

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ

**KRONİK MİYELOİD LÖSEMİLİ HASTALARDA DAP KİNAZ GENİNİN
METİLASYON ANALİZLERİ**

Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU

Biyolog Selcen ÇELİK

ANKARA
2007

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	2
2.1. <i>DAP Kinaz (DAPK1) Geni.....</i>	2
2.1.1. <i>DAP Kinaz'ın Aktin Hücre İskeleti Regülasyonunda İşlevi.....</i>	4
2.1.2. <i>DAP Kinaz'ın Hücre Ölümündeki İşlevi.....</i>	5
2.1.3. <i>DAP Kinaz'ın Anoiikisin İndüklenmesinde İşlevi.....</i>	7
2.2. Kronik Myeloid Lösemi.....	9
2.2.1. KML'de İmatinib Tedavisi ve İmatinib Direnci.....	10
2.2.2. İmatinib'e Karşı Gelişen Direnç Mekanizmaları.....	11
2.2.2.1. BCR-ABL'de ABL geninin tirozin kinaz domainindeki nokta mutasyonları.....	11
2.2.2.2. BCR-ABL geninin amplifikasyonuna bağlı BCR-ABL proteininin artmış ekspresyonu.....	11
2.2.2.3. Farmakolojik Mekanizmalar.....	11
2.2.2.4. İmatinib direncinde BCR-ABL bağımsız sitogenetik değişiklikler.....	11
2.2.3. BCR-ABL sinyal yollarının hedeflenmesi.....	11
2.3. Epigenetik mekanizmalar.....	11
2.3.1. Histon Modifikasyonları.....	12
2.3.2. RNA aracılı gen susturulması.....	13
2.3.3. DNA Metilasyonu.....	13
2.3.3.1. CpG Adacıkları.....	14
2.3.3.2. Kanserde Metilasyon Profili.....	15
2.3.3.3. DNA metilasyonu aracılığıyla transkripsiyonun baskılanma mekanizmaları.....	15
2.3.3.4. DNA metilasyonunun kanser gelişiminde etkilediği mekanizmalar.....	16
2.4. Kanserde, <i>DAP Kinaz</i> Geninin Hipermetilasyon İle Susturulması.....	17
3. MATERYAL ve METOT.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.1.1. Örnekler.....	20
3.1.2. Gerekli Materyaller.....	20
3.1.3. Alet ve Gereçler.....	20
3.1.4. Kimyasallar.....	20
3.2. Metot.....	22
3.2.1. DNA İzolasyonu.....	22
3.2.2. DNA Modifikasyonu.....	22
3.2.2.1. Ajanların Hazırlanma Aşamaları.....	23
3.2.2.2. DNA Modifikasyon Aşamaları.....	23
3.2.2.3. Tuzdan Uzaklaştırma Aşamaları.....	24
3.2.2.4. DNA Modifikasyonunun Tamamlanması, İkinci Tuzdan Arındırma ve Yıkama Aşamaları.....	24
3.2.3. Metilasyon Spesifik PCR.....	25
3.2.4. Agaroz Jel Elektrofrezisi.....	26
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	27
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	30
KAYNAKLAR.....	33

Kronik Miyeloid Lösemili Hastalarda *DAP Kinaz (DAPK1)* Geninin Metilasyon Analizleri

ÖZET

Kanser; tümör baskılayıcı genler, onkogenler, DNA tamir ve apoptoz genlerinin işlevini kazanmasına/yitirmesine neden olan çok farklı genetik ve epigenetik mekanizmalar sonucu ortaya çıkmaktadır. Proapoptotik bir gen olan *DAP* (Death Associated Protein Kinase-Ölüm Aracılı Protein Kinaz) *Kinaz* geni; çok çeşitli içsel ve dışsal apoptotik uyarılara karşı hücreyi apoptoza götürmektedir. *DAP kinaz* geninde meydana gelecek değişiklikler hücrenin apoptoza gitmeyerek, kontrolsüz çoğalmasına ve kanser oluşumuna neden olmaktadır. Bu nedenle *DAP kinaz* geni tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanmaktadır.

Kanser oluşumunda genetik mekanizmalar kadar öneme sahip olan epigenetik mekanizmalardan DNA metilasyonu genellikle genlerin sessizleştirilerek, ifade edilmesini engelleyebilmektedir. *DAPK1* geninin bu metilasyon mekanizmasıyla susturulması birçok solid tümörde ve hematopoetik malignansilerde gözlenmektedir.

Çalışmada 35 KML (12 Glivec dirençli KML ve 23 KML) ve 25 sağlıklı kontrol örneğinin *DAPK1* metilasyon durumu Metilasyon Spesifik PCR (MSP) ile analiz edilmiştir. 12 dirençli KML örneğinin 4'ünde hipermetilasyon saptanmıştır ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir. Buna karşın dirençli olmayan KML örneklerinin hepsi ve tüm kontrol grubu örneklerinde metilasyon gözlenmemiştir.

Bu çalışmada tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanan *DAPK1*'in hipermetilasyonu ile KML oluşumu arasında direk bir ilişki saptanmazken hastalığın seyri ve ilaca direnci açısından anlamlı bir ilişkinin varlığı belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler; Apoptoz, DAP Kinaz geni (DAPK1), DNA Metilasyonu, Kronik Miyeloid Lösemi, Metilasyon Spesifik PCR

The Methylation Analysis of *DAP Kinase (DAPK1)* Gene in Chronic Myeloid Leukemia Patients

ABSTRACT

Cancer occurs as a result of various genetic and epigenetic mechanisms which cause loss/gain of functions of tumour suppressor genes, oncogenes, DNA repair and apoptosis genes. *DAP kinase* gene, which is an proapoptotic gene, induces the cell to apoptosis response to several internal and external apoptotic stimulants. Changes occurring in *DAP kinase* gene cause uncontrolled proliferation instead of going to apoptosis of the cell and cause development. Therefore *DAP Kinase* gene is described as a tumor suppressor gene.

DNA methylation, one of epigenetic mechanisms that have as much importance as genetic mechanisms in cancer formation can prevent gene expression by silencing. Silencing of *DAP kinase* through this methylation mechanism can be observed in many solid tumour and hematopoietic malignancies.

In this study methylation of DNAs of 35 patients with chronic myeloid leukaemia and DNAs of 25 healthy patients were analysed by Methylation Specific PCR (MSP). As a result, it has been determined that 4 of 12 CML patients with drug resistance have hypermethylation and statistically the significant difference is established. However all of the CML patients with no drug resistance and all of the control sample groups DNAs don't have methylation.

In this study although no correlation is found between hypermethylation of DAPK1 which is defined as a tumour suppressor gene and formation of CML, significant relation between hypermethylation of DAPK1 and progress of CML and drug resistance is determined.

Key Words: Apoptosis, DAP Kinase Gene (DAPK1), DNA Methylation, Chronic Myeloid Leukaemia, Methylation Specific PCR

TEŞEKKÜR

Akademik kariyerimin başlangıcı olan yüksek lisans eğitimimde, başından beri deneyimi ve ilgisıyla bana yol gösteren sayın danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Asuman SUNGURUĞLU (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi)'na, desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. O. Sena Aydos (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi) ve Sayın Arş. Gör. Dr. Bio. Gvem Gümüş Akay' a (Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi), tez çalışmamın her aşamasında büyük fedakrlıklarla emek vererek bana yardımcı olan çalışma arkadaşlarım Sayın Uzm. Bio. Tülin ÖZKAN ve Sayın Bio. Nuray VAROL' a, sevgili arkadaşım Sayın Bio. Dilara AKÇORA' ya, tüm Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı (Ankara Üniversitesi-Tıp Fakültesi) ekibine, tüm eğitim hayatım boyunca hiçbir fedakrlıktan kaçınmayan ve bana olan güvenlerini daima hissettiğim canım aileme ve tüm arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALL	Akut Lenfoid Lösemi
AML	Akut Miyeloid Lösemi
APAF- 1	Apoptoz Proteaz Aktive Edici Faktör 1
ATP	Adenozin Trifosfat
<i>BRCA1</i>	Meme Kanseri 1 Geni
Ca ⁺²	Kalsiyum
CaM	Kalmodulin
<i>c-Myc</i>	Hücrel Miyelositomatozis Onkogeni
CpG	Sitozin- Guanin Dinükleotit Adaları
<i>DAPK1</i>	Ölüm Aracılı Protein Kinaz
dATP	2'-Deoksiadenozin 5'-Trifosfat
dCTP	2'-Deoksisitidin 5'-Trifosfat
dGTP	2'-Deoksiguanin 5'-Trifosfat
DISC	Ölüm Artırıcı Sinyal Kompleksi
DNMTs	DNA Metil Transferaz Enzimleri
dNTP	Deoksi Ribonükleotit Trifosfat
dTTP	2'-Deoksitimidin 5'-Trifosfat
E2F	Transkripsiyon Faktör (Elongation Factor II)
ECM	Hücreler Arası Madde
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
ERK	Elk ilişkili Protein Kinaz
EtBr	Etidyum Bromür
EtOH	Etil Alkol
FADD	Fas ile İlişkili Ölüm Bölgesi
Fas	TNF Resetör Ailesinden bir Ölüm Reseptörü (TNF Receptor Superfamily, member 6)
FL	Folüküler Lenfoma
<i>hMLH1</i>	İnsan Yanlış Eşleşme Onarım Geni 1 (Human mismatch repair -1)
IFN- γ	İnterferon Gama
kD	Kilodalton
KLL	Kronik Lenfoid Lösemi
KML	Kronik Miyeloid Lösemi
LMS	Leiomyosarkoma
Lys42	Lizin 42
M	Molar
MAPK	Mitojen aktive edici protein kinaz
5-MeC	5-Metil Sitozin
MeC	Metil Sitozin
MeCP2	Metil CpG Bağlanma Proteini 2
MDM2	Murine double minute 2
MDS	Miyelodisplastik Sendrom
<i>MGMT</i>	O- 6- Metilguanin- DNA Metiltransferaz Geni
mL	Mililitre
MLC	Miyozin Hafif Zincir
mM	Milimolar
MORT1	Toksisiteyi Teşvik Eden Reseptör Aracısı
MSP	Metilasyon Spesifik PCR
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
NK	Doğal Öldürücü Hücreler
NPC	Nazofaringal Karsinom
NSCLC	Küçük Hücreli Olmayan Akciğer Kanseri (Non-Small Cell Lung Cancer)
pmol	Pikomol
SCLC	Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (Small Cell Lung Cancer)
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
Ser	Serin
SMAD	Serin/Treonin Kinaz Reseptörlerine “downstream” etki eden sinyal molekülleri
STE	Sodyum Tris EDTA

TE	Tris EDTA
TGF- β	Transforme Edici Büyüme faktörü β (Transforming Growth Factor- β)
TNF- α	Tümör Nekrozis Faktör α (Tumour Necrosis Factor α)
Thr	Treonin
UTR	Translasyona Uğramayan Bölge (Untranslated Region)
μ L	Mikrolitre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. DAP kinaz protein ailesi üyeleri.....	2
Şekil 2. 2. DAP kinaz sinyal kaskadı.....	3
Şekil 2. 3. DAP Kinaz protein yapısı.....	3
Şekil 2. 4. DAP Kinaz proteinin fosforilasyonu.....	4
Şekil 2. 5. <i>DAP Kinaz</i> 'ın MLC fosforilasyonu yoluyla apoptozis.....	5
Şekil 2. 6. Ekstrinsik ve İntrensik apoptoz yolakları.....	6
Şekil 2. 7. Tümör baskılanmasında DAPK proteinlerinin etkili olduğu moleküler mekanizmalar.....	7
Şekil.2. 8. Ph kromozomunun oluşumu.....	9
Şekil 2. 9. BCR-ABL füzyon geninin etkili olduğu yolaklar.....	10
Şekil 2. 10. Epigenetik mekanizmalar.....	12
Şekil 2. 11. Sitozin metilasyonu, demetilasyonu, sitozin ve 5-metilsitozin mutagenezi için biyokimyasal yolağın şematik gösterimi.....	14
Şekil 2. 12. Kanserde metilasyon görünümü.....	15
Şekil 2. 13. Sitozin metilasyonu aracılığıyla transkripsiyonel susturulma mekanizmaları.....	16
Şekil 2. 14. Onkogeneizde, sitozin metilasyonunun neden olduğu mekanizmalar.....	17
Şekil 3. 1. Sodyum bisülfitle DNA muamelesi.....	23
Şekil 4. 1. Kontrol ve KML hasta DNA'larının MSP sonucu hipermetilasyon durumlarının jel gösterimi.....	28
Şekil 4. 2. Kontrol ve KML hasta grubunun <i>DAPK1</i> promotor hipermetilasyon durumlarının dağılımı.....	28

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1. Hematopoetik malignansilerde sıklıkla metile olan genler.....	10
Çizelge 2. 2. İnsan kanserlerinde <i>DAP Kinaz</i>	18
Çizelge 3. 1. DNA Modifikasyon KİT İçeriği.....	20
Çizelge 3. 2. DNA Amplifikasyon KİT İçeriği.....	21
Çizelge 3. 3. DNA Amplifikasyon KİT'i kullanılarak yapılan PCR içeriği.....	25
Çizelge 3. 4. KİT kullanılmadan yapılan PCR içeriği.....	25
Çizelge 3. 5. <i>DAP Kinaz</i> promotörü primer dizisi.....	25
Çizelge 3. 6. Kontrol DNA'lardan beklenen ürünlerin büyüklükleri.....	26
Çizelge 4. 1. Hasta ve kontrol gruplarında <i>DAPK1</i> promotör hipermetilasyon durumları.....	27
Çizelge 4. 2. <i>DAPK1</i> hipermetilasyonu olan İmatinib dirençli hastalarda mutasyonların dağılımı.....	27
Çizelge 4. 3. İlaça dirençli olan ve olmayan hastaların <i>DAPK1</i> hipermetilasyon dağılımları.....	29

1. GİRİŞ

Günümüzde; birçok mutasyonun somatik hücrelerde birikmesiyle oluşan kanserin, genetik ve epigenetik değişiklikleri kapsayan çok aşamalı bir süreç etkisiyle ortaya çıktığı bilinmektedir. Çeşitli mutasyonlar sonucu proto-onkogenlerin aktive edilmesi, tümör baskılayıcı genlerin ise inaktive edilmesiyle kanser genlerinin ifade edilme özellikleri değişikliğe uğrarken, DNA ve histon metilasyonu, histon deasetilasyonu ve fosforilasyonu gibi epigenetik mekanizmalarla da bu ekspresyonlar değişikliğe uğrayabilmektedir (Melki ve Clark 2002).

