faktörü (GEF) tarafından aktive edilirken ve GTPaz aktive edici bir protein tarafından inaktive edilir. Bu gendeki mutasyonlar somatik rektal kanser, folliküler tiroid kanseri, otoimmün lenfoproliferatif sendrom, Noonan sendromu ve gençlik miyelomonosidik lösemisi ile ilişkilendirilmiştir [RefSeq, Jun 2011]. NRAS geni,  $\beta$ -katenin proteininin hedefi olarak tespit edilmiş olup bu sonuç yürüttüğümüz transkriptom analiz çalışmasında NRAS ifadesininin 6,5 kat artışı ile desteklenmiştir. Ras yolağında yer alan ve  $\beta$ -katenin ile ilişkili olduğunu saptadığımız diğer bir gen olan GRB2'nin de hedefler arasında yer almasıyla ayrıca dikkat çekicidir. GRB2 ile indüklenen MAPK sinyal yolağında görev alan RAS onkogenlerinden NRAS'ın hedefler içinde yer almasının da ötesinde KRAS'ın da  $\beta$ -katenin hedef genleri arasında çıkması (Şekil 5.7),  $\beta$ -kateninin AML'deki hücre proliferasyonundaki artışı sağlayan yolaklarla ne kadar sıkı bir ilişkide olduğunu göstermektedir.



Şekil 5.7. MAPK Sinyal Yolağı

### **KRAS Geni:**

12p12.1 kromozom bölgesinden kodlanan KRAS (v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) geni, memeli ras gen ailesinden bir Kristen ras onkogen homologudur ve küçük GTPaz süperailisinin bir üyesi olan bir proteini kodlamaktadır. Aktive edici bir mutasyon için, tek bir aminoasit yer değiştirmesi yeterlidir. Sonuçta formu değişen protein, akciğer adenokarsinoma, pankreasın duktal karsinoması ve kolorektal karsinoma gibi çeşitli malignansilerde rol almaktadır [RefSeq, Jul 2008]. AML’de sıklıkla aktive olan Ras yolağının  $\beta$ -katenin proteini için hedefler arasında bulunması ve mutasyonlar haricindeki aktivasyonların bu interaksiyondan kaynaklanıyor olabileme ihtimali ilk kez tespit edilmiş olup daha ileri çalışmaların önünü açmaktadır. Nitekim yürüttüğümüz transkriptom analiz çalışmasında 3,8 kat ifade artışının bulunmuş olması da  $\beta$ -katenin proteini için KRAS’ın bir hedef olduğunun (Şekil 5.7) ve ifadesindeki artışın bir transkripsiyon faktörü gibi davranan  $\beta$ -katenin proteini ile sağlandığının bir kanıtıdır.

Pacheco-Pinedo ve ark., 2011 yılında yaptıkları bir çalışmada KRAS ve Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolaklarının beraber aktive olmalarının tümörün görülme sıklığını ve büyüklüğünü dramatik bir şekilde artırdığını bulmuşlardır. Dahası bu iki yolağın beraber aktivasyonu sonucu oluşan akciğer tümörlerinin gelişen akciğerde bulunan embriyonik progenitörlere benzer şekilde farklı bir fenotip sergilediği bildirilmiştir. Böylece KRAS ve Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolaklarının beraber aktivasyonu daha projenitör olan fenotiple karakterize olan akciğer kanseri ile sonuçlandığı bildirilmiştir. Çalışmamızda da  $\beta$ -katenin sinyal yolağının hedefi olarak bulduğumuz KRAS geni, AML’de Wnt/ $\beta$ -katenin sinyal yolağı ile KRAS’ın beraber aktive olduğunu ve ayrıca  $\beta$ -katenin aracılığı ile Ras yolağında yer alan genlerin ekspresyonlarını direkt artırarak gerçekleştirdiğini gösteren önemli bir bulgudur.

### **SHC1 Geni:**

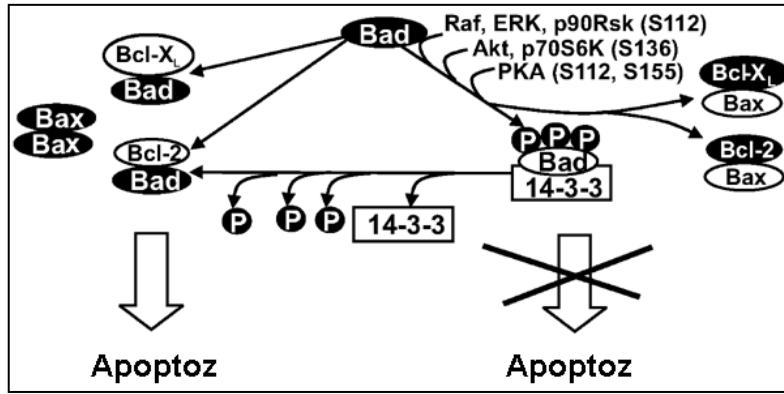
SHC1 geni (SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1), hücrenin ölümden kaçması ve hayatta kalması yönünde çalışan sinyal yolaklarından “*PI3K-Akt sinyal yolağı ve MAPK sinyal yolaklarının*” bir arada uyarılmasını sağlayabilen ve  $\beta$ -katenin proteinin hedefi olarak tespit ettiğimiz bir gendir. 1q21 kromozom bölgesinden kodlanmaktadır. Bu gen aktivitede ve subselüler lokalizasyonda farklılık gösteren üç ana

izoform kodlar. Bu izoformların üçü de sinyal transdüksiyon yollarında adaptör proteinler olduğu halde, en uzununu (p66Shc), ömür uzunluğunun ve reaktif oksijen türlerinin etkilerinin regülasyonunda yer alır. Diğer iki izoform, p52Shc ve p46Shc, **GRB2/SOS** kompleksinin dahil olmasını sağlayarak, aktive reseptör tirozin kinazları, **Ras** yolağına bağlar[RefSeq, Feb 2011]. p66Shc Ras aktivasyonuna katılmaz. Çalışmamızda  $\beta$ -katenin proteininin hedefi olarak tespit edilen **SHC1** geninin (Şekil 5.5) alt basamaklarındaki **GRB2**, **NRAS** ve **KRAS** ve **PIK3** genlerinin de  $\beta$ -katenin proteininin hedefleri olduğu ve bu genlerin PI3K-Akt ve MAPK sinyal yollarında görev aldığı düşünülecek olursa, bu sinyal yollarının  $\beta$ -katenin'i yüksek AML hastalarında özellikle uyarıldığını vurgulamaktadır. Yine daha önceki transkriptom çalışmamızdaki SHC1 geninin yaklaşık 3 katlık ifade artışı bu bulgumuzu destekler niteliktedir.

## Apoptotik Yolak ile İlişkili Bulunan Genler (BAD,P53,NFKBI):

### BAD Geni:

Çalışmamızda AML' de apoptotik yolakta yer alan  $\beta$ -katenin hedefi olan bir diğer gen **BAD** (BCL2-associated agonist of cell death) olarak tespit edilmiştir (Şekil 5.5, 5.7).



Şekil 5.8. Apoptoz ve BAD geni

Bu gen tarafından kodlanan protein BCL-2 ailesinin bir üyesidir. BCL-2 aile üyelerinin programlı hücre ölümünün düzenleyicileri oldukları bilinmektedir. 11q13.1 kromozom bölgesinden kodlanan bu protein, BCL-x<sub>l</sub> ve BCL-2 ile heterodimerler oluşturarak ve onların ölüm baskılayıcı etkilerini tersine çevirerek hücre apoptozunu pozitif olarak düzenlemektedir. Bu proteinin proapoptotik aktivitesi fosforilasyon aracılığıyla düzenlenmektedir. Defosforile BAD, BCL-2 ve BCL-XL ile heterodimer oluşturup onları inaktive ederek apoptozu indüklerken, fosforlanmış BAD BCL-2'nin serbest kalmasını ve antiapoptotik olarak çalışmasını sağlamaktadır (Şekil 5.6). Protein kinazlar, AKT ve MAP kinazlar ve bunların yanısıra protein fosfataz kalsineurinin BAD'ın düzenlenmesi (fosforillenmesi) ile ilişkili olduğu bulunmuştur [RefSeq, Jul 2008]. BAD'ın  $\beta$ -katenin proteininin hedefleri arasında belirlenmesi (Şekil 5.7) ve ekspresyonundaki 5 katlık artış,  $\beta$ -katenin'nin hem BAD hem de PI3K-AKT yolağındaki PIK3R5 ve PIK3R2'nin promotoruna bağlanarak ifadesini artırmasına rağmen, pro-apoptotik olan BAD'ın PI3K ile fosforillenerek inaktif formda tutulmasını sağlıyor ve hücre sağkalımını uyarıyor şeklinde yorumlanmıştır. Bu bulgular AML'de BAD ekspresyonunun arttığı ve  $\beta$ -katenin'nin direkt hedefi olduğunu bildiren ilk veriler olması nedeniyle önemlidir.

### **NFKBIA Geni:**

Tespit edilen hedef genlerden NFKBIA (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha), çoklu ankrin tekrar domainleri içeren NF-kappa B inhibitör ailesinin bir üyesini kodlamaktadır (Şekil 5.5). Kodlanan protein, inflammatuvar yanıtlarda görev yapan NF-kappa-B komplekslerini inhibe etmek üzere NF-kappa B ile etkileşime girer ve NF-kappa B'nin sitoplazmada inaktif halde tutulmasını sağlarlar. 14q13 kromozom bölgesinden kodlanan protein, bir nükleer lokalizasyon sinyali ve CRM1-aracılı nükleer transport aracılığıyla sitoplazma ve nükleus arasında hareket eder [RefSeq, Aug 2011].

NfκB'nin aktivasyonu ve nükleusa taşınabilmesi için birlikte bulunduğu inhibitörün Akt tarafından fosforillenerek ayrılması ve yıkılması gereklidir. Bu süreçte NFκB ve NFKBI arasındaki miktarın göreceli farklılığı hücrenin yaşamını uyaracak yönde gelişmektedir. β-katenin aracılı NFκB'nin 8,9 katlık artışı, inhibitörün 3,8 katlık artışından çok daha fazla olmasına ilaveten β-katenin PI3K-Akt yolağıdaki PIK3R5 ve PIK3R2 ifadelerini artırarak Akt aktivasyonuna neden olmakta ve Akt aracılı inhibitörün fosforilasyonu sonunda inhibitörün nonfonksiyonel hale gelmesi ile de NFκB'nin hücrenin yaşaması yönünde sinyal iletimini sağladığı şeklinde yorumlanmıştır.

### **TP53 Geni:**

β-katenin proteininin hedefleri arasında tespit edilen bir diğer hedef gen, hücre döngüsündeki genlerden TP53'tür (Tumor protein p53) (Şekil 5.9).

Bu gen, hücre döngüsünde tutulma, apoptoz, senesens, DNA tamiri veya metabolizmadaki değişiklikleri indükleyen hedef genleri düzenlemek üzere farklı hücresel streslere yanıt veren tümör protein p53'ü kodlamaktadır. 17p13.1 kromozom bölgesinden kodlanan P53 proteini, normal hücrelerde düşük düzeyde ifadelendir ve transformasyon ve malignansiye eşlik ettiği düşünülen çeşitli transforme hücre serilerinde ise yüksek düzeyde ifadelenmektedir. P53, transkripsiyon aktivasyonu, DNA bağlanma ve oligomerizasyon domainleri içeren DNA'ya bağlanan bir proteindir. Bir p53 bağlanma bölgesine bağlandığı ve hücre büyümesi ve/veya invazyonu inhibe eden genlerin ekspresyonunu aktive ettiği ve



böylece bir tümör baskılayıcı gibi davrandığı bildirilmiştir. Çeşitli farklı insan kanserlerinde sıklıkla ortaya çıkan p53 mutantları konsensus DNA bağlanma bölgesine bağlanamamakta ve böylece tümör baskılayıcı aktivitenin kaybına neden olmaktadır. Bu gendeki değişiklikler, sadece insan malignansilerindeki somatik mutasyonlar olarak değil, aynı zamanda bazı Li-Fraumeni sendromlu kansere yatkın ailelerde germline mutasyonlar olarak da ortaya çıkmaktadır. [RefSeq, Jul 2008]. Çeşitli onkogenlerin anormal aktivasyonu ve hücredeki stres ya da hasarla arttığı bildirilen P53 proteininin daha önceki transkriptom çalışmamızda bulduğumuz 3,6 katlık artış gösteren bir ifade profili sergilemesi literatürle uyumluluk arz etmektedir. İlk kez  $\beta$ -katenin proteininin hedef genleri arasında bulunmuş olması da ifadesindeki bu artışın  $\beta$ -katenin proteini aracılığıyla olabileceğine dair önemli bir bulgu oluşturmaktadır.

Çalışmamızda,  $\beta$ -kateninin bağlandığı genlerin ilişkide olduğu yollar arasında apoptoz yolağı da bulunmuştur.  $\beta$ -katenin proteininin apoptoz yolağındaki hedef genlerine bakacak olursak, bunların hem proapoptotik hem de anti apoptotik olarak görev yaptıklarını görmekteyiz.  $\beta$ -katenin proapoptotik genler olarak P53, BAD ve NFKBIA(I $\kappa$ B $\alpha$ )'ya bağlandığını tespit etmiş olmakla beraber bunların alt ve üst basamaklarındaki düzenleyici genlerin de hedefler arasında yer alması hücrenin, apoptoza gitmek için çalışıyor olsa da antiapoptotik genlerindeki daha yüksek ekspresyon seviyeleriyle apoptozdan kaçtığına bir göstergesidir. Örneğin  $\beta$ -kateninin BAD genine bağlanıp ekspresyonunu artırıyor olmasının yanı sıra BAD'ı fosforilleyerek inhibe edecek olan PI3K genine de bağlı olarak bulunması hücrenin proapoptotik/antiapoptotik gen ifade oranlarını paydadaki antiapoptotikler yönünde arttıracak ve hücrenin apoptozdan kaçmasına neden olacaktır.

