

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**AKUT MYELOİD LÖSEMİDE WNT SİNYAL YOLAĞINDAKİ GENLERİN DNA
MİKROARRAY ANALİZİ İLE TANIMLANMASI**

Buket ALTINOK

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

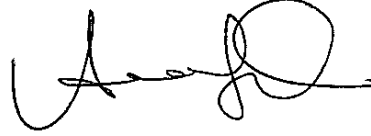
**ANKARA
2011**

Prof. Dr. Asuman SUNGURUŐLU danışmanlığında, Buket ALTINOK tarafından hazırlanan bu çalışma 08/04/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

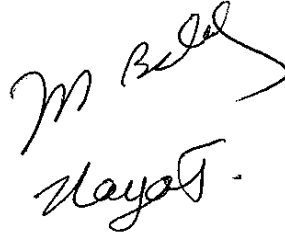
Başkan: Prof. Dr. Nurten AKARSU



Üye : Prof. Dr. Asuman SUNGURUŐLU

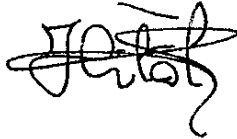


Üye : Prof. Dr. Meral BEKSAÇ



Üye : Prof. Dr. Hayat ERDEM

Üye : Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ



ÖZET

Akut Miyeloid Lösemide Wnt sinyal yolağındaki genlerin DNA Mikroarray Analizi ile tanımlanması

Akut Miyeloid Lösemi, erken hematopoetik kök hücrelerde bir dizi genetik değişiklik sonucunda normal hematopoetik büyüme ve farklılaşmanın bozularak, kemik iliği ve periferik kanda çok sayıda anormal olgunlaşmamış miyeloid hücrenin birikimi ile karakterize olan bir hastalıktır. Kendilerini yenileyebilme özelliğine sahip normal kök hücreler, sinyal ileti yolağına ait genlerdeki mutasyonlar, epigenetik ya da gen ifade düzeyindeki değişiklikler sonucunda neoplastik transformasyona uğrayabilmektedirler. Bu konuda özellikle embriyonel dönemde ve çeşitli kanser türlerinde aktif olan Wnt/ β -katenin yolağı, son yıllarda üzerinde durulan oldukça ilgi çekici bir konudur.

Wnt yolağına anahtar elemanı olan beta katenin gen ifade seviyeleri ile ilgili olarak literatürde sıklıkla çalışmalar yapılmıştır. Birbiri ile uyumlu olarak yapılan bu çalışmalarda, AML hasta gruplarında beta katenin gen ifade oranları arasında ciddi farklılıklar tespit edilmiştir. Buradan yola çıkılarak bu tez çalışmasında öncelikle AML hastalarından elde edilen CD34+ hematopoetik kök hücrelerde, beta katenin gen ifade profillerinin qRT-PCR yöntemi ile tayin edilmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın devamında, DNA mikroarray analizi ile önceden tespit edilmiş beta katenin gen ifade oranlarına göre gruplandırılan AML hasta örnekleri arasındaki genlerin karşılaştırılması planlanmıştır. Bu şekilde belirlenecek olan gen grubu ile sağlıklı kontrol grubundaki genler birleştirildiğinde AML hastalarında beta katenin ile ilişkili genlerin ortaya çıkarılması ve bu yolak hakkında detaylı bilgi oluşturulması hedeflenmiştir.

Buna göre bu çalışmada 19 AML ve 3 sağlıklı bireyin izole edilmiş olan CD34+ hematopoetik kök hücrelerinde eş zamanlı PCR ile mRNA seviyesi tespiti, hasta örnekleri arasında beta katenin seviyelerinin değiştiğini göstermiştir. Bu sonuçlara göre incelenen örnekler beta katenini yüksek, düşük ve bu seviyede değişiklik tespit edilemeyen 3 gruba ayrılmıştır. Beta katenin gen ifade oranına göre 3 gruba ayrılmış olan AML örneklerinin transkriptom profilleri belirlenmiştir. Belirlenen bu transkriptom profillerinin farklı beta katenin seviyesine sahip olan AML vakalarını hem birbirinden hem de sağlıklı örneklerden net birer moleküler imza ile ayırdığı saptanmıştır. Böylelikle hücre döngüsü, kemokinler, adezyon molekülleri, hücre iskeletinin düzenlenmesi, gen ifade regülasyonu, kök hücre belirteci, migrasyon, metastaz, P53, Erb B, TGFB ve Slit-Robo yolakları beta katenin yüksek AML hasta örneklerinde ve kemokinler, adezyon molekülleri, gap junction, hücre iskeletinin düzenlenmesi, kök hücre belirteci, gen ifade regülasyonu, apoptoz, JAK-STAT, P53 ve TGFB yolakları beta katenin düşük AML hasta örneklerinde ön plana çıkmıştır.

Sonuçta bu çalışma beta katenin seviyelerine bağlı olarak temel olarak ikiye ayrılan AML vakalarında transkriptom profilini ortaya koyan ilk çalışmadır. Çalışmamızda kanser oluşumunda önemli rol oynayan beta katenin ilişkili yolakların saptanması AML moleküler biyolojisine dair önemli veriler içermenin yanısıra yeni diagnostik, prognostik ve terapötik aday moleküller ortaya koyabilecektir.

Anahtar Sözcükler: AML, Wnt sinyal yolağı, Mikroarray

ABSTRACT

Identification of Wnt signaling pathway genes in acute myeloid leukemia with DNA Microarray Analysis

Acute Myeloid Leukemia (AML) is a disease characterized with impairment of normal hematopoietic proliferation and differentiation and accumulation of abnormal immatured myeloid cells in bone marrow and periferic blood which occurs as a result of genetic changes in early hematopoietic stem cells. Capable of self-renewing normal stem cells, mutations in genes belonging to the signal transduction pathways, gene expression or epigenetic changes may come as a result of neoplastic transformation. In particular embriyonal period, and a variety of cancers, active Wnt/ β -catenin signal pathway, in recent years has been focused on a special interesting issue.

Beta catenin, which is the key element of Wnt pathway, gene expression levels in relation to the studies carried out frequently in the literature. In accordance with each other in these studies, beta catenin gene expression ratios were serious differences between AML patient groups. From here on the basis of this thesis, primarily CD34+ hematopoietic stem cells obtained from AML patients, beta-catenin gene expression profiles is to be determined by qRT-PCR method. Afterwards of the study, grouped according to beta catenin gene expression ratios of between AML patient samples which genes planned to compared with DNA microarray analysis. In this way the determined gene group in combination with the healthy control group, genes associated with beta catenin in patients with AML is revealed and the creation of the detailed information about this pathway is targeted.

According to this study, detection of the mRNA level by real-time PCR in CD34+ hematopoietic stem cells have been isolated from 19 AML and 3 healthy individuals, changed the beta-catenin levels between AML patient samples have shown. According to these results, examined samples is divided into 3 groups; high, low and changes can not be determined at this level. According to the rate of beta catenin gene expression profiles divided into 3 groups of microarray profiles of AML samples were determined. These microarray profiles, cases of AML with different level of beta-catenin both from each other as well as healthy specimens were clearly seperated by a molecular signature. In this manner cell cycle, chemokines, adhesion moleculles, regulation of cell cytoskeleton, regulation of gene expression, stem cell marker, migration, metastasis, P53, Erb B, TGFB, Slit-Robo pathways in AML patient samples with high beta catenin expression and chemokines, adhesion moleculles, gap junction, regulation of cell cytoskeleton, stem cell marker, regulation of gene expression, apoptosis, JAK-STAT, P53, TGFB pathways in AML patient samples with low beta catenin expression took over.

As a result of this study, depending on the level of beta catenin are basically divided in cases of AML is the first study to demonstrate microarray profile. In our study, detection of beta catenin related genes which is an important role in the formation of cancer will put forward an important data about the molecular biology of AML as well as new diagnostic, prognostic and therapeutic candidate molecules.

Key Words: AML, Wnt signaling pathway, Microarray

ÖNSÖZ

Öncelikle tezin oluşturulması sırasında engin bilgi ve yardımlarıyla beni başından sonuna kadar yönlendiren, bilimsel çalışmanın gereklerini üstün hoşgörü anlayışıyla bana öğreten, hiçbir zaman manevi desteğini eksik etmeyen 2. annem, değerli Hocam Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU'na,

Tez çalışmamın her aşamasında değerli katkıları ve fikirlerini paylaşan Sayın Hocam Prof. Dr. Meral BEKSAC'a ve Prof. Dr. Nilgün SAYINALP'e,

Bilimselliğini, yapıcı ve yaratıcı düşünme şekli ile davranışlarını örnek almaya çalıştığım emeklerini hiçbir zaman unutamayacağım, doktora eğitimimin başından sonuna kadar desteğini, eleştirilerini, fikirlerini ve güvenini benden esirgemediği için 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. Tülin ÖZKAN, Uzm. Bio. Aynur KARADAĞ'a, ve Tüm Tıbbi Biyoloji Ailesine,

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı Genom Bilim Ekibinden Arş. Gör. Semih DALKILIÇ'a,

Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde titizlikle ve sabırla emek veren Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı Genom Bilim Ekibinden Zeynep ÖZKESERLİ'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı 08B3330003 nolu proje olarak destekleyen Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne maddi katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Ayrıca, her adımında yanımda olan ve bana her türlü desteği vererek bu günlere gelmemi sağlayan, haklarını asla ödeyemeyeceğim sevgili annem Tevhide ALTINOK ve babam Nejat ALTINOK'a sonsuz teşekkür ve sevgilerimle...

Buket ALTINOK

Ankara, Mart 2011

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

ONAY SAYFASI.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Hematopoez.....	3
2.2. Lösemi	7
2.3. Akut Miyeloid Lösemi (AML)	8
2.4. AML'ye yönelik İleri Analizler.....	12
2.5. Wnt Sinyal İleti Yolağı.....	13
2.5.1. Wnt/ β -Katenin (Kanonik/Klasik) Yolağı	18
2.5.1.1. Wnt Reseptörleri: Fz ve LRP'ler.....	19
2.5.1.2. Dvl (Dishevelled/Dsh)	20
2.5.1.3. Axin (Conductin)	21
2.5.1.4. APC (Adenomatous Polyposis Coli)	22
2.5.1.5. GSK-3 β (Glikojen Sentez Kinaz 3 β)	23
2.5.1.6. Kazein Kinaz I (CKI)	25
2.5.1.7. Kaderinler	26
2.5.1.8. Beta-katenin (β -Katenin)	27
2.5.1.9. TCF/LEF (T Cell Factor/Lenfosit enhancer binding factor)	31
2.5.2. Wnt/Kalsiyum (Ca ⁺²) Yolağı	37
2.5.3. Wnt/Planar Hücre Polaritesi (PCP) Yolağı	38
2.6. Wnt Sinyal Yolağında rol oynayan inhibitörler	39
2.7. Wnt/ β -Katenin Sinyal Yolağının AML'deki rolü	43
3. MATERYAL VE YÖNTEM	44
3.1. ÇALIŞMA GRUBUNUN OLUŞTURULMASI.....	44

3.2. YÖNTEMLER	44
3.2.1. CD34+ Hematopoetik Kök Hücre (HKH) Seçimi ve Primer Kültürü	44
3.2.2. Flow (Akım) Sitometri (FCM) Analizi	46
3.2.3. RNA İzolasyonu	47
3.2.4. RNA Kantitasyonu	48
3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi	48
3.2.6. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time PCR)	49
3.2.7. RNA Kantitasyonu	54
3.2.8. Mikroarray Analizi	54
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	66
4.1. Flow Sitometri Sonuçları	67
4.2. RNA izolasyonu Sonuçları	68
4.3. qRT-PCR Sonuçları	69
4.4. Mikroarray Sonuçları	74
4.5. İstatistiksel Analiz	76
4.6. Kümeleme Analizi (Cluster Analysis)	77
4.7. Yolak Analizleri	88
4.8. Bulunan genler ve ilişkili olduğu Yolaklar	88
3.2.8. Mikroarray Analizi	54
3.2.8. Mikroarray Analizi	54
5.TARTIŞMA ve SONUÇ	94
KAYNAKLAR	110
EKLER	131
EK-1	131
EK-2	132
EK-3	133
EK-4	134
EK-5	135
EK-6	136
EK-7	137
EK-8	138
EK-9	144
EK-10	152
ÖZGEÇMİŞ	159

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 2.1. Hematopoetik kök hücrelerin kan yapımı süresince farklılaşması	4
Şekil 2.2. Osteoblastlar ile HKH'ler arasında Homeostazı sağlayan iletişimler	5
Şekil 2.3. Löseminin oluşum mekanizması	7
Şekil 2.4. Wnt proteininin Salınımı	14
Şekil 2.5. Wnt Sinyal İleti Yolakları	18
Şekil 2.6. Dvl proteinin yapısı	20
Şekil 2.7. Axin proteinin yapısı	21
Şekil 2.8. APC proteinin yapısı	23
Şekil 2.9. GSK-3β tarafından β-katenin fosforilasyonu.	24
Şekil 2.10. β-katenin ya da APC genindeki mutasyonlar sonucu anormal Wnt sinyal aktivasyonu.	25
Şekil 2.11. β-kateninin yapısı	28
Şekil 2.12. β-kateninin transkripsiyon ve hücre adezyonundaki rolü.....	29
Şekil 2.13. Wnt/ β-Katenin (Kanonik) Yolağı.....	35
Şekil 2.14. Wnt İnhibitörlerinin etki mekanizmaları	41
Şekil 3.1. Santrifüj sonrasında kan komponentleri	45
Şekil 3.2. CD34+ HKH İzolasyonu	46
Şekil 3.3. Tetramerik Antikor Kompleksi (TAC) Teknolojisi.....	46
Şekil 3.4. CD34+ HKH'den izole edilen RNA'ların %1'lik Agaroz Jel görüntüsü	49
Şekil 3.5. Sybr Green Yöntemi.....	53
Şekil 3.6. RNA örneğinin Biyoanalizördeki değerlendirilmesi.....	54
Şekil 3.7. Affymetrix platformunda gen ifade profillemesinin aşamaları	57
Şekil 3.8. Magnetik seperatör (Magnetic separation rack)	61
Şekil 4.1. Flow sitometri analiz sonuçları	67
Şekil 4.2. β-katenin amplifikasyon eğrisi grafiği.....	69
Şekil 4.3. Hprt amplifikasyon eğrisi grafiği	70
Şekil 4.4. β-katenin erime eğrisi	71
Şekil 4.5. Hprt erime eğrisi	71
Şekil 4.6. Sağlıklı havuza göre AML hastalarının β-katenin gen ifade oranları.....	73

Şekil 4.7.	Fragmente ürünlerin %1'lik agaroz jel görüntüleri	75
Şekil 4.8.	Tüm gruplar arasındaki Kümeleme Analizi	78
Şekil 4.9.	Beta Katenin gen ifade oranları yüksek olan AML hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubunun Kümeleme Analizi	79
Şekil 4.10.	Beta Katenin gen ifade oranları düşük olan AML hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubunun Kümeleme Analizi	80
Şekil 4.11.	Beta Katenin gen ifade oranları yüksek ve düşük AML hasta gruplarının Kümeleme Analizi	81
Şekil 4.12.	Sağlıklı kontrol grubunun içerisine beta katenin gen ifade oranları değişmeyen AML hastalarının ilave edilmesiyle elde edilen grup ile beta katenin gen ifade oranları düşük AML hasta grubunun Kümeleme Analizi	82
Şekil 4.13.	Beta Katenin gen ifade oranları düşük hasta grubunun içerisine beta katenin gen ifade oranları değişmeyen AML hastalarının ilave edilmesiyle elde edilen grup ile sağlıklı kontrol grubun Kümeleme Analizi	83
Şekil 4.14.	Sağlıklı kontrol grubunun içerisine beta katenin gen ifade oranları değişmeyen AML hastalarının ilave edilmesiyle elde edilen grup ile beta katenin gen ifade oranları yüksek AML hasta grubunun Kümeleme Analizi	84
Şekil 4.15.	Beta Katenin gen ifade oranları yüksek AML hasta grubu içerisine beta katenin gen ifade oranları değişmeyen AML hastalarının ilave edilmesiyle elde edilen grup ve sağlıklı kontrol grubunun Kümeleme Analizi	85
Şekil 4.16.	Beta Katenin gen ifade oranları düşük AML hasta grubu içerisine beta katenin gen ifade oranları değişmeyen AML hastalarının ilave edilmesiyle elde edilen grup ile beta katenin gen ifade oranları yüksek AML hasta grubunun Kümeleme Analizi	86
Şekil 4.17.	Beta Katenin gen ifade oranları yüksek AML hasta grubu içerisine beta katenin gen ifade oranları değişmeyen AML hastalarının ilave edilmesiyle elde edilen grup ile beta katenin gen ifade oranları düşük AML hasta grubunun Kümeleme Analizi	87
Şekil 5.1.	Beta Katenini etkileyen mekanizmalar	96
Şekil 5.2.	Yüksek ve Düşük beta katenin seviyeli AML hasta grupları arasında farklı ifade bulan genler ve ilişkili olduğu yolaklar	100
Şekil 5.3.	Düşük beta katenin seviyeli AML hasta grubu ve sağlıklı kontrol grubu arasında farklı ifade bulan genler ve ilişkili olduğu yolaklar	104
Şekil 5.4.	Yüksek beta katenin seviyeli AML hasta grubu ve sağlıklı kontrol grubu arasında farklı ifade bulan genler ve ilişkili olduğu yolaklar	107

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No:

Çizelge 2.1. Akut Miyeloid Lösemide FAB sınıflaması	9
Çizelge 2.2. Akut Miyeloid Lösemide WHO sınıflaması.....	10
Çizelge 2.3. Farklı kanser türlerinde Wnt Sinyal yolağında saptanan değişimler	36
Çizelge 2.4. Wnt/ β -katenin sinyal yolağını kontrol eden inhibitör moleküller ve özellikleri.....	39
Çizelge 2.5. Hematolojik Malign hastalıklarda saptanan Wnt Sinyal yolağındaki değişimler	42
Çizelge 3.1. c-DNA sentez protokolü.....	50
Çizelge 3.2. PCR protokolü.....	51
Çizelge 3.3. Eş Zamanlı (qRT-PCR) PCR protokolü.....	52
Çizelge 3.4. Poli-A RNA kontrollerinin hazırlanışı.....	57
Çizelge 3.5. Total RNA/Poli A Kontrol Mix.nin Hazırlanışı.....	58
Çizelge 3.6. First-Strand Mix.nin Hazırlanışı	58
Çizelge 3.7. Second-Strand Mix.nin Hazırlanışı.....	59
Çizelge 3.8. IVT Mix.nin Hazırlanışı.....	59
Çizelge 3.9. Önerilen IVT inkübasyon Süreleri.....	60
Çizelge 3.10. PCR Programı	60
Çizelge 3.11. aRNA binding Mix.nin Hazırlanışı.....	60
Çizelge 3.12. aRNA Fragmentasyon Mix.nin Hazırlanışı	61
Çizelge 3.13. Hibridizasyon Kokteyli	62
Çizelge 3.14. SAPE Solüsyon mix.inin hazırlanışı.....	64
Çizelge 3.15. SAPE Solüsyon mix.inin (Antibody Solüsyon mix) hazırlanışı.....	64
Çizelge 4.1. AML Hasta bilgileri	66
Çizelge 4.2. Örneklere ait RNA izolasyonu Nanodrop sonuçları	68
Çizelge 4.3. Örneklerin ortalama Cp değerleri.....	70
Çizelge 4.4. Örneklerin gen ifade değişikliği oranlarının log2 tabanına göre karşılıkları.....	72
Çizelge 4.5. Elde edilen c-RNA Nanodrop sonuçları	74
Çizelge 4.6. % Present değerleri	76
Çizelge 4.7. Beta katenin ifade düzeyleri yüksek ve düşük AML hasta grupları arasında farklı ifadelen genler.....	89
Çizelge 4.8. Beta katenin ifade düzeyleri düşük AML hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında farklı ifadelen genler.....	90

Çizelge 4.9. Beta katenin ifade düzeyleri yüksek AML hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında farklı ifadelen genler.....	92
---	----

SİMGELER DİZİNİ

ALL	Akut Lenfoid Lösemi
AML	Akut Miyeloid lösemi
APC	Adenomatous polyposis coli
BiP	Immunoglobulin heavy-chain-binding protein
BBF	Bromfenol mavisi
cDNA	Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
CGH	Karşılaştırmalı genom hibridizasyonu
CKIε	Kazein kinazIε
ddH ₂ O	Deiyonize su
dk	Dakika
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
Dsh/Dvl	Dishevelled
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
Epo	Eritropoietin
ECM	Ekstraselüler matrikst
FAB	French – American - British Cooperative Group
FCS	Fetal Kalf Serum
Fz	Frizzled
GO	Gen Ontolojisi
GSK-3	Glycogen synthase kinase-3
Hsp70	Heat shock protein
Hh	Hedgehog
HKH	Hematopoetik Kök Hücre
hprt	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
IL-3	Interlökin-3
IKKα	IkB kinase alpha
KEGG	The Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes
KML	Kronik Miyeloid Lösemi
K.İ	Kemik iliği
LEF	Lymphoid enhancing factor
LIMMA	Linear Models for Microarray Data

LRP5/6	Low-density lipoprotein receptor-related protein
LKH	Lösemik kök hücre
MiRNA	MikroRNA
MT1-MMP	Matriks Metalloproteinaz
MM	Multiple Myeloma
mg	Miligram
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
ng	Nanogram
°C	Santigrat derece
OST	Oligosakkaril-transferaz kompleksi
PAR1	Protease-activated receptor-1
PBS	Phosphate Buffer Solution
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PP2A	Protein fosfataz 2A
PTEN	Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten
PTPaz	Protein tirozin fosfataz
RGS	Regulator of G protein signaling
RNA	Ribonükleik asit
RTK	Reseptör tirozin kinaz
SCF	Stem cell factor
SNP	Single nucleotid polymorphism
sFRP	Secreted frizzled-related protein
TAC	Tetramerik Antikor Kompleksi
TCF	T-cell factor
TPO	Trombopoietin
TGF-β	Transforming growth factor-β
UPD	Uniparental dizomi
WHO	World Health Organization
WIF-1	Wnt-inhibitory factor-1
Wnt	Wingless-type MMTV integration site family member
β-TRCP	β-transducin repeat containing protein

1. GİRİŞ

Akut Miyeloid Lösemi (AML), bir hematopoetik (kan yapan) kök hücre bozukluğudur. Hematopoez sürecinde olgun kan hücrelerine farklılaşan miyeloid kökenli öncü kan hücrelerinin, farklılaşma yeteneklerini kaybederek klonal çoğalan neoplastik hücrelere dönüşümleri ile karakterize olan bir hastalıktır (Shipley ve Butera 2009).

Bugün kök hücre çalışmalarının kanser araştırmalarını yakından aydınlattığı bilinmekte olup, kök hücrelerle kanser hücreleri arasında birçok benzerlik ortaya çıkarılmıştır. İlk kez Dick vd (1997) tarafından kanser kök hücreleri akut miyeloid lösemide tanımlanmış (Bonnet vd 1997, Hope vd 2004,) ve daha sonra da çeşitli çalışmalarda kanser kök hücrelerinin solid tümörlerin beyin (Yuan vd 2004), (Singh vd 2004), göğüs (Al-Hajj vd 2003), ovaryum (Bapat vd 2005) gelişimiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Kendini yenileyebilme özelliğine sahip normal kök hücreler, sinyal ileti yolağına ait genlerdeki mutasyonlar, epigenetik ya da gen ifade düzeyindeki değişiklikler sonucunda neoplastik transformasyona uğrayabilmektedirler. Bu konuda özellikle embriyonel dönemde ve çeşitli kanser türlerinde aktif olan Wnt sinyal ileti yolağı, son yıllarda üzerinde durulan oldukça ilgi çekici bir konudur. Temel olarak 3 farklı Wnt sinyal yolağı tanımlanmıştır ve bunlardan kanser gelişiminde rol oynayan tip Wnt/ β -katenin yolağıdır. Bu yolağın anlaşılmasında merkezi rolü β -katenin oynar. β -katenin sitoplazmada bulunur, Wnt sinyal aktivasyonu ile çekirdeğe taşınır (Ilyas 2005). Böylelikle hücre proliferasyonunu düzenleyen ve gelişimi kontrol eden çok sayıda genin transkripsiyonunu aktive eder. Bu genlerin çoğu bilinen onkogenler olup kanser tedavisinde güçlü birer hedeftirler (Lustig vd 2003).

Son yıllarda Wnt/ β -katenin yolağını hedefleyen çalışmalar çok geniş kapsamlı olarak literatürde yer almaktadır. Çeşitli kanser türlerinde, Wnt sinyal yolağındaki yeni hedef genlerin belirlenebilmesi için, genom ebadında çalışmalar yapılmıştır. Ancak şimdiye kadar sınırlı sayıda aday gen belirlenmiştir (Wend 2010). Bu yolaktaki yeni gen profillerinin belirlenmesi, AML tedavisinde yeni moleküler hedeflerin seçilmesini sağlayacağı düşünülmektedir.

Yapılan çalışmalarda gösterildiği üzere beta katenin miktarının yüksek olması Wnt varlığıyla ilişkili bir durumdur (Nygren vd 2006, Ysebaert vd 2006). Wnt, etkisini beta katenin üzerinden gösterebilmektedir. Ancak son zamanlarda yapılan kanser araştırmalarında beta katenin düzeylerini Wnt sinyalinden bağımsız olarak artıran birçok faktör bulunduğu belirtilmiştir (Mikesch vd 2007). Wnt sinyaline bağımlı ya da bağımsız olarak beta katenin miktarındaki artış, beta kateninin sitoplazmadaki yıkım kompleksinden ayrılarak çekirdeğe girişini indüklemekte ve Wnt sinyal yolağı tarafından düzenlenen genlerin ifadesini etkilemektedir. Wnt yolağının çekirdek içindeki ana tetik bileşeni olan beta katenin gen ifade seviyeleri ile ilgili olarak literatürde sıklıkla çalışmalar yapılmıştır ve bunların başında, Serinsöz vd (2004), Simon vd (2005), Yseabart vd (2006) yaptığı çalışmalar gelmektedir. Birbiri ile uyumlu olarak yapılan bu çalışmalarda, AML hasta gruplarında beta katenin gen ifade oranları arasında ciddi farklılıklar tespit edilmiştir.

Buradan yola çıkılarak bu tez çalışmasında öncelikle AML hastalarından elde edilen örneklerde, beta katenin gen ifade profillerinin qRT-PCR yöntemi ile tayin edilerek, beta katenin düzeylerinin AML hasta grupları arasındaki durumunun tespiti amaçlanmıştır. Çalışmanın devamında ise, ifade olan gen profillerini çıkarabilme imkanı sağlayan geniş kapsamlı bir teknoloji olan DNA mikroarray analizi ile önceden tespit edilmiş beta katenin gen ifade oranlarına göre gruplandırılan AML hasta örnekleri arasındaki genlerin karşılaştırılması planlanmıştır. Bu şekilde belirlenecek olan gen grubu ile sağlıklı kontrol grubundaki genler birleştirildiğinde AML hastalarında Wnt yolağının anahtar bileşeni olan beta katenin ile ilişkili genler ortaya çıkarılarak bu yolak hakkında detaylı bilgi oluşturulması hedeflenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Hematopoez

Hematopoez, organizmanın embriyonik ve yetişkin düzeyde kan hücresi oluşturmasını tanımlayan bir terimdir. Yetişkin kök hücre tiplerinden biri olan ve bütün kan hücre serilerine dönüşme yeteneğindeki hematopoetik kök hücrenin (HKH, hematopoietic stem cell =HSC) gelişim, kendini yenileme ve farklılaşma süreçlerini de kapsamaktadır.

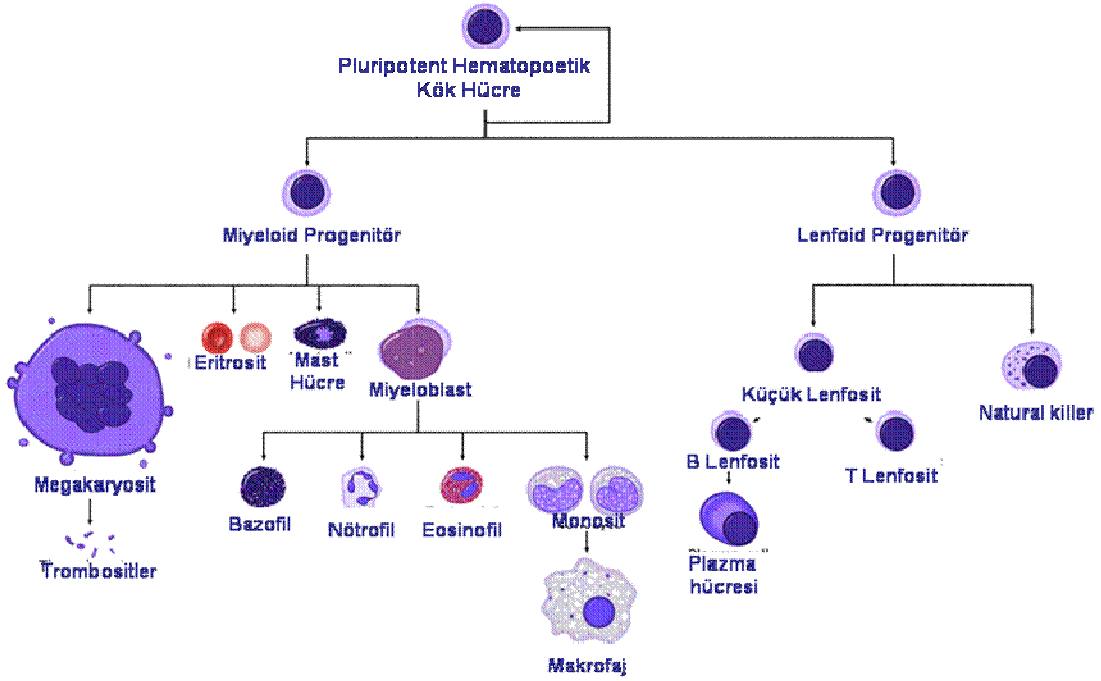
Hematopoez için gerekli elemanlar; -Hematopoetik kök hücreler,
-Mikroçevre,
-Hematopoetik büyüme faktörleridir.

Embriyogenezin en erken evrelerinde, kan hücreleri Vitellus kesesi mezoderminden gelişmektedir. Bir süre sonra karaciğer ve dalak geçici hematopoetik dokular olarak görev yapar. Kemik iliği ise ancak 7. aydan sonra hematopoezin gerçekleştiği primer doku olarak görülür ve tüm erişkin hayatı boyunca aynı şekilde devam eder.

Kemik iliği 3 hücre popülasyonu içerir; -Kendi kendini yenileme kapasitesine sahip **HKH**,
-Farklı hücre serilerinin farklılaşmasını sağlayan **progenitör hücreler**,
-Progenitör hücrelerden farklılaşan **olgunlaşan hücreler**.

Kemik iliğindeki hematopoetik kök hücreler, en iyi tanımlanmış erişkin kök hücreleridir. Bu hücrelerin en önemli belirteçlerinden birisi CD34'dür, bu insan kemik iliği hücrelerinin %0.5-5'inde ifade olur. Erken progenitörlerde bulunurken daha olgun hücrelerde bulunmaz.

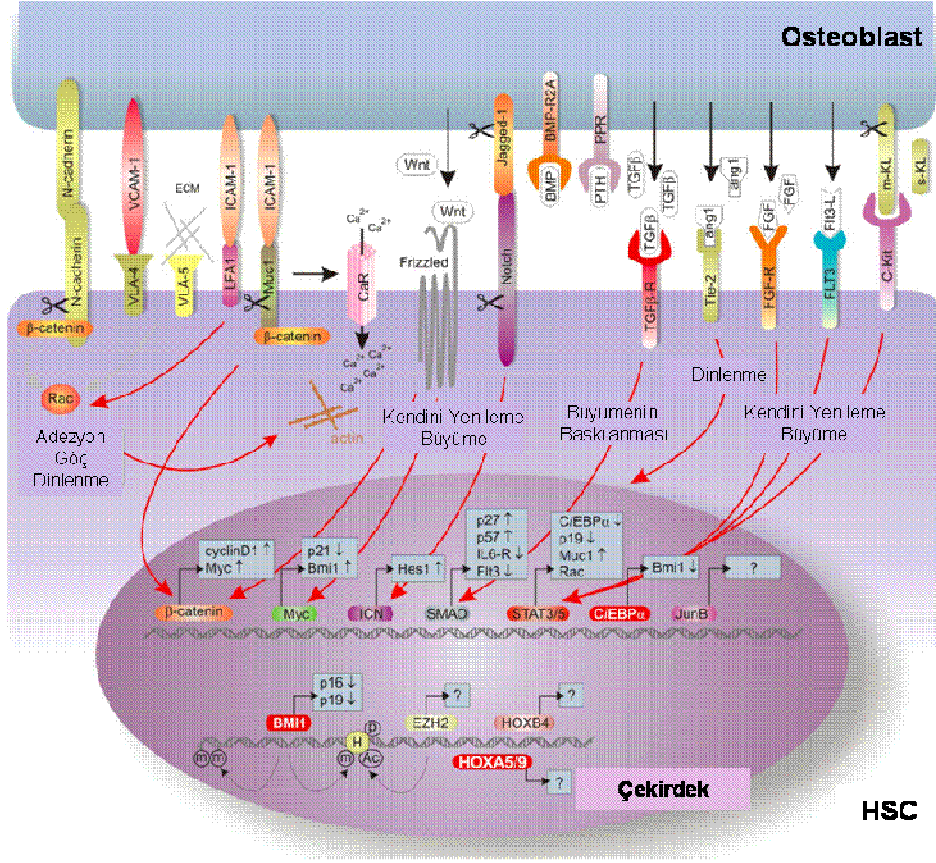
HKH'ler kendini yenileyebilme özelliğine sahip (self renewal) pluripotent kök hücreler olup, olgun kan hücrelerinin tüm tiplerini meydana getirebilmektedirler (Şekil 2.1). HKH'ler kemik iliğinde yerleşik olarak görevlerini yaşam boyu sürdürürler (Demir 2006).



Şekil 2.1. Hematopoetik kök hücrelerin kan yapımı süresince farklılaşması

HKH'lerin kendilerini yenilemesi, hücre siklusunun G0 evresinde sessiz olarak kalmaları, yapışmaları (adezyonları), proliferasyonları, olgunlaşmaları, farklılaşmaya gitmeleri, kemik iliğinden ayrılıp dolaşıma girmeleri (mobilizasyonları) ile yerleşim (homing) gibi birçok karmaşık süreçler kemik iliğinde özel mikroçevrelerde sağlanır. Bu özelleşmiş mikroçevrelerde kemik iliğine özgül hücreler (osteoblast, osteoklast...), stromal hücreler ve hücre-dışı matriks bileşenleri ile HKH arasında bazı moleküller, faktörler ve sinyaller aracılığıyla yüksek düzeyde etkileşimler vardır. Bu etkileşimler ile HKH'lerin fonksiyonlarını ve karakteristiklerini düzenleyen ve yetişkin hematopoezin stabil düzeyde kalmasını sağlayan özelleşmiş mikro çevreler "*Niş*" (Niche) olarak adlandırılır. Kemik iliğinde HKH'lerin farklı fonksiyonlarını düzenleyen iki ayrı türde niş, "*Endostel niş* (osteoblastik niş)" ve "*Vasküler niş* (endotelial niş)" bulunur. Bu iki niş birbirinden fiziksel olarak tamamen ayrı olmayıp birbirleriyle bağlantılıdır. HKH'ler farklı koşullar altında iki nişten birini kullanırlar ve vasküler nişteki HKH sayısı endostel niştekinden daha fazladır. Endostel nişteki HKH'ler kendini yenileme yeteneğinde olan siklusun G0 evresinde uykudaki primitif kök hücreler iken vasküler nişteki HKH'ler ve hematopoetik progenitör hücreler daha olgun, proliferere olabilen ve farklılaşmaya yatkın hücrelerdir.

Niş regülasyonunda Wnt, Notch, BMP, TGFb/SMAD, FGF, JAK/STAT gibi birçok sinyal molekülü görevlidir (Şekil 2.2) (www.tuba.gov.tr, Staal ve Luis 2010).



Şekil 2.2: Osteoblastlar ile HKH'ler arasında Homeostazı sağlayan iletişimler (Rizo vd 2006)

Hematopoetik kök hücreleri ve progenitörleri, hematopoetik büyüme faktörlerinin kontrolü altındadır. Her faktörün genelde birden fazla görevi vardır. Hematopoezde rolü olan Eritropoietin (Epo) ilk tanımlanan hümorale düzenleyicidir. Epo 1977 yılında saf olarak elde edilmiş ve 1985 yılında Epo cDNA başarıyla klonlanmıştır. Epo eritroid seri kök hücreleri üzerine etki ederek eritroid progenitörlerin farklılaşmalarından ve olgun eritrositlerin yapımlarından sorumludur. Miyelopoezden sorumlu ve koloni stimüle edici faktör (colony-stimulating factor= CSF) olarak tanımlanan G-CSF 1977 yılında tanımlanmıştır. GM-CSF'in granülosit, makrofaj/monosit, eozinofil ve megakaryositlerin yapımlarını düzenlediği gösterilmiş ve 1984 yılında GM-CSF cDNA'sı klonlanmıştır. Monosit yapımından doğrudan sorumlu M-CSF (monosit colony-stimulating factor) 1985 yılında ve 1991 yılında da insan Interlökin-3 (IL-3) geni klonlanmıştır. Trombosit

yapımından sorumlu olan Trombopoietin (TPO) hematopoetik sitokin olarak fare lösemi virusü-Mpl'in genomunun sitokin reseptörüne benzerliğini bildiren çalışmalar sonucu tanımlanmıştır. TPO'nun Mpl için bir ligand olduğu ve megakaryositleri uyararak trombosit yapımını düzenlediği gösterilmiştir. Bunların dışında; SCF (stem cell factor), B-lenfositlerini uyaran IL-5, T-lenfositlerinin yapımını düzenleyen IL-2 ve lenfositlerin özellikle T-lenfositlerin yapımını sağlayan IL-7 tanımlanmıştır.

Hematopoetik büyüme faktörlerinin genel etkileri şu şekilde özetlenebilir:

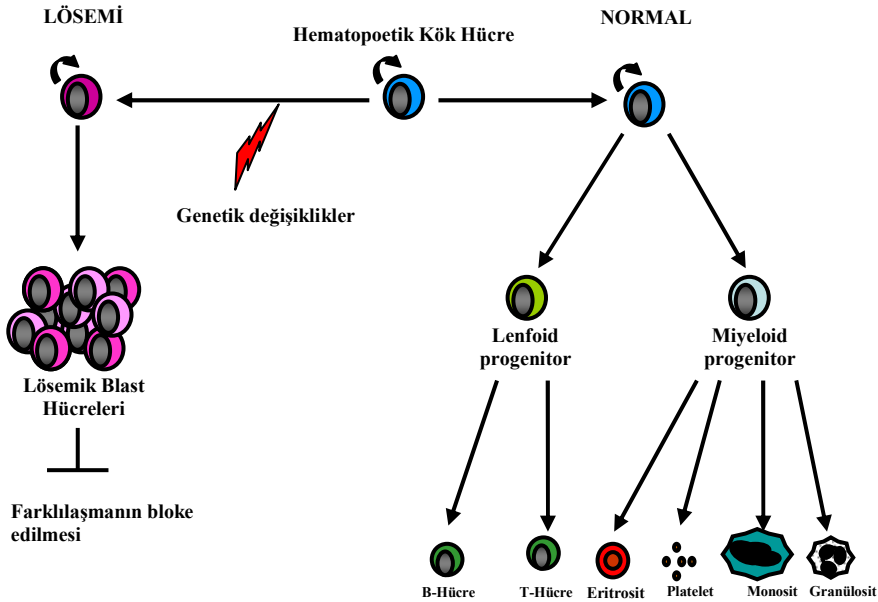
- Farklılaşmanın Sağlanması,
- Hücre Yaşamının Sürdürülmesi,
- Hücre Proliferasyonu,
- Olgunlaşmanın Uyarılması,
- Fonksiyonların Uyarılması,
- Bir veya birden fazla hematopoetik/hücre üzerine etkide bulunabilmeleri

HKH'ler *Niş* olarak tanımlanan oturma ve eğitim alma bölgelerinde, hematopoetik büyüme faktörleri, interlökinler ve farklı sitokinlerin etkileri altında sessiz-uyku (quiescent) döneminden başlayarak bölünme ve farklılaşmalarını gerçekleştirirler (www.tuba.gov.tr, Kaushansky 2006).

2.2. Lösemi

Yunanca "beyaz kan" anlamına gelen lösemi; kan hücrelerinde ya da öncülerinde gerçekleşen mutasyon ve/veya kromozomal translokasyon sonucunda ortaya çıkan kontrol dışı çoğalmalar ile karakterize edilen hematolojik malignansi olarak tanımlanmaktadır (Crans ve Sakamoto 2001). Lösemik hücreler kanser kök hücre kaynaklıdır, mutasyona veya kromozomal anomaliye sahiptirler, genetik kararsızlık gösterirler, çoğalma, farklılaşma ve apoptozis gibi önemli hücresel fonksiyonlarda bozulma ve özellikle de farklılaşmadan kaçış gösterirler. Lösemik hücreler büyüme avantajı kazanmışlardır, klonal baskınlık ve yayılım gösterirler (Franks ve Teich 2001).

Lösemnin akut, kronik miyeloid lösemi ve akut, kronik lenfoid lösemi olmak üzere 4 formu vardır. Akut lösemi hızlı ilerleyen bir hastalıktır. Hücrelerin tamamen gelişimlerini ya da olgunlaşmalarını etkiler. Bu olgunlaşmamış hücreler normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Kronik lösemi ise daha yavaş ilerler. Çok sayıdaki gelişen hücrelere büyüme izni verir. Genel olarak, bu olgun hücreler normal fonksiyonlarının bazılarını yerine getirebilir (Anonim 2003).



Şekil 2.3: Lösemnin oluşum mekanizması

2.3. Akut Miyeloid Lösemi (AML)

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

AML, hemen hemen her yaş grubunda görülebilmekle birlikte daha çok erişkin yaşlarda görülür (Estey vd 2006). Amerika Birleşik Devletleri'nde AML'nin yıllık insidansı 3.8/100.000'dür. İnsidans giderek yaşla beraber artar ve 65 yaş üzerinde 17.9/100.000'e ulaşır (Estey ve Döhner 2006). Erişkinlerin %85'i, çocukluk çağı lösemilerinin %15'i AML'dir (Burhanoğlu 2002). Tüm yaş gruplarında benzer klinik özellikler göstermekte olup, semptomlar blastik hücrelerin kemik iliği hücrelerinin yerini alması sonucu bozulmuş hematopoez ve buna bağlı gelişen sitopenilere dayanır (Beksac 1997).

AML'li olgularda 100'den fazla genetik bozukluk tanımlanmış olmakla birlikte, sıklıkla saptanan kromozomal anomaliler; t(8;21), t(15;17), inv(16) t(9;11) ve t(16;16)'dır. Bu kromozomal bozukluklar yaklaşık olarak AML olguların %40'ını oluşturmaktadır. Tanımlanmış olan diğer kromozomal bozukluklar ise olguların %10'undan azını kapsamaktadır. Geri kalan %50 olguda ise, normal karyotip saptanmakta veya kromozomal anomali saptanamamaktadır (Valk vd 2005).

1976 yılında Fransız, Amerikan ve İngiliz bir grup hematolog tarafından orijinal akut lösemi FAB sınıflaması oluşturulmuştur. FAB sınıflamasında akut lösemi, hücrelerin morfolojik ve sitokimyasal boyanma özelliklerine göre gruplanmıştır. Ancak immünofenotipleme, elektron mikroskobu, sitogenetik, moleküler biyolojik tetkik yöntemlerini ve nadir lösemi tiplerini içermeyen bir sınıflamadır (Head 2004, Özkalemkaş 2005).

Çizelge 2.1. Akut Miyeloid Lösemide FAB sınıflaması

Akut Miyeloid Lösemi (AML)	
Alt Tip	Tanımlama
M0	Minimal farklılaşma gösteren akut miyeloblastik lösemi
M1	Olgunlaşma göstermeyen akut miyeloblastik lösemi
M2	Granülositik olgunlaşma gösteren akut miyeloblastik lösemi
M3	Akut promiyelositer lösemi
M3V	Akut varyant promiyelositer lösemi (mikrogranuler)
M4	Akut miyelomonositer lösemi
M4Eo	Akut eozinofilik miyelomonositer lösemi
M5a	Akut monoblastik lösemi
M5b	Akut monositer lösemi
M6	Akut eritrolösemi
M7	Akut megakaryoblastik lösemi

Bu şekilde yapılan sınıflandırma bu alt tiplere ve hastalığın ilerlemesine bağlı olarak farklı terapilerin mevcudiyetine olanak sağlar (Anonim 2003).

Akut lösemide sitogenetik ve moleküler genetik anomalilerin prognostik önem arz etmesi nedeni ile, yeni bir sınıflandırma ihtiyacı olduğu gözlenmiştir. 2001 yılında Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO) tarafından akut lösemiler de dahil olmak üzere hemopoetik ve lenfoid neoplazmaları içeren yeni bir sınıflama yapılmıştır. WHO sınıflamasında; morfoloji, immünofenotipleme, sitogenetik ve moleküler biyolojik özellikler göz önüne alınmış, akut lösemi tanısı için blastik hücre sayısı %30'dan %20'ye indirilmiş ve nadir lösemi tipleri de dahil edilmiştir (Head 2004, Yanada vd 2005).

Çizelge 2.2. Akut Miyeloid Lösemide WHO sınıflaması

Akut Miyeloid Lösemi

1. Tekrarlayan Genetik Anomalilerle Seyreden AML

- t(8;21)(q22;q22), (AML 1/ETO) ile AML
- inv(16)(p13q22) veya t(16;16)(p13;q22), (CBFβ/MYH1-1) ile AML
- Akut promiyelositer lösemi (t(15;17)(q22;q22), (PML/RARα) ile AML)
- 11q23 (MLL) anomalisi ile AML

2. Çoğul Seri Displazisi ile Seyreden AML

- Önceden miyelodisplastik sendromlu
- Önceden miyelodisplastik sendrom olmadan

3. Tedaviye İkincil AML ve MDS

- Alkilleyici ajanlarla ilişkili
- Topoisomera II inhibitör ile ilişkili

4. Tanımlanan Gruplara Girmeyen AML

- Minimal farklılaşma gösteren AML
- Olgunlaşma göstermeyen akut miyeloblastik
- Akut miyelofibrozis ile panmiyelozlösemi
- Granülositik olgunlaşma gösteren akut miyeloblastik lösemi
- RARα rearrajmanı göstermeyen akut promiyelositer lösemi
- Akut miyelomonositik lösemi
- Akut monoblastik ve monositer lösemi
- Akut eritrolösemi
- Akut megakaryoblastik lösemi
- Akut bazofilik lösemi
- Myeloid sarkom

Son yıllarda araştırmacılar bu hastalığın moleküler patogenezi aydınlatmayı başarmışlardır. AML gelişiminde en temel genetik olaylar miyeloid transkripsiyon faktörlerindeki değişiklikler, sinyal yollarındaki mutasyonlar ve anormal sinyal uyarımıdır. Bu mekanizmalar birbirinden bağımsız olup, hücre ölümünün azalmasına, kök hücrenin kendini yenileme kabiliyetinin artmasına ve AML hücrelerinin farklılaşma potansiyelinin bloke edilmesine neden olmaktadır. AML'nin, normal hematopoetik kök ya da progenitör hücrelerin malign transformasyonu sonucu kanser kök hücrelerinin oluşumu ile ortaya çıktığı varsayılmaktadır (Mikesch vd 2007).

Amerika Birleşik Devletleri'nde lösemi tanısı konmuş ya da lösemi sonrası remisyon halinde bulunan yaklaşık 259.889 kişi olduğu belirtilmiştir. 2010 yılı kanser istatistiklerine

göre, yaklaşık 43.050 kişiye lösemi tanısı koyulacağı öngörülmüştür. Bunlardan 19,860'ı Kronik lösemi iken, 17,660'ının ise Akut lösemi olduğu tahmin edilmektedir (www.leukemia-lymphoma.org).

Klonal olmakla birlikte primer tümörlerin çoğunun belirgin oranda heterojen hücrelerden oluştuğu bilinmektedir. Tek hücre klonundan kaynaklanan tümörlerin nasıl olupta çok sayıda farklı hücre oluşturabildiği tartışmalı bir konudur. Benzer bir durum kök hücreler için de geçerlidir. Normal kök hücreler 3 ana özelliğe sahiptir: kendini yenileyebilme, çoğalma ve farklılaşma. Böylece çok az sayıdaki kök hücre çok sayıda olgun hücreye dönüşebilme potansiyeli taşımaktadır. Son yıllarda ortaya çıkan sonuçlar kanser patogenezinde kök hücrelerin rolünü kanıtlamıştır. Böylece *Kanser Kök Hücre* kavramı ortaya çıkmıştır. Bu konuda, üzerinde en çok çalışılan lösemik kök hücrelerdir (LKH). Bir olasılık mutasyonun HKH'yi hedef alarak LKH 'ye dönüşüme yol açmasıdır. Diğer olasılık ise daha farklılaşmış hücrelerde ortaya çıkan mutasyonların bu hücrelere kök hücre nitelikleri kazandırmasıdır. Patogenez ne olursa olsun LKH'nin saptanmasının kanser tedavisi için yeni bir hedef oluşturacağı düşünülmektedir (Mikesch vd 2007).

İlk kez Dick vd (1997) tarafından kanser kök hücreleri akut miyeloid lösemide tanımlanmış olup (Bonnet vd 1997, Hope vd 2004,) daha sonra da çeşitli çalışmalarda kanser kök hücrelerinin solid tümörlerin beyin (Yuan vd 2004), (Singh vd 2004), göğüs (Al-Hajj vd 2003), ovaryum (Bapat vd 2005) gelişimiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Kanserle ilgili birçok sinyal yolağı, kök hücrelerin kendi kendini yenileme ve farklılaşmasını da düzenlemektedir. Böylelikle birçok gen ve bunlar tarafından başlatılan sinyal yolları olarak bilinen olaylar kaskadı bir kök hücrenin kaderini belirlemede (kendini yenileyebilme ve farklılaşma) anahtar rol oynarlar. Bu yollar **Wnt/ β -catenin**, **Notch**, **Hh (Hedgehog)**, **TGF- β** (transforming growth factor- β), **PTEN** (Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) ve **Bmi** (Andl vd 2002; Boulanger vd 2005, Brennan vd 2004, Dontu vd 2004, Hatsell vd 2003, Ingham vd 2001, Korinek vd 1998, Leung vd 2004, Lewis vd 1999, Machold vd 2003, Molofsky vd 2004, Reya vd 2003, Stiles vd 2004) olarak tanımlanmış; anormal aktivasyonlarının kanser gelişimiyle ilişkilendirildiği de gösterilmiştir (Woodward vd 2005).

2.4. AML'ye yönelik İleri Analizler

Bütün kanserler gibi yüksek derecede heterojenite gösteren AML hastalığında genom, transkriptom, proteom ebadında gerçekleştirilen çalışmalar ile bu heterojen hastalık grubuna ait farklı alt grupların tanımlanmasına, yeni teşhis ve tedavide hedef olabilecek genlerin analizine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. AML'de sitogenetik anomaliler, gen mutasyonları ve çeşitli genlerdeki değişen ifade profillerinin yanı sıra yakın zamanda hücre proliferasyonu, farklılaşması ve ölümü gibi homeostatik süreçlerde önemli rol oynayan yeni bir sınıf olan mikroRNA'lar (miRNA) tanımlanmıştır. Global düzeyde yapılan transkriptom çalışmaları, kontrolsüz hücre bölünmesinin gerçekleştiği lösemi hücrelerinde değişikliğe uğramış miRNA ifade düzeylerini gözler önüne sermiştir (Marcucci vd 2009, Marcucci vd 2011). Bu konuda yapılan pek çok çalışmanın AML'nin klinik sonuçları üzerinde etkili olabileceği ve tedavide bir hedef olabileceği belirtilmiştir (Debernardi vd 2007, Li vd 2008, Marcucci vd 2009, Pedranzini vd 2010, Starczynowski vd 2011).

AML'de SNP (Tek nükleotid polimorfizm) mikroarray uygulamalarıyla tüm genomun yüksek çözünürlükte taranması ve konvensiyonel sitogenetik ile saptanamayan kriptik lezyonların tanınabilmesi mümkün olmaktadır. Böylelikle SNP mikroarrayler ile yapılan pek çok çalışmada lösemiye veya lösemide yatkınlığa neden olan WT1, CBL, PDGFRbeta, SHIP genleri ve UPD (Uniparental dizomi) 6p, UPD 11p, UPD 13q, 20. kromozom üzerindeki delesyona uğrayan bölgeler saptanmıştır (Zhang vd 2006, Serrano vd 2008, Knight vd 2009, Huh vd 2010, Bullinger vd 2010, Barresi vd 2010, Damm vd 2010).

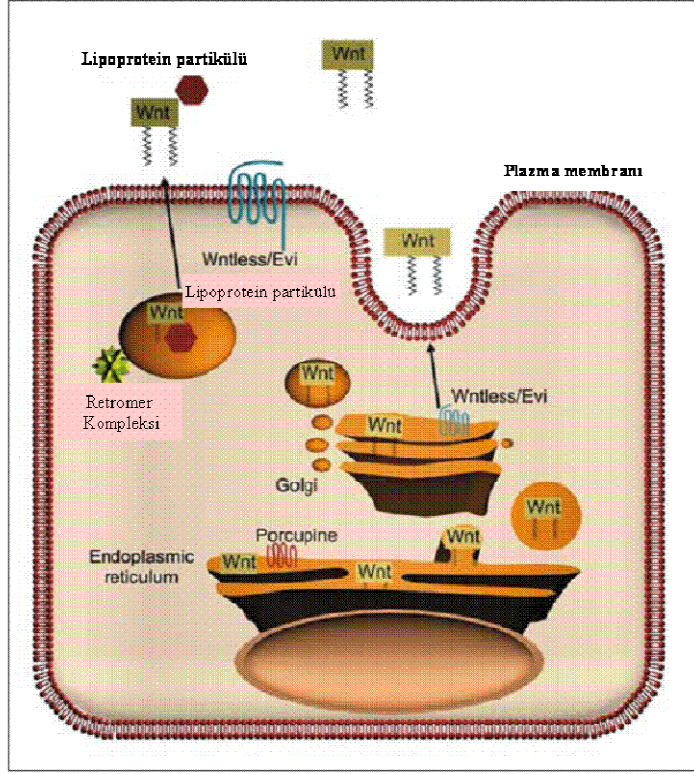
AML'de en sık gözlenen 1p, 3q, 6p, 11q, 8, 8q, 15q, 17q,19q, 21q, 22 kromozomal artış bölgeleri ve 2, 4q, 5q, 17p, 7q, 7, 9p, 11p, 16q, 17p kromozomal kayıp bölgeleri geniş spektrumlu olarak karşılaştırmalı genom hibridizasyonu (CGH) ile tespit edilmiştir (Alvarez vd 2001, Casas vd 2004, Alvarez vd 2005, Rucker vd 2006, Paulsson vd 2006, Tyybakinoja vd 2006, Zatkova vd 2009). CGH ile genom ebadında transkriptom profillerinin kombine analizleri, AML patogenezinde rol alabilecek hedef genlerin tanımlanmasına imkan sağlanmıştır (Rucker vd 2006).