DNA metilasyonu, omurgalılarda transkripsiyonun kontrolünde kromatin yapısı ile ilişkili bir mekanizmadır. Omurgalı DNA'sında bulunan sitozin birimleri, 5. karbon atomuna metil gruplarının takılmasıyla modifiye edilebilir. DNA, özgül olarak guaninlerden önce yer alan sitozinlerden (CpG dinükleotitler) metillenir. Bu metillenme genellikle, promotörlerin çevresinde yüksek sıklıkta CpG dinükleotidi içeren genlerin transkripsiyonel aktivitelerinin azaltılması ile ilişkilidir. Metillenme, hem bazı transkripsiyonel aktivatörlerin bağlanmasını engelleyerek, hem de metillenmiş DNA'ya özgül olarak bağlanan represörlerin katılımını sağlayarak, genin ekspresyonunu engeller (Cooper vd 2006).

Hücreyi apoptoza götüren genlerden biri olan *DAPK1* geni (Death-Associated Protein Kinase) 1990'lı yıllarda keşfedilmiştir. *DAPK1* gen ürünü olan DAPK proteini 160 kDa'lık bir protein olup, apoptozun pozitif düzenleyicisi olarak işlev görür (Esteller ve Herman 2002, Bialik ve Kimchi 2004, Inbal vd 2002). *DAPK1*, apoptotik ve otofajik hücre ölümü ile tümör ve metastazın baskılanmasını sağlayan yeni bir protein ailesinin üyesidir (Gozuacik ve Kimchi 2006).

DAPK1 promotor bölgesinin hipermetilasyonunun apoptotik hücre ölümüne direnç gelişimine neden olabileceği gösterilmiştir. (Nakatsuka vd 2003). *DAPK1* promotor hipermetilasyonu; NSCLC (Non-Small Cell Lung Cancer) (%25- 44), baş-boyun kanseri (%18- 33), mide karsinomu (%34) ve servikal kanserleri içeren birçok solid tümörde ve özellikle lösemi ve lenfoma gibi hematolojik malignansilerde rapor edilmektedir (Tang vd 2000, Ng. 2002).

Kronik Miyeloid Lösemi (KML), *BCR* ve *ABL* genleri arasında t(9;22)(q34;q14) translokasyonu sonucu oluşan *BCR-ABL* füzyon geni ile karakterize edilmektedir. *BCR-ABL* geni, artmış Tirozin Kinaz aktivitesine sahiptir ve hücrenin kontrolsüz bölünmesine neden olmaktadır. Bu nedenle son yıllarda Tirozin Kinaz inhibitörleri (Örn; Gleevec) tedavide etkin olarak kullanılmaktadır.

Solid tümörlerin yanı sıra hematopoetik malignansilerde de metilasyonu kanser oluşumuna neden olabilen *DAPK1*, çeşitli kanser tiplerinde rolü olduğu bildirilmektedir. *BCR-ABL* füzyon geni ile karakterize olan Kronik Miyeloid Lösemi (KML)'de artan Tirozin Kinaz aktivitesinin inhibe edilmesi için çeşitli inhibitörler kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında *DAPK1* hipermetilasyonu ile KML oluşumu ve Imatinib (Gleevec, bir tirozin kinaz inhibitörü)'e direnç mutasyonu saptanan hastalar kullanılarak tedaviye direnç gelişimi arasındaki ilişkinin araştırılması planlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

Kanser, genomda kontrolsüz hücre büyümesi, invazyon ve metastaz yeteneğine yol açan dinamik değişiklikleri içeren kalıtsal bir hastalıktır. Kansere sebep olan genler; hücre döngüsü kontrol genleri, hücre ölüm genleri, DNA tamir genleri, yaşlanma, ölümsüzlük, anjiogenez ve metastaz genleridir (Zingde 2001). Kanserlerin çoğu; karsinomlar, sarkomlar ve lösemi/lenfomalar olarak 3 ana grupta toplanabilir. İnsan kanserlerinin yaklaşık %7'sini oluşturan lösemi ve lenfomalar sırasıyla kan ve bağışıklık sistem hücrelerinden gelişir (Cooper vd 2006).

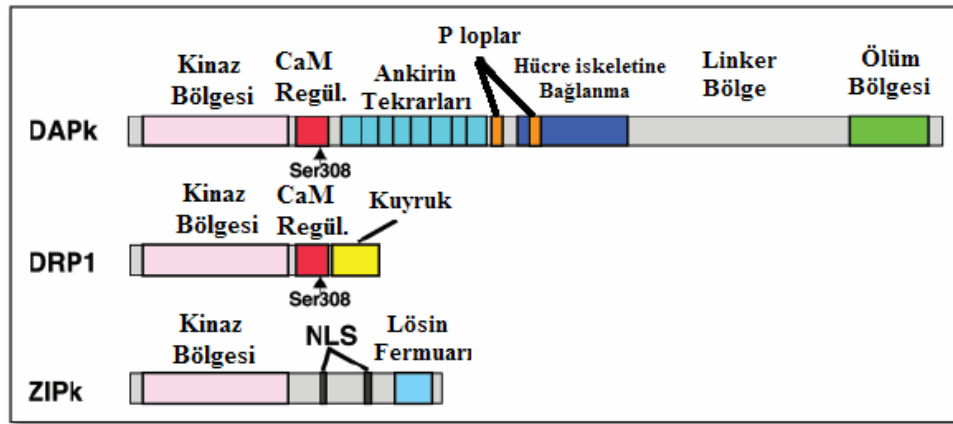
Genetik değişiklikler, nokta mutasyonları, gen delesyonları ve yeniden düzenlenmeler ile ortaya çıkar. Epigenetik değişiklikler ise DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmaksızın gen ifadesinde meydana gelen kalıtsal değişikliklerdir. Epigenetik değişikliklerde DNA'nın kendisi mutasyona uğramaz, ancak işlevi değişir (Melki ve Clark 2002).

2.1. DAPK1 (Death-Associated Protein Kinase) Geni ve DAPK1 Proteini

DAPK1 geni 9q34.1'de lokalizedir. 210 kb olan **DAPK1** geni, apoptoz işlevi ile kanser oluşumunu engelleyerek tümör baskılayıcı bir görev yapar. **DAPK1** geninin ürünü olan DAPK1 proteini, DAP kinaz protein ailesi üyesidir. 160 kDa olan DAPK1, apoptozun pozitif düzenleyicisidir (Bialik ve Kimchi 2004).

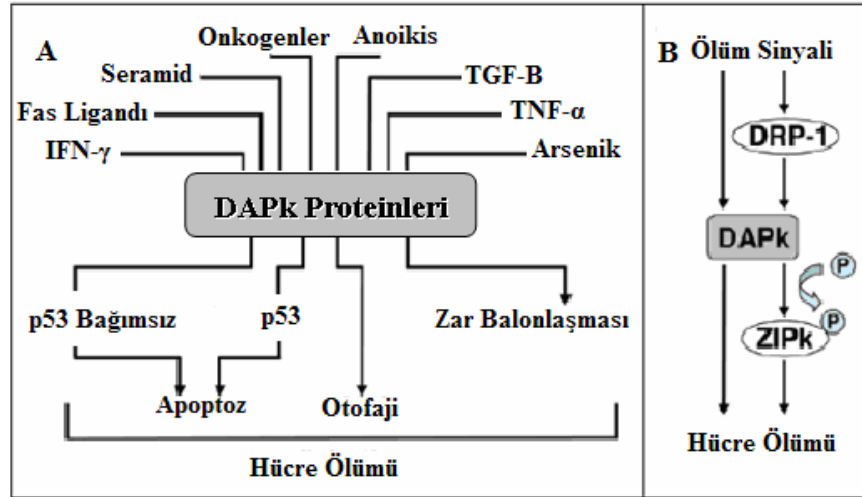
DAP kinaz protein ailesi; DAPK1 ile birlikte ZIPK ve DRP-1 olmak üzere, hücrede birbirleriyle ilişkili olan 3 serin-treonin kinazı içerir (Gozuacik ve Kimchi 2006). Bu aile üyeleri amino uçlarında birbirleriyle benzerlik gösterirken, karboksi uçlarında farklı özel bölgeler içerirler. (Kögel vd 2001). Hücreleri ölüme indükleyen bu kinazların katalitik bölgeleri %80 homoloji gösterir. Ekstrakatalitik bölgelerinin birbirinden farklı oluşu ise bu aile üyelerinin işlevsel farkını ortaya koyar (Şekil 2.1.) (Gozuacik ve Kimchi 2006).

DRP-1 proteini, hücre ölüm yolağında DAP kinaza "upstream" de etkilidir. DAPk, ekstrakatalitik bölgeden ZIPk'ı fosforile ederek, ZIPk'ın sitoplazmik tutulumunu sağlar ve böylece ZIPk'ın ölüme sebep olma kapasitesini artırır (Şekil 2.2B). DAPk ve ZIPk, kendi katalitik bölgeleri yoluyla birbirleriyle interaksiyona girerler (Gozuacik ve Kimchi 2006).



Şekil 2. 1. DAP kinaz protein ailesi üyeleri (Gozuacik ve Kimchi 2006)

DAPk protein ailesi; TNF- α , Fas ligandı, Seramid, Onkogenler, TGF- β , arsenik trioksit ve ECM'den ayrılma gibi intrinsik ve ekstrinsik çeşitli apoptotik uyarıcıların indüklediği apoptotik hücre ölümünde etkilidir (Şekil 2.2A) (Gozuacik ve Kimchi 2006). DAPk ailesi üyelerinin overekspresyonu; zar balonlaşması, nükleer kondensasyon ve hücre büzülmesi gibi hücre ölümünün morfolojik karakterlerinin oluşumuna neden olur (Kögel vd 2001).

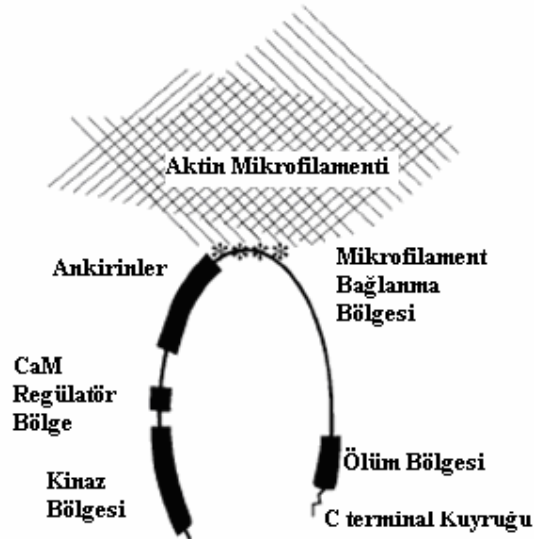


Şekil 2. 2. DAP kinaz sinyal kaskadı. A. DAP kinaz ailesinin aktivasyonuna neden olan upstream sinyaller. B. DAP kinaz proteinleri arasındaki ilişki (Gozuacik ve Kimchi 2006)

DAPK1 proteini; Kinaz Bölgesi, CaM regülâtör bölgesi, Ankirin tekrarları, P loplara, Mikrofilament bağlanma bölgesi ve Ölüm Bölgesi içeren çoklu bölge yapısına sahiptir (Şekil 2. 3.) (Raveh ve Kimchi 2001).

CaM bağlanma bölgesine, Ca^{+2} ile aktive edilen Kalmodulin bağlanır. Bu bağlanma; protein yapısında yeniden düzenlenme ve biçimsel değişikliğe yol açar (Bialik ve Kimchi 2004).

DAPK1 proteini, Ser³⁰⁸'de otofosforilasyona uğrar. Bu fosforilasyon, proteinin kalmoduline olan afinitesini azaltır ve böylece DAPK1' in katalitik aktivitesinin etkisini zayıflatır. DAPK1 aktivitesinin bu otofosforilasyon ile negatif regülasyonu, DAPK1 protein ailesi kinazların en belirgin özelliğidir (Chen vd 2006). DAPK1'in bilinmeyen bir fosfataz yoluyla gerçekleştirilen defosforilasyonla aktive edildiği bildirilmektedir (Shang vd 2005).