Hepatoselüler karsinoma hücrelerinde yapılmış olan bir çalışmada  $\beta$ -kateninin siRNA ile inhibisyonu sonucunda apoptotik genlerde değişiklikler ve tümör hücre proliferasyonunun anlamlı olarak baskılandığı belirlenmiştir (Wang vd 2011). Bu çalışma da bizim bulgularımızda olduğu gibi  $\beta$ -katenin proteininin apoptoz yolağında önemli genleri hedef olarak seçtiği anlaşılmaktadır.

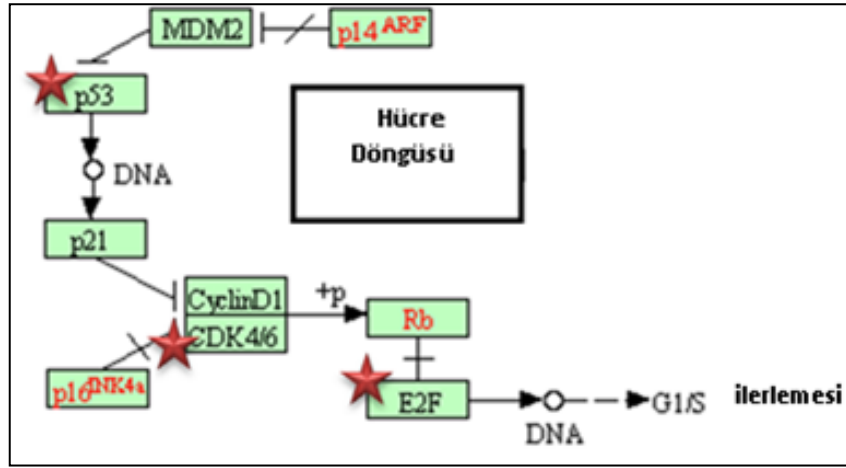
### **Hücre Döngüsü Yolağı ile İlişkili Bulunan Genler (CDK6, E2F3,PKCB,GSK3B):**

#### **CDK6 ve E2F3 Genleri:**

Çalışmamızda ayrıca CDK6 (cyclin-dependent kinase 6) ve E2F3 (E2F transcription factor 3) genleri de  $\beta$ -katenin proteininin hedef genleri arasında tespit edilmiştir (Şekil 5.9).

7q21-q22 kromozom bölgesinde bulunan CDK6 tarafından kodlanan protein, CDK ailesinin bir üyesidir. CDK ailesi üyeleri hücre siklusu ilerlemesinin önemli regülatörleri olarak bilinirler. Bu kinaz, hücre siklusu G1 faz progresyonu ve G1/S geçişi için önemli olan protein kinaz kompleksinin katalitik subunitesidir. Bu kinazın aktivitesi ilk olarak, D tip siklinler ve CDK inhibitörlerinin INK4 ailesinin üyelerini içeren regülatör subuniteler tarafından kontrol edilen orta G1 fazında görülür. Bu kinazın, CDK4 gibi, tümör supresör protein Rb'yi fosforile ettiği ve böylece aktivitesini regüle ettiği bildirilmiştir. Bu genin ekspresyonu bazı tip kanserlerde yüksek seviyelerdedir [RefSeq, Nov 2009]. E2F3 tarafından kodlanan protein ise E2F ailesinden transkripsiyon faktörlerinin bir üyesidir. E2F ailesi, hücre döngüsünün kontrolü ve tümör baskılayıcı proteinlerin aktivitesi için önemli rol oynamaktadırlar. E2F proteinleri ailenin pek çok üyesinde bulunan evrimsel olarak korunmuş çeşitli domainler içermektedir. Bu domainler arasında bir DNA bağlanma domaini, farklılaşma ile düzenlenen transkripsiyon faktör proteinleri ile etkileşimi belirleyen bir dimerizasyon domaini, asidik aminoasitlerce zenginleştirilmiş bir transaktivasyon domaini ve transaktivasyon domaininin içine yerleşmiş bir tümör baskılayıcı protein birleşme domaini bulunmaktadır. Kromozomun 6p22 bölgesinden kodlanan bu protein, hücre döngüsü bağımlı olarak ve spesifik bir şekilde retinoblastoma proteinine bağlanmaktadır [RefSeq, Jul 2011]. Retinoblastoma proteinini fosforilleyerek E2F'den ayrılmasını ve hücre döngüsüne ilerlemesi yönünde sinyal verilmesini sağlayan CDK6'nın ve E2F3'ün her ikisinin de  $\beta$ -katenin'in hedef genleri olması  $\beta$ -katenin'in hücre döngüsündeki rolünün altını çizmektedir. Ayrıca  $\beta$ -kateninin her ne kadar p53'ü arttırsa da onun inhibe etmesi gereken genlerden bu ikisine bağlanarak ekspresyonlarını artırması P53'ün yetersiz kalmasına da neden olduğunun göstergesidir. Bu bulgu transkriptom çalışmalarımızdaki E2F3'ün 8,8 kat, CDK6'nın 3,2 kat artmasıyla da koreledir.

Hücre döngüsünde G0'da tümör süpresör olarak rol oynayan Rb, E2F ile kompleks halinde bulunur. Hücreye bölünme sinyali geldiğinde aktifleşen CDK6 Rb'yi fosforilleyerek E2F'nin inhibitöründen (Rb) ayrılarak nükleusa göç etmesini ve S fazı gen ekspresyonlarını başlatmasını sağlar.  $\beta$ -katenin'in her iki genin ekspresyonunu birlikte artırması, hem E2F'nin inhibitörü olan Rb'nin baskılanmasını hem de E2F miktarının 8,8 kat artması ile hücrenin G1-S geçişini ve böylece proliferasyonunu sürekli uyaracağını düşündürmektedir.



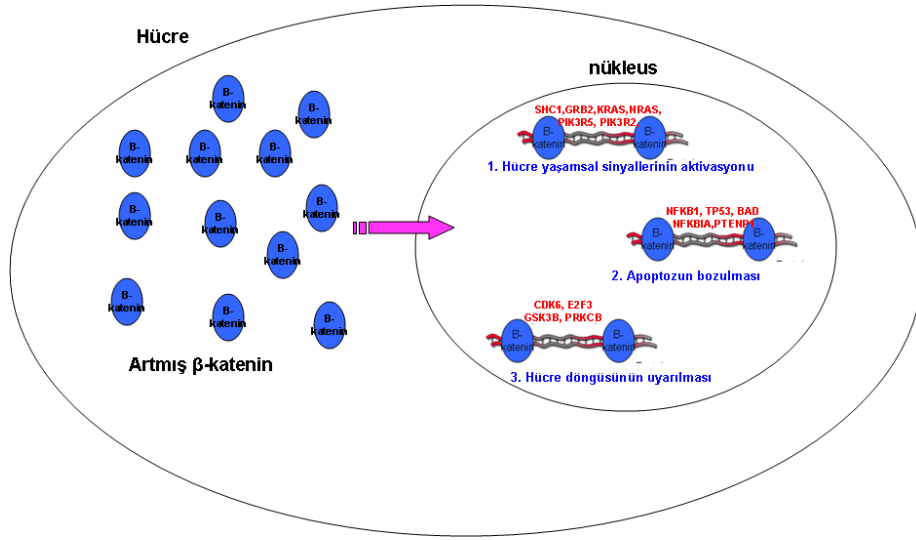
Şekil 5.9. Hücre döngüsü, P53, CDK6 ve E2F3

## **PRKCB Geni:**

Bu çalışmada kanserlerdeki bir çok yolda görev alan ve  $\beta$ -katenin proteininin hedefleri olarak belirlenen genlerin içinde **PRKCB** de (protein kinase C, beta) tespit edilmiş bulunmaktadır. 16p11.2 kromozom bölgesinden kodlanan Protein kinaz C (PKC), kalsiyum ve ikincil ulak(mesenger) diaçilgliserol tarafından aktive edilen serin ve treonin spesifik protein kinazların bir ailesidir. PKC ailesinin üyeleri çok geniş çeşitlilikteki protein hedefleri fosforile ederler ve bu aile üyelerinin farklı hücresel sinyal yollarında görev yaptıkları bilinmektedir. PKC ailesinin üyeleri aynı zamanda, tümör teşvik edicilerin bir sınıfı olan forbol esterleri için başlıca reseptörler olarak da görev yapmaktadırlar. PKC ailesinin her üyesinin spesifik bir ekspresyon profili vardır ve hücrelerde farklı roller üstlendikleri bilinmektedir. Bu gen tarafından kodlanan protein PKC aile üyelerinden bir tanesidir. Bu protein kinazın, B hücre aktivasyonu, apoptoz indüksiyonu, endoteliyal hücre proliferasyonu ve intestinal şeker absorpsiyonu gibi pek çok farklı hücresel fonksiyon ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Bu proteinin retinoblastoma proteinini fosforilleyerek E2F'den ayrılmasını sağladığı, ayrıca bu proteinin aktivasyonunun Ras ve MAPK yollarını aktive ettiği ve böylelikle hücreye bölünme sinyalleri verdiği de bilinmektedir [RefSeq, Jul 2008]. PRKCB'nin  $\beta$ -katenin proteininin hedefi olarak tespit edilmesi (Şekil 5.4) ve daha önceki transkriptom çalışmamızda ifadesinde yaklaşık 4 katlık bir artış belirlenmesi,  $\beta$ -katenin proteininin hücrenin proliferasyonu yönündeki sinyal yollarıyla yakın ilişkisinin ve bu yolları sıkı bir şekilde düzenlediğinin kanıtıdır.

Protein kinaz C'nin, rodentlerde ve insanlarda intestinal epitelial hücre proliferasyonu ve kolon karsinogenezinde rol oynadığına ilişkin çalışmaların sayısı hızla artmaktadır (Weinstein 1990; Chapkin vd 1993). PKC aktivitesi, aktif olarak proliferasyon yapan kolonik epitelial hücrelerde, sessiz hücrelere göre daha yüksek olarak bulunmuştur (Craven ve DeRubertis., 1987), bu da epitelial hücre proliferasyonunda PKC aktivasyonunun rolünü ortaya koymaktadır. Wnt/APC/ $\beta$ -katenin sinyal yolağının kolon karsinogenezindeki başlıca önemi bilinmektedir. PKC'nin, Wnt/APC/ $\beta$ -katenin proliferatif sinyal yolağında çok önemli bir rol oynadığı ve bu rolde de PKC'nin kolonik epitelial hücre proliferasyonu ve kolon karsinogenezini uyardığı bir moleküler mekanizmanın görev yaptığı ortaya konulmaktadır (Cook vd 1996).

Özetle, PKC: 1) Rb'yi fosforilleyerek hücre döngüsünde pozitif regülatör olarak rol oynamaktadır. 2) Ras aracılı PI3K-Akt aktivasyonu ile  $\beta$ -katenin yıkımını sağlayan GSK3 $\beta$ 'nin fosforillenerek uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. 3) Ras aracılı MAP kinaz yolağı ile hücrede bölünme sinyallerini aktive etmektedir. 4) Hücre döngüsünde G1-S geçişinde önemli olan Siklin D'nin ifadesini arttırması konusunda yayımlar bulunmaktadır. Böylece hücreye proliferasyon sinyali verilecektir. Çalışmamızda elde ettiğimiz  $\beta$ -katenin-PKC interaksiyonuna ilişkin veriler, bu yayımlarla paralellik göstermektedir.



Şekil 5.10.  $\beta$ -katenin Proteininin Hedef Genleri ve Aktive Ettiği Yolakların Gösterimi

Bu çalışmada, AML hastalarında yüksek ekspresyon sergileyen ve AML patogenezinde önemli rol oynadığı bilinen  $\beta$ -katenin transkripsiyon faktörünün genom ebadındaki bağlanma bölgeleri, spesifik regülatör proteinlere bağlı olan DNA dizilerinin ve epigenetik modifikasyonların analiz edilmesi için kullanılan oldukça güçlü bir teknik olan CHIP-on-chip kullanılarak ortaya çıkarılmıştır. Çalışmamız, AML'li hastalarda  $\beta$ -katenin proteininin bağlandığı hedef genlerin belirlendiği ilk çalışmadır. Bu çalışmada elde edilen veriler, AML hastalığının teşhis ve tedavisinde yeni hedef genleri ve bu genlerin ilişkide olduğu yeni sinyal yolaklarının belirlenmesini sağlamıştır.

Çalışmamızda, AML hastalarında sağlıklı gruptan farklı olarak  $\beta$ -kateninin bağlandığı 10.230 gen belirlenmiştir.  $\beta$ -katenin proteininin hasta grubunda bu kadar fazla sayıda gene bağlanma göstermesi, AML' nin patogeneğinde  $\beta$ -katenin proteininin önemini vurgulamaktadır.

$\beta$ -katenini yüksek yüksek AML'li hastalarda, özellikle:

- 1) Hücre döngüsünün uyarılması,
- 2) Apoptozun baskılanması ve
- 3) Hücre yaşamsal sinyallerinin aktivasyonu aşamalarındaki genlerin  $\beta$ -kateninin hedefinde yer aldığı belirlenmiştir (Şekil 5.10).