Bununla birlikte genom ebadında yapılan transkriptom analizleri sonucunda AML hasta grupları ve hasta-sağlıklı örnekleri arasında farklı ifadelenen genler ve bu genlerle ilişkili hücre döngüsü, apoptoz, adezyon molekülleri, JAK-STAT, MAPK, Notch, Wnt gibi sinyal yolları tespit edilmiştir (Gal vd 2006, Stirewalt 2008, Majeti vd 2009, Gentles vd 2010).

2.5. Wnt Sinyal İleti Yolağı

Wnt geni, yaklaşık 27 yıl önce ilk olarak int-1 adı ile farenin tümörlü meme dokusundan klonlanmış olan bir gendir. Daha sonra, *Drosophila*'da bulunan ''wingless'' geninin int-1 geni ile dizi ve fonksiyon benzerliği gösterdiği saptanarak, 1991 yılında bu iki gen ismi birleştirilmiş ve bu gen literatüre Wnt geni olarak geçmiştir (Nusse ve Varmus 1992, Nusse 2005). Günümüze kadar insanda tanımlanmış olan Wnt gen ailesine ait birbirine temel yapı olarak benzeyen 19 adet protein vardır ve bunlar reseptörlerine bağlanmada önemli rol oynayan sistein'den zengin bölgeler içeren, glikoprotein yapısında, ekstrasellüler bölgeye salınan, sinyal yolu uyarıcılarıdır (Ilyas 2005).

Wnt polipeptid zincirinin oluşumuyla birlikte, N terminalinde bulunan hidrofobik sinyal dizileri ile endoplazmik retikulum (ER)'a yönelir. Son şeklini almamış olan Wnt, ER'de çeşitli post-translasyonel düzeyde glikozilasyon ve lipid modifikasyonu gibi (Coudreuse ve Korswagen 2007) modifikasyonlar geçirerek Wnt sinyal yolunda görev alacak hale gelir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4: Wnt proteininin Salınımı (Espada vd 2009)

Proteinlere şeker eklenmesi anlamına gelen glikozilasyon modifikasyonu için, Wnt proteini birçok şeker eklenebilen merkez içermektedir. Wnt'nin peptid omurgasındaki bu merkezlere, N bağlı oligosakkarid zincirler, ER zarında bulunan oligosakkaril-transferaz kompleksi (OST), yardımıyla hızla bağlanır (Coudreuse ve Korswagen 2007, Hausmann vd 2007).

Bir diğer modifikasyon ise, ER zarında bulunan ve Porcupine [membran-bound O-aciltransferaz family (MBOAT)] isimli transmembran proteini tarafından, Wnt yapısında bulunan korunmuş sistein rezidülerine palmitat isimli lipid grubunun eklenmesidir. Palmitat eklendikten sonra hidrofilik yapıdaki Wnt, hidrofobik özellik kazanır (Nusse ve Varmus 1992, Coudreuse ve Korswagen 2007, He ve Axelrod 2006). Wnt hidrofobik özellik kazanması yani lipid modifikasyonunun görevi çeşitli araştırmalarda tarafından farklı şekilde açıklanmaktadır. Coudreuse ve Korswagen çalışmalarında Wnt'nin hidrofobik özellik kazanmasının, sentezlendiği hücre içinde ER'den Golgi'ye, Golgi'den sitoplazmaya doğru gideceği yeri belirlemede Wnt için önemli olduğunu bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar aynı zamanda bu tür bir modifikasyonun Wnt'nin sinyal potansiyelini arttırdığını da ileri sürmektedirler (Coudreuse ve Korswagen 2007). Willert vd (2003) ise

yaptıkları araştırmada palmitat grubunun enzimatik olarak uzaklaştırıldığı veya palmitat eklenen sistein grubunda mutasyon meydana geldiği durumlarda, Wnt'nin fonksiyonunu kaybettiğini ifade etmektedirler (Willert vd 2003). Bunun yanı sıra, lipid modifikasyonun Wnt'nin sinyal yolu üzerindeki etkisinin henüz netlik kazanmadığını ifade eden araştırmacılar da vardır (Mikels 2006). Wnt proteinindeki bu iki modifikasyon arasındaki ilişki de ortaya konulmaya çalışılmıştır. Komekado vd'nin (2007) yaptıkları çalışmada glikozilasyonun lipid modifikasyonunu arttırıcı yönde bir etkisinin olduğunu ancak lipid modifikasyonun glikozilasyon üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir. Coudreuse ve Korswagen'in görüşlerine göre ise Wnt, ER zarındaki "Porcupine" transmembran proteinine bağlandığında Wnt'nin konformasyonunda değişiklik meydana gelmekte ve Wnt şeker eklenen merkezleri açığa çıkmakta, bu şekilde OST'nin glikozilasyon işini daha verimli yapmasına olanak sağlanmaktadır (Coudreuse ve Korswagen 2007). Tüm bu görüşlere rağmen, Wnt'nin salgılanma sürecinde ve aktivitesinde önemli rol oynayan lipid modifikasyonu ile glikozilasyonu arasındaki ilişki henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır (Komekado vd 2007).

Wnt proteininin son şeklini almasında ER lümeni içinde bulunan BiP (immunoglobulinheavy-chain-binding protein) proteininin rolü büyüktür. Bu protein, "heat-shock" protein (Hsp70) ailesinin bir üyesidir ve Wnt ile ER içinde birleşerek, Wnt'nin doğru katlanmasını etkiler ve böylelikle üç boyutlu yapı kazanmasını sağlamış olur (Nusse ve Varmus 1992, Kitajewski vd 1992).

İşlev yapabilecek durumda olan Wnt proteini, daha sonra ER'nin tomurcuklanarak oluşturduğu taşıyıcı veziküller (transfer veziküller) içerisinde sitozole verilir ve sitozolden Golgi kompleksine taşınır. Buradan ayrılan Wnt'nin etki mekanizması iki yolla gerçekleşir. Bunlardan biri uzaktaki hedef hücreyi, diğerisi de yakındaki hedef hücreyi ekileme yoludur (Nusse ve Varmus 1992, Coudreuse ve Korswagen 2007, Kitajewski vd 1992).

Wnt'nin uzaktaki bir hedef hücreyi etkileme mekanizmasında, Wnt proteininin daha Golgi kompleksinde iken, Golgi kompleksinin trans yüzündeki zarında bulunan kargo reseptörüne tutunması önemli bir basamağı oluşturur. Bu kargo reseptörü zardaki bir transmembran proteindir ve Wntless(Wls)/Evanes (Evi) olarak bilinmektedir (Coudreuse ve Korswagen 2007, Ching ve Nusse 2006). Bu proteine tutunan Wnt, "Wnt-kargo reseptör kompleksini" oluşturur. Sitolde bulunan ve retromer kompleksi denilen bir multiprotein,

Golgi'nin trans yüz zarında bulunan Wnt-kargo reseptör kompleksine bağlanır. Bu “Wnt-kargo reseptör-retromer kompleks” üçlüsü Golgi zarından tomurcuklanarak ayrılır ve sitozole verilir. Bu üçlü yapıyı taşıyan Wnt vezikülü, içinde lipoprotein biyomolekülleri bulunan bir endozoma taşınır. Bu vezikül zarı ile endozom zarı kaynaşır ve Wnt endozom içine verilir. Bu arada, retromer kompleksi sitozole verilirken, kargo reseptör endozom zarında kalır. Zarda tutulan kargo reseptörü tekrar retromer kompleksi ile ilişki kurar ve tomurcuklanarak, yeniden kullanılmak üzere Golgi kompleksine gönderilir. Endozom içinde, Wnt lipoproteinlerle birleşir ve endozom zarının tomurcuklanmasıyla oluşmuş bir vezikül içinde sitozole verilir. Buradan hücre zarına gönderilen bu vezikül, ekzositoz ile içeriğini hücre dışına bırakır (Coudreuse ve Korswagen 2007, Hausmann vd 2007, Kritikou 2008). Ekstraselüler sıvıya geçen “lipoprotein-Wnt” bileşiği uzaktaki bir hedef hücreyi etkileme yeteneğine sahiptir. Buradaki Wnt proteininin bu etkiyi gösterebilmesinin kendisine bağlanan lipoprotein molekülleri sayesinde olduğu bazı araştırmacılar tarafından ileri sürülmektedir (Mikels ve Nusse 2006, Hausmann vd 2007).

Lipoproteinlerin yanı sıra, uzaktaki hedef hücreyi etkileme mekanizmasında önemli olan bir diğer protein kompleksi de retromerdir; çünkü yapılan çalışmalarda Golgi kompleksinde bulunan Wnt'nin retromer kompleksinin yokluğunda endozoma gidemediği görülmüştür. Bu takdirde, Wnt direkt olarak Golgi kompleksinden sitozole, oradan da endozomla birleşmeksizin hücre zarına gönderilip, ekzositoz ile dışarı verilmektedir. Bu özellikteki bir Wnt ise ancak yakındaki bir hedef hücreyi etkileyebilmektedir (Coudreuse ve Korswagen 2007, Hausmann vd 2007).

Wnt sentezlenip, ekzositozla hücrelerarası boşluklara verilerek glikozaminoglikanlar ile ilişki kurar ve hedef hücre zarına ulaşır. Wnt, hedef hücre zarında bulunan, Frizzled (Fz) ve LRP5/6 (Low-density lipoprotein receptor-related protein) reseptörlerine bağlanır (Wend vd 2010). Fz reseptörü, G protein ailesinin üyesidir ve bir transmembran proteindir. Bu proteinin hücre dışında bulunan kısmı, 10 adet sisteince zengin rezidü içerir. Wnt proteini sistein rezidülerinin bulunduğu uç kısmı ile Fz proteininin CRD bölgesine yüksek afinite ile bağlanırken, diğer ucu ile de, LRP5/6 proteinine bağlanır. LRP5/6 düşük yoğunluklu lipoprotein ailesinin üyesi olan bir transmembran proteindir ve Fz'nin ko-reseptörü olarak görev yapmaktadır. Böylece, Wnt sinyal mekanizmasının

başlatılabilmesi için gerekli olan bu üçlü yapı, birbirleriyle bağlantı kurmuş olur. (Fz- Wnt-LRP5/6) (Mikels ve Nusse 2006, Ken vd 2006, Chen vd 2008).

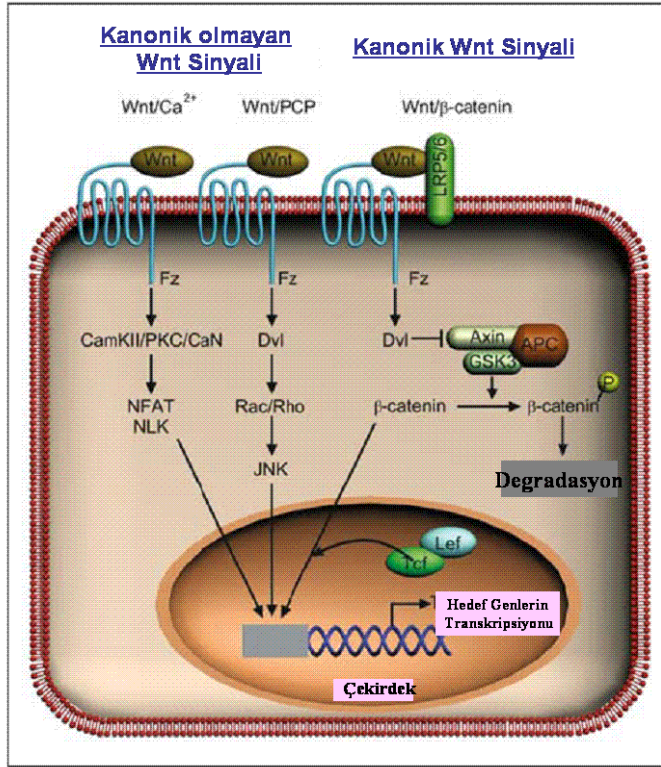
Wnt proteinlerinin hücre büyümesi, hücre adezyonu, hücre hareketi, hücre polaritesi ve farklılaşmasını düzenlediği bilindiği gibi ayrıca hem kök hücrelerinin özelleşmesinde ve değişimlerinde hem de pek çok dokunun embriyonik gelişiminde (özellikle merkezi sinir sistemi, böbrek, meme bezleri ve dokusu, ve ekstremitelerde) önemli rol oynadıkları da gösterilmiştir (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 (Ilyas 2005).

Temel olarak 3 çeşit Wnt sinyal yolağı tanımlanmıştır (Şekil 2.5) (Huelsenken ve Behrens 2002).

1. Wnt/ β -katenin (Kanonik/Klasik) sinyal yolağı
2. Wnt/ Ca^{+2} (Kanonik olmayan) sinyal yolağı
3. Wnt/Planar Hücre Polaritesi (PCP) (Kanonik olmayan) sinyal yolağı

Kanonik olmayan yolakların kanser gelişimindeki rolü tam olarak bilinmemektedir. Ancak bunların, Wnt/ β -katenin sinyal yolağının antagonisti gibi davrandığı düşünülebileceği gibi, başka bir fikre göre de Wnt'lerin aktivasyonunun bu iki yolak aracılığı ile tümör progresyonunu sağlayabileceği önerilmektedir (Ilyas 2005).



Şekil 2.5: Wnt Sinyal İleti Yolakları (Espada vd 2009)

Wnt genleri kodladıkları proteinlerin görev aldığı sinyal yollarına yani biyolojik aktivitelerine göre 2 gruba ayrılmıştır;

1-β-katenin sinyal yolağını aktifleştirme özelliğine sahip Wnt genleri; Wnt 1, Wnt 2A, Wnt 2, Wnt 3, Wnt 3A, Wnt 7A, Wnt 8A, Wnt 8B, Wnt 10A, Wnt 10B,

2- Diğer sinyal yollarını aktifleştirme özelliğine sahip Wnt genleri; Wnt 4, Wnt 5A, Wnt 5B, Wnt 6, Wnt 7B ve Wnt 11 (Miller 2001).

2.5.1. Wnt/ β-Katenin (Kanonik/Klasik) Yolağı

Kanser gelişiminde rol oynayan en temel yolağıdır. Bu yolağın anlaşılmasında merkez rolü β-katenin oynar. β-katenin sitoplazmada bulunur, Wnt sinyal aktivasyonu ile çekirdeğe taşınır. Böylelikle çok sayıda genin transkripsiyonunu aktive eder. Aynı zamanda bu yolağı çok sıkı bir şekilde kontrol edilir, ancak ihtiyaç duyulduğu zaman aktive olur (Ilyas 2005). Bu yolağın en temel komponentleri; multiprotein kompleksini (yıkım kompleksini)

oluşturan Axin-APC (Adenomatous Polyposis Coli)- GSK3 β (Glikojen Sentez Kinaz 3 β) ve bu yıkım kompleksinin antagonistleri olan Dvl (Dishevelled)-CKI ϵ (Kazein kinazI ϵ)-GBP/Frat ve de β -katenin'dir (Miller 2003).

2.5.1.1.Wnt Reseptörleri: Fz ve LRP'ler

Frizzled proteinini kodlayan Fz geni ilk olarak 1996 yılında *Drosophila*'da tanımlanmıştır (Bhanot vd 1996, Cadigan ve Liu 2006). Günümüzde ise insanlarda tanımlanmış 10 adet Fz reseptörü bulunmaktadır. Fz reseptörü G protein ailesinin üyesi olup, 537-706 amino asit uzunluğunda yaklaşık 63-80 kd molekül ağırlığında bir transmembran proteindir (Huang ve Klein 2004). Bu proteinlerin bir ucu ekstraselüler matrikse (ECM) uzanırken, diğer ucu ise zarın bir ucundan diğerine 7 kez kat ederek sitozol içine uzanır. Oluşturdukları bu kıvrımlar nedeniyle Fz proteinleri "7 kıvrımlı reseptör proteinler" olarak da nitelendirilebilir (Chen vd 2008, Wawrzak vd 2009). Bu proteinin hücre dışında bulunan kısmı, 10 adet sisteince zengin (cystein-rich domain (CRD) rezidü içerir. Wnt proteini sistein rezidülerinin bulunduğu uç kısmı ile Fz proteininin CRD bölgesine yüksek affinite ile bağlanırken, diğer ucu ile de LRP5/6 proteinine bağlanır. Farklı Wnt ligandları farklı Fz reseptörlere bağlanır.

Memelilerde 10 farklı düşük yoğunluklu lipoprotein reseptör ilişkili protein (LRP) tanımlanmış olmasına rağmen Wnt sinyal yoluyla ilişkili reseptörleri LRP5 ve LRP6'dır. Bu proteinlerin Wnt/ β -katenin sinyal yolağında reseptör olarak görev yaptığı, 2000 yılında farelerde, *Xenopus* embriyolarında ve *Drosophila*'da yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Pinson vd 2000, Tamai vd 2000, Wehrli vd 2000).

LRP5/6 düşük yoğunluklu lipoprotein ailesinin üyesi olan bir transmembran proteini olup 1615 amino asit uzunluğunda, 180 kd molekül ağırlığında ve Fz'nin ko-reseptörü olarak görev yapmaktadır (He vd 2004, Cadigan ve Liu 2006). Böylece, Wnt sinyal mekanizmasının başlatılabilmesi için gerekli olan bu üçlü yapı, birbirleriyle bağlantı kurmuş olur (Fz-Wnt-LRP5/6). (Nusse ve Varmus 1992, Mikels ve Nusse 2006, Cadigan ve Liu 2006, Chen vd 2008).

2.5.1.2.Dvl (Dishevelled/Dsh)

Dvl proteinini kodlayan *Dishevelled* geni ilk olarak 1959 yılında *Drosophila*'da saptanmıştır (Wallingford ve Habas 2005, Lee vd 2008). Wnt/ β -katenin sinyal yolu ile ilişkisi ise *Drosophila*'da segment polaritesi üzerine yapılan çalışmalar sırasında 1994 yılında keşfedilmiş ve Wnt geni gibi *Hydra*'dan insana kadar evrimsel olarak oldukça korunduğu belirlenmiştir (Weitzmann 2005). Dvl proteini yaklaşık 700 amino asitten oluşur ve 78 kd molekül ağırlığına sahiptir (Wallingford ve Habas, 2005).

İlk hücre içi sinyal molekülü olan Dvl, membrana bağlı reseptörler ile β -katenin kompleksi arasındaki ilişkiyi sağlar (Povelones ve Nusse 2002). Dvl, bir ucu ile zar da bulunan Fz'nin hücre içi kısmına bağlanırken, diğer ucu ile fosforillenmiş LRP5/6'ya bağlı halde bulunan Axin'e bağlanır. Bu bağlanma ile Axin proteininde konformasyonel bir değişim olur. Bu değişim, GSK-3 β 'nin Axin'den ayrılmasını sağlar. Axin'den ayrılan GSK-3 β hücredeki bir inhibitör protein (frequently rearranged in advanced T-cell lymphoma-1 (Frat-1)) tarafından inhibe edilir ve bu sayede GSK-3 β 'nin β -katenini fosforilleme etkisi ortadan kaldırılmış olur. (Chen vd 2008, Schwarz-Romond vd 2007, Fraser vd 2002).

Dvl proteini sadece Wnt/ β -katenin sinyal yolağı değil ayrıca kanonik olmayan 2 yolakta da görev yapmaktadır. O nedenle bazı araştırmacılar tarafından Dvl Wnt sinyal yolaklarının kavşak noktası olarak da nitelendirilmektedir (Wallingford ve Habas 2005, Lee vd 2008).



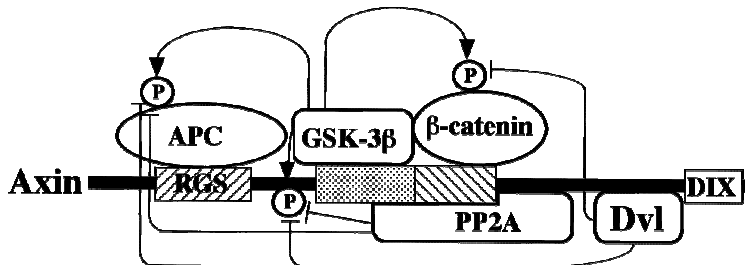
Şekil 2.6: Dvl proteinin yapısı

2.5.1.3.Axin (Conductin)

İlk olarak 1997 yılında fare embriyoları ile yapılan çalışmalar sırasında tanımlanmıştır (Zeng vd 1997). Axin proteini 862 amino asit uzunluğundadır ve 95,6 kd molekül ağırlığına sahiptir. Yıkım kompleksinin merkezinde yer alan, yapının iskeletini oluşturan ve Wnt sinyal yolağında negatif regülatör olarak görev yapan bir proteindir (Novak vd 1999). 3 adet domaine sahip olup; bunlardan amino terminalinde bulunan RGS (regulator of G protein signaling) domaini ile Adenomatous Polyposis Coli (APC)'ye, merkezi domaini ile β -katenin-Glikojen sentaz kinaz 3β (GSK3 β)-protein fosfataz 2A (PP2A)-Kazein kinaz I (CKI)'ya ve C-terminal (DIX) domaini ile de Dvl'ye bağlanır (Lustig vd 2003). Axin, GSK3- β -CKI-APC-PP2A- β -katenin ile multiprotein kompleksini (yıkım kompleksi) oluşturur. Bu kompleksin oluşumu sayesinde Axin, β -kateninin fosforilasyonunu koordine eder (Kimelman ve Xu 2006). Fosforlanan β -katenin ise parçalanır ve çekirdeğe taşınımı gerçekleşemez, hedef genler aktive olamaz. Böylelikle Axin, β -katenin için moleküler bir şaperon olarak davranır ve β -katenin'inin çekirdek-sitoplazma dağılımını düzenler (Prunier vd 2004).

Axin proteininin, sadece Wnt/ β -katenin sinyal yolağında değil, apoptosisin strese bağlı uyarılmasında ve sentrozomlarda γ -tübinin ile kompleks oluşturarak mikrotübüllerin organizasyonunda da görev yaptığı belirlenmiştir (Fumoto vd 2009, Zhang vd 2009).

Yapılan çalışmalarda Wnt yolağının inhibitörü olarak görev yapan Axin geninin yüksek seviyede ifade edilmesi ile hematopoetik kök hücre fonksiyonunun baskılandığı sonucuna varılmıştır (Reya vd 2003).



Şekil 2.7: Axin proteinin yapısı (Kasumi vd 1999)

2.5.1.4.APC (Adenomatous Polyposis Coli)

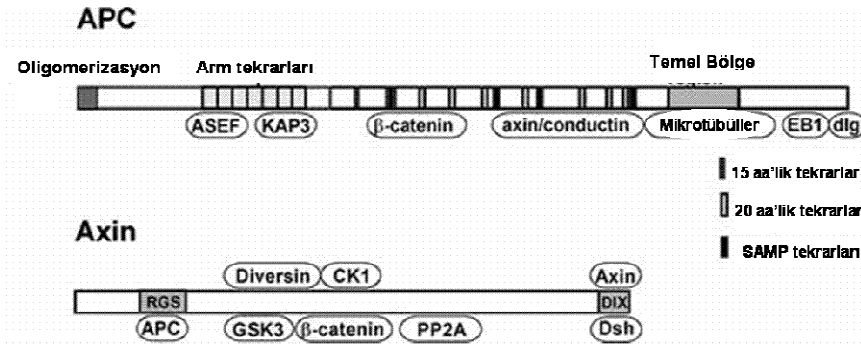
APC geni 5. kromozomda (5q 21-22) yer alır. İlk olarak 1987 yılında Gardner sendromlu bir hastada yapılan kromozom delesyonu çalışmaları sırasında saptanmış ve tümör baskılayıcı gen ailelerinden biri olarak kabul edilmiştir (Aoki ve Taketo 2007). Daha sonra yapılan çalışmalarda bu genin, kolorektal karsinomların gelişiminde oldukça etkili olduğu belirlenmiştir (Prunier vd 2004).

İnsanda fetal ve erişkin dokularda ifade edilen APC geninin ürünü olan APC proteini 2843 amino asitten ve çok sayıda alt birimden oluşmuş, 312 kd molekül ağırlığına sahip oldukça büyük bir proteindir (Lustig ve Behrens 2003, Aoki ve Taketo 2007). APC proteini hücrenin sitoplazma ve çekirdeğinde bulunmaktadır (Giles vd 2003). Çekirdek zarından difüzyon ile geçemeyecek kadar büyük bir protein olan APC'nin N terminalinde çekirdek zarından girip çıkma sinyali "nuclear export and import signal (NES)" adı verilen bir sinyal dizisi bulunmaktadır (Goss ve Groden 2000). Bu sinyal sekansı ile çekirdek zarında bulunan bir transmembran proteine bağlanan APC proteininin bu şekilde çekirdekten sitoplazmaya, sitoplazmadan çekirdeğe geçebildiği öne sürülmektedir (Henderson ve Fagotto 2002). APC proteininin N terminalinin birçok kanser tipinde mutasyona uğradığı da saptanmıştır. Bu nedenle APC proteininin çekirdek ve sitoplazma arasındaki transferinde önemli rol oynayan bu bölümünün, hastalıkların oluşumunda oldukça önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir (Polakis 2000, Bienz ve Clevers 2000, Nathke 2005, Senda vd 2007).

Kanserdeki rolü β -katenin'in hücresele seviyelerini düzenlemek olup, Wnt sinyal yolağında bir negatif regülatördür. Yani axin gibi β -katenin'in GSK3- β ile fosforilasyonunu hızlandırır. Bu görevinin yanı sıra APC proteininin, çekirdeğe girerek sinyal yolağının aktivasyonu ile çekirdeğe giren beta kateninin sitoplazmaya tekrar taşındığı ve bu şekilde genlerin transkripsiyonunun önlendiği düşünülmektedir (Henderson ve Fagotto 2002, Aoki ve Takedo 2007, Brocardo ve Henderson 2008). Ancak beta kateninin APC'den bağımsız olarak çekirdek ile sitoplazma arasında hareket edebildiği düşüncesiyle bu görüşe karşı çıkan araştırmacılar da bulunmaktadır (Lustig ve Behrens 2003). Ayrıca çekirdeğe giren APC burada transkripsiyonu inhibe eden çeşitli moleküller ile kompleks oluşturarak

genlerin ifade edilmesini engellediğini savunan araştırmacılar da vardır (Hamada ve Bienz 2004).

Yaklaşık 300'ün üzerinde farklı hastalık, APC genindeki mutasyonlar ile ilişkili bulunmuştur. Bu mutasyonlar çerçeve kayması ya da oluşan prematüre/stop kodonları ile "truncated" kısalmış proteinlerin oluşturduğu mutasyonlardır. APC geninde mutasyon var olduğu zaman β -kateninin sitoplazmada birikimine, sonrasında çekirdeğe geçerek hedef genlerin transkripsiyonuna neden olur ve bu durum kolorektal tümörlerin %80'inde görülmektedir (Miller 2003). APC çeşitli domainler içerir, bütün domainlerin C terminali ya mikrotübüllere direkt bağlanma ya da mikrotübül bağlanma proteini olan EB1 boyunca bağlanma içerir. APC mikrotübüllerin distal kısımlarına, mitotik iğ iplikçiklerine ve kinetokorlara lokalize olmuştur. Embriyonik hücrelerdeki kaybı ise kromozom segregasyon defektleriyle ilişkilidir. Böylelikle APC mutasyonları sadece artan/azalan β -katenin sinyali değil, ayrıca anormal adezyon/migrasyon ve genomik instabiliteye de neden olmaktadır (Lustig vd 2003).



Şekil 2.8: APC proteinin yapısı (Lustig vd 2003)

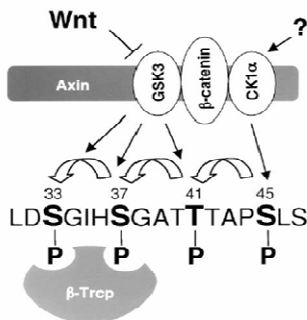
2.5.1.5. GSK-3 β (Glikojen Sentez Kinaz 3 β)

Erişkin ve embriyonik dönemde birçok sinyal yolağında görev alan bu enzim ilk olarak 1980 yılında saptanmıştır (Hedgpeth vd 1999). Wnt sinyalinin bir diğer negatif regülatörü olan GSK-3 β , yaklaşık 420 amino asit uzunluğundadır ve 47 kd molekül ağırlığına sahiptir (Jope vd 2007). β -katenin'in fosforlanmasından sorumlu bir serin/treonin kinaz olup, β -

katenini N terminal bölgesinden Serin (Ser) 33, Ser 37, Ser 45 ve Treonin (Thr) 41. pozisyonlardan fosforlamaktadır (Şekil 1.9) (Ilyas 2005). Fosforile olan β -katenin proteini ubiquitin proteozom yolu için hedef oluşturur (Kikuchi 2006). Ubikutin proteozom yolu 3 enzim içerir: ubiquitin aktivasyon enzimi (E1), ubiquitin-konjuge eden enzim (E2) ve ubiquitin ligaz (E3). β -katenin için ubiquitin ligazın bir bileşeni olan β -TRCP, (β -transducin tekrarı içeren protein) fosforile β -katenin ile ilişki kurar ve proteinin ubiquitinasyonu ve yıkımını uyarır (Megy vd 2005). Wnt sinyali yokluğunda, β -kateninin yıkımı Ser 45 rezidüsünün Kazein kinaz α (CK1 α) tarafından fosforilasyonu ile başlar. Ser 45'in fosforilasyonu CK1 α 'nın Axin'e bağlanmasına bağlıdır. Daha sonraki aşama β -katenin-APC-Axin-GSK3- β multi protein kompleksinin oluşumudur. GSK3- β , β -kateninin amino ucundaki diğer fosforilasyonları kolaylaştırır. Fosforilasyon Thr 41, Ser 33 ve Ser 37 ile devam eder. GSK3- β tarafından fosforlanan β -katenin sekansına yıkım kutusu (destruction box) denir (Miller 2003). β -katenin üzerindeki 4 Ser/Thr rezidüsü fosforile olduktan sonra E3 ubiquitin ligaz, β -TRCP tarafından komplekse bağlanır. Bu kompleks ubiquitinasyon ve fosforile β -kateninin proteozomal yıkımını sağlar (Kimelmanve Xu 2006, Liu vd 2002).

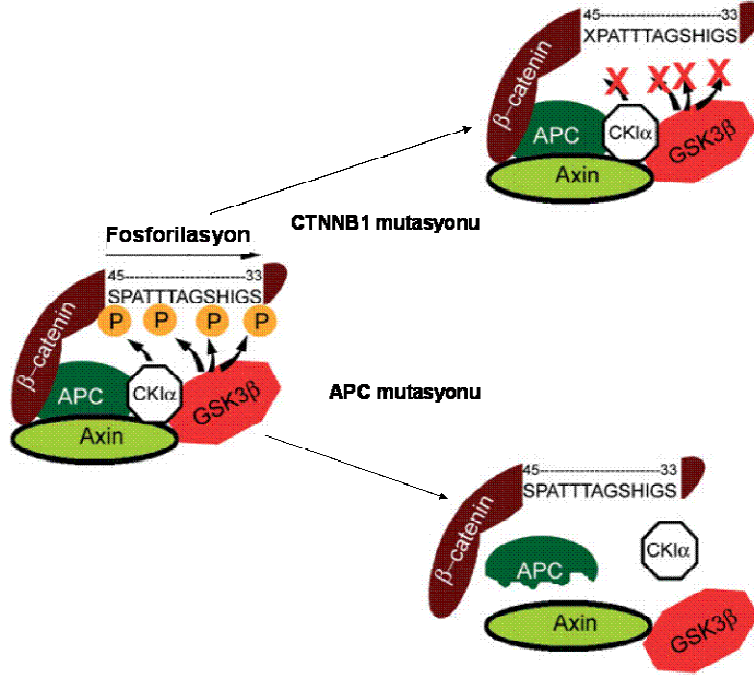
Buna ek olarak GSK-3 β sadece β -katenini fosforlamakla kalmaz, ayrıca Axin ve APC'yi de fosforile eder. Böylelikle Axin ve APC'nin, β -katenin ile olan ilişkisinin artmasına ve β -kateninin fosforilasyonunun/degradasyonunun hızlanmasına öncülük eder (MacDonald vd 2009).

Son zamanlarda GSK-3 β 'nin Wnt'nin koreseptörleri olan LRP5 ve LRP6'yı da fosforile edebildiği gösterildiğinden aynı zamanda Wnt sinyal yolağı için pozitif regülatör olarak rol oynadığı da ileri sürülmektedir (Polakis 2007).



Şekil 2.9: GSK-3 β tarafından β -katenin fosforilasyonu (Liu vd 2002)

Çeşitli kanser türlerinde, β -katenin’de yer alan yıkım kutusu sıklıkla mutasyona (CTNNB1 mutasyonu) uğramaktadır, çünkü onkogenik aktivasyon için en temel bölgelerden biridir. Bu bölgede yer alan 4 Ser/Tyr rezidüsünden birinde meydana gelecek bir mutasyon daha sonraki fosforilasyonları da engeller. Mutant protein fosforilasyona dirençlidir ve ubiquitin aracılı yıkımdan kaçır. Böylelikle β -katenin stabil bir konuma gelir, sitoplazmik ve nükleer seviyeleri artar (Miller 2003).



Şekil 2.10: β -katenin ya da APC genindeki mutasyonlar sonucu anormal Wnt sinyal aktivasyonu (Ilyas 2005)

2.5.1.6.Kazein Kinaz I (CKI)

Serin ve treonin amino asitlerinin fosforillenmesinde görev alan bir protein kinazdır. İlk olarak sütte bulunan kazein proteinini fosforillediği ortaya konulan bu enzim o nedenle kazein kinaz olarak adlandırılmıştır. CKI enziminin memeli hücrelerinde alfa (CKI α), beta 1 (CKI β 1), gama 1 (CKI γ 1), gama 2 (CKI γ 2), gama 3 (CKI γ 3), delta (CKI δ) ve epsilon (CKI ϵ) olmak üzere 7 izoformu bulunmaktadır (Xu vd 1995, Virshup 2001). CKI enzimleri bir hücrenin hücre zarı, sitoplazma ve çekirdeğinde bulunmaktadır. Tek bir polipeptid zincirinden oluşan bu enzimler yaklaşık 30-60 kd molekül ağırlığına sahiptir ve organizmada çok sayıda biyolojik süreçte rol oynayan birçok proteinin fosforillenmesinden

sorumludur. Bu fosforillenme reaksiyonları ile proteinlerin aktifleşmesini ve buna bağlı olarak da sinyal iletimini sağlar (Xu vd 1995, Knipschield vd 2005).

CKI enzimlerinin Wnt/ β -katenin sinyal yolağında bulunan çeşitli proteinleri de fosforillediği ortaya konmuştur. Bu proteinlerden ilki hücre zarında bulunan LRP5/6'dır (He vd 2004). Sinyal aktivasyonunun başlamasıyla, konformasyonel değişikliğe uğrayan bu transmembran protein CKI γ tarafından fosforillenir. Fosforillenen diğer bir molekül ise Dvl proteinidir. Bu protein ise CKI ϵ tarafından fosforillenmektedir (Swiatek vd 2004, Verheyen ve Gothardi 2010).

CKI enziminin Wnt/ β -katenin sinyal yolağındaki en önemli görevi ise, yıkım kompleksinin yapısına katılarak, hem bu komplekste bulunan Axin ve APC'yi hem de β -katenini fosforillemesidir (Willert ve Nusse 1998, Giles vd 2003, Lustig ve Behrens 2003). Bu fosforillenmeler, GSK3 β enzimi tarafından gerçekleştirilecek fosforillenme reaksiyonları için bir hazırlık niteliğindedir, çünkü GSK3 β enziminin kinaz aktivitesi gösterebilmesi için CKI α enzimine ihtiyacı vardır (Doble ve Woodgett 2003). Bu iki kinaz, β -katenin miktarının ayarlanmasında büyük öneme sahiptir. Yıkım kompleksine bağlanan β -kateninin 45. Ser rezidüsü CKI α tarafından fosforillenir. Bu fosforillenme Thr 41, Ser 37 ve Ser 33 amino asit rezidülerinin GSK3 β enzimi tarafından fosforillenmesini sağlar (Salahshor ve Woodgett 2005, Chen vd 2008).

2.5.1.7.Kaderinler

Adezyon molekülleri, hücrelerin özgül olarak dokulara yönlendirmelerinde, birbirlerini tanımalarında, embriyogenez, hücre büyümesi, hücre farklılaşması ve inflamasyon gibi olguların düzenlenmesinde görev alırlar (Guc 2004).

Adezyon molekülleri integrinler, selektinler, immunglobulin süper-ailesine dahil adezyon molekülleri ve kaderinler olmak üzere 4 sınıfta incelenmektedir.

Kaderinler, moleküler ağırlıkları 120,000-140,000 kDa arasında değişen, yapı ve fonksiyonları açısından Ca⁺²'a bağımlı, genellikle 110 aminoasitten oluşan transmembran glikoproteinleridir (Behrens 1994). Hem adezyon bölgesi, hem de Ca⁺² bağlayıcı bölge

içerirler (Takeichi 1990). Embriyoda özgün adezyon moleküllerinin ekspresyonu, hücre göçü ve doku diferansiyasyonu için kaderinler gereklidir. Kaderinler, morfogenezi ve farklılaşmayı hızlandıran moleküllerdir. (Crockard ve Boylan, 1998; Ergüler ve ark., 2002).

Kaderinler, yapısal olarak birbirleri ile benzerlik gösterirler. Birçok tekrarlayan ilmikten (domain) oluşan ve Ca^{+2} 'a bağlanmada önem taşıyan geniş bir hücre-dışı N-ucu ile, kaderinler arasında çok iyi korunan sitoplazmik bölümlerle bağlantılı tek bir transmembran kısımdan oluşur. Sitoplazmik kısım, üç sitoplazmik protein ile ilişkilidir; bunlar **α , β ve γ -katenindir** (Seidensticker 2000, Guc 2004). Bunlar, E-kaderinin sitoplazmik uzantılarına direkt olarak bağlanırken; α -katenin bu moleküllerle hücre iskeletindeki aktin mikrofilamentleri arasındaki bağlantıyı sağlar (Wijnhoven vd 2000, Atabekoglu vd 2002). Kaderinler homofiliktir yani hem reseptör, hem de ligand görevi görürler (Nagafuchi vd 1987).

Kaderinler üzerinde buldukları dokulara göre isimlendirilirler ve bugün bilinen 5 kaderin grubu vardır. **E-kaderinler:** Epitel hücrelerinde ifade edilirler. **P-kaderinler:** Placentada ekspresyon olurlar ancak belirli dönemlerde diğer dokularda da buldukları bildirilmiştir. **V-kaderinler:** Endotel hücreleri üzerinde ifade edilirler. **N-kaderinler:** Nöral dokularda ve kas hücrelerinde ifade edilirler. **H-kaderinler:** Kalp kasında ifadeleri vardır (Rubin 2006).

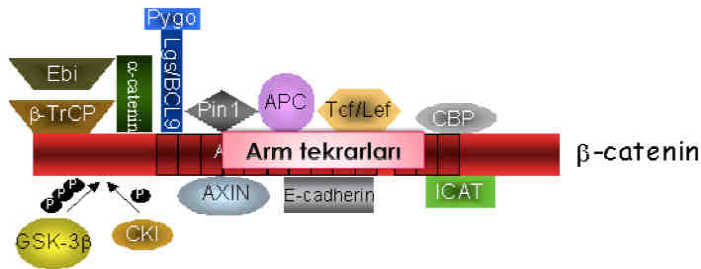
Hücrelerin birbirlerine bağlandıkları noktalarda yoğun şekilde bulunan kaderinler, görevlerini yerine getirebilmek için sitoplazmik proteinlerle (örneğin aktin) ilişki halinde olmalıdırlar. Kaderin ifade düzeyi hücre differansiyasyonu ile dinamik bir şekilde değişir. Tümör hücrelerinin düzensiz davranışı nedeniyle hücre-hücre ilişkisi tümörlerde bozulmuştur (Guc 2004, Erhan 2009).

2.5.1.8. Beta-katenin (β -Katenin)

β -katenin (CTNNB1) 3. kromozomun p22.1 bölgesinde yer alan, DNA'nın 23.2 kb'lık bir bölgesini kaplayan ve 16 eksondan oluşan bir gen dir (Nollet 1996). İlk olarak 1989 yılında transmembran kaderinlerin sitoplazmik domainine bağlı plazma membranındaki

intraselüler yüzey proteinleri olarak tanımlanmıştır. Daha sonra bu proteinin *Drosophila*'da bulunan Armadillo (Arm) isimli proteinle fonksiyonel ve yapısal homoloji gösterdiği saptanmış ve Wnt/ β -katenin sinyal yolağında transkripsiyon faktörü olarak görev yaptığı ortaya konmuştur (Behrens vd 1996, Xu ve Kimelman 2007). Böylelikle β -katenin, adeziv hücre-hücre bağlantılarında ve Wnt sinyal yolağında görevli çok fonksiyonlu bir proteindir (Şekil 2.12) (Novak vd 1999, Nelson vd 2004).

β -katenin proteini yaklaşık 300 aminoasit içeren bir amino uç, 550 aminoasit içeren orta bölge ile 100 aminoasit içeren bir karboksi uç olmak üzere 3 bölgeden oluşan 90kD'luk bir sitozolik proteindir (Akiyama 2000, Fuchs vd 2005). Amino ucu GSK-3 β için fosforilasyon bölgelerini içerirken, karboksi ucu hedef genlerin aktivasyonu için gerekli transaktivasyon bölgesini içermektedir. Proteinin orta bölgesi ise "Armadillo repeat" Armadillo (Arm) tekrarları olarak bilinen 42 aminoasitten oluşan 12 bölge içerir. Bu bölge, helikslerden oluşan bir süperheliks meydana getirir ve pozitif yüklü bir kanal oluşturur. β -katenin adezyon reseptörü kaderin, degradasyon kompleksi Axin/APC/GSK-3 β ve transkripsiyon faktörleri TCF/LEF gibi çoğu negatif yüklü ligandlarla etkileşim için bu bağlanma bölgesini kullanır. β -kateninin fonksiyonu armadillo bölgesi ile hangi faktörün etkileştiğine bağlı olarak değişir. Genelde β -katenine bağlanan proteinlerin fosforilasyonu, negatif yükü yüklenmelerini sağlar ve β -kateninin pozitif yüklü bölgesine bağlanma afinitesini artırır. Böylece ligand fosforilasyonu β -kateninin transkripsiyonda mı veya hücre-hücre adezyonunda mı kullanılacağını belirler. β -kateninin kendisinin fosforilasyonu da bazı ligand etkileşimlerini etkileyebilir. Böylelikle β -katenin farklı hücrel kompartmanlarda farklı molekülleri bağlama yeteneğine sahiptir (Şekil 2.11) (Kikuchi 2003, Kimelman ve Xu 2006).

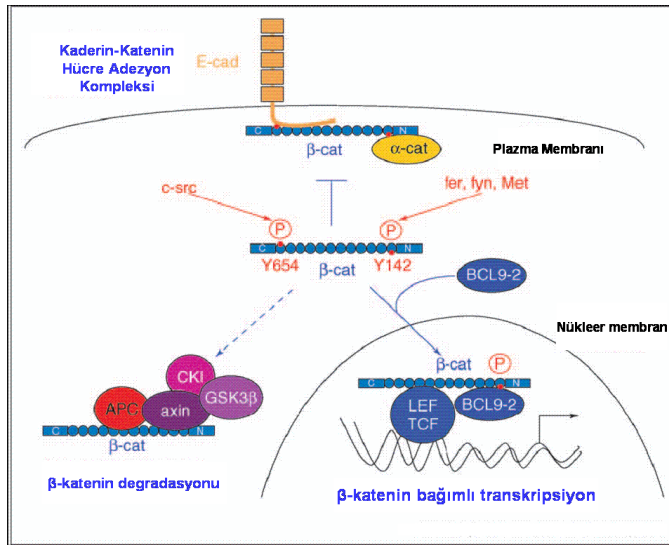


Şekil 2.11: β -kateninin yapısı

Wnt sinyal yolağında görev alan β -katenin proteini hücre içinde membrana bağlı olarak, sitozolde ve çekirdekte olmak üzere 3 farklı bölgede bulunabilir (Nelson vd 2004). Kaderin-katenin kompleksinin yapısal ve fonksiyonel bütünlüğü fosforilasyon tarafından düzenlenir. Bu kompleksin fosforilasyonunu c-src, Fer, Fyn ve Met tirozin kinazları katalizler.

β -kateninin adezyonla ilişkili önemli fosforilasyonları 142. ve 654. rezidülerdeki tirozin (Tyr) aminoasitlerinde meydana gelir. β -kateninin 654. pozisyonundaki Tyr'nin c-src tarafından fosforilasyonu E-kaderine bağlanmasında azalmaya, Tyr 142'nin Fer, Fyn veya Met tirozin kinazlar tarafından fosforilasyonu ise α -katenine bağlanmasında azalmaya yol açar. Tyr 142'den fosforile olduğunda, β -katenin BCL9-2 ile ilişki kurar ve β -katenin-BCL9-2 kompleksi çekirdeğe geçerek TCF/LEF DNA'ya bağlanan proteinler ile birlikte hedef genlerin transkripsiyonunu düzenler (Şekil 2.12).

β -katenin veya α -kateninin birlikte fosforilasyonu bazı Protein Tirozin Fosfataz (PTPaz)'lar için bir bağlanma bölgesi oluşturur ve bunlar tirozin kinazlarla rekabet ederler. Genelde tirozin kinazların aktivasyonu kaderin aracılı hücre-hücre adezyonunun kaybıyla sonuçlanır ve sitoplazmik β -katenin düzeyi artar. Tersine PTPaz'ların aktivasyonu kaderin-katenin kompleksini stabilize eder ve kaderin aracılı hücre-hücre adezyonu artar. Tirozin kinazların aktivasyonu çekirdekteki β -katenin sinyal yolunu aktive edebilir (Nelson vd 2004).



Şekil 2.12: β -kateninin transkripsiyon ve hücre adezyonundaki rolü (Brembeck vd 2006)

Bunlara ek olarak bir de β -kateninin fosforlanmasına bağılı olmayan bir yol mevcuttur. Bu yolda ise Siah-1, P53 tarafından uyarılan β -katenin ve APC'nin C terminali ile ilişki kurar. β -kateninin ubiquitinasyonuna neden olur. Böylelikle β -katenin degrade olur ve sitoplazmik seviyeleri düşer (Ilyas 2005) (Şekil 2.13-A).

Serinsöz vd (2004), AML hastalarıyla yaptıkları çalışmada, beta katenin mRNA seviyelerinin bu hasta grubunda (n=10) sağlıklı kontrol grubuna (n=33) göre istatistiksel olarak önemli ölçüde artmış olduğunu ($p<0.019$) ve buna ek olarak AML hastalarında ALL hastalarına (n=16) göre beta katenin düzeylerinin 5 kat artış gösterdiğini ($p<0.0001$) saptamışlardır. Ancak bu çalışmada AML FAB sınıflandırmasına göre M2 ve M4 alt tiplerinde beta katenin ifade düzeylerinin yüksek olduğu, bu alt tiplerin sayıları arttıkça (M0, M1, M3 gibi) beta katenin ifade düzeylerinde hastalar arasında farklılıklar ortaya çıktığı gözlenmiştir.

25 AML hastasıyla yapılan diğer bir çalışmada ise, AML hastalarının CD34+ hücrelerinde normal bireylere ait miyeloid öncü hücrelere göre beta katenin protein düzeylerinin diğer çalışmalarla uyumlu olarak değişken olduğu sonucuna varılmış ve beta katenin ifade oranlarının primer AML blastlarında çok geniş bir aralığa sahip olduğunu, bunun CD34+ yüzdesi ile korelasyon göstermediğini saptamışlardır. Ayrıca normal miyeloid hücrelerin 5-7 gün kültüre bırakılmasının ardından, bu hücrelerde farklılaşma gözleendiği ve buna bağılı olarak beta katenin protein düzeylerinde azalma olduğu gösterilmiştir (Simon vd 2005).

AML'de beta kateninin önemi Ysebart vd (2006)'nın AML hasta grubunda yapmış oldukları çalışmadan ileri gelmektedir. Bu çalışmada AML hastalarının (n=118) %61'nde beta katenin geninin ifade olduğu ancak hastalara göre bu ifade düzeylerinin çok değişken olduğu bulunmuştur. Beta katenin gen ifade oranlarının genel sağkalım (Overall survival-OS) ve hastalısız sağkalım (Relaps free survival-RFS) ile ilişkilendirildiği belirtilerek, β -kateninin AML hastalarının prognozunda ve hastalığın patogenezinde kritik bir önemi olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Yapılan bu çalışmalarla uyumlu olarak, Chen vd (2008) AML (n=59) hasta grubunda beta katenin ifade düzeylerinin araştırılması ile bu genin AML'deki prognostik rolü üzerinde durmuşlardır. AML hastalarının %22'sinde (n=13) beta katenin ifade oranlarında artış

gözlemlemişler ve bu durumun kötü prognozla ilişkilendirilebileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca <65 yaş hastalarda beta katenin düzeylerinde düşme olduğu ve iyi prognoz ile ilişki gösterdikleri saptanmıştır. Böylelikle AML'de beta kateninin bir belirteç olarak rol oynayabileceği rapor edilmiştir.

Gandillet vd (2011) ise yaptıkları bir çalışmada, beta katenin RNA ve protein düzeylerinin AML hasta grubunun (n=17) %88'nde arttığını göstermişler ve bu ifade oranlarını AML örneklerinden elde edilen CD34+ ve CD34- hücre grupları ve sağlıklı kontrol örneklerinde incelemişlerdir. Bunun sonucunda CD34 yüzdesi ile beta katenin seviyeleri arasında bir ilişki bulamamışlardır. Buna ek olarak bu çalışmada beta katenin ifade oranları ile FAB sınıflandırması, karyotip, Flt3 ve nükleofosmin mutasyonları arasında da bir ilişki saptanmamıştır.

2.5.1.9.TCF/LEF (T Cell Factor/Lenfosit enhancer binding factor)

İlk kez 1991 yılında saptanmış olan TCF/LEF transkripsiyon faktörleri, çekirdek içinde bulunurlar ve DNA'ya bağlanarak gen transkripsiyonunu aktifleştirirler. Bu nedenle birçok önemli hücresel süreçte hayati bir konuma sahiptirler (Van de Wetering vd 1991, Willert ve Jones 2006). Wnt sinyali ile stabilize olan β -katenin proteini fiziksel olarak DNA'ya bağlanamadığı için TCF/LEF transkripsiyon faktörleri ailesiyle ilişki kurarak Wnt hedef genlerini aktive eder (Ilyas 2005).

TCF/LEF, HMG "high mobility group" (Yüksek mobiliteli grup) süper ailesine ait transkripsiyon faktörleri ailesidir (Nusse 1999, Fuchs vd 2005) ve β -kateninin Arm tekrarlarına bağlanırlar (Mulholland vd 2005, Willert ve Jones 2006). TCF/LEF proteinleri transaktivasyon bölgesi içermezler, fakat hedef genlerin düzenleyici bölgelerindeki özel DNA dizilerini tanıyabilirler (Fuchs vd 2005). TCF/LEF proteinleri DNA'ya HMG bölgeleri (=DNA bağlanma bölgesi) ile bağlanarak, (A/T) (A/T) CAA (A/T) GG DNA dizisi için yüksek affinite göstermektedir.

TCF/LEF ilk olarak T hücre genlerini aktive eden faktörler olarak tanımlanmışlardır (Behrens 1996). Yaklaşık olarak 380-620 amino asit uzunluğunda olan bu proteinler, 42-68 kd ağırlığına sahiptirler. Günümüzde ise memelilerde bu ailenin 4 üyesi bilinmektedir;

LEF-1, TCF-1, TCF-3 ve TCF-4 (Shitashige vd 2008). Bu proteinler HMG bölgeleri yoluyla doğrudan DNA'ya bağlanmalarına rağmen gen anlatımını aktive edemezler, DNA sarmalını bükülmeye yönlendiren yapısal transkripsiyon faktörleri olarak iş görürler (Morin 1999, Akiyama 2000, Seidensticker ve Behrens 2000, Kikuchi vd 2006).

Wnt/ β -katenin hedef genlerinin transkripsiyonu, koaktivatörler ve korepresörlerle düzenlenir. Örneğin; β -katenin-TCF/LEF kompleksi; asetiltransferaz CBP/P300, TATA bağlayıcı protein, Pontin 52 ile kombinasyona girerek hedef genleri aktive ederler (Es vd 2003). Bu proteinlerin β -katenin/TCF kompleksi ile temel transkripsiyonel mekanizma arasında köprü görevi gördüğü düşünülmektedir. Ancak ortamda Wnt sinyal yokluğunda β -katenin çekirdeğe giremediğinden dolayı transkripsiyon faktörlerine bağlanarak onları aktifleştiremez. Bu şekilde genlerin transkripsiyonu engellenmiş olur. Bunun yanı sıra TCF/LEF proteinleri, Groucho ve C terminal bağlanma proteinleri (CtBP) denilen transkripsiyonel represörler ya da başka transkripsiyonel represörlere bağlanırlar. Bu bağlanma ile transkripsiyon faktörleri inaktif hale gelir. Bundan dolayı bu proteinler transkripsiyon inhibitörleri olarak adlandırılırlar (Ilyas 2005, Bajoghli 2007).

TCF/LEF/ β -katenin kompleksinin hedef aldığı genler 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).

Simon vd (2005) AML hastalarının primer CD34+ öncü hücrelerinde beta katenin ve APC gen mutasyonlarının tespit edilmediğini, ancak Wnt-1, Wnt-2b ve Lef-1 genlerinin ifade düzeylerinin anormal şekilde arttığını ve buna bağlı olarak AML hastalarının birçoğunda kanonik Wnt sinyal yolağının aktif olduğunu göstermişlerdir.

Neth vd'nin (2006) yaptıkları diğer bir çalışmada, sağlıklı bireylerden aldıkları mezenkimal kök hücrelere kültür ortamında Wnt3a uyguladıklarında β -katenin ve β -katenin hedef genleri olan siklin D1, matriks metalloproteinaz (MT1-MMP) gen ifade seviyelerinin Wnt sinyaline bağlı olarak arttığını göstermişlerdir.

Çeşitli kanser türlerinde, Wnt sinyal yolağındaki yeni hedef genlerin belirlenebilmesi için, mikroarray analizi ile genom ebadında çalışmalar yapılmıştır. Ancak şimdiye kadar sınırlı sayıda aday gen belirlenmiştir (Wend 2010).

2006 yılında mikroarray tekniği kullanılarak yapılan bir çalışmada, B-ALL lösemik hücre serilerinde (Nalm-6) ve primer B-ALL hücrelerinde (n=5) kültür ortamında Wnt3a'ya cevap olarak sitoplazmada beta katenin birikiminin gerçekleştiği ve beta kateninin çekirdeğe taşındığı gösterilmiştir. Ancak bazı ALL hücre serilerinde (EU12, BV173, KOPN-8) ise, yüksek doz Wnt3a'ya maruziyet proliferasyonu baskılayıcı bir etki göstermiştir. Bunun sonucunda Wnt3a ile indüklenen hücre serilerinde ve primer hücrelerde mikroarray analizi yapılarak Wnt3a'ya bağlı değişen genler bulunmuş ve hücre büyümesini düzenleyici çeşitli hedef genler belirlenmiştir. Hücre kültür ortamında 4 saat Wnt3a ile muamele sonunda 49 genin, 24 saat muamele sonrasında 33 genin ifade seviyelerindeki farklılıklar gösterilmiştir. Böylelikle Wnt sinyal yolağının B-ALL hücrelerinde büyüme düzenleyici bir rol oynadığı ortaya konmuştur (Nygren vd 2006).