Şekil 2. 3. DAP Kinaz Protein Yapısı (Raveh ve Kimchi 2001)

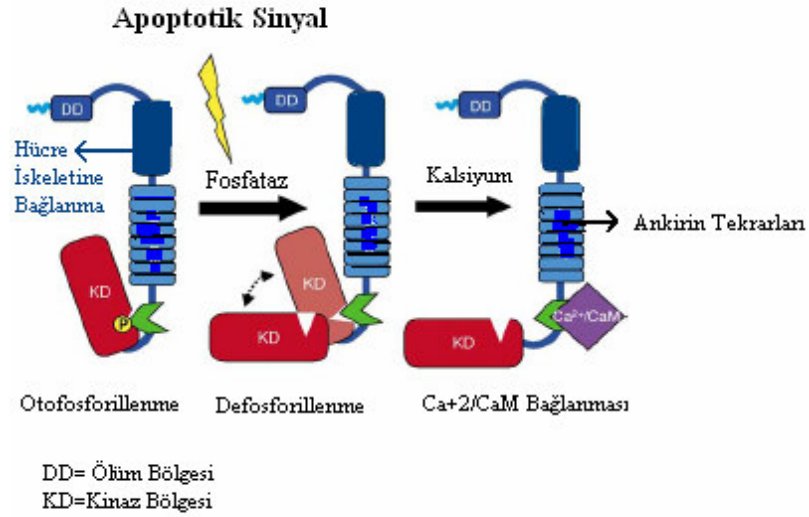
DAPK1 proteininin N terminalinde bulunan katalitik bölge; Ser/Thr kinazların 11 tipik alt bölgesini içerir. Katalitik bölge; birçok proteinde yaygın bir yapısal özellik olan, büyük helikal C-terminal bölgesi ve β -tabakalarda düzenlenmiş N terminal bölgesini içeren iki loblu bir konformasyona sahiptir. β -tabakalardan

oluşan ATP bağlanma bölgesi bu iki lob arasında bulunmaktadır. Bu yapı; ATP bağlanmasında kritik aminoasitlerden biri olan Lys42' yi içine alan diğer kinazlarla yüksek oranda benzerlik gösterir. Gerçekten Lys42' den Alanin' e (K42A) dönüşümle sonuçlanan mutasyonla, *DAPK1* katalitik aktivitesini kaybeder (Bialik ve Kimchi 2004).

DAPK1 yapısında bulunan ankirin tekrarları; aktin fiberlerine kinazın uygun lokalizasyonu için gereklidir (Bialik ve Kimchi 2004). Ankirin tekrarları, protein veri tabanlarında en sıklıkla görülen amino asit motiflerinden biridir. Ankirin tekrarları; hücre-hücre sinyalizasyonu, hücre iskeletiyle bütünlük sağlama, transkripsiyon ve hücre döngüsünün düzenlenmesi, inflamatuvar cevap, gelişim ve çeşitli taşınma işlevleri olan farklı birçok proteinde bulunmuştur. Ankirin tekrarlarının enzimatik aktivitesi yoktur ve genel olarak özgül protein- protein ilişkisine aracılık ederler (Mosavi vd 2004).

DAPK1 protein yapısında bulunan birinci P "loop"u; 639- 646 pozisyonunda, 8 ankirin tekrar serisi içeren N terminalde bulunur. İkinci P "loop"u ise; 695- 702 pozisyonunda yer alarak, aktin hücre iskeletine doğrudan kinaz aktivitesi içerir. Proteinin C terminalinde yer alan ölüm bölgesi ise ölüm reseptörleri ve onların adaptör proteinlerini içerir (Bialik ve Kimchi 2004).

DAPK1, kendini fosforiller ve Ca^{+2} / CaM bağlanma bölgesi yoluyla düzenlenen süreçte ekzojen substrat yapısını oluşturur (Katzenellenbogen vd 1999). *DAPK1* proteininde Ser³⁰⁸,de gerçekleşen otofosforilasyon negatif olarak aktiviteyi düzenler. (Bialik ve Kimchi 2004) (Şekil 2. 4.). Ayrıca *DAPK1*'in katalitik aktivitesi, ERK yoluyla Ser⁷³⁵'den gerçekleştirilecek fosforilasyonla da upregüle edilebilir (Chen vd 2006).

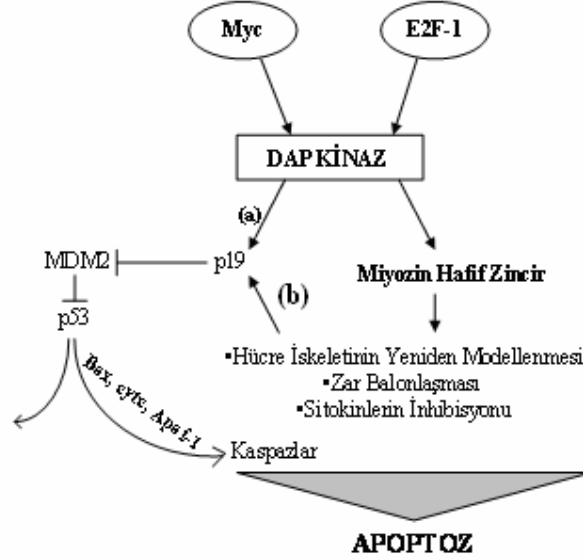


Şekil 2. 4. *DAP* Kinaz proteinin fosforilasyonu (Shohat vd 2002)

2.1.1. *DAPK1*'in Aktin Hücre İskeleti Regülasyonunda İşlevi

DAPK1, aktin mikrofilyament sistemiyle birlikte hücre iskelet sistemine yerleşiktir. *DAPK1*'in hücre iskeleti bağlanma bölgesi ve ankirin tekrarları iskelet sistemine yerleşim için gereklidir. *DAPK1*'in sitoskelet bağlanma bölgesinde gerçekleşen bir delesyon, *DAPK1*'in sitoplazmada dağınık olarak lokalize olmasına neden olurken, ankirin tekrar bölgesinin kaybı ile oluşan mutant bir protein ise yanlış adezyona neden olur (Chen vd 2006).

DAPK1'in kendine ve ekzojen bir substrat olan miyozin hafif zincire (MLC) karşı intrinsik kinaz aktivitesi vardır (Cohen vd 1997). *DAPK1* *in vivo* olarak MLC' yi Ser¹⁹'da fosforile eder. *DAPK1* aktomyozin sisteminin büzülme ve kasılmasını sağlar. Apoptotik hücrelerde *DAPK1* yoluyla MLC fosforilasyonu; hücre iskeletinin yeniden biçimlendirilmesi, zar balonlaşması ve sitokinlerin inhibisyonuna neden olur (Şekil 2. 5.) (Chen vd 2006, Raveh ve Kimchi 2001).



Şekil 2. 5. *DAP* kinazın MLC fosforilasyonu yoluyla apoptozis (Raveh ve Kimchi 2001)

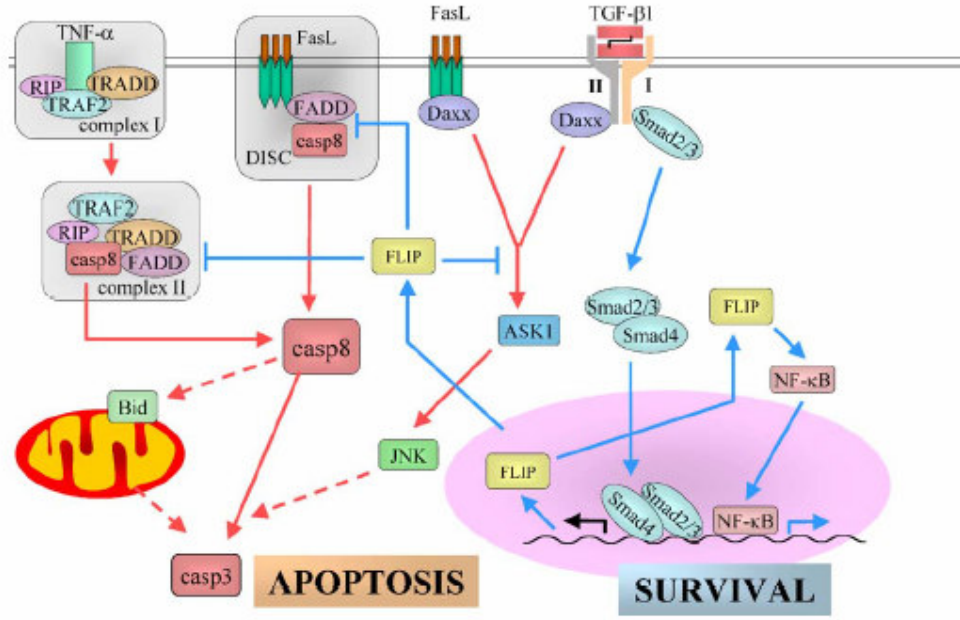
2.1.2. *DAPK1*'in Hücre Ölümündeki İşlevi

Hücre ölüm mekanizmaları genel olarak apoptozis ve otofaji olmak üzere sınıflandırılır. *DAPK1* geni her iki mekanizmada da etki gösterir (Gozacik ve Kimchi 2004).

Apoptotik Hücre Ölümü ve *DAPK1*: Tip I Hücre Ölümü olarak da adlandırılan Apoptozis, kromozom kondensasyonu, nükleozomal DNA degradasyonu ve fragmantasyonu ile ortaya çıkan bir programlanmış hücre ölüm mekanizmasıdır. Apoptozun bu morfolojik yapısı, Kaspaz protein ailesi üyelerinin aktivasyonu ile gerçekleştirilir. Hücrede arta kalanlar, fagositler veya komşu hücrelerin lizozomları ile uzaklaştırılır (Gozacik ve Kimchi 2004). Programlanmış hücre ölümünün düzenlemesi, hücre ölümünün uyarıcı ve hücre sağ kalımını sağlayan birçok farklı sinyal ileti yolağının birlikte aktivitesiyle gerçekleştirilir (Cooper 2006). Apoptotik mekanizmalar genel olarak dışsal ("extrinsic") ve içsel ("intrinsic") yolak olarak iki sınıfa ayrılır (Şekil 2. 6).

Dışsal yolak, hücre zarında yer alan ölüm reseptörlerine (Fas veya TRAIL) apoptozu tetikleyen proteinlerin (TNF ailesi) bağlanmasıyla gerçekleşir. Böylece kaspazlar aktive olur ve hücre apoptoza gider (Redd ve Pellecchia 2005). *DAPK1* ise IFN- γ , Fas ligandı ve TNF- α ile başlatılan dışsal apoptoz yolağında işlev görmektedir (Voso vd 2006). *DAPK1*'in; Fas reseptörüne, FADD/ MORT1 ile prokaspaz 8 veya 10'un bağlanmasıyla oluşan ölüm sinyal kompleksine (DISC-"death inducing signaling complex") etki ettiği düşünülmektedir (Cohen vd 1999).

İçsel yolak, mitokondride hücre ölüm sinyalleriyle başlatılarak mitokondriden sitokrom c ve diğer apoptotik proteinlerin sitozole salınması ile devam eden bir süreçtir. Sitolde sitokrom-c, kaspazları aktive edecek olan APAF- 1'e (apoptotic protease activating factor) bağlanır ve APAF-1'e prokaspaz-9'un bağlanmasıyla da "apoptozom" olarak adlandırılan çoklu bir protein yapısı oluşur. Oluşan bu apoptozom, kaspaz 9'u aktive ederek bir proteolitik kaskadı oluşturur. Kaspaz-9; prokaspaz-3 gibi "downstream" efektör proteinleri aktive eder (Redd ve Pellecchia 2005). *DAPK1* içsel apoptoz yolağı olan mitokondriyal TGF- β yolağında işlev görmektedir (Chen vd 2006). TGF- β , *DAPK1*'in ifadesini indükler. *DAPK1*, mitokondriyal pro-apoptotik yolakta Smad bağlanması ile TGF- β ' nın apoptotik dengeleyicisi olarak işlev görür (Jang vd 2002).



Şekil.2. 6. Ekstrinsik ve İntrinsik Apoptoz Yolakları (Sa'nchez-Capelo 2005)

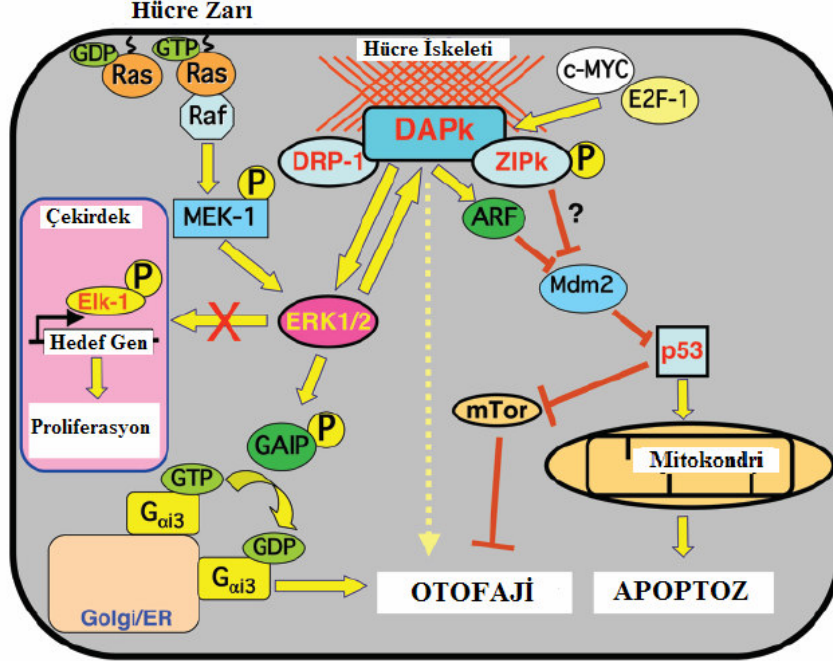
Bu bilgiler ışığında DAPK1 proteini, ekstraselüler matriksten ayrılma, *c-Myc* aktivasyonu ve Fas, TNF- α , IFN- γ ' yı içeren intrinsik ve ekstrinsik apoptotik sinyallerin katılımıyla, hücre ölümünü sağlayan bir Ser/Thr kinaz olarak tanımlanmaktadır (Shohat vd 2001). Bir ölüm bölgesi içeren ve kalmodulinle düzenlenen DAPK1, işlevi çok az bilinen proapoptotik bir aktiviteye sahiptir (Lévy 2004, Chen vd 2005).