Bu tez çalışması, AML'de  $\beta$ -kateninin hedef genlerini genom ebadında ChIP-Chip yöntemiyle belirleyen ilk çalışma olması nedeniyle literatüre katkıda bulunacak önemli veriler elde edilmiştir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

AML'de  $\beta$ -katenin gen ifadesinin artması sonucunda veya yıkım bozukluğuna bağlı olarak  $\beta$ -katenin miktarının artarak  $\beta$ -kateninin nukleusa taşınması sonucunda  $\beta$ -kateninin bir transkripsiyon faktörü olarak iş gördüğü bilinmektedir.  $\beta$ -katenin gen ekspresyonu sonucu sitoplazmada biriken  $\beta$ -katenin proteini çekirdeğe geçerek çeşitli genleri aktive etmektedir. Ancak, şimdiye kadar  $\beta$ -kateninin hedef genlerini saptamak üzere genom ebadında herhangi bir çalışma yapılmamıştır.

Bu tez çalışmasında  $\beta$ -katenin proteininin hangi genleri aktive ettiği ChIP-chip yöntemi ile araştırılmış ve kanser gelişiminde rol oynayan en temel yolaklardan biri olan Wnt/  $\beta$ -katenin sinyal yolağının hedef aldığı genler genom ebadında ilk kez ortaya çıkarılmıştır.

- Bu çalışmada, yaklaşık 30.000 promotor bölge taranmıştır.
- Elde edilen sonuçlar,  $\beta$ -katenin proteininin sağlıklı ve  $\beta$ -katenini yüksek AML hasta gruplarının her ikisinde aynı anda 6.604 gene bağlandığını,
- Sadece sağlıklı bireylerde 2.184 gene bağlandığını,
- Sadece hasta grubunda ise 10.230 genin promotoruna bağlandığını ortaya koymuştur.
- $\beta$ -katenin proteininin hedef aldığı bütün genler fonksiyonel anotasyonlarına göre gruplandırıldıklarında,  $\beta$ -katenin proteininin, sadece hasta grubunda bağlandığı genler toplam 136 farklı anotasyon kümelerine ayrılırken, yalnızca sağlıklı bireylerde bulunan genler 122 anotasyon kümesi oluşturmuştur.
- Bu anotasyon kümelerinden, içlerinde en çok gen barındıranlar DAVID analizi ile seçildiğinde, hasta grubunda toplamda 1135 gen tespit edilmiştir.
- Bu 1135 gen daha önceki transkriptom çalışmamızla kıyaslandığında hepsinin ekspresyon profilinde artış saptanmıştır.

- İfadelerinde artış olan bu genler KEGG yolak analizine tabi tutulduğunda  $\beta$ -katenin proteininin görev aldığı, içlerinde bir çok kanserin de yer aldığı 26 farklı yolak ortaya çıkmıştır.
- Yapılan analizler sonrasında bu 26 yolakta sıklıkla görev alan 15 gen tespit edilmiştir.
- $\beta$ -katenin proteininin genelde hücrenin hayatta kalması, hücre döngüsünün uyarılması, apoptozun baskılanması ve hücre yaşamsal sinyallerinin aktivasyonu yönündeki sinyal yollarını indüklediği ve bu yollarla sıkı bir ilişki içinde olduğu tespit edilmiştir.
- Yalnızca hasta grubunda sağlıklı gruptan farklı olarak 10.230 genin hedef olması  $\beta$ -katenin proteininin AML patogeneğinde ne kadar önemli bir belirteç/etken olduğunu ispat etmiştir.
- $\beta$ -kateninin düzenlediği olası bütün genlerin ortaya çıkarılması ile AML tedavisinde hedef genlerin tespiti, ilaç ve antisens moleküllerin geliştirilmesi için yeni ufuklar açacaktır.
- Çalışmada bulunan bütün genler literatüre büyük ölçüde katkı sağlamıştır. Transkriptom sonrası saptanan genlerin her biri ayrı fonksiyonel çalışmalarda kullanılacak hedef potansiyeline sahip olduğundan sonraki çalışmalarda seçilen genlerin fonksiyonel inhibisyonları gerçekleştirilecek ve AML'deki rolleri araştırılacaktır.



## 7. KAYNAK LİSTESİ

- Agnes, F., Shamoon, B., Dina C, Rosnet O, Birnbaum D, Galibert F. 1994. Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene: exon/intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinases (RTK) of subclass III. *Gene*, 145: 283–288.
- Ailles, Le., Gerhard, B., Kawagoe, H., Hogge, DE. 1999. Growth characteristics of acute myelogenous leukemia progenitors that initiate malignant hematopoiesis in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Blood*, 94, 1761–1772.
- Ailles, Le., Humphries, RK., Thomas, TE., Hogge, DE. 1999. Retroviral marking of acute myelogenous leukemia progenitors that initiate long-term culture and growth in immunodeficient mice. *Exp Hematol*, 27: 1609–1620.
- Alcalay, M., Meani, N., Gelmetti, V. 2003. Acute myeloid leukemia fusion proteins deregulate genes involved in stem cell maintenance and DNA repair. *J Clin Invest.*;112:1751-1761.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., Clarke, M.F. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100(7): 3547-9.
- Ayllon, V., Rebollo, A. 2000. Ras-induced cellular events (review). *Mol Membr Biol*; 17: 65–73.
- Baba, Y., Yokota, T., Spits, H., Garrett, KP., Hayashi, S., Kincade, PW. 2006. Constitutively active beta-catenin promotes expansion of multipotent hematopoietic progenitors in culture. *J. Immunol*, 177 :2294-2303.
- Bacher, U., Haferlach, T., Schoch, C., Kern, W., Schnittger, S. 2006. Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients. *Blood*, 107: 3847–3853
- Balesaria, S., Pell, RJ., Abbott, LJ., Tasleem, A., Chavele, KM., Barley, NF., Khair, U., Simon, A., Moriarty, KJ., Brydon, WG., Walters, JR. 2008. Exploring possible mechanisms for primary bile acid malabsorption evidence for different regulation of ileal bile acid transporter transcripts in chronic diarrhoea. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 20:413–422.

- Ballesteros, Mr., Monte, MJ., Briz, O., Jimenez, F., Gonzalez-San Martin, F., Marin JJ. 2006. Expression of transporters potentially involved in the targeting of cytostatic bile acid derivatives to colon cancer and polyps. *Biochem Pharmacol*, Sep 14;72(6):729-38.
- Bansal, D., Scholl, C., Frohling, S., McDowell, E., Lee, BH., Dohner, K et al. 2006. Cdx4 dysregulates Hox gene expression and generates acute myeloid leukemia alone and in cooperation with Meis1a in a murine model. *Proc Natl Acad Sci USA*;103: 16924–16929.
- Bapat, S.A., Mah, A.M., Koppikar, C.B., Kurrey, N.K. Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer. 2005. *Cancer Res*; 65(8):3025-9.
- Beaupre, DM., Kurzrock, R. 1999. RAS and leukemia: from basic mechanisms to gene-directed therapy. *J Clin Oncol*, 17:1071–1079.
- Beksac, M. 1997. *Klinik Hematoloji*
- Bellei, B., Pacchiarotti, A., Perez, M., Faraggiana, T. 2004. Frequent  $\beta$ -catenin overexpression without exon 3 mutation in cutaneous lymphomas. *Modern Pathology*, 17:1275-1281.
- Bennett, J., Catovsky, D., Daniel, M. 1985. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. *Annals of Internal Medicine* 103:626 ..
- Blume-Jensen, P., Hunter, T. 2001. Oncogenic kinase signalling. *Nature*, 411: 355–365.
- Bonnet, D., Dick, JE. 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, 3: 730–737.
- Bottomly, D., Kyler, SL., McWeeney, SK., Yochum, GS. Identification of  $\beta$ -catenin binding regions in colon cancer cells using ChIP-Seq. 2010. *Nucleic Acids Res*. Sep;38(17):5735-45. doi: 10.1093/nar/gkq363. Epub 2010 May 11.
- Bowen, DT., Frew, ME., Hills, R., Gale, RE., Wheatley, K., Groves, MJ. 2005. RAS mutation in acute myeloid leukemia is associated with distinct cytogenetic subgroups but does not influence outcome in patients younger than 60 years. *Blood*, 106: 2113–2119.
- Bruserud, Ø., Rynningen, A., Olsnes, AM., Stordrange, L., Øyan, AM., Kalland, KH., Gjertsen, BT. 2007. Subclassification of patients with acute myelogenous leukemia based on

chemokine responsiveness and constitutive chemokine release by their leukemic cells. *Haematologica*, Mar;92(3):332-41.

Care, RS., Valk, PJ., Goodeve, AC., Abu-Duhier, FM., Geertsma-Kleinekoort, WM., Wilson, GA. 2003. Incidence and prognosis of c-KIT and FLT3 mutations in core binding factor (CBF) acute myeloid leukaemias. *Br J Haematol*, 121: 775–777.

Carow, CE., Levenstein, M., Kaufmann, SH., Chen, J., Amin, S., Rockwell, P. 1996. Expression of the hematopoietic growth factor receptor FLT3 (STK-1/Flk2) in human leukemias. *Blood*, 87:1089–1096.

Carroll, Js., Meyer, CA., Song, J., Li, W., Geistlinger, TR., Eeckhoutte, J., Brodsky, AS., Keeton, EK., Fertuck, KC., Hall, GF., Wang, Q., Bekiranov, S., Sementchenko, V., Fox, EA., Silver, PA., Gingeras, TR., Liu, XS., Brown, M. 2006. Genome-wide analysis of estrogen receptor binding sites. *Nat Genet*, Nov;38(11):1289-97.

Cawley, S., Bekiranov, S., Ng, HH., Kapranov, P., Sekinger, EA., Kampa, D., Piccolboni, A., Sementchenko, V., Cheng, J., Williams, AJ., Wheeler, R., Wong, B., Drenkow, J., Yamanaka, M., Patel, S., Brubaker, S., Tammana, H., Helt, G., Struhl, K., Gingeras, TR. 2004. Unbiased mapping of transcription factor binding sites along human chromosomes 21 and 22 points to widespread regulation of noncoding RNAs. *Cell*, Feb 20;116(4):499-509.

Chen, HL., Liu, YJ., Chen, HL., Wu, SH., Ni, YH., Ho, MC., Lai, HS., Hsu, WM., Tseng, HC., Jeng, YM., Chang, MH. 2008. Expression of Hepatocyte Transporters and Nuclear Receptors in Children with Early and Late- Stage Biliary Atresia. *Pediatr Res*, Jun; 63(6):667-73.

Hwa, CH., Song, JS., Yu, JM., Yu, SS., Choi, SJ., Kim DH., Jung, JS. 2008. Differential effect of NF- $\kappa$ B activity on  $\beta$ -catenin/Tcf pathway in various cancer cells. *FEBS Lett* 582(5):7.

Christiansen, DH., Andersen, MK., Desta, F., Pedersen-Bjergaard, J. 2005. Mutations of genes in the receptor tyrosine kinase (RTK)/RAS/BRAF signal transduction pathway in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 19:2232–2240.

Coluccia, AM., Vacca, A., Duñach, M., Mologni, L., Redaelli, S., Bustos, VH., Benati, D., Pinna, LA., Gambacorti-Passerini, C. 2007. Bcr-Abl stabilizes beta-catenin in chronic myeloid leukemia through its tyrosine phosphorylation. *EMBO J*. Mar 7;26(5):1456-66.

- Conacci-Sorrell, M., Zhurinsky, J., Ben Ze'ev, A. 2002. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J Clin Invest*, 109:987–991.
- Cook, D., Fry, M. J., Hughes, K., Sumathipala, R., Woodgett, J. R. and Dale, T. C. 1996. Wntless inactivates glycogen synthase kinase-3 via an intracellular signalling pathway which involves a protein kinase C. *EMBO J.* 15, 4526-4536.
- Renneville, A., Roumier, V, Biggio, O, Nibourel, N, Boissel, P, Fenaux and C Preudhomm. 2008. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature, *Leukemia* 22, 915–931
- Crampton, SP., Wu, B., Park, EJ., Kim, JH., Solomon, C., Waterman, ML., Hughes, CC. 2009. Integration of the beta-catenin-dependent Wnt pathway with integrin signaling through the adaptor molecule Grb2. *PLoS One.* 16;4(11):e7841.
- Crans, H.N., Sakamoto, K.M. 2001. Transcription factors and translocations in lymphoid and myeloid leukemia. *Leukemia*,15:313-331.
- Craven, P A., F R De, Rubertis . 1989. Protein kinase C is activated in glomeruli from streptozotocin diabetic rats. Possible mediation by glucose. *J Clin Invest.* 83(5): 1667–1675.
- Curtin, J C., Matthew V. Lorenzi. 2010. Drug Discovery Approaches to Target Wnt Signaling in Cancer Stem Cells *Oncotarget*, November, Vol.1(7):563-566.
- Curtis, RK., Oresic, M., Vidal-Puig, A. 2005. Pathways to the analysis of microarray data. *Trends Biotechnol* 23:429–435.2005.05.011.
- Dash, Ab., Williams, IR., Kutok, JL., Tomasson, MH., Anastasiadou, E., Lindahl, K. 2002. A murine model of CML blast crisis induced by cooperation between BCR/ABL and NUP98/HOXA9. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99: 7622–7627.
- De Sousa, EMF., Vermeulen, L., Richel, DJ., Medema, JP. 2011. Targeting Wnt signaling in colon cancer stem cells. *Clin Cancer Res*,17:647-53
- Dean, M., Fojo, T., Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer.* 2005; 5: 275-84.