Wnt sinyal ileti yolağının temel mekanizmasını kısaca özetlersek ;

Wnt sinyal varlığında; Eğer hücre bir Wnt sinyali algırsa öncelikle Wnt sinyal proteini gelir, hedef hücre zarında bulunan Fz reseptörü ve LRP5/6 koreseptörü ile ilişki kurar. Bu bağlanma ile beraberinde Wnt 2 önemli fosforillenme reaksiyonunu uyarır. Bunlardan biri LRP5/6'nın sitozol içinde kalan kısmının GSK3 β ve CKI ϵ enzimleri tarafından fosforillenmesidir. Bu kısmın fosforillenmesi, sitozol içerisinde bulunan ve Axin-APC-GSK3 β 'dan oluşan yıkım kompleksini etkiler. Bu fosforillenmenin etkisi sonucu bu kompleksi bir arada tutan Axin ile ona bağlı bulunan GSK3 β bu kompleksten ayrılarak, LRP5/6'nın sitozol içindeki fosforillenmiş kısmına bağlanır. Diğer bir fosforilleme işlevi ise, sitozolde bulunan CKI, CKII ve Par-1 enzimleri ile Dvl proteininin fosforillenmesidir. Dvl, Axin'e bağlanarak, Axin proteininde konformasyonel bir değişiklik meydana getirir. Bu değişiklik, GSK3 β 'nın Axin'den ayrılmasını sağlar. Axin'den ayrılan GSK3 β , Frat-1 tarafından inhibe edilir. Bu sayede GSK3 β 'nın β -katenini fosforilleme etkisi ortadan kalkar ve hücre içinde " β -katenin" konsantrasyonu artar. Hücre içinde biriken bu " β -katenin" başlıca iki mekanizmayı tetikler. Bunlardan birincisinde, " β -katenin" hücre membranındaki N-kaderin'in hücre içi bölümüne bağlanarak, hücreler arası bağlantıyı güçlendirici ve

stabilize edici rol oynar. İkincisinde ise, hücre çekirdeği içine girerek "Tcf/Lef" transkripsiyon faktörlerine bağlanır ve Wnt sinyal yolunun hedef aldığı genlerin transkripsiyonlarına olanak sağlar (Ilyas 2005, Tanır ve Demirezen) (Şekil 2.13).

Wnt sinyal yokluğunda; Wnt hücre zarındaki Fz ve LRP5/6 reseptörlerine bağlanamaz. Dolayısıyla sinyal mekanizmasının aktivasyonunda rol oynayan 2 fosforillenme işlemi gerçekleşemez. Fosforillenme reaksiyonları gerçekleşmediği için, yıkım kompleksi aktif durumdadır. Bu yıkım kompleksi üyeleri olan GSK-3 β ve beraberindeki "Axin" ve tümör baskılayıcı faktör olan "APC", " β -katenin" in fosforilasyonunu N-ucunda yer alan serin ve treonin amino asitlerinden (kodon 33, 37, 41,) kazein kinaz-1 (CKI) ise Ser 45'den yapmaktadır. Bu fosfoaminoasitler β -katenine 2. bir protein kompleksi (ubikutin ligaz kompleksi) için bağlanma bölgesi oluştururlar ve ubikütinasyonu başlatırlar. Böylelikle β -TRCP (β -transducin repeat containing protein), proteozomal degradasyon için proteini hedefler ve β -kateninin degradasyonu sağlanır. " β -katenin" in degradasyonu da, hücre çekirdeğinde "Tcf/Lef" grubu transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanarak Wnt sinyal yolunun hedefi olan genlerin transkripsiyonlarını baskılamalarına imkan sağlar (Orsulic 1999, Miller 2002, Miller 2003, Ilyas 2005, Daugherty ve Gottardi 2007). (Şekil 2.13).

Yapılan çalışmalarda gösterilen çeşitli kanser türlerinde Wnt sinyal yolağının anormal aktivasyonu sonucu meydana gelen değişimler aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

Çizelge 2.3. Farklı kanser türlerinde Wnt Sinyal yolağında saptanan değişimler

Wnt Sinyal Yolağı komponentleri	Değişim	Kanser çeşidi	Referans
Wnt	Aşırı ifadenleme (Overekspresyon)	NSCLC CLL Gastrik kanser	You vd 2004 Lu vd 2004 Kim vd 2003, Saitoh vd 2002 Rhee vd 2002
		HNSCC Kolorektal Ovaryum BCC Göğüs	Holcombe vd 2002 Ricken vd 2002 Lo Muzio vd 2002 Jonsson vd 2002
sFRP (Wnt inhibitörü)	Düşük ifadenleme (Downregülasyon)	Göğüs	Klopoecki vd 2004, Ugolini vd 2001
	Düşük ifadenleme (Downregülasyon)	Mesane Deri Kolorektal	Stoehr vd 2004 Lee vd 2004 Suzuki vd 2004, Kim vd 2002
	Aşırı ifadenleme (Overekspresyon)		Caldwell vd 2004 Wissmann vd 2003
WIF-1 (Wnt inhibitörü)	Düşük ifadenleme (Downregülasyon)	Prostat NSCLC Prostat Göğüs Akciğer Mesane	Mazieres vd 2004 Wissmann vd 2003 Wissmann vd 2003 Wissmann vd 2003 Wissmann vd 2003
LRP-5	Aşırı ifadenleme (Overekspresyon)	Osteosarkom	Hoang vd 2004
Frizzled (Fz)	Düşük ifadenleme (Downregülasyon)	Prostat HNSCC Kolorektal Ovaryum Özefagus Gastrik	Wissmann vd 2003 Rhee vd 2002 Holcombe vd 2002 Wissmann vd 2003 Tanaka vd 1998 Kirikoshi vd 2001
Dishevelled (Dvl)	Aşırı ifadenleme (Overekspresyon)	Prostat Göğüs Deri Serviks	Wissmann vd 2003 Nagahata vd 2003 Uematsu vd 2003 Okino vd 2003
Frat1	Aşırı ifadenleme (Overekspresyon)	Pankreatik Özefagus Serviks Göğüs Gastrik	Saitoh vd 2002 Saitoh vd 2002 Saitoh vd 2002 Saitoh vd 2002 Saitoh vd 2001
CTNNB1	Fonksiyon kazanımı (Gain of function)	Gastrik Gastrik Kolorektal Ovaryum Hepatoselüler	Clements vd 2002, Park vd 1999 Morin vd 1997, Ilyas vd 1997 Gamallo vd 1999, Wu vd 2001 Sato vd 2000, Wong vd 2001 Abraham vd 2002
		Pankreatik Tiroid Prostat Deri Kolorektal	Garcia-Rostan vd 1999, 2001 Cheshire vd 2000, Voeller vd 1998 Reifenberger vd 2002 Fearon vd 1990, Rowan vd 2000
APC	Fonksiyon kaybı (Loss of function)	Deri Medulloblastoma	Reifenberger vd 2002, Rubinfeld vd 1997 Koch vd 2001, Huang vd 2000
Axin	Fonksiyon kaybı (Loss of function)	Hepatoselüler Medulloblastoma	Sato vd 2000, Taniguchi vd 2002 Dahmen vd 2001, Yokota vd 2002

Beta kateninin stabilizasyonunu içermeyen yollar, kanonik olmayan yollardan oluşmaktadır. Birbirinden farklı en az 7 adet kanonik olmayan yolak mevcuttur. Bunlardan bazıları Fz reseptörlerini kullanmaktadır. En iyi karakterize edilen Fz-bağımlı kanonik olmayan yolak Wnt-cGMP/Ca²⁺ yolağıdır (Kokolus ve Nemeth 2010).

2.5.2.Wnt/Kalsiyum (Ca²⁺) Yolağı

Wnt/Ca²⁺ sinyal yolağı ile ilgili bilgiler Danio rerio (Zebra balığı) embriyosu ile yapılan çalışmalar sırasında ortaya konmuştur. Bu sinyal yolağı, Wnt proteininin hedef hücre zarında bulunan reseptörlerine bağlanması ile başlamaktadır (Kohn ve Moon 2005). Bu başlama sinyali hücre içi kalsiyum miktarının artmasına neden olur. Artan kalsiyum, sitozolde bulunan Ca²⁺/Kalmodulin bağımlı Protein kinaz II (CAMKII) ve Protein kinaz C (PKC) gibi çeşitli enzimlerin aktifleşmesine neden olmaktadır. CamKII, kalsinörin ve sonrasında NF-AT ailesi kalsinörin bağımlı transkripsiyon faktörlerini aktive eder (TAK-NLK kinazları) (Şekil 2.5). Enzimlerdeki bu aktifleşmeye bağılı olarak bu sinyal yolağının hücre göçü ve hücre proliferasyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (Kühl vd 2000, Lustig ve Behrens 2003, Komiya ve Habas 2008).

İlginç olan birçok çalışmada gösterildiği gibi kanonik ve kanonik olmayan yollar arasında bir çapraz durumun söz konusu olmasıdır. Bu çalışmalarda Wnt5a'nın kanonik olmayan yolağı uyardığı, kanonik Wnt yolağını ise inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu görüş hem in vivo hem de in vitro şartlarda hematopoetik kök hücreleri içermektedir. Bu mekanizmada kanonik olmayan sinyal, korunmuş etkisini kanonik yolak üzerinde göstermektedir, ancak bu durum henüz belirsizdir. Ca²⁺ aracılı TAK1-NLK kinazların aktivasyonunun beta katenin degradasyonunu uyararak bu durumu düzenlediği belirtilmiştir (Kokolus ve Nemeth 2010).

Topol vd (2003) Wnt5a'nın beta katenin degradasyonunu, Ebi-APC-Siah2 ubiquitinasyon kompleksi vasıtasıyla Ca²⁺dan bağımsız bir şekilde sağladığını göstermişlerdir. Ancak Wnt5a'nın bu kompleks oluşumunu nasıl sağladığı bilinmemektedir. Bunun aksine Mikels ve Nusse Wnt5a'nın kanonik yolağı kalsiyumdan bağımsız bir şekilde inhibe ettiğini, fakat bu durumun beta katenin degradasyonunu uyarmadan gerçekleştiğini göstermişlerdir.

Yakın zamanda Wnt5a'nın Wnt3a (kanonik Wnt sinyalinin aktivatörü) ile LRP5/6 koreseptöre bağlanmak için yarışa girdiği de gösterilmiştir (Bryja vd 2009).

Martin vd (2010) 11 AML hücre serisinde ve 252 AML hasta grubunda yaptıkları çalışmada, 7 hücre serisinde ve hastaların %43'ünde Wnt5a'nın hipermetile olduğunu bulmuşlardır ve bu epigenetik durumun AML hastalarında relaps+mortalite yüzdelerini artırdığını belirtmişlerdir. Bununla birlikte Wnt5a'nın hipermetilasyonun siklin D1 gen ifade oranını artırdığını ve AML hastalarında kötü prognoza neden olduğunu bildirmişlerdir.

2.5.3.Wnt/Planar Hücre Polaritesi (PCP) Yolağı

Wnt'ler tarafından aktive edilen hücresel davranışları düzenleyen 3. sinyal yolağıdır. İlk olarak Drosophila'da tanımlanan bu yolak hücre göçünde ve hücre iskelet elemanlarının düzenlenmesinde görev aldığı yapılan genetik çalışmalarla ortaya konmuştur ancak bu sinyal yolağının memelilerdeki görevi üzerine hala çalışmalar yapılmaktadır (Fanto ve McNeill 2004, Kikuchi ve Yamamoto 2006, Karner vd 2009, Dale vd 2009).

Drosophila'da ve omurgalılarda bu yolak için farklı bir Wnt ligandı saptanmamış olup, Wnt5a ve Wnt11'in bu sinyal yolağını aktive ettiği bilinmektedir. Bu yolak Rho GTPazları ve bunlarla ilişkili proteinler olan RhoA, Akt1 (Rac) ya da Cdc42 aktivasyonlarını içermektedir (Şekil 2.5) (Espada vd 2009).

2.6.Wnt Sinyal Yolağında rol oynayan inhibitörler

Wnt/ β -katenin sinyal yolağı aktivasyonunun kontrol edilmesi hayati önem taşımaktadır. Wnt proteinlerinin Fz/LRP reseptör kompleksine bağlanmasını önleyerek, sinyal yolağının kontrollü şekilde inhibe edilmesi ekstraselüler matrikste (ECM) bulunan çeşitli inhibitör moleküller tarafından gerçekleştirilir. Bu inhibitörler, sFRP ve Dkk protein aileleri olmak üzere 2 fonksiyonel gruba ayrılmaktadır (Çizelge 2.4) (Kawano ve Kypta 2003, Elston ve Clifton-Bligh 2010, Staal 2010).

Çizelge 2.4. Wnt/ β -katenin sinyal yolağını kontrol eden inhibitör moleküller ve özellikleri

Moleküller	Amino asitler	Moleküler Ağırlık (Da)	Etki Mekanizması
sFRP-1	314	35386	Wnt ve Fz'ye bağlanır
sFRP-2	295	33490	Wnt'ye bağlanır
sFRP-3	325	36254	Wnt'ye bağlanır
sFRP-4	346	39827	Wnt'ye bağlanır
sFRP-5	317	35563	Wnt'ye bağlanır
Dkk-1	266	28672	LRP5/6'ya bağlanır
Dkk-2	259	28447	LRP5/6'ya bağlanır
Dkk-3	350	38291	Beta katenine bağlanır
Dkk-4	224	24876	LRP5/6'ya bağlanır

1.Grup; sFRP Ailesi (Secreted Frizzled-Related Proteins); *sFRP1*, *sFRP2*, *sFRP3*, *sFRP4*, *sFRP5*, *WIF-1* (Wnt inhibitory factor-1) ve *Cerberus* bu grup içerisine girmektedir. Bu proteinler ya direkt olarak Wnt ligandlarına bağlanarak, ya da Wnt reseptörlerine bağlanarak Wnt'nin reseptörleri ile ilişki kurmasına engel olurlar (Kawano ve Kypta, 2003, Bovolenta vd 2008). Böylelikle hem kanonik hem de kanonik olmayan Wnt sinyalini inhibe ederler (MacDonald 2009) (Şekil 2.14b).

Son yıllarda Wnt inhibitörlerinin tümör baskılayıcılar gibi hareket ettikleri ve promotor hipermetilasyonu yoluyla baskılandıklarına dair yapılan birçok çalışma mevcuttur. Bununla birlikte, sFRP ailesi üyelerinin gen ifade düzeylerindeki değişimler göğüs, servikal, gastrik, kolon ve deri gibi çok çeşitli kanser türlerinde gözlenmektedir (Reguart vd 2005). Suzuki vd'nin (2004) yaptığı bir çalışmada, sFRP'nin epigenetik olarak inaktivasyonun kolorektal kanserlerde ortaya çıktığı bulunmuştur.

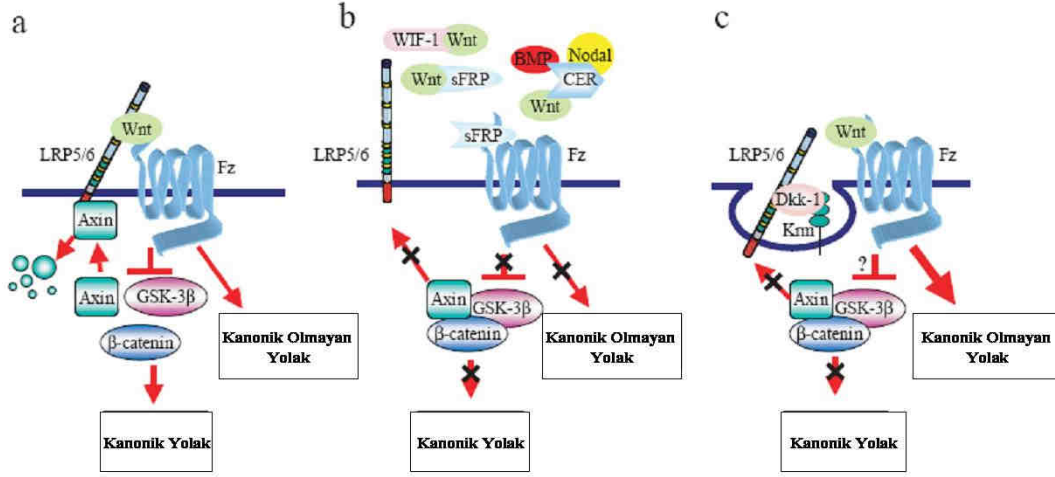
WIF-1 ise çeşitli kanser türlerinde özellikle akciğer kanserinde promotor bölgesindeki CpG adacıklarının hipermetile olmasıyla ifade düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir (Wissmann vd 2003).

2.Grup; Dickkopf (Dkk) ailesi; *Dkk1*, *Dkk2*, *Dkk3* ve *Dkk4* olmak üzere 4 adet protein içerir (Kawano ve Kypta 2003, Pinzone vd 2009). Bu proteinler direkt Wnt'ye bağlanmazlar, Wnt'nin ilişki kurduğu koreseptör olan LRP5/6'ya bağlanarak LRP-Fz-Wnt kompleksi oluşumunu engelleyerek, Wnt sinyalini inhibe ederler (Wend 2010, MacDonald 2009) (Şekil 2.14c). Her iki durumda da sinyal yolağı inhibe edilmiş olur.

Bu 2 grup inhibitörden farklı olarak bir de Shisa proteinlerinden bahsedilmektedir. Shisa proteinleri, Fz reseptörlerine endoplazmik retikulum (ER) içerisinde iken bağlanır ve bu reseptörlerin hücre yüzeyine ulaşmalarını engeller (MacDonald 2009).

2006 yılında Gomez vd'nin yaptığı çalışmada Wnt inhibitörlerinden sFRP1, sFRP2, sFRP3, sFRP4, sFRP5, WIF-1 ve Dkk3'ün promotor bölgelerinin anormal metilasyonu sonucunda ALL hastalarında ve ALL hücre serilerinde bu inhibitörlerin ifade düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir.

Benzer çalışma Valencia vd (2009) tarafından 4 AML hücre serisinde ve 184 AML hastasında sFRP1, sFRP2, sFRP4, sFRP5 ve DKK1, DKK3 genlerinin promotor bölgeleri hipermetile olarak bulunmuştur. Bu şekilde Wnt inhibitörlerinin metilasyonu AML hastalarında kötü prognozla ilişkilendirilmiştir.



Şekil 2.14. Wnt İnhibitörlerinin etki mekanizmaları

Tüm hematolojik malign hastalıklarda (AML, ALL, KML, MM (Multiple Myeloma)) Wnt sinyal yolağında rol oynayan biyomoleküller ile ilgili olarak yapılan çalışmalar Çizelge 2.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 2.5. Hematolojik Malign hastalıklarda saptanan Wnt Sinyal yolağındaki değişimler (Khan vd 2006)

Wnt Sinyal Yolağı Komponentleri	Değişim	Lösemi Tipi	Etkisi
APC	Metilasyon	T lösemi/lenfoma	Hastaların %50'sinde gözlenmiş
β -Katenin	Aşırı ifadenme	T-ALL AML KML	β -Kateninin baskılanmasıyla artmış apoptoz ve azalmış proliferasyon Aktif kanonik Wnt yolağı
γ -Katenin	AML1-ETO,PML-RARA ya da PLZF-RARA'dan kaynaklanan aktivasyon	AML	Artmış self renewal Artmış proliferasyon ve self renewal
Wnt1	Aşırı ifadenme	AML	Bilinmiyor
Wnt2b	Ekzojen Aşırı ifadenme	MM AML	Artmış migrasyon Bilinmiyor
Wnt3	Aşırı ifadenme	MM	Bilinmiyor
Wnt3a	Ekzojen	KLL	Artmış proliferasyon Artmış migrasyon
Wnt4	Ekzojen	MM	Artmış migrasyon
Wnt5a	Düşük ifadenme Aşırı ifadenme	ALL MM	Bilinmiyor Bilinmiyor
Wnt5b	Aşırı ifadenme	KLL	Bilinmiyor
Wnt6	Aşırı ifadenme	KLL	Bilinmiyor
Wnt7a	Aşırı ifadenme	MM	Bilinmiyor
Wnt10a	Aşırı ifadenme	KLL	Bilinmiyor
Wnt10b	Aşırı ifadenme	MM	Bilinmiyor
Wnt11	Aşırı ifadenme	MM	Bilinmiyor
Wnt13	Aşırı ifadenme	MM	Bilinmiyor
Wnt14	Aşırı ifadenme	KLL	Bilinmiyor
Wnt16	Aşırı ifadenme	KLL	Bilinmiyor
Wnt16b	t(1;19) sonucunda Aşırı ifadenme	B-ALL	Wnt16b'nin baskılanması sonucu apoptoz ve azalmış proliferasyon Bilinmiyor
Fzd3	Aşırı ifadenme	KLL	Bilinmiyor
Fzd4	Flt3 mutasyonu sonucunda Aşırı ifadenme	AML	Bilinmiyor,Hastaların %30'nda gözlenmiş
Dkk1	Aşırı ifadenme	MM (matür fenotip)	Fokal kemik lezyonları ile ilişkili
Dkk3	Metilasyon	ALL	Wnt cevabında artış
sFRP2	Aşırı ifadenme	MM	Fokal kemik lezyonları ile ilişkili
Bcl9	t(1;14) sonucunda Aşırı ifadenme	Pre- B ALL	Bilinmiyor
	Aşırı ifadenme	Non-Hodgkin Lenfoma	Bilinmiyor
	Aşırı ifadenme	MM	Bilinmiyor

2.7. Wnt/ β -katenin Sinyal Yolağının AML'deki rolü

RAS ailesi üyeleri, FLT3 ve KIT reseptör tirozin kinazlar gibi hematopoezin önemli sinyal yolaklarında meydana gelen ve diferansiye olmamış hücrelere proliferasyon ve hayatta kalma avantajı sağlayan genetik değişimler AML'nin ortaya çıkmasında çok önemlidir. FLT3, KIT ve RAS mutasyonlarının tümü AML'li olguların yaklaşık % 50'sinde görülmektedir. Hastaların diğer kısmında da sinyal yolaklarının aktive olmasını sağlayacak başka genlerin mutasyonlarının varlığı olasıdır. AML'de anormal sinyal aktivasyonu hematopoetik kök hücrelerin sağkalımını ve proliferasyonunu artırmaktadır. RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT gibi yolaklarda içerilen çok sayıda mutant sinyal proteinleri AML'de tanımlanmıştır (Scholl vd 2008).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise, AML'de Wnt/ β -katenin yolağının aktivasyonu ve β -katenin birikiminin gösterilmesi hastalığın patogenezinde bu yolağın bozulduğunu gösteren kanıtlardır (Mikesh vd 2007). AML'de şimdiye dek β -katenin mutasyonlarına hiç rastlanmamıştır, böylelikle bu durum bu yolağı tetikleyen başka mekanizmaların varlığının bir göstergesi olmuştur (Gandillet vd 2011). AML'de Flt3 reseptör tirozin kinaz mutasyonları, t(15;17), t(8;21) translokasyonları sıklıkla gözlenmekte olup, bu genetik anomalilerin anormal Wnt/ β -katenin sinyali ile ilişkili olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir. Fukumoto vd (2007) yaptıkları çalışmada, beta katenin yıkım kompleksinde rol oynayan GSK3 β 'nin, PI3K/Akt yolağı için iyi bir hedef olduğunu saptamışlardır. GSK3 β 'nin Akt bağımlı fosforilasyonu, yıkımına neden olurken bu mekanizmanın Flt3 mutasyonları ile uyarılabileceği de belirtilmiştir (Mikesh vd 2007). Aynı zamanda yine Flt3 mutasyonları tarafından Wnt reseptörü olan Fz 4'ün ifadesinin artışı beta katenin aktivasyonuna öncülük etmektedir (Gandillet vd 2011). Buna ilaveten yakın zamanda AML'de sFRP1, sFRP2, sFRP4, sFRP5, WIF1, DKK3 gibi Wnt yolağı inhibitörlerinin promotor hipermetilasyonu ile sessizleşerek Wnt yolağını aktif konuma geçirdiğine dair çalışmalar mevcuttur (Griffiths vd 2010).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMA GRUBUNUN OLUŞTURULMASI

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı ve Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvar'ında gerçekleştirilmiştir. Ankara Üniversitesi, Hacettepe Üniversitesi ve Gazi Üniversitesi Hematoloji Bilim Dallarında AML tanısı almış, beta katenin gen ifade düzeyleri laboratuvarımızda belirlenen 19 hasta ve daha önceden herhangi bir malign hastalık tanısı almamış 3 sağlıklı bireyin kemik iliği (K.İ)/kan örnekleri tez çalışmasına dahil edilmiştir.

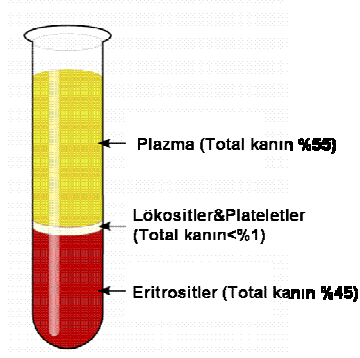
RNA'ları çalışılacak bireylerin çalışmaya dahil edilmelerine dair izin kağıtları kendilerinden ve/veya yakınlarından alınmıştır.

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. CD34+ Hematopoetik Kök Hücre (HKH) Seçimi ve Primer Kültürü

Hematopoetik Kök Hücrelerin en önemli belirteçlerinden birisi CD34'dür. CD34 antijenini eksprese eden hücrelerin ayrıştırılması yolu ile kök hücre içeren bir kemik iliği süspansiyonu elde etmek mümkün olmaktadır.

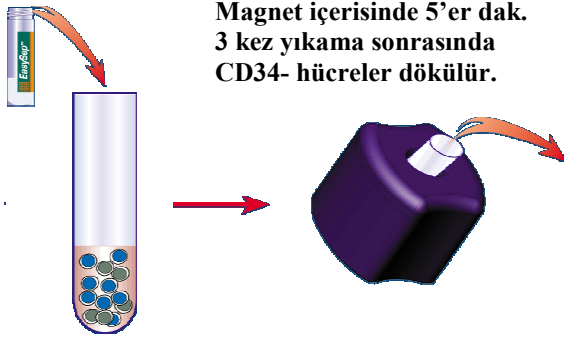
İlk olarak hasta ve sağlıklı bireylerden alınan örneklerin (kemik iliği ya da kan) üzerine aynı volümde "Phosphate Buffer Solution (PBS)" (Thermo Scientific Hyclone, USA) eklendi. Üzerine kan/kemik iliği ile aynı volümde olmak üzere fikol (PAA, Avusturya) tüpün yan duvarından çok yavaşça sızdırılarak bırakıldı. Yoğunluğu yüksek bir sıvı olduğu için hemen dipte birikir. Örneğin; 5 cc kemik iliği/kan + 5 cc PBS ve sonra 5 cc fikol ilave edildi. Tüpler hiç karıştırmadan ve sarsmadan 1200 x g'de 20 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında en altta eritrositler çöker, eritrositlerin üzerinde yoğunluğu yüksek olan fikol ve en yukarıda PBS ve plazma vardır. Fikol ve PBS birleşim yerinde bir bulut şeklinde mononükleer hücreler (Lökositler, plateletler) yer alır. Pastör pipeti ile sıvının içine girilerek mononükleer hücreler toplandı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Santrifüj sonrasında kan komponentleri

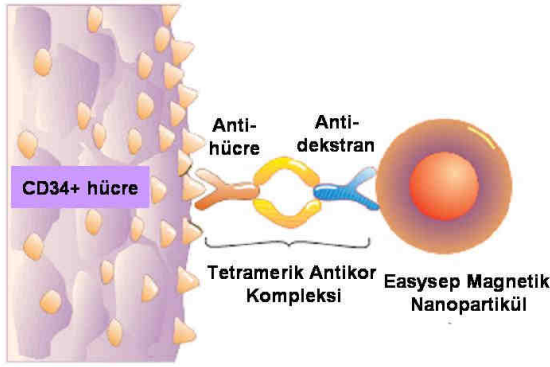
Bu mononükleer hücrelerden, CD34+ hücrelerin eldesi için EasySep CD34+ izolasyon kiti (Stem cell, Kanada) kullanılmıştır. Bu kit, CD34+ hücrelerin ayırımında kullanılmak üzere "CD34 pozitif ayırma kokteyli (Stem cell, Kanada)" ve "manyetik işaretleme için nanopartikül (Stem cell, Kanada)" içerir. Mononükleer hücreler öncelikle kokteyl ile karıştırıldı ve 15 dk oda sıcaklığında magnet içerisinde inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında manyetik nanopartiküller tüp içerisine ilave edilerek magnet dışında 10 dk bekletildi. Daha sonra PBS-%2FCS-EDTA karışımı ile tüp içerisindeki volüm 2.5 ml'ye tamamlandı ve tüp tekrardan magnet içerisinde koyularak 5 dk. oda sıcaklığında bekletildi. 5 dk.nın sonunda tüp magnetin içerisinde iken magnet ters çevrilerek nanopartiküller ile işaretlenmemiş hücreler döküldü (CD34- hücreler). Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı. Artık tüpün dibinde kalan istenilen CD34+ hücreleridir. Bu CD34+ hücreler üzerine 1 ml besiyeri ilave edilerek, 6'lı plaklara (Orange Scientific, Belçika) ekim yapıldı.

Elde edilen CD34+ hücreler, hematopoetik kök 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 CO₂ içeren ortamda 1-2 gün boyunca inkübe edildi. Kültür sonunda 4-5x10⁵ hücre/ml elde edildi.



Mononükleer hücreler önce EasySep CD34+ ayırma kokteyli (15dk.) ile ve sonra manyetik nanopartiküller (10dk) ile muamele edilir.

Şekil 3.2. CD34+ HKH İzolasyonu



Hedef hücreler, Tetramerik Antikor Kompleksi (TAC) kullanılarak dekstran kaplı manyetik nanopartiküller ile spesifik olarak işaretlenmiştir. Bu kompleks hem dekstran hem de hedef hücre yüzey antijenini tanır.

Şekil 3.3. Tetramerik Antikor Kompleksi (TAC) Teknolojisi

3.2.2. Flow (Akım) Sitometri (FCM) Analizi

Akım sitometresinin temel prensibi, bir süspansiyon halindeki hücre ya da partiküllerin lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilerek hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyallerin toplanarak analiz edilmesidir. Oluşan sinyallerin kaynağı hücrenin büyüklüğü, granularitesi gibi fiziksel özellikleri yanında hücreye bağlanan çeşitli florokromlar da olabilmektedir. Böylece hücre ya da partikülün immunfenotipi, DNA içeriği, enzim aktiviteleri, hücre membran potansiyeli, canlılığı gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir.

Kültüre edilen hücreler, kültürün 2. gününde toplanarak yüzeylerindeki CD34 ifadesi FCM ile değerlendirildi. Bu amaçla toplanan hücrelerin 100 µl'si üzerine 10'ar µl CD34._{PEerCP}, CD45._{FITC}, CD33._{PE} antikorları (BD, San Jose USA) eklenerek 20 dk oda ısısında karanlıkta bekletildikten sonra bağlanmayan antikorlar bir yıkama işlemi ile uzaklaştırılarak örnekler

FCM'de değerlendirildi (FACS Calibur, BD, San Jose USA). Cihazın günlük ayar ve kontrollerinin yapılmasını takiben tüpteki hücrelerin 10.000 tanesine ait veriler toplanarak kaydedildi ve CELL Quest yazılımını kullanarak veriler analiz edildi.

3.2.3. RNA İzolasyonu

Trizol (Invitrogen, ABD) fenol ve guanidin izotiyosiyanat'dan meydana gelen tek fazlı bir solüsyondur. Chomczynski ve Sacchi tarafından 1987'de tanımlanan protokol doku ve hücreden total RNA, DNA ve protein izolasyonu için kullanılmaktadır. Trizol, rneğin homojenizasyonu ya da lizisi sırasında hücreleri parçalayıp, hücre bileşenlerini çözerken RNA bütünlüğünü sağlar.

Homojenizasyon:

Kültür ortamındaki hücreler 300 x g'de 5 dk santrifüj edildi ve supernatant kısım atıldı. Pelet zerine (1×10^6 hücreye 1 ml Trizol) Trizol eklendi.

Faz Ayrımı:

Homojenize edilmiş hücreler 15-30°C'de 5 dk inkübe edildi. Her tüpe 0.2 ml kloroform (Merck, Almanya) eklendi. Tüpler elle 15 sn. boyunca sallandı. Daha sonra 15-30°C'de 10 dk inkübe edildi. 12,000 x g.'de 2-8°C, 13 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası alttaki faz kırmızı fenol-kloroform fazı, ara faz ve renksiz-akıcı üst faz olmak üzere 3 faz oluştu. RNA st fazdadır. (DNA ara fazda ve protein ise alt fazdadır. Bu fazlar saklandı.)

RNA ktrmesi:

Üst faz yeni bir tüpe aktarıldı. zerine 0.5 mL izopropil alkol (Merck, Almanya) eklendi. 15-30°C'de 10dk inkübe edildi. Tüpler 12,000 x g.de 10 dk 2-8°C'de santrifüjlendi. RNA tüpün dibinde jel benzeri bir pelet oluşturdu.

RNA Yıkaması:

Süpernatant atıldı, 1 ml %75'lik etanol (Merck, Almanya) eklendi. Örnekler vortekslendi ve 7,500 x g.de 5 dk 2-8°C'de santrifüjlendi.

RNA'nın Yeniden Çözülmesi:

RNA pelleti oda sıcaklığında bekletilerek kurutuldu. Sonrasında RNA, 35µl RNaz içermeyen DEPC'li (Applichem, Almanya) su içinde çözüldü.

% 0,1 konsantrasyonda 100 ml steril distile su (dH₂O)'ya 0,1 ml DEPC (Diethylpyrocarbonate) eklendi. Bu solüsyon oda sıcaklığında 1 saat bekletildi, ardından otoklavlanıp (15 dakika, 100°C) soğutularak kullanıldı.

3.2.4. RNA Kantitasyonu

Elde edilen RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrik yöntemle belirlendi.

3.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz (Pronase) kullanılacağı amaca uygun olarak belirli yüzdelerde hazırlanır. Biz bu çalışmamızda elde edilen RNA ürünlerini %1'lik agaroz jelde değerlendirdik. %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 ddH₂O ile seyreltilmesiyle hazırlanır.

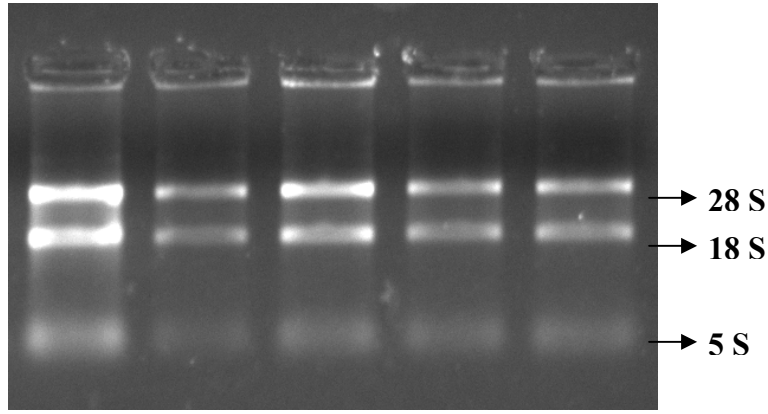
TBE 5X solüsyonunun hazırlanışı:

54 g Trizma[®] (Biobasic, Kanada),

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

20 ml 0,5 M EDTA (Merc, Almanya) ve deiyonize su (ddH₂O) ile 1 L'ye tamamlanarak hazırlanır.

Agaroz istenilen yüzdelerde hazırlandıktan sonra mikrodalga fırında (Arçelik, Türkiye) kaynatıldı. Üzerine 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 Mavisini (BBF, Amresco, USA) ile karıştırılıp jele yüklendi. 70 V akımda 20 dk kadar yürütüldü. Ultraviyole ışıkta incelendi. Quantum-ST4 100/26MX, Vilber/Courmat jel görüntüleme cihazında fotoğraflandı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. CD34+ HKH'den izole edilen RNA'ların %1'lik Agaroz Jel görüntüsü

3.2.6. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time PCR)

Bu çalışmada qRT-PCR yöntemi kullanılarak beta 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 (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. c-DNA sentez protokolü

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

qRT-PCR uygulamalarında kullanılacak olan beta katenin ve hprt (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) (Housekeeping/referans gen: Her dokuda hücre hayatini 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: TGACACTGGCAAAACAATGCA

Hprt: 5'R: GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT

Bu primerler ile elde edilen cDNA'lar kullanılarak primerlerin optimizasyonu Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) aracılığıyla değişik sıcaklıklarda (55°C ve 60°C) denendi (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. PCR protokolü

PCR Mix'inin Hazırlanışı:				
Komponentler	Hacim (55°C)	Hacim (55°C)	Hacim (60°C)	Hacim (60°C)
10xBuffer	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl	2.5 µl
MgCl₂	1.5 µl	2µl	1.5 µl	2µl
dNTP	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl
Primer Forward	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl
Primer Reverse	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl	0.5 µl
Taq Polimeraz	0.2µl	0.2µl	0.2µl	0.2µl
dH ₂ O	17.3µl	16.8µl	17.3µl	16.8µl
c-DNA	2µl	2µl	2µl	2µl

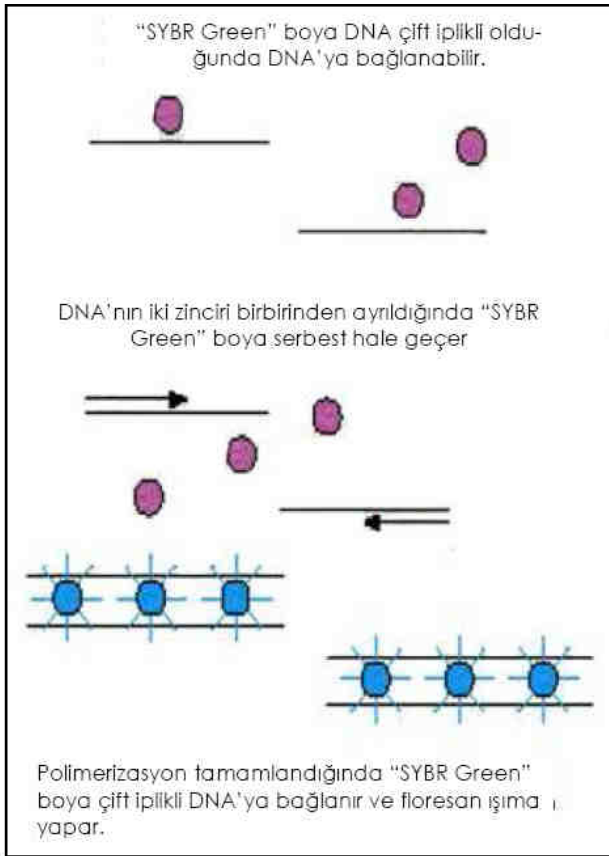
"SYBR Green" (Roche, Almanya) floresans boyası kullanılarak primerlerin optimize edildiği sıcaklık olan 60°C'de kantitasyon (Eş Zamanlı PCR) yapıldı (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. qRT-PCR protokolü

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

Bu yöntemde kullanılan "Sybr Green" floresan boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlandığından, çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak PCR cihazında okunan floresanın miktarı da eş zamanlı olarak artar. SYBR Green en fazla kullanılan boya çeşiti olup 497 nm dalga boyunda yükseltgenir ve 520 nm dalga boyunda indirgenir. Çift sarmal DNA'nın küçük oluşuna bağlanan boya 30 amplifikasyon döngüsü sonrası yalnızca aktivitesinin % 6'sını kaybeder. Çoğaltımın başında reaksiyon karışımında çift zincirli DNA molekülü, primerler ve SYBR Green boyası bulunmaktadır. Bağlı olmayan serbest DNA molekülü çok az bir floresan ışımaya yapar. Primerler bağlanıp uzama başladığında boya molekülü çift zincirli DNA'nın arasına girer ve floresan yayılımı başlar. Başlangıçtaki döngü boyunca sinyal zayıftır; ürün miktarı arttıkça floresan miktarı da hızla artar. Çoğaltılan DNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için DNA'ların erime eğrisi analizleri ("melting curve", "dissociation") yapılması

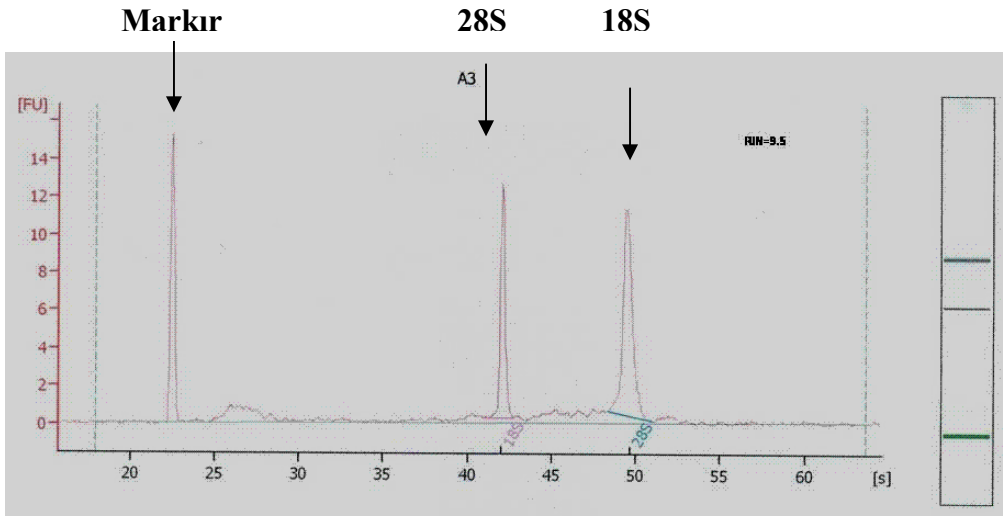
gerekmektedir. Erime eğrisi analizi yapılmak istendiğinde cihaz PCR tüplerini yavaşça ısıtmaya başlar. Çift zincirli DNA birbirinden ayrılmaya başladığında (melting temperature= T_m) floresan boya serbest kalır ve okunan floresan miktarı da düşer. Her bir DNA'nın belirli bir erime sıcaklığı (T_m) derecesi vardır. Bu erime sıcaklığı çoğalan DNA parçalarının uzunluğuna ve içerdiği GC/AT oranına bağlıdır. Spesifik olmayan ürünlerin çoğalmasında (primer dimer'lerinde) aradığımız DNA parçasının T_m derecesi arasında farklılık olacaktır. T_m derecesinin farklı olması her ürünün kendine özgü uzunluğu ve gen dizisi içermesindedir. Bu yüzden T_m sıcaklığı her ürün için özeldir.



Şekil 3.5. Sybr Green Yöntemi

3.2.7. RNA Kantitasyonu

Hasta ve sağlıklı örneklerin Mikroarray analizlerine başlanmadan önce tüm örneklerden elde edilen RNA'ların istenilen kalitede olup olmadığını gösterebilmek için Biyoanalizörde (Agilent, ABD) değerlendirmeleri yapıldı.



Şekil 3.6. RNA örneğinin Biyoanalizördeki değerlendirilmesi

3.2.8. Mikroarray Analizi

Wnt sinyal yolağındaki genlerin araştırılmasında çeşitli metodlar kullanılmıştır. Ancak bunlar içerisinde ifade olan gen profillerini çıkarabilme imkanı sağlayan Mikroarray tekniği çok geniş kapsamlı bir teknoloji olup, aynı anda binlerce genin birbirleriyle olan ilişkisini, birbirlerini nasıl etkilediklerini öğrenebilme imkanı sağlamaktadır. Ayrıca bir hücreye yapılan bir uygulamanın hücreyi nasıl etkilediği, hangi yolakların uyarıldığı hangilerinin sustuğu uygulama öncesine göre kıyasla ortaya konulması ve hangi genlerin ifadesinin artıp hangilerinin inhibe olduğu, yeni genlerin/ yolakların keşfedilmesi açısından tercih edilme sebebidir.

Mikroarray teknolojisi, parçalanmış DNA'nın bir substrata yapıştırılıp ve daha sonra bilinen bir gen veya fragman ile araştırılan Southern Blot yönteminden geliştirilmiş bir tekniktir. Array yöntemi, ifade profilinin ortaya konulmasında ilk olarak 1987 yılında kullanılmaya başlanmış, bugünkü minyatürize edilmiş mikroarray teknolojisi ile gen ifade profili çalışmaları ilk olarak 1995 yılında bildirilmiştir. Mikroarray aracılı ökaryotik genom profilinin çıkartılması ise ilk olarak 1997 yılında yayınlanmıştır.

Genlerin ifade paternlerini bilmek fonksiyonları hakkında önemli bilgiler verir. Genler ve gen ürünleri arasındaki etkileşimi anlamak için; genomdaki, binlerce-onbinlerce genin ifade düzeylerini analiz etmek gereklidir. DNA mikroarray; genomdaki tüm genlerin ifade analizlerini hızlı bir şekilde yapmak üzere geliştirilmiş bir metodur.

Mikroarray kullanımında amaç şu sorunun cevabını verebilmektir: Bir organizmanın belirli bir hücreinde, belirli bir zamanda ve belirli koşullar altında hangi genler ifade edilmektedir?

DNA veya RNA'yı saptamak için kullanılan DNA mikroarray (gen çipi, DNA çipi ya da biyoçip olarak da bilinir) yaşayan hücrelerin mRNA gen ürün seviyelerini ölçen "chip" teknolojisini kullanan yeni bir yöntemdir. Bir mikroarray "chip" DNA noktaları (spot) içeren, karelere bölünmüş, dikdörtgen şeklindedir. Array'deki her bir nokta "chip"e bağlanmış olarak bir DNA dizisinin milyonlarca kopyasını içermektedir. Bunların her birine "prob" denir. Problar, array yüzeyine yerleştirilmeden önce sentezlenmekte ve daha sonra kovalent bağ ile bir kimyasal matriks (poliakrilamid, lizin, amino silan vs) içeren bu katı yüzey üzerine nokta şeklinde yerleştirilmektedir. "Chip"ler cam veya silikon olabilmektedir.

Kullanım amaçlarına veya kullanılan renk sayısına göre mikroarrayler ikiye ayrılmaktadır;

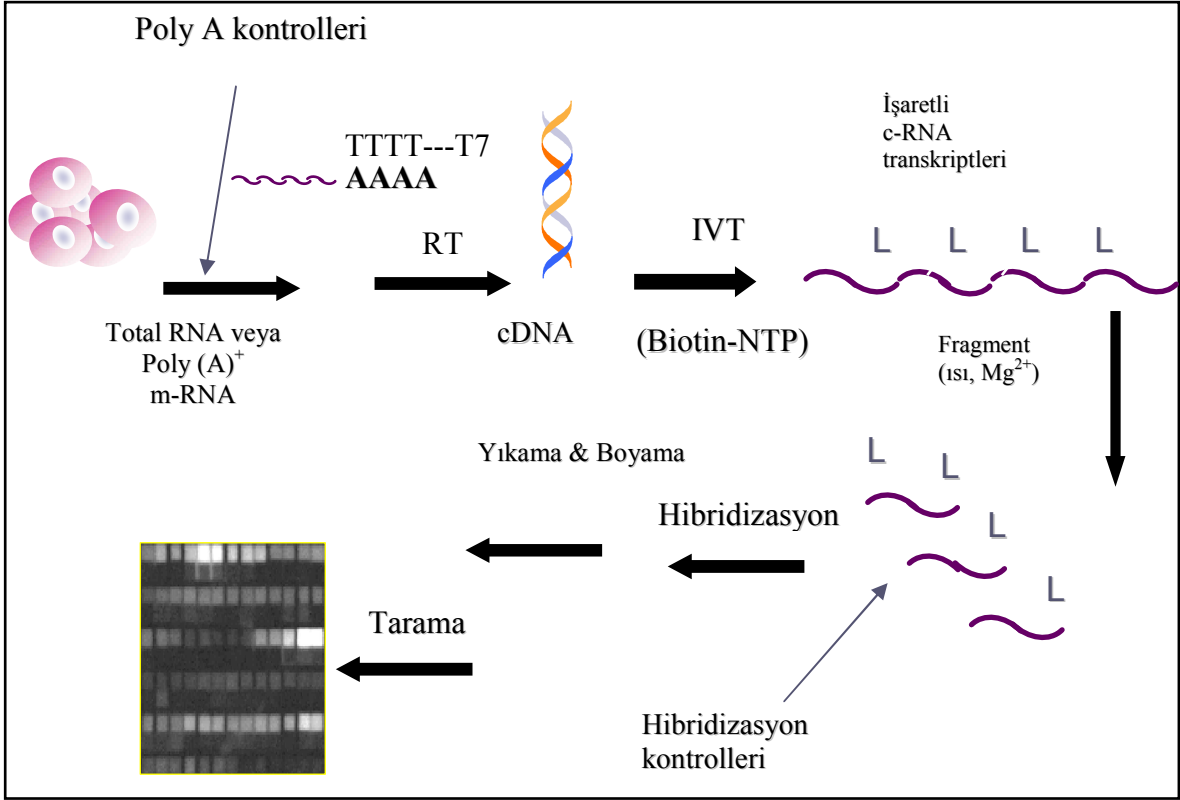
Spotlu Mikroarray'ler: Spotlu (ya da iki kanallı) mikroarray'lerde problar oligonükleotid, cDNA veya m-RNA'lara tekabül eden PCR ürünlerinin küçük fragmentleri olabilir. Bu tarz array'ler tipik olarak iki farklı florfor ile işaretlenmiş, karşılaştırılacak iki örnekten (örneğin hasta ve kontrol) gelen cDNA ile hibridize edilmiştir. Örnekler karıştırılıp tek bir mikroarray'e hibridize edilebilir; bu daha sonra scan edilir ve de böylece

aşırı ifadelenen "up-regulate" genlerle düşük ifadelenen "down-regulated" genler bir seferde görülebilir.

Oligonükleotid Mikroarray'ler: Oligonükleotid (ya da tek kanallı) mikroarray'lerinde prob lar sekansı bilinen ya da tahmin edilen mRNA'lara uygun olacak şekilde dizayn edilir. Bu tip dizaynların bazılarını ticari olarak erişmek mümkündür (GE Healthcare, Affymetrix veya Agilent gibi firmalar aracılığı ile). Bu mikroarray'ler gen ifadesinin kesin değeri ile ilgili tahminler verir; o nedenle, iki durumun karşılaştırılmasında iki ayrı mikroarray kullanmak gerekir. Array'deki her bir geni temsil etmek üzere genellikle 25-70 nt uzunluğundaki oligonükleotidler kullanılır. Daha küçük boyutlar da prob bağlanma etkinliği daha düşük olmaktadır. Bununla birlikte, küçük oligonükleotidlerin özgüllüğü daha yüksektir. 70 nt'den daha büyük olanlarda ise sinyalde çok küçük bir artış olmaktadır.

"Affymetrix" mikroarray GenChip sisteminde bilinen bir gen veya potansiyel olarak ifade bulan bir dizi "chip" üzerinde, her biri 25 bç uzunluğunda 11-20 özgün oligomerik prob lar ile temsil edilmektedir. Verilen gen veya yüksek oranda benzer genlerin küçük grupları ile ilgili olarak prob grupları prob set olarak bilinir. Her bir oligomerin çoklu kopyaları "GenChip" array üzerindeki farklı hücrelerde ve seri olarak tekrarlanan basamaklarda paralel olarak sentezlenmekte ve her bir basamak "chip"teki seçilmiş bölgelere özel nükleotidleri eklemektedir. Her bir örnek için bir "chip (array)" kullanılmakta ve c-RNA tek bir renk ile işaretlenip, taranmaktadır.

HG U133 Plus 2.0 array, 54.000'den fazla prob set ile iyi olarak tanımlanmış yaklaşık 38.500 insan genide dahil 47.000'den fazla transkriptin ve varyantların ifade seviyeleri her bir transkript için 22 bağımsız prob la analiz edebilmektedir. Her geçen yıl buna daha fazla gen eklenmektedir.



Şekil 3.7. Affymetrix platformunda gen ifade profillemesinin aşamaları

Mikroarray ile gen ifade analizleri için GeneChip® 3' IVT Express Kiti (Affymetrix, ABD) kullanılmıştır.

Poli-A RNA Kontrollerinin Hazırlanması:

Çizelge 3.4. Poli-A RNA kontrollerinin hazırlanışı

Total RNA Miktarı	1.Dilasyon	2.Dilasyon	3.Dilasyon	4.Dilasyon	4.Dilasyondan Total RNA'ya eklenecek miktar
50ng	1:20	1:50	1:50	1:20	2µl
100ng	1:20	1:50	1:50	1:10	2µl
250ng	1:20	1:50	1:50	1:4	2µl
500ng	1:20	1:50	1:50	1:2	2µl

500 ng toplam RNA için Poli-A RNA'nın seyreltilerinin hazırlanması;

1. Dilusyon: İlk seyreltme için (1:20); 38µl Poli-A Kontrol Dilusyon Buffer'ına, Poli-A RNA kontrol stok'dan 2µl eklendi.

2.Dilusyon: İkinci seyreltiyi hazırlamak için (1:50); 98 µl Poli-A Kontrol Dilusyon Buffer'ına ilk seyreltiden 2µl eklendi.

3.Dilusyon: Üçüncü seyreltiyi hazırlamak için (1:50); ikinci seyreltiden 2µl'yi, 98 µl Poli-A Kontrol stok'a eklendi.

4. Dilusyon: Dördüncü seyreltiyi hazırlamak için (1:2); ikinci seyreltiden 10µl'yi, 10 µl Poli-A Kontrol stok'a eklendi.

Çizelge 3.5. Total RNA/Poli A Kontrol Mix.nin Hazırlanışı (Bir örnek için):

Total RNA örneği (500ng)	<3 µl
4.Dilusyon (Poli A RNA kontrol)	2 µl
Nükleaz-free su	<3 µl
Toplam Hacim	5 µl

First-strand c-DNA Sentezi:

Çizelge 3.6. First-Strand Mix.nin Hazırlanışı (Bir örnek için):

First-Strand Buffer Mix	4 µl
First-Strand Enzim Mix	1 µl
Toplam Hacim	5 µl

Hazırlanan First-Strand mix, öncesinde hazırlanan Total RNA/Poli A Kontrol mix.nin içerisine eklenerek son hacim 10 µl'ye tamamlandı. Çizelge 3.10'da belirtildiği üzere 42°C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı.

Second-strand c-DNA Sentezi:

Çizelge 3.7. Second-Strand Mix.nin Hazırlanışı (Bir örnek için):

Nükleaz-free su	13 µl
Second-Strand Buffer Mix	5 µl
Second-Strand Enzim Mix	2 µl
Toplam Hacim	20 µl

10 µl cDNA örneklerinin her birinin üzerine hazırlanan Second-Strand mix, son hacim 30 µl olacak şekilde eklendi. Çizelge 3.10'da belirtildiği üzere 16°C'de 1 saat, 65°C'de 10 dakika olacak şekilde inkübasyona bırakıldı.