Otofajik Hücre Ölümü ve DAPK1: Otofajik hücre ölümü, böcek metamorfozu gibi gelişimde ve erişkinde homeostatik süreçte gözlenir. Bazı durumlarda, otofajik ve apoptotik hücre ölümünün morfolojik özellikleri veya otofajik ile nekrotik hücre ölümünün morfolojik özellikleri aynı hücrede gözlenebilmesine rağmen, otofajik hücre ölümü (veya Tip II hücre ölümü); biyokimyasal ve morfolojik olarak apoptozdan (Tip I hücre ölümü) ayrılır. Otofajik ölümden, kaspaz aktivasyonu ve DNA fragmentasyonu gözlenmez. Otofajik hücre ölümü, mitokondri, golgi gibi sitoplazmik organelleri ve sitoplazmayı yutan sitoplazmik veziküllerin görülmesiyle tanımlanmaktadır (Chen vd 2006, Levine ve Yuan 2005). Otofajide, otofagozom veya otofajik vakuol olarak bilinen çift veya daha fazla membran yapıları oluşur. Memelilerde otofagozomun dış membranı lizozomla, maya ve bitkilerde ise vakuolle kaynaşır (Levine ve Yuan 2005). Hücrelerde, *DAPK1*'in ifade edilmesi ise otofajik veziküllerin oluşumu ve zar balonlaşmasına yol açar (Bialik ve Kimchi 2004). Otofajik veziküller ve bu veziküllerin içeriği, aynı hücrenin lizozomal hidrolazları tarafından yok edilir (Gozuacik ve Kimchi 2004). Otofajik hücrelerin hücre içi besin ve enerji üretimine ihtiyacı olduğunda hızla upregüle edilir. Dolayısıyla hücre yoğunluğu (density), oksijen konsantrasyonu, sıcaklık, hormonal faktörler ve besin durumu otofajinin kontrolünde önemlidir. Tip I programlı hücre ölümü olan apoptozda, hücre iskelet proteinlerinin erken yıkılması gözlenirken organeller geç evreye kadar korunurlar. Buna karşılık Tip II hücre ölümü olan otofajide, organellerin erken degradasyonu gerçekleşir fakat geç evreye kadar hücre iskelet elementlerinin korunmuş olduğu gözlenmiştir (Levine ve Yuan 2005).

Apoptotik ve otofajik hücre ölümü arasında karşılıklı ilişkiler bulunmaktadır. Örneğin, bazı proapoptotik sinyaller (dışsal apoptoz yolağı bileşenleri olan TRAIL, TNF ve FADD, seramid, kalsiyum-kalmodulinle regüle edilen serin-treonin kinazlar olarak bilinen *DRP-1* ve *DAPK1*) otofajiyi indükler. Buna karşın, Sınıf I PI3K/Akt/TOR sinyalizasyonu gibi antiapoptotik sinyaller otofajiyi baskılamaktadır. Apoptozun mitokondriyal regülasyonunu sağlayan genler, otofajik yolağıyla birbirini etkileyebilir. Bu yüzden mitokondrinin, otofajik ve apoptoz yolaklarının birbirini etkilemesine neden olan bir bağlantı noktası özelliği gösterdiği düşünülmektedir. Memeli hücrelerinde dış mitokondriyal membranda bulunan Bcl-2 ailesi üyeleri otofajiyi etki eder. *Bcl-2* downregülasyonu, insan lösemi hücrelerinde kaspaz bağımsız bir yolda otofajiyi artırır. *Bcl-2*, bir otofajik proteini olan Beclin-1 ile direkt bir interaksiyon yoluyla otofajiyi inhibe eder. Fakat

mitokondride Bcl- 2 proteinlerinin otofajiyi regüle edici işlevleri henüz tam olarak açıklanamamıştır (Levine ve Yuan 2005).

Hücre ölüm mekanizmalarıyla ilişkili olan *DAPK1* geni kanserin baskılanmasında önemli rol oynamaktadır. Hücrede hücre iskelet proteinleriyle birlikte bulunan *DAPK1* geni; *c-Myc* veya *E2F-1* gibi onkogenlerin aktivasyonu karşısında, eksprese olarak *P19^{ARF}* aktivitesini uyarır. Böylece *P19^{ARF}*, *p53*'ün negatif bir regülatörü olan *Mdm2*'yi inaktive ederek, *p53* stabilizasyonunu sağlanması ile hücre transformasyonun baskılanmasına neden olur (Şekil 2.7) (Gozacik ve Kimchi 2006). *DAPK1* -/- olan fibroblastlarda hem *p53* seviyesinin hem de apoptoz miktarının azaldığı tespit edilmesi, kanserin erken gelişiminde *DAPK1*'in koruyucu olarak görev yaptığını desteklemektedir (Ng 2002, Bialik ve Kimchi 2004).



Şekil 2.7. Tümör baskılanmasında *DAPK* proteinlerinin etkili olduğu moleküler mekanizmalar (Gozacik ve Kimchi 2006)

Amino asit ve/veya büyüme faktörü yokluğunda otofajiyi regüle eden *p53* ve *mTor* yolağı arasında ise bir ilişki ortaya konmuştur. Antiapoptotik bir sinyal yolağında etkili olan *mTor* aktivitesinin inhibe edilmesiyle, *p53* aktivasyonu otofajiyi uyarır (Şekil 2. 7) (Gozacik ve Kimchi 2006).

Son çalışmalar, *DAPK1* ve *ERK1/2* arasında karşılıklı bir etkileşim olduğunu ortaya koymuştur. Bu karşılıklı ilişki, hücrede proliferasyon sinyali oluşturan *ERK2*'nin *DAPK1* tarafından sitoplazmada tutularak çekirdeğe girişinin engellenmesi ve *DAPK1*'in *ERK2* ile fosforile edilerek kinaz aktivitesinin artırılması ve hücre ölümünün aktifleştirilmesiyle gerçekleştirilir. Hücre sağkalımı ve çoğalmasını sağlayan *ERK1/2*'nin çekirdeğe girişi inhibe edildiğinde *Elk-1* gibi *ERK*'le çalışan nükleer hedef sinyalleri bloke edilerek, hücre proliferasyonu engellenir. Son yıllarda *ERK2*'nin, kolon kanser hücrelerinde makrotofajide rol oynayan *GAIP* (*Gα*-interacting protein)'in golgiye lokalizasyonu ve fosforilasyonunu etkilediği gösterilmiştir (Pattingre vd 2003). Diğer bir çalışmada ise *Ras/Raf/ERK* yolağının *GAIP* fosforilasyonu yoluyla otofajiyi regüle ettiği tespit edilmiştir (Şekil 2.7) (Gozacik ve Kimchi 2006). Sonuç olarak *DAPK1*, otofajiyi indükleyerek ve/veya tümör baskılayıcı aktivitesiyle etkili olmaktadır.

2.1.3. *DAPK1*'in Anoikisin İndüklemesindeki İşlevi

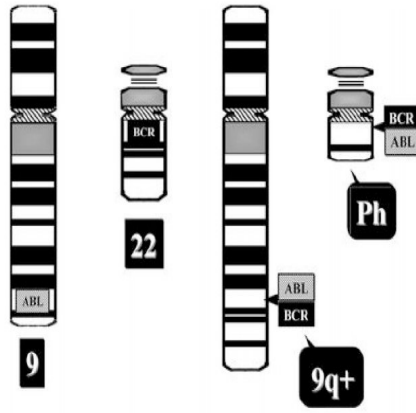
Hücreler arası maddede (ECM) adezyon, integrin yoluyla hücrenin hayatta kalmasını regüle eder (Chen vd 2006). *DAPK1*; integrin sinyalinin inhibisyonu yoluyla, hücrelerin hücreler arası maddeye adezyonunu etkileyerek apoptoza neden olur. Adezyon kaybı, Anoikis olarak bilinen kaspaz bağımlı hücre ölümünü

etkinleştirebilir (Bialik ve Kimchi 2004). Anokis; hücre ve hücreler arası madde ilişkisinin yetersiz kalması veya kaybolması yoluyla tetiklenmiş olan apoptozun bir alt kümesidir (Chen vd 2006).*DAPK1*, ECM hayatta kalma sinyalinin bloke edilmesiyle *p53* indüksiyonuna neden olarak integrin aracılı hücre adezyonunu baskılar. Böylece *DAPK1* bir anokis indükleyicisi olarak tanımlanır (Chen vd 2006).*DAPK1*'in indüklediği çok çeşitli olan bu hücre ölüm yollarının seçiminin hücrenin genel durumuna bağlı olduğu düşünülmektedir (Bialik ve Kimchi 2004).

2.2. Kronik Miyeloid Lösemi (KML)

Lösemiler; hücre çoğalması ve hücre olgunlaşması arasındaki dengenin bozulması ile sonuçlanan kan hücreleri ve/veya öncülerinin aşırı artışı ile karakterize olan malign, hematolojik bir hastalıktır (Melki ve Clark 2002). Lösemiler; hematopoetik kök hücrelerden aldıkları kökene göre, miyeloid ve lenfoid lösemi olmak üzere ikiye ayrılır. Bunlar da kendi içerisinde akut ve kronik faza göre, akut lenfoid (ALL), akut miyeloid (AML), kronik lenfoid (KLL), kronik miyeloid lösemiler (KML) olarak gruplandırılırlar (Beksaç 1997).

Kronik **M**iyeloid **L**ösemi (KML), t(9;22) (q34;q11) translokasyonu sonucu oluşan Philadelphia (Ph) kromozomu ile karakterize olan hematopoetik kök hücrelerin neoplastik bir hastalığıdır (Beksaç 1997). t(9;22) translokasyonu, kromozom 9'daki *ABL* onkogeni ile kromozom 22'deki *BCR* geninin füzyonu ile sonuçlanmaktadır (Şekil 2.8.) (Litzow 2006). Kimerik BCR-ABL onkoproteininin ekprese eden hücreler, apoptozun inhibisyonu ve farklılaşmanın kaybı sonucu hücrelerin aşırı çoğalması ile malign transformasyon gösterir (Walz ve Sattler 2006).



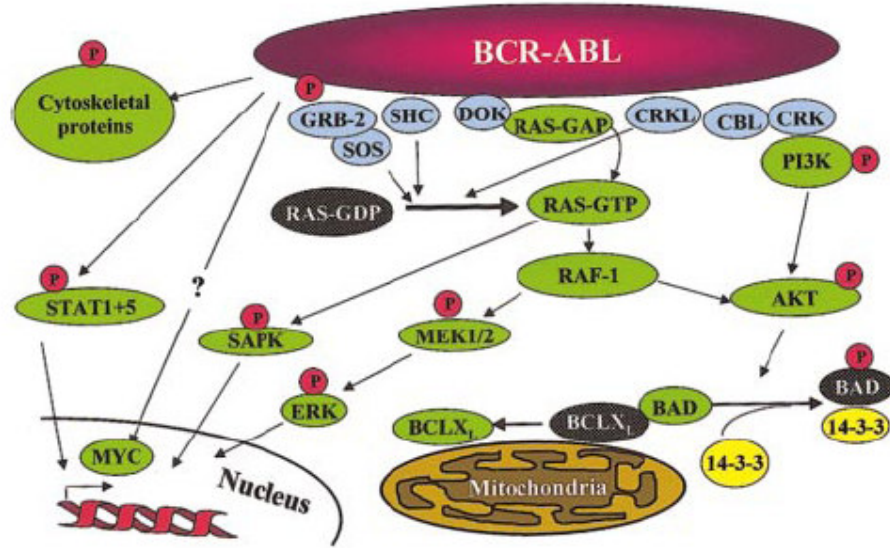
Şekil 2. 8. Ph Kromozomunun Oluşumu (Litzow 2006)

230 kb olan *ABL* geni, 9. kromozomun q34 bölgesinde yerleşim gösterir (Pane vd 2002). Bir onkogen olan *ABL* geni non reseptör tirozin kinazı kodlar. İnsan *ABL* proteini yaygın olarak eksprese edilen 145 kD'luk bir proteindir (Deininger vd 2000). *BCR* geni ise 22. kromozomun q11 bölgesinde lokalize olup bu gen ürünü 160 kD'luk *BCR* proteindir. (Melo vd 2004). *BCR* ve *ABL* genleri arasında t(9;22) (q34;q11) translokasyonu ile oluşan *BCR-ABL* füzyon geninin kodladığı 210 kD'luk sitoplazmik onkoprotein; artmış tirozin kinaz aktivitesine sahiptir ve hücre döngüsü kontrolünden bağımsız olarak hareket ederek lösemiye neden olur.

BCR-ABL proteininin 4 yoldan malinite oluşumunu tetiklediği belirlenmiştir (Deininger 2000, Deininger ve Vierra 2000).

1. Hücrenin adezyon özellikleri değişir.
2. Mitojenik aktivasyona yol açar.
3. Apoptozu inhibe eder.
4. Abl tirozin kinaz aktivitesini inhibe edici proteinlerin yıkımına yol açar.

BCR-ABL onkoproteini, Ras, Jak/STAT, PI3 kinaz ve Myc sinyal yolları gibi birçok mitojenik sinyal yolunun aktivasyonuna sebep olur ve hücrenin çoğalmasını indükler (Şekil 2.9) (Melo vd 2004).



Şekil 2.9. BCR-ABL füzyon geninin etkili olduğu yollar (Deininger vd 2000)

Lösemi hücreleri, BCR-ABL füzyon proteininin ekspresyonu sonucunda, Kaspaz-3 inhibisyonu ile sitokrom-c'nin sitozole salınımının engellenmesiyle apoptoza gitmezler. Bu antiapoptotik mekanizma, *Bcl-2*, *Bcl-xl* veya *Mcl-1* antiapoptotik genlerin overekspresyonu ile ortaya çıkar (Ikeda vd 2006).