- Deschler, B., de Witte, T., Mertelsmann, R., Lübbert, M. 2006. Treatment decision-making for older patients with high-risk myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukemia: problems and approaches. *Haematologica*, Nov;91(11):1513-22.
- Döhner, H., Estey, EH., Amadori, S. 2010. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European leukemiaNet. *Blood*, 115: 453–74.
- Donnenberg, VS., Donnenberg, AD. 2005. Multiple drug resistance in cancer revisited: the cancer stem cell hypothesis. *J Clin Pharmacol*, 45:872–7.
- Es, J.H.V., Barker, N., Clevers, H. 2003. You Wnt some, you lose some: oncogenes in the Wnt signaling pathway. *Current Opinion in Genetics & Development*, 13: 28-33.
- Estey, E., Döhner, H. 2006. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*, 368:1894 –907.
- Estey, E., Dohner, H. 2006. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*, 368: 1894–907.
- Xue-feng, F., Zhang, W., Zhao, N., Yu, W., Ding, D., Hong, Xu., Li-sha Li, Hua-rong Zhang, Shu Zheng. Genome-wide analysis of OCT4 binding sites in glioblastoma cancer cells. 2011. *J Zhejiang Univ Sci B*. October; 12(10): 812–819.
- Feuring-Buske, M., Gerhard, B., Cashman, J., Humphries, RK., Eaves, CJ., Hogge, DE. 2003. Improved engraftment of human acute myeloid leukemia progenitor cells in  $\alpha$ 2-microglobulin-deficient NOD/ SCID mice and in NOD/SCID mice transgenic for human growth factors. *Leukemia*, 17: 760–763.
- Franks, L.M., Teich, N.M. 2001. *Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer*. NewYork:Oxford University Press, Inc., Chapter 12.
- Gachet, S., Ghysdael, J. 2009. Calcineurin/NFAT signaling in lymphoid malignancies. *Gen Physiol Biophys*, F47-54.
- Georges, Martin., Walter Keller. 2007. RNA-specific ribonucleotidyl transferases. *RNA*, 13:1834–1849.
- Gilliland, DG., Griffin, JD. 2002. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*, 100: 1532–1542.

- Gilliland, Dg., Jordan, CT., Felix, CA. 2004. The molecular basis of leukemia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program*, 1: 80–97.
- Gorski Julia, J., Kienan I, Savage., Jude M. Mulligan, Simon S. McDade, Jaine K. Blayney, Zhaoping, Ge., D. Paul Harkin. 2011. Profiling of the BRCA1 transcriptome through microarray and ChIP-chip analysis. *Nucleic Acids Res.* December; 39(22): 9536–9548.
- Gurney, JG., Severson ,RK., Davis, S., Robison, LL. 1995. Incidence of cancer in children in the United States. Sex-, race-, and 1-year age-specific rates by histologic type. *Cancer*. Apr 15;75(8):2186-95.
- Hall, Bm., Gibson, LF. 2004. Regulation of lymphoid and myeloid leukemic cell survival: role of stromal cell adhesion molecules. *Leuk Lymphoma*, Jan;45(1):35-48.
- Hau C. Kwaan. 2007. Double Hazard of Thrombophilia and Bleeding in Leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 151-7.
- Herbst, A., Kolligs, FT. 2007. Wnt signaling as a therapeutic target for cancer. *Methods Mol Biol*, 361:63-91.
- Holliday, R. 2006. Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics*, 1: 76–80.
- Hope, K.J., Jin, L., Dick, J.E. 2004. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol*, 5(7):701-3.
- Horak, CE., Luscombe, NM., Qian, J., Bertone, P., Piccirillo, S., Gerstein, M., Snyder, M. 2002. Complex transcriptional circuitry at the G1/S transition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*, 16:3017-3033.
- <http://en.wikipedia.org/wiki/ChIP-on-chip>
- Huang da, W., Sherman, BT., Lempicki, RA. 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources *Nat Protoc*, 4(1):44-57.
- Ilyas, M. 2005. Wnt signalling and the mechanistic basis of tumour development. *J Pathol*, 205: (2):130–144.

- Injoo I, Hwang., Yong Seok YS, Choi., Mi-Ya MY, Jeon., Sunjoo S, Jeong. 2010. NF-kB p65 represses  $\beta$ -catenin-activated transcription of cyclin D1. *Biochem Biophys Res Commun* 403(1):6.
- Iyer, Vr., Horak, CE., Scafe, CS., Botstein, D., Snyder, M., Brown, PO. 2001. Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF. *Nature*, 409:533-538.
- Jamieson, CH., Ailles, LE., Dylla, SJ. 2004. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med*, 351:657-67.
- Jamieson, CH., Weissman, IL., Passegué, E. 2004. Chronic versus acute myelogenous leukemia: a question of self-renewal. *Cancer Cell*, 6(6):531-3.
- Jamieson, Ch., Ailles, LE., Dylla, SJ et al. 2004. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J ; Med*;351:657–667.
- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., Ward, E. 2010. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2010;60:277–300.
- Johan, MF., Bowen, DT., Frew, ME., Goodeve, AC., Wilson, GA., Peake, IR. 2004. Mutations in PTPN11 are uncommon in adult myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia. *Br J. Haematol.* 124: 843–844.
- Jude, CD., Gaudet, JJ., Speck, NA., Ernst, P. 2008. Leukemia and hematopoietic stem cells: balancing proliferation and quiescence. *Cell Cycle*, 7:586–59.
- Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S., Okuno, Y., Hattori, M. 2004. The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids, Res.*32:D277-280.
- KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. URL: <http://www.genome.jp/kegg/pathway>. Html.
- Kelly, MJ., Meloni-Ehrig, AM., Manley, PE., Altura, A. 2009. Poor outcome in a pediatric patient with acute myeloid leukemia associated with a variant t(8;21) and trisomy 6. *Cancer Genet Cytogenet*, 189:48 - 52.

- Khan, N I., Bradstock, KF., Bendall, LJ. 2007. Activation of Wnt/beta-catenin pathway mediates growth and survival in B-cell progenitor acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*,138 :338-348.
- Kim, Th., Barrera, LO., Ren, B. 2007. CHIP-chip for genome-wide analysis of protein binding in mammalian cells. *Curr Protoc Mol Biol*, Jul, Chapter 21:Unit 21.13.
- Kottaridis, PD., Gale, RE., Langabeer, SE., Frew, ME., Bowen, DT., Linch, DC. 2002. Studies of FLT3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia:implications for the role of FLT3 mutations in leukemogenesis,minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3 inhibitors. *Blood*, 100: 2393–2398.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J et al. 1994. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*, 367: 645–648.
- Lennartsson, J., Jelacic, T., Linnekin, D., Shivakrupa, R. 2005. Normal and oncogenic forms of the receptor tyrosine kinase kit. *Stem Cells*, 23: 16–43.
- Li ,Y., Welm, B., Podsypanina, K. 2003. Evidence that transgenes encoding components of the Wnt signaling pathway preferentially induce mammary cancers from progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:15853-8.
- Li, Y., Flores, R., Yu, A., Okcu, MF., Murray, J., Chintagumpala, M., Hicks, J., Lau, CC., Man, TK. 2011. Elevated expression of CXC chemokines in pediatric osteosarcoma patients. *Cancer*, Jan 1;117(1):207-17. doi: 10.1002/cncr.25563.
- Lieb, Jd., Liu, X., Botstein, D., Brown, PO. 2001. Promoter-specific binding of Rap1 revealed by genome-wide maps of protein-DNA association. *Nat Genet*, 28:327-334.
- Loh, ML., Reynolds, MG., Vattikuti, S., Gerbing, RB., Alonzo, TA., Carlson, E. 2004. Children's Cancer Group. PTPN11 mutations in pediatric patients with acute myeloid leukemia: results from the Children's Cancer Group. *Leukemia*, 18: 1831–1834.
- Lustig, B., Behrens, J. 2003. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol*, 129:199-221.



- Lustig, B., Behrens, J. 2003. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J Cancer Res Clin Oncol*, 129: 199–221.
- MacDonald Bryan, T., Keiko, Tamai., Xi He. 2009. Wnt/b-Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases, Volume 17, Issue 1, 21 July, Pages 9–26.
- Madhani, HD., Galitski, T., Lander, ES., Fink, GR. 1999. Effectors of a developmental mitogen-activated protein kinase cascade revealed by expression signatures of signaling mutants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:12530-12535.
- Malanchi, I., Peinado, H., Kassen, D. 2008. Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling. *Nature*,452:650-3.
- Marvin, C. 2001. Gershengorn and Roman Osman Minireview: Insights into G Protein-Coupled Receptor Function Using Molecular Models. *Endocrinolog*, Vol. 142 No. 1.
- Mcclanahan, T. 2006. Identification of overexpression of orphan G proteincoupled receptor GPR49 in human colon and ovarian primary tumors. *Cancer Biol. Ther*, 5, 419–426.
- Medyouf, Hind., Jacques, Ghysdael. 2008. The calcineurin/NFAT signaling pathway A novel therapeutic target in leukemia and solid tumors. *Cell Cycle*, 7:3, 1-7.
- Micalizzi, DS., Farabaugh, SM., Ford, HL. 2010. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*;15:117-34.
- Miller, J.R. 2003. Wnt signal transduction. *The Cancer Handbook* chapter 14: 195-208.
- Mitin, N., Rossman, KL., Der, CJ. 2005. Signaling interplay in Ras superfamily function. *Curr Biol*, 15: R563–R574.
- Modi, W., Chen, Z. 1998. Localization of the human CXC chemokine subfamily on the long arm of chromosome 4 using radiation hybrids. *Genomics*,47 (1): 136–9.
- Moon, Cheil., Bridget, Q. Liu., So Yeun, Kim., Esther, J. Kim., Yun, Ju Park., Joo-Yeon, Yoo., Hyung, Soo Han., Yong Chul, Bae., Gabriele, V. 2009. Ronnett Leukemia Inhibitory Factor Promotes Olfactory Sensory Neuronal Survival Via Phosphoinositide 3-Kinase Pathway Activation and Bcl-2. *Journal of Neuroscience Research*, 87:1098–1106.

- Moon, Cheil., Joo-Yeon, Yoo., Vale' ry, Matarazzo., Young Kwan, Sung., Esther, J. Kim., Gabriele, V. 2002. Ronnett Leukemia inhibitory factor inhibits neuronal terminal differentiation through STAT3 activation. PNAS, June 25, vol. 99 no. 13 9015–9020.
- Morrison, SJ., Spradling, AC. 2008. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. Cell, 132:598–611.
- Mrozek, K., Bloomfield, CD. 2008. Clinical significance of the most common chromosome translocations in adult acute myeloid leukemia. J Natl Cancer Inst Monogr 52 - 57.
- Mufti, GJ., Bennett, JM., Goasguen, J. 2008. Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. Haematologica, 93:1712-1717.
- Muller-Tidow, C., Steffen, B., Cauvet, T., et al. 2004. Translocation products in acute myeloid leukemia activate the Wnt signaling pathway in hematopoietic cells. Mol Cell Biol, 24:2890–2904.
- Murdoch, B., Chadwick, K., Martin, M, et al. 2003. Wnt-5A augments repopulating capacity and primitive hematopoietic development of human blood stem cells in vivo. Proc Natl Acad Sci USA, 100:3422–3427.
- Nelson, W. J., Nusse, R. 2004. Convergence of Wnt,  $\beta$ -catenin, and cadherin pathways. Science, 303, 1483–1487.
- Neubauer, A., Dodge, RK., George, SL., Davey, FR., Silver, RT., Schiffer, CA. 1994. Prognostic importance of mutations in the ras proto-oncogenes in de novo acute myeloid leukemia. Blood, 83: 1603–1611.
- Novak, A., Dedhar, S. 1999. Signaling through  $\beta$ -catenin and Lef/Tcf. Cell Mol Life Sci, 56 (5-6): 523-37.
- O'donovan, N., Galvin, M., Morgan, J. 1999. Physical mapping of the CXC chemokine locus on human chromosome 4. Cytogenet Cell Genet, 84 (1–2): 39–42.
- Offman, J., Opelz, G., Doehler, B. 2004. Defective DNA mismatch repair in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome after organ transplantation. Blood, 104:822-828

- Okuda, T., van Deursen, J., Hiebert, S. W., Grosveld, G., and Downing, J. R. (1996). AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 84, 321 — 330.
- Onder, TT., Gupta, PB., Mani, SA. 2008. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res*, 68:3645-54.
- Orkin, SH., Zon, LI. 2008. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, 132: 631–644.
- Pacheco-Pinedo, EC., Morrissey, EE.2011. Wnt and Kras signaling-dark siblings in lung cancer. *Oncotarget*.;2(7):569-74.
- Passegué, E., Jamieson, CH., Ailles, LE., Weissman, IL. 2003. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 30;100 Suppl, 1:11842-9.
- Pedrosa, E., Shah, A., Tenore, C., Capogna, M., Villa, C., Guo, X., Zheng, D., Lachman, HM. 2010.  $\beta$ -catenin promoter ChIP-chip reveals potential schizophrenia and bipolar disorder gene network. *J Neurogenet*, Dec;24(4):182-93. doi: 10.3109/01677063.2010.495182. Epub 2010 Jul 8.
- Perez-Moreno, M., Jamora, C., Fuchs, E. 2003. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell*, 112, 535-548.
- Proost, P., Wuyts, A., Conings, R., Lenaerts, J., Billiau, A., Opdenakker, G., Van Damme, J. 1993. Human and bovine granulocyte chemotactic protein-2: complete amino acid sequence and functional characterization as chemokines. *Biochemistry*, 32 (38): 10170–7.
- Pruner, C., Hocevar, B.A., Howe, P.H. 2004. Wnt signaling: Physiology and Pathology. *Growth Factor*, 22 (3): 141-150.
- Reguart. 2005. The role of Wnt signaling in cancer and stem cells. *Future Oncol*. 1(6):787-797.
- Reilly, JT. 2003. Receptor tyrosine kinases in normal and malignant haematopoiesis. *Blood Rev*, 17: 241–248.