Biotin-işaretli (IVT) cRNA'nın Sentezi:

Çizelge 3.8. IVT Mix.nin Hazırlanışı (Bir örnek için):

IVT Biotin Label	4 µl
IVT Labeling Buffer	20 µl
IVT Enzim Mix	6 µl
Toplam Hacim	30 µl

Reaksiyon buzda gerçekleştirilmez, 10X IVT Labeling Buffer'daki spermidine stok DNA'nın çökmesine sebep olabilir.

30 µl second strand cDNA örneklerinin her birinin üzerine hazırlanan IVT mix, son hacim 60 µl olacak şekilde eklendi. Çizelge 3.10'da belirtildiği üzere 40°C'de 16 saat inkübasyona bırakıldı.

Çizelge 3.9. Önerilen IVT inkübasyon Süreleri

RNA miktarı	IVT inkübasyon süresi
50-250ng	16 saat
100-500 ng	4 saat

Çizelge 3.10. PCR Programı

Program	
First-Strand cDNA sentezi	42°C 2 saat
Second-Strand cDNA sentezi	16°C 1 saat 65°C 10 dakika
IVT	40°C 16 saat

İnkübasyondan sonra cRNA'nın temizlenmesi aşamasına geçildi.

Biotin işaretli cRNA'nın temizlenmesi:

Çizelge 3.11. aRNA binding Mix.nin Hazırlanışı: (Bir örnek için)

RNA Binding Beads	10 µl
aRNA Binding Buffer	50 µl
Toplam Hacim	60 µl

- Hazırlanan aRNA binding mix her bir örneğin üzerine son hacim 120 µl olacak şekilde eklendi.

- 120 µl etanol (%100) her bir örneğe eklendi ve 3 sn vorteksle karıştırıldı. Bu sürede aRNA'lar bead.lere bağlandı.

- Bu örnekler şekil 3.8'de gösterildiği gibi magnetik seperatöre (Cell signalling, ABD) koyuldu, 5 dk bekletildi ve bead.ler (aRNA'ya bağlanan bead.ler) tüpün bir tarafına toplandı.



Şekil 3.8. Magnetik seperatör (Magnetic separation rack)

- 5 dk.nın sonunda bead.lere dokunulmadan supernatant kısım pipetle alınıp atıldı. Daha sonra 100 µl aRNA yıkama solüsyonu örnekler üzerine ilave edilerek aynı işlem 2 kez tekrarlandı.
- Yıkama sonrasında 50 µl Elution Buffer örnekler üzerine eklendi ve 3 sn vorteksle karıştırıldı.
- Tüm örnekler magnetik seperatöre koyulup 5 dk bekletildi. 5 dk sonunda bead.ler yine tüpün bir tarafına toplandı. Elution Buffer eklendikten sonra artık Bead.lere bağlı olan aRNA'lar bead.lerden ayrıldı. Böylelikle bu sefer supernatant kısım alındı. RNA'lar pürifiye edilmiş oldu.
- Pürifiye edilen c-RNA'ların spektrofotometrik ölçümleri yapıldı.
- Fragmentasyon aşaması için tüm örnekler hazır hale getirildi.

c-RNA'nın Fragmentasyonu:

Çizelge 3.12. aRNA Fragmentasyon Mix.nin Hazırlanışı: (Bir örnek için)

cRNA	15µg (max.hacim 32µl olabilir)
5X Fragmentasyon Tamponu	8 µl
RNase-free su	Değişken (Final hacmini 40 µl'ye tamamla)
Total Hacim	40 µL

- Hazırlanan bu mix 94°C'de 35 dk inkübe edildi.
- İnkübasyondan sonra örnekler buza konuldu.
- Reaksiyon sonunda 25-200 bp uzunluğunda fragmentler elde edildi.

- %1'lik agaroz jelde yürütülerek reaksiyonun kontrolü yapıldı.

Hibridizasyon:

Çizelge 3.13. Hibridizasyon Kokteyli

Fragmente cRNA	12.5 µg (max.hacim 33.3 µl olabilir)
Kontrol oligonükleotid B2 (3nM)	4.2 µl
20Xökaryotik Hibridizasyon Kontrol	12.5 µl
Herring Sperm DNA (10 mg/mL)	2.5 µL
BSA (50 mg/mL)	2.5 µl
2X Hibridizasyon tamponu	120 µl
DMSO	25 µl
Rnase-free su	50 µl

- Array (HG-U133Plus 2.0) (Affymetrix, USA) kullanılmadan önce yarım saat oda ısısında tutuldu.

- Hazırlanan hibridizasyon kokteyli 99 °C'de 5 dakika ısı bloğunda inkübe edildi.

- Bu sırada array içerisine 200 µl 1X Hibridizasyon tamponu dolduruldu ve 10 dakika 45°C'deki hibridizasyon fırını içerisinde 60 rpm de inkübe edildi.

- Hibridizasyon kokteyli 5 dakikalık inkübasyondan sonra 5 dakika süresince 45°C'de inkübasyona koyuldu.

- İnkübasyondan sonra hibridizasyon kokteyli 5 dakika maksimum hızda santrifüj edildi.

- Array içerisindeki tampon çıkarıldı ve içerisine hazırlanan hibridizasyon kokteylinde 200 µl dolduruldu.

- Array hibridizasyon fırınına koyuldu ve 45 °C'de 60 rpm de 18 saat hibridize edildi.

- Hibridizasyon bittikten sonra Array'ın yıkama, boyama ve tarama işlemine geçildi.

Array Yıkama ve Boyama:

Hibridizasyondan sonra, array'den hibridizasyon kokteyli alındı ve prob array'e non-stringent Wash Buffer (A) dolduruldu.

Wash Buffer A: (Non-Stringent Wash Buffer):

(6X SSPE, 0.01% Tween-20)

1,000 ml için:

300 ml 20X SSPE (Sigma, ABD)

1.0 ml 10% Tween-20 (Sigma, ABD)

699 ml su

Wash Buffer B: (Stringent Wash Buffer):

(100 mM MES, 0.1M [Na+], 0.01% Tween-20)

1,000 ml için:

83.3 ml 12 X MES Stock Buffer (Sigma, ABD) 5.2 ml 5M NaCl

1.0 ml 10% Tween-20

910.5 ml su

2X Stain Tamponunun hazırlanışı:

(Final 1X konsantrasyonu: 100 mM MES, 1M [Na+], 0.05% Tween-20) 250 ml için:

41.7 ml 12X MES Stock Buffer

92.5 ml 5M NaCl (Applichem, Almanya)

2.5 ml 10% Tween-20

113.3 ml su

Boyama Maddelerinin Hazırlanışı:

- Üç adet amber renkli tüp alınarak sırasıyla 1, 2 ve 3 olarak işaretlendi.
- Birinci tüp aşağıdaki şekilde hazırlandı ve iyice karıştırıldı.

Çizelge 3.14. 1. SAPE Solüsyon mix.inin hazırlanışı

2X Stain tamponu	600 µl
50 mg/mL BSA (Sigma, ABD)	48 µl
1 mg/mL SAPE (Invitrogen, ABD)	12 µl
Rnase free su	540 µl
Toplam Hacim	1200 µl

-Birinci tüpten 600 µl alınarak üçüncü tüp içerisine koyuldu. Böylece birinci (600 µl) ve üçüncü (600 µl) tüpler Streptavidin Phycoerythrin (SAPE) solüsyon tüpleri oldu.

- İkinci tüp ise aşağıdaki şekilde hazırlandı;

Çizelge 3.15. 2. SAPE Solüsyon mix.inin (Antibody Solüsyon mix) hazırlanışı

2X Stain tamponu	300 µl
50 mg/mL BSA (Sigma, ABD)	24 µl
10 mg/mL Goat IgG Stok (Invitrogen, ABD)	6 µl
0,5 mg/mL Biotin Antibody	3,6 µl
Rnase free su	266,4 µl
Toplam	600 µl

- Hazırlanan ikinci tüpte karıştırıldı ve santrifüj edildi.

- Hazırlanan yıkama solüsyonları yıkama istasyonuna yerleştirilerek array'in yıkama işlemi aşağıdaki gibi yapıldı.

Buffer A ile yıkama gerçekleştirildi (25°C).

Buffer B ile yıkama gerçekleştirildi (50°C).

- 1. Boyama:** SAPE solüsyonu ile probe array 10 dk boyandı (25°C).
Buffer A ile tekrar yıkandı (25°C).
 - 2. Boyama:** Antikor solüsyonu ile probe array 10 dk boyandı (25°C).
 - 3. Boyama:** SAPE solüsyonu ile probe array 10 dk boyandı (25°C).
Buffer A ile son kez yıkandı (30°C).
- Yıkama ve boyama işlemleri yapıldıktan sonra da array scanner'da tarandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çalışmada kullanılan AML hastalarına ait bilgiler Çizelge 4.1’de gösterilmiştir.

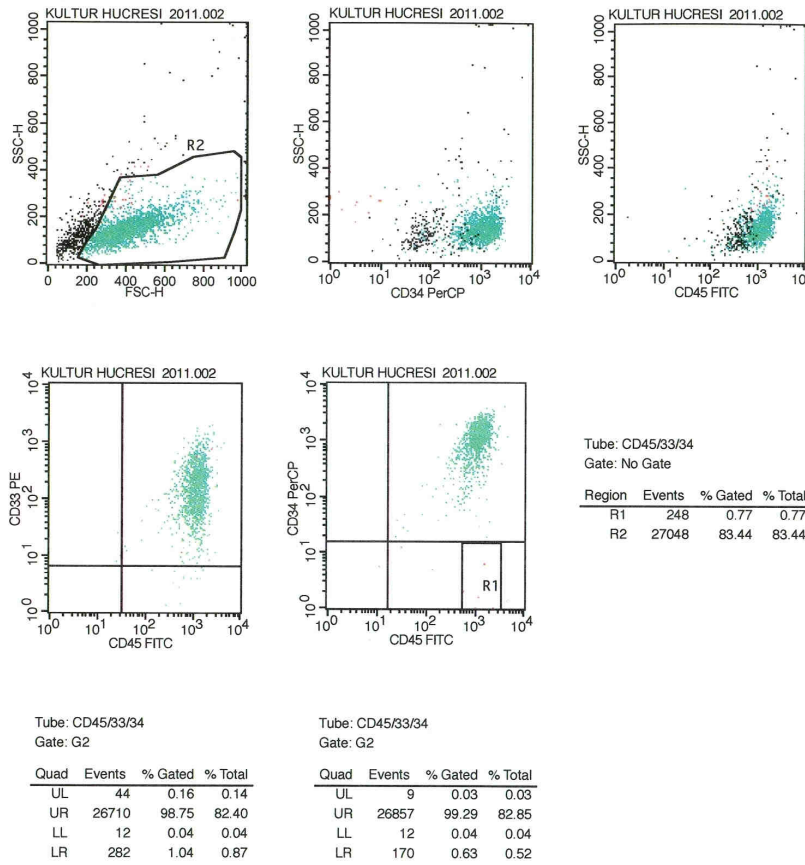
Çizelge 4.1. AML Hasta bilgileri

	Toplam (n=19)	β-Katenin (Yüksek) (n=8)	β-Katenin (Düşük) (n=7)	β-Katenin (Değişmeyen) (n=4)	
Yaş					
≤60	12 (63.2)	5 (62.5)	6 (85.7)	1 (25)	p>0.05
>60	7 (36.8)	3 (37.5)	1 (14.3)	3 (75)	
Ortalama	54	53	46	68	
Cinsiyet					
K	7 (36.8)	3 (37.5)	3 (42.9)	1 (25)	
E	12 (63.2)	5 (62.5)	4 (57.1)	3 (75)	
Lökosit sayısı (Ortalama)	48 689	37 000	74 957	26 100	p>0.05
FAB sınıflaması					
M0	3 (20)	1 (14.3)	1 (20)	1 (33.3)	-
M1	1 (6.7)	0 (0)	1 (20)	0 (0)	
M2	2 (13.3)	1 (14.3)	0 (0)	1 (33.3)	
M3	1 (6.7)	0 (0)	1 (20)	0 (0)	
M4	5 (33.3)	4 (57.1)	1 (20)	0 (0)	
Sekonder AML (MDS dönüşümlü)	3 (20)	1 (14.3)	1 (20)	1 (33.3)	-
Karyotip					
Normal	2 (25)	0 (0)	2 (66.6)	0 (0)	
Karyotip					
Anormal	6 (75)	3 (100)	1 (33.3)	2 (100)	
%CD34 (Ortalama)	55.50	73.83	43.26	43.33	p>0.05
Npm mutasyonu	2 (10.5)	1 (12.5)	1 (14.3)	0 (0)	-
Sağkalım					
Ölü	11 (64.7)	4 (57.1)	5 (71.4)	2 (66.7)	-
Sağ	1 (5.9)	0 (0)	1 (14.3)	0 (0)	
Takip	5 (29.4)	3 (42.9)	1 (14.3)	1 (33.3)	

4.1. Flow Sitometri Sonuçları

AML hastalarının (n=19) kemik iliğinden/kanından izole edilen CD34+ hematopoetik hücrelerin 24 saat boyunca kültürü yapılmıştır. Kültüre edilen CD34+ hücrelerin, kültür sonrasında hala lösemik hücreler mi yoksa farklılaşmış hücreler mi olduklarını anlayabilmek için, kültürün 2. gününde hücreler toplanarak farklılaşma yüzey belirteçleri olan CD33, CD34, CD45 antikorları kullanılarak FCM ile değerlendirilmiştir. Analiz sonuçlarına göre 2 gün boyunca kültürü yapılan hücrelerin %98 oranında blastik hücreler olduğu yani CD34+ fenotipini koruduğu ve farklılaşmaya gitmediği gösterilmiştir.

Şekil 4.1'de görüldüğü gibi miyelomonositer seri kaynaklı hücreler olduklarını destekleyecek şekilde hücrelerin %98'inde CD34 ve CD33 ifadesinin bulunduğu, CD45 ifadesinin de çok az sayıda bulunan olası lenfoid hücrelerden dolayı daha zayıf olduğu tesbit edilmiştir.



Şekil 4.1. Flow sitometri analiz sonuçları

4.2. RNA izolasyonu Sonuçları

Tüm örneklerin CD34+ hematopoetik hücrelerinden RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığının belirlenmesi için yapılan Nanodrop ölçümleri Çizelge 4.2’de mevcuttur.

Çizelge 4.2. Örneklerle ait RNA izolasyonu Nanodrop sonuçları

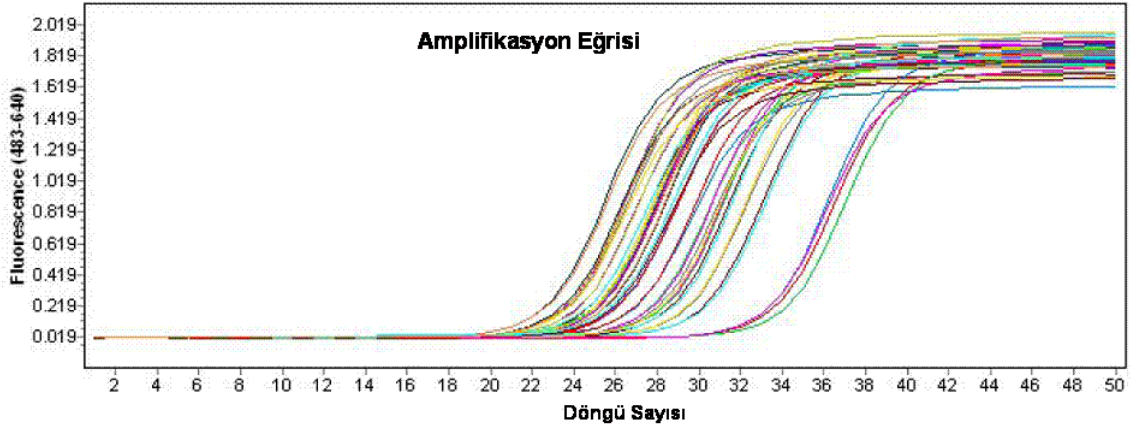
Örnek No	ng/µl	260/280
AML01	213.27	1.87
AML02	197.35	1.88
AML03	77.53	1.80
AML04	274.19	1.97
AML05	107.97	1.86
AML06	272.86	2.05
AML07	73.21	1.80
AML08	21.02	
AMI.09	274.81	2.05
AML10	59.34	1.80
AML11	57.08	1.81
AML12	21.01	1.89
AML13	44.25	1.80
AML14	63.32	1.80
AML15	73.18	1.82
AML16	48.86	1.80
AML17	19.2	
AML18	83.17	1.80
AMI.19	96.26	1.81
Kontrol1	46.49	1.71
Kontrol2	67.42	1.70
Kontrol3	307.79	2.05

4.3. qRT-PCR Sonuçları

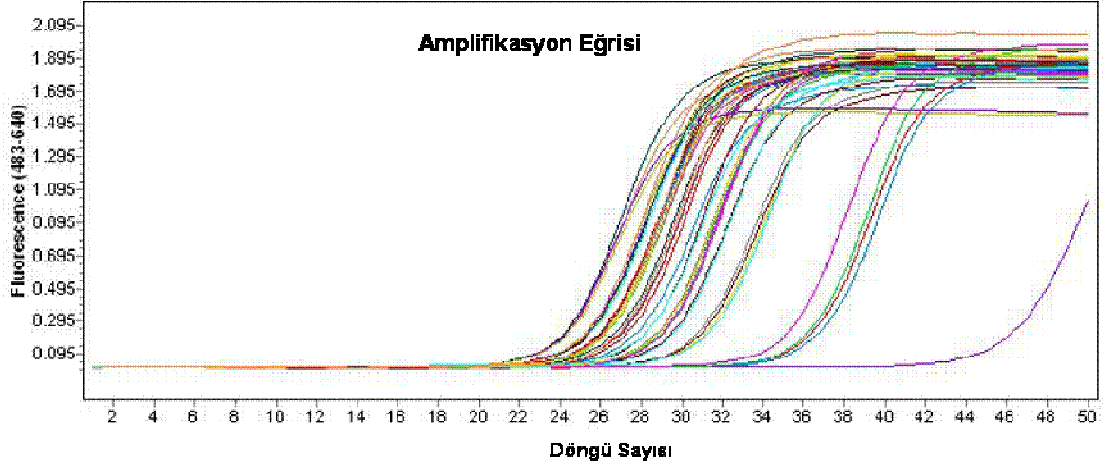
Birbirinden farklı RNA konsantrasyonuna sahip her bir örneğin, başlangıç RNA miktarı 500 ng olacak biçimde ayarlanmıştır ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

β -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 4.2' de β -katenin'e ve şekil 4.3'de hprt'ye ait amplifikasyon eğrisi grafikleri gösterilmektedir.



Şekil 4.2. β -katenin amplifikasyon eğrisi grafiği



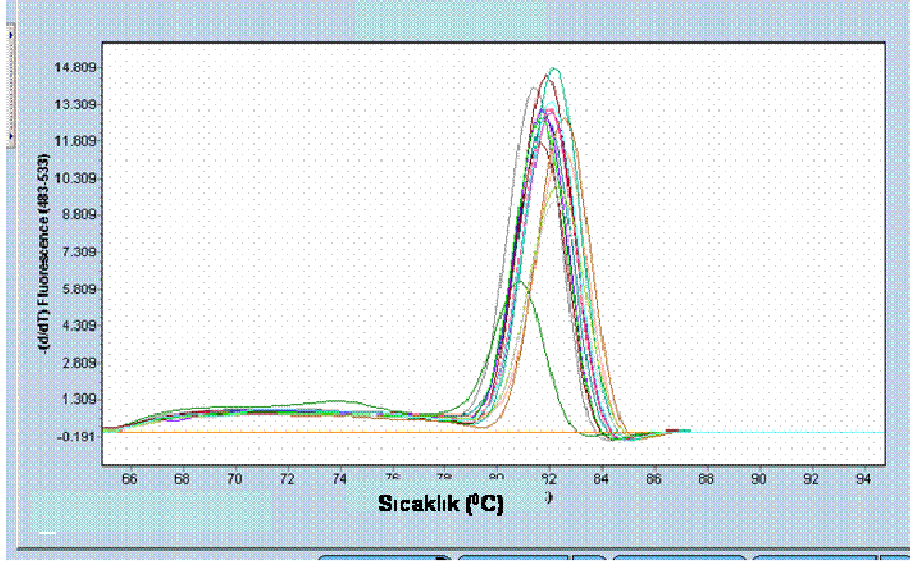
Şekil 4.3. Hprt amplifikasyon eğrisi grafiği

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

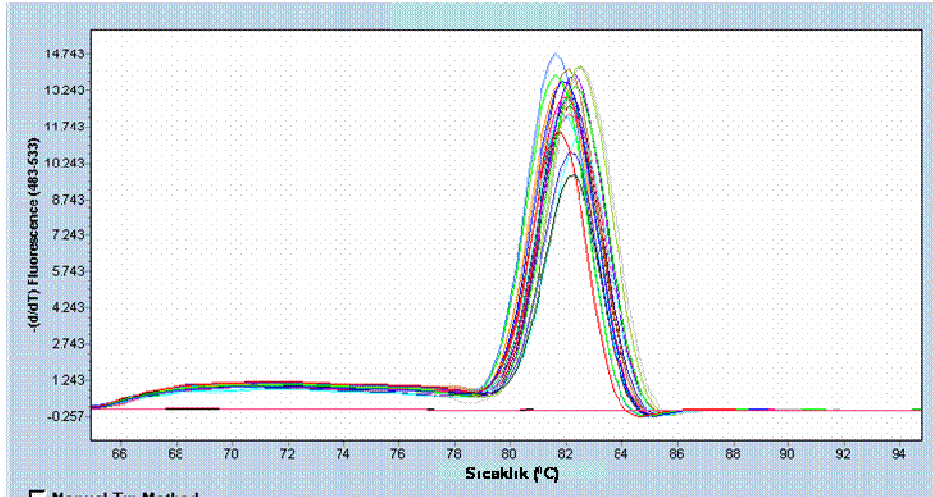
Çizelge 4.3. Örneklerin ortalama Cp değerleri

Örnek No	Ortalama Cp Değerleri	
	hprt	β -Katenin
AML01	27.075	20.805
AML02	26.44	19.095
AML03	23.375	16.78
AML04	25.195	18.69
AML05	21.855	9.73
AML06	26.245	19.485
AML07	25.87	24.91
AML08	26.975	21.710
AML09	28.090	23.035
AML10	25.500	25.030
AML11	23.085	22.895
AML12	26.72	25.89
AML13	27.945	27.495
AML14	27.125	26.110
AML15	21.71	19.715
AML16	24.555	22.735
AML17	28.67	28.395
AML18	27.1	25.455
AML19	24.655	22.91
Sağlıklı Havuzu	25.73	24.622

Her qRT-PCR analizinin ardından, çoğaltılan bölgenin istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için erime eğrisi analizleri yapılmıştır. Şekil 4.4’de β -katenin’e ve şekil 4.5’te hprt’ye ait erime eğrisi grafikleri görülmektedir.



Şekil 4.4. β -katenin erime eğrisi



Şekil 4.5. hprt erime eğrisi

Gen ifade oranlarının hesaplanmasında;

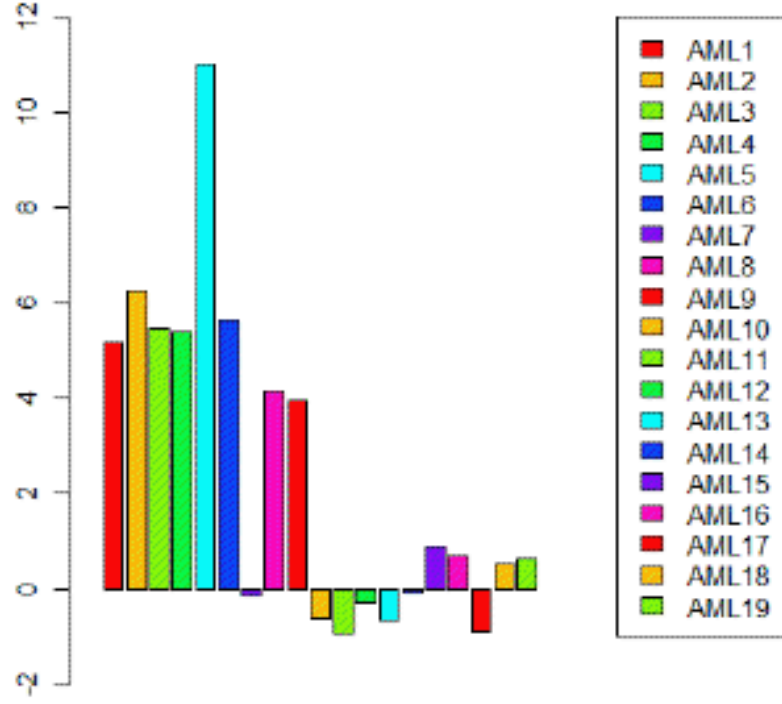
$$R = \frac{(E_{\text{Hedef}})^{\Delta\text{CP}(\text{Hedef}(\text{Kontrol}-\text{Örnek}))}}{(E_{\text{Ref}})^{\Delta\text{CP}(\text{Ref}(\text{Kontrol}-\text{Örnek}))}}$$

formülü kullanılmıştır. Bu formül E (amplifikasyon etkinliği değeri) değerini 2 alarak reaksiyon etkinliğinin %100 olduğunu kabul eder. Bu formül ile hesaplanan gen ifadesi oranları, log2 tabanına çevrilmiştir. β -katenin için örneklere ait gen ifade oranlarının log2 tabanındaki karşılıkları Çizelge 4.4'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Örneklerin gen ifade değişikliği oranlarının log2 tabanına göre karşılıkları

Örnek No	β -Katenin
AML01	5.162
AML02	6.237
AML03	5.487
AML04	5.397
AML05	11.017
AML06	5.652
AML07	-0.148
AML08	4.157
AML09	3.947
AML10	-0.638
AML11	-0.918
AML12	-0.278
AML13	-0.658
AML14	-0.093
AML15	0.887
AML16	0.712
AML17	
AML18	0.537
AML19	0.637

Şekil 4.6’da gösterilen grafiğe göre AML 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 no.lu hastaların beta katenin gen ifade düzeyleri yüksek; AML 7, 10, 11, 12, 13, 14, 17 no.lu hastaların beta katenin gen ifade düzeyleri düşük bulunmuştur. AML 15, 16, 18, 19 no.lu hastaların beta katenin gen ifade düzeylerinde ise anlamlı bir artış ya da azalış olmadığı saptanmıştır.



Şekil 4.6. Sağlıklı havuza göre AML hastalarının β -katenin gen ifade oranları (Mann Whitney U” testi $p=0.021$, $p<0.05$)

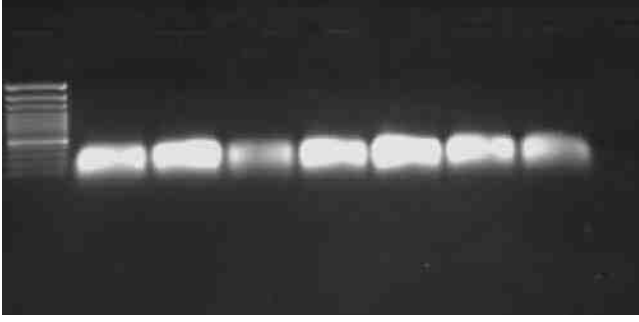
4.4. Mikroarray Sonuçları

AML hasta ve sağlıklı kontrol gruplarının CD34+ hematopoetik hücrelerinden elde edilen RNA örnekleri kullanılarak c-RNA sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen c-RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığının belirlenmesi için yapılan Nanodrop ölçümleri Çizelge 4.5’de mevcuttur. Reaksiyonun devamında her bir c-RNA örneğinden 15 µg kullanılmıştır.

Çizelge 4.5. Elde edilen c-RNA Nanodrop sonuçları

Örnek No	ng/µl
AML01	427.94
AML02	481.64
AML03	644.94
AML04	533.41
AML05	2106.9
AML06	436.88
AML07	648.66
AML08	1572.59
AML09	328.29
AML10	843.55
AML11	1270.27
AML12	1385.23
AML13	363.54
AML14	567.55
AML15	1342.7
AML16	549.06
AML17	1632.9
AML18	312.58
AML19	1136.33
Kontrol1	
Kontrol2	
Kontrol3	

Bu elde edilen c-RNA örneklerinden 25-200 bp uzunluğunda fragmentler elde edildi. Fragmentasyon sonrası ürünlerin %1’lik agaroz jeldeki görüntüleri Şekil 4.7’de gösterilmiştir.



Şekil 4.7. Fragmente ürünlerin %1'lik agaroz jel görüntüleri

Fragmentasyon reaksiyonu sonrasında *HG-UI33Plus 2.0* (54,675 prop seti) oligonükleotid array kullanılarak Prob-hedef hibridizasyon aşaması gerçekleştirildi. Hibridizasyon işlemi bittikten sonra array'ın yıkama, boyama ve tarama işlemlerine geçildi. Yıkama ve boyama işlemleri ardından array scanner'da tarandı.

Mikroarray analizi sonrasında hibridizasyon kalite-kontrolünü göstermek için Çizelge 4.6'da % Present değerleri gösterilmektedir. % Present değeri, organizmanın tüm genlerinin % kaçının aktif olduğunu ifade etmektedir. Herhangi bir organizmada veya hücrede belli bir anda tüm genlerin % 50'sinin ifade olduğu kabul edilir. Yapılan deneylerde (K.i/kan) % 35 in üzerinde olan değerler kabul edilmiştir. Bu değerlerin çok yüksek veya çok düşük (%20 veya altında) çıkması bir hata olduğunu ifade etmektedir. Böylelikle deneyin doğru çalışıp çalışmadığı kontrol edilmiştir.

Çizelge 4.6. % Present değerleri

Örnek No	% Present Değerleri
AML01	%30.5
AML02	%43.4
AML03	%45.4
AML04	%39.4
AML05	%45.5
AML06	%38.5
AML07	%42.9
AML08	%44.9
AML09	%37.7
AML10	%48.04
AML11	%47.1
AML12	%47.2
AML13	%42.5
AML14	%46.1
AML15	%46.1
AML16	%45.6
AML17	%45.1
AML18	%44.8
AML19	%46.1
Kontrol1	%42.6
Kontrol2	%42.4
Kontrol3	%42.7

4.5. İstatistiksel Analiz

Mikroarray verisinin analizi, istatistiksel analize yönelik geliştirilmiş bir açık yazılım platformu olan "R" kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Gruplar arasında diferansiyel ifadenme gösteren genlerin tespiti için "moderated t statistics"e ve lineer modellere dayalı "LIMMA" (Linear Models for Microarray Data) kullanılmıştır.

Yüksek beta katenin seviyeli AML grubu, düşük beta katenin seviyeli AML grubu ve sağlıklı kontrol grubundan oluşan veri üzerinde aşağıdaki karşılaştırmalar gerçekleştirilmiştir:

1. Yüksek Grup –Düşük Grup
2. Yüksek Grup – Kontrol Grubu
3. Düşük Grup – Kontrol Grubu

Bu karşılaştırmalar sonucunda adj.p=0.05 ve log kat değişim değeri en az 2 olmak üzere, en iyi sonuçları veren genler listelenmiştir.

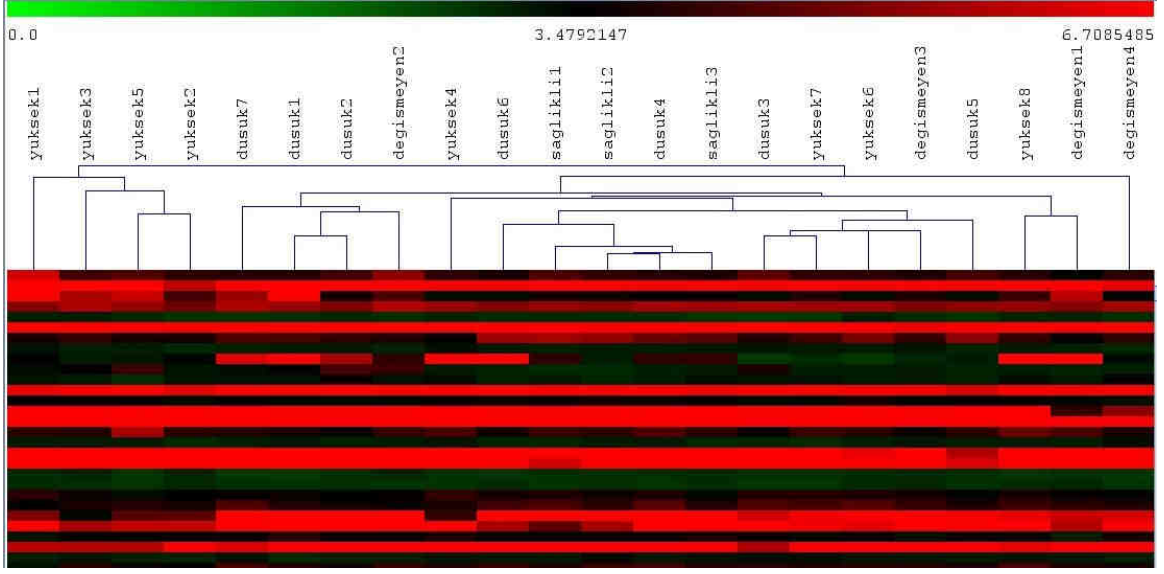
"Adj.p değeri" (q değeri olarak da bilinir), çoklu testler için kullanılan yöntemlerden biri olan, Benjamini Hochberg (BH) tarafından bulunan hatalı keşif oranını (FDR) azaltmaya yönelik yöntemle düzeltilmiştir. Buna göre, adj.p değeri 0.05'in altında olan genler diferansiyel ifade düzeyleri anlamlı olarak seçildiğinde, bu seçilen gruptaki yanlış keşif oranı (FDR) da %5'ten düşük olacak şekilde kontrol edilmiş olur.

4.6. Kümeleme Analizi (Cluster Analysis)

Kümeleme Analizi (Cluster Analysis), benzer ifadelenme kalıbına sahip genlerin tek bir grupta toplanmasını sağlamaktadır. Gruplar arasındaki gen ifadelenme örüntüsünü izleyebilmek amacıyla hiyerarşik kümeleme analizi gerçekleştirilmiştir. Kümeleme analizinde uzaklık ölçüsü olarak Pearson Korelasyonu ve yöntem olarak da average linkage clustering kullanılmıştır.

- 1- Beta katenin gen ifade oranları yüksek AML hasta grubu,
- 2- Beta katenin gen ifade oranları düşük AML hasta grubu,
- 3- Beta katenin gen ifade oranları değişmeyen hasta grubu,
- 4- Sağlıklı kontrol grubu

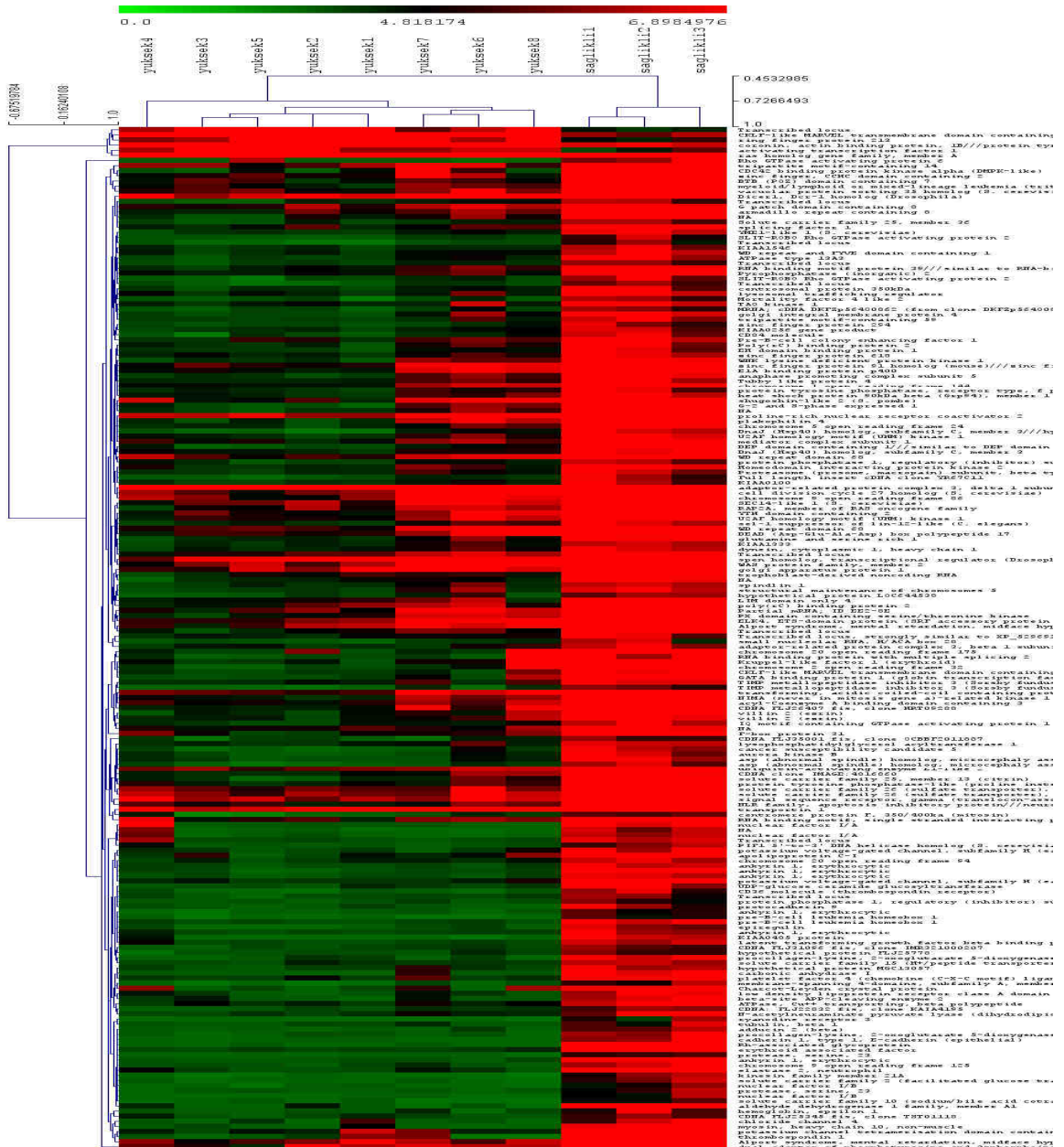
olmak üzere bu 4 grup arasında Kümeleme Analizi yapılarak, farklı ifadelenen gen paternleri Şekil 4.8'de gösterildiği üzere karşılaştırılmıştır. Ancak 4 grup arasında yapılan analiz sonuçları anlamlı bir patern vermemiştir.



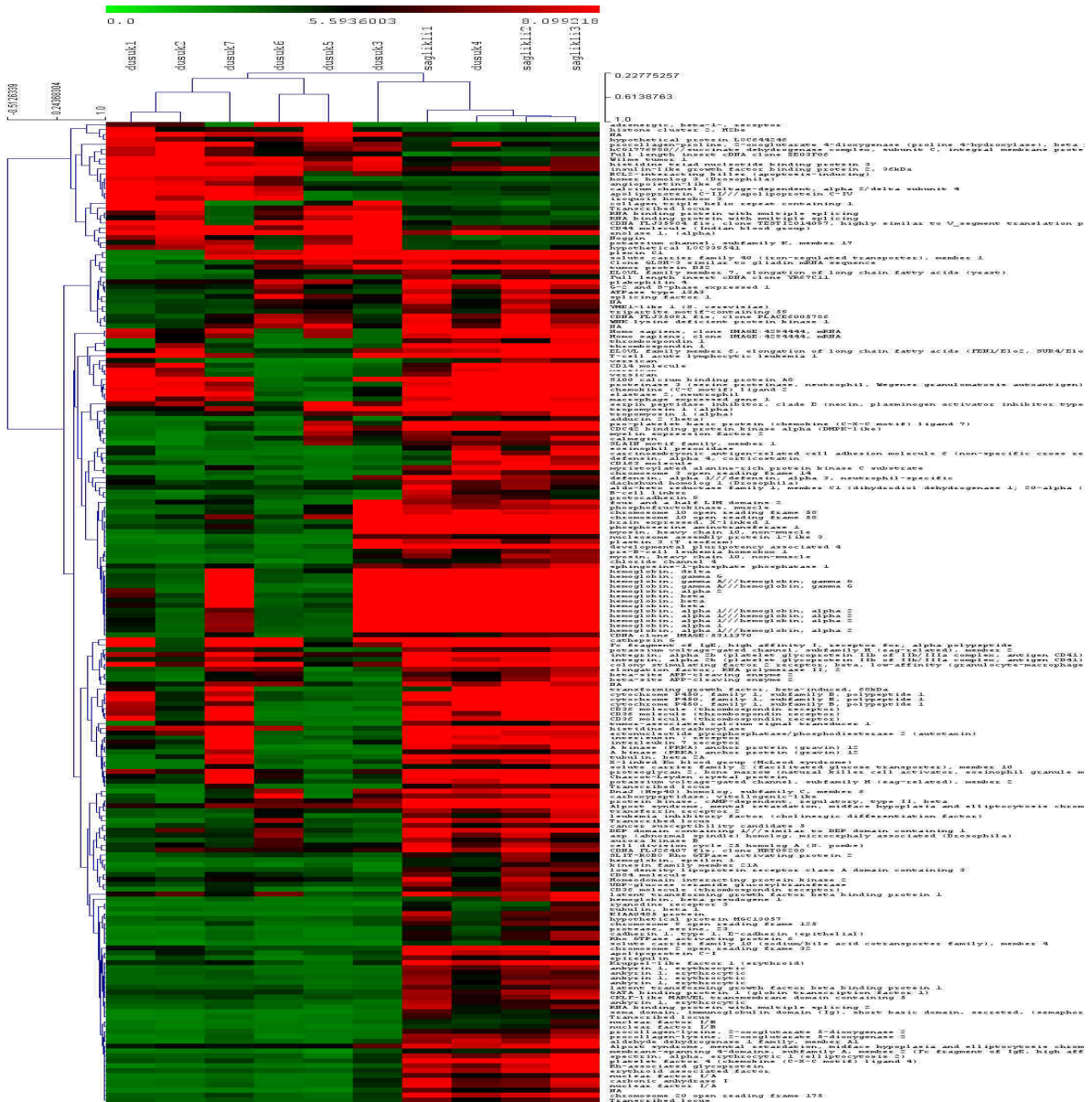
Şekil 4.8. Tüm gruplar arasındaki Kümeleme Analizi

Bu nedenle ikili gruplar arasında Kümeleme Analizleri yapılmıştır.

- 1- Beta Katenin ifade düzeyleri yüksek AML hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında,
 - 2- Beta Katenin ifade düzeyleri düşük AML hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında,
 - 3- Beta Katenin ifade düzeyleri yüksek ve düşük AML hasta grupları arasında
- Kümeleme Analizi yapıldığında Şekil 4.9, 4.10 ve 4.11’de gösterildiği üzere sonuçlar anlamlı bir patern vermiş olup yüksek ve düşük ifadelenen genler ortaya çıkarılmıştır.



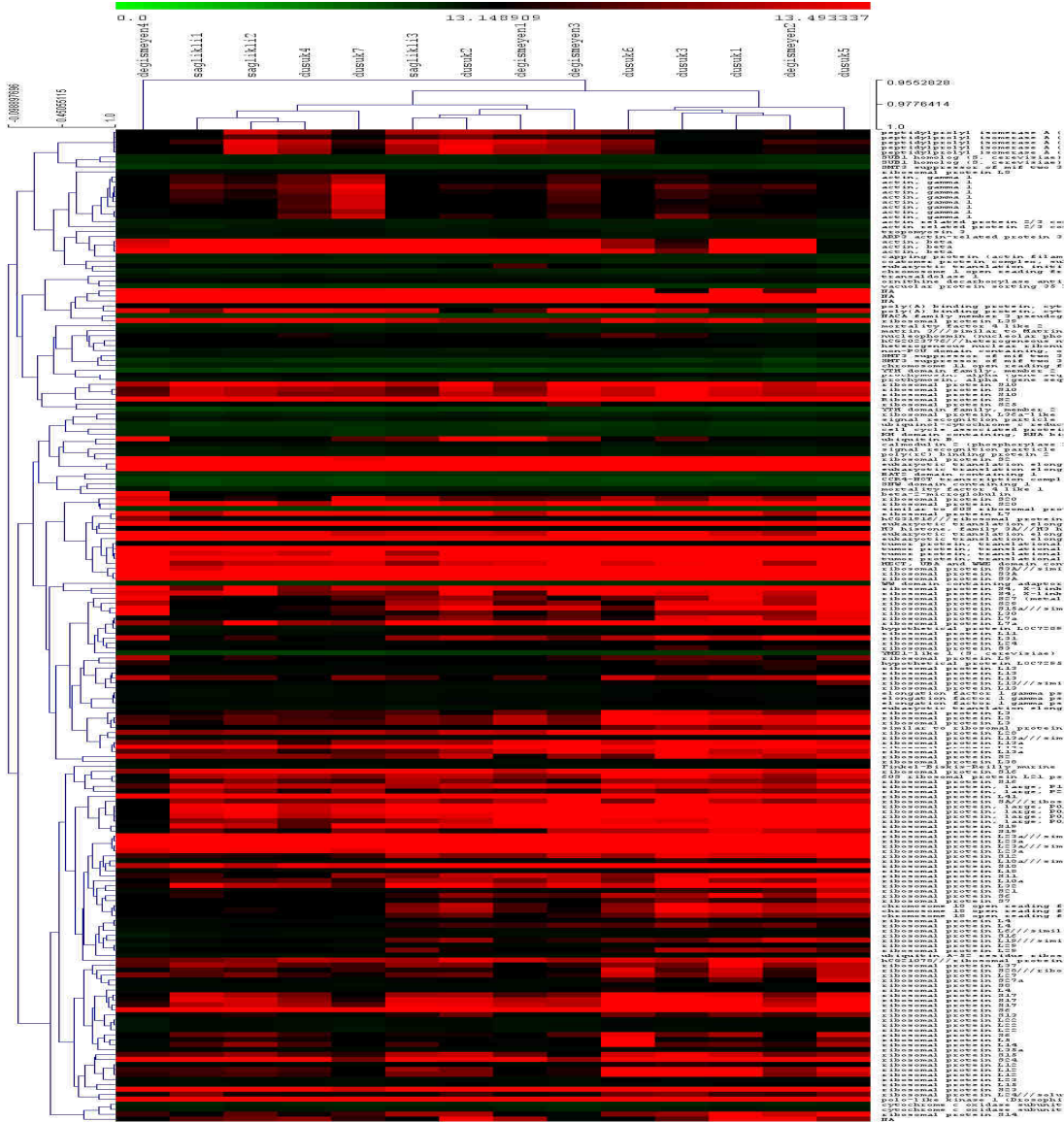
Şekil 4.9. Beta Katenin gen ifade oranları yüksek olan AML hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubunun Kümeleme Analizi (Kırmızı; yüksek ifadelenen genler, Yeşil; düşük ifadelenen genler)



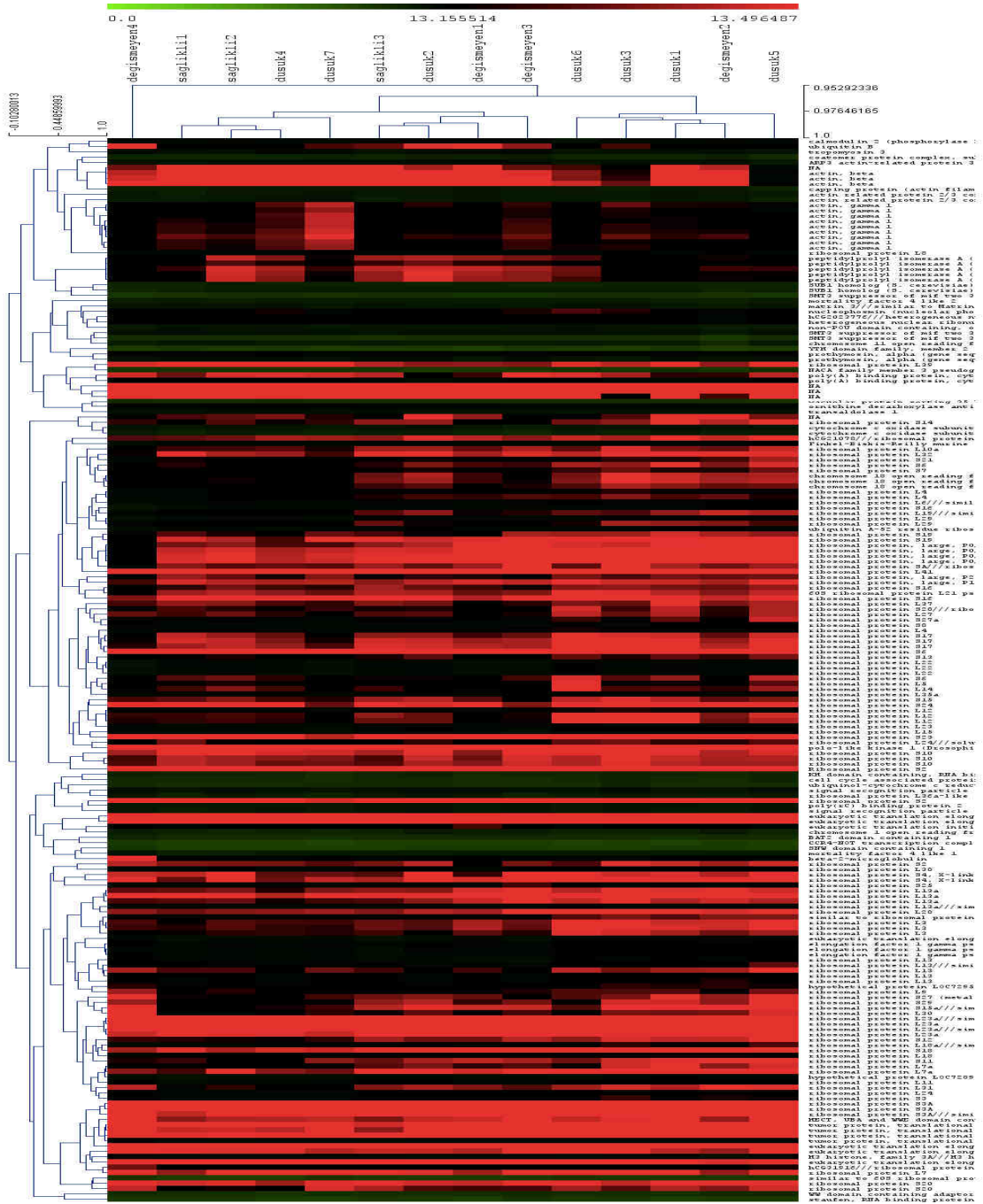
Şekil 4.10. Beta Katenin gen ifade oranları düşük olan AML hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubunun Kümeleme Analizi

Böylelikle beta katenin gen ifade oranları değişmeyen AML hasta grubu, diğer 3 grubun içerisine dahil edildiği zaman bütün grubu bozduğu ve kümeleme analizinin anlamlı bir patern vermediği gözlenmiştir.

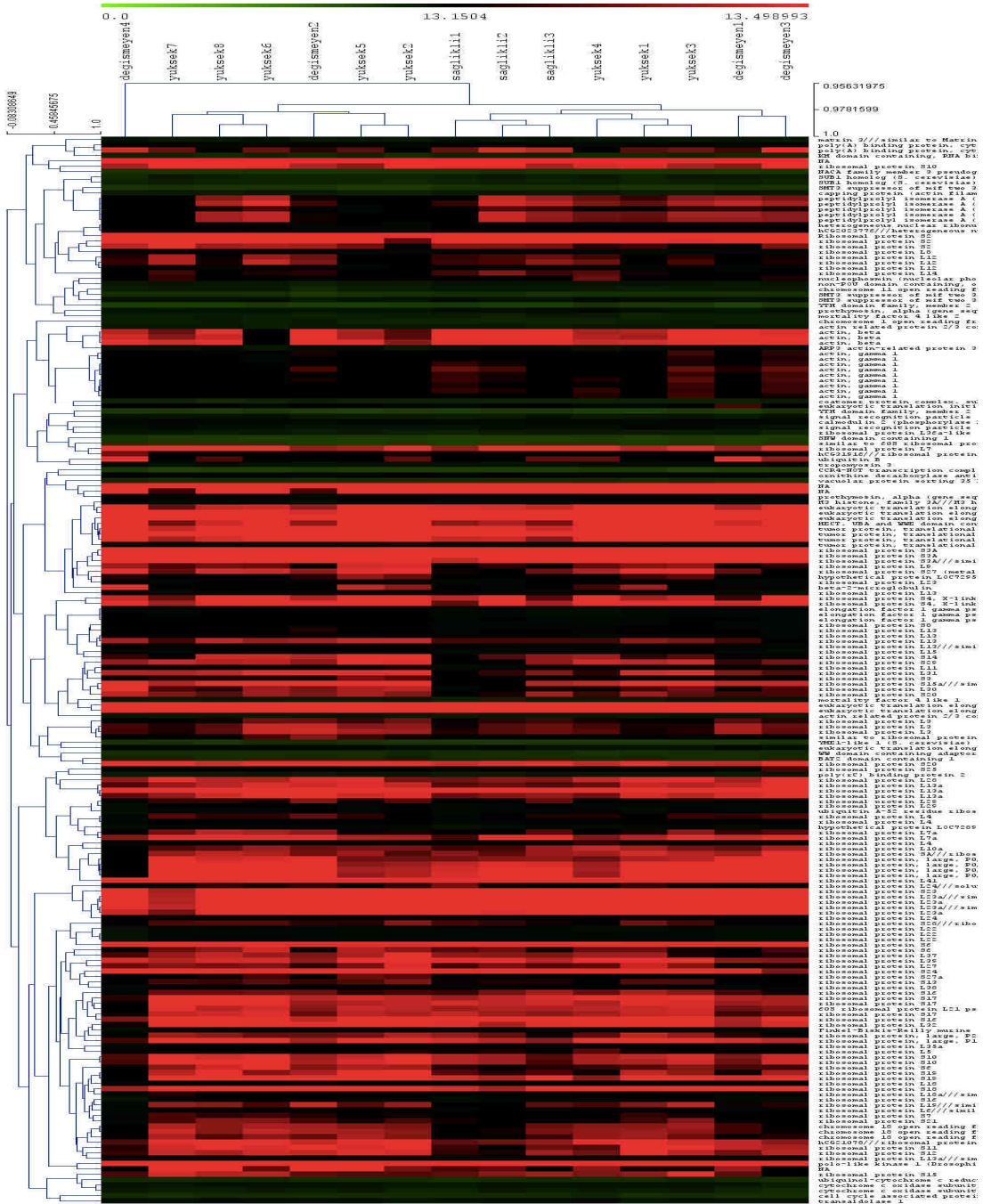
Bu değişmeyen gruba dahil olan hasta sayısının az olması dolayısıyla bu grup tek başına değerlendirilmeyip, bir de diğer grupların içerisine katılarak yine ikili gruplar şeklinde Kümeleme Analizi yapıldı. Bunun sonucunda da değişmeyen grubunun katıldığı hiç bir ikili karşılaştırmada genlerin ifadenmesinde anlamlı bir patern vermediği Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15, Şekil 4.16 ve Şekil 4.17’de gösterilmiştir.