BCR-ABL, gen transkripsiyonunun aktivasyonu ya da represyonu için önemli olan onkogenik sinyallerin iletiminde görevli çeşitli proteinlerle etkileşmesinde, apoptotik yanıtın mitokondrial işlenmesinde, hücre iskeleti organizasyonunda ve inhibitör proteinlerin degradasyonunda etkilidir (Litzow 2006).

KML'nin de içine girdiği Hematopoetik Malignansiler, çeşitli genlerin mutasyonları ve epigenetik modifikasyonlarıyla ortaya çıkabilmektedir. Bu malignansilerde DNA hipermetilasyonu ile farklı işlevde birçok gen susturulabilir (Çizelge 2.1.) (Galm vd 2006).

Çizelge 2. 1. Hematopoetik malignansilerde sıklıkla metile olan genler (Galm vd 2006)

Tümör Tipi	Genler
Non Hodgkin's Lenfoma	<i>DAPK1</i> , <i>p57</i> , <i>p16</i> , <i>O⁶MGMT</i> , <i>GST π</i> , <i>RARβ2</i> , <i>CRBP1</i>
Multiple Miyeloma	<i>p16</i> , <i>SOCS- 1</i> , <i>E-kaderin</i> , <i>p73</i> , <i>DAPK1</i>
Kronik Miyeloid Lösemi	<i>p15</i> , <i>abl</i>
Akut Lenfositik Lösemi	<i>E-kaderin</i> , <i>p15</i> , <i>p16</i> , <i>p73</i> , <i>DAPK1</i> , <i>O⁶MGMT</i>
Akut Miyeloid Lösemi	<i>p15</i> , <i>E-kaderin</i> , <i>SOCS- 1</i> , <i>p73</i> , <i>DAPK1</i> , <i>HIC1</i> , <i>RAR β2</i> , <i>CRBP1</i>

2.2.1. KML'de İmatinib Tedavisi ve İmatinib Direnci

İmatinib, BCR-ABL otofosforilasyonunun ve substrat fosforilasyonunun inhibisyonunu gerçekleştirerek, etkilenen hücrelerin proliferasyonunu bloke eder ve apoptozu indükler. İmatinib, ABL kinaz domainindeki amino asitlere bağlanır ve adenosin trifosfat (ATP) 'ın bağlanmasını bloke ederek BCR-ABL proteininin inaktif konformasyonda kalmasını indükler. Bu durum da ATP'den fosfat transferini engeller ve downstream sinyal iletim yollarını bloke ederek büyüme duraklamasına ya da apoptoza neden olur. Son yıllarda

hastalarda İmatinib'e karşı direnç ortaya çıkmakta ve tedavinin seyri değişmektedir. İmatinib'e karşı gelişen bir direnç sebep olan çeşitli mekanizmalar bulunmaktadır (Walz ve Sattler 2006).

2.2.2. İmatinib'e Karşı Gelişen Direnç Mekanizmaları

2.2.2.1. BCR-ABL'de ABL geninin tirozin kinaz domainindeki nokta mutasyonları; özellikle primer dirençten ziyade kazanılmış dirençte görülmekte ve KML'nin tüm fazlarında bulunmasına rağmen daha sıklıkla hastalığın geç kronik veya akselere fazında gözlenmektedir. Bu mutasyonlar; imatinib bağlanma bölgesi, ATP bağlanma bölgesi, Aktivasyon bölgesi ve Katalitik bölgede yer alan gerçekleşen mutasyonlar olmak üzere 4 ana grupta toplanmaktadır. T315I ve F317L Mutasyonları; **(1) imatinib bağlanma bölgesinde** yer alır. **T315I Mutasyonu;** ABL 1a proteinin 315. pozisyonunda, 1b proteininde 334 pozisyonundaki treonin (Thr,T) amino asidinin izolösine (Ile,I) dönüşümü ile gerçekleşir. Bu mutasyon Gleevec'in bağlanabilme yeteneğine zarar verir fakat ATP'nin bağlanmasını etkilememektedir. **F317L Mutasyonu;** ABL proteininin 317. pozisyonundaki fenilalaninin (Phe,F) lösine (Leu,L) dönüşmesine ile ortaya çıkar. **(2) ATP bağlanma bölgesinde** (fosfat ya da P-loop) gerçekleşen ve İmatinib'in bağlanması için gerekli konformasyonunu destabilize eden P loop mutasyonları ise; tirozin253fenilalanin / histidin (Y253F/H), glutamikasit255lizin/ valin (E255K/V), glisin250glutamikasit/ alanin/ fenilalanin (G250E/A/F) ve glutamin252histidin/ arjinin (Q252H/R) 'dir. **(3) ABL kinazın aktivasyon bölgesinde** de mutasyon gerçekleşebilir. Bu durumda ise, İmatinib ABL'ı inaktif konformasyonda stabil kılar ve ABL aktif durumdayken bağlanamaz. Direnç sebep olan bir diğer mutasyon ise; imatinib ve diğer küçük moleküllü tirozin kinaz inhibitörlerinin bağlandığı aralıkta yer alan **(4) katalitik bölgede** gerçekleşir (Walz ve Sattler 2006).

2.2.2.2. BCR-ABL geninin amplifikasyonuna bağlı BCR-ABL proteininin artmış ekspresyonu

2.2.2.3. Farmakolojik Mekanizmalar; MDR1 geninin aşırı ekspresyonu sonucunda yüksek P-glikoprotein seviyesi ve $\alpha 1$ asid glikoprotein (AGP) 'inin artmış ekspresyonu da, imatinib direncine katkı sağlayan farmakolojik mekanizmalardır (Walz ve Sattler 2006).

2.2.2.4. İmatinib direncinde BCR-ABL bağımsız sitogenetik değişiklikler; BCR-ABL, hastalığın kronik fazdan, akselere ve blast faza geçiş sürecinde, genomik instabiliteyle ve böylece ek mutasyonların birikimi ile birlikte gözlenebilir. Örneğin, bazı hastalarda kromozomal translokasyona ek olarak; aneuploidi, p53 alel kaybına yol açan 17.kromozomun kısa kolundaki değişimler ve yeni resiprokal translokasyonlar ortaya çıkmıştır (Walz ve Sattler 2006).

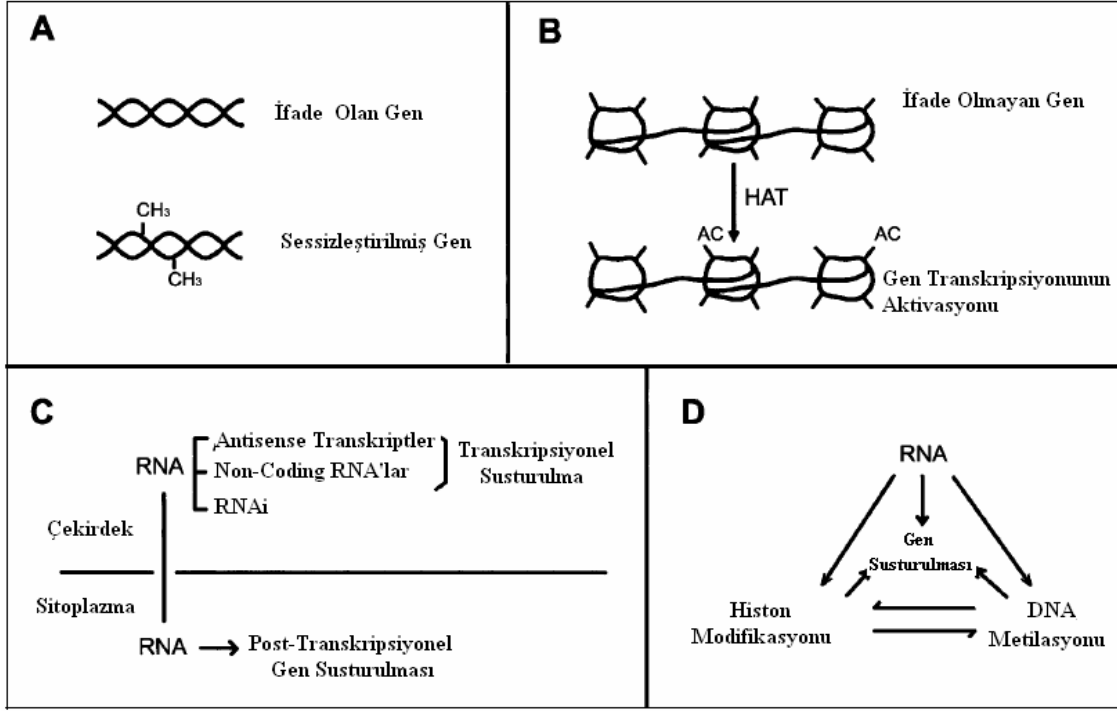
2.2.3. BCR-ABL sinyal yollarının hedeflenmesi

Çok farklı sinyal yolları üzerinden hücrede proliferasyona neden olabilen BCR-ABL proteininin işlevi; Ras Yolağı (Farnesil Transferaz inhibitörleri ve MAP kinaz inhibitörleri) veya PI3K Yolağının (PI3K inhibitörleri, PDK1 inhibitörü ve mTOR inhibitörleri) hedeflenmesiyle inhibe edilmektedir. Ayrıca bu inhibisyonla, bazı ek hedeflerde kullanılabilir. Örneğin, anti-angiogenik bir molekül olan 2-metoksiestradol, BCR-ABL transforme hücre serilerinde imatinible kombine olarak etki göstermektedir. 2-metoksiestradol, in vivo ve in vitro olarak mikrotübüllere bağlanarak onları destabilize eder. imatinible kombine olarak kullanılan 2-metoksiestradol, hücre büyümesini azaltıcı etkide bulunmaktadır. Ayrıca bir DNA metilasyon inhibitörü olan 5 aza 2 deoksisisitidin, imatinibe dirençli hücrelerde faydalı olduğu gösterilmiştir. Bu etki direncin moleküler mekanizmasına bağlıdır ve imatinib, T315I mutasyonu olan BCR-ABL eksprese eden hücrelerde, decitabine direncini teşvik etmektedir (Walz ve Sattler 2006).

2.3. Epigenetik Mekanizmalar

Epigenetik mekanizmalar; DNA dizisinde bir değişim içermeyen ve hücre döngüsü boyunca gerçekleşen kalıtsal değişikliklerdir. Epigenetik değişiklikler; genetik modifikasyonlardan farklı olarak geri dönüşümlü potansiyellerine sahip olma, genomda yakındaki bir diğer gen grubunu etkileyebilme ve çevre ile modifiye edilebilme gibi ortak özelliklere sahiptirler (Feinberg 2004).

Epigenetik değişiklikler; DNA metilasyonu, Histon modifikasyonları ve RNA aracılı gen susturulmaları olarak 3 temel grupta toplanır (Peedicayil 2006) (Şekil 2. 10.).



- A. DNA Metilasyonunun sebep olduğu gen susturulması,
 B. Kromatinde histonların deasetilasyonu yoluyla gen transkripsiyonunun susturulması
 C. RNA aracılı transkripsiyonel ve post-transkripsiyonel gen susturulması
 D. 3 epigenetik mekanizma arasındaki ilişki

Şekil 2. 10. Epigenetik Mekanizmalar (Peedicayil 2006)

2.3.1. Histon Modifikasyonları

Histonların post-transkripsiyonel modifikasyonları, metilasyon, asetilasyon, fosforilasyon, ubiquitinasyon/sumolasyon ve ADP-ribozilasyonudur (Lu vd 2006).

Metilasyon: Histonlarda Lizin ve Arjininin azot atomlarında post-translasyonel olarak gerçekleşen kovalent bir modifikasyondur. Histon H3 ve H4'te birkaç rezidüde meydana gelen Lizin metilasyonu; transkripsiyon aktivasyonu boyunca nükleozom değişikliklerini sağlayan "Chromatin Remodeling"e neden olur. Arjinin metilasyonu ise çeşitli genlerin transkripsiyonel aktivitesi ile ilişkili olup, bu aktivasyonun histon asetilasyonu ile olan birlikteliği gösterilmiştir (Santos-Rosa ve Caldas 2005).

Asetilasyon/deasetilasyon ile kromatin katlanmalarının değişimi ve transkripsiyon koregülatörler için spesifik bağlanma yüzeylerinin oluşumu sağlanarak gen ifadesi düzenlenir. Histonların asetilasyonu, transkripsiyon faktörleriyle promotora özgü gen ifadesinin aktivasyonunu sağlar. Histon asetilasyonu ve deasetilasyonu; Histon Asetil Transferaz (HAT) ile Histon Deasetilaz (HDAC) enzimleri ile regüle edilir (Ducasse ve Brown 2006).

Fosforilasyon: Kovalent bir post-translasyonel modifikasyon olan bu mekanizma için fosforillenecek olan başlıca substrat histon H3'tür. Histon H3'ün amino terminalinde bulunan 10. pozisyonundaki Serin'in fosforillenmesi, perisentrik heterokromatinde, kromozom kondensasyonunun başlatılması için gereklidir (Santos-Rosa ve Caldas 2005).

Ubikutinasyon ve Sumolasyon: Histon Lizin rezidülerinin ϵ -amino grubu ubikutin ve ubikutin benzeri proteinler (SUMO) yoluyla modifiye edilebilir. Histon ubikutinasyonu genellikle artan gen ifadesiyle ilişkili iken, Histon sumolasyonu ise azalmış gen ifadesi ile ilişkilidir (Santos-Rosa ve Caldas 2005).

ADP-Ribozilasyonu; DNA hasarına karşı oluşan hücresel cevaplarda yer alan post-translasyonel bir modifikasyondur. Negatif yüklü poli-ADP-riboz zincirinin, DNA ile histonlar arasındaki etkileşimi azaltarak, kromatinde bölgesel açılmalara neden olduğu düşünülmektedir (Morin vd 1999).