- Rekhtman, N., Radparvar, F., Evans, T., and Skoultschi, A. I. 1999. Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes Dev.* 13, 1398—1411.
- Ren, B., Robert, F., Wyrick, JJ., Aparicio, O., Jennings, EG., Simon, I., Zeitlinger, J., Schreiber, J., Hannett, N., Kanin, E et al. 2000. Genome-wide location and function of DNA binding proteins. *Science*, 290:2306-2309.
- Renner, O., Harsch, S., Strohmeyer, A., Schimmel, S., Stange, EF. 2008. Reduced ileal expression of organic solute transporter alpha and beta (OSTalpha -OSTbeta ) in non-obese gallstone disease. *J Lipid Res.*
- Reya, T., Duncan, AW., Ailles, L., Domen, J., Scherer, DC., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R., Weissman, IL. 2003. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 423:409-414.
- Reya, T., O' Riordan, M., Okamura, R., Devaney, E., Willert, K., Nusse, R., Grosschedl, R. 2000. Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity*, 13:15-24.
- Reya, T., Duncan, AW., Ailles, L., et al. 2003. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 423:409–414.
- Rizo, A., Dontje, B., Vellenga, E., de Haan, G., Schuringa, JJ. 2008. Long-term maintenance of human hematopoietic stem/progenitor cells by expression of BMI1. *Blood*, 111: 2621–2630.
- Roberts, Cj., Nelson, B., Marton, MJ., Stoughton, R., Meyer, MR., Bennett, HA., He, YD., Dai, H., Walker, WL., Hughes, TR. 2000. Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles. *Science*, 287:873-880.
- Sauter, Gh., Munzing, W., von Ritter, C., Paumgartner, G. 1999. Bile acid malabsorption as a cause of chronic diarrhea: diagnostic value of 7alpha-hydroxy-4-cholesten-3-one in serum. *Dig Dis Sci*, 44:14–19.
- Schepeler, T., Holm, A., Halvey, P., Nordentoft, I., Lamy, P., Riising, EM., Christensen, LL., Thorsen, K., Liebler, DC., Helin, K., Ørntoft, TF., Andersen, CL. 2011. Attenuation of the

beta-catenin/TCF4 complex in colorectal cancer cells induces several growth-suppressive microRNAs that target cancer promoting genes. *Oncogene*. 31;31(22):2750-60.

Schlenk, RF., Benner, A., Krauter, J. 2004. Individual patient data-based meta-analysis of patients aged 16 - 60 years with core binding factor acute myeloid leukemia: a survey of the German Acute Myeloid Leukemia Intergroup. *J Clin Oncol*, 22:3741 - 3750.

Schmalhofer, O., Brabletz, S., Brabletz, T. 2009. E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 28:151-66.

Sengupta, A., Banerjee, D., Chandra, S., Banerji, SK., Ghosh, R., Roy, R et al. 2007. Deregulation and cross talk among Sonic hedgehog, Wnt, Hox and Notch signaling in chronic myeloid leukemia progression. *Leukemia*, 21: 949–955.

Sergey, P. Shevtsov Syed Haq., Thomas Force. 2006. Activation of  $\beta$ -catenin Signaling Pathways by Classical G-Protein-Coupled Receptors Mechanisms and Consequences in Cycling and Non-cycling Cells. *Cell Cycle*, 5:20, 2295-2300.

Serinsoz, E., Neusch, M., Busche, G., Wasielewski, R., Kreipe, H., Bock, O. 2004. Aberrant expression of  $\beta$ -catenin discriminates acute myeloid leukaemia from acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, 126:313–9.

Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ. 2009. Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell*, 138:822–9.

Shih, LY., Huang, CF., Wu, JH., Lin, TL., Dunn, P., Wang, PN. 2002. Internal tandem duplication of FLT3 in relapsed acute myeloid leukemia: a comparative analysis of bone marrow samples from 108 adult patients at diagnosis and relapse. *Blood*, 100:2387–2392.

Sierko, Ewa., A., Marek, Z., Wojtukiewicz, Roman, Zawadzki., Lech, Zimnoch., Walter, Kisiel. 2010. Expression of protein C (PC), protein S (PS) and thrombomodulin (TM) in human colorectal cancer. *Thrombosis Research*, 125 e71–e75.

Simon, I., Barnett, J., Hannett, N., Harbison, CT., Rinaldi, NJ., Volkert, TL., Wyrick, JJ., Zeitlinger, J., Gifford, DK., Jaakkola, TS. et al. 2001. Serial regulation of transcriptional regulators in the yeast cell cycle. *Cell*, 106:697-708.

- Simon, M., Grandage, V.L., Linch, D.C., Khwaja, A. 2005. Constitutive activation of the Wnt / beta-catenin signalling pathway in acute myeloid leukaemia. *Oncogene*, 24:2410–20.
- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., Dirks, P.B. 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*, 432 (7015):281-2.
- Smalley, M.J., Dale, T.C. 1999. *Cancer Metast. Rev.*, 18, 215–230.
- Spicuglia, S., Vincent-Fabert, C., Benoukraf, T., Tibéri, G., Saurin, A.J., Zacarias-Cabeza, J., Grimwade, D., Mills, K., Calmels, B., Bertucci, F., Sieweke, M., Ferrier, P., Duprez, E. 2011. Characterisation of genome-wide PLZF/RARA target genes. *PLoS One*;6(9):e24176.
- Stone, R.M., O'donnell, M.R., Sekeres, M.A. Acute Myeloid Leukemia. 2004. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 98-117.
- Takanashi, M., Motoji, T., Masuda, M., Oshimi, K., Mizoguchi, H. 1993. The effects of leukemia inhibitory factor and interleukin 6 on the growth of acute myeloid leukemia cells. *Leuk Res*, 17(3):217-22.
- Tan, X. 2008. Beta-catenin deletion in hepatoblasts disrupts hepatic morphogenesis and survival during mouse development. *Hepatology*, 47:1667–1679.
- Tang, B., Di Lena, P., Schaffer, L., Head, S.R., Baldi, P., Thomas, E.A. 2011. Genome-wide identification of Bcl11b gene targets reveals role in brain-derived neurotrophic factor signaling. *PLoS One*, 6(9):e23691.
- Tartaglia, M., Martinelli, S., Iavarone, I., Cazzaniga, G., Spinelli, M., Giarin, E. 2005. Somatic PTPN11 mutations in childhood acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, 129: 333–339.
- Tartaglia, M., Niemeyer, C.M., Shannon, K.M., Loh M.L. 2004. SHP-2 and myeloid malignancies. *Curr Opin Hematol*, 11: 44–50.
- Tenen, D. G., Hromas, R., Licht, J. D., and Zhang, D.-E. 1997. Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood*, 90, 489—519.

- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*, 139:871-90.
- Tichenbrock, L., Schwable, J., Wiedehage, M.. 2005. Flt3 tandem duplication mutations cooperate with Wnt signaling in leukemic signal transduction. *Blood*, 105:3699–3706.
- Tolwinski, N. S., Wieschaus, E. Rethinking WNT signaling. 2004. *Trends Genet*, 20, 177–181.
- Uchiba, M., Okajima, K., Oike, Y., Ito, Y., Fukudome, K., Isobe, H., et al. 2004. Activated protein C induces endothelial cell proliferation by mitogen-activated protein kinase activation in vitro and angiogenesis in vivo. *Circ Res*, 95:34–41.
- Valencia, A., Román-Gómez, J., Cervera, J., Such, E., Barragán, E., Bolufer, P., Moscardó, F., Sanz, G F., Sanz, MA. 2009. Wnt signaling pathway is epigenetically regulated by methylation of Wnt antagonists in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, 23:1658-1666.
- Van De Wetering, M. 2002. The  $\beta$ -catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*, 111, 241–250.
- Van Den Berg, J,David., Sharma KARun, Bruno., Edward., Hoffman, Ron. 1998. Role of Members of the Wnt Gene Family in Human Hematopoiesis. *Blood*, 92:3189-3202.
- Vermeulen, L., De Sousa, EMF., van der Heijden, M. 2010. Wnt activity defines colon cancer stem cells and is regulated by the microenvironment. *Nat Cell Biol*;12:468-76.
- Voso, M. T., Burn, T. C., Wulf, G., Lim, B., Leone, G.,and Tenen, D. G. 1994. Inhibition of hematopoiesis by competitive binding of the transcription factor PU.1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7932—7936.
- Wang, XH., Meng, XW., Sun, X., DU, YJ., Zhao, J., Fan, YJ. 2011. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway affects the protein expressions of caspase-3, XIAP and Grp-78 in hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*. Aug;19(8):599-602.
- Wang, C., Lishner, M., Minden, MD., McCulloch, EA. 1990. The effects of leukemia inhibitory factor (LIF) on the blast stem cells of acute myeloblastic leukemia. *Leukemia*, Aug;4(8):548-52.

- Wang, Q., Stacy, T., Miller, J. D., Lewis, A. F., Gu, T.-L., Huang, X., Bushweller, J. H., Bories, J.-C., Alt, F. W., Ryan, G., Liu, P. P., Wynshaw-Boris, A., Binder, M., Marin-Padilla, M., Sharpe, A. H., and Speck, N. A. (1996). The CBFbeta subunit is essential for CBFalpha2 (AML1) function in vivo. *Cell*, Nov 15;87(4):697-708.
- Warr, MR., Pietras, EM., Passequé, E. 2011. Mechanisms controlling hematopoietic stem cell functions during normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. Nov-Dec;3(6):681-701.
- Watkins, F., Fidler, C., Boulwood, J., Wainscoat, JS. 2004. Mutations in PTPN11 are rare in adult myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Am J Hematol*, 76: 417.
- Weerkamp, F., van Dongen, JJ., Staal, FJ. 2006. Notch and Wnt signaling in T-lymphocyte development and acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 20:1197-1205.
- Whitman, SP., Archer, KJ., Feng, L., Baldus, C., Becknell, B., Carlson, BD. 2001. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res*, 61: 7233–7239.
- Wodarz, A., Nusse, R. 1998. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14:59–88.
- Wojtukiewicz, Mz., Rucińska, M., Zacharski, LR., Kozłowski, L., Zimnoch, L., Piotrowski, Z., et al. 2001. Localization of blood coagulation factors in situ in pancreatic carcinoma. *Thromb Haemost*, 86:1416–20.
- Wojtukiewicz, Mz., Sierko, E., Zacharski, LR., Zimnoch, L., Kisiel. 2003. Tissue factor dependent coagulation activation and impaired fibrinolysis in loco in gastric cancer. *Semin Thromb Hemost*, 29:291–9.
- Wojtukiewicz, Mz., Zacharski, LR., Memoli, VA., Kisiel, W., Kudryk, BJ., Moritz, TE., et al. 1991. Fibrin formation on vessel walls in hyperplastic and malignant prostate tissue. *Cancer*, 67:1377–81.



- Wojtukiewicz, Mz., Zacharski, LR., Memoli, VA., Kisiel, W., Kudryk, BJ., Rousseau, SM., et al. 1990. Abnormal regulation of coagulation/fibrinolysis in small cell carcinoma of the lung. *Cancer*, 65:481–5.
- Wojtukiewicz, Mz., Zacharski, LR., Memoli, VA., Kisiel, W., Kudryk, BJ., Rousseau, SM., et al. 1990. Malignant melanoma. Interaction with coagulation and fibrinolysis pathways in situ. *Am J Clin Pathol*, 93:516–21.
- Woodward, W.A., Chen, M.S., Behbod, F., Rosen, J.M. On mammary stem cells. 2005. *J Cell Sci*, 118 (Pt 16):3585-94.
- Wu, J., Smith, LT., Plass, C., Huang, TH. 2006. ChIP-chip comes of age for genome-wide functional analysis. *Cancer Res*, Jul 15;66(14):6899-902.
- Wuyts, A., Van Osselaer, N., Haelens, A., Samson, I., Herdewijn, P., Ben-Baruch, A., Oppenheim, J., Proost, P., Van Damme, J. 1997. Characterization of synthetic human granulocyte chemotactic protein 2: usage of chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 and in vivo inflammatory properties. *Biochemistry*, 36 (9): 2716–23.
- Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S. 2001. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood*, 97: 2434–2439.
- Yamamoto, Y. et al. 2003. Overexpression of orphan G-protein-coupled receptor, Gpr49, in human hepatocellular carcinomas with  $\beta$ -catenin mutations. *Hepatology*, 37, 528–533.
- Yang, A., Zhu, Z., Kapranov, P., McKeon, F., Church, GM., Gingeras, TR., Struhl, K. 2006. Relationships between p63 binding, DNA sequence, transcription activity, and biological function in human cells. *Mol Cell*, Nov 17;24(4):593-602.
- Yilmaz M, Christofori G. 2009. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer Metastasis Rev*, 28:15-33.
- Ysebaert, L., Chicanne, G., Demur, C., et al. 2006. Expression of beta-catenin by acute myeloid leukemia cells predicts enhanced clonogenic capacities and poor prognosis. *Leukemia*, 20:1211–1216.