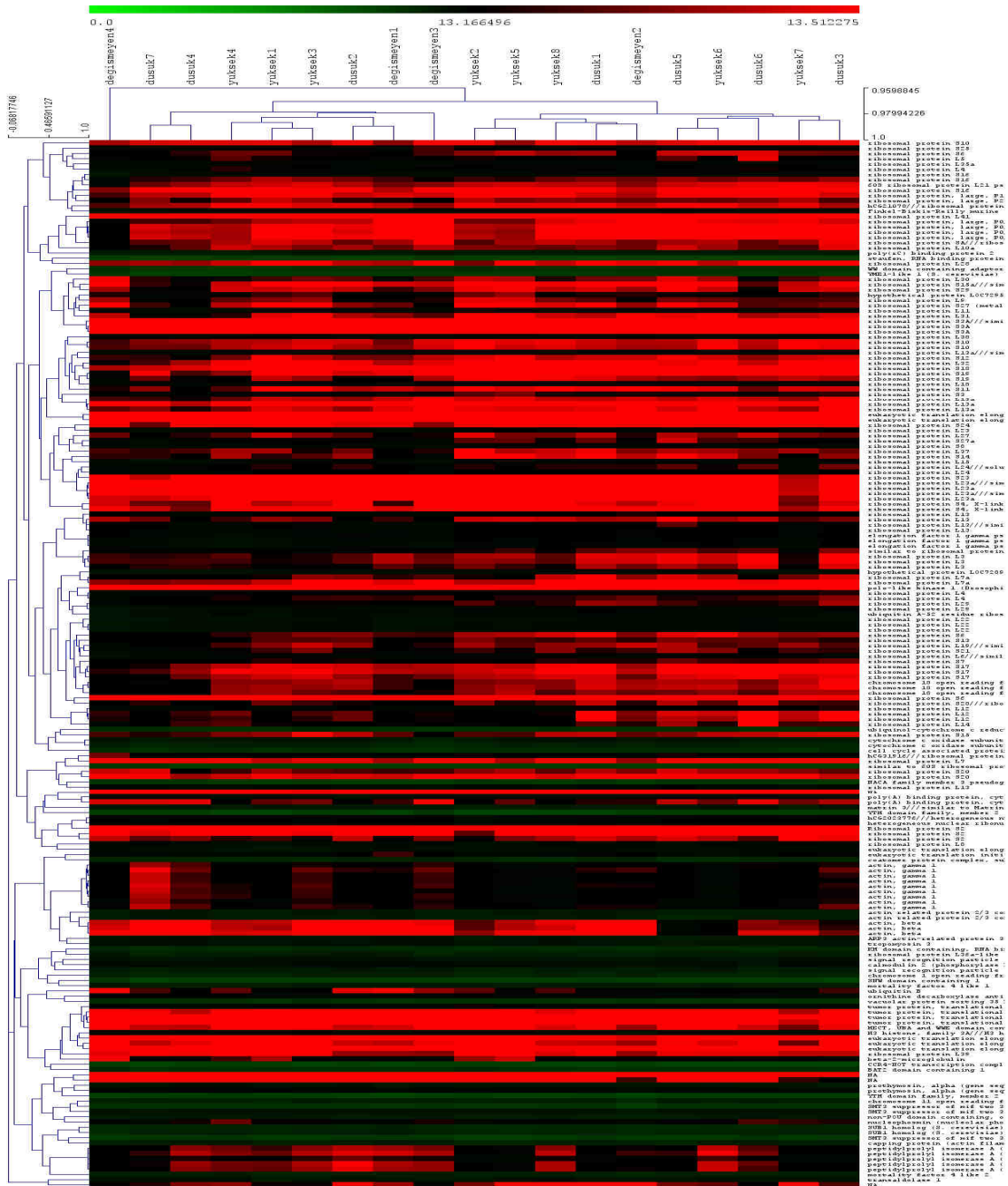
Şekil 4.12. Sağlıklı kontrol grubunun içerisine beta katenin gen ifade oranları değişmeyen AML hastalarının ilave edilmesiyle elde edilen grup ile beta katenin gen ifade oranları düşük AML hasta grubunun Kümeleme Analizi



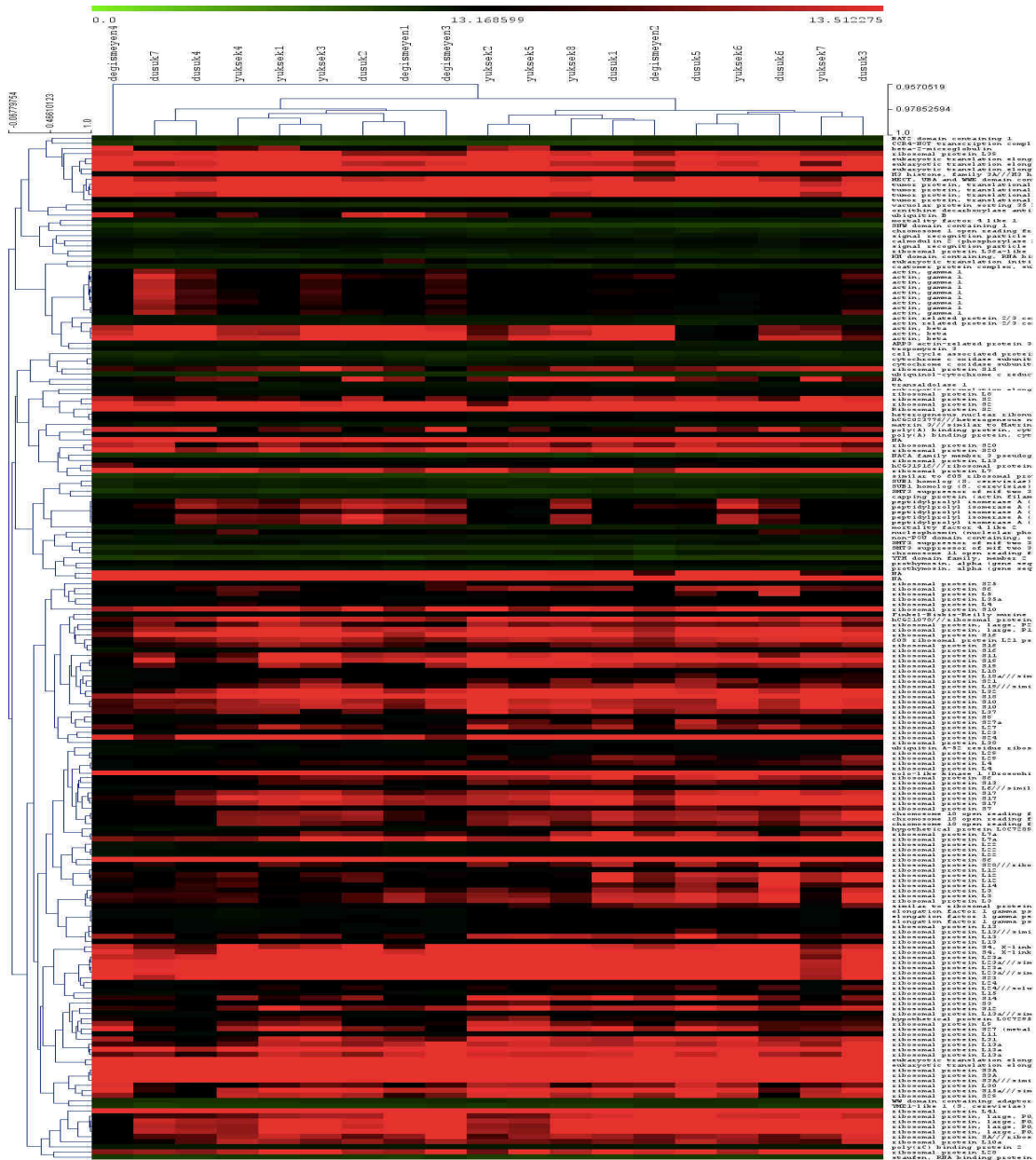
Şekil 4.13. Beta Katenin gen ifade oranları düşük hasta grubunun içerisinde beta katenin gen ifade oranları değişmeyen AML hastalarının ilave edilmesiyle elde edilen grup ile sağlıklı kontrol grubun Kümeleme Analizi



Şekil 4.14. Sağlıklı kontrol grubunun içerisine beta katenin gen ifade oranları değişmeyen AML hastalarının ilave edilmesiyle elde edilen grup ile beta katenin gen ifade oranları yüksek AML hasta grubunun Kümeleme Analizi



Şekil 4.16. Beta Katenin gen ifade oranları düşük AML hasta grubu içerisinde beta katenin gen ifade oranları değişmeyen AML hastalarının ilave edilmesiyle elde edilen grup ile beta katenin gen ifade oranları yüksek AML hasta grubunun Kümeleme Analizi



Şekil 4.17. Beta Katenin gen ifade oranları yüksek AML hasta grubu içerisinde beta katenin gen ifade oranları değişmeyen AML hastalarının ilave edilmesiyle elde edilen grup ile beta katenin gen ifade oranları düşük AML hasta grubunun Kümeleme Analizi

4.7. Yolak Analizleri

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).

İfade düzeyleri anlamlı olarak değişmiş gen setlerinin, sahip olduğu Gen Ontolojisi (GO) terimleri ve ilişkili olduğu yolakların belirlenmesi amacıyla "KEGG" (The Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes) (<http://www.genome.jp/kegg/>) veri tabanı kullanılmıştır. "KEGG" bir yolak üzerindeki genlerin araştırılmasını sağlamaktadır (Curtis vd 2005).

Beta katenin gen ifade seviyeleri düşük, yüksek AML hasta grupları ve sağlıklı kontrol grubunda KEGG yolak analizleri yapılarak ifade düzeyleri anlamlı artış ya da azalış gösteren genlerin ilişkili olduğu yolaklar bulunmuştur.

4.8. Bulunan genler ve ilişkili olduğu Yolaklar

Beta katenin seviyeleri düşük ve yüksek AML hasta grupları arasındaki karşılaştırmalar sonucunda $\text{adj.p}=0.05$ ve log kat değişim değeri en az 2 olmak üzere, en iyi sonuçları veren 125 gen listelenmiştir (Bkn Ek-8). Bu 125 genin içerisinde önemli genler seçilmiştir (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>).

Çizelge 4.7'de beta katenin seviyeleri düşük ve yüksek AML hasta grupları arasında fazla ifade bulan veya az ifade bulan önemli genler gösterilmektedir.

Çizelge 4.7. Beta katenin ifade düzeyleri yüksek ve düşük AML hasta grupları arasında farklı ifadelen genler

<i>Affymetrix Prob ID</i>	<i>Sembol</i>	<i>Gen</i>	<i>Fonksiyonu/Yolak</i>	<i>Fc</i>
209191_at	TUBB6	<i>Tubulin, beta 6</i>	- Gap Junction	-2.62
222608_s_at	ANLN	<i>Anilin, actin binding protein</i>	- Hücre iskeletinin düzenlenmesi	-2,09
206364_at	KIF14	<i>Kinesin family member 14</i>	- Hücre iskeletinin düzenlenmesi	-2.03
218755_at	KIF20A	<i>Kinesin family member 20A</i>	- Hücre iskeletinin düzenlenmesi	-2.19
210139_s_at	PMP22	<i>Peripheral myelin protein 22</i>	- Tight junction	-2.26
242029_at	FNDC3B	<i>Fibronectin type III domain containing 3B</i>	- Hücre adezyon molekülü	-2.06
210997_at	HGF	<i>Hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)</i>	- Fokal adezyon - Kanser Yolakları - Sitokin-sitokin reseptör interaksyonu	-2.37
200999_s_at	CKAP4	<i>Cytoskeleton-associated protein 4</i>	-ER'de protein işlenmesi	-2.18
214575_s_at	AZU1	<i>Azurocidin 1 (cationic antimicrobial protein 37)</i>	- Lökosit migrasyonu	-3.97
206871_at	ELA2	<i>Elastase 2, neutrophile</i>	- Lökosit/nötrofil migrasyonu	-4.90
201069_at	MMP2	<i>Matrix metalloproteinase 2</i>	- Lökosit migrasyonu - Kanser yolakları	-2.43
203213_at	CDK1 (cdc2)	<i>cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M</i>	- Gap Junction - Hücre siklusu	-2.09
202870_s_at	cdc20	<i>cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)</i>	- P53 Yolağı	-2.24
202705_at	CCNB2	<i>cyclin B2 (cyc B)</i>	- Hücre siklusu - P53 Yolağı	-2.17
204256_at	GTSE1	<i>G-2 and S-phase expressed 1</i>	- P53 Yolağı	-2.13
218662_s_at	NCAPG	<i>Non-SMC condensin I complex, subunit G</i>	- Hücre siklusu	-2,08
203973_s_at	CEBPD	<i>CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta</i>	- Transkripsiyon faktörü	-3.06
209099_x_at	JAG1	<i>Jagged 1</i>	- Notch Sinyal Yolağı	-2.17
1553297_a_at	CSF3R	<i>Colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)</i>	- JAK-STAT Yolağı - Kanser Yolakları - Sitokin-sitokin reseptör interaksyonu	-2.01
200782_at	ANXA5 BIRC5	<i>Annexin A5 Baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)</i>	- Apoptoz	-2,84
208791_at	CLU	<i>Clusterin</i>	- Apoptoz	-3.05
206978_at	CCR2	<i>chemokine (C-C motif) receptor 2 (Monocyte chemoattractant protein 1 receptor) (CD192 antigen)</i>	- Sitokin-sitokin reseptör interaksyonu	-2.24
201291_s_at	TOPIIA	<i>Topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa</i>	- DNA Tamiri	-2.75
227961_at	CTSB	<i>cathepsin B</i>	- Tümör invazyonu ve metastaz	-2.09
205653_at	CTSG	<i>cathepsin G</i>	- Tümör invazyonu ve metastaz	-2.95
224918_x_at	MGST1	<i>microsomal glutathione S-transferase 1</i>	- İlaç Metabolizması	-3.42
203744_at	HMGB3	<i>High-mobility group box 3</i>	- Non histon proteinleri	-2.01
202917_s_at	S100A8	<i>S100 calcium binding protein A8</i>	-Kalsiyum bağlama proteinleri	-3.18

<i>Affymetrix Prob ID</i>	<i>Sembol</i>	<i>Gen</i>	<i>Fonksiyonu/Yolak</i>	<i>Fc</i>
203535_at	S100A9	<i>S100 calcium binding protein A9</i>	-Kalsiyum bağlama proteinleri	-2,61
204351_at	S100P	<i>S100 calcium binding protein P</i>	-Kalsiyum bağlama proteinleri	-3,23
206632_s_at	APOBEC3B	<i>Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3B</i>	- Lipid taşınımı	-2.33

Fc (Fold change) değerlerinin negatif olması, genin az ifade bulunduğunu; pozitif olması ise genin fazla ifade bulunduğunu göstermektedir.

Beta katenin seviyeleri düşük AML hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasındaki karşılaştırmalar sonucunda adj.p=0.05 ve log kat değişim değeri en az 2 olmak üzere, en iyi sonuçları veren 200 gen listelenmiştir (Bkn Ek-9). Bu 200 genin içerisinde önemli genler seçilmiştir (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>).

Çizelge 4.8'de beta katenin seviyeleri düşük AML hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında fazla ifade bulan veya az ifade bulan önemli genler gösterilmektedir.

Çizelge 4.8. Beta katenin ifade düzeyleri düşük AML hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında farklı ifadelen genler

<i>Affymetrix Prob ID</i>	<i>Sembol</i>	<i>Gen</i>	<i>Fonksiyonu/Yolak</i>	<i>Fc</i>
205798_at	CD127(IL7)	<i>interleukin 7 receptor</i>	- Sitokin-sitokin reseptör interaksyonu	-3.00
201743_at	CD14	<i>CD14 molecule</i>	- Hücre iskeletinin düzenlenmesi - Toll-like reseptör Sinyal Yolağı - MAPK Yolağı	-2.5
206488_s_at	CD36	<i>CD36 molecule (thrombospondin receptor)</i>	- Fokal adezyon - P53 Sinyal Yolağı - TGFB Sinyal Yolağı	-2.98
205266_at	LIF	<i>Leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor)</i>	- Sitokin-sitokin reseptör interaksyonu - JAK-STAT Yolağı	-2.86
206390_x_at	PF4 (CXCL4)	<i>Platelet factor 4 (chemokine (C-X-C motif) ligand 4)</i>	- Sitokin-sitokin reseptör interaksyonu	-5.00
214146_s_at	PPBP	<i>Pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)</i>	- Sitokin-sitokin reseptör interaksyonu	-4.83
204141_at	TUBB2A	<i>Tubulin, beta 2A</i>	- Gap Junction	-3.98
201109_s_at	THBS1	<i>Thrombospondin 1</i>	- Fokal Adezyon - TGFB Sinyal Yolağı - P53 Yolağı	-2.5
201131_s_at	CDH1	<i>Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)</i>	- Hücre adezyon molekülü	-3.26
221731_x_at	VCAN	<i>Versican</i>	- Kanser Yolakları - Hücre adezyon molekülü	-2.4

Affymetrix Prob ID	Sembol	Gen	Fonksiyonu/Yolak	Fc
212372_at	MYH10	<i>Myosin, heavy chain 10, non-muscle</i>	- Hücre iskeletinin düzenlenmesi	-3.96
201215_at	PLS3	<i>Plastin 3 (T isoform)</i>	- Hücre iskeletinin düzenlenmesi	-2.53
206167_s_at	ARHGAP6	<i>Rho GTPase activating protein 6</i>	- Hücre iskeletinin düzenlenmesi	-3.10
214464_at	cdc42BPA	<i>CDC42 binding protein kinase alpha (DMPK-like)</i>	- Hücre iskeletinin düzenlenmesi	-3.89
205390_s_at	ANK1	<i>Ankyrin 1, erythrocytic</i>	- Hücre iskeletinin düzenlenmesi	-3.32
223967_at	ANGPTL6	<i>Angiopoetin like 6</i>	- Tümör invazyonu	2.01
203680_at	PRKAR2B	<i>Protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta</i>	- Apoptoz	-3.45
204315_s_at	GTSE1	<i>G-2 and S-phase expressed 1</i>	- P53 Yolağı	-2.45
205767_at	EREG	<i>Epiregulin</i>	- ERB B Sinyal Yolağı	-2.39
202728_s_at	LTBP1	<i>Latent transforming growth factor beta binding protein 1</i>	- TGFB Sinyal Yolağı	-2.6
201506_at	TGFB1	<i>Transforming growth factor, beta-induced, 68kDa</i>	- TGFB Sinyal Yolağı	-2.39
205780_at	BIK	<i>BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)</i>	- Apoptoz	2.23
204004_at	PAWR	<i>PRKC, apoptosis, WTI, regulator</i>	- Tümör supresör	-1.57
231798_at	NOG	<i>Noggin</i>	- TGFB Sinyal Yolağı	2.33
210517_s_at	AKAP12	<i>A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12</i>	- Apoptoz	-2.94
204416_x_at	APOCI	<i>Apolipoprotein C I</i>	- Lipid taşınımı	-3.74
204561_x_at	APOCII	<i>Apolipoprotein C II</i>	- Lipid taşınımı	2.42
234985_at	LDLRAD3	<i>Low density lipoprotein receptor class A domain containing 3</i>	- Lipid taşınımı	-2.88
212224_at	ALDH1A1	<i>Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1</i>	- Kök Hücre Belirteci	-3.81
215489_x_at	HOMER3	<i>Homer homolog 3</i>	- Transkripsiyon faktörü	2.08
229638_at	IRX3	<i>Iroquois homeobox 3</i>	- Transkripsiyon faktörü	2.57
210446_at	GATA1	<i>GATA binding protein 1 (globin transcription factor 1)</i>	- Transkripsiyon faktörü	-2.76

Beta katenin seviyeleri yüksek AML hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasındaki karşılaştırmalar sonucunda adj.p=0.05 ve log kat değişim değeri en az 2 olmak üzere, en iyi sonuçları veren 200 gen listelenmiştir (Bkn Ek-10). Bu 200 genin içerisinde önemli genler seçilmiştir (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>).

Çizelge 4.9'da beta katenin seviyeleri yüksek AML hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında fazla ifade bulan veya az ifade bulan önemli genler gösterilmektedir.

Çizelge 4.9. Beta katenin ifade düzeyleri yüksek AML hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasında farklı ifadelen genler

<i>Affymetrix Prob ID</i>	<i>Sembol</i>	<i>Gen</i>	<i>Fonksiyonu</i>	<i>Fc</i>
206390_x_at	PF4	<i>platelet factor 4 (chemokine (C-X-C motif) ligand 4)</i>	- Sitokin-sitokin reseptör interaksyonu	-5.58
206167_s_at	ARHGAP6	<i>Rho GTPase activating protein 6</i>	- Hücre iskeletinin düzenlenmesi	-2.88
226003_at	KIF21A	<i>Kinesin family member 21A</i>	- Hücre iskeletinin düzenlenmesi	-2.99
213067_at	MYH10	<i>Myosin, heavy chain 10, non-muscle</i>	- Hücre iskeletinin düzenlenmesi - Tight Junction	-3.78
205268_s_at	ADD2	<i>Adducin2 beta</i>	- Hücre iskeletinin düzenlenmesi	-2,67
207087_x_at	ANK1	<i>Ankyrin 1, erythrocytic</i>	- Hücre iskeletinin düzenlenmesi	-2.89
202065_s_at	PPFIA1	<i>Protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin), alpha 1</i>	- Hücre adezyon molekülü	-2,01
201131_s_at	CDH1	<i>Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)</i>	- Hücre adezyon molekülü	-3.47
211192_s_at	CD84	<i>CD84 molecule</i>	- Kanser Yolakları - Hücre adezyon molekülü	-2.69
201110_s_at	THBS1	<i>Thrombospondin 1</i>	- Lökosit migrasyonu - Fokal adezyon - P53 Sinyal Yolağı - TGFB Sinyal Yolağı	-5.26
242197_x_at	CD36	<i>CD36 molecule (thrombospondin receptor)</i>	- Fokal adezyon - P53 Sinyal Yolağı - TGFB Sinyal Yolağı	-2,98
202728_s_at	LTBP1	<i>latent transforming growth factor beta binding protein 1</i>	- TGFB Sinyal Yolağı	-2.81
212926_at	Smc5	<i>Structural maintenance of chromosomes 5</i>	- Hücre siklusu	-2.62
208721_s_at	ANAPC5	<i>Anaphase promoting complex subunit 5</i>	- Hücre siklusu	-2.7
239219_at	AURKB	<i>Aurora kinase B</i>	- Hücre siklusu	-2.88
217813_s_at	SPIN1	<i>Spindlin1</i>	- Hücre siklusu	-2.19
1552680_a_at	CASC5	<i>Cancer susceptibility candidate 5</i>	- Hücre siklusu	-2.98
204315_s_at	GTSE1	<i>G-2 and S-phase expressed 1</i>	- P53 Sinyal Yolağı	-3.69
205767_at	EREG	<i>Epiregulin</i>	- ERB B sinyal yolağı	-2.96
1558080_s_at	DNAJC3	<i>DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3</i>	- Kanser Yolakları	-3.31
206871_at	ELA2	<i>Elastase 2, neutrophil</i>	- Lökosit/nötrofil migrasyonu	-7.9
1556202_at	SRGAP2	<i>Slit-Robo Rho Gtpase activating protein</i>	- Slit Robo sinyal yolağı	-2.3
212224_at	ALDH1A1	<i>Aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1</i>	- Kök Hücre Belirteci	-4,37
210446_at	GATA1	<i>GATA binding protein 1 (globin transcription factor 1)</i>	- Transkripsiyon faktörü	-3.3
219737_s_at	PCDH9	<i>Protocadherin 9</i>	- Tümör supresor	-3.0
201149_s_at	TIMP3	<i>TIMP metalloproteinase inhibitor 3</i>	- Metastaz	-2.45
204416_x_at	APOC1	<i>Apolipoprotein C I</i>	- Lipid taşınımı	-4.00
237741_at	SLC25A36	<i>Solute carrier family 25, member 36</i>	- Membran taşıma (transport) proteinleri	-2.20
240159_at	SLC15A2	<i>Solute carrier family 15 (H+/peptide transporter), member 2</i>	- Membran taşıma (transport) proteinleri	-2.64

<i>Affymetrix Prob ID</i>	<i>Sembol</i>	<i>Gen</i>	<i>Fonksiyonu</i>	<i>Fc</i>
241843_at	SNORA28	<i>Small nucleolar RNA, H/ACA box 28</i>	- Nükleolar RNA	-2.22

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

AML, bir hematopoetik (kan yapan) kök hücre bozukluğudur. Normal hematopoetik kök ya da öncü hücrelerin kontrolsüz olarak çoğalmaları, olgunlaşma ve farklılaşma özelliklerini kaybetmeleri ile karakterize olan bir hastalıktır (Shipley ve Butera 2009). Hematopoetik kök hücrelerin proliferasyonunu ve farklılaşmasını kontrol eden RAF/MEK/ERK, PI3K/AKT, reseptör tirozin kinazlar ve RAS ailesi üyeleri gibi çok çeşitli yolaklar AML'de bozulmaktadır (Scholl vd 2008). Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise, AML vakalarının çoğunluğunda Wnt/ β -katenin yolağındaki bozukluklar gösterilmiştir. Hematopoetik kök hücrelerin proliferasyonu ve ``self renewal`` yeteneklerinde Wnt/ β -katenin sinyal yolağının rol oynadığına dair bulgulara ulaşılmıştır. Bir çok çalışmada, AML vakalarında Wnt/ β -katenin sinyal yolağının aktivasyonu gösterilmiş olup, bu yolağın kilit noktası olduğu düşünülen beta katenin üzerinde sıkça durulmuştur (Mikesch vd 2007).

Wnt/ β -katenin sinyal yolağı embriyonik ve erişkin dönemlerde proliferasyon, farklılaşma, apoptoz, anjiogenez ve hücre göçü gibi birçok biyolojik süreçte görev alan önemli bir yolaktır (Chen vd 2008). Normal bir kök hücrede sinyal yolağı, Wnt proteininin hücre zarındaki reseptörlerine bağlanması ile başlar. Bu bağlanmanın sonrasında sinyal önce sitoplazmaya geçerek hücrenin proliferasyonunu sağlayacak çok sayıda genin transkripsiyonunu aktive eden beta katenin proteinini yıkmakla görevli protein kompleksini parçalar.

Wnt sinyal yolağından bağımsız olarak (Wnt sinyali inaktif durumdayken), yukarıda bahsi geçen beta katenin ve beta katenin proteini yıkım kompleksinde rol alan proteinleri kodlayan genlerde (Axin, APC) meydana gelen mutasyonlar sonucunda sinyal yolağının aktif hale geçmesi ise hücrelerde kontrolsüz aktivasyona neden olmaktadır. Bu yolda görev yapan biyomoleküllerdeki değişiklikler nedeni ile meydana gelen hastalıklarla ilgili çalışmalar çok geniş kapsamlı olarak literatürde yer almaktadır. Wnt sinyal yolağı her dokuda farklı bir mekanizma bozukluğu ile başta kolorektal kanser olmak üzere, şizofreni, retinal anjiyogenez defekti, Alzheimer, tetra-amelia, polikistik böbrek hastalıkları, akciğer kanseri, osteoporozis, lösemi gibi birçok hastalığın meydana gelmesinde önemli rol oynamaktadır (Lustig vd 2003, Logan vd 2004, Chen vd 2008).

AML hasta grupları ile bugüne kadar yapılan çalışmalar, Wnt sinyal yolağının temel bileşenlerinden biri olan beta katenin gen ifade seviyelerinin gerek bu hasta grubu vakaları arasında gerek bu hasta grubu ile sağlıklı kontrol grup arasında ciddi farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur (Serinsöz vd 2004, Simon vd 2005, Ysebart vd 2006, Chen vd 2008, Gandillet vd 2011). Anılan bu çalışmalar beta katenin gen ifade seviyesindeki bu farklılıkların; AML hastalığının FAB sınıflandırması, CD34+ yüzdesi, karyotip dağılımı, Flt3 ve nükleofosmin mutasyonları ile korele olup olmadığını sorgulamış, ancak herhangi bir anlamlı korelasyon tespit edememiştir.

Yürütülmüş olan bu çalışmada, birçok sinyal yolağının kavşak noktasında bulunan beta katenin proteini ile AML moleküler biyolojisi arasındaki net bağlantıyı ortaya koyamamış olan AML literatüründeki eksikliğin tamamlanması hedeflenmiştir.

1- AML'de hasta örnekleri arasında beta katenin seviyeleri değişmektedir.

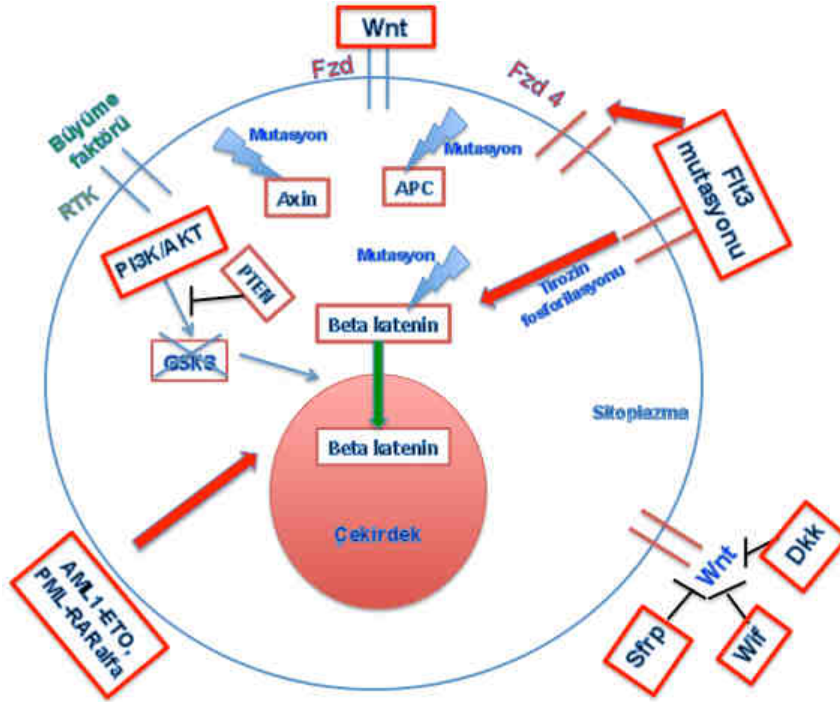
AML grubu hasta örnekleri ile yapılan önceki çalışmalarda, Wnt yolağının çekirdek içindeki ana tetik bileşeni olan beta katenin protein seviyelerinde, hasta grupları ve hasta-sağlıklı örnekleri arasında yapılan analizlerde ciddi farklılıklar tespit edilmiştir.

Buna göre analize aldığımız 19 AML ve 3 sağlıklı bireyin izole edilmiş olan CD34+ hematopoetik kök hücrelerinde eş zamanlı PCR ile mRNA seviyesi tespiti, hasta örnekleri arasında beta katenin seviyelerinin değiştiğini göstermiştir. Bu sonuçlara göre incelenen örnekler beta katenini yüksek, düşük ve bu seviyede değişiklik tespit edilemeyen 3 gruba ayrılmıştır (Bkn Şekil 4.6). Bu bulgularımız yukarıda değinilen literatürler ile paralellik göstermektedir.

Her ne kadar beta katenin, Wnt yolağı ile ilişkili ise de birtakım farklı mekanizmalarda beta katenin üzerinde etkili olabilmektedir (Şekil 5.1).

- Axin mutasyonları (Iwai vd 2005),
- APC mutasyonları (Schlosshauer vd 2000),
- β -katenin mutasyonları (Iwai vd 2005),

- Flt3 mutasyonları (Kajiguchi vd 2007),
- Translokasyon ürünleri (Müller-Tidow vd 2004),
- Wnt inhibitörlerinin anormal metilasyonu (sFRP1, sFRP2, SFRP4 sFRP5, WIF1, DKK3, Hdpr1) (Valencia vd 2009).
- Sinyal yolları; PTEN (Stambolic vd 2002), PI3K/AKT (Kajiguchi vd 2007)



Şekil 5.1: Beta katenini etkileyen mekanizmalar (Kırmızı ile işaretlenmiş faktörler, beta kateninin sitoplazmadan çekirdeğe girişinde etkili olan mekanizmalardır)

2- AML örneklerinin transkriptom profilleri beta katenin seviyelerine göre farklı moleküler imza profilleri ortaya koymaktadır.

Bir hücrenin keza bir organizmanın genomu statiktir. Oysa ki transkriptom profili hücreden hücreye, dokudan dokuya, organdan organa değişiklik arz etmektedir, yani dinamiktir. Multigenik, multistep ve multifaktöryel bir hastalık olan kanserdeki heterojenite aynı dokuya ait benzer histopatolojik özelliklere sahip kanser vakalarının bile moleküler heterojenitesini ortadan kaldıramamaktadır. Kanser örneklerinin detaylı moleküler kimliklendirilmeleri ve yeni informatif moleküler belirteçlerin tanımlanabilmesinde transkriptom analizleri öne çıkmaktadır.

Bu tez çalışmasında, beta katenin gen ifade oranına göre 3 gruba ayrılmış olan AML örneklerinin transkriptom profilleri, sağlıklı kontrol örneklerinin transkriptom profilleri ile öncelikle farklı olarak ifadelenen gen setleri, sonrasında ise kümeleme (Cluster) analizleri ile sorgulanmıştır.

Beta katenin gen ifade seviyeleri düşük, yüksek AML hasta grupları ve sağlıklı kontrol grubunda KEGG yolak analizleri yapılarak (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) ifade düzeyleri anlamlı artış ya da azalış gösteren genlerin ilişkili olduğu yollar bulunmuştur.

Yüksek ve Düşük Beta katenin gen ifade seviyelerine sahip AML hasta grupları:

Beta katenin düzeyleri yüksek ve düşük AML hasta grupları arasındaki transkriptom profil kıyaslaması belirgin bir imza vermektedir. Yüksek ve düşük beta katenin seviyeli AML hasta örneklerinin transkriptom profilleri kıyaslandığında, $adj.p=0.05$ ve log kat değişim değeri en az 2 olmak üzere 125 gen üzerinden kümeleme (Cluster) analizi gerçekleştirilmiştir. Bu 125 gen ile yüksek grubun düşük gruptan net olarak ayrıldığı gözlenmiştir. Bu ayrılmada öne çıkan yollar şunlardır (Bkn Çizelge 4.7);

Hücre döngüsü, DNA tamiri, hücre adezyon molekülleri, oluklu bağlantı (Gap junction), sıkı bağlantı (Tight junction), fokal adezyon, hücre iskeletinin düzenlenmesi, lökosit/nötrofil migrasyonu, transkripsiyon faktörleri, apoptoz, P53 yolağı, JAK-STAT yolağı, Notch yolağı, Kemokin yolağıdır. Bu yollar, lösemide ya da lösemik kök hücrelerde anahtar rolleri olduğu bilinen ve daha önceki çalışmalarda tanımlanmış yollardır.

Beta katenin seviyeleri yüksek olan AML grubumuzda, *hücre döngüsünde* rol oynayan genlerin (özellikle *cdc2, cdc20, CCNB2*) ifade düzeylerindeki azalma kök hücrelerin karakteristik özelliği olan yavaş hücre bölünme hızı ile ilişkilendirilebilir. Bu durum hızlı bölünen hücrelere kemoterapötik ajanların etki etmesinin nedenini ve kök hücrelerin kemoterapiye olan duyarlılığını açıklamaktadır.

Buna ilaveten *DNA tamirinde* rol oynayan TOP1IA gen ifade düzeylerinin, beta katenin seviyeleri yüksek olan AML grubumuzda azalması AML'de sık rastlanan kromozomal bozukluklar ve mutasyonlarla ilişkili olabileceğini ortaya çıkarmıştır. Bu bulgular daha önce AML'de lösemik kök hücreler ile yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir (Gal vd 2006, Gentles vd 2010).

Embriyonik ve postnatal gelişimde hücre kaderinin belirlenmesi ve kök hücre devamlılığının sağlanmasında *Notch sinyal yolağı* rol oynar. Erişkinlerde bu etkilerin çeşitli nedenlerle aksamasından dolayı Notch, onkogen veya tümör baskılayıcı gen olarak etki eder. Yapılan pek çok çalışmada (Karanu vd 2000, Duncan vd 2005, Gal vd 2006, Stirewalt vd 2007) Notch sinyal aktivasyonunun hematopoetik kök ya da öncü hücrelerinin kendi kendini yenileme özelliğini sağladığı ve farklılaşmayı baskıladığı rapor edilmiştir. Bunun aksine Notch sinyal aktivasyonunun, transkripsiyonel faktör PU.1'in aşırı ifadelenmesi tarafından miyeloid hücrelerin farklılaşmasını uyardığını belirten çalışmalarda mevcuttur (Tohda vd 2005, Chen vd 2008, Pizzimenti vd 2008, Chadwick vd 2008). Bizim çalışmamızda ise beta katenin seviyeleri yüksek olan AML hasta grubunda, Notch sinyal yolağında rol oynayan Jagged 1 ligandının az ifade bulduğu gözlenmiştir.

Hematopoetik kök hücrelerin kendilerini yenilemesi, hücre siklusunun G0 evresinde sessiz olarak kalmaları, adezyonları, proliferasyonları, olgunlaşmaları, farklılaşmaya gitmeleri vb birçok karmaşık süreç kemik iliğinde özel mikroçevrelerde (niş) sağlanır. Çeşitli yolakların, kök hücre ile nişi arasındaki bağlantılarda görevli olduğu ve hücreler arasındaki bağlantıların bozulmasının kanser kök hücre patogenezinde çok önemli bir faktör olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Clarke ve Fuller 2006). Beta katenin seviyeleri yüksek olan AML grubumuzda, hücre bağlantılarıyla ilişkili birçok yolak; *hücre adezyon molekülleri*, *gap junction*, *tight junction* tespit edilmiş olup, bu yolaklarla ilişkili genlerin ifade düzeylerinde beta katenin seviyeleri düşük AML grubumuza göre azalma gözlenmiştir.

Normal ve lösemik kök hücre ile nişleri arasındaki interaksyonda kritik öneme sahip bir diğer protein ailesi grubu ise kemokinler olup, kök hücre mobilizasyonunda rol oynamaktadır (Majeti vd 2009). Yapılan çalışmalara paralel olarak beta katenin seviyeleri

yüksek AML grubumuzda kemokin ailesi üyelerinin ifade düzeylerinde azalma gözlenmiştir.

Stres altında olmayan hücrelerde çok sayıda pozitif ve negatif düzenleyiciler bulunmaktadır ve P53'ün kararlı halinin devamlılığını sağlamaktadırlar. Hücreler stres altına girdiği zaman ise, P53 çeşitli post translasyonel modifikasyonlar ile aktive olmaktadır ve çekirdekte birikmektedir. Bu modifikasyonlar P53'ün stabil ve aktif halde kalmasında etkili olan birtakım faktörler ile ilişkiye girmesi için gereklidir. Bu faktörlerden ayrıldığı zaman ise P53 negatif olarak düzenlenir. Hasarın tamiri süresince negatif düzenleyiciler GTSE1 gibi, P53 seviyelerinin ve aktivitesinin azalmasında kritik rol oynayarak P53'ün yeniden kararlı halini almasını sağlarlar. GTSE1, hücre siklusunu düzenleyici bir protein olup yalnızca hücre döngüsünün G2 ve S fazları boyunca ifade olmaktadır. Sitoplazma ve çekirdek arasında gidip gelen bir protein olup, ancak DNA hasarı sonrasında çekirdekte birikir ve çekirdekte P53'e bağlanarak onu çekirdek dışına gönderir ve P53 aracılı apoptozu baskılar (Monte vd 2004). AML hasta grubunda daha önceden GTSE1 ile yapılan bir çalışma bulunmamaktadır. Beta katenin seviyeleri yüksek olan AML hasta grubumuzda, P53 yolağında rol oynayan GTSE1 geninin az ifade bulunduğu gözlenmiştir.

Proliferasyon ve farklılaşmada rol oynayan, miyeloid gelişimi boyunca ifadelenen C/EBP ailesinin bir üyesi olan CEBPD (CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP, delta) bir transkripsiyon faktörüdür. AML'de bir tümör supresör gen olarak CEBPD'nin baskılandığını gösteren promotor metilasyon çalışmaları mevcuttur (Agrawal vd 2007). Bizim beta katenin seviyeleri yüksek AML grubunda ise CEBPD geninin ifade düzeylerinde literatürle uyumlu olarak azalma gözlenmiştir.

Nötrofil migrasyonunda rol oynayan ELA2 geni, nötrofillerden inflamasyon boyunca salgılanan bir serin proteazdır. Yapılan çalışmalarda özellikle nötrofenili hastaların miyeloid öncü hücrelerinde, ELA2 ifade düzeylerinde ve protein seviyelerinde azalma gözlenmiş olup, bu gen mutasyonlarını taşıyan hastaların bir kısmında lösemi gelişimi saptanmıştır. Buna ilaveten hematopoez, immün sistemin düzenlenmesi ve onkogeneizde kritik bir öneme sahip olan *JAK-STAT yolağında* görev alan bir hematopoetik büyüme faktörü ve nötrofil üretiminde bir regülatör olan CSF3R geninde meydana gelen

mutasyonların nötropenili hastalardaki varlığı, bu hastaların %78'nde AML ya da ALL gelişimine neden olmaktadır (Hermans ve Touw 2001, Zeidler vd 2008, Skokowa vd 2009). Bizim çalışmamızda ise yüksek beta katenin seviyeli AML grubunda düşük beta katenin seviyeli AML grubuna göre her 2 gen de az ifade bulmuştur. Böylelikle CSF3R geninin, beta katenin seviyeleri yüksek AML grubumuzda az ifadenmesi bu hastalarda sitopeni gelişimiyle ilişkilendirilebilir.



Şekil 5.2: Yüksek ve Düşük beta katenin seviyeli AML hasta grupları arasında farklı ifade bulan genler ve ilişkili olduğu yolaklar (Mavi: Beta katenin seviyeleri yüksek AML hasta grubunda ifade düzeyi azalan yolaklar, Kırmızı: Yolaklarla ilişkili bulunan genler)

Düşük Beta katenin gen ifade seviyelerine sahip AML ve Sağlıklı Kontrol Grubu:

Beta katenin düzeyleri düşük AML hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasındaki transkriptom profil kıyaslaması belirgin bir imza vermektedir. Düşük beta katenin seviyeli AML hasta ve sağlıklı örneklerinin transkriptom profilleri kıyaslandığında $adj.p=0.05$ ve log kat değişim değeri en az 2 olmak üzere 200 gen üzerinden kümeleme (Cluster) analizi gerçekleştirilmiştir. Bu 200 gen ile düşük grubun sağlıklı kontrol grubundan net olarak ayrıldığı gözlenmiştir. Bu ayrılımda öne çıkan yolaklar şunlardır (Bkn Çizelge 4.8);

Adezyon molekülleri, Gap junction, hücre iskeletinin düzenlenmesi, apoptoz, kök hücre belirteçleri, transkripsiyon faktörleri, TGFB yolu, JAK-STAT yolu ve kemokin yolu.

Kök hücrelerin mikroçevre elemanları ile olan interaksyonu, kök hücrelerin kendi kendini yenilemesi ve farklılaşmasında düzenleyici bir mekanizma olarak ortaya çıkmaktadır (Rizo vd 2006). Bu interaksyonda *hücre adezyon molekülleri (CAM)* ve *kemokinler* kritik rol oynamaktadır (Clarke ve Fuller 2006). Hücrelerin özgül olarak dokulara yönelmelerinde, birbirlerini tanımalarında, embriyogenez, hücre büyümesi, farklılaşması ve inflamasyon gibi birçok prosesin düzenlenmesinde rol oynayan adezyon moleküllerinden E-kaderinin ifade düzeyleri lösemili hastaların büyük bir kısmında önemli derecede azalmış ya da tamamen ortadan kaybolmuştur (Rao vd 2008, Rao vd 2010). Literatürde yapılan bu çalışmalar ile uyumlu olarak, beta katenin seviyeleri düşük AML grubumuzda sağlıklı kontrollere göre E-kaderin geni az ifade bulmuştur.

Hücre adezyon molekülleri ile ilişkili yollardan, *gap junction* elemanlarının ifadenmesinin lösemik kök hücrelerde anormal şekilde düzenlendiği rapor edilmiştir (Majeti vd 2009). Bizim AML hasta grubumuzda ise *gap junction* ilişkili genlerin ifade düzeylerinde sağlıklı kontrollere göre azalma gözlenmiştir.

Kök hücre ile niş interaksyonunda görev alan diğer bir protein ailesi olan kemokinler ile ilişkili genler beta katenin seviyeleri düşük AML hasta grubumuzda sağlıklı kontrollere göre literatürle paralel olarak az ifadenmiştir.

Apoptoz ilişkili genlerden BIK proapoptotik bir gen olup, BH3 bölgeleri ile BCL-2 ailesine benzerlik gösterir ve malign hücrelerde yüksek seviyede ifadenmelerinin anlamsız olduğu yapılan bazı belirtilmiştir (Boyd vd 1995). Ancak BIK'in pro-apoptotik aktivitesi tümör oluşumu boyunca BCL-2 tarafından kontrol altında tutulabilir (Chinnadurai vd 2008). Böylelikle BIK geninin artan ifade düzeylerinin, BCL-2 yolunun efektörlerinin bozulması ya da anti-apoptotik BCL-2 ailesi üyelerinin aşırı ifadenmesinden dolayı uygun bir hücresel yanıt olabileceği belirtilmiştir (Manion ve Hockenbery 2003, Certo vd 2006). Bizim beta katenin seviyeleri düşük AML grubumuzda ise, sağlıklı kontrollere göre BIK geninin ifadesi literatüre paralel olarak (Stirewalt vd 2007) artmıştır.

Hücre siklusunu düzenleyici bir protein olan GTSE1 geni, P53 'ün negatif düzenleyicisi olup beta katenin seviyeleri düşük AML hasta grubumuzda sağlıklı kontrollere göre az ifade bulmuştur.

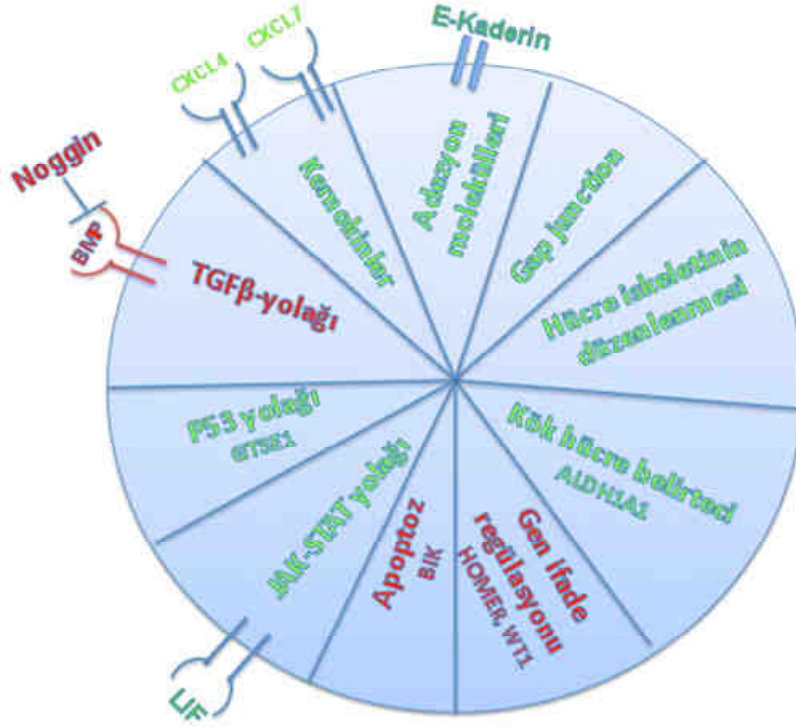
Transkripsiyon faktörü olan WT1 tümör supresör bir gendir. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda WT1'in AML'li hastaların %53.3'ünde ifade olduğu ve bu hastaların %23.3'nde Flt3 tirozin kinaz mutasyonlarının varlığı tespit edilmiştir. WT1 geninin ifade düzeylerinin yüksek olması ile Flt3 mutasyonlarının varlığı arasındaki korelasyon hastalığın remisyon yüzdesindeki azalma ile ilişkilendirilmiştir. AML blastlarında Flt3 mutasyonlarının varlığının muhtemel olarak WT1 ifade düzeylerini artırdığı ve onkogenik fonksiyonuna katkıda bulunduğu belirtilmiştir (Spasov vd 2011). Bu durumun aksine bizim beta katenin seviyeleri düşük AML hasta grubumuzda sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında WT1 ifadesinde azalma gözlenmiştir.

Çeşitli aldehit dehidrojenaz genlerinden bir tanesi ve bir *kök hücre belirteci* olan ALDH1A1, yapılan çalışmalar sonucunda AML'de ifade oranları önemli ölçüde azalan bir gen olarak tespit edilmiştir. ALDH1A1 intraselüler retinoik asit üretiminde içerilir, ilaç direnci, hücre farklılaşması, oksidatif stres cevabı gibi çok çeşitli biyolojik aktivitelerde rol oynar (Moreb vd 2008). Normal hemetopoetik öncü hücrelerde olgun hücrelere nazaran, artan ALDH aktivitesinden bahsedilmektedir ve ALDH aktivitesinin normal hematopoetik kök hücrelerin devamlılığının sağlanmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Buna rağmen ALDH aktivitesinin lösemi ve lösemik kök hücrelerdeki rolü tam olarak netliğe kavuşmamıştır (Stirewalt vd 2008). Yapılan çalışmalarda AML blastlarının ALDH aktivitesini kaybettiği tespit edilmiş olup (Pearce vd 2005), bizim beta katenin seviyeleri düşük AML hasta grubumuzda da sağlıklı kontrollere göre ALDH1A1 gen ifade oranlarında benzer durum söz konusudur.

HOMER3 bir *transkripsiyon faktörü* olup, bazı dokuların farklılaşmasında rol oynadığı düşünülmektedir. Bununla birlikte HOMER3'ün lösemik blastlarda ifade düzeylerindeki değişiklikler tam olarak bilinmemektedir. (Ishiguro ve Xavier vd 2004, Bortoloso vd 2006). Ancak yakın zamanda AML'de yapılan bir çalışmada AML hasta grubunda HOMER3 ifade düzeylerinde artış gözlenmiştir (Stirewalt vd 2008). Bizim beta katenin seviyeleri düşük AML hasta grubumuzda da benzer sonuçlar tespit edilmiştir.

TGFB yolağı hücre bölünmesinde önemli yeri olan bir sitokin olup, hücre tipine bağlı olarak hücre bölünmesini pozitif veya negatif yönde etkilemek gibi bir çok değişik fonksiyona sahiptir. *TGFB* epitelyal, endotelyal ve hematopoetik hücrelerin bölünmesini engellemektedir. *TGFB*'nin hücre bölünmesi üzerindeki fonksiyonu bu sitokinin hücre siklusunun ilerlemesinde önemli rol oynayan anahtar proteinlerle etkileşimi sonucu ortaya çıkmaktadır (Meulmeester vd 2011). *TGFB* ailesi üyelerinden BMP proteinleri (kemik morfojenik protein) özellikle hematopoetik hücrelerin proliferasyonu, farklılaşması ve apoptozu gibi çeşitli proseslerde görev alır. BMP sinyal yolağının çeşitli kanserlerde bozulduğu gösterilmiş olup, buna rağmen BMP'nin hematolojik malign hastalıklardaki rolü halen tam olarak netliğe kavuşmamıştır. Ancak çeşitli çalışmalarda BMP ve reseptörlerinin lösemilerde hücre farklılaşmasını ve apoptozu düzenleyebileceği belirtilmiştir (Dzietczenia vd 2010). BMP proteinlerinin inhibitörü olarak görev yapan Noggin, BMP'ye bağlanarak BMP'nin tip I ve tip II reseptörlerine bağlanmasını inhibe etmektedir (Krause vd 2011). AML hasta grubunda daha önce Noggin ile yapılan bir çalışma bulunmamaktadır. Bizim beta katenin seviyeleri düşük AML hasta grubunda sağlıklı kontrollere göre Noggin gen ifadesinin arttığı saptanmıştır.

Hücre büyümesi, farklılaşması ve transformasyonunu içeren hücrel olayları düzenleyen *Jak-Stat yolağı* üyelerinden olan LIF (Leukemia inhibitory factor), LIF reseptörünün gp190 ve gp130 alt birimlerine bağlanarak STAT aktivasyonunda rol oynar. (Graf vd 2010). LIF, farklı tipte hücrelerin büyüme ve farklılaşmasını düzenlemede görev alır. Yakın zamanda AML'de yapılan bir çalışmada, AML hasta grubunda LIF ifade seviyelerinde artış gözlenmiş olup, bu artışın hastalığın patogenezi ile ilişkilendirildiği belirtilmiştir (Xiao vd 2010). Bu çalışmanın aksine bizim beta katenin seviyeleri düşük AML hasta grubunda sağlıklı kontrollere göre LIF gen ifadesinin azaldığı saptanmıştır.



Şekil 5.3: Düşük beta katenin seviyeli AML hasta grubu ve sağlıklı kontrol grubu arasında farklı ifade bulan genler ve ilişkili olduğu yollar (Yeşil: AML hasta grubunda ifade düzeyi azalan yollar, Kırmızı: AML hasta grubunda ifade düzeyi artan yollar)

Yüksek Beta katenin gen ifade seviyelerine sahip AML ve Sağlıklı Kontrol Grubu:

Beta katenin düzeyleri yüksek AML hasta grubu ile sağlıklı kontrol grubu arasındaki transkriptom profil kıyaslaması belirgin bir imza vermektedir. Yüksek beta katenin seviyeli AML hasta ve sağlıklı örneklerin transkriptom profilleri kıyaslandığında $adj.p=0.05$ ve log kat değişim değeri en az 2 olmak üzere 200 gen üzerinden kümeleme (Cluster) analizi gerçekleştirilmiştir. Bu 200 gen ile yüksek grubun sağlıklı kontrol grubtan net olarak ayrıldığı gözlenmiştir. Bu ayrılımda öne çıkan yollar şunlardır (Bkn Çizelge 4.9);

Hücre iskeletinin düzenlenmesi, hücre adezyon molekülleri, kemokinler, hücre döngüsü, TGFB Yoluğu, P53 yoluğu, Erb B yoluğu, Slit-Robo yoluğu, lökosit/nötrofil migrasyonu, kök hücre belirteçleri, tümör supresör genler, metastazdır.

Hücre döngüsünde rol oynayan genlerin beta katenin seviyeleri yüksek olan AML grubumuzda sağlıklı kontrol grubuna göre ifade düzeylerinde azalma gözlenmiştir. Bu

durum literatür bilgisi ile paralel olarak, yukarıda da değinildiği üzere kök hücrelerin karakteristik özelliği olan yavaş hücre bölünme hızı ile açıklanabilir (Gal vd 2006).

Hücre döngüsünü düzenleyici bir protein olan yukarıda değinilen GTSE1 geni, P53'ün negatif regülatörüdür (Monte vd 2004). GTSE1, beta katenin seviyeleri yüksek AML hasta grubumuzda sağlıklı kontrollere göre az ifade bulmuştur.

Kök hücre ile nişi arasındaki bağlantılarda önemli rol oynayan hücre adezyon molekülleri, kemokinler gibi çeşitli yolakların bozulmasının kanser kök hücre patogenezinde çok önemli bir faktör olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Clarke ve Fuller 2006, Majeti vd 2009). Beta katenin seviyeleri yüksek AML hasta grubumuzda hücre bağlantılarıyla ilişkili yolaklar; *hücre adezyon molekülleri*, *kemokinler* tespit edilmiş olup, bu yolaklarla ilişkili genlerin ifade düzeylerinde sağlıklı kontrol grubumuza göre azalma gözlenmiştir.