2.3.2. RNA Aracılı Gen Susturulması

Antisense transkript, kodlanmayan RNA ve siRNA'lar olarak çeşitli formlarda bulunan RNA; histon modifikasyonu ve DNA metilasyonunu kolaylaştırarak, gen ifadelerinin susturulmasını indükleyebilir (Pedicayil 2006).

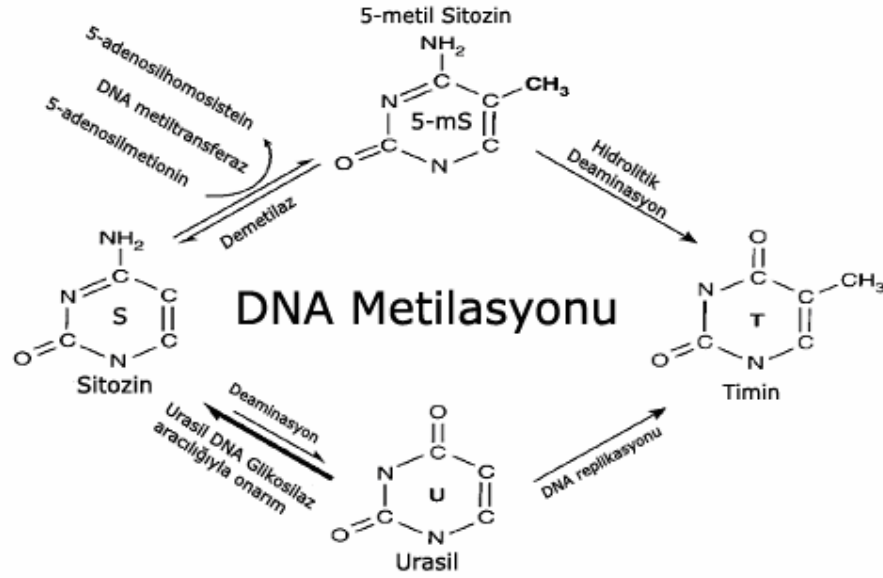
Promotor bölgelerinde CpG adacıklarını hedef alan Kodlanmayan (Non-Coding) RNA, gen ifadesinde etkili olan DNA ve Histon Metilasyonu ile birliktelik göstererek etki eder. Ancak, transkripsiyonel aktivite açısından non-coding RNA'nın etkisi henüz tam olarak bilinmemektedir (Ducasse ve Brown 2006).

siRNA (Small Interfering RNAs) ise mRNA degradasyonunun hedeflenmesi yoluyla genlerin sessizleştirilmesinde etkin olan bir molekül olarak tanımlanmıştır (Lu vd 2006). siRNA'nın, gen aktivasyonunun fizyolojik regülasyonu ve immün savunma olmak üzere iki önemli işlevi vardır (Tchurikov 2004). RNA interferansın akciğer ve meme kanser hücrelerinde, DNMT1 protein ekspresyonunu "down-regüle" ettiği tespit edilmiştir (Lu vd 2006).

2.3.3. DNA Metilasyonu

İnsanda başlıca epigenetik değişiklik, CpG dinükleotitleri içinde bulunan sitozinlerin metilasyonudur (Etseller ve Herman 2002). Bazı memeli genleri, DNA dizilerindeki metilasyonla sessizleştirilir. Ayrıca, memeli genomunun büyük bölümü bu yolla işaretlenir (imprint) ve DNA metilasyonu sıklıkla heterokromatin bölgelerde görülür (Watson vd 5. baskı). Epigenetik bir mekanizma olan genlerin CpG adacıklarının metilasyonu, kanserde gen susturulmalarında; gen delesyonu ve gen mutasyonları ile eşit öneme sahip olarak görülmektedir (Melki ve Clark 2002).

Ökaryotlarda DNA metilasyonu; sitozin halkasının 5. pozisyonundaki karbonuna metil grubunun ($-CH_3$) eklenmesiyle meydana gelir (Şekil 2. 11). Memeli hücrelerinin genomik DNA'larının yaklaşık olarak %3-5'inde sitozin rezidülerinde metilasyon görülmektedir. Sitozin bazında gerçekleşen bu modifikasyon, DNA replikasyonundan sonra meydana gelir ve bu olay DNMT1 (DNA metiltransferaz) enzimi tarafından katalizlenir. DNMT1 enzimi, genomik DNA'daki CpG dinükleotitlerini (CpG adacıkları) substrat olarak kullanır (Momparker ve Bovenzi 2002). Memeli DNMT1 metiltransferaz enzimi, DNA'daki hemimetile bölgelere karşı yüksek afiniteye sahip olmasına karşı ayrıca metile olmamış bölgelerde de *de novo* metilasyona neden olabilmektedir (Singal ve Ginder 1999). DNMT1, ilk kez kolon kanserlerinde bildirilmiş olup, artan ekspresyon miktarından dolayı DNA metilasyon profilini değiştirdiği gösterilmiştir (Melki ve Clark 2002).



Şekil 2. 11. Sitozin metilasyonu, demetilasyonu, sitozin ve 5-metilsitozin mutajenezi için biyokimyasal yolağın şematik gösterimi. (Singal ve Ginder 1999)

2.3.3.1. CpG Adacıkları

İnsan genomunda CpG dinükleotidince zengin bölgelere CpG adacıkları denir. Bu adacıklar, genellikle tüm normal dokularda metile değildir ve genlerin 5' ucunda (promotor, ifade edilmeyen bölge- UTR, ekzon- 1) bulunur (Etseller ve Herman 2002).

CpG adacıkları ilk olarak, restriksiyon enzimi HpaII için kesim bölgesine sahip kısa genomik DNA bölgeleri olarak tanımlanarak, "HpaII Tiny Fragment (HTF) adacıkları" olarak adlandırılmıştır. CpG adacıkları 1- 2 kb uzunluğunda kısa DNA bölgeleridir ve genomun yaklaşık olarak %2'sini oluşturmaktadırlar. Bu bölgeler, %60- 70 oranında guanin ve sitozince (GC) zengin dizilere sahiptir (Melki ve Clark 2002).

CpG metilasyon içeriği ve modeli hem türe, hem de dokuya özgüdür. Normal insan doku DNA'sında 5-metilsitozinin oranı; HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ve HCPE (High Performance Capillary Electrophoresis) ile yapılan ölçümlerde %0.75- 1 olarak bildirilmektedir (Etseller ve Herman 2002).

CpG adacıkları, "housekeeping" genleri olarak bilinen temel genlerde, dokuya özgü genlerin 5'promotor bölgelerinde ve ayrıca bazı genlerin 1.ekzonlarında bulunmaktadır. İnsan genomunda bu şekilde tanımlanmış 45.000 CpG adacığı bulunmaktadır (Melki ve Clark 2002). CpG adacıkları normalde; işaretlenmiş (imprint) genler, kadınlarda X kromozom genleri, eşey hücrelerine özgü genler ve dokuya özgü genler olmak üzere 4 durumda metiledir (Etseller ve Herman 2002).

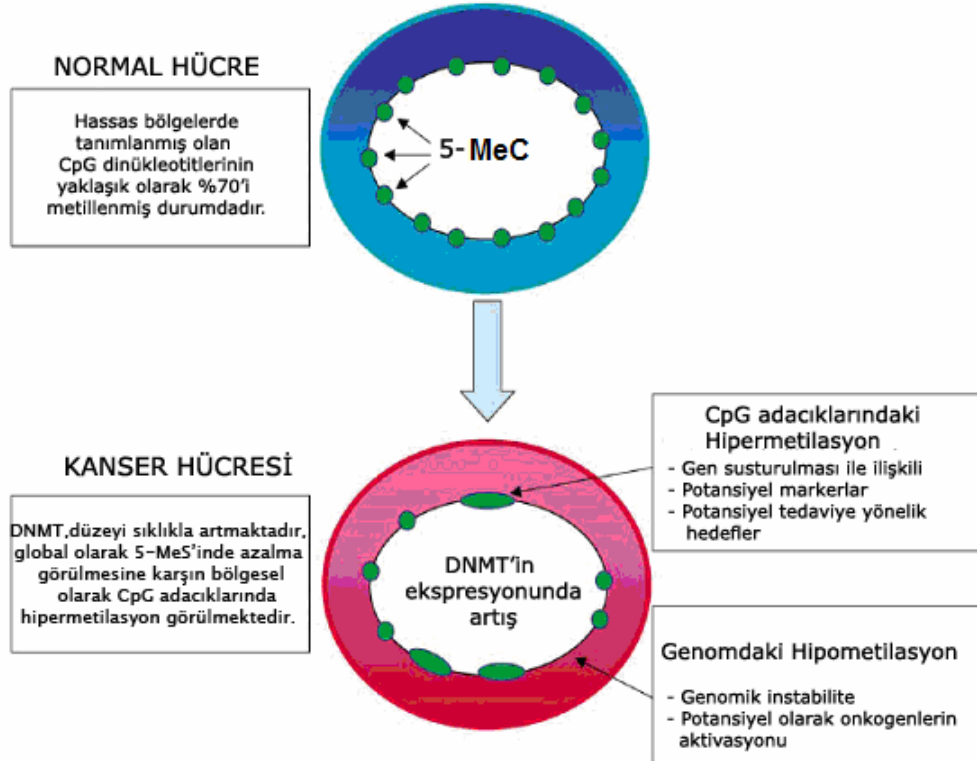
Metilasyon durumunun hücre tipine özgüllüğü, farklı malignensiler arasında sıklıkla görülür. Lösemide, CpG adacıklarındaki sitozinlerde metilasyon artışları; hipermetilasyon ve hücre tipi özgüllüğünden kaynaklanır (Melki ve Clark 2002).

Hipermetilasyonla gerçekleşen sessizleşme; DNA tamiri (*hMLH1*, *BRCA1*, *MGMT*), hücre döngüsü ve apoptoz (*DAPK*, *APAF-1*) gibi, hücresel iletişimdeki tüm yolları etkiler (Etseller ve Herman 2002).

2.3.3.2. Kanserde Metilasyon Profili

Genelde tümör baskılayıcı genlerde, metilasyonun artması, DNMT enzimlerinin yükselmesi ile birlikte gözlenir. DNMT1'in artışı, ilk kez kolon kanserinde rapor edilmiştir. DNMT1 aktivitesinin insan kolon kanseri dışında akciğer kanserlerinin ileri aşamasında ve lösemili hastaların olgunlaşmamış hücrelerinde de arttığı gösterilmiştir (Melki ve Clark 2002).

Kanserli hücrelerin DNA'sında 5-metilsitozin (5-MeC) miktarında azalma görülmektedir. Ancak bazı bölgelerde; örneğin tümör baskılayıcı genlerde, DNA hipermetilasyonu saptanmıştır. Buna karşın DNA hipometilasyonu ile de onkogen aktivasyonu gerçekleşmektedir. Bu değişim solid tümörlerde olduğu gibi lösemilerde de bildirilmektedir (Şekil 2. 12.) (Melki ve Clark 2002).



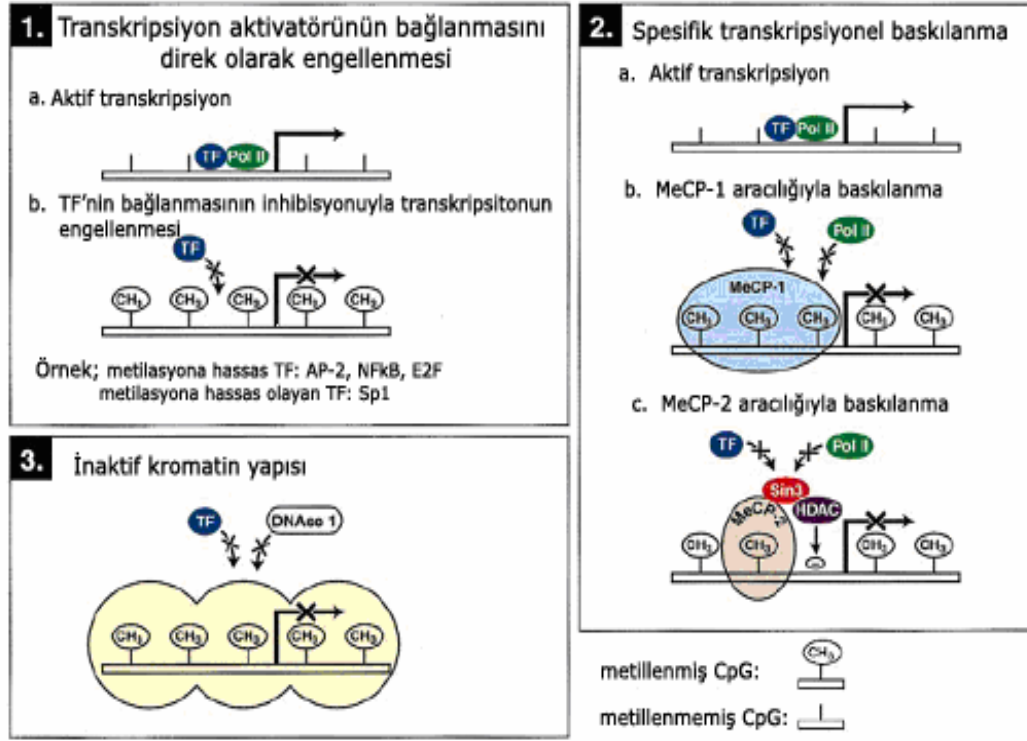
Şekil 2.12. Kanserde metilasyon görünümü (Melki ve Clark 2002)

2.3.3.3. DNA Metilasyonu Aracılığıyla Transkripsiyonun Baskılanma Mekanizmaları

Transkripsiyon aktivatör faktörünün bağlanmasına direk müdahale: AP-2, c-myc/ myn, cAMP-bağımlı aktivatör CREB, E2F ve NF- κ B gibi bazı transkripsiyon faktörlerinin tanıyıp bağlandığı bölgeler, CpG rezidüleri içermektedir. Bu bölgelerde meydana gelen metilasyon sayesinde transkripsiyon faktörleri bağlanamadığından transkripsiyon inhibe olur. Buna karşın, bazı transkripsiyon faktörleri (örneğin; Sp1 ve CTF) bağlanma bölgelerindeki metilasyona duyarlı değildir ve birçok faktöründe bağlanma bölgesinde CpG dinükleotid rezidüleri bulunmamaktadır (Singal ve Ginder 1999).