- Yuan, X., Curtin, J., Xiong, Y., Liu, G., Waschmann-Hogiu, S., Farkas, D.L., Black, K.L., Yu, J.S. 2004. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme. *Oncogene*, 23(58): 9392-400.
- Zeitlinger, J., Simon, I., Harbison, C.T., Hannett, N.M., Volkert, T.L., Fink, G.R., Young, R.A. 2003. Program-specific distribution of a transcription factor dependent on partner transcription factor and MAPK signaling. *Cell*, 113:395-404.
- Zhang, P., Behre, G., Pan, J., Iwama, A., Wara-aswapati, N., Radomska, H. S., Auron, P. E., Tenen, D. G., and Sun, Z. J. 1999. Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8705—8710.
- Zhang, P., Zhang, X., Iwama, A., Yu, C., Smith, K. A., Mueller, B., Narravula, S., Torbett, B. E., Orkin, S.H., and Tenen, D. G. 2000. PU.1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding. *Blood*, 96, 2641—2648.
- Zwaan, ChM., Meshinchi, S., Radich, J.P., Veerman, A.J., Huismans, D.R., Munske, L. 2003. FLT3 internal tandem duplication in 234 children with acute myeloid leukemia (AML): prognostic significance and relation to cellular drug resistance. *Blood*, 102: 2387–2394.

## **EKLER**

### **EK-1**

#### **ARAŞTIRMA AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU**

##### **(Hasta Grubu)**

###### **(Hekimin Açıklaması)**

Bu form katılmanız önerilen araştırma ile ilgili olarak sizi bilgilendirmek üzere hazırlanmış olup; araştırmaya katılıp katılmama konusunda karar vermenizin kolaylaştırılması hedeflenmiştir.

Araştırmanın ismi " Akut Miyeloid Lösemide Beta katenin proteininin düzenlediği genlerin genom ebadında incelenmesi ve olası ilaç hedeflerinin belirlenmesi "dir.

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Ancak hemen söyleyelim ki bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararımızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Araştırmanın amacı; Akut Miyeloid Lösemi (AML), kemik iliğindeki kan kök hücrelerinin bir dizi genetik değişiklik sonucunda normal büyüme ve farklılaşmanın bozulup, kemik iliği ve periferik kanda çok sayıda anormal olgunlaşmamış hücrenin birikimi ile karakterize olan bir hastalıktır. Kendilerini yenileyebilme özelliğine sahip normal kök hücrelerde meydana gelen mutasyonlar kanseri ortaya çıkarmaktadır.

AML’li hastalarda kemik iliğinde bulunan kök hücrelerde meydana gelen bir mutasyon veya sinyal iletimindeki bozukluk bu hücrelerin aşırı çoğalmasına ve kana geçmesine böylece hastalığın ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

Wnt/ $\beta$ -katenin adı verilen sinyal yolağındaki  $\beta$ -katenin proteinin AML hastalığının oluşumundaki etkisini araştırmak için sağlıklı insanlar ile bu hastalığa yakalanan insanların hücrelerini karşılaştırmak üzere bir çalışma planlanmıştır.

Buradan yola çıkarak, bu çalışmada Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim dalından Wnt yolağının etkili olduğu bilinen akut miyeloid lösemi tanısı almış 10 hastadan (kemikiliği) ve 5 sağlıklı vericiden (kanından) kök hücrelerin elde edilmesi ve bu hücrelerdeki protein etkileşimlerinin AML tanı ve tedavisindeki görevinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmada Hacettepe Üniversitesi Hematoloji Bilim dalında tanı amacıyla alınan hasta kemik iliği örnekleri kullanılacaktır. Bunun haricinde sizden ilave kemik iliği alınmayacaktır. Zaten alınan örneğin bir kısmı bu çalışmada kullanılacağı için onayınıza başvurulmaktadır.

Bir miktar kemik iliği örneği alındıktan sonra CD34+ hematopoetik kök hücreler izole edilecektir. Bu hücreler ile gen düzeyinde bir çalışma yapılacaktır. Size her hangi bir ilaç verilmeyecek ve bu durum yaşamınızı etkilemeyecektir.

Çalışma sırasında elde edilen hücre örnekleri anonim olarak saklanacak ve hastaların isimleri saklı kalmak koşulu ile diğer bilimsel çalışmalarda da kullanılabilir. Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

Bu çalışmadan elde edilecek sonuçlar size bildirilmeyecek ve tedaviniz bu sonuçlara bağlı olmayacaktır.

Çalışmadan istediğiniz zaman çıkabilirsiniz. Ayrıca teknik nedenlerden dolayı araştırmacı tarafından çalışmadan çıkarılabiliyorsunuz.

---

Bu çalışma Doç. Dr. Berrin İmge Ergüder tarafından yürütülecektir. Çalışma süresince herhangi soru veya sorunuz olduğunda Doç. Dr. Berrin İmge Ergüder’e 310 30 10/284 numaralı telefondan veya 24 saat 05057581080 numaralı cep telefonundan veya Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Morfoloji Binası Kat:1’den ve/veya doktorumuz Prof. Dr. Nilgün Sayınalp’e 3051543 numaralı telefondan veya 24 saat 05323558234 numaralı cep telefonundan veya Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji Bilim Dalından ulaşabilirsiniz. Bu yazının bir kopyası size verilecektir.

Yardımlarınız için çok teşekkür ederiz.

###### **(Katılımcının/Hastanın Beyanı)**

Sayın Dr. Nilgün Sayınalp tarafından Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Hematoloji Bilim dalında tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu

bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağına bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dr Nilgün Sayınalp’i, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakóltesi Hastanesi Hematoloji Bilim Dalından ve 3051543 numaradan arayabileceğimi biliyorum.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağdının bir kopyası bana verilecektir.

**Katılımcı**

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

**Görüşme tanığı**

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

**Katılımcı ile görüşen hekim**

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel:

İmza:

## EK-2

### ARAŞTIRMA AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU (Kontrol Grubu)

#### *(Hekimin Açıklaması)*

Bu form katılmanız önerilen araştırma ile ilgili olarak sizi bilgilendirmek üzere hazırlanmış olup; araştırmaya katılıp katılmama konusunda karar vermenizin kolaylaştırılması hedeflenmiştir.

Araştırmanın ismi " Akut Miyeloid Lösemide Beta katenin proteininin düzenlediği genlerin genom ebadında incelenmesi ve olası ilaç hedeflerinin belirlenmesi "dir.

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Ancak hemen söyleyelim ki bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Araştırmanın amacı; Akut Miyeloid Lösemi (AML), kemik iliğindeki kan kök hücrelerin bir dizi genetik değişiklik sonucunda normal büyüme ve farklılaşmanın bozulup, kemik iliği ve periferik kanda çok sayıda anormal olgunlaşmamış hücrenin birikimi ile karakterize olan bir hastalıktır. Kendilerini yenileyebilme özelliğine sahip normal kök hücrelerde meydana gelen mutasyonlar kanseri ortaya çıkarmaktadır.

AML’li hastalarda kemik iliğinde bulunan kök hücrelerde meydana gelen bir mutasyon veya sinyal iletimindeki bozukluk bu hücrelerin aşırı çoğalmasına ve kana geçmesine böylece hastalığın ortaya çıkmasına neden olmaktadır.

Wnt/ $\beta$ -katenin adı verilen sinyal yolağındaki  $\beta$ -katenin proteininin AML hastalığının oluşumundaki etkisini araştırmak için sağlıklı insanlar ile bu hastalığa yakalanan insanların hücrelerini karşılaştırmak üzere bir çalışma planlanmıştır.

Buradan yola çıkarak, bu çalışmada Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim dalından Wnt yolağının etkili olduğu bilinen akut miyeloid lösemi tanısı almış 10 hastadan (kemik iliği) ve 5 sağlıklı vericiden (kanından) kök hücrelerin elde edilmesi ve bu hücrelerdeki protein etkileşimlerinin AML tanı ve tedavisindeki görevinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada Hacettepe Üniversitesi Hematoloji Bilim dalında sağlıklı allojenik kök hücre vericilerinden alınan kan örnekleri kullanılacaktır. Bunun haricinde sizden ilave kan alınmayacaktır. Zaten alınan örneğin bir kısmı bu çalışmada kullanılacağı için onayınıza başvurulmaktadır.

Bir miktar kan örneği alındıktan sonra CD34+ hematopoetik kök hücreler izole edilecektir. Bu hücreler ile gen düzeyinde bir çalışma yapılacaktır. Size her hangi bir ilaç verilmeyecek ve bu durum yaşamınızı etkilemeyecektir.

Çalışma sırasında elde edilen hücre örnekleri anonim olarak saklanacak ve hastaların isimleri saklı kalmak koşulu ile diğer bilimsel çalışmalarda da kullanılabilir. Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

Bu çalışmadan elde edilecek sonuçlar size bildirilmeyecek ve tedaviniz bu sonuçlara bağlı olmayacaktır.

Çalışmadan istediğiniz zaman çıkabilirsiniz. Ayrıca teknik nedenlerden dolayı araştırmacı tarafından çalışmadan çıkarılabilirsiniz.

---

Bu çalışma Doç. Dr. Berrin İmge Ergüder tarafından yürütülecektir. Çalışma süresince herhangi soru veya sorunuz olduğunda Doç. Dr. Berrin İmge Ergüder’e 310 30 10/284 numaralı telefondan veya 24 saat 05057581080 numaralı cep telefonundan veya Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Morfoloji Binası Kat:1’den ve/veya doktorumuz Prof. Dr. Nilgün Sayınalp’e 3051543 numaralı telefondan veya 24 saat 05323558234 numaralı cep telefonundan veya Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji Bilim Dalından ulaşabilirsiniz. Bu yazının bir kopyası size verilecektir.

Yardımlarınız için çok teşekkür ederiz.

#### *(Katılımcının/Hastanın Beyanı)*

Sayın Dr. Nilgün Sayınalp tarafından Hacettepe Üniversitesi Hastanesi Hematoloji Bilim dalında tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu

bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılabacağına inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağına bilincindeyim) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dr Nilgün Sayınalp’i, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji Bilim Dalından ve 3051543 numaradan arayabileceğimi biliyorum

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde “katılımcı” olarak yer alma kararını aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağdının bir kopyası bana verilecektir.

**Katılımcı**

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

**Görüşme tanığı**

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

**Katılımcı ile görüşen hekim**

Adı soyadı, ünvanı:

Adres:

Tel:

İmza :



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
Tıp Fakültesi  
Tıbbi Araştırmalar Yerel Etik Kurulu

Sayı : B.30.2.HAC.0.01.00.01/6 718  
Konu :

06 Mart 2009

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

**Toplantı Tarihi** : 26 ŞUBAT 2009 PERŞEMBE günü  
**Toplantı No** : 2009/3  
**Proje No** : TBK 09/9 (Değerlendirme Tarihi: 26.02.2009)  
**Karar No** : TBK 09/9- 47

Ankara U. Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Berrin İmge Ergüder'in sorumlu araştırmacısı olduğu, Prof.Dr.Asuman Sunguroğlu, Prof.Dr.Nilgün Sayınalp, Doç.Dr.Hilal Özdağ, Uzm.Bio.Tülin Özkan, Uzm.Bio.Aynur Karadağ ve Uzm.Bio.Buket Altınok ile birlikte çalışacakları TBK 09/9 kayıt numaralı ve "Akut Myeloid Lösemide Beta Katenin Proteininin Düzenlediği Genlerin Genom Ebadında İncelenmesi ve Olası İlaç Hedeflerinin Belirlenmesi" başlıklı proje önerisi kurulumuzda değerlendirilmiş olup, tıbbi etik açıdan uygun bulunmuştur..