ErbB yolağı ilişkili Epiregulin geni epidermal büyüme faktörü ailesinin bir ligandı olup, ErbB ailesi reseptörlerine bağlanır. Bu bağlanma sonrasında reseptörlerin tirozin rezidülerinden dimerizasyonu, fosforilasyonu gerçekleşir. Fosforlanan ErbB reseptörleri büyüme, farklılaşma, apoptoz, adezyon ve migrasyon gibi birçok intraselüler yolağı aktive eder (Kato vd 2006). AML hasta grubunda daha önce Epiregulin ile yapılan bir çalışma bulunmamaktadır. Beta katenin seviyeleri yüksek AML hasta grubumuzda sağlıklı kontrollere göre Epiregulin gen ifade oranlarında azalma gözlenmiştir.

Slit-Robo yolağında, Slit reseptörü Robo'ya bağlanarak kalsiyum bağımlı hücre-hücre adezyon molekülü N-kaderinin inaktivasyonuna neden olmaktadır. Bunun için Robo, abl tirozin kinaz ve N-kaderinin multimerik bir kompleks oluşturması gerekir. Kompleks oluşumu sonrasında beta kateninin tirozin 489. rezidüsünden abl aracılı fosforilasyonu gerçekleştirilir. Böylelikle bu durum beta kateninin N-kaderine olan affinitesinin azalmasını, N-kaderin fonksiyonunun kaybını ve tirozinden fosforlanan beta kateninin çekirdeğe transloke olmasını sağlar. Böylece Slit-Robo kaderin aracılı adezyon kaybına neden olur (Rhee vd 2007). Slit-Robo sinyali ile ilişkili srGAPs; Rho GTPaz, Cdc42, Rac1, and RhoA genlerinin inaktivasyonundan sorumludur. srGAP2 sitoplazmada ve membranda lokalizedir. Bu genin azalan ifade düzeyleri hücre adezyonunda azalmaya, hücre migrasyonunda artışa neden olurken, hücre proliferasyonu üzerine etki etmemektedir (Guo

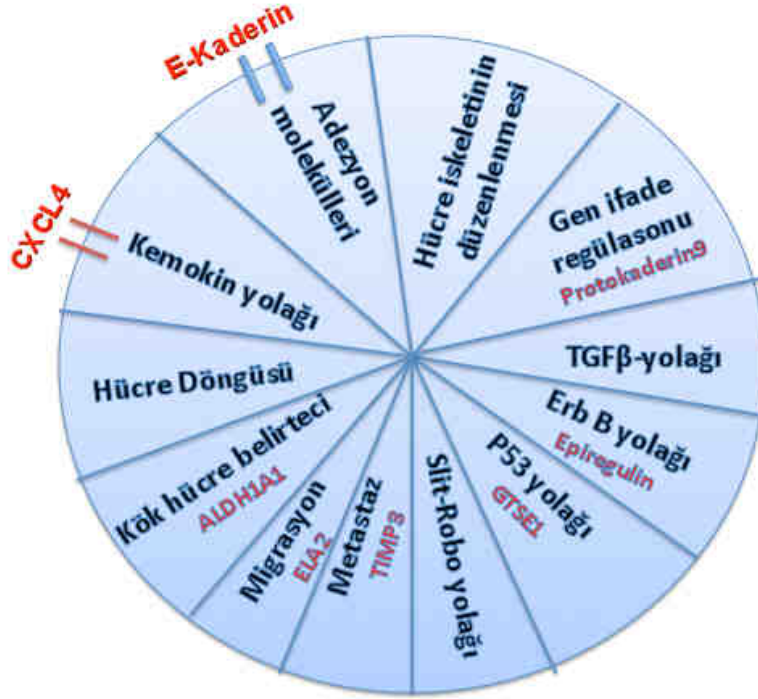
vd 2010). srGAP geni ile ilgili olarak AML'de şimdikiye dek yapılan bir çalışma yoktur. Bizim yüksek beta katenin seviyeli AML grubumuzda sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında srGAP geninde azalma gözlenmiştir.

Tümör supresör gen olan protokaderinler, Wnt/ β -katenin gibi birçok yolağın düzenlenmesinde görev almaktadır. β -katenin/TCF aracılı transkripsiyonu baskılamaktadır. Protokaderinlerin ifade düzeylerinin azalması ile β -katenin proteininde artış gözlenerek, Wnt hedef genlerinin aktive olması sağlanmaktadır (Dallosso vd 2009). AML hasta grubunda daha önce protokaderin 9 ile yapılan bir çalışma bulunmamaktadır. Beta katenin seviyeleri yüksek AML hasta grubumuzda sağlıklı kontrollere göre Protokaderin 9 geni az ifadelenmiştir.

Nötrofil migrasyonunda rol oynayan yukarıda adı geçen ELA2 geni, beta katenin seviyeleri yüksek AML hasta grubumuzda sağlıklı kontrollere göre az ifade bulmuştur.

Kanserin invazyon ve *metastaz* yapabilmesi için ekstrasellüler matriksin (ECM) yıkılması gereklidir. Matriks metalloproteinazlar (MMP) fizyolojik ve patolojik doku yıkımında önemli rol oynayan ekstrasellüler proteazlardır. Matriks metalloproteinazlar lökositler, keratinositler, fibroblastlar, makrofajlar, kondrositler, düz kas hücreleri gibi epitelyal ve mezenkimal kökenli hücreler tarafından sentezlenirler. Doku gelişimi ve farklılaşması, hücre göçü, anjiogenez patolojisinde MMP'ler önemli rol oynamaktadır. İnaktif zimojenler halinde salınan MMP'lerin proteolitik aktiviteleri, spesifik doku inhibitörleri olan TIMP tarafından inhibe edilir (Soydinc vd 2006). MMP ve TIMP arasındaki dengenin bozulması kanserde invazyon ve metastaza neden olmaktadır. Beta katenin seviyeleri yüksek AML hasta grubumuzda sağlıklı kontrollere göre AML'de daha önce çalışılmamış olan *TIMP3* gen ifade oranlarında azalma gözlenmiştir.

AML blastlarının ALDH aktivitesini kaybettiği yukarıda değinildiği üzere, yapılan çalışmalarda tespit edilmiş olup (Pearce vd 2005), bizim beta katenin seviyeleri yüksek AML hasta grubumuzda sağlıklı kontrollere göre ALDH1A1 gen ifade oranlarında benzer şekilde azalma gözlenmiştir.



Şekil 5.4: Yüksek beta katenin seviyeli AML hasta grubu ve sağlıklı kontrol grubu arasında farklı ifade bulan genler ve ilişkili olduğu yollar (Mavi: Beta katenin seviyeleri yüksek AML hasta grubunda ifade düzeyi azalan yollar, Kırmızı: Yollarla ilişkili bulunan genler)

Beta katenin seviyeleri Değişmeyen AML hasta Grubu:

Bu grubun kendi içerisinde heterojen olduğu, diğer grupların her birinin içerisine dahil edilerek analiz edildiğinde hem bu grupların profilini bozduğu hem de anlamlı bir patern vermediği gözlenmiştir.

SONUÇ

Bu çalışma Wnt sinyal yolağının anahtar elemanı olan beta katenin seviyelerine göre AML'de gerçekleştirilen global düzeyde ilk transkriptom çalışmasıdır. Şimdiye kadar AML'de yapılmış olan diğer transkriptom çalışmalarında, yeni prognostik belirteçlerin tanımlanması, hastalığın farklı alt gruplarının belirlenmesi üzerine odaklanılmıştır (Park vd 2007). Buna ilaveten AML hasta grupları ve hasta-sağlıklı örnekleri arasında farklı ifadelenen genler ve bu genlerle ilişkili yolaklar tespit edilmiştir (Gal vd 2006, Stirewalt 2008, Majeti vd 2009).

Kanser üzerinde yürütülmüş sayısız transkriptom çalışması, bu hastalığın moleküler sınıflandırmasını, yeni tedavi, prognoz, teşhis belirteçlerinin tespit ve tayinini hedeflerken bir yandan da kanserin moleküler biyolojisinin detaylı dökümünü yapmaktadır.

Bu çalışmada bugüne dek AML literatüründe birçok kez saptanmış olan beta katenin gen ifade farklılığının moleküler sonuçları irdelenmiştir. Analizlerin sonucunda kemokinler, adezyon molekülleri, gap junction, hücre iskeletinin düzenlenmesi, kök hücre belirteci, gen ifade regülasyonu, apoptoz, JAK-STAT, P53 ve TGFB yolakları düşük beta katenin seviyeli AML hasta örneklerinde; hücre döngüsü, kemokinler, adezyon molekülleri, hücre iskeletinin düzenlenmesi, gen ifade regülasyonu, kök hücre belirteci, migrasyon, metastaz, P53, Erb B, TGFB ve Slit-Robo yolakları yüksek beta katenin seviyeli AML hasta örneklerinde ön plana çıkmıştır.

Sonuçların layıkıyla yorumlanmasında FAB sınıflaması, karyotip, tanı tarihi, ölüm tarihi ve sağkalım gibi hastalara ait bilgilere eksiksiz ulaşılamamış olması etkin olmuştur.

Yapılması Planlanan Çalışmalar

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenen proje kapsamında halen sürmektedir.

Cluster'ı sağlayan 3 grup arasındaki gen sayısını, minimal gen sayısına çekebilmek için daha ileri istatistiksel analizler (ICA (Independent Component Analysis), PCA (Principle Component Analysis), Diskriminant Analizi) yapılacaktır. Böylelikle bu analizler sonucunda AML'ye spesifik, beta katenin ilişkili genler net olarak belirlenebilecektir.

Belirlenen bu genler q-RT PCR ile teyit edilecektir.

Bu genler içerisinde ifade düzeyleri azalan genlerin metilasyon profilleri çıkarılacaktır.

Bu genlerin Western Blot ile protein seviyeleri de araştırılacaktır.

KAYNAKLAR

Abraham, S.C., Klimstra, D.S., Wilentz, R.E., Yeo C.J., Conlon K., Brennan M., Cameron J.L., Wu T.T., Hruban R.H. 2002. Solid-pseudopapillary tumors of the pancreas are genetically distinct from pancreatic ductal adenocarcinomas and almost always harbor beta-catenin mutations. *Am J Pathol*, 160 (4); 1361–1369.

Agrawal, S., Hofmann, W.K., Tidow, N., Ehrich, M., Van den Boom, D., Koschmieder, S., Berdel, W.E., Serve, H., Müller-Tidow, C. 2007. The C/EBPdelta tumor suppressor is silenced by hypermethylation in acute myeloid leukemia. *Blood* 109(9);3895-905.

Akiyama, T. 2000. Wnt/beta-catenin signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11(4):273-82.

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 U S A*, 100 (7); 3547-9.

Alvarez, S., MacGrogan, D., Calasanz, M.J., Nimer, S.D., Jhanwar, S.C. 2001. Frequent gain of chromosome 19 in megakaryoblastic leukemias detected by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*. 32(3);285-93.

Alvarez, S., Cigudosa, J.C. 2005. Gains, losses and complex karyotypes in myeloid disorders: a light at the end of the tunnel. *Hematol Oncol*. 23(1);18-25.

Andl, T., Reddy, S. T., Gaddapara, T. And Millar, S. E. 2002. WNT signals are required for the initiation of hair follicle development. *Dev. Cell* 2 (5); 643-653.

Aoki, K., Taketo, M.M., 2007. Adenomatous Polyposis Coli (APC): a multi- functional tumor suppressor gene, *J Cell Sci* 120(19), 3327-3335.

Atabekoglu CS., Engin Y., Üstün Y., Aytac, R. 2002. Üreme fizyolojisi ve adhezyon molekülleri. *A.U. Tıp Fakültesi Mecmuası*, 55, 85–92.

Bapat, S.A., Mali, A.M., Koppikar, C.B., Kurrey, N.K. 2005. Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res*, 65(8); 3025-9.

Barresi, V., Palumbo, G.A., Musso, N., Consoli, C., Capizzi, C., Meli, C.R., Romano, A., Di Raimondo, F., Condorelli, D.F. 2010. Clonal selection of 11q CN-LOH and CBL gene mutation in a serially studied patient during MDS progression to AML. *Leuk Res*. 34(11):1539-42.

Behrens, J. 1994. Cadherins as determinants of tissue morphology and supressors of invasion, *Acta Anat (Basel)* 149:165-9.

Behrens, J., von Kries, J.P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., Birchmeier, W., 1996. Functional interaction of beta catenin with the transcription factor LEF-1, *Nature*, 382, 638-642.

Beksac, M. *Klinik Hematoloji* 1997.

Bhanot, P., Brink, M., Samos, C.H., Hsieh, J.C., Wang, Y., Macke, J.P., Andrew, D., Nathans, J., Nusse, R. 1996. A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* 382(6588):225-30.

Bienz, M., Clevers, H., 2000. Linking colorectal cancer to Wnt signaling, *Cell*, 103(2), 311-20.

Bonnet, D., Dick, J.E. 1997. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3(7);730-7.

Bortoloso, E., Pilati, N., Megighian, A., Tibaldo, E., Sandonà, D., Volpe, P. 2006. Transition of Homer isoforms during skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Cell Physiol*. 290(3);711-718.

Boulanger, C. A., Wagner, K. U. And Smith, G. H. 2005. Parity-induced mouse mammary epithelial cells are pluripotent, self-renewing and sensitive to TGF-beta1 expression. *Oncogene* 24; 552-560.

Bovolenta, P., Esteve, P., Ruiz J.M., Cisneros, E., Lopez-Rios, J.J., 2008. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease, *Cell Sci*,121(Pt 6), 737-746.

Brembeck, F.H., Rosario, M., Birchmeier. 2006. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of β -catenin. *Curr Opin Genet Dev* 16;51-59.

Brennan, K. R. and Brown, A. M. 2004. Wnt proteins in mammary development and cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 9;119-131.

Brocardo, M., Henderson, B.R., 2008. APC shuttling to the membrane, nucleus and beyond, *Trends Cell Biol*, 18(12), 587-596.

Bryja, V., Andersson, Er., Schambony, A., Esner, M., Bryjova, L., Biris, Kk. 2009. The extracellular domain of Lrp5/6 inhibits noncanonical Wnt signaling in vivo. *Mol Biol Cell*. 20; 924–36.

Bullinger, L., Krönke, J., Schön, C., Radtke, I., Urbauer, K., Botzenhardt, U., Gaidzik, V., Carió, A., Senger, C., Schlenk, R.F., Downing, J.R., Holzmann, K., Döhner, K., Döhner, H. 2010. Identification of acquired copy number alterations and uniparental disomies in cytogenetically normal acute myeloid leukemia using high-resolution single-nucleotide polymorphism analysis. *Leukemia*. 24(2);438-49.

Cadigan, K.M., Liu, Y.I. 2006. Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci*. 119(Pt 3):395-402.

Caldwell, Gm., Jones, C., Gensberg, K. 2004. The Wnt antagonist sFRP1 in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 64; 883–888.

Carayol, N., Wang, C.Y. 2006. IKK α stabilizes cytosolic β -catenin by inhibiting both canonical and non-canonical degradation pathways. *Cellular Signalling*, 18 (11);1941–1946.

Casas, S., Aventín, A., Fuentes, F., Vallespí, T., Granada, I., Carrió, A., Angel Martínez-Climent, J., Solé, F., Teixidó, M., Bernués, M., Duarte, J., Maria Hernández, J., Brunet, S., Dolors Coll, M., Sierra, J. 2004. Genetic diagnosis by comparative genomic hybridization in adult de novo acute myelocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 153(1);16-25.

Certo, M., Del Gaizo Moore, V., Nishino, M., Wei, G., Korsmeyer, S., Armstrong, S.A., Letai, A. 2006. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. *Cancer Cell.* 9(5);351-65.

Chen X., Yang J., Evans P.M., Liu C. 2008. Wnt signaling: the good and the bad. *Acta Biochim Biophys Sin*, 40(7); 577-94.

Chen, P.M., Yen, C.C., Wang, W.S., Lin, Y.J., Chu, C.J., Chiou, T.J., Liu, J.H., Yang, M.H. 2008. Down-regulation of Notch-1 expression decreases PU.1-mediated myeloid differentiation signaling in acute myeloid leukemia. *Int J Oncol.* 32(6);1335-41.

Chen, C.C., Gau, J.P., You, J.Y., Lee, K.D., Yu, Y.B., Lu, C.H., Lin, J.T., Lan, C., Lo, W.H., Liu, J.M., Yang, C.F. 2009. Prognostic significance of beta-catenin and topoisomerase IIalpha in de novo acute myeloid leukemia. *Am J Hematol.* 84(2);87-92.

Cheshire, Dr., Ewing, Cm., Sauvageot, J., Bova, Gs., Isaacs, Wb. 2000. Detection and analysis of beta-catenin mutations in prostate cancer. *Prostate* 45; 323–334.

Chadwick, N., Fennessy, C., Nostro, M.C., Baron, M., Brady, G., Buckle, A.M. 2008. Notch induces cell cycle arrest and apoptosis in human erythroleukaemic TF-1 cells. *Blood Cells Mol Dis.* 41(3);270-7.

Faculty of Life Sciences, Manchester Interdisciplinary Biocenter, University of Manchester, Manchester M1 7DN, UK.

Ching W, Nusse R. A dedicated Wnt secretion factor. 2006. *Cell*, 125(3); 432-3.

Clarke, M.F., Fuller, M. 2006. Stem cells and cancer: Two faces of eve. *Cell* 124:1111-1115.

Clements, Wm., Wang, J., Sarnaik, A. 2002. Beta-catenin mutation is a frequent cause of Wnt pathway activation in gastric cancer. *Cancer Res.* 62; 3503–3506.

Coudreuse D, Korswagen HC. 2007. The making of Wnt: new in sights in to Wnt maturation, sorting and secretion. *Development*, 134(1); 3-12.

Crans, H.N., Sakamoto, K.M. 2001. Transcription factors and translocations in lymphoid and myeloid leukemia. *Leukemia.* 15;313-331.

- Crockard, A.D., Boylan, M.T. 1998. Corticosteroids effects on neutrophil adhesion molecules. *Int. J. Clin. Lab. Res.*, 28, 110–115.
- Curtis, R.K., Ores̃ic, M., Vidal-Puig, A. 2005. Pathways to the analysis of microarray data. *TRENDS in Biotechnology* 23(8):429-35.
- Dahmen, Rp., Koch, A., Denkhaus, D. 2001. Deletions of AXIN1, a component of the WNT/wingless pathway, in sporadic medulloblastomas. *Cancer Res* 61;7039–7043.
- Dale, R.M., Sisson, B.E., Topczewski, J, 2009. The emerging role of Wnt/PCP signaling in organ formation, *Zebrafish*, 6(1), 9-14.
- Dallosso, A.R., Hancock, A.L., Szemes, M., Moorwood, K., Chilukamarri, L., Tsai, H.H., Sarkar, A., Barasch, J., Vuononvirta, R., Jones, C., Pritchard-Jones, K., Royer-Pokora, B., Lee, S.B., Owen, C., Malik, S., Feng, Y., Frank, M., Ward, A., Brown, K.W., Malik, K. 2009. Frequent long-range epigenetic silencing of protocadherin gene clusters on chromosome 5q31 in Wilms' tumor. *PLoS Genet.* 5(11);e1000745.
- Damm, F., Heuser, M., Morgan, M., Yun, H., Grosshennig, A., Göhring, G., Schlegelberger, B., Döhner, K., Ottmann, O., Lübbert, M., Heit, W., Kanz, L., Schlimok, G., Raghavachar, A., Fiedler, W., Kirchner, H., Döhner, H., Heil, G., Ganser, A., Krauter, J. 2010. Single nucleotide polymorphism in the mutational hotspot of WT1 predicts a favorable outcome in patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 28(4);578-85.
- Danuta, W., Annouck, L., Kathleen, L., Pascale, Z. 2009. Frizzled-PDZ scaffold interactions in the control of Wnt signaling. *Adv Enz Regul* 49(1):98.
- Daugherty, R.L., Gottardi, C.J. 2007. Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions. *Physiology (Bethesda)* 22: 303-9.
- Debernardi, S., Skoulakis, S., Molloy, G., Chaplin, T., Dixon-McIver, A., Young, B.D. 2007. MicroRNA miR-181a correlates with morphological sub-class of acute myeloid leukaemia and the expression of its target genes in global genome-wide analysis. *Leukemia.* 21(5);912-6.
- Demir, R. 2006. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi.* 157-163.
- Doble, B.W., Woodgett, J.R., 2003. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase, *J Cell Sci*, 116(7), 1175-1186.
- Dontu, G., Abdallah, W. M., Foley, J. M., Jackson, K. W., Clarke, M. F., Kawamura, M. J. And Wicha, M. S. 2003. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev.* 17;1253-1270.
- Duncan, A.W., Rattis, F.M., DiMascio, L.N., Congdon, K.L., Pazianos, G., Zhao, C. 2005. Integration of Notch and Wnt signaling in hemato- poietic stem cell maintenance. *Nat Immunol* 6;314–322.

- Dzietczenia, J., Wróbel, T., Jaźwiec, B., Mazur, G., Butrym, A., Poręba, R., Kuliczkowski, K. 2010. Expression of bone morphogenetic proteins (BMPs) receptors in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Int J Lab Hematol.* 32(6);217-221.
- Elihu, E., Hartmut, D. 2006. Acute myeloid leukaemia. *Lancet* 368: 1894–907.
- Elston M.S., Clifton-Bligh R.J., 2010. Identification of Wnt family inhibitors: A pituitary tumor directed whole genome approach, *Mol Cell Endocrinol* (basım aşamasında).
- Ergüler G., Demir N., Demir R. 2002. Adezyon moleküllerinin yapısal özellikleri ve fonksiyonları., *T. Klin. J. Med. Sci.*, 22, 313–327.
- Erhan, S. 2009. Hücre Adezyon Molekülleri. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, 4 (1): 57-68.
- 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.
- Espada, J., Moises, B.C., Prado, S.D., Medina, V. 2009. Wnt Signaling and Cancer Stem Cells. *Clin Transl Oncol.* 11;411-427.
- Estey, E., Dohner, H. 2006. Acute miyeloid leukaemia. *Lancet.* 368; 1894–907.
- Fanto, M., McNeill, H.J., 2004. Planar polarity from flies to vertebrates, *Cell Sci*, 117(Pt 4), 527-533.
- Fearon, Er., Vogelstein, B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 61; 759–767.
- Ferhanoglu, B. 2002. PDQ Hematoloji.
- Franks, L.M., Teich, N.M. 2001. *İntroduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer.* NewYork:Oxford University Pres, İnc., Chapter 12.
- Fraser, E., Young, N., Dajan,i R., Franca-Koh, J., Ryves, J., Williams, R.S. 2002. Identification of the Axin and Frat binding region of glycogen synthase kinase-3. *J Biol Chem* 277(3):2176-85.
- Fuchs, S.Y., Ougolkov, A.V., Spiegelman, V.S., Minamoto, T. 2005. Oncogenic beta-catenin signaling networks in colorectal cancer. *Cell Cycle* 4(11):1522-39.
- Fumoto, K., Kadono, M., Izumi, N., Kikuchi, A., 2009. Axin localizes to the centrosome and is involved in microtubule nucleation, *EMBO Rep*, 10(6), 606-613.
- Gal, H., Amariglio, N., Trakhtenbrot, L., Jacob-Hirsh, J., Margalit, O., Avigdor, A., Nagler, A., Tavor, S., Ein-Dor, L., Lapidot, T., Domany, E., Rechavi, G., Givol, D. 2006. Gene expression profiles of AML derived stem cells; similarity to hematopoietic stem cells. *Leukemia.*20;(12) 2147-54.

- Gamallo, C., Palacios, J., Moreno, G., De Mora, Jc., Suarez, A., Armas, A. 1999. Beta-catenin expression pattern in stage I and II ovarian carcinomas — relationship with beta-catenin gene mutations, clinicopathological features, and clinical outcome. *Am J Pathol.* 155; 527–536.
- Gandillet, A., Park, S., Lassailly, F., Griessinger, E., Vargaftig, J., Filby, A., Lister, T.A., Bonnet, D. 2011. Heterogeneous sensitivity of human acute myeloid leukemia to b-catenin down-modulation. *Leukemia* (2011), 1–11
- Garcia-Rostan, G., Camp, Rl., Herrero, A., Carcangiu, Ml., Rimm, Dl., Tallini, G. 2001. Beta-catenin dysregulation in thyroid neoplasms - down-regulation, aberrant nuclear expression, and CTNNB1 exon 3 mutations are markers for aggressive tumor phenotypes and poor prognosis. *Am J Pathol.* 158; 987–996.
- Garcia-Rostan, G., Talini, G., Herrero, A., D'aquila, Tg., Carcangiu, Ml., Rimm, Dl. 1999. Frequent mutation and nuclear localization of beta-catenin in anaplastic thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 59; 1811–1815.
- Gentles, A.J., Plevritis, S.K., Majeti, R., Alizadeh. A.A. 2010. Association of a Leukemic Stem Cell Gene Expression Signature With Clinical Outcomes in Acute Myeloid Leukemia. *JAMA* 304(24);2706-2715.
- Giles, R.H., van Es, J.H., Clevers H., 2003. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1653, 1 – 24.
- Gómez, J.R., Cordeu, L., Agirre, X., Jiménez-Velasco, A., José-Eneriz, E.S., Garate, L., Calasanz, M.J., Heiniger, A., Torres, A., Prosper, F. 2006. Epigenetic Regulation Of Wnt Signaling Pathway In Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood First Edition Paper*, republished online December 5.
- Goss, K.H., Groden, J.J., 2000. Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor, *Clin Oncol*, 18(9), 1967-1979.
- Graf, U., Casanova, E.A., Cinelli, P. 2011. The Role of the Leukemia Inhibitory Factor (LIF) — Pathway in Derivation and Maintenance of Murine Pluripotent Stem Cells. *Genes* 2;280-297.
- Griffiths, E.A., Gore, S.D., Hooker, C., McDevitt, M.A., Karp, J.E., Smith, B.D., Mohammad, H.P., Ye, Y., Herman, J.G., Carraway, H.E. 2010. Acute myeloid leukemia is characterized by Wnt pathway inhibitor promoter hypermethylation. *Leuk Lymphoma.* 51(9);1711-9.
- Guc, D. 2004. Adezyon Moleküller. *Ankem Derg* ; 18 (Ek 2);158-163.
- Guo, S., Bao, S. 2010. srGAP2 arginine methylation regulates cell migration and cell spreading through promoting dimerization. *J Biol Chem.* 2010 285(45);35133-41.
- Hamada, F., Bienz, M., 2004. The APC tumor suppressor binds to C-terminal binding protein to divert nuclear beta-catenin from TCF, *Dev Cell*, 7(5);677-685.

- Hatsell, S., Rowlands, T., Hiremath, M. And Cowin, P. 2003. Beta-catenin and Tcfs in mammary development and cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. 8; 145-158.
- Hausmann G., Bänziger C., Basler K. 2007. Helping Wingless take flight: how WNT proteins are secreted. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(4);331-6.
- He X., Axelrod D.J.A. 2006. WNTer wonderland in Snow bird. *Development*, 133(14);2597- 603.
- He, X., Semenov, M., Tamai, K., Zeng, X., 2004, LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/b-catenin signaling: Arrows point the way, *Development*, 131(8);1663-1677.
- Head Dr. Classification and differentiation of the acute leukemias. In: Wintrobe's Clinical Hematology, Eds: Greer JP, Foerster J, Lukenks JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2004, pp:2063-76.
- Henderson, B.R., Fagotto, F., 2002. The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport, *EMBO Rep*, 3(9); 834-9.
- Hermans, H.A., Touw, I.P. 2001. Significance of neutrophil elastase mutations versus G-CSF receptor mutations for leukemic progression of congenital neutropenia. *Blood*, 97(7);2185-2186
- Hoang, Bh., Kubo, T., Healey, Jh. 2004. Expression of LDL receptor-related protein 5 (LRP5) as a novel marker for disease progression in high-grade osteosarcoma. *Int J Cancer*. 109; 106–111.
- Holcombe, Rf., Marsh, JI., Waterman, Ml., Lin, F., Milovanovic, T., Truong, T. 2002. Expression of Wnt ligands and Frizzled receptors in colonic mucosa and in colon carcinoma. *J Clin Pathol-Mol Pathol*. 55; 220–226.
- 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.
- Huang, H. C., Klein, P.S. 2004. The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biol*. 5, 234.
- Huang, Ht., Mahler-Araujo, Bm., Sankila, A. 2000. APC mutations in sporadic medulloblastomas. *Am J Pathol*. 156;433–437.
- Huelsken, J., Beh, Rens, J. 2002. The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci*. 115(21);3977-8.
- Huh, J., Tiu, R.V., Gondek, L.P., O'Keefe, C.L., Jasek, M., Makishima, H., Jankowska, A.M., Jiang, Y., Verma, A., Theil, K.S., McDevitt, M.A., Maciejewski, J.P. 201. Characterization of chromosome arm 20q abnormalities in myeloid malignancies using genome-wide single nucleotide polymorphism array analysis. *Genes Chromosomes Cancer*. 49(4);390-9.

- Iwai, S., Katagiri, W., Kong, C., Amekawa, S., Nakazawa M., Yura, Y. 2005. Mutations of the APC, beta-catenin, and axin 1 genes and cytoplasmic accumulation of beta-catenin in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 131;(12) 773-782.
- İlyas, M., Tomlinson, İpm., Rowan, A., Pignatelli, M., Bodmer, Wf. 1997. Beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(10) ; 330–334.
- İlyas, M., 2005. Wnt signalling and the mechanistic basis of tumour development. *J Pathol*. 205(2) ;130–144.
- İngham, P. W. and McMahon, A. P. 2001. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev*. 15; 3059-3087.
- Ishiguro, K., Xavier, R. 2004. Homer-3 regulates activation of serum response element in T cells via its EVH1 domain. *Blood*. 103(6);2248-56.
- Jonsson, M., Dejmek, J., Bendahl, Po., Andersson, T. 2002. Loss of Wnt- 5a protein is associated with early relapse in invasive ductal breast carcinomas. *Cancer Res*. 62;409–416.
- Jope, R.S., Yuskaitis, C.J., Beurel, E., 2007. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics, *Neurochem Res*, 32(4-5), 577- 595.
- Kajiguchi, T., Chung, E.J., Lee, S., Stine, A., Kiyoi, H., Naoe, T., Levis, M.J., Neckers, L., Trepel, J.B. Flt3 regulates β -catenin tyrosine phosphorylation, nuclear localization and transcriptional activity in acute myeloid leukemia cells. 2007. *Leukemia* 21; 2476-2484.
- Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S., Okuno, Y., Hattori, M. 2004. The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Res*. 32, D277–D280.
- Karanu, F.N., Murdoch, B., Gallacher, L., Wu, D.M., Koremoto, M., Sakano, S. 2000. The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 192;1365–1372.
- Karner, C.M., Chirumamilla, R., Aoki, S., Igarashi, P., Wallingford, J.B., Carroll, T.J., 2009. Wnt9b signaling regulates planar cell polarity and kidney tubule morphogenesis, *Nat Genet*, 41(7), 793-799.
- Katoh, Y., Katoh, M. 2006. Canonical WNT signaling pathway and human AREG. *International Journal of Molecular Medicine* 17;1163-1166.
- Kaushansky, K. 2006. Lineage-Specific Hematopoietic Growth Factors. *N Engl J Med* 354:2034-2045.
- Kawaguchi-Ihara, N., Murohashi, I., Nara, N., Tohda, S. 2008. Promotion of the self-renewal capacity of human acute leukemia cells by Wnt3A. *Anticancer Res*, 28(5A);2701-4.

- Kawano, Y., Kypta, R.J., 2003. Secreted antagonists of the Wnt signaling pathway, *Cell Sci*, 116(Pt 13), 2627-2634.
- Ken M.Cadigan, Liu I.Y. 2006. Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci*, 119; 395-402.
- Khan, N.I., Bendall, L.J. 2006. Role of WNT signaling in normal and malignant hematopoiesis. *Histol Histopathol* 21;761-774.
- Kikuchi, A. 1999. Roles of Axin in the Wnt Signalling Pathway. *Cell. Signal.* 11(11);777–788, 1999
- Kikuchi, A. 2003. Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway. *Cancer Sci* 94(3):225-9.
- Kikuchi, A., Kishida, S., Yamamoto, H. 2006. Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications. *Exp Mol Med* 38:1-10.
- Kikuchi, A., Kishida, S., Yamamoto, H., 2006. Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications, *Exp Mol Med.* 38(1), 1-10.
- Kim, Jm., Sohn, Hy., Oh, Jh., Kim, Jg., Kim, Ns., Kim, Ys. 2003. Characterization of human WNT7b gene and its up regulation in gastric cancer cell lines. *Exp Oncol.* 25; 211–215.
- Kimelman, D., Xu, W. 2006. Beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* 25:7482–7491.
- Kimelman, D., Xu, W. 2006. Beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene* 25(57):7482-91.
- Kirikoshi, H., Sekihara, H., Katoh, M. 2001. Up-regulation of Frizzled-7 (FZD7) in human gastric cancer. *Int J Oncol.* 19;111–115.
- Kitajewski J., Mason J., Varmus H.E. 1992. Interaction of Wnt-1 proteins with the binding prote in BiP. *Mol Cell Biol*, 12(2); 784-90.
- Klopocki, E., Kristiansen, G., Wild, Pj. 2004. Loss of SFRP1 is associated with breast cancer progression and poor prognosis in early stage tumors. *Int J Oncol.* 25; 641–649.
- Knight, J.A., Skol, A.D., Shinde, A., Hastings, D., Walgren, R.A., Shao, J., Tennant, T.R., Banerjee, M., Allan, J.M., Le Beau, M.M., Larson, R.A., Graubert, T.A., Cox, N.J., Onel, K. 2009. Genome-wide association study to identify novel loci associated with therapy-related myeloid leukemia susceptibility. *Blood.* 113(22);5575-82.
- Knippschild, U., Gocht, A., Wolff, S., Huber, N., Löhler, J., Stöter, M., 2005. The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes, *Cell Signal*, 17(6), 675-689.

- Koch, A., Waha, A., Tonn, Jc. 2001. Somatic mutations of WNT/wingless signaling pathway components in primitive neuroectodermal tumors. *Int J Cancer*. 93; 445–449.
- Kohn, A.D., Moon, R.T., 2005. Wnt and calcium signaling: beta-catenin- independent pathways., *Cell Calcium*, 38(3-4), 439-46.
- Kokolus, K., Nemeth, M J. 2010. Non-canonical Wnt signaling pathways in hematopoiesis. *Immunol Res*. 46(1-3) ; 155-64.
- Komekado H., Yamamoto H., Chiba T., Kikuchi A. 2007. Glycosylation and palmitoylation of Wnt-3a are coupled to produce an active form of Wnt-3a. *Genes Cells*, 12(4);521-34.
- Komiya, Y. and Habas, R., 2008. Wnt signal transduction pathways, *Organogenesis*, 4(2), 68-75.
- Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., Van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P.J. And Clevers, H. 1998. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat. Genet*. 19; 379-383.
- Korinek, V., Barker, N., Morin, Pj. 1997. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin–Tcf complex in APC(–/–) colon carcinoma. *Science*. 275;1784–1787.
- Kritikou E. 2008. Membrane trafficking: endurance of the weakest signal. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(10); 742-3.
- Krause, C., Guzman, A., Knaus, P. 2011. Noggin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 43(4);478–481.
- Kühl, M., Sheldahl, L.C., Park, M., Miller, J.R., Moon, R.T., 2000. The Wnt/Ca²⁺ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape, *Trends Genet*, 16(7), 279-283.
- Lee, Ay., He B., You, L. 2004. Expression of the secreted frizzled-related protein gene family is downregulated in human mesothelioma. *Oncogene*. 23;6672–6676.
- Lee, Y.N., Gao, Y., Wang, H.Y., 2008. Differential mediation of the Wnt canonical pathway by mammalian Dishevelleds-1, -2, and -3, *Cell Signal*, 20(2), 443- 452.
- Leung, C., Lingbeek, M., Shakhova, O., Liu, J., Tanger, E., Saremaslani, P., Van Lohuizen, M. And Marino, S. 2004. Bmi1 is essential for cerebellar development and is overexpressed in human medulloblastomas. *Nature*. 428; 337-341.
- Lewis, M. T., Ross, S., Strickland, P. A., Sugnet, C. W., Jimenez, E., Scott, M. P. and Daniel, C. W. 1999. Defects in mouse mammary gland development caused by conditional haploinsufficiency of Patched-1. *Development*. 126;5181-5193.
- Li, Z., Lu, J., Sun, M., Mi, S., Zhang, H., Luo, R.T., Chen, P., Wang, Y., Yan, M., Qian, Z., Neilly, M.B., Jin, J., Zhang, Y., Bohlander, S.K., Zhang, D.E., Larson, R.A., Le Beau, M.M., Thirman, M.J., Golub, T.R., Rowley, J.D., Chen, J. 2008. Distinct microRNA

expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(40);15535-40.

Liu, C., Liu, Y., Semenov, M., Han, C., Baeg, G.H., Tan, Y., Zhang, Z., Lin, X., He, X. 2002. Control of β -catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108:837-847.

Lo, Muzio, L., Pannone, G., Staibano, S. 2002. WNT-1 expression in basal cell carcinoma of head and neck. An immunohistochemical and confocal study with regard to the intracellular distribution of beta-catenin. *Anticancer Res.* 22; 565–576.

Logan, C.Y., Nusse R. 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease, *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20, 781-810.

Lu, Ds., Zhao, Yd., Tawatao, R. 2004. Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101; 3118–3123.

Lustig, B. and Behrens, J.J., 2003. The Wnt signaling pathway and its role in tumor development, *Cancer Res Clin Oncol*, 129(4), 199-221.

MacDonald, B.T., Tamai, K., He, X. 2009. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell.* 17(1):9-26.

Machold, R., Hayashi, S., Rutlin, M., Muzumdar, M. D., Nery, S., Corbin, J. G., Gritli-Linde, A., Dellovade, T., Porter, J. A., Rubin, L. L. 2003. Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron.* 39; 937-950.

Majetia, R., Beckerb, M.W., Tianc, Q., Leec, T:M., Yanc, X., Liuf, R., Chiangce, J., Hoodc, L., Clarkea, M.F., Weissmana, I.L. 2009. Dysregulated gene expression networks in human acute myelogenous leukemia stem cells. *PNAS* 106;(9) 3396-3401.

Manion, M.K., Hockenbery, D.M. 2003. Targeting BCL-2-related proteins in cancer therapy. *Cancer Biol Ther.* 2(4);105-14.

Marcucci, G., Radmacher, M.D., Mrózek, K., Bloomfield, C.D. 2009. MicroRNA expression in acute myeloid leukemia. *Curr Hematol Malig Rep.* 4(2);83-8.

Marcucci, G., Haferlach, T., Döhner, H. 2011. Molecular genetics of adult acute myeloid leukemia: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol.* 29(5);475-86.

Martin, V., Valencia, A., Agirre, X., Cervera, J., Jose-Eneriz, E:S., Vilas-Zornoza, A., Rodriguez-Otero, P., Sanz, M:A., Herrera, C., Torres, A., Prosper, F., Roman-Gomez, J.. 2010. Epigenetic regulation of the non-canonical Wnt pathway in acute myeloid leukemia. *Cancer Sci* 101;(2) 425–432.

Mazieres, J., He, B., You, L. 2004. Wnt inhibitory factor-1 is silenced by promoter hypermethylation in human lung cancer. *Cancer Res.* 64; 4717–4720.

- Megy, S., Bertho, G., Gharbi-Benarous, J., Baleux, F., Benarous, R., Girault, J.P. 2005. Solution structure of a peptide derived from the oncogenic protein β -catenin in its phosphorylated and nonphosphorylated states. *Peptides* 26;227-241.
- Meulmeester, E., Ten Dijke, P. 2011. The dynamic roles of TGF- β in cancer. *J Pathol.* 223(2);205-218.
- Mikels, A.J, Nusse, R. 2006. Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene* 25(57):7461-8.
- Mikels, Aj., Nusse, R. 2006. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol.* 4;115.
- Mikesch, J.H., Steffen, B., Berdel, W.E., Serve, H., Müller-Tidow, C. 2007. The emerging role of Wnt signaling in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 21(8):1638-47.
- Miller, J.R. 2002. The Wnts. *Genome Biol*, 3(1); reviews 3001.
- Miller, J.R. 2003. Wnt signal transduction. *The Cancer Handbook* chapter. 14;195-208.
- Miller, J.R. The Wnts. *Genome Biol* 2002; 3(1):REVIEWS3001.
- Miller, J.R., 2001, The Wnts, *Genome Biol*, 3(1), 1-15.
- Molofsky, A. V., Pardal, R., Morrison, S. J. 2004. Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16; 700-707.
- Monte, M., Benetti, R., Collavin, L., Marchionni, L., Del Sal, G., Schneider, C. 2004. hGTSE-1 expression stimulates cytoplasmic localization of p53. *J Biol Chem.* 279(12);11744-11752.
- Moreb, J.S. 2008. Aldehyde Dehydrogenase as a Marker for Stem Cells. *Current Stem Cell Research & Therapy* 3(4); 237-246.
- Morin, P.J. 1999. Beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays.* 21(12):1021-30.
- Mulholland, D.J., Dedhar, S., Coetzee, G.A., Nelson, C.C. 2005. Interaction of nuclear receptors with the Wnt/beta-catenin/Tcf signaling axis: Wnt you like to know? *Endocr Rev.* 26(7):898-915.
- Müller-Tidow, C., Steffen, B., Cauvet, T., Tickenbrock, L., Ji, P., Diederichs, S., Sargin, B., Köhler, G., Stelljes, M., Puccetti, E., Ruthardt, M., deVos, S., Hiebert, S.W., Koeffler, H.P., Berdel, W.E., Serve, H. 2004. Translocation products in acute myeloid leukemia activate the Wnt signaling pathway in hematopoietic cells. *Mol Cell Biol.* 24(7);2890-904.
- Nagafuchi A., Shirayoshi Y., Okazaki K. 1987. Transformation of cell adhesion properties by exogeneously introduced E-cadherin cDNA. *Nature*, 329, 341–343.

- Nagahata, T., Shimada, T., Harada, A. 2003. Amplification, upregulation and over-expression of DVL-1, the human counterpart of the *Drosophila* disheveled gene, in primary breast cancers. *Cancer Sci.* 94;515–518.
- Näthke, I., 2005. Relationship between the role of the adenomatous polyposis coli protein in colon cancer and its contribution to cytoskeletal regulation, *Biochem Soc Trans*, 33(Pt 4), 694-697.
- Nelson, W.J., Nusse, R. 2004. Convergence of Wnt, β -Catenin, and Cadherin Pathways. *Science.* 303;1483-1487.
- Neth, P., Ciccarella, M., Egea, V., Hoelters, J., Jochum, M., Ries C. 2006. Wnt Signaling Regulates the Invasion Capacity of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 24(8);1892-903.
- Nollet, F., Berx, G., Molemans, F., Van Roy, F. 1996. Genomic organization of the human beta-catenin gene (CTNNB1). *Genomics* 32(3):413-24.
- Novak, A., Dedhar, S. 1999. Signaling through beta-catenin and Lef/Tcf. *Cell Mol Life Sci.* 56 (5-6) ; 523-37.
- Nusse, R. 1999. WNT targets. Repression and activation. *Trends Genet.* 15(1):1-3.
- Nusse, R. 2005. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res* 15(1) ;28-32.
- Nusse, R., Varmus, H.E. 1982. Many tumors induced by the mouse mammary-tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell.* 31; 99–109.
- Nusse, R., Varmus, H.E. 1992. Wnt genes. *Cell.* 69(7) ;1073-87.
- Nygren, M.K., Dosen, G., Hystad, M.E., Stubberud, H., Funderud, S., Rian, E. 2006. Wnt3A activates canonical Wnt signalling in acute lymphoblastic leukaemia (ALL) cells and inhibits the proliferation of B-ALL cell lines. *British Journal of Haematology.* 136;400–413.
- Okino, K., Nagai, H., Hatta, M. 2003. Up-regulation and overproduction of DVL-1, the human counterpart of the *Drosophila* dishevelled gene, in cervical squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.*10;1219–1223.
- Orsulic, S., Huber, O., Aberle, H., Arnold, S., Kemler, R. 1999. E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/ LEF-1-mediated transactivation. *J Cell Sci* 112 (Pt 8):1237-45.
- Özkalemkaş, F. 2005. Akut lösemiler, *İç Hastalıkları Kitabı*, Ed. Dolar E, Nobel Tıp Kitabevi: İstanbul. 576-80.
- Park, Ws, Oh, Rr, Park, Jy. 1999. Frequent somatic mutations of the beta-catenin gene in intestinal-type gastric cancer. *Cancer Res.* 59;4257–4260.

- Park, M.H., Cho, S.A., Yoo, K.Y., Yang, M.H., Ahn, J.Y., Lee, H.S., Lee, K., Mun, Y., Cho, D.H., Seong, C.M., Pak, J.H. 2007. Gene expression profile related to prognosis of acute myeloid leukemia. *Oncology reports* 18;1395-1402.
- Paulsson, K., Heidenblad, M., Strömbeck, B., Staaf, J., Jönsson, G., Borg, A., Fioretos, T., Johansson, B. 2006. High-resolution genome-wide array-based comparative genome hybridization reveals cryptic chromosome changes in AML and MDS cases with trisomy 8 as the sole cytogenetic aberration. *Leukemia*. 20(5);840-6.
- Pearce, D.J., Taussig, D., Simpson, C., Allen, K., Rohatiner, A.Z., Lister, T.A., Bonnet, D. 2005. Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples. *Stem Cells*. 23(6);752-60.
- Pedranzini, L., Mottadelli, F., Ronzoni, S., Rossella, F., Ferracin, M., Magnani, I., Roversi, G., Colapietro, P., Negrini, M., Pelicci, P.G., Larizza, L. 2010. Differential cytogenomics and miRNA signature of the Acute Myeloid Leukaemia Kasumi-1 cell line CD34+38-compartment. *Leuk Res*. 34(10);1287-95.
- Perez-Moreno, M., Jamora, C., Fuchs E. 2003. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell*. 112; 535-548.
- Pinson, K.I., Brennan, J., Monkley, S., Avery, B.J., Skarnes, W.C., 2000. An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice, *Nature*, 407(6803), 535-8.
- Pinzone, J.J., Hall, B.M., Thudi, N.K., Vonau, M., Qiang, Y.W., Rosol, T.J., Shaughnessy, J.D.Jr., 2009. The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease, *Blood*, 113(3), 517-525.
- Pizzimenti, S., Barrera, G., Calzavara, E., Mirandola, L., Toaldo, C., Dianzani, M.U., Comi, P., Chiaramonte, R. 2008. Down-Regulation of Notch1 Expression is Involved in HL-60 Cell Growth Inhibition Induced by 4-Hydroxynonenal, a Product of Lipid Peroxidation. *Medicinal Chemistry* 4(6); 551-557.
- Polakis P. 2007. The many ways of Wnt in cancer. *Curr opin Genet De*. 17;45-51.
- Polakis, P., 2000. Wnt signaling and cancer, *Genes Dev*, 14(15), 1837-1851.
- Poplack, D.G., Morgolin. 1997 . Management of common cancers of childhood. *Principles and Practice of Pediatric Oncology* I. Philedelphia: Saunders. 409-504.
- Povelones, M., Nusse, R. 2002. Wnt signaling sees spots. *Nat Cell Biol* 4: E249-E250.
- Prunier, C., Hocevar, B.A., Howe, P.H.2004. Wnt signaling: Physiology and Pathology. *Growth Factor*. 22 (3) ;141-150.
- Rao Q, Xu ZF, Wang JY, Meng JH, Tang KJ, Tian Z, Xing HY, Wang M, Wang JX. 2008. Leukemia cell surface expression of E-cadherin and its correlation with membrane localization of beta-catenin. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 29(9);592-4.

Rao, Q., Wang, J., Meng, J., Tang, K., Wang, Y., Wang, M., Xing, H., Tian, Z., Wang, J. 2010. Low-expression of E-cadherin in leukemia cells causes loss of homophilic adhesion and promotes cell growth. *Cell Biol Int*. Epub ahead of print.

Reifenberger, J., Knobbe, Cb., Wolter M. 2002. Molecular genetic analysis of malignant melanomas for aberrations of the Wnt signaling pathway genes CTNNB1, APC, ICAT and BTRC. *Int J Cancer*. 100;549–556.

Reya, T., Duncan, A. W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D. C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R. And Weissman, I. L. 2003. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*. 423;409-414.

Rhee, Cs., Sen, M., Lu, Ds. 2002. Wnt and frizzled receptors as potential targets for immunotherapy in head and neck squamous cell carcinomas. *Oncogene*. 21; 6598–6605.

Rhee, J., Buchan, T., Zukerberg, L., Lilien, J., Balsamo, J. 2007. Cables links Robo-bound Abl kinase to N-cadherin-bound beta-catenin to mediate Slit-induced modulation of adhesion and transcription. *Nat Cell Biol*. 2007 9(8);883-92.

Ricken, A., Lochhead, P., Kontogiannea, M., Farookhi, R. 2002. Wnt signaling in the ovary: identification and compartmentalized expression of wnt-2, wnt-2b, and frizzled-4 mRNAs. *Endocrinology*. 143;2741–2749.

Rizo, A., Vellenga, E., Haan, G., Schuringa, J.J. 2006. Signaling pathways in self-renewing hematopoietic and leukemic stem cells: do all stem cells need a niche? *Human Molecular Genetics* 15(2);210-219.

Rowan, Aj., Lamlum, H., İlyas, M. 2000. APC mutations in sporadic colorectal tumors: a mutational ‘hotspot’ and interdependence of the ‘two hits’. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97;3352–3357.

Rubin, J.S., Barshishat-Kupper, M., Feroze-Merzoug, F., Xi, Z.F. 2006. Secreted WNT antagonists as tumor suppressors: pro and con. *Front Biosci*. 11:2093-105.

Rubinfeld, B., Robbins, P., El, Gamil, M., Albert, I., Porfiri, E., Polakis, P. 1997. Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science*. 275;1790–1792.

Rücker, F.G., Bullinger, L., Schwaenen, C., Lipka, D.B., Wessendorf, S., Fröhling, S., Bentz, M., Miller, S., Scholl, C., Schlenk, R.F., Radlwimmer, B., Kestler, H.A., Pollack, J.R., Lichter, P., Döhner, K., Döhner, H. 2006. Disclosure of candidate genes in acute myeloid leukemia with complex karyotypes using microarray-based molecular characterization. *J Clin Oncol*. 24(24);3887-94.

Saitoh, T., Mine, T., Katoh, M. 2002. Molecular cloning and expression of proto-oncogene FRAT1 in human cancer. *Int J Oncol*. 20;785–789.

Salahshor, S., Woodgett, J.R., 2005. The links Between Axin and carcinogenesis, *J Clin Pathol*, 58(3), 225-236.

- Satoh, S., Daigo, Y., Furukawa, Y. 2000. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus-mediated transfer of AXIN1. *Nature Genet.* 24; 245–250.
- Schlosshauer, P.W., Brown, S.A., Eisinger, K., Yan, Q., Guglielminetti, E.R., Parsons, R., Ellenson, L.H., Kitajewski, J. (2000). APC truncation and increased β -catenin levels in a human breast cancer cell line. *Carcinogenesis* 21(7): 1453-1456.
- Scholl, C., Gilliland, G., Fröhling, S. 2008. Deregulation of signaling pathways in Acute Myeloid Leukemia. *Seminars in Oncology*, 35;(4) 336-345.
- Schwarz-Romond, T., Metcalfe, C., Bienz, M. 2007. Dynamic recruitment of axin by Dishevelled protein assemblies. *J Cell Sci* 120(Pt 14):2402-12.
- Seidensticker, M.J., Behrens, J. 2000. Biochemical interactions in the wnt pathway. *Biochim Biophys Acta.* 1495(2):168-82.
- Senda, T., Iizuka-Kogo, A., Onouchi, T., Shimomura, A., 2007. Adenomatous polyposis coli (APC) plays multiple roles in the intestinal and colorectal epithelia, *Med Mol Morphol*, 40(2), 68-8.
- Serinsöz, E., Neusch, M., Guntram, B., Wasielewski, R.V., Kreipe, H., Bock, O. 2004. Aberrant expression of β -Catenin discriminates acute myeloid leukaemia from acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology.* 126;313–319.
- Serrano, E., Carnicer, M.J., Orantes, V., Estivill, C., Lasa, A., Brunet, S., Aventín, A.M., Sierra, J., Nomdedéu, J.F. 2008. Uniparental disomy may be associated with microsatellite instability in acute myeloid leukemia (AML) with a normal karyotype. *Leuk Lymphoma.* 49(6);1178-83.
- Shiple, J., & Butera, J.. 2009. Acute Myelogenous Leukemia. *Experimental Hematology.* 37 (6) ; 649-658.
- Shitashige, M., Hirohashi, S., Yamada, T., 2008. Wnt signaling inside the nucleus, *Cancer Sci*, 99(4), 631-63.
- Singh, S.K., Hawkiins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusiimano, M.D., Dirks, P.B. 2004. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 432 (7015) ;281-2.
- Simon, M., Grandage, V.L., Linch, D.C. and Khwaja, A. 2005. Constitutive activation of the Wnt/ β -catenin signalling pathway in acute myeloid leukaemia. *Oncogene.* 24 (14); 2410–2420.
- Skokowa, J., Fobiwe, J.P., Dan, L., Thakur, B.K., Welte, K. 2009. Neutrophil elastase is severely down-regulated in severe congenital neutropenia independent of ELA2 or HAX1 mutations but dependent on LEF-1. *Blood* 114(14);3044-3051.
- Soydinc, H.O., Camlica, H., Duranyildiz, D., Kaytan, E., Tafi, F., Yasasever, V., Dalay, N. 2006. Matriks metalloproteinazlar ve akciğer kanseri. *Türk Onkoloji Dergisi* 21(2);53-56.

Spassov, B.V., Stoimenov, A.S., Balatzenko, G.N., Genova, M.L., Peichev, D.B., Konstantinov, S.M. 2011. Wilms' tumor protein and FLT3-internal tandem duplication expression in patients with de novo acute myeloid leukemia. *Hematology*. 16(1);37-42.

Staal, F., Luis, T.C. 2010. Wnt Signaling in Hematopoiesis: Crucial Factors for Self-Renewal, Proliferation, and Cell fate Decisions. *Journal of Cellular Biochemistry* 109:844–849.

Staal, F.J., Luis, T.C. 2010. Wnt Signaling in Hematopoiesis: Crucial Factors for Self-Renewal, Proliferation, and Cell fate Decisions. *Journal of Cellular Biochemistry* 109(5):844–849.

Stambolic, V. 2002. PTEN: a new twist on β -catenin? *Trends in Pharmacological Sciences* 23(3);104-106.

Starczynowski, D.T., Morin, R., McPherson, A., Lam, J., Chari, R., Wegrzyn, J., Kuchenbauer, F., Hirst, M., Tohyama, K., Humphries, R.K., Lam, W.L., Marra, M., Karsan, A. 2010. Genome-wide identification of human microRNAs located in leukemia-associated genomic alterations. *Blood*. 117(2);595-607.

Stiiles, B., Groszer, M., Wang, S., Jiao, J. and Wu, H. 2004. PTENless means more. *Dev. Biol.* 273; 175-184.