Spesifik transkripsiyonel baskılanma: Spesifik transkripsiyonel represörün, metillenmiş DNA'ya direk bağlanmasıyla meydana gelir. Bu özelliğe sahip iki faktör MeCP-1 ve MeCP-2 (metil sitozine bağlanma proteini 1 ve 2), herhangi bir dizide metillenmiş CpG rezidülerine bağlanarak inaktivasyona neden olur (Singal ve Ginder 1999).

İnaktif Kromatin Yapısı: DNA metilasyonu, kromatin yapısında değişiklikler meydana getirerek transkripsiyonu engelleyebilir. Heterokromatin bölgelerin oluşumunda ve genomun sıkı bir şekilde paketlenmesinde DNA metilasyonu önemli rol oynamaktadır. Heterokromatin bölge içerisinde yer alan genler genellikle ifade bulamazlar (Şekil 2. 13.) (Singal ve Ginder 1999).



Şekil 2. 13. Sitozin metilasyonu aracılığıyla transkripsiyonel susturulma mekanizmaları (Singal ve Ginder 1999)

2.3.3.4. DNA Metilasyonunun Kansere Gelişiminde Etkilediği Mekanizmalar

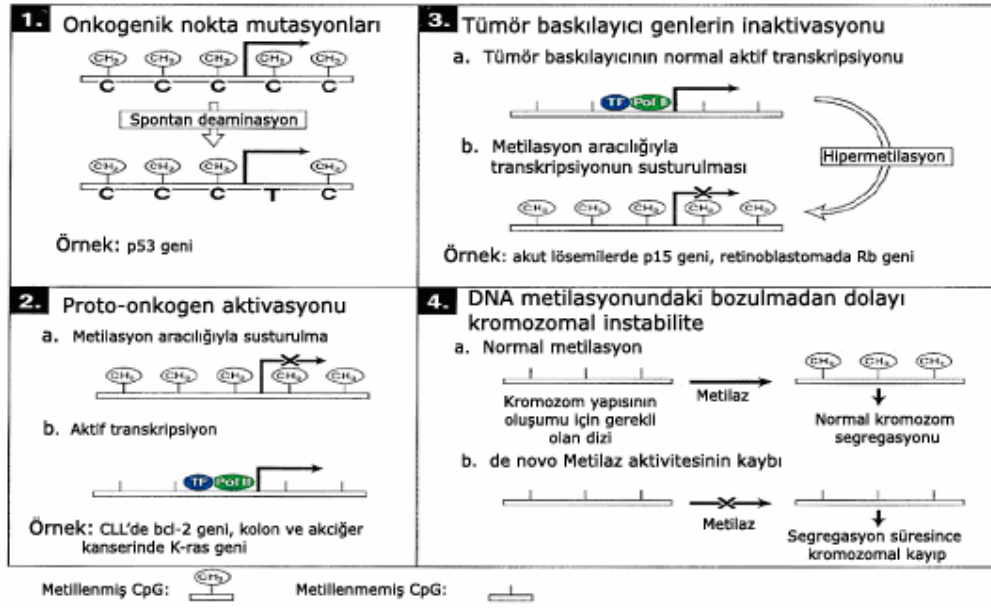
Kanser hücrelerindeki C → T dönüşümü: Metile olmamış C, deaminasyon sonucu U'ye dönüşür. Ancak Urasil-DNA glikosilaz enzimi sayesinde G:U yanlış eşleşmesi tanınır ve onarılır. Bununla birlikte, DNMT enzimi bu onarımı bloklamaktadır. DNMT enzimi CpG adacıklarındaki sitozinlere (C) metil grubu ekler. 5MeC'in deaminasyonu sonucunda T bazı oluşur. Ancak bu dönüşüm DNA'da tanınarak onarılamaz ve böylece nokta mutasyonları meydana gelir. Bu olaya tümör baskılayıcı gen olan *p53* örnek verilebilmektedir. İnsan solid tümörlerinin %50'sinden fazlasında *p53* tümör baskılayıcı geninde mutasyon görülmektedir ve bunların %24'ünü, CpG adacıklarındaki C→T dönüşümü oluşturmaktadır (Singal ve Ginder 1999).

DNA hipometilasyonu: Genomik metilasyon düzeyindeki düşüş bir diğer mekanizmadır. Bu olay sonucunda metilasyon aracılığıyla inaktifleşmiş olan genler, metilasyonun kalkması ile aktif duruma geçerler. Bunlara kronik lenfoid lösemilerdeki *bcl-2* onkogeninin reaktivasyonunu örnek verebiliriz (Singal ve Ginder 1999).

Tümör baskılayıcı genlerin hipermetilasyonu: DNMT1 düzeyindeki artış sonucunda, tümör baskılayıcı genler promotor dizilerindeki CpG adacıklarında meydana gelen hipermetilasyon sonucunda inaktive olabilmektedir (Singal ve Ginder 1999).

DNA metilasyonundaki bozulmadan dolayı kromozomal instabilite: Kansere gelişimi ve ilerleyişinde kromozomal instabilite oldukça önemlidir. DNA metilasyonu ayrıca DNA'nın sıkı bir şekilde paketlenmesinde rol oynamaktadır. Bu sıkı paketlenmeden dolayı örneğin transpozonların genom içerisinde hareket etmeleri engellenmiş olmaktadır. Ancak metilasyon kaybıyla, DNA sıkı bir şekilde

paketlenemeyeceği için transpozonlar genomda rahatlıkla hareket ederek kromozomal instabiliteye neden olmaktadır. Ayrıca metilasyon paternindeki değişimler sonucunda ortaya çıkabilen DNA onarım genlerindeki anomaliler ve kromozomal instabiliteye neden olmaktadır (Şekil 2. 14.) (Singal ve Ginder 1999).



Şekil 2. 14. Onkogeneze, sitozin metilasyonunun neden olduğu mekanizmalar (Singal ve Ginder 1999)

DNA metilasyon belirteçleri (marker) , hem hastalığın sınıflandırılması hem de saptanması için kullanılabilir. Ayrıca her bir gen promotörünün DNA metilasyon durumunun belirlenmesi özel bir tedaviye cevabı tespit etmek için de kullanılabilir (Laird 2005).

Kanserdeki genetik değişikliklerin aksine epigenetik mekanizmalar geri dönüşü olabilen değişikliklerdir. Metilasyonun tersinir sürecinde, DNA'nın demetilasyonu ve sessiz genlerin yeniden etkinleştirilmesinde bazı DNA metiltransferaz inhibitörleri kullanılmaktadır. Örneğin; kanser hücre serilerinin 5-aza- 2-deoksisitidin (Decitabine) ve 5-azasitidin ile muamelesi DAPK1'i demetile ederek yeniden ifadenmesini sağlar (Bialik ve Kimchi 2004). DNA metiltransferaz veya histon deasetilaz aktivitesinden birinin bloke edilmesi, epigenetik susturulma sürecini tersine çevirebilir ya da inhibe edebilir. DNA metiltransferaz ve histon deasetilaz inhibitörlerinin birleşimi; epigenetik olarak susturulmuş genlerin yeniden aktive edilmesinde etkili bir birliktelik gösterir (Laird 2005).

Bu çalışmada metilasyon durumunun tespiti için alternatif teknikler olmasına rağmen MSP (Metilasyon Spesifik PCR) tekniği kullanılmıştır. Herman ve arkadaşları tarafından geliştirilen bu teknik; 1000 normal kopyada bir molekülün değişikliğini tespit edebilmektedir (Tang vd 2000). Literatürde bu konuyla ilgili yapılan çalışmalarda da DAPK1'in 5'UTR metilasyon durumları, normal hücreler ile çeşitli karsinom, sarkom ve lenfoma tümör hücrelerinden elde edilen DNA'ların analizinde tercih edilmiştir (Bialik ve Kimchi 2004). MSP; her gen için özgüllüğünün olması ve yüksek hassasiyet göstermesi dolayısıyla bu çalışmada kullanılmıştır.

2.4. Kanserde, DAPK1 Geninin Hipermetilasyon İle Susturulması

DAPK1'in promotor bölgesinin hipermetilasyonu ile DAPK1 gen ifadesinin azalması, apoptotik hücre ölümüne dirençle sonuçlanarak tümör gelişimine neden olabilmektedir (Nakatsuka vd 2003). DAPK1 ifadesinin kaybı, promotor bölgesinin artmış metilasyonu ile birlikte görülebilir. Bu durum pek çok solid tümörde ve hematopoetik malignenside bildirilmektedir. DAPK1 promotor hipermetilasyonu; akciğer kanseri (NSCLC-Non Small Cell Lung Cancer) (%25- 44), baş-boyun kanseri (%18- 33), mide karsinomu (%34) ve servikal kanserleri içeren birçok solid tümörde görülmektedir (Çizelge 2. 2) (Ng 2002, Tang vd 2000).

Toyooka ve arkadaşları (2003) NSCLC’de *DAPK1* metilasyon sıklığının yüksek derecede çeşitlilik (%19- 44) gösterdiğini tespit etmişlerdir. *DAPK1* ekspresyonunun, primer NSCLC kültürlerinde, SCLC ve NSCLC hücre serilerinde sıklıkla düşük olarak bulunması, birçok akciğer kanserinde *DAPK1*’in düşük oranda ifade edildiğine işaret etmektedir. Akciğer kanserinde, *DAPK1* metilasyon sıklığının %19- 44 arası değişiklik gösterdiği ve metilasyonun, sigara içenlerde bronşiyal epitelyumda sıklıkla bulunduğu tespit edilmiştir (Toyooka vd 2003).

Hipermetilasyon; 24 nazofaringeal karsinom (NPC) primer tümör biyopsisinde (%75) ve 4 NPC hücre serisinde (%80) gözlenmiştir. Erken ve geç evre NPC’ nin her ikisinde de *DAPK1* promotör hipermetilasyonu bulunmuştur. NPC’de, *DAPK1* promotörü hipermetilasyonunun yaygın ve erken bir bulgu olduğu bildirilmektedir (Wong vd 2002).

Kawaguchi (2004); 45 LMS (Leiomyosarkoma) olgusunun 10’unda (%22) *DAPK1* hipermetilasyonu tespit etmiştir. Bu çalışmada promotör hipermetilasyonu içeren LMS’ nin 10’nunun hepsinde hem metile olmayan hem de metile olan sinyaller gözlenmiş olup ayrıca immünohistokimya boyama ile 45 LMS örneğinin 13’ünde (%29) *DAPK1* protein ekspresyonunun düştüğü saptanmıştır.

Lévy ve arkadaşları (2004); Meme kanser tiplerinde (105 invaziv meme duktal karsinomu ve 23 lobüler karsinomunda) *DAPK1* ekspresyon seviyesi immünohistokimya ile analiz etmişlerdir. Yapılan immünohistokimyasal boyamada, 128 hastadan 30’unda *DAPK1* %20’ den daha az bir boyama gösterirken, 98 hasta örneği %20’nin üzerinde boyama göstermiştir. Oysa normal meme hücrelerinde *DAPK1* %80’den fazla boyama göstermiştir. İnvaziv meme karsinomunda *DAPK1* promotörü hipermetiledir ve *DAPK1* ifadesi yüksek oranda kaybedilir. Böylece çok erken evre meme kanserinde, *DAPK1* ekspresyon kaybı tanı ve tedavi için önem teşkil eder.

Çizelge 2. 2. İnsan Kanserlerinde DAP Kinaz (Raveh ve Kimchi 2001)

İnsan Tümörleri ve İnsan Kanser Hücre Serilerinde <i>DAPK1</i> Metilasyon Düzeyleri			
Tümör Tipi	(%)	Değişiklik	Referans
B Hücre lenfoması	%84	DNA Metilasyonu	Katzenellenbogen vd. 1999
Küçük Olmayan Hücreli Akciğer Kanseri (NSCLC)	%23	DNA Metilasyonu	Etseller vd. 1999
Baş ve Boyun Kanseri ^a	%18	DNA Metilasyonu	Sanchez vd. 2000
Küçük Olmayan Hücreli Akciğer Kanseri ^b	%44	DNA Metilasyonu	Tang vd 2000
Tiroid Lenfoma	%84	DNA Metilasyonu	Nakatsuka vd. 2000
Kolon Karsinoma	%26	DNA Metilasyonu	Kissil ve Kimchi (yayınlanmamış)
Kolon ve Meme Kanseri	%15	Heterozigosite Kaybı	Kissil ve Kimchi (yayınlanmamış)
<i>DAPK1</i> İfadesi Olmayan Tümör Hücre Serileri			
B hücre Lösemisi	%80		Kissil vd. 1997
Meme Karsinoma	%30		Kissil vd. 1997
Mesane Karsinomu	%29		Kissil vd. 1997
Renal Karsinoma	%40		Kissil vd. 1997
^a Lenf Nodu Metastazı ^b Hastalığa özgü 5 yıllık tedavi			

DAPK1 solid tümörlerin yanı sıra, genin susturulması ile ilişkili olarak hematopoetik kanser hücre serilerinde de metile olarak gözlenmektedir (Katzenellenbogen vd 1999). *DAPK1*’in promotör hipermetilasyonu ile işlevini kaybetmesi, özellikle Foliküler Lenfoma olmak üzere, B hücre hastalıklarında yaygın bir bulgu olarak bildirilmektedir. Voso ve arkadaşları (2006) yaptıkları çalışma sonucu 52 Foliküler Lenfoma (FL) hastasının kemik iliği örneklerinde, *DAPK1*’in sıklıkla hipermetile olduğunu belirtmektedirler. *DAPK1*’in promotör

hipermetilasyonu ile inaktive olması özellikle FL olmak üzere, B hücre hastalıklarında yaygın (%80) bir bulgu olarak gözlenmektedir.