1. Prof.Dr. E. Rüştü Onur (Başkan) 
2. Prof.Dr. Murat Yurdakök (Üye) 
3. Prof.Dr. Osman Abbasoğlu(Üye) 
4. Prof.Dr. Mithat Haliloğlu (Üye) 
5. Prof.Dr. Türkan Eldem (Üye) 
6. Prof.Dr. Pınar Fırat (Üye) 
7. Prof.Dr. Erdem Aydın (Üye) 
8. Prof.Dr. H. Asuman Özkara (Üye) 
9. Prof.Dr. Tanju Besler (Üye) KATILMAMIŞ
10. Prof.Dr. Haydar A. Demirel(Üye) 
11. Prof.Dr. Bülent Sivri (Üye) KATILMAMIŞ
12. Prof. Dr. Zafer Çehrelî (Üye) 
13. Doç.Dr. Bilgehan Yalçın (Üye) 
14. Doç.Dr. Ümit Yaşar (Üye) 
15. Doç.Dr.Mutlu Hayran (Üye) 

**EK-4**

Gen ID	Clusters								Genel Toplam
	Annotation Cluster 1 Enrichment Score:10.79	Annotation Cluster 2 Enrichment Score: 3.16	Annotation Cluster 3 Enrichment Score: 2.96	Annotation Cluster 4 Enrichment Score: 0.97	Annotation Cluster 5 Enrichment Score: 0.95	Annotation Cluster 6 Enrichment Score: 0.55	Annotation Cluster 7 Enrichment Score: 0.37	Annotation Cluster 8 Enrichment Score: 0.05	
1553047_AT					0,95		0,37		2
1553048_A_AT					0,95		0,37		2
1553387_AT					0,95				1
1554499_S_AT	10,79								1
1554534_AT			2,96						1
1554536_AT			2,96						1
1554631_AT					0,95				1
1554719_AT	10,79								1
1554847_AT	10,79								1
1554855_AT	10,79								1
1555057_AT	10,79								1
1555114_AT	10,79								1
1555353_AT	10,79								1
1555504_AT						0,55			1
1555505_A_AT						0,55			1
1555548_AT	10,79								1
1555612_S_AT					0,95				1
1555668_A_AT	10,79								1
1555834_AT	10,79								1
1556284_AT	10,79								1
1556285_S_AT	10,79								1
1558346_AT	10,79								1
1559203_S_AT					0,95	0,55	0,37		4
1559204_X_AT					0,95	0,55	0,37		3
1559206_AT	10,79				0,95				2
1559496_AT	10,79								1
1560317_S_AT	10,79								1
1560974_S_AT	10,79					0,55	0,37		3
1561009_AT		3,16							1
1561010_A_AT		3,16							1
1562028_AT					0,95				1
1562031_AT					0,95				1
1565731_AT		3,16							1
1567440_AT	10,79				0,95				2
1567443_X_AT	10,79				0,95				2
1568629_S_AT					0,95		0,37	0,05	3
1568943_AT					0,95		0,37		2
1569042_AT	10,79								1
1569748_AT					0,95		0,37		2
1569891_AT	10,79								1
1570352_AT					0,95				1
1861_AT	10,79				0,95		0,37		3
200081_S_AT					0,95		0,37		2
200086_S_AT	10,79								1
200096_S_AT	10,79								1
200622_X_AT	10,79				0,95	0,55	0,37		4
200623_S_AT	10,79				0,95	0,55	0,37		4
200635_S_AT					0,95				1
200636_S_AT					0,95				1
200637_S_AT					0,95				1
200653_S_AT					0,95	0,55	0,37		3
200655_S_AT	10,79				0,95	0,55	0,37		4
200744_S_AT					0,95				1
200745_S_AT					0,95				1
200746_S_AT					0,95				1
200770_S_AT					0,95				1
200771_AT					0,95				1
200784_S_AT	10,79								1
200785_S_AT	10,79								1
200925_AT	10,79								1
200954_AT	10,79								1
201030_X_AT			2,96						1
201080_AT					0,95		0,37		2
201081_S_AT					0,95		0,37		2
201089_AT	10,79								1
201134_X_AT	10,79								1



201135 AT			2,96							1
201171 AT	10,79									1
201172 X AT	10,79									1
201187 S AT	10,79					0,55	0,37			3
201188 S AT	10,79					0,55	0,37			3
201189 S AT	10,79					0,55	0,37			3
201254 X AT				0,95			0,37			2
201272 AT			0,97							1
201322 AT	10,79									1
201387 S AT	10,79									1
201441 AT	10,79									1
201469 S AT				0,95						1
201502 S AT				0,95				0,05		5
201527 AT	10,79									1
201700 AT				0,95						1
201740 AT	10,79									1
201746 AT	10,79			0,95						2
201757 AT	10,79									1
201833 AT	10,79			0,95						2
201903 AT	10,79									2
201966 AT	10,79									1
201971 S AT	10,79									1
201972 AT	10,79									1
202043 S AT			2,96							1
202053 S AT			2,96	0,97						2
202054 S AT			2,96	0,97						2
202110 AT	10,79									1
202178 AT				0,95			0,37			2
202233 S AT	10,79									1
202282 AT	10,79									1
202389 S AT	10,79									1
202390 S AT	10,79									1
202502 AT			2,96							1
202530 AT				0,95	0,55	0,37	0,05			6
202605 AT			0,97							1
202647 S AT				0,95	0,55	0,37				3
202698 X AT	10,79									1
202847 AT				0,95						1
202934 AT				0,95			0,37			2
202941 AT	10,79									1
202959 AT			2,96							1
202960 S AT			2,96							1
203032 S AT				0,95						1
203033 X AT				0,95						1
203331 S AT				0,95			0,37			2
203332 S AT				0,95			0,37			2
203460 S AT	10,79			0,95						2
203606 AT	10,79									1
203617 X AT				0,95	0,55					2
203621 AT	10,79									1
203625 X AT				0,95						1
203626 S AT				0,95						1
203663 S AT	10,79									1
203692 S AT				0,95						1
203693 S AT				0,95						1
203817 AT					0,55	0,37				2
203880 AT	10,79									1
203928 X AT	10,79									1
203929 S AT	10,79									1
203930 S AT	10,79									1
204009 S AT				0,95	0,55	0,37				3
204010 S AT				0,95	0,55	0,37				3
204046 AT	10,79			0,95	0,55	0,37				4
204053 X AT				0,95		0,37				2
204054 AT				0,95		0,37				2
204115 AT				0,95						1
204130 AT				0,95		0,37				2
204158 S AT	10,79									1
204413 AT				0,95		0,37	0,05			3
204646 AT			2,96							1
204762 S AT					0,55					1
204763 S AT					0,55					1

204859 S AT	10,79				0,95		0,37		3
204894 S AT			2,96						1
205095 S AT	10,79								1
205172 X AT	10,79								1
205222 AT			2,96						1
205293 X AT					0,95				1
205294 AT					0,95				1
205425 AT	10,79								1
205426 S AT	10,79								1
205473 AT	10,79								1
205480 S AT				0,97					1
205570 AT					0,95				1
205577 AT					0,95				1
205581 S AT					0,95	0,55	0,37		3
205623 AT		3,16							1
205640 AT		3,16							1
205704 S AT	10,79								1
205711 X AT	10,79								1
205765 AT		1							3
205858 AT					0,95				1
205939 AT		3,16							1
205998 X AT		3,16							1
205999 X AT		3,16							1
206284 X AT	10,79								1
206311 S AT		3,16			0,95	0,55	0,37		4
206353 AT	10,79								1
206369 S AT					0,95		0,37	0,05	3
206370 AT					0,95		0,37	0,05	3
206401 S AT	10,79								1
206444 AT						0,55			1
206492 AT					0,95		0,37		2
206505 AT		3,16		0,97					3
206630 AT						0,55			1
206687 S AT					0,95		0,37		2
206755 AT		3,16							1
206790 S AT	10,79								1
206927 S AT						0,55			1
206952 AT					0,95				1
207058 S AT	10,79								1
207064 S AT			2,96						1
207105 S AT					0,95		0,37	0,05	3
207143 AT					0,95		0,37		2
207157 S AT					0,95				1
207166 AT					0,95				1
207243 S AT	10,79				0,95	0,55	0,37		4
207309 AT	10,79					0,55	0,37		3
207310 S AT	10,79					0,55	0,37		3
207328 AT		3,16							1
207391 S AT					0,95		0,37		2
207507 S AT	10,79								1
207508 AT	10,79								1
207573 X AT	10,79								1
207608 X AT		3,16							1
207609 S AT		3,16							1
207782 S AT	10,79				0,95				2
207832 AT					0,95				1
207892 AT					0,95				1
207957 S AT					0,95	0,55	0,37		3
207958 AT		3,16		0,97					2
208126 S AT		3,16							1
208147 S AT		3,16							1
208315 X AT					0,95		0,37	0,05	4
208367 X AT		3,16							2
208478 S AT	10,79				0,95		0,37		3
208629 S AT			2,96						1
208630 AT			2,96						2
208631 S AT			2,96						2
208714 AT	10,79								1
208737 AT	10,79								1
208745 AT	10,79								1
208746 X AT	10,79								1
208847 S AT		3,16							1



215912 AT						0,55	0,37		2
216058 S AT		3,16							1
216687 X AT		3,16		0,97					2
217048 AT					0,95		0,37		2
217133 X AT		3,16							1
217175 AT		3,16		0,97					2
217398 X AT	10,79								1
217451 AT	10,79								1
217491 X AT	10,79								1
217603 AT	10,79								1
217773 S AT	10,79								1
217848 S AT	10,79								1
217874 AT			2,96						1
218101 S AT	10,79								1
218160 AT	10,79								1
218563 AT	10,79								1
218869 AT			2,96						1
219511 S AT	10,79								1
219547 AT	10,79			0,97					2
219903 S AT		3,16							1
220197 AT	10,79								1
220566 AT					0,95		0,37		2
220741 S AT	10,79								1
221550 AT	10,79			0,97					2
221571 AT					0,95		0,37	0,05	4
221996 S AT	10,79								1
222005 S AT					0,95				1
222176 AT					0,95		0,37		2
222305 AT					0,95		0,37		2
222521 X AT	10,79								1
222992 S AT	10,79								1
223049 AT					0,95	0,55	0,37		3
223281 S AT	10,79			0,97					2
223487 X AT					0,95				1
223488 S AT					0,95				1
223613 AT	10,79								1
224344 AT	10,79								1
224347 X AT	10,79								1
224847 AT					0,95		0,37		2
224848 AT					0,95		0,37		2
224851 AT					0,95		0,37		2
224985 AT					0,95	0,55	0,37		3
225209 S AT	10,79								1
225363 AT					0,95		0,37		2
225379 AT	10,79								1
225710 AT					0,95				1
226364 AT	10,79								1
226704 AT	10,79								1
227469 AT					0,95		0,37		2
227645 AT					0,95		0,37	0,05	3
227795 AT	10,79								1
227817 AT					0,95	0,55	0,37		3
227824 AT					0,95	0,55	0,37		3
228006 AT					0,95		0,37		2
228168 AT	10,79								1
228366 AT	10,79								1
228388 AT					0,95		0,37		2
228572 AT					0,95	0,55	0,37		3
228795 AT					0,95	0,55	0,37		3
229093 AT					0,95	0,55	0,37		3
229392 S AT					0,95		0,37	0,05	3
229415 AT	10,79				0,95		0,37		3
229426 AT	10,79								1
230437 S AT					0,95	0,55	0,37		3
231198 AT					0,95		0,37		2
231699 AT					0,95		0,37	0,05	6
231704 AT		3,16							1
232180 AT				0,97					1
232660 AT	10,79				0,95		0,37		3
233254 X AT					0,95		0,37		2
233314 AT					0,95		0,37		2
233545 AT					0,95		0,37		2

234876 AT	10,79									1
235139 AT					0,95					1
235255 AT	10,79									1
235287 AT					0,95		0,37			2
237833 S AT	10,79									1
237834 AT	10,79									1
238056 AT	10,79									1
238765 AT	10,79									1
239132 AT	10,79					0,55	0,37			3
240911 AT	10,79					0,55	0,37			3
241619 AT	10,79				0,95	0,55	0,37			4
242141 AT	10,79				0,95		0,37			3
242622 X AT					0,95		0,37			2
243000 AT					0,95		0,37			2
243015 AT		3,16								1
243609 AT		3,16								1
243630 AT	10,79									1
244546 AT	10,79				0,95		0,37			3
36994 AT	10,79									1
1568629 S AT					0,95					1
201746 AT					0,95		0,37			2
202941 AT	10,79									1
206369 S AT							0,37			1
206687 S AT					0,95		0,37			2
209134 S AT					0,95		0,37			2
209563 X AT	10,79				0,95	0,55	0,37			4
210544 S AT			2,96	0,97						2
211833 S AT					0,95		0,37			2
214235 AT		3,16								1
215075 S AT					0,95		0,37			2
215772 X AT			2,96							1
220566 AT							0,37	0,05		2
223699 AT			2,96							1
227824 AT					0,95	0,55	0,37			3
228388 AT								0,05		3
230125 AT				0,97						1
233254 X AT					0,95		0,37			2
Genel Toplam	170	40	28	16	176	63	132	45		670



203032 S_AT									
203033 X_AT									
203625 X_AT									
203626 S_AT									
204859 S_AT			1						
206311 S_AT									
206492 AT									
206687 S_AT				1					
208315 X_AT									
210145 AT									
210867 S_AT									
211853 X_AT			1						
211854 S_AT			1						
214170 X_AT									
221571 AT									
242141 AT						1			
201746 AT						1			
206687 S_AT									
209563 X_AT									
1553047 AT									
1553048 A_AT									
1553387 AT			1						
1554631 AT			1						
1555612 S_AT									
1559206 AT									
1567440 AT									
1567443 X_AT									
1570352 AT			1						
200081 S_AT									
200635 S_AT									
200636 S_AT									
200637 S_AT									
200744 S_AT						1			
200745 S_AT						1			
200746 S_AT						1			
201080 AT									
201081 S_AT									
201254 X_AT									
202847 AT									
202934 AT									
203460 S_AT									
204046 AT						1			
204115 AT						1			
204130 AT		1							
205293 X_AT									
205294 AT									
205570 AT									
205577 AT									
205581 S_AT									
205858 AT									
206952 AT									
207157 S_AT						1			
207166 AT						1			
207391 S_AT									
207782 S_AT									
207832 AT									
207892 AT									
209195 S_AT						1			
209320 AT						1			
209321 S_AT						1			
209502 S_AT									
209563 X_AT									
210256 S_AT									
210388 AT						1			
210858 X_AT			1						
211205 X_AT									
211833 S_AT									
212672 AT			1						
212829 AT									
213384 X_AT						1			
214621 AT									
215066 AT									
222005 S_AT						1			
222305 AT									
223487 X_AT						1			
223488 S_AT						1			
225710 AT						1			
229093 AT									
235139 AT						1			
1568629 S_AT									
209134 S_AT									
Genel Toplam	21	19	29	35	53	40	26	36	34