Stirewalt, D.L., Meshinchi, S., Kopecky, K.J., Fan, W., Pogossova-Agadjanyan, E.L., Engel, J.H., Cronk, M.R., Dorcy, K.S., McQuary, A.R., Hockenbery, D., Wood, B., Heimfeld, S., Radich, J.P. 2008. Identification of genes with abnormal expression changes in acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 47;(1) 8-20.

Stoehr R., Wiissmann C., Suzuki H. 2004. Deletions of chromosome 8p and loss of sFRP1 expression are progression markers of papillary bladder cancer. *Lab Invest*. 84;465–478.

Stone, R.M., O'donnell, M.R., Sekeres, M.A. 2004. Acute Myeloid Leukemia. *American Society of Hematology*.

Suzuki, H., Watkins, Dn., Jair, Kw. 2004. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nature Genet*. 36;417–422.

Swiatek, W., Tsai, I.C., Klimowski, L., Pepler, A., Barnette, J., Yost, H.J., Virshup, D.M., 2004. Regulation of casein kinase I epsilon activity by Wnt signaling, *J Biol Chem*, 279(13), 13011-13017.

Takeichi, M., Inuzuka, H., Shimamura, K., Fujimori, T., Nagafuchi, A. 1990. Cadherin subclasses: differential expression and their roles in neural morphogenesis.

Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J.P., He, X., 2000. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction, *Nature*, 407(6803), 530-535.

Tanaka, S., Akiyoshi, T., Mori, M., Wands, Jr., Sugimachi, K. 1998. A novel frizzled gene identified in human esophageal carcinoma mediates APC/beta-catenin signals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95;10 164–10 169.

Tanır, H.G., Demirezen, Ş. 2009. Wnt Sinyal Yolunun Biyolojisi ve Bu Yolda Görev Alan Biyomoleküller. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 29(5):1292-7.

Taniguchi, K., Roberts, Lr., Aderca, İn. 2002. Mutational spectrum of beta-catenin, AXİN1, and AXİN2 in hepatocellular carcinomas and epatoblastomas. *Oncogene.* 21;4863–4871.

The Leukemia & Lymphoma Society. 2003. Novartis Oncology.

Tohdaa, S., Kogoshia, H., Murakamia, N., Sakanob, S., Naraa, N. 2005. Diverse effects of the Notch ligands Jagged1 and Delta1 on the growth and differentiation of primary acute myeloblastic leukemia cells. *Experimental Hematology* 33;558–563.

Topol, L., Jiang, X., Choi, H., Garrett-Beal, L., Carolan, Pj., Yang, Y. 2003. Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *J Cell Biol.* 162;899–908.

Tuna M. Solid tümörlerde ve lösemilerde kanser kök hücreleri. *Cancer stem cells in solid tumors and leukemia.* 2009. *Türk Onkoloji Dergisi* 24(1):42-47.

Tuna M. Solid tümörlerde ve lösemilerde kanser kök hücreleri. *Cancer stem cells in solid tumors and leukemia.* 2009. *Türk Onkoloji Dergisi* 24(1):42-47.

Tyybäkinoja, A., Saarinen-Pihkala, U., Elonen, E., Knuutila, S. 2006. Amplified, lost, and fused genes in 11q23-25 amplicon in acute myeloid leukemia, an array-CGH study. *Genes Chromosomes Cancer.* 45(3);257-64.

Uematsu, K., Kanazawa, S., You, L. 2003. Wnt pathway activation in mesothelioma: evidence of dishevelled overexpression and transcriptional activity of beta-catenin. *Cancer Res.* 63; 4547–4551.

Ugolini, F., Charafe-Jauffret, E., Bardou, Vj. 2001. WNT pathway and mammary carcinogenesis: loss of expression of candidate tumor suppressor gene SFRP1 in most invasive carcinomas except of the medullary type. *Oncogene.* 20;5810–5817.

Valencia, A., Román-Gómez, J., Cervera, J., Such, E., Barragán E., Bolufer, P., Moscardó, F., Sanz G.F., Sanz, M.A. (2009). Wnt signaling pathway is epigenetically regulated by methylation of Wnt antagonists in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 23;1658–1666.

Valk, P.J., Delwel, R., Lowenberg, B. 2005. Gene expression profiling in acute myeloid leukemia. *Curr Opin Hematol* 12:76-81.

Van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Dooijes, D., Clevers, H., 1991. Identification and cloning of TCF-1, a T lymphocyte-specific transcription factor containing a sequence-specific HMG box, *EMBO J*, 10(1),123-132.

- Verheyen, E.M., Gottardi, C.J., 2010. Regulation of Wnt/beta-catenin signaling by protein kinases, *Dev Dyn*, 239(1), 34-44.
- Virshup, D.M., 2001. Casein kinase I: from obscurity to center stage, *IUBMB Life*, 51(2), 73-78.
- Voeller, HJ., Truica, Ci., Gelmann, Ep. 1998. Beta-catenin mutations in human prostate cancer. *Cancer Res.* 58;2520–2523.
- Wallingford, J.B., Habas, R., 2005. The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity, *Development*, 132(20), 4421-4436.
- Wehrli, M., Dougan, S.T., Caldwell, K., O'Keefe, L., Schwartz, S., Vaizel-Ohayon, D., Schejter, E., Tomlinson, A., DiNardo, S., 2000. Arrow encodes an LDL- receptor-related protein essential for Wntless signalling, 407(6803), 527- 530.
- Weitzman, J.B., 2005. Dishevelled Nuclear Shuttling, *J Biol*, 4(1),1.
- Wend, P., Holland, J.D., Ziebold, U., Birchmeier, W. 2010. Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Semin Cell Dev Biol.* 2010 Oct;21(8):855-63.
- Wijnhoven, BPL., Dinjens, W.N., Pignatelli, M. 2000. E-cadherin/catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br. J. Surg.*, 87, 992–1005.
- Willert K., Brown J.D., Danenberg E., Duncan A.W., Weissman I.L., Reya T. 2003. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*, 423(6938);448-52.
- Willert, K., Jones, K.A., 2006. Wnt signaling: is the party in the nucleus?, *Genes Dev*, 20(11), 1394-404.
- Willert, K., Nusse, R., 1998. Beta-catenin: a key mediator of Wnt signaling, *Curr Opin Genet Dev*, 8(1), 95-102.
- Wissmann, C., Wild, Pj., Kaiser, S. 2003. WIF1, a component of the Wnt pathway, is down-regulated in prostate, breast, lung, and bladder cancer. *J Pathol.* 201;204–212.
- Wong, Cm., Fan, St., Ng, Iol. 2001. Beta-catenin mutation and overexpression in hepatocellular carcinoma - clinicopathologic and prognostic significance. *Cancer.* 92;136–145.
- Woodward, W.A., Chen, M.S., Behbod, F., Rosen, J.M. 2005. On mammary stem cells. *J Cell Sci.* 118 (Pt 16) ;3585-94.
- WU, R., Zhai, Y., Fearon, ER., Cho, KR. 2001. Diverse mechanisms of beta-catenin deregulation in ovarian endometrioid adenocarcinomas. *Cancer Res.* 61;8247–8255.
- Xiao, R., Chen, T., Zhou, M., Yang, J.H., Jiang, N.K., Zhang, R. 2010. Abnormal expression of hematopoietic regulatory factors in newly diagnosed patients with acute myeloid leukemia. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 18(5);1124-7.

Xu, R.M., Carmel, G., Sweet, R.M., Kuret, J., Cheng, X., 1995. Crystal structure of casein kinase-1, a phosphate-directed protein kinase, *EMBO J*, 14(5), 1015-1023.

Xu, W., Kimelman, D., 2007. Mechanistic insights from structural studies of beta-catenin and its binding partners, *J Cell Sci*, 120(Pt 19), 3337-3344.

Yanada, M., Suzuki, M., Kawashima, K. 2005. Long-term outcomes for unselected patients with acute myeloid leukemia categorized according to the World Health Organization classification: a single-center experience. *Eur J Haematol*. 74;418-23.

Yokota, N., Nishizawa, S., Ohta, S. 2002. Role of Wnt pathway in medulloblastoma oncogenesis. *Int J Cancer*. 101;198–201.

You, L., He, B., Xu, Z. 2004. Inhibition of Wnt-2-mediated signaling induces programmed cell death in non-small-cell lung cancer cells. *Oncogene* 23; 6170–6174.

Ysebaert, L., Chicanne, G., Demur, C., De Toni, F., Prade-Houdellier, N., Ruidavets, J-B., Mansat-De Mas, V., Rigal-Huguet, F., Laurent, G., Payraastre, B., Manenti, S., Racaud-Sultan, C. 2006. Expression of β -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.

Zatkova, A., Merk, S., Wendehack, M., Bilban, M., Muzik, E.M., Muradyan, A., Haferlach, C., Haferlach, T., Wimmer, K., Fonatsch, C., Ullmann, R. 2009. AML/MDS with 11q/MLL amplification show characteristic gene expression signature and interplay of DNA copy number changes. *Genes Chromosomes Cancer*. 48(6);510-20.

Zeidler, C., Germeshausen, M., Klein, C., Welte, K. 2008. Clinical implications of ELA2-, HAX1- and G-CSF-receptor (CSF3R) mutations in severe congenital neutropenia. *British Journal of Hematology* 144;459-467.

Zeng, L., Fagotto, F., Zhang, T., Hsu, W., Vasicek, T.J., Perry, W.L.3rd, Lee, J.J., Tilghman, S.M., Gumbiner, B.M, Costantini, F., 1997. The mouse Fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation, *Cell*, 90(1), 181-192.

Zhang, S.J., Li, J.Y., Shi, J.Y., Shi, Z.Z., Gu, B.W., Bai, X.T., Zhu, Y.M., Shen, Z.X. 2006. Study of mutation and single nucleotide polymorphism of PDGFRbeta and SHIP gene in acute myeloid leukemia. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*. 27(6);383-5.

Zhang, L.Y., Ye, J., Zhang, F., Li, F.F., Li, H., Gu, Y., Liu, F., Chen, G.S., Li, Q., 2009. Axin induces cell death and reduces cell proliferation in astrocytoma by activating the p53 pathway, *Int J Oncol*, 35(1), 25-32.

www.tuba.gov.tr

www.leukemia-lymphoma.org

KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. URL:
<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>

EKLER

EK-1

HASTA BİLGİLENDİRME VE ONAM FORMU

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

Araştırmanın Adı: Akut Miyeloid Lösemide Wnt sinyal yolağındaki genlerin DNA Mikroarray Analizi ile tanımlanması

Araştırmanın Amacı: Akut Miyeloid Lösemi, 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 adı verilen sinyal sisteminin AML hastalığının oluşumundaki etkisini araştırmak için sağlıklı insanlar ile bu hastalığa yakalanan insanların hücrelerini karşılaştırmak üzere bir çalışma planlanmıştır.

Buradan yola çıkarak, bu çalışmada AÜ Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim dalından Wnt yolağıının etkili olduğu bilinen akut miyeloid lösemi tanısı almış 10 hastanın ve 10 sağlıklı vericinin alınacak hücrelerinden elde edilecek RNA'lar ile mikrodizin analizi ve Real time PCR yapılarak bu yolaktaki aktive ya da inhibe olan genlerin miktarının araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmanın Protokolü: Bu çalışmada Ankara Üniversitesi Hematoloji Bilim dalında tanı amacıyla alınan hasta kemik iliği örnekleri kullanılacaktır. Bunun haricinde sizden ilave kemik iliği alınmayacaktır. Zaten alınan örnekten ihtiyaç fazlası olan miktar bu çalışmada kullanılacağı için onayınıza başvurulmaktadır.

Bir miktar kemik iliği örneği alındıktan sonra CD34+ hematopoetik kök hücreler izole edilerek RNA elde edilecektir. Bu RNA örnekleri ile gen düzeyinde bir çalışma yapılacaktır. Size her hangi bir ilaç verilmeyecek ve bu durum yaşamınızı etkilemeyecektir. Çalışmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılmayı red etme hakkına sahipsiniz. Çalışma sırasında elde edilen kemik iliği örnekleri anonim olarak saklanacak ve hastaların isimleri saklı kalmak koşulu ile diğer bilimsel çalışmalarda da kullanılabilir. Bu çalışma size veya sosyal güvencenizi sağlayan kuruma ekonomik açıdan bir yük getirmeyecektir. 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.

Ben.....;bu çalışma ile ilgili yeterli bilgiye sahibim.

Konu ile ilgili sorularımı sorarak açık ve doyurucu yanıtlar aldım.

Bu bilgiler ışığında elde edilen kemik iliğimin;

Başka amaçla kullanılmaması

Kimliğimin gizli tutularak bilimsel amaçlı diğer çalışmalarda da kullanılabilmesi koşulu ile kullanılmasına izin veriyorum.

Hastanın adı-soyadı:

Adresi:

Tel:

İmza:

Sorumlu Araştırmacı:

İmza:

EK-2

SAĞLIKLI BİREY BİLGİLENDİRME VE ONAM FORMU

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

Araştırmanın Adı: Akut Miyeloid Lösemide Wnt sinyal yolağındaki genlerin DNA Mikroarray Analizi ile tanımlanması

Araştırmanın Amacı: Akut Miyeloid Lösemi, 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 adı verilen sinyal sisteminin AML hastalığının oluşumundaki etkisini araştırmak için sağlıklı insanlar ile bu hastalığa yakalanan insanların hücrelerini karşılaştırmak üzere bir çalışma planlanmıştır.

Buradan yola çıkarak, bu çalışmada AÜ Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim dalından Wnt yolağının etkili olduğu bilinen akut miyeloid lösemi tanısı almış 10 hastanın ve 10 sağlıklı vericinin alınacak hücrelerinden elde edilecek RNA’lar ile mikrodizin analizi ve Real time PCR yapılarak bu yolaktaki aktive ya da inhibe olan genlerin miktarının araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmanın Protokolü: Bu çalışmada Ankara Üniversitesi Hematoloji Bilim dalında tanı amacıyla alınan verici kemik iliği örnekleri kullanılacaktır. Bunun haricinde sizden ilave kemik iliği alınmayacaktır. Zaten alınan örnekten ihtiyaç fazlası olan miktar bu çalışmada kullanılacağı için onayınıza başvurulmaktadır.

Bir miktar kemik iliği örneği alındıktan sonra CD34+ hematopoetik kök hücreler izole edilerek RNA elde edilecektir. Bu RNA örnekleri ile gen düzeyinde bir çalışma yapılacaktır. Size her hangi bir ilaç verilmeyecek ve bu durum yaşamınızı etkilemeyecektir. Çalışmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılmayı red etme hakkına sahipsiniz. Çalışma sırasında elde edilen kemik iliği örnekleri anonim olarak saklanacak ve hastaların isimleri saklı kalmak koşulu ile diğer bilimsel çalışmalarda da kullanılabilir. Bu çalışma size veya sosyal güvencenizi sağlayan kuruma ekonomik açıdan bir yük getirmeyecektir. 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.

Ben.....;bu çalışma ile ilgili yeterli bilgiye sahibim.

Konu ile ilgili sorularımı sorarak açık ve doyurucu yanıtlar aldım.

Bu bilgiler ışığında elde edilen kemik iliğimin;

- Başka amaçla kullanılmaması
- Kimliğimin gizli tutularak bilimsel amaçlı diğer çalışmalarda da kullanılabilmesi koşulu ile kullanılmasına izin veriyorum.

Hastanın adı-soyadı:

Adresi:

Tel:

İmza:

Sorumlu Araştırmacı:

İmza:

EK-3

ARAŞTIRMA AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU (Hasta Grubu)

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 Wnt sinyal yolağındaki genlerin DNA Mikroarray Analizi ile tanımlanması"dır.

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 adı verilen sinyal sisteminin AML hastalığının oluşumundaki etkisini araştırmak için sağlıklı insanlar ile bu hastalığa yakalanan insanların hücrelerini karşılaştırmak üzere bir çalışma planlanmıştır.

Buradan yola çıkarak, bu çalışmada HÜ Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim dalından Wnt yolağının etkili olduğu bilinen akut miyeloid lösemi tanısı almış 10 hastanın ve 10 sağlıklı vericinin alınacak hücrelerinden elde edilecek RNA'lar ile mikrodizin analizi ve Eş Zamanlı PCR yapılarak bu yolaktaki aktive ya da inhibe olan genlerin miktarının 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 edilerek RNA elde edilecektir. Bu RNA örnekleri ile gen düzeyinde bir çalışma yapılacaktır. Size her hangi bir ilaç verilmeyecek ve bu durum yaşamınızı etkilemeyecektir.

Çalışma sırasında elde edilen kemik iliği 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.

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 kağıdının 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-4

ARAŞTIRMA AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU (Kontrol Grubu)

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 Wnt sinyal yolağındaki genlerin DNA Mikroarray Analizi ile tanımlanması"dır.

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 adı verilen sinyal sisteminin AML hastalığının oluşumundaki etkisini araştırmak için sağlıklı insanlar ile bu hastalığa yakalanan insanların hücrelerini karşılaştırmak üzere bir çalışma planlanmıştır.

Buradan yola çıkarak, bu çalışmada HÜ Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim dalından Wnt yolağının etkili olduğu bilinen akut miyeloid lösemi tanısı almış 10 hastanın ve 10 sağlıklı vericinin alınacak hücrelerinden elde edilecek RNA'lar ile mikrodizin analizi ve Eş Zamanlı PCR yapılarak bu yolaktaki aktive ya da inhibe olan genlerin miktarının araştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada Hacettepe Üniversitesi Hematoloji Bilim dalında alınan 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 edilerek RNA elde edilecektir. Bu RNA örnekleri ile gen düzeyinde bir çalışma yapılacaktır. Size her hangi bir ilaç verilmeyecek ve bu durum yaşamınızı etkilemeyecektir.

Çalışma sırasında elde edilen kan 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.

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 kağıdının 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



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

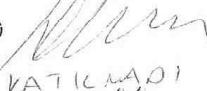
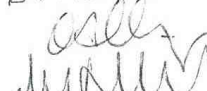
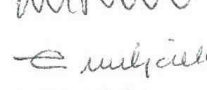
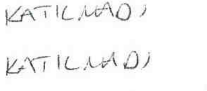



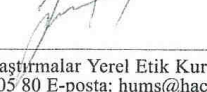
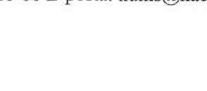

Sayı : B.30.2.HAC.0.20.05.04/ 1655/13028
Konu :

13 Temmuz 2009

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 02 TEMMUZ 2009 PERŞEMBE günü
Toplantı No : 2009/8
Proje No : FON 09/23 (Değerlendirme Tarihi: 02.04.2009)
Karar No : FON 09/23 -71

Ankara Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Asuman Sunguroğlu'nun sorumlu araştırmacısı olduğu, Prof. Dr. Meral Beksaç, Prof. Dr. Nilgün Sayınalp, Doç. Dr. Hilal Özdağ, Uzm. Bio. Buket Altınok, Uzm. Bio. Tülin Özkan ve Uzm. Dr. Klara Dalva ile birlikte çalışacakları FON 09/23 kayıt numaralı ve "Akut Myeloid Lösemide Wnt Sinyal Yolağındaki Genlerin DNA Mikroarray Analizi ile Tanımlanması" başlıklı proje önerisi Kurulumuzda değerlendirilmiş olup, Tıbbi Etik açıdan uygun bulunmuştur.

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

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ ETİK KURULU
RESEARCH ETHICS COMMITTEE OF MEDICAL FACULTY, ANKARA UNIVERSITY
ANKARA-TÜRKİYE
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	
	PROTOKOL ADI	Akut myeloid lösemide wnt sinyal yolağındaki genlerin DNA mikroarray analizi ile tanımlanması
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Prof.Dr.Asuman Sunguroğlu
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Ankara Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim
	DESTEKLEYİCİ FİRMA	

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BİLGİLER	Belge Adı	Değişiklik No. / Tarihi	Dili
	PROTOKOL		
	ARAŞTIRICI BROŞÜRÜ		
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLURU		
	OLGU RAPOR FORMU		

ÇALIŞMA ESASI	İYİ KLİNİK UYGULAMALARI KLAUZU
---------------	--------------------------------

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:123-3355	Tarih: 07 Ocak 2008
	Araştırma protokolüne tamamen uyulmak, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Yönergesinde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve Yönergenin 11/h maddesi gereği sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere laboratuvar çalışmasının Fakültemizde yürütülmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan öğretim üyelerinin oybirliği ile karar verildi.	

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. İsmail Hakkı Ayhan Başkan	Farmakoloji	Ankara Tıp Fakültesi	E	
Prof. Dr. Efser Kerimoğlu Başkan Yardımcısı	Çocuk Psikiyatrisi	Ankara Tıp Fakültesi	K	
Prof. Dr. Özden Palaoğlu Sekreter	Farmakoloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	RAHATSIZ

Bünye KARAR NO: 123-3355
17 Ocak 2008

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:16-364	Tarih: 04 Ekim 2010
	Çalışmada yeterli hasta sayısına ulaşılmadığından Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Öğretim üyesi Prof.Dr.Münci Yağcı'nın sorumlu araştırmacı olarak eklenmesi uygun bulunmuştur.	

DEĞERLENDİRME KOMİSYONU BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik , İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu ve SOP
DEĞERLENDİRME KOMİSYONU BAŞKANI UNVANI/ADI/SOYADI: Prof.Dr.Mehmet MELLİ	
DEĞERLENDİRME KOMİSYONU ÜYELERİ	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		İlişki *		Katılım **		İmza
Prof.Dr.Mehmet Melli	Tıbbi Farmakoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ahmet Demirkazık	Tıbbi Onkoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ajlan Tükün	Tıbbi Genetik	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Şehirdışında
Prof.Dr.Nuhan Puralı	Biyofizik	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.H.Serdar Öztürk	Tıbbi Biyokimya	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Bülent Gümüşel	Eczacı- Öğr.Üyesi -	Hacettepe Üni. Ecz. Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.H.Serap Sivri	Çocuk Sağlığı	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Muharrem Özen	Avukat- Öğr.Üyesi	Ankara Üniv. Hukuk Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Toplantıda
Prof.Dr.Banu Çakır	Halk Sağlığı	Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Öğr.Gör.Dr.Volkan Kavas	Deontoloji	Ankara Üniv. Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Gülsüm Aslan	Sağlık Mes. Dışı- Emekli	-----	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma



19 Ekim 2010

ASLI GIBİDİR

Hasan TUNA
A. Ü. Tıp Fakültesi
İdari Personel Büro Amirliği Şefi

EK-8

	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B	Probe ID	Gene Title
227062_at	-2,249163704	6,159611	-5,87038	2,11E-05	0,174311	2,36917	1552274_at	PX domain containing serine/threonine kinase
236198_at	2,206764877	5,690084	5,456939	4,76E-05	0,174311	1,74895	1553297_a_at	colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)
1557270_at	-2,244077001	5,967804	-4,97409	0,00012681	0,198095	0,98737	1554892_a_at	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 3 (hematopoietic cell-specific)
1552274_at	-2,172931144	6,539817	-4,56972	0,000293604	0,234634	0,3215	1555745_a_at	lysozyme (renal amyloidosis)
210943_s_at	-2,254607016	5,931614	-4,18799	0,000657119	0,281433	-0,3268	1556589_at	CDNA FLJ25645 fis, clone SYN00113
222529_at	-2,133809658	7,177996	-4,18793	0,000657203	0,281433	-0,3269	1556590_s_at	CDNA FLJ25645 fis, clone SYN00113
215599_at	-2,048300897	5,442172	-4,16728	0,000686681	0,281433	-0,3625	1557270_at	CDNA FLJ36375 fis, clone THYMU2008226
203591_s_at	-2,339914386	5,64091	-4,1518	0,000709639	0,281433	-0,3891	1565162_s_at	microsomal glutathione S-transferase 1
1553297_a_at	-2,014671584	6,172586	-4,11676	0,000764548	0,281433	-0,4496	1570165_at	CDNA clone IMAGE:3895112
208792_s_at	-3,19379713	7,094618	-3,80198	0,001496779	0,294678	-0,9968	200782_at	annexin A5
223136_at	-2,08908936	5,124489	-3,6842	0,001925799	0,296377	-1,203	200862_at	24-dehydrocholesterol reductase
206871_at	-4,915184932	6,957648	-3,59428	0,002334464	0,296377	-1,3608	200999_s_at	cytoskeleton-associated protein 4
214575_s_at	-3,968526093	5,674251	-3,5806	0,00240385	0,296377	-1,3848	201069_at	matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)
210254_at	-4,716540026	7,134037	-3,55602	0,002533671	0,296377	-1,428	201160_s_at	cold shock domain protein A
208791_at	-3,052433342	6,365614	-3,54478	0,002595342	0,296377	-1,4477	201291_s_at	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa
203973_s_at	-3,036576198	7,37957	-3,43752	0,003264416	0,303663	-1,6361	201397_at	phosphoglycerate dehydrogenase
1570165_at	-2,012847104	5,974869	-3,41413	0,003431729	0,303663	-1,6772	201506_at	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa
238774_at	-2,046271391	7,005591	-3,35656	0,003880636	0,303663	-1,7782	201909_at	ribosomal protein S4,Y-linked 1
223502_s_at	-2,757008103	8,505057	-3,32773	0,00412687	0,303663	-1,8288	202095_s_at	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)
218865_at	-2,041010571	5,446628	-3,32743	0,004129461	0,303663	-1,8293	202391_at	brain abundant, membrane attached signal protein 1
225601_at	-2,259659705	6,651025	-3,29306	0,004443456	0,303698	-1,8896	202705_at	cyclin B2
202760_s_at	-2,127950075	6,477398	-3,28409	0,00452926	0,303698	-1,9053	202760_s_at	A kinase (PRKA) anchor protein 2///PALM2-AKAP2 protein
1554892_a_at	-3,366960822	5,222789	-3,21377	0,005260551	0,30975	-2,0284	202859_x_at	interleukin 8
1556589_at	-2,316498463	6,071696	-3,20619	0,005345951	0,30975	-2,0417	202870_s_at	cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)
207341_at	-3,216488394	5,438306	-3,09925	0,006707768	0,32285	-2,2283	202917_s_at	S100 calcium binding protein A8

	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B	Probe ID	Gene Title
231929_at	2,287916943	6,910997	3,083977	0,006928188	0,324036	-2,2549	203213_at	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M
204351_at	-3,234701928	4,984344	-3,06565	0,007202082	0,327055	-2,2868	203305_at	coagulation factor XIII, A1 polypeptide
212021_s_at	-2,309835303	6,777515	-3,01739	0,007974911	0,332846	-2,3705	203535_at	S100 calcium binding protein A9
AFFX-HUMRGE /M10098_5_at	-2,818547821	9,722285	-3,0089	0,008119056	0,334057	-2,3853	203591_s_at	colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)
227961_at	-2,090743375	6,00511	-3,00353	0,008211457	0,334057	-2,3946	203744_at	high-mobility group box 3
213274_s_at	-2,016766573	5,261261	-2,91354	0,009922631	0,345868	-2,55	203753_at	transcription factor 4
204256_at	-2,12977528	7,608827	-2,8439	0,011480114	0,353331	-2,6696	203764_at	discs, large homolog 7 (Drosophila)
218755_at	-2,193439006	6,30109	-2,84046	0,01156282	0,353331	-2,6755	203948_s_at	myeloperoxidase
201291_s_at	-2,752880583	7,985398	-2,8198	0,012072456	0,355418	-2,7108	203949_at	myeloperoxidase
202859_x_at	2,133582928	9,445734	2,813905	0,012221742	0,356191	-2,7209	203973_s_at	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta
204971_at	-3,87745292	7,570262	-2,80788	0,012376271	0,356361	-2,7312	204048_s_at	phosphatase and actin regulator 2
227265_at	-2,353047239	5,597876	-2,77518	0,013247962	0,356818	-2,7869	204197_s_at	runt-related transcription factor 3
242029_at	-2,056308438	6,089909	-2,73832	0,014301655	0,362012	-2,8496	204256_at	ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3- like, yeast)
212022_s_at	-2,326394102	7,220963	-2,73762	0,014322174	0,362012	-2,8507	204318_s_at	G-2 and S-phase expressed 1
203753_at	-2,035891902	8,047704	-2,72734	0,014630685	0,363606	-2,8682	204351_at	S100 calcium binding protein P
204834_at	-2,135770096	4,831	-2,7029	0,015389837	0,366345	-2,9095	204834_at	fibrinogen-like 2
207165_at	-2,436082563	8,263917	-2,69984	0,015487286	0,366345	-2,9147	204959_at	myeloid cell nuclear differentiation antigen
214370_at	-2,169113695	4,325306	-2,69321	0,01570093	0,366345	-2,9259	204971_at	cystatin A (stefin A)
214835_s_at	-2,585292883	6,078738	-2,67749	0,016218931	0,366345	-2,9524	205000_at	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked
211506_s_at	2,6960097	6,599199	2,672813	0,016376146	0,366345	-2,9603	205001_s_at	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, X-linked///DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 3, Y-linked
215772_x_at	-2,44067921	5,730581	-2,66211	0,016741626	0,367119	-2,9783	205382_s_at	complement factor D (adipsin)
210140_at	-2,772186586	8,6566	-2,65619	0,016946814	0,367394	-2,9882	205624_at	carboxypeptidase A3 (mast cell)
206643_at	-2,367727359	4,848342	-2,65016	0,017158562	0,368572	-2,9984	205653_at	cathepsin G
203764_at	-2,373200556	6,771168	-2,63433	0,017726261	0,371626	-3,0249	206111_at	ribonuclease, RNase A family, 2 (liver, eosinophil-derived neurotoxin)
212459_x_at	-2,504610186	5,773481	-2,61236	0,018544216	0,373636	-3,0617	206130_s_at	asialoglycoprotein receptor 2
212023_s_at	-2,110553222	6,279137	-2,61108	0,018593257	0,373636	-3,0638	206207_at	Charcot-Leyden crystal protein

	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B	Probe ID	Gene Title
202705_at	-2,174819032	8,353566	-2,60762	0,0187255	0,374569	-3,0696	206364_at	kinesin family member 14
206111_at	-3,591037774	9,104127	-2,60686	0,018754822	0,374569	-3,0709	206478_at	KIAA0125
239001_at	-2,101324302	6,86178	-2,60307	0,018900831	0,374728	-3,0772	206632_s_at	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3B
227923_at	2,207894903	5,872833	2,587137	0,019527947	0,375854	-3,1038	206643_at	histidine ammonia-lyase
210997_at	-2,370097677	5,347816	-2,56385	0,020480018	0,378038	-3,1425	206851_at	ribonuclease, RNase A family, 3 (eosinophil cationic protein)
226818_at	-2,084496088	5,252267	-2,54569	0,021253089	0,380496	-3,1727	206871_at	elastase 2, neutrophil
220179_at	-2,219783996	4,126764	-2,53968	0,021514638	0,380839	-3,1826	206940_s_at	POU class 4 homeobox 1
203744_at	-2,01551411	8,172935	-2,53414	0,021758988	0,380839	-3,1918	206978_at	chemokine (C-C motif) receptor 2///similar to C-C chemokine receptor type 2 (C-C CKR-2)
226841_at	-2,015079456	4,858818	-2,53384	0,021772065	0,380839	-3,1923	207067_s_at	histidine decarboxylase
204318_s_at	-2,063966358	6,634483	-2,53178	0,021863813	0,381181	-3,1957	207165_at	hyaluronan-mediated motility receptor (RHAMM)
205653_at	-2,956915366	7,501559	-2,52413	0,022206675	0,382463	-3,2083	207341_at	proteinase 3 (serine proteinase, neutrophil, Wegener granulomatosis autoantigen)
206364_at	-2,027635861	7,214795	-2,5183	0,022471432	0,382463	-3,218	208791_at	clusterin
206632_s_at	-2,327246516	6,079895	-2,50682	0,023001611	0,382463	-3,2369	208792_s_at	clusterin
1556590_s_at	-2,346969733	5,984755	-2,50407	0,023130176	0,382463	-3,2414	209099_x_at	jagged 1 (Alagille syndrome)
206130_s_at	-2,389564016	5,596755	-2,49634	0,023495659	0,382705	-3,2541	209191_at	tubulin, beta 6
223501_at	-2,033823628	7,985057	-2,47303	0,024631477	0,385742	-3,2924	210139_s_at	peripheral myelin protein 22
222608_s_at	-2,086016218	7,203696	-2,46399	0,02508607	0,385889	-3,3072	210140_at	cystatin F (leukocystatin)
206851_at	-2,85476506	6,877943	-2,46053	0,025261802	0,385889	-3,3129	210254_at	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 3 (hematopoietic cell-specific)
200862_at	-2,315518036	8,91299	-2,44639	0,025993439	0,386883	-3,336	210943_s_at	lysosomal trafficking regulator
204048_s_at	-2,17367288	7,727563	-2,43956	0,026353513	0,386883	-3,3472	210997_at	hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)
202095_s_at	-2,343058528	7,797988	-2,4316	0,02677964	0,387116	-3,3601	211506_s_at	interleukin 8
205001_s_at	-2,600148278	5,978721	-2,41327	0,027785243	0,390512	-3,3899	211709_s_at	C-type lectin domain family 11, member A
216268_s_at	-2,121515765	6,390395	-2,37141	0,030216299	0,397899	-3,4577	211743_s_at	proteoglycan 2, bone marrow (natural killer cell activator, eosinophil granule major basic protein)
206978_at	-2,241189397	5,353123	-2,367	0,030483601	0,398853	-3,4648	212021_s_at	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67

	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B	Probe ID	Gene Title
201069_at	-2,424138292	6,809467	-2,36274	0,030743991	0,399727	-3,4716	212022_s_at	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67
202870_s_at	-2,242244489	8,039195	-2,36128	0,030833859	0,399727	-3,474	212023_s_at	antigen identified by monoclonal antibody Ki-67
234987_at	-2,595569404	6,735964	-2,35553	0,031189637	0,40068	-3,4832	212390_at	phosphodiesterase 4D interacting protein (myomegalin)
212390_at	2,103067647	5,096364	2,345739	0,031804656	0,401789	-3,499	212459_x_at	succinate-CoA ligase, GDP-forming, beta subunit
200782_at	-2,84139446	6,819609	-2,33203	0,032684796	0,403537	-3,5209	213274_s_at	cathepsin B
224918_x_at	-3,420021137	9,654376	-2,3275	0,032980265	0,404364	-3,5282	213975_s_at	lysozyme (renal amyloidosis)
211709_s_at	-2,191674361	9,132136	-2,32672	0,033031631	0,404364	-3,5294	214131_at	chromosome Y open reading frame 15B
214131_at	-2,180520955	5,508224	-2,31787	0,033617	0,405395	-3,5436	214218_s_at	X (inactive)-specific transcript
201397_at	-2,019805867	6,84093	-2,31701	0,033674412	0,405395	-3,5449	214370_at	S100 calcium binding protein A8
209099_x_at	-2,162029039	6,356328	-2,29671	0,035057154	0,409048	-3,5773	214575_s_at	azurocidin 1 (cationic antimicrobial protein 37)
203213_at	-2,09993976	8,862556	-2,26455	0,037356392	0,413882	-3,6282	214835_s_at	succinate-CoA ligase, GDP-forming, beta subunit
231736_x_at	-3,159807415	9,814844	-2,24364	0,038926273	0,41552	-3,6612	215599_at	glucuronidase, beta pseudogene///similar to SMA4
218618_s_at	-2,223054645	7,484999	-2,21356	0,041291259	0,419849	-3,7084	215772_x_at	succinate-CoA ligase, GDP-forming, beta subunit
210139_s_at	-2,265579409	5,937876	-2,20965	0,041608488	0,420602	-3,7145	216268_s_at	jagged 1 (Alagille syndrome)
204197_s_at	2,013689043	8,25532	2,202397	0,042202157	0,421411	-3,7258	216667_at	ribonuclease, RNase A family, 2 (liver, eosinophil-derived neurotoxin)
224356_x_at	-2,039623674	5,075213	-2,19061	0,043183902	0,42336	-3,7442	217963_s_at	nerve growth factor receptor (TNFRSF16) associated protein 1
218662_s_at	-2,079532725	8,140645	-2,16561	0,045337039	0,427475	-3,7829	218618_s_at	fibronectin type III domain containing 3B
216667_at	-3,035837663	7,82729	-2,16224	0,045635159	0,428287	-3,7881	218662_s_at	non-SMC condensin I complex, subunit G
226847_at	-2,090865755	3,823692	-2,1553	0,046253593	0,430527	-3,7989	218718_at	platelet derived growth factor C
202917_s_at	-3,181874844	8,265388	-2,15041	0,046694194	0,431699	-3,8064	218755_at	kinesin family member 20A
206207_at	-2,70802701	6,512619	-2,08801	0,052664434	0,442746	-3,9018	218865_at	MOCO sulphurase C-terminal domain containing 1
1565162_s_at	-2,680362316	8,823109	-2,06722	0,054803628	0,446117	-3,9333	220179_at	dipeptidase 3
207067_s_at	-2,366490246	6,601992	-2,064	0,055142484	0,447071	-3,9382	221728_x_at	X (inactive)-specific transcript
201506_at	-2,133357628	4,766301	-2,06388	0,055154285	0,447071	-3,9383	222529_at	solute carrier family 25, member 37
218718_at	-2,220804136	7,51825	-2,04951	0,056687886	0,449461	-3,96	222608_s_at	anillin, actin binding protein

	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B	Probe ID	Gene Title
203948_s_at	-3,392087207	9,099534	-1,97391	0,065409932	0,462444	-4,0724	223136_at	androgen-induced 1
213975_s_at	-2,504237343	9,702106	-1,97157	0,0656983	0,462657	-4,0759	223501_at	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b
224590_at	2,27930205	4,430943	1,956039	0,067641725	0,464759	-4,0987	223502_s_at	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b
217963_s_at	-2,202136489	9,853288	-1,93914	0,069813684	0,466718	-4,1233	223551_at	protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor beta
209191_at	-2,607454354	8,395684	-1,9226	0,072001063	0,470049	-4,1474	224356_x_at	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6A
203535_at	-2,608066608	7,74716	-1,91989	0,072365714	0,470616	-4,1513	224588_at	X (inactive)-specific transcript
205382_s_at	-2,375308793	6,503204	-1,91304	0,073292934	0,471716	-4,1612	224590_at	X (inactive)-specific transcript
206940_s_at	2,155347939	3,937712	1,906164	0,074234543	0,473934	-4,1712	224918_x_at	microsomal glutathione S-transferase 1
200999_s_at	-2,181537094	6,876399	-1,88904	0,076627725	0,475993	-4,1958	225601_at	high-mobility group box 3
1555745_a_at	-2,540047631	7,087579	-1,87888	0,078078412	0,476943	-4,2103	226818_at	macrophage expressed gene 1
227388_at	-2,013918356	6,669577	-1,85352	0,081810329	0,482556	-4,2465	226841_at	macrophage expressed gene 1
203305_at	-2,434771094	6,388568	-1,81576	0,087658581	0,489604	-4,2997	226847_at	follistatin
203949_at	-3,238864322	9,969681	-1,79947	0,09029205	0,493425	-4,3224	227062_at	trophoblast-derived noncoding RNA
214218_s_at	2,804137731	5,014343	1,799068	0,090358662	0,493592	-4,323	227265_at	fibrinogen-like 2
206478_at	2,032832961	8,632694	1,768323	0,095524605	0,500633	-4,3656	227388_at	tumor suppressor candidate 1
223551_at	-2,05108962	4,82405	-1,76493	0,096109985	0,501776	-4,3702	227671_at	X (inactive)-specific transcript
205624_at	-2,082376297	8,742901	-1,75043	0,098648967	0,504474	-4,3901	227711_at	family with sequence similarity 112, member B
205000_at	-2,638596076	6,765671	-1,74888	0,098923671	0,504962	-4,3922	227923_at	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3
204959_at	-2,388904971	6,524995	-1,69402	0,109086586	0,514952	-4,4665	227961_at	cathepsin B
211743_s_at	-2,008870033	7,27504	-1,67661	0,112495149	0,519132	-4,4897	231736_x_at	microsomal glutathione S-transferase 1
227671_at	2,722948014	5,183654	1,611123	0,126151003	0,531592	-4,5756	231929_at	IKAROS family zinc finger 2 (Helios)
201160_s_at	-2,119517104	10,32338	-1,59996	0,128614836	0,534603	-4,5901	234987_at	Full-length cDNA clone CS0DI067YM20 of Placenta Cot 25-normalized of Homo sapiens (human)
202391_at	-2,203293589	7,580868	-1,59886	0,128859831	0,534603	-4,5915	236198_at	Transcribed locus
221728_x_at	2,951451322	5,494032	1,580498	0,133006523	0,53866	-4,615	238774_at	NA
224588_at	3,141024632	5,950385	1,537567	0,143145189	0,550823	-4,6693	239001_at	Microsomal glutathione S-transferase 1
227711_at	-2,10804732	7,043703	-1,37929	0,186251	0,589071	-4,8599	242029_at	Fibronectin type III domain containing 3B

	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B	Probe ID	Gene Title
201909_at	-2,628812287	9,121023	-1,34697	0,196233166	0,59629	-4,8969	AFFX- HUMRGE/M10098_5_at	NA

EK-9

	logFC	AveExpr	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B	Prob ID	Gene Title
226279_at	-2,324408	3,358982	3,35898	-13,8453	1,70E-10	9,30E-06	11,0904	1552680_a_at	cancer susceptibility candidate 5
201131_s_at	-3,260052	3,573756	3,57376	-12,316	9,96E-10	2,72E-05	10,0763	1555772_a_at	cell division cycle 25 homolog A (S. pombe)
214295_at	-3,716718	3,659925	3,65993	-9,60906	3,69E-08	0,0003359	7,71052	1556203_a_at	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2
224458_at	-2,94492	3,999405	3,9994	-9,30705	5,77E-08	0,0004499	7,39104	1557905_s_at	CD44 molecule (Indian blood group)
205391_x_at	-2,935006	4,089295	4,08929	-9,10819	7,80E-08	0,0004499	7,17371	1562056_at	CDNA FLJ35091 fis, clone PLACE6005786
208353_x_at	-3,498377	4,041142	4,04114	-9,01091	9,05E-08	0,0004499	7,06533	1564494_s_at	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), beta polypeptide
239913_at	-2,116817	3,188592	3,18859	-8,92908	1,03E-07	0,0004678	6,9731	201109_s_at	thrombospondin 1
223754_at	-2,755058	4,154411	4,15441	-8,15014	3,55E-07	0,0013861	6,04468	201110_s_at	thrombospondin 1
230690_at	-2,344262	3,656961	3,65696	-7,33789	1,40E-06	0,0040396	4,97363	201131_s_at	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
202728_s_at	-2,579402	4,17044	4,17044	-7,16975	1,89E-06	0,0049196	4,73813	201215_at	plastin 3 (T isoform)
206145_at	-4,184729	3,965817	3,96582	-7,14256	1,98E-06	0,0049196	4,6996	201506_at	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa
208352_x_at	-2,914673	4,020791	4,02079	-7,07309	2,24E-06	0,0049587	4,60056	201669_s_at	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate
226003_at	-2,6425	3,424199	3,4242	-7,00801	2,52E-06	0,004979	4,50704	201690_s_at	tumor protein D52
219672_at	-3,995948	4,616293	4,61629	-6,80211	3,65E-06	0,0062332	4,2063	201743_at	CD14 molecule
205390_s_at	-3,324335	4,031905	4,03191	-6,69454	4,44E-06	0,0067433	4,04627	201839_s_at	tumor-associated calcium signal transducer 1
212151_at	-2,995882	4,158739	4,15874	-6,49472	6,42E-06	0,0087785	3,74365	201927_s_at	plakophilin 4
206306_at	-2,110067	3,177647	3,17765	-6,46709	6,76E-06	0,0090168	3,70125	202435_s_at	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1
209289_at	-2,101974	3,360364	3,36036	-6,40618	7,58E-06	0,0098633	3,60733	202436_s_at	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1
205919_at	-2,395149	3,723467	3,72347	-6,19161	1,14E-05	0,0126761	3,27134	202437_s_at	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1
221765_at	-2,281401	4,378503	4,3785	-6,08898	1,38E-05	0,0142561	3,10782	202619_s_at	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2
202619_s_at	-2,836613	3,781782	3,78178	-5,92672	1,89E-05	0,0181215	2,8456	202620_s_at	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2
207087_x_at	-2,697986	4,115183	4,11518	-5,88556	2,05E-05	0,0190592	2,77838	202708_s_at	histone cluster 2, H2be
234985_at	-2,876657	4,182352	4,18235	-5,87431	2,09E-05	0,0190592	2,75995	202718_at	insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa

	logFC	AveExpr	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B	Prob ID	Gene Title
209290_s_at	-2,032783	3,334477	3,33448	-5,82711	2,29E-05	0,0202209	2,68241	202728_s_at	latent transforming growth factor beta binding protein 1
206390_x_at	-4,994568	5,210309	5,21031	-5,81869	2,33E-05	0,0202294	2,66854	202729_s_at	latent transforming growth factor beta binding protein 1
230942_at	-2,964269	4,59741	4,59741	-5,7907	2,46E-05	0,021033	2,62234	202917_s_at	S100 calcium binding protein A8
207496_at	-2,253469	3,494702	3,4947	-5,55889	3,89E-05	0,0287259	2,23475	202949_s_at	four and a half LIM domains 2
213067_at	-3,263087	4,112076	4,11208	-5,52439	4,16E-05	0,0291874	2,17632	203680_at	protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta
205950_s_at	-3,686979	4,21383	4,21383	-5,4448	4,88E-05	0,0329438	2,04077	203757_s_at	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (non-specific cross reacting antigen)
205268_s_at	-2,33181	3,690565	3,69056	-5,34544	5,96E-05	0,0387757	1,87015	203789_s_at	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C
242197_x_at	-2,53011	3,695488	3,69549	-5,29134	6,64E-05	0,0412781	1,7766	204018_x_at	hemoglobin, alpha 1///hemoglobin, alpha 2
216101_at	-2,189208	4,045942	4,04594	-5,27185	6,91E-05	0,0419812	1,7428	204141_at	tubulin, beta 2A
206167_s_at	-3,101196	3,853639	3,85364	-5,14494	8,94E-05	0,0488791	1,52123	204151_x_at	aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)
1556203_a_at	-2,134602	4,16264	4,16264	-4,97246	0,000127234	0,0609976	1,21631	204315_s_at	G-2 and S-phase expressed 1
204416_x_at	-3,741356	5,069222	5,06922	-4,93765	0,000136681	0,0627884	1,15427	204416_x_at	apolipoprotein C-I
205767_at	-2,389796	3,833559	3,83356	-4,92573	0,000140079	0,0627884	1,13298	204419_x_at	hemoglobin, gamma G
232216_at	-2,182276	4,785402	4,7854	-4,90769	0,000145388	0,0627884	1,10073	204561_x_at	apolipoprotein C-III///apolipoprotein C-IV
202620_s_at	-3,398672	3,996109	3,99611	-4,90243	0,000146975	0,0627884	1,09131	204619_s_at	versican
242824_at	-2,731469	4,231669	4,23167	-4,8612	0,000160038	0,0673081	1,01742	204620_s_at	versican
225115_at	-2,226012	5,276011	5,27601	-4,84927	0,000164036	0,0673301	0,99599	204720_s_at	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 6
226421_at	-2,347701	6,227638	6,22764	-4,81191	0,000177231	0,0702181	0,92876	204749_at	nucleosome assembly protein 1-like 3
210504_at	-3,85461	5,385193	5,38519	-4,79744	0,000182625	0,0708158	0,9027	204848_x_at	hemoglobin, gamma A///hemoglobin, gamma G
210446_at	-2,759543	4,740402	4,7404	-4,77661	0,000190694	0,0734238	0,8651	204976_s_at	Alport syndrome, mental retardation, midface hypoplasia and elliptocytosis chromosomal region, gene 1
205266_at	-2,86463	4,540847	4,54085	-4,76876	0,000193827	0,0741083	0,85092	205033_s_at	defensin, alpha 1///defensin, alpha 3, neutrophil-specific
228802_at	-3,279546	4,256009	4,25601	-4,76155	0,000196752	0,0747044	0,83788	205159_at	colony stimulating factor 2 receptor, beta, low-affinity (granulocyte-macrophage)
211192_s_at	-2,048654	4,32503	4,32503	-4,67845	0,000233909	0,0869999	0,68721	205262_at	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 2

	logFC	AveExpr	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B	Prob ID	Gene Title
227654_at	-4,328448	5,068305	5,0683	-4,61767	0,000265568	0,0949015	0,57648	205266_at	leukemia inhibitory factor (cholinergic differentiation factor)
212224_at	-3,806881	4,229159	4,22916	-4,54564	0,000308807	0,1058347	0,44471	205268_s_at	adducin 2 (beta)
224975_at	-2,76334	3,886469	3,88647	-4,42663	0,000396603	0,1225101	0,22576	205390_s_at	ankyrin 1, erythrocytic
219558_at	-2,236483	4,712164	4,71216	-4,39024	0,000428243	0,1285992	0,15851	205391_x_at	ankyrin 1, erythrocytic
214769_at	-2,744327	3,935699	3,9357	-4,36764	0,000449167	0,1296857	0,11669	205472_s_at	dachshund homolog 1 (Drosophila)
226806_s_at	-2,89295	3,783813	3,78381	-4,36076	0,000455737	0,12986	0,10395	205653_at	cathepsin G
1552680_a_at	-2,15258	4,222832	4,22283	-4,26581	0,000557132	0,1485911	-0,0723	205767_at	epiregulin
224970_at	-3,580934	4,332025	4,33203	-4,25937	0,000564781	0,149176	-0,0843	205780_at	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)
235476_at	-2,102297	4,571297	4,5713	-4,22066	0,000613095	0,1603874	-0,1564	205798_at	interleukin 7 receptor
226751_at	-3,636229	5,079124	5,07912	-4,12482	0,000751542	0,1826247	-0,3354	205830_at	calmegin
220295_x_at	-2,829991	5,270909	5,27091	-4,06309	0,000857092	0,1994107	-0,4511	205919_at	hemoglobin, epsilon 1
217867_x_at	-2,51377	4,367952	4,36795	-3,89794	0,001219157	0,2431209	-0,7615	205950_s_at	carbonic anhydrase I
210215_at	-2,656999	5,289179	5,28918	-3,86637	0,001304237	0,2528693	-0,8209	206067_s_at	Wilms tumor 1
204976_s_at	-2,346641	6,857767	6,85777	-3,8539	0,001339481	0,2556551	-0,8445	206145_at	Rh-associated glycoprotein
222446_s_at	-3,043657	4,525028	4,52503	-3,82902	0,001412665	0,2645119	-0,8914	206167_s_at	Rho GTPase activating protein 6
201110_s_at	-4,338594	4,973962	4,97396	-3,78268	0,00155987	0,2769023	-0,9788	206207_at	Charcot-Leyden crystal protein
221024_s_at	-2,085014	3,712148	3,71215	-3,72238	0,001774668	0,297638	-1,0926	206283_s_at	T-cell acute lymphocytic leukemia 1
210172_at	-2,607848	5,54994	5,54994	-3,66279	0,002016078	0,3161656	-1,2051	206306_at	ryanodine receptor 3
210036_s_at	-2,803204	5,320287	5,32029	-3,63208	0,002153031	0,3251098	-1,2631	206390_x_at	platelet factor 4 (chemokine (C-X-C motif) ligand 4)
214146_s_at	-4,826866	5,830351	5,83035	-3,62548	0,002183702	0,3271066	-1,2755	206488_s_at	CD36 molecule (thrombospondin receptor)
206937_at	-3,655013	5,157774	5,15777	-3,60815	0,002266179	0,3348739	-1,3082	206493_at	integrin, alpha 2b (platelet glycoprotein IIb of IIb/IIIa complex, antigen CD41)
219737_s_at	-2,321113	3,935693	3,93569	-3,57848	0,002414753	0,3483551	-1,3643	206494_s_at	integrin, alpha 2b (platelet glycoprotein IIb of IIb/IIIa complex, antigen CD41)
239723_at	-3,407471	4,828761	4,82876	-3,56495	0,002485693	0,3530006	-1,3898	206698_at	X-linked Kx blood group (McLeod syndrome)
239219_at	-2,134578	4,380289	4,38029	-3,55384	0,002545495	0,3586983	-1,4108	206834_at	hemoglobin, delta
239002_at	-2,282748	4,806466	4,80647	-3,50285	0,00283889	0,3805054	-1,507	206871_at	elastase 2, neutrophil
205262_at	-2,132834	4,596465	4,59646	-3,48838	0,002928088	0,3876349	-1,5343	206937_at	spectrin, alpha, erythrocytic 1 (elliptocytosis 2)
228697_at	2,1161253	6,891788	6,89179	3,482331	0,002966236	0,3903745	-1,5457	207067_s_at	histidine decarboxylase
214464_at	-3,888708	5,489947	5,48995	-3,46526	0,003076481	0,3976516	-1,5779	207087_x_at	ankyrin 1, erythrocytic
236793_at	-2,281836	3,653656	3,65366	-3,42349	0,003363788	0,4151583	-1,6566	207269_at	defensin, alpha 4, corticostatin

	logFC	AveExpr	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B	Prob ID	Gene Title
206698_at	-3,4416	4,851606	4,85161	-3,40555	0,003495232	0,420004	-1,6904	207341_at	proteinase 3 (serine proteinase, neutrophil, Wegener granulomatosis autoantigen)
204315_s_at	-2,453215	5,403841	5,40384	-3,33966	0,004023144	0,4470842	-1,8143	207496_at	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 2 (Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; beta polypeptide)
228188_at	2,1156206	7,64989	7,64989	3,249018	0,004880467	0,4869335	-1,9844	207655_s_at	B-cell linker
240652_at	-2,328317	5,536713	5,53671	-3,20678	0,005339303	0,5076344	-2,0635	208146_s_at	carboxypeptidase, vitellogenic-like
201109_s_at	-2,548128	4,278603	4,2786	-3,16813	0,005796232	0,5255539	-2,1357	208352_x_at	ankyrin 1, erythrocytic
239082_at	-2,024057	4,346544	4,34654	-3,15441	0,00596753	0,5288083	-2,1613	208353_x_at	ankyrin 1, erythrocytic
239451_at	-2,207318	5,963763	5,96376	-3,14673	0,006065534	0,5305967	-2,1756	209116_x_at	hemoglobin, beta
1557905_s_at	2,0608652	7,472888	7,47289	3,14475	0,006091094	0,5305967	-2,1793	209289_at	nuclear factor I/B
204141_at	-3,987139	5,328536	5,32854	-3,07436	0,007070587	0,5615301	-2,3102	209290_s_at	nuclear factor I/B
204720_s_at	-3,671285	5,932061	5,93206	-3,07158	0,007112263	0,5615301	-2,3154	209392_at	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2 (autotaxin)
219288_at	-2,261864	3,867478	3,86748	-3,0672	0,007178431	0,5615301	-2,3235	209458_x_at	hemoglobin, alpha 1///hemoglobin, alpha 2
202435_s_at	-4,139126	6,075032	6,07503	-3,05192	0,007414211	0,5624563	-2,3519	209487_at	RNA binding protein with multiple splicing
203680_at	-3,452406	6,298275	6,29827	-3,0397	0,007608022	0,5706016	-2,3745	209488_s_at	RNA binding protein with multiple splicing
206834_at	-5,734225	7,041415	7,04142	-3,00235	0,008231892	0,5929891	-2,4436	209555_s_at	CD36 molecule (thrombospondin receptor)
211699_x_at	-3,61646	5,979755	5,97976	-2,97106	0,008792896	0,6094901	-2,5013	210036_s_at	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 2
216063_at	-3,061578	4,268029	4,26803	-2,96792	0,008851122	0,6094901	-2,5071	210172_at	splicing factor 1
206207_at	-5,125477	6,512619	6,51262	-2,96398	0,008924789	0,611475	-2,5144	210215_at	transferrin receptor 2
201927_s_at	-2,352829	6,194341	6,19434	-2,93734	0,009439091	0,620404	-2,5634	210446_at	GATA binding protein 1 (globin transcription factor 1)
1562056_at	-2,226043	5,645349	5,64535	-2,90378	0,010127798	0,6450165	-2,625	210504_at	Kruppel-like factor 1 (erythroid)
217294_s_at	2,9232028	10,42131	10,4213	2,902367	0,010157911	0,6450165	-2,6276	210517_s_at	A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12
241929_at	-2,171144	4,029818	4,02982	-2,8867	0,010496992	0,6485062	-2,6562	210868_s_at	ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3-like, yeast)
227180_at	-2,330833	4,996436	4,99644	-2,85882	0,011127609	0,6658516	-2,7072	210976_s_at	phosphofructokinase, muscle
201839_s_at	-2,089977	4,191086	4,19109	-2,85278	0,011268997	0,6681211	-2,7182	210986_s_at	tropomyosin 1 (alpha)
214627_at	-2,246132	3,919716	3,91972	-2,85236	0,011278935	0,6681211	-2,719	210987_x_at	tropomyosin 1 (alpha)
205798_at	-3,390659	5,389161	5,38916	-2,83738	0,011637443	0,6796152	-2,7463	211192_s_at	CD84 molecule
209116_x_at	-5,705643	7,402989	7,40299	-2,83646	0,011660006	0,6796152	-2,748	211696_x_at	hemoglobin, beta

	logFC	AveExpr	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B	Prob ID	Gene Title
209458_x_at	-3,676267	6,168698	6,1687	-2,78671	0,012933917	0,7015495	-2,8383	211699_x_at	hemoglobin, alpha 1//hemoglobin, alpha 2
217232_x_at	-5,368635	7,695459	7,69546	-2,78599	0,012953427	0,7015898	-2,8396	211734_s_at	Fc fragment of IgE, high affinity I, receptor for; alpha polypeptide
227349_at	-2,103317	5,109406	5,10941	-2,77996	0,013116753	0,7049719	-2,8506	211743_s_at	proteoglycan 2, bone marrow (natural killer cell activator, eosinophil granule major basic protein)
211745_x_at	-3,745296	6,022859	6,02286	-2,76035	0,013662476	0,7134015	-2,886	211745_x_at	hemoglobin, alpha 1
217414_x_at	-3,711494	5,784792	5,78479	-2,75439	0,013832695	0,7148418	-2,8968	211993_at	WNK lysine deficient protein kinase 1
204018_x_at	-3,712684	6,065201	6,0652	-2,75392	0,013846011	0,7148542	-2,8976	212151_at	pre-B-cell leukemia homeobox 1
230388_s_at	2,1740811	5,069925	5,06992	2,753462	0,013859287	0,7148647	-2,8985	212190_at	serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 2
202436_s_at	-4,233414	6,480979	6,48098	-2,74316	0,014158628	0,7163231	-2,9171	212224_at	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1
211993_at	-2,018987	5,466776	5,46678	-2,7232	0,014756672	0,7207325	-2,953	212372_at	myosin, heavy chain 10, non-muscle
211696_x_at	-5,410382	7,899733	7,89973	-2,72101	0,014823705	0,7223584	-2,957	213067_at	myosin, heavy chain 10, non-muscle
206494_s_at	-2,666178	5,649173	5,64917	-2,69533	0,015632546	0,7381452	-3,0031	213241_at	plexin C1
205472_s_at	-2,048149	4,649091	4,64909	-2,67434	0,016324624	0,7475283	-3,0407	213515_x_at	hemoglobin, gamma A//hemoglobin, gamma G
209555_s_at	-3,679208	5,36833	5,36833	-2,61002	0,018633693	0,7668483	-3,1552	214146_s_at	pro-platelet basic protein (chemokine (C-X-C motif) ligand 7)
212372_at	-3,961611	5,521314	5,52131	-2,6091	0,018668949	0,7668483	-3,1569	214295_at	KIAA0485 protein
235811_at	-2,038274	5,737387	5,73739	-2,58639	0,019557817	0,7743111	-3,1971	214414_x_at	hemoglobin, alpha 2
204848_x_at	-4,765572	6,702016	6,70202	-2,57487	0,020024003	0,7824168	-3,2174	214464_at	CDC42 binding protein kinase alpha (DMPK-like)
202437_s_at	-3,649656	5,620525	5,62052	-2,53162	0,021870645	0,8022759	-3,2935	214627_at	eosinophil peroxidase
204419_x_at	-4,735968	6,76214	6,76214	-2,52142	0,022329113	0,8025984	-3,3113	214769_at	chloride channel 4
214414_x_at	-4,612808	6,879458	6,87946	-2,52132	0,022333797	0,8025984	-3,3115	215049_x_at	CD163 molecule
215049_x_at	-2,286836	4,110385	4,11039	-2,5092	0,022890582	0,8056899	-3,3327	215489_x_at	homer homolog 3 (Drosophila)
205033_s_at	-2,584721	4,563808	4,56381	-2,49872	0,023382729	0,8081231	-3,351	215811_at	Clone GLSH-3 similar to gliadin mRNA sequence
1555772_a_at	-2,041447	5,359457	5,35946	-2,48904	0,023846253	0,8112459	-3,3679	216063_at	hemoglobin, beta pseudogene 1
202729_s_at	-2,634444	5,577764	5,57776	-2,46737	0,024915026	0,8161947	-3,4056	216101_at	Full length insert cDNA clone YR67C11
204151_x_at	-2,2668	5,801572	5,80157	-2,43873	0,026397464	0,8314299	-3,4551	216591_s_at	hCG1776980//succinate dehydrogenase complex, subunit C, integral membrane protein, 15kDa
206493_at	-2,376211	7,173957	7,17396	-2,43832	0,026419526	0,8314299	-3,4559	216598_s_at	chemokine (C-C motif) ligand 2
1564494_s_at	2,3042039	6,269762	6,26976	2,432133	0,026750774	0,8358357	-3,4665	217232_x_at	hemoglobin, beta
213515_x_at	-5,001456	6,584596	6,5846	-2,42273	0,027261574	0,841423	-3,4827	217294_s_at	enolase 1, (alpha)

	logFC	AveExpr	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B	Prob ID	Gene Title
205830_at	-2,396319	5,389217	5,38922	-2,42243	0,027278171	0,841423	-3,4833	217414_x_at	hemoglobin, alpha 1///hemoglobin, alpha 2
216591_s_at	2,1514242	5,885222	5,88522	2,40192	0,028425485	0,8544497	-3,5185	217867_x_at	beta-site APP-cleaving enzyme 2
206067_s_at	2,4491085	7,833472	7,83347	2,398957	0,02859492	0,8552666	-3,5236	218332_at	brain expressed, X-linked 1
210868_s_at	-2,047423	5,731254	5,73125	-2,38589	0,029353325	0,8597626	-3,546	219288_at	chromosome 3 open reading frame 14
242520_s_at	2,2174831	6,775349	6,77535	2,383615	0,029487594	0,8607764	-3,5499	219558_at	ATPase type 13A3
204619_s_at	-2,419282	3,984491	3,98449	-2,33189	0,032693859	0,8794115	-3,6379	219672_at	erythroid associated factor
207269_at	-2,432156	4,1278	4,1278	-2,31379	0,033890565	0,8831861	-3,6685	219737_s_at	protocadherin 9
224049_at	2,352076	5,633872	5,63387	2,312608	0,033970064	0,8835934	-3,6705	220295_x_at	DEP domain containing 1///similar to DEP domain containing 1
204749_at	-2,29331	4,061836	4,06184	-2,31134	0,034055434	0,8849719	-3,6726	221024_s_at	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 10
203789_s_at	-2,589506	3,917003	3,917	-2,30997	0,034148579	0,8857085	-3,6749	221731_x_at	versican
210986_s_at	-2,527699	7,351415	7,35141	-2,27751	0,03641341	0,8947613	-3,7295	221765_at	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase
226818_at	-2,447701	5,252267	5,25227	-2,24194	0,039056557	0,911403	-3,7888	222446_s_at	beta-site APP-cleaving enzyme 2
232985_s_at	-3,308908	5,466161	5,46616	-2,23858	0,039315149	0,9127232	-3,7944	222771_s_at	myelin expression factor 2
228766_at	-3,421267	5,59651	5,59651	-2,22871	0,04008383	0,9135991	-3,8108	223044_at	solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), member 1
210987_x_at	-2,131547	6,186161	6,18616	-2,19657	0,042684869	0,9177407	-3,8638	223062_s_at	phosphoserine aminotransferase 1
211743_s_at	-3,479358	7,27504	7,27504	-2,17792	0,044265189	0,9255262	-3,8945	223391_at	sphingosine-1-phosphate phosphatase 1
212190_at	-2,121027	6,677906	6,67791	-2,17065	0,044895718	0,9255262	-3,9064	223754_at	hypothetical protein MGC13057
202949_s_at	-2,355065	5,116116	5,11612	-2,15589	0,046201086	0,9259101	-3,9305	223967_at	angiopoietin-like 6
227530_at	-2,11634	4,236326	4,23633	-2,13903	0,047734578	0,9278775	-3,9579	224049_at	potassium channel, subfamily K, member 17
223967_at	2,0061529	5,784798	5,7848	2,107726	0,050706769	0,9390825	-4,0085	224435_at	chromosome 10 open reading frame 58
228083_at	2,1256705	6,378655	6,37866	2,105994	0,050876117	0,9390825	-4,0112	224458_at	chromosome 9 open reading frame 125
201743_at	-2,517997	4,92309	4,92309	-2,05768	0,055811103	0,9514043	-4,0885	224970_at	nuclear factor I/A
206488_s_at	-2,982064	5,691202	5,6912	-2,05397	0,056208074	0,9514043	-4,0944	224975_at	nuclear factor I/A
226099_at	-2,106592	5,221163	5,22116	-2,03868	0,057868937	0,9514043	-4,1186	225115_at	Homeodomain interacting protein kinase 2
215489_x_at	2,0865005	4,504369	4,50437	2,038672	0,057870113	0,9514043	-4,1186	225619_at	SLAIN motif family, member 1
226282_at	2,8892487	5,65205	5,65205	2,019448	0,060021837	0,9552941	-4,1489	225681_at	collagen triple helix repeat containing 1
231798_at	2,3315077	5,825153	5,82515	1,968282	0,066105917	0,9679542	-4,2288	226003_at	kinesin family member 21A
207341_at	-2,690479	5,438306	5,43831	-1,94431	0,069143022	0,9714396	-4,2658	226099_at	elongation factor, RNA polymerase II, 2
222771_s_at	-2,290613	4,638823	4,63882	-1,94256	0,06936916	0,9728861	-4,2685	226190_at	Homo sapiens, clone IMAGE:4294444, mRNA
223391_at	-2,019175	5,396211	5,39621	-1,90641	0,074200737	0,9818029	-4,3237	226218_at	interleukin 7 receptor

	logFC	AveExpr	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B	Prob ID	Gene Title
215811_at	-2,000489	5,672352	5,67235	-1,8984	0,075311624	0,9820615	-4,3359	226279_at	protease, serine, 23
209392_at	-2,206163	5,458824	5,45882	-1,89796	0,075372198	0,9820615	-4,3365	226282_at	Full length insert cDNA clone ZE03F06
241133_at	3,2357251	7,502448	7,50245	1,888788	0,076662883	0,9835326	-4,3504	226421_at	Alport syndrome, mental retardation, midface hypoplasia and elliptocytosis chromosomal region, gene 1
210517_s_at	-2,944575	5,045383	5,04538	-1,88649	0,076989736	0,9835326	-4,3539	226556_at	Homo sapiens, clone IMAGE:4294444, mRNA
231310_at	2,1467575	6,149517	6,14952	1,883201	0,077458549	0,9846984	-4,3589	226751_at	chromosome 2 open reading frame 32
201669_s_at	-3,195181	5,378197	5,3782	-1,87379	0,0788154	0,9859415	-4,373	226806_s_at	NA
209488_s_at	2,3017728	5,453888	5,45389	1,871068	0,079211854	0,9866659	-4,3771	226818_at	macrophage expressed gene 1
226218_at	-3,001261	6,346564	6,34656	-1,87082	0,079248554	0,9866659	-4,3775	227180_at	ELOVL family member 7, elongation of long chain fatty acids (yeast)
213241_at	-2,120659	7,529452	7,52945	-1,86751	0,079732669	0,9866659	-4,3825	227349_at	NA
210976_s_at	-2,30555	5,424075	5,42407	-1,84149	0,083633843	0,9884955	-4,4213	227530_at	A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12
205653_at	-2,869866	7,501559	7,50156	-1,83736	0,08426843	0,9919465	-4,4275	227654_at	chromosome 20 open reading frame 175
221731_x_at	-2,900262	5,404229	5,40423	-1,81708	0,087447306	0,9992503	-4,4575	228083_at	calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta subunit 4
204620_s_at	-2,828998	5,182064	5,18206	-1,81552	0,087696279	0,9992503	-4,4598	228155_at	chromosome 10 open reading frame 58
208146_s_at	-2,257048	5,087159	5,08716	-1,80831	0,088854252	0,9999153	-4,4704	228188_at	NA
205159_at	-2,447632	8,564616	8,56462	-1,80482	0,08941939	0,9999153	-4,4755	228697_at	histidine triad nucleotide binding protein 3
223062_s_at	-2,890024	6,17192	6,17192	-1,79155	0,091599194	0,9999153	-4,495	228766_at	CD36 molecule (thrombospondin receptor)
207067_s_at	-2,716574	6,601992	6,60199	-1,777	0,094041416	0,9999153	-4,5162	228802_at	RNA binding protein with multiple splicing 2
207655_s_at	-2,340252	4,486632	4,48663	-1,77603	0,094206178	0,9999153	-4,5176	229309_at	adrenergic, beta-1-, receptor
202708_s_at	2,1258706	5,56836	5,56836	1,769192	0,095375112	0,9999153	-4,5275	229638_at	iroquois homeobox 3
218332_at	-3,257368	6,165856	6,16586	-1,75814	0,097292295	0,9999153	-4,5435	230388_s_at	hypothetical protein LOC644246
225619_at	-2,08835	4,832966	4,83297	-1,75461	0,097910405	0,9999153	-4,5486	230690_at	tubulin, beta 1
209487_at	2,3854571	5,825661	5,82566	1,736383	0,101163211	0,9999153	-4,5748	230942_at	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 5
201506_at	-2,391852	4,766301	4,7663	-1,73547	0,101328469	0,9999153	-4,5761	231310_at	Transcribed locus
205780_at	2,0026381	6,286384	6,28638	1,691316	0,109610687	0,9999153	-4,6388	231798_at	Noggin
206283_s_at	-2,366992	7,095878	7,09588	-1,68974	0,1099165	0,9999153	-4,641	232216_at	YME1-like 1 (S. cerevisiae)
201215_at	-2,531494	4,736266	4,73627	-1,66036	0,115760438	0,9999153	-4,682	232985_s_at	developmental pluripotency associated 4
224435_at	-2,49643	6,11178	6,11178	-1,65574	0,116703733	0,9999153	-4,6885	234985_at	low density lipoprotein receptor class A domain containing 3
228155_at	-2,833034	7,47461	7,47461	-1,65333	0,117196416	0,9999153	-4,6918	235476_at	tripartite motif-containing 59

	logFC	AveExpr	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B	Prob ID	Gene Title
206871_at	-3,000532	6,957648	6,95765	-1,64563	0,118789266	0,9999153	-4,7024	235811_at	NA
211734_s_at	-2,108611	7,620252	7,62025	-1,60358	0,127809917	0,9999153	-4,76	236793_at	Transcribed locus
226190_at	-2,2575	6,150744	6,15074	-1,57725	0,133752498	0,9999153	-4,7954	239002_at	asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated (Drosophila)
201690_s_at	-2,339492	6,939996	6,94	-1,57427	0,134438824	0,9999153	-4,7994	239082_at	CDNA clone IMAGE:5311370
223044_at	-3,103879	7,550481	7,55048	-1,54297	0,141833406	0,9999153	-4,841	239219_at	aurora kinase B
226556_at	-2,085358	5,837628	5,83763	-1,52547	0,146115974	0,9999153	-4,864	239451_at	CDNA FLJ26407 fis, clone HRT09288
204561_x_at	2,4204307	5,33374	5,33374	1,514119	0,148951295	0,9999153	-4,8788	239723_at	Transcribed locus
203757_s_at	-2,349313	4,563843	4,56384	-1,50792	0,150518037	0,9999153	-4,8868	239913_at	solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 4
229638_at	2,5737264	5,266942	5,26694	1,507658	0,150585125	0,9999153	-4,8872	240652_at	NA
202718_at	2,1038055	7,778199	7,7782	1,49803	0,153047714	0,9999153	-4,8996	241133_at	CDNA FLJ35984 fis, clone TESTI2014097, highly similar to V_segment translation product
229309_at	2,0636316	4,54142	4,54142	1,489509	0,155255091	0,9999153	-4,9106	241929_at	Transcribed locus
216598_s_at	-2,792674	7,268277	7,26828	-1,4885	0,155517519	0,9999153	-4,9119	242197_x_at	CD36 molecule (thrombospondin receptor)
202917_s_at	-2,825507	8,265388	8,26539	-1,43217	0,170801324	0,9999153	-4,9832	242520_s_at	hypothetical LOC339541
225681_at	2,6095763	5,22494	5,22494	1,417309	0,175034142	0,9999153	-5,0017	242824_at	Transcribed locus

EK-10

	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B	Prob ID	Gene Title
226279_at	-2,3826819	3,35898	-14,466	8,70E-11	3,15E-06	13,193684	1552274_at	PX domain containing serine/threonine kinase
201131_s_at	-3,4732549	3,57376	-13,375	2,88E-10	5,25E-06	12,353898	1552680_a_at	cancer susceptibility candidate 5
205389_s_at	-2,2395626	3,43312	-11,699	2,14E-09	2,92E-05	10,859453	1553107_s_at	chromosome 5 open reading frame 24
224458_at	-3,248215	3,9994	-10,464	1,09E-08	0,000119481	9,5717592	1554690_a_at	transforming, acidic coiled-coil containing protein 1
205391_x_at	-3,1841913	4,08929	-10,072	1,89E-08	0,000147574	9,1260173	1555058_a_at	lysophosphatidylglycerol acyltransferase 1
214295_at	-3,7671942	3,65993	-9,9275	2,32E-08	0,000149778	8,9564245	1555705_a_at	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 3
208353_x_at	-3,765414	4,04114	-9,8859	2,47E-08	0,000149778	8,9071282	1555814_a_at	ras homolog gene family, member A
239913_at	-2,0607649	3,18859	-8,8604	1,14E-07	0,000446018	7,6192176	1556202_at	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2
221765_at	-3,1766076	4,3785	-8,6418	1,61E-07	0,000564616	7,3257296	1556203_a_at	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2
206145_at	-4,8097139	3,96582	-8,3677	2,49E-07	0,000716899	6,9476176	1558080_s_at	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3//hypothetical protein LOC144871
223754_at	-2,7163812	4,15441	-8,1908	3,32E-07	0,000864552	6,6976303	1559391_s_at	Partial mRNA; ID EE2-8E
226003_at	-2,9957301	3,4242	-8,0981	3,87E-07	0,000948814	6,5647639	1559496_at	Pyrophosphatase (inorganic) 2
208352_x_at	-3,252889	4,02079	-8,0461	4,21E-07	0,000948814	6,4897397	1563321_s_at	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 10
219672_at	-4,6312062	4,61629	-8,0356	4,29E-07	0,000948814	6,4744362	1565269_s_at	activating transcription factor 1
202728_s_at	-2,8102949	4,17044	-7,9623	4,84E-07	0,000974518	6,3676818	1568680_s_at	YTH domain containing 2
205390_s_at	-3,8064438	4,03191	-7,8133	6,21E-07	0,001132156	6,1482758	1569385_s_at	KIAA1546
212151_at	-3,4420837	4,15874	-7,606	8,83E-07	0,00139111	5,8371416	201110_s_at	thrombospondin 1
1556202_at	-2,2905245	3,84911	-7,6012	8,91E-07	0,00139111	5,8297706	201131_s_at	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
240159_at	-2,6410276	4,5352	-7,494	1,07E-06	0,001537438	5,666239	201148_s_at	TIMP metalloproteinase inhibitor 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory)
224963_at	-2,7183793	6,72955	-7,459	1,14E-06	0,001537438	5,6123363	201149_s_at	TIMP metalloproteinase inhibitor 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory)
227062_at	-3,7246636	6,15961	-7,4318	1,19E-06	0,001537438	5,5703848	201702_s_at	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 10
222600_s_at	-2,0071357	6,56593	-7,3975	1,27E-06	0,001537438	5,5172891	201728_s_at	KIAA0100
209289_at	-2,3515561	3,36036	-7,3051	1,49E-06	0,001693331	5,373426	201927_s_at	plakophilin 4
230392_at	-2,2238024	4,01096	-7,1826	1,84E-06	0,001955856	5,1805479	201996_s_at	spen homolog, transcriptional regulator (Drosophila)
230690_at	-2,2496784	3,65696	-7,1777	1,86E-06	0,001955856	5,1726954	202062_s_at	sel-1 suppressor of lin-12-like (C. elegans)
1558080_s_at	-3,3126406	4,66858	-7,0823	2,20E-06	0,00223096	5,0206344	202065_s_at	protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin), alpha 1
202619_s_at	-3,2327558	3,78178	-6,8847	3,14E-06	0,003039092	4,7012637	202082_s_at	SEC14-like 1 (S. cerevisiae)

	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B	Prob ID	Gene Title
232216_at	-2,9911642	4,7854	-6,8566	3,30E-06	0,003062457	4,6552324	202323_s_at	acyl-Coenzyme A binding domain containing 3
233819_s_at	-2,3057277	4,23364	-6,8338	3,44E-06	0,003090544	4,6178674	202458_at	protease, serine, 23
1556203_a_at	-2,8778444	4,16264	-6,8332	3,45E-06	0,003090544	4,6168372	202619_s_at	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2
243648_at	-2,9790966	5,22035	-6,8065	3,62E-06	0,003191595	4,57302	202620_s_at	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2
206306_at	-2,168672	3,17765	-6,775	3,83E-06	0,003326547	4,5210443	202728_s_at	latent transforming growth factor beta binding protein 1
205919_at	-2,5212082	3,72347	-6,6432	4,88E-06	0,003912637	4,3022208	203141_s_at	adaptor-related protein complex 3, beta 1 subunit
206390_x_at	-5,5764651	5,21031	-6,622	5,07E-06	0,003912637	4,2666126	203147_s_at	tripartite motif-containing 14
209290_s_at	-2,2571468	3,33448	-6,5951	5,33E-06	0,003946087	4,221567	203496_s_at	mediator complex subunit 1
221745_at	-2,852296	6,9782	-6,5786	5,50E-06	0,003961426	4,1938167	204315_s_at	G-2 and S-phase expressed 1
207496_at	-2,6159828	3,4947	-6,5777	5,51E-06	0,003961426	4,1922371	204324_s_at	golgi integral membrane protein 4
230942_at	-3,2892794	4,59741	-6,5496	5,80E-06	0,004118553	4,1449495	204416_x_at	apolipoprotein C-I
213067_at	-3,7825676	4,11208	-6,5274	6,04E-06	0,004236302	4,1075393	204624_at	ATPase, Cu ⁺⁺ transporting, beta polypeptide
220295_x_at	-4,4477526	5,27091	-6,509	6,25E-06	0,004328694	4,0762862	204860_s_at	NLR family, apoptosis inhibitory protein///neuronal apoptosis inhibitory protein (centromeric)
207087_x_at	-2,896824	4,11518	-6,4412	7,10E-06	0,004789619	3,9612503	204960_at	coronin, actin binding protein, 1B///protein tyrosine phosphatase, receptor type, C-associated protein
225115_at	-2,8906608	5,27601	-6,4187	7,40E-06	0,004924803	3,9227447	204976_s_at	Alport syndrome, mental retardation, midface hypoplasia and elliptocytosis chromosomal region, gene 1
216101_at	-2,612807	4,04594	-6,4133	7,48E-06	0,004924803	3,9135924	205097_at	solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2
213446_s_at	-2,6126756	4,90663	-6,3749	8,03E-06	0,005138375	3,8478058	205262_at	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 2
243683_at	-2,6045569	4,03124	-6,3656	8,18E-06	0,005138375	3,8318362	205268_s_at	adducin 2 (beta)
242197_x_at	-2,9803631	3,69549	-6,3532	8,37E-06	0,005199304	3,81062	205389_s_at	ankyrin 1, erythrocytic
201728_s_at	-2,0955288	4,52553	-6,3153	8,99E-06	0,005387671	3,7453569	205390_s_at	ankyrin 1, erythrocytic
1555705_a_at	2,14203949	7,45137	6,31073	9,07E-06	0,005387671	3,7374351	205391_x_at	ankyrin 1, erythrocytic
201149_s_at	-2,4523551	3,84106	-6,3022	9,21E-06	0,005416213	3,7227114	205767_at	epiregulin
205950_s_at	-4,1696441	4,21383	-6,2764	9,67E-06	0,00547128	3,6780931	205919_at	hemoglobin, epsilon 1
202458_at	-2,3763967	3,63167	-6,2752	9,69E-06	0,00547128	3,6761174	205950_s_at	carbonic anhydrase I
216022_at	-2,2964766	3,99319	-6,2652	9,88E-06	0,00547128	3,6587043	206145_at	Rh-associated glycoprotein
211192_s_at	-2,6900977	4,32503	-6,2618	9,94E-06	0,00547128	3,6528727	206167_s_at	Rho GTPase activating protein 6
234985_at	-3,0067583	4,18235	-6,2585	1,00E-05	0,00547128	3,6470283	206207_at	Charcot-Leyden crystal protein
205268_s_at	-2,6745683	3,69056	-6,2495	1,02E-05	0,005510026	3,6314533	206306_at	ryanodine receptor 3
208499_s_at	-2,3061021	5,29106	-6,2395	1,04E-05	0,00555984	3,6141855	206390_x_at	platelet factor 4 (chemokine (C-X-C motif) ligand 4)

	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B	Prob ID	Gene Title
205767_at	-2,9632849	3,83356	-6,2256	1,06E-05	0,005598583	3,5900331	206871_at	elastase 2, neutrophil
217234_s_at	-3,3020842	5,56042	-6,1491	1,23E-05	0,006294317	3,4565467	207087_x_at	ankyrin 1, erythrocytic
1555058_a_at	-2,2065884	5,05865	-6,118	1,31E-05	0,006497528	3,4019976	207496_at	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 2
1552680_a_at	-2,9825216	4,22283	-6,0246	1,56E-05	0,007435473	3,2372272	207966_s_at	golgi apparatus protein 1
219558_at	-2,9978819	4,71216	-5,9984	1,64E-05	0,007696381	3,1908886	208352_x_at	ankyrin 1, erythrocytic
205097_at	-2,6645935	7,33805	-5,9776	1,71E-05	0,007800685	3,1539416	208353_x_at	ankyrin 1, erythrocytic
213956_at	-2,5041266	4,67564	-5,9459	1,82E-05	0,00802621	3,0975024	208499_s_at	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 3
214807_at	-2,2289142	4,12921	-5,9149	1,93E-05	0,008115317	3,0421057	208621_s_at	villin 2 (ezrin)
224730_at	-2,8881107	6,99729	-5,8696	2,11E-05	0,008500455	2,9609946	208710_s_at	adaptor-related protein complex 3, delta 1 subunit
204960_at	2,17451805	8,36242	5,86872	2,11E-05	0,008500455	2,9594457	208721_s_at	anaphase promoting complex subunit 5
210446_at	-3,2863002	4,7404	-5,7982	2,43E-05	0,009381474	2,8324309	209172_s_at	centromere protein F, 350/400ka (mitosin)
202323_s_at	-2,2221864	6,13003	-5,7748	2,54E-05	0,009577066	2,7902177	209204_at	LIM domain only 4
222816_s_at	-2,6667223	6,34974	-5,7275	2,79E-05	0,010158339	2,7044327	209225_x_at	transportin 1
212148_at	-2,240878	3,31266	-5,684	3,04E-05	0,010639589	2,6253527	209289_at	nuclear factor I/B
239002_at	-3,6274079	4,80647	-5,6736	3,10E-05	0,010721907	2,6064353	209290_s_at	nuclear factor I/B
227223_at	-3,3087392	5,8015	-5,6685	3,13E-05	0,010761743	2,5971566	210036_s_at	potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 2
1554690_a_at	-2,4030807	6,88873	-5,6317	3,37E-05	0,011220302	2,5298815	210172_at	splicing factor 1
203141_s_at	-2,2704756	5,05561	-5,597	3,60E-05	0,01174732	2,4663232	210446_at	GATA binding protein 1 (globin transcription factor 1)
236966_at	-2,8234256	6,07995	-5,5485	3,97E-05	0,012366653	2,3770216	210504_at	Kruppel-like factor 1 (erythroid)
202620_s_at	-3,7488602	3,99611	-5,5119	4,27E-05	0,01299246	2,3095628	210943_s_at	lysosomal trafficking regulator
210036_s_at	-4,1631453	5,32029	-5,4982	4,39E-05	0,013145017	2,2842937	211192_s_at	CD84 molecule
232064_at	-2,0079184	4,28168	-5,4886	4,47E-05	0,013145017	2,266461	211993_at	WNK lysine deficient protein kinase 1
208621_s_at	-2,619797	5,40115	-5,4498	4,83E-05	0,013841112	2,1946334	212002_at	chromosome 1 open reading frame 144
235003_at	-2,3713194	5,20265	-5,4336	4,99E-05	0,014051857	2,1644017	212148_at	pre-B-cell leukemia homeobox 1
1559496_at	-2,2132107	5,55985	-5,4316	5,01E-05	0,014051857	2,1606767	212151_at	pre-B-cell leukemia homeobox 1
236198_at	2,86217383	5,69008	5,41066	5,23E-05	0,014358129	2,1217941	212188_at	potassium channel tetramerisation domain containing 12
232238_at	-2,8651199	4,08467	-5,3806	5,55E-05	0,015022633	2,0658621	212224_at	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A1
229115_at	-2,1707505	5,00688	-5,3562	5,83E-05	0,015581916	2,0201449	212451_at	KIAA0256 gene product
1563321_s_at	-2,5331517	5,8121	-5,3232	6,23E-05	0,01603668	1,9584327	212487_at	G patch domain containing 8
212224_at	-4,3732681	4,22916	-5,3227	6,24E-05	0,01603668	1,9574902	212650_at	EH domain binding protein 1
238444_at	-2,220708	5,44643	-5,3151	6,33E-05	0,016045982	1,943199	212926_at	structural maintenance of chromosomes 5

	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B	Prob ID	Gene Title
204416_x_at	-3,950746	5,06922	-5,3146	6,34E-05	0,016045982	1,9423057	213067_at	myosin, heavy chain 10, non-muscle
239606_at	-2,0872126	4,03468	-5,2997	6,53E-05	0,016307461	1,9144424	213229_at	Dicer1, Dcr-1 homolog (Drosophila)
208721_s_at	-2,6795518	5,32947	-5,2865	6,71E-05	0,016514333	1,8895374	213328_at	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 1
212487_at	-2,6029648	6,60969	-5,2835	6,75E-05	0,016514333	1,8838741	213446_s_at	IQ motif containing GTPase activating protein 1
201148_s_at	-2,3559109	5,17329	-5,2781	6,82E-05	0,016514333	1,8738167	213517_at	poly(rC) binding protein 2
235476_at	-2,5791516	4,5713	-5,2779	6,83E-05	0,016514333	1,8734446	213956_at	centrosomal protein 350kDa
221024_s_at	-2,8904916	3,71215	-5,26	7,08E-05	0,016948436	1,8396709	213998_s_at	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17
244801_at	-2,0921886	4,99203	-5,2586	7,10E-05	0,016948436	1,837029	214295_at	KIAA0485 protein
204976_s_at	-3,134263	6,85777	-5,2467	7,27E-05	0,017283726	1,8147411	214464_at	CDC42 binding protein kinase alpha (DMPK-like)
210504_at	-4,1158604	5,38519	-5,2214	7,65E-05	0,017730807	1,7670281	214769_at	chloride channel 4
1553107_s_at	-2,8116685	5,51083	-5,2024	7,95E-05	0,018295845	1,7310242	214807_at	MRNA; cDNA DKFZp564O0862 (from clone DKFZp564O0862)
216450_x_at	-2,4664129	5,43161	-5,1903	8,15E-05	0,018295845	1,7082324	216022_at	Transcribed locus
210943_s_at	-3,6545574	5,93161	-5,1896	8,16E-05	0,018295845	1,7068025	216101_at	Full length insert cDNA clone YR67C11
217867_x_at	-3,2770601	4,36795	-5,1796	8,33E-05	0,018593575	1,6878915	216450_x_at	heat shock protein 90kDa beta (Grp94), member 1
242824_at	-2,8520055	4,23167	-5,1737	8,43E-05	0,018666233	1,676685	217234_s_at	villin 2 (ezrin)
226751_at	-4,4625319	5,07912	-5,1598	8,67E-05	0,018892585	1,6504892	217813_s_at	spindlin 1
224943_at	-2,2134113	5,68154	-5,1347	9,13E-05	0,01957249	1,602829	217867_x_at	beta-site APP-cleaving enzyme 2
205262_at	-3,0783026	4,59646	-5,1319	9,18E-05	0,01957249	1,5974974	217878_s_at	cell division cycle 27 homolog (S. cerevisiae)
204860_s_at	-2,9908734	6,29479	-5,1313	9,19E-05	0,01957249	1,5962864	219558_at	ATPase type 13A3
204315_s_at	-3,6936962	5,40384	-5,1254	9,30E-05	0,01957249	1,5851485	219672_at	erythroid associated factor
238350_at	-2,1401494	4,00221	-5,1239	9,33E-05	0,01957249	1,5822754	219737_s_at	protocadherin 9
201927_s_at	-4,0261114	6,19434	-5,1233	9,34E-05	0,01957249	1,5811348	219785_s_at	F-box protein 31
229982_at	-2,540688	5,06808	-5,1188	9,43E-05	0,019676174	1,5726456	220295_x_at	DEP domain containing 1///similar to DEP domain containing 1
241569_at	-2,1907352	3,56928	-5,1086	9,63E-05	0,019895896	1,5532147	221024_s_at	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 10
233559_s_at	-2,5025654	5,03345	-5,1054	9,69E-05	0,019895896	1,5471293	221745_at	WD repeat domain 68
223405_at	-2,7037915	4,73913	-5,105	9,70E-05	0,019895896	1,5462769	221765_at	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase
235954_at	-2,0049441	5,21131	-5,0983	9,83E-05	0,019984403	1,5335755	221830_at	RAP2A, member of RAS oncogene family
213998_s_at	-3,2421324	6,6808	-5,0885	0,0001003	0,020242901	1,514921	222366_at	Transcribed locus
229061_s_at	-2,797501	5,01409	-5,0824	0,0001016	0,020242901	1,5033418	222387_s_at	vacuolar protein sorting 35 homolog (S. cerevisiae)
222412_s_at	-2,0557871	7,27627	-5,0602	0,0001063	0,020605496	1,4610249	222406_s_at	proline-rich nuclear receptor coactivator 2

	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B	Prob ID	Gene Title
1552274_at	-3,1385984	6,53982	-5,0459	0,0001094	0,021142143	1,4337415	222412_s_at	signal sequence receptor, gamma (translocon-associated protein gamma)
212002_at	-2,5925781	6,06421	-5,0024	0,0001196	0,022377188	1,3505153	222600_s_at	ubiquitin-activating enzyme E1-like 2
208710_s_at	-2,0152202	9,11834	-4,9963	0,0001211	0,022377188	1,3388632	222816_s_at	zinc finger, CCHC domain containing 2
240652_at	-3,5419957	5,53671	-4,9725	0,0001272	0,023163901	1,2931659	222858_s_at	dual adaptor of phosphotyrosine and 3-phosphoinositides
227976_at	-2,2803937	4,42426	-4,9714	0,0001275	0,023163901	1,2909774	223254_s_at	KIAA1333
221830_at	-2,7456945	6,47431	-4,9687	0,0001282	0,023211805	1,2859527	223405_at	N-acetylneuraminate pyruvate lyase (dihydrodipicolinate synthase)
222387_s_at	-2,4309106	6,30411	-4,9594	0,0001307	0,023363141	1,267954	223754_at	hypothetical protein MGC13057
202065_s_at	-2,0076259	5,04441	-4,9475	0,0001339	0,023456542	1,2451189	224458_at	chromosome 9 open reading frame 125
212926_at	-2,6246875	5,13421	-4,935	0,0001374	0,023850531	1,2210784	224563_at	WAS protein family, member 2
237119_at	-2,4367975	4,0896	-4,9335	0,0001378	0,023850531	1,2182994	224631_at	zinc finger protein 91 homolog (mouse)
204624_at	-2,8903155	5,17337	-4,9238	0,0001406	0,024179597	1,1996116	224730_at	WD repeat domain 68
227741_at	-2,5173501	5,36676	-4,9161	0,0001429	0,024382293	1,1846607	224943_at	BTB (POZ) domain containing 7
213328_at	-2,8285779	5,88981	-4,9152	0,0001431	0,024382293	1,1830461	224963_at	solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2
1568680_s_at	-2,921326	6,4795	-4,9111	0,0001444	0,024513412	1,175132	224970_at	nuclear factor I/A
227454_at	-2,9994676	5,59058	-4,8942	0,0001495	0,024993869	1,1426097	224975_at	nuclear factor I/A
206167_s_at	-2,8899081	3,85364	-4,8869	0,0001518	0,025067252	1,1285136	225115_at	Homeodomain interacting protein kinase 2
239219_at	-2,8774381	4,38029	-4,8831	0,000153	0,025191927	1,1210608	225265_at	RNA binding motif, single stranded interacting protein 1
209172_s_at	-2,3225233	4,10601	-4,8758	0,0001553	0,02519523	1,1069736	225377_at	chromosome 9 open reading frame 86
223254_s_at	-2,064726	4,86315	-4,8714	0,0001567	0,025273296	1,0985551	225931_s_at	ring finger protein 213
224975_at	-2,9724459	3,88647	-4,8535	0,0001626	0,02569027	1,0639466	225937_at	CDNA clone IMAGE:4816860
228252_at	-2,4735832	4,17173	-4,8492	0,000164	0,02569027	1,0557595	226003_at	kinesin family member 21A
212650_at	-2,5131074	4,79424	-4,843	0,0001662	0,025728904	1,043683	226279_at	protease, serine, 23
1555814_a_at	2,18099555	10,0056	4,83909	0,0001675	0,025728904	1,0361395	226421_at	Alport syndrome, mental retardation, midface hypoplasia and elliptocytosis chromosomal region, gene 1
201702_s_at	-2,1020781	4,66082	-4,8369	0,0001683	0,025775533	1,031826	226751_at	chromosome 2 open reading frame 32
222406_s_at	-2,1389661	7,56734	-4,832	0,00017	0,025890747	1,0224369	226806_s_at	NA
204324_s_at	-3,34593	5,26385	-4,8084	0,0001785	0,026741619	0,9767227	227006_at	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14A
217813_s_at	-2,1865426	4,99088	-4,8017	0,000181	0,027030226	0,9637515	227062_at	trophoblast-derived noncoding RNA
202082_s_at	-2,1630945	6,67629	-4,7964	0,000183	0,027194231	0,953382	227223_at	RNA binding motif protein 39
209225_x_at	-2,0472067	8,23398	-4,7851	0,0001873	0,027593608	0,9316262	227454_at	TAO kinase 1
202062_s_at	-2,3302887	5,2425	-4,7803	0,0001892	0,027665964	0,9221846	227654_at	chromosome 20 open reading frame 175

	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B	Prob ID	Gene Title
224631_at	-2,8547051	6,80444	-4,7633	0,000196	0,028298162	0,8893005	227740_at	U2AF homology motif (UHM) kinase 1
207966_s_at	-2,3648633	7,24413	-4,7552	0,0001994	0,028384773	0,8735304	227741_at	protein tyrosine phosphatase-like (proline instead of catalytic arginine), member b
227006_at	-2,0316592	3,88778	-4,7203	0,0002144	0,030208483	0,8055345	227976_at	hypothetical protein LOC644538
230629_s_at	-3,4859371	6,59472	-4,7162	0,0002162	0,030306605	0,7975333	228252_at	PIF1 5'-to-3' DNA helicase homolog (S. cerevisiae)
213517_at	-2,2994549	6,08498	-4,7085	0,0002197	0,030497787	0,782598	228802_at	RNA binding protein with multiple splicing 2
219737_s_at	-2,9942182	3,93569	-4,7053	0,0002212	0,030538771	0,7763452	229061_s_at	solute carrier family 25, member 13 (citrin)
241843_at	-2,2168552	4,01647	-4,693	0,0002269	0,031172351	0,7524248	229115_at	dynein, cytoplasmic 1, heavy chain 1
224970_at	-3,8689102	4,33203	-4,6907	0,000228	0,031199279	0,7479203	229467_at	Poly(rC) binding protein 2
238761_at	-2,2282117	7,06906	-4,6881	0,0002292	0,031199279	0,7429177	229982_at	glutamine and serine rich 1
201996_s_at	-2,3465842	8,18948	-4,6878	0,0002294	0,031199279	0,7422624	230392_at	CDNA FLJ31096 fis, clone IMR321000207
212451_at	-2,2075027	4,66691	-4,6807	0,0002328	0,031582964	0,7285038	230629_s_at	E1A binding protein p40
225937_at	-2,7620858	5,60862	-4,6778	0,0002342	0,031617749	0,7228427	230690_at	tubulin, beta 1
201110_s_at	-5,2581634	4,97396	-4,6729	0,0002366	0,031712307	0,7131447	230942_at	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 5
226421_at	-2,2289494	6,22764	-4,6567	0,0002448	0,032250548	0,6814828	232064_at	CDNA FLJ35001 fis, clone OCBBF2011887
243296_at	-2,2189453	5,38354	-4,6459	0,0002504	0,032825803	0,660442	232216_at	YME1-like 1 (S. cerevisiae)
213229_at	-2,268952	8,50235	-4,6333	0,000257	0,033401664	0,6358943	232238_at	asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated (Drosophila)
214769_at	-2,8518963	3,9357	-4,6264	0,0002608	0,033464189	0,6223586	232405_at	CDNA: FLJ22832 fis, clone KAIA4195
210172_at	-3,2309763	5,54994	-4,6255	0,0002612	0,033464189	0,6206764	233559_s_at	WD repeat and FYVE domain containing 1
219785_s_at	-2,1830013	5,52124	-4,6231	0,0002626	0,033464189	0,6159037	233819_s_at	zinc finger protein 294
236375_at	-2,0659562	4,2771	-4,6224	0,000263	0,033464189	0,6145219	234985_at	low density lipoprotein receptor class A domain containing 3
1569385_s_at	-2,3398958	4,66865	-4,6191	0,0002648	0,033551854	0,6081091	235003_at	U2AF homology motif (UHM) kinase 1
206207_at	-7,8335036	6,51262	-4,6174	0,0002657	0,033551854	0,6047236	235425_at	shugoshin-like 2 (S. pombe)
222858_s_at	-2,2960903	6,78716	-4,6164	0,0002663	0,033551854	0,6028318	235476_at	tripartite motif-containing 59
217878_s_at	-2,7906631	7,32463	-4,6096	0,0002701	0,033711021	0,5894691	235954_at	Transcribed locus, strongly similar to XP_529692.1 hypothetical protein XP_529692 [Pan troglodytes]
225265_at	-2,1621333	6,50248	-4,6086	0,0002707	0,033711021	0,5874686	236198_at	Transcribed locus
232405_at	-2,34253	4,11667	-4,6086	0,0002707	0,033711021	0,5874298	236375_at	Transcribed locus
239167_at	-2,618658	5,83511	-4,5973	0,0002771	0,03416697	0,5653594	236390_at	chromosome 20 open reading frame 94
226806_s_at	-2,9798056	3,78381	-4,5783	0,0002883	0,034956428	0,5282365	236923_x_at	NA
237741_at	-2,2016362	4,34392	-4,5574	0,0003013	0,035610776	0,4871559	236966_at	armadillo repeat containing 8
225377_at	-2,628121	7,16998	-4,5483	0,0003071	0,035952894	0,4692941	237119_at	Transcribed locus

	logFC	AveExpr	t	P.Value	adj.P.Val	B	Prob ID	Gene Title
225931_s_at	2,11302805	6,19895	4,53191	0,0003178	0,036817369	0,4370817	237741_at	Solute carrier family 25, member 36
222366_at	-2,086716	4,7785	-4,5287	0,00032	0,036848012	0,4308598	238350_at	hypothetical protein FLJ25778
239742_at	-2,3128087	5,30278	-4,528	0,0003205	0,036848012	0,4293489	238444_at	zinc finger protein 618
240247_at	-2,6797152	5,5992	-4,5171	0,0003279	0,037426226	0,4079439	238651_at	Transcribed locus
209204_at	-3,1774274	6,00062	-4,5143	0,0003298	0,037488177	0,4024945	238761_at	ELK4, ETS-domain protein (SRF accessory protein 1)
1559391_s_at	-2,9100786	7,07497	-4,5095	0,0003332	0,037591357	0,3929721	239002_at	asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated (Drosophila)
236923_x_at	-2,0563995	5,74704	-4,5024	0,0003381	0,03795898	0,3791278	239167_at	Transcribed locus
227740_at	-2,4684623	6,20787	-4,5005	0,0003395	0,03795898	0,3753759	239219_at	aurora kinase B
224563_at	-2,2359341	7,03969	-4,4872	0,0003491	0,038638549	0,3492271	239451_at	CDNA FLJ26407 fis, clone HRT09288
203147_s_at	-2,5190936	6,93474	-4,4823	0,0003527	0,038805939	0,3395105	239606_at	CDNA FLJ25345 fis, clone TST01118
236390_at	-2,5406995	4,82661	-4,4738	0,0003591	0,039069736	0,3227667	239742_at	Tubby like protein 4
228802_at	-3,0206489	4,25601	-4,4703	0,0003618	0,039091795	0,3158342	239913_at	solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter family), member 4
229467_at	-2,3935744	5,16369	-4,4666	0,0003646	0,039199603	0,3086691	240159_at	solute carrier family 15 (H+/peptide transporter), member 2
235425_at	-3,2736654	6,98158	-4,4662	0,0003649	0,039199603	0,3077202	240247_at	NA
203496_s_at	-2,3002003	5,92385	-4,46	0,0003697	0,039477114	0,2956118	240652_at	NA
214464_at	-4,9011294	5,48995	-4,4517	0,0003762	0,03977102	0,2792417	241569_at	Transcribed locus
211993_at	-3,2362417	5,46678	-4,4492	0,0003782	0,03977102	0,2743896	241843_at	small nucleolar RNA, H/ACA box 28
238651_at	-2,0423525	6,31627	-4,4491	0,0003783	0,03977102	0,274148	242197_x_at	CD36 molecule (thrombospondin receptor)
239451_at	-3,0590215	5,96376	-4,4451	0,0003815	0,039866544	0,266122	242824_at	Transcribed locus
227654_at	-4,0828529	5,0683	-4,4397	0,0003858	0,03999849	0,2555639	243296_at	Pre-B-cell colony enhancing factor 1
1565269_s_at	2,12689675	5,98818	4,43435	0,0003902	0,040254038	0,2450062	243648_at	NA
206871_at	-7,9157167	6,95765	-4,4251	0,0003979	0,040891607	0,226763	243683_at	Mortality factor 4 like 2
212188_at	-3,5097209	5,81267	-4,4178	0,000404	0,041213651	0,2124017	244801_at	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 7

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Buket ALTINOK
Doğum Yeri : Ankara
Doğum Tarihi : 21.09.1980
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
Adres : Kazakistan cad. 28/3 Emek / ANKARA
E-mail : buketaltinok@gmail.com.tr

EĞİTİM:

2002-2004 Yüksek Lisans
Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Pediatrik Moleküler Genetik BD
Tez Çalışması: Pulmoner Embolide ACE Gen Polimorfizmi sıklığı

1998-2002 Lisans
Ankara Üniversitesi
Fen Fakültesi
Biyoloji Bölümü

1994-1997 Lise
Arı Koleji

YAYINLAR

1. Tekeli O, Turaçlı ME, Altinok B, Akar N, Elhan AH. No relation between angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and pseudoexfoliation. Ophthalmic Res. 2008;40(1):32-4. Epub 2006 Nov 27.
2. Oguzulgen K, Ekim N, Erkekol F.Ö, Altinok B, Akar N. Is Tissue-Plasminogen Activator Gene Polymorphism a Risk Factor for Venous Thromboembolism in Every Population?. Journal of Thrombosis and Thrombolysis 19(1), 61–63, 2005.
3. Ekim N., Oguzülgen K., Demir N., Altinok B., Akar N. The role of angiotensin-converting enzyme gene polymorphismin pulmonary thromboembolism. Thromb Haemost 2004; 92:432-3.

PROJELER:

1. Akut Miyeloid Lösemide Beta katenin proteininin düzenlediği genlerin genom ebadında incelenmesi ve olası ilaç hedeflerinin belirlenmesi (Tübitak-109S117)
2. Akut Miyeloid Lösemide Wnt Sinyal Yolağındaki Genlerin DNA Mikroarray Analizi ile Tanımlanması (BAP-08B3330003)
3. PSA değeri 2.5 – 10 ng/dl olan hastalarda serum örneklerinde GSTP-1 ve APC gen lokuslarında hipermetilasyon varlığı araştırılmasının prostat kanseri tespit edilmesindeki ve hastalık seyrinin öngörülmesindeki önemi (Üroloji Derneği)

POSTERLER / SÖZLÜ SUNUMLAR

2003 Altinok, B., Oguzulgen, K., Erkek, F., Ekim, F., Ekim, N., Numanoglu, N., Akar, N. "Doku Plazminojen Aktivatöründeki (t-PA) ALU I/D Polimorfizminin Pulmoner Embolili hastalardaki rolü". 4. Ulusal Tromboz, Hemostaz ve Anjiyoloji Kongresi Edirne & Poster sunumu

2004 Altinok, B., Deda, G., Akar, N. "Doku Plazminojen Aktivatöründeki (t-PA) ALU I/D Polimorfizminin Pediatrik Stroke Olgularındaki rolü". 4. Ulusal Tromboz, Hemostaz ve Anjiyoloji Kongresi Edirne & Poster sunum

2004 Altinok, B., Oguzulgen, K., Öner, F., Numanoglu, N., Ekim, N., Akar, N. "Pulmoner Emboli hastalarında ACE I/D (insersiyon/delesyon) Polimorfizmi ile t-PA I/D Polimorfizmi ve PAI-1 4/5G Polimorfizmi arasındaki ilişki". 5. Ulusal Tromboz, Hemostaz ve Anjiyoloji Kongresi İstanbul & Poster sunumu

2004 Altinok, B., Oner, F., Numanoglu, N., Oguzulgen, K., Ekim, N., Akar, N. "The relationship between Ins/Del (I/D) polymorphism in ACE gene with t-PA I/D and PAI-1 4G/5G polymorphism". Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis, Slovenya. Poster sunumu

2006 Sunguroglu, A., Akay, G.G., Ozkal, P., Varol, N., Akcora, D., Altinok, B., Gokmen, D., Avcı, A., Ergüder, I.B., Devrim, E., Durak, I. "Antiproliferative and apoptotic effects of garlic on chronic myeloid leukemia cell line". *Planta Medicine* 11 volume 72, 2006.

Poster sunumu

2006 Durak, I., Sunguroglu, A., Avcı, A., Devrim, E., Ergüder, I.B., Akay, G.G., Ozkal, P., Varol, N., Akcora, D., Altinok, B., Gokmen, D. "Effects of aqueous garlic extract on oxidant/antioxidant status in 32 D and 32Dp210 cell lines". *Planta Medicine* 11 volume 72, 2006. Poster sunumu

2006 G.Gümüş Akay, P.Özkal, N.Varol, D.Akçora, B.Altınok, İ.Durak, A.Sunguroğlu. "Sarımsağın (*Allium satvum*) BCR-ABL (+) Fare Miyeloid Hücre Serisi Üzerindeki Antiproliferatif Ve Apoptotik Etkisi" Tıbbi Biyoloji Kongresi, Manisa

Poster sunumu

2007 Ozkan T, Karadag A, Altınok B, Doganay B, Aydos S, Avcı A, Sunguroglu A. "Wheatgrass extract induces apoptotic cell injury of K562 leukemia cell line". The XI International Congress "Phytopharm 2007" Leiden, The Netherlands. Poster sunumu

2007 Karadag A, Ozkan T, Altınok B, Aydos S, Sunguroglu A (2007) "Antiproliferative and apoptotic effects of wheatgrass extracts on chronic myeloid leukemia (CML) cell line". *Planta Med* 2007; 73. 55th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research. Graz, Austria. Poster sunumu

2008 Altınok 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". *Planta Med* August 2008;74;77. 7th Joint Meeting of GA, AFERP, ASP, PSI & SIF, Athens, Greece, August 3-8. Poster sunumu

2008 Avcı, A., Gurleyik, E., Ozkan, T., Altınok, B., Karadag, A., Aydos, S., Sunguroglu, A. "Effect of wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) on oxidant/antioxidant status in Baf3p210 and T315I cell lines". *Planta Med* August 2008; 74;117. 7th Joint Meeting of GA, AFERP, ASP, PSI & SIF, Athens, Greece, August 3-8. Poster sunumu

2008 Ozkan, T., Altinok, B., Karadag, A., Gurleyik, E., Aydos, S., Avci, A., Biyikli, Z., Sunguroglu, A. "Antiproliferative and apoptotic effect of wheatgrass (*Triticum aestivum* L.) extract on chronic myeloid leukemia cell lines with Imatinib-resistant". XX. International Congress of Genetics, July 12-17, 2008, Berlin, Germany. Poster sunumu

2009 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,;61:3:376. Poster sunumu

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. Poster sunumu

2009 Aydos S, Altinok B, Ozkan T, Yukselen I, Caliskan E, Gokce I, Oztuna D, Baltaci 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. Poster sunumu

2010 Ozkan T, Karadag A, Altinok B, Karabay AZ, Koc A, Bozkurt S, Aydos S, Sunguroglu A. "NF-kappaB activation and complex control of NOS2 gene promoter in K562 imatinib mesylate resistant CML cell line". FEBS JOURNAL Vol: 277 Pages: 147-Supplement: Suppl. 1 Published: JUN 2010. 35th Congress of the Federation-of-European-Biochemical-Societies Gothenburg, SWEDEN, JUN 26-JUL 01, 2010. Poster sunumu

2010 Karabay AZ, Ozkan T, Koc A, Karadag A, Altinok B, Buyukbingol Z, Sunguroglu A. Effect of wnt3a or lithium chloride preconditioning on nitric oxide production in RAW264.7 macrophages and K562 leukemic cell line. Source: FEBS JOURNAL Vol: 277 Pages: 147-148 Supplement: Suppl. 1Published: JUN 2010. 35th Congress of the Federation-ofmEuropean-Biochemical-Societies Gothenburg, SWEDEN, JUN 26-JUL 01, 2010. Poster sunumu