203032 S_AT										
203033 X_AT										
203625 X_AT										
203626 S_AT										
204859 S_AT										
206311 S_AT	1									
206492 AT										
206687 S_AT										1
208315 X_AT										
210145 AT	1									
210567 S_AT										
211553 X_AT										
211554 S_AT										
214170 X_AT										
221571 AT										
242141 AT										
201746 AT										
206687 S_AT										
209563 X_AT										
1553047 AT										
1553048 A_AT										
1553387 AT										
1554631 AT										
1555612 S_AT										
1559206 AT										
1567440 AT										
1567443 X_AT										
1570352 AT										
200081 S_AT										
200635 S_AT										
200636 S_AT										
200637 S_AT										
200744 S_AT										
200745 S_AT										
200746 S_AT										
201080 AT										
201081 S_AT										
201254 X_AT										
202847 AT										
202934 AT										
203460 S_AT										
204046 AT										
204115 AT										
204130 AT										
205293 X_AT										
205294 AT										
205570 AT										
205577 AT										
205581 S_AT										
205858 AT										
206952 AT										
207157 S_AT										
207166 AT										
207391 S_AT										
207782 S_AT										
207832 AT										
207892 AT										
209195 S_AT										
209320 AT										
209321 S_AT										
209502 S_AT										
209563 X_AT										
210256 S_AT										
210388 AT										
210858 X_AT										
211205 X_AT										
211833 S_AT										
212672 AT										
212829 AT										
213384 X_AT										
214621 AT										
215066 AT										
222005 S_AT										
222305 AT										
223487 X_AT										
223488 S_AT										
225710 AT										
229093 AT										
235139 AT										
1568629 S_AT										
209134 S_AT										
Genel Toplam	33	40	57	57	14	38	27	54	38	

	Yolaklar									
prob id	Pancreatic cancer	Pathways cancer	In	Prostate cancer	Regulation of actin cytoskeleton	Renal cell carcinoma	Small cell lung cancer	T cell receptor signaling pathway	VEGF signaling pathway	Genel Toplam
206369 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	26
206370 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	26
207105 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	26
220566 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	26
227645 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	26
229392 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	26
1568629 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	25
1559203 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22
1559204 X_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22
204009 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22
204010 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22
214352 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	22
202647 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	19
223049 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	19
224985 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	19
228572 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	19
215075 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	16
1861 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	15
209364 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	15
232660 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	15
211300 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12
207957 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	11
209239 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	11
209685 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	11
209945 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	11
227817 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	11
228795 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	11
230437 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	11
201746 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	10
201502 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9
231699 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9
201469 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8
203692 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8
203693 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8
214853 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8
217048 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8
227824 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	8
204053 X_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7
204054 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7
207143 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7
211711 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7
222176 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7
224847 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7
224848 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7
224851 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7
225363 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7
227469 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7
228006 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7
231198 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7
233314 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7
235287 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7
242622 X_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7
243000 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	7
209112 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5
202530 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4
203617 X_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4
208478 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4
208905 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4
210376 X_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4
210449 X_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4
210850 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4
211087 X_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4
211561 X_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4
214062 X_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4
214448 X_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4
228388 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4
229415 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4
244546 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4
233254 X_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	4
1568943 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
200622 X_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
200623 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
200653 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
200655 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
200770 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
200771 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
203331 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
203332 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
204413 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
207243 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
211984 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
211985 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
213688 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
227824 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
233254 X_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
233545 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
241619 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
211833 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
215075 S_AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3
1562028 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
1562031 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
1569748 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
201700 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
201833 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
202176 AT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2

203032 S_AT		1								2
203033 X_AT		1								2
203625 X_AT		1								2
203626 S_AT		1								2
204859 S_AT		1								2
206311 S_AT									1	2
206492 AT										2
206687 S_AT										2
208315 X_AT		1								2
210145 AT										2
210567 S_AT		1								2
211553 X_AT										2
211554 S_AT										2
214170 X_AT		1								2
221571 AT		1								2
242141 AT		1								2
201746 AT										2
206687 S_AT	1									2
206687 X_AT								1		2
209563 X_AT										2
1553047 AT				1						1
1553048 A_AT				1						1
1553387 AT										1
1554631 AT										1
1555612 S_AT										1
1559206 AT										1
1567440 AT										1
1567443 X_AT										1
1570352 AT										1
200081 S_AT										1
200635 S_AT										1
200636 S_AT										1
200637 S_AT										1
200744 S_AT										1
200745 S_AT										1
200746 S_AT										1
201080 AT				1						1
201081 S_AT				1						1
201254 X_AT										1
202847 AT										1
202934 AT										1
203460 S_AT										1
204046 AT										1
204115 AT										1
204130 AT										1
205293 X_AT				1						1
205294 AT				1						1
205570 AT				1						1
205577 AT				1						1
205581 S_AT									1	1
205858 AT										1
206952 AT										1
207157 S_AT										1
207166 AT										1
207391 S_AT				1						1
207782 S_AT				1						1
207832 AT				1						1
207892 AT								1		1
209195 S_AT										1
209320 AT										1
209321 S_AT										1
209502 S_AT				1						1
209563 X_AT				1						1
210256 S_AT				1						1
210388 AT										1
210858 X_AT				1						1
211205 X_AT				1						1
211833 S_AT										1
212672 AT										1
212829 AT				1						1
213384 X_AT										1
214621 AT										1
215066 AT										1
222005 S_AT										1
222305 AT										1
223487 X_AT										1
223488 S_AT										1
225710 AT										1
229093 AT									1	1
235139 AT										1
1568629 S_AT				1						1
209134 S_AT										1
Genel Toplam	27	70	39	27	20	47	30	31		942

## ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Tülin ÖZKAN  
Doğum Yeri : Ankara  
Doğum Tarihi : 04.03.1979  
Medeni Hali : Bekar  
Yabancı Dili : İngilizce  
Adres : Birlik mah. 59.sok.180/2 Çankaya/Ankara  
E-mail : [tlnozkan@yahoo.com](mailto:tlnozkan@yahoo.com)

## EĞİTİM:

2003-2005 Yüksek Lisans  
Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

1998-2002 Lisans  
Ankara Üniversitesi  
Fen Fakültesi  
Biyoloji Bölümü

1994-1997 Lise  
Ayrancı Süper Lisesi

## Yayınlar:

Koc A, Ozkan T, Karabay AZ, Sunguroglu A, Aktan F. Effect of L-carnitine on the synthesis of nitric oxide in RAW 264.7 murine macrophage cell line. Cell Biochem Funct. 2011 Oct 19. doi: 10.1002/cbf.1807.

Aydos O.S, Avcı A, Ozkan T, Karadag A, Gurleyik E, Altınok B, Sunguroglu A. Antiproliferative, Apoptotic and Antioxidant Activities of Wheatgrass (Triticum aestivum L) Extract on CML (K562) Cell Line, Turk J Med Sci (doi:10.3906/sag-0912-425), 2011.

Arzu Z. Karabay, Aslı Koç, Tülin Özkan, Zeliha Büyükbingöl, Asuman Sunguroğlu, Fügen Aktan. Effect of taurine on hydrogen peroxide production in lipopolysaccharide induced RAW 264.7 macrophage cells. FABAD J. Pharm. Sci., 33, 187-192, 2008.

## Kongrelere sunulan bildiriler:

### Uluslararası Bildiri-Poster

Ozkan T, Koc A, Karabay A.Z., Sunguroglu A, Buyukbingol Z, Aktan F. Different expression pattern of akirin-2 in K562r and K562s cell lines. EMBO Conference Series. Intracellular RNA localization and localized translation, Barga, Italy, August 7-12 2011.

Karabay A.Z., Ozkan T, Koc A, Sunguroglu A, Aktan F, Buyukbingol Z. Effect of carnosine on nitrite production in LPS-activated RAW 264.7 macrophages. EMBO Conference Series. Intracellular RNA localization and localized translation, Barga, Italy, August 7-12 2011.

Sureyya Bozkurt, Tulin Ozkan, Emin Kansu, Asuman Sunguroglu. Epigenetic Regulation of Bim and Bid Proapoptotic Genes by Polycomb Group Proteins in Imatinib Mesylate Resistant and Non-Resistant Chronic Myeloid Leukemia Cell Lines. 36 th FEBS Congress - "Biochemistry for Tomorrow's Medicine" Torino, Italy - June 25-30, 2011

Ozturk G.; Altinok B.; Ozkan T. Yukselen, I; Ilgaz, S; Karadag, A ; Ozsoy, N; Sunguroglu, A. Detection of NPM1 gene mutations in AML patients in Turkish population. 36th FEBS Congress of the Biochemistry for Tomorrows Medicine Location: Torino, ITALY Date: JUN 25-30, 2011

Caliskan, E; Altinok, B; Ozkan, T ; Taspinar, M; Ilgaz, S; Ugur, HC; Akpinar, P; Sunguroglu, A. Expression of nucleostemin in glioblastoma multiforme tumor cells and its effect on the diagnosis and prognosis. 36th FEBS Congress of the Biochemistry for Tomorrows Medicine Location: Torino, ITALY Date: JUN 25-30, 2011

Aydos, S ; Avci, A; Durak, I; Ozkan, T; Altinok, B; Karadag, A; Sunguroglu, A. Effect of *Urtica dioica* on proliferation of HCT-116 colon cancer cell line. 59th International Congress and Annual Meeting of the Society-for-Medicinal-Plant-and-Natural-Product-Research Location: Antalya, TURKEY Date: SEP 04-09, 2011

Aydos S, Ozkan T, Karabay AZ, Koc A, Karadag A, Altinok B, Sunguroglu A. Wheatgrass juice reduces nitric oxide production in LPS induced raw 264.7 cells. IUBMB Life, 2009;61:3:376

Koc A, Karabay AZ, Ozkan T, Karadag A, Sunguroglu A, Aktan F, Buyukbingol Z. Effect of L-carnitine on NO production in lipopolysaccharide induced RAW 264.7 cells. IUBMB Life, 2009;61:3:376

Arzu Zeynep Karabay, Asli Akinci, Tulin Ozkan, Asuman Sunguroglu, Fugen Aktan, Zeliha Buyukbingol. Effect of methylsulfonylmethane on proliferation and nitric oxide production in LPS activated RAW 264.7 cells 34th FEBS Congress. Life's Molecular Interactions. July 4 - 9, 2009, Prague, Czech Republic. FEBS JOURNAL Volume: 276 Pages: 316-316 JUL 2009

Tulin Ozkan, Filiz Bakar, Arzu Zeynep Karabay, Asli Akinci, Buket Altinok, Aynur Karadag, Sena Aydos, Asuman Sunguroglu. Wheatgrass extract effects lipid peroxidation levels in human promyelocytic leukemia cell line HL-60 34th FEBS Congress. Life's Molecular Interactions. July 4 - 9, 2009, Prague, Czech Republic. FEBS JOURNAL Volume: 276 Pages: 334-334 JUL 2009

Asli Akinci, Arzu Karabay, Tulin Özkan, Asuman Sunguroglu, Fugen Aktan. The effect of LPS incubation periods on nitric oxide levels in RAW 264.7 macrophage cell line 34th FEBS Congress. Life's Molecular Interactions. July 4 - 9, 2009, Prague, Czech Republic. FEBS JOURNAL Volume: 276 Pages: 297-297 JUL 2009

Altinok B , Ozkan T, Karadag A, Aydos S, Biyikli Z, Sunguroglu A. Apoptotic effect of wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) extract on Baf3p210 and Baf3p210-T315I leukemia cell lines. 7. Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF. 03-08 August 2008 Athens, Greece. *PLANTA MEDICA* 74:9 970-970 JUL 2008

Avcı A, Gurleyik E, Ozkan T, Altinok B , Karadag A., Aydos S, Sunguroglu A.. Effect of wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) on oxidant/antioxidant status in Baf 3p210 and T315i cell lines. 03-08 August 2008 7. Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF. Athens, Greece. *PLANTA MEDICA* 74:9 1010-1010 JUL 2008

Aydos S, Altinok B, Ozkan T, Yukselen I, Çalışkan E, Gokçe I, Oztuna D, Baltacı S, Sunguroglu A. The methylation Analysis of DAP Kinase (DAPK1) gene in Prostate Cancer Patients. Mediterranean Medical Genetics Meeting, 28 June- 01 July 2009, Ankara

Aydos S, Taspınar M, Ozkan T, Şakırağaoğlu O, Ilgaz S, Gokçe I, Baltacı S, Sunguroglu A. PON1 192Q/R Polymorphism and Prostate Cancer. Mediterranean Medical Genetics Meeting, 28 June- 01 July 2009, Ankara

Ozkan T, Altinok B, Karadag A, Aydos S, Biyikli Z, Sunguroglu A. Antiproliferative and Apoptotic Effects Of Wheatgrass Extract on Chronic Myeloid Leukemia Cell Lines with Imatinib-Resistant. XX International Congress of Genetics, Berlin, Germany, 12-17 July 2008

Özkan T, Karabay ZA, Koç A, Karadag A, Aydos S, Çalışkan E, Öztürk G, Ilgaz SN, Yukselen I, Sunguroglu A. Wheatgrass extract increases proliferation of RAW 264.7 macrophages induced by hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) or lipopolysaccharide (LPS) International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Geneva(CICG) 16-20 August 2009.

Karabay ZA ,Özkan T , Koç A, Büyükbingöl Z, Sunguroglu A. Effects of MSM (methylsulfonylmethane) on SNP (sodium nitroprusside) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (hydrogen peroxide) induced RAW 264.7 macrophages International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Geneva(CICG) 16-20 August 2009.