Hücre ölümünün pozitif bir düzenleyicisi olan DAPK1'in kaybı veya inaktivasyonu tümör hücrelerinin oluşumu ile sonuçlandığından, DAPK1 bir tümör baskılayıcı gen olarak kabul edilmektedir (Ng 2002).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. MATERYAL

3.1.1. Örnekler; A.Ü Tıbbi Biyoloji A.B.D'ye Rutin Gleevec Direnç Analizi için gelen 35 yetişkin Kronik Miyeloid Lösemili hastanın (18 Erkek- 17 Bayan) DNA örnekleri ve A.Ü. Tıbbi Biyoloji A.B.D'de önceden elde edilmiş olan 25 yetişkin sağlıklı (14 Erkek- 11 Bayan) bireyin (onamları alınmış olan) DNA örnekleri kullanılmıştır.

3.1.2. Gerekli Materyaller

3.1.2.1. Alet ve Gereçler

- a. Su banyosu
- b. Mikrosantrifüj (12.000 X g), Santrifüj
- c. Mikrosantrifüj tüpleri (1. 5- 2. 0 mL.), 15'lik falkon tüpleri, PCR tüpleri
- d. 2,5, 10, 100 ve 1000 mikrolitrelik mikropipetler
- e. pH metre
- f. Elektroforez Tankı, Güç Kaynağı
- g. Vorteks
- h. Thermocycler
- i. Otoklav
- j. 37°C Ettiv
- k. UV Jel Görüntüleme Tablası
- l. Hassas terazi
- m. Mikrodalga fırın

3.1.2.2. Kimyasallar

- a. 3M. NaOH ve NaCl
- b. %70, %90 ve %100 EtOH
- c. β -Merkaptoetanol
- d. TE tamponu (10 mM Tris-HCl, 0. 1 mM EDTA, pH 7. 5)
- e. Agaroz
- f. Sodyum Tris EDTA (150 ml. STE hazırlanması için; 5 M. NaCl.'den 3ml, 0,5 M Tris' ten 3 ml, 0,5 M. EDTA'dan 300 μ l konur. Bu karışıma 143. 5 su konularak, toplam hacim 150 ml. ye tamamlanır. Tampon hazırlanmadan önce EDTA, otoklavda steril edilmelidir.)
- g. Sodyumdodesilsülfat
- h. Proteinaz K (Proteinaz K; 20 μ L. de 500 mg. olacak şekilde hazırlanır ve -20 °C' de bekletilir.)
- i. Etidyum Bromür (EtBr)
- j. 2,5 mM.lık dNTP
- k. DNA Modifikasyon KİT Ajanları (Çizelge 3. 1)
- l. DNA Amplifikasyon KİT'i (Çizelge 3. 2)

Çizelge 3. 1. DNA Modifikasyon KİT İçeriği

Bölüm No	Tanım (description)	Miktar	Saklama Koşulları
90412	DNA Modifikasyon Reagent (ajan) I	23 g	-15 / -25°C Işıktan korunmalıdır
90413	DNA Modifikasyon Reagent (ajan) II	135 g	-15 / -25°C
90414	DNA Modifikasyon Reagent (ajan) III	700 μ l	-15 / -25°C (uzun süre) 2 / 8°C (kısa süre)
90415	DNA Modifikasyon Reagent (ajan) IV	200 μ l	-15 / -25°C

Çizelge 3. 2. DNA Amplifikasyon KİT İçeriği

Tanım	Miktar	Bölüm No	Saklama Koşulları
U Primer Seti [7,5 µM her örnek (25x)]	35 µL	90510	-15°C ile - 25 °C
M Primer Seti [7,5 µM her örnek (25x)]	35 µL	90511	-15°C ile - 25 °C
W Primer Seti [7,5 µM her örnek (25x)]	35 µL	90512	-15°C ile - 25 °C
U Kontrol DNA [0.1 µg / µL]	50 µL.	90393	-15°C ile - 25 °C
M Kontrol DNA [0.1 µg / µL]	50 µL.	90394	-15°C ile - 25 °C
W Kontrol DNA [0.05 µg / µL]	50 µL.	90395	-15°C ile - 25 °C
10x PCR Tamponu	265 µL.	90396	-15°C ile - 25 °C

3. 2. METOT

3. 2. 1. DNA İZOLASYONU

Periferik kan örneklerinden DNA'lar tuz yöntemi ile aşağıda belirtildiği gibi izole edilmiştir. Kan EDTA'lı tüplerde toplanmalı ve en fazla 2 ay bekletilmelidir. Tuzla DNA izolasyonu iki gün süren bir aşamadır;

DNA İzolasyonu 1. gün

- Kanlar 15'lik falkona konup, 13 ml. ye kadar soğuk distile (dH₂O) su eklendi.
- Buz üzerinde 1 saat inkübe edilerek hücrelerin lizis olması sağlandı.
- 20 dakika, 3500 rpm. de santrifüj yapıldı.
- Süpernatant atılır, üzerine 13 ml. ye kadar su eklendi.
- 20 dakika, 3500 rpm. de santrifüj yapıldı.
- Süpernatant atılır, üzerine 5ml. STE (Sodyum Tris EDTA Tampon) eklendi.
- 20 dakika, 3500 rpm. de santrifüj yapıldı.
- Süpernatant atıldıktan sonra 4,5 ml. STE ve 0,5 ml. SDS eklendi. [SDS hazırlarken; 5 gr. Sodyumdodesilsülfat büyük falkonda 40 mL. ye tamamlanır. 70 °C olan Pastör fırınına 50 dakika- 1 saat konur ve SDS' in erimesi sağlanır. pH ölçülür, 50 mL. ye tamamlanır.]
- 5 µl Proteinaz K kondu.
- 37 °C' de 16-18 saat bekletildi.

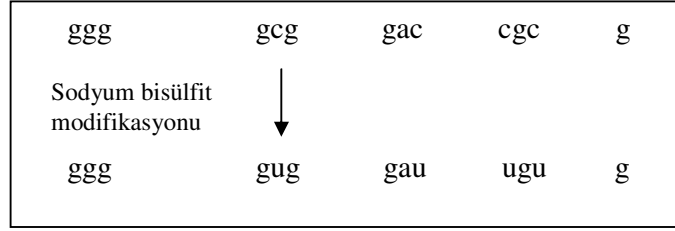
DNA İzolasyonu 2. gün

- 37 °C etüvdeki tüplerin üzerine 1 ml. doymuş NaCl₂ tuz çözeltisi konarak iyice çalkalandı.
- 2500 rpm. de 20 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant yaklaşık 1mL. ye kadar çekilerek yeni falkon tüplerine aktarıldı. Hacminin iki katı saf etanol kullanıldı.
- DNA'nın presipitasyonu için hafif sallandı ve presipite olan DNA'lar ependorfa aktarıldı.
- Aktarmadan sonra, 1300 rpm. de 10 dakika santrifüj edildi.
- Santrifüjden sonra, süpernatant atıldı ve pelet kurumaya bırakıldı.
- Kuruyan pelet üzerine 400 µl. steril dH₂O ilave edildi.
- 37 °C' de 1 gece inkübe edilerek DNA'nın çözülmesi sağlandı.

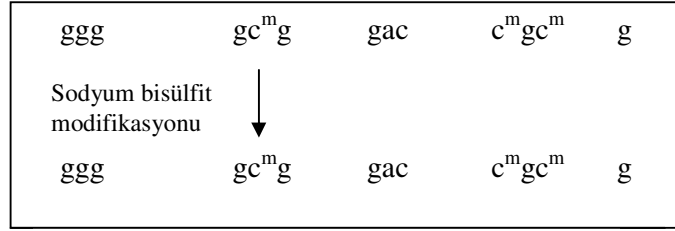
3. 2. 2. DNA MODİFİKASYONU

MSP' nin başlangıç basamağı, DNA örneğinin bisülfitle modifiye edilmesidir. DNA'nın bisülfite ile modifikasyonu sonucunda metillenmemiş olan bütün sitozinler urasile dönüşürken, 5-metilsitozinler hiçbir değişikliğe uğramadan aynen kalır. Bisülfite reaksiyonda, metillenmemiş tüm sitozinlerin deamine edilmesi ve sülfat bağlanması ile bu sitozinler, urasile çevrilir. DNA zincirlerinin bisülfite muamelesinde, metile olmayan DNA dizisi bisülfite hassas, metile olan DNA dizisi bisülfite dirençli olacaktır. (Şekil 3. 1)

Metile Olmayan DNA



Metile DNA



Şekil 3. 1. Sodyum bisülfitle DNA muamelesi

Modifikasyon aşaması, CpGGenome™ (Chemicon- Katalog No:S7820) kit protokolü kullanılarak, sitozinlerin urasile çevrilmesi ile gerçekleştirildi.

Bu KİT içeriğinde bulunan Ajan (Reagent) I; bisülfid iyonunun (HSO⁻3) Na⁺ tuzunu içerir. Metile olmayan sitozinlere sülfat bağlar ve hidrolitik olarak deamine eder. DNA daha sonra, diğer bir tuz (Ajan II) varlığında bir mikro taşıyıcı olan Ajan III'e bağlanır ve %70'lik EtOH' de resüspense edilir. Böylece tekrarlayan santrifüjler yoluyla tuzdan uzaklaştırılır. Urasile dönüşüm alkalın desülfonizasyonu ve %90'lık EtOH' de tuzdan uzaklaştırmanın tekrarlanması ile tamamlanır. DNA son olarak TE tamponu ile taşıyıcıdan uzaklaştırılır.

3.2.2.1. Ajanların Hazırlanma Aşaması

Ajan (Reagent) I

- Toz halde bulunan ve her kullanımdan önce taze olarak hazırlanan ajan I, kullanımdan önce oda sıcaklığına getirildi.
- Modifiye edilecek her bir örnek için 0.227 gr DNA Modifikasyon Reagent I ve 0.571 su kondu.
- Vorteks ile Ajan I, suda çözülecek şekilde karıştırıldı.
- Hazırlanan solüsyonun pH'sı 5.0 olmalıdır. Bunun için Ajan I'e her kullanımdan önce taze olarak hazırlanan 3M NaOH' ten yaklaşık 20 µL. konularak pH ayarlandı. Ajan I, ışıktan korunmalıdır.

Ajan (Reagent) II

- Ajan II, kullanımdan önce oda sıcaklığına getirildi.
- 20 mL deiyonize suya 1 µL β- Merkaptoetanol kondu.
- Modifiye edilecek her bir örnek için 1.35 gr DNA Modifikasyon Reagent II' ye, hazırlanan β- Merkaptoetanol ve su karışımından 750 µL. eklendi.
- Tamamlanan solüsyon iyice karıştırıldı.
- Hazırlanan ajan, 2- 8°C' de, karanlık ortamda 6 haftaya kadar saklanabilir.

3.2.2.2. DNA Modifikasyon Aşaması

- 1.5- 2. 0 mL. hacimdeki mikrosantrifüj tüplerine; 7 µL. 3M NaOH, 15 µL. DNA, 78 µL. su konarak karıştırıldı.
- 1.0 mg' dan daha az DNA içeren örnekler, 2 µL. Ajan IV eklendi.

- DNA örnekleri 50°C' de sıcak su banyosunda 10 dakika inkübe edildi.
- Her bir örneğe, taze olarak hazırlanan Ajan (Reagent) I' den 550 µL. eklenerek vortekslendi.
- Örnekler 50°C' de sıcak su banyosunda 4- 16 saat inkübasyona bırakıldı.

3.2.2.3. Tuzdan Uzaklaştırma Aşaması

- DNA Modifikasyon Ajan III kuvvetli bir şekilde vortekslenerek plastik pipetle iyice süspanse edildi.
- Tüplerdeki DNA örneklerine iyi süspanse edilmiş olan DNA Modifikasyon Ajan III' ten 5µL. eklendi.
- 750 µL. DNA Modifikasyon Ajan II eklenerek yavaşça karıştırıldı.
- Oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi.
- 5.000 X g' de 10 saniye santrifüj edilerek (küçük beyaz pelet olmalıdır) süpernatant atıldı.
- %70'lik 1.0 mL. EtOH eklenerek vorteks yapıldı ve 5.000 X g' de 10 saniye santrifüj edildi. Ardından süpernatant atıldı. Bu basamak 3 kere tekrar edildi.
- Süpernatantın 3. yıkamadan sonra atılmasıyla, yüksek hızda 2 dakika santrifüj edildi ve arta kalan süpernatant da atıldı.

3.2.2.4. DNA Modifikasyonunun Tamamlanması (Desülfonizasyon), İkinci Tuzdan Arındırma ve Yıkama Aşaması

- Örnekler 50 µL. 20 mM. NaOH/ %90 EtOH solüsyonu eklendi.
- Pelet yavaşça yapılan vorteksle resüspense edildi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
- 5.000 X g' de 10 saniye santrifüj edilerek süpernatant atıldı. %90'lık 1.0 mL. EtOH eklendi ve vorteks yapılarak pelet yıkandı. Tekrar santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Bu basamak bir kere daha tekrar edildi.
- İkinci yıkamanın ardından süpernatant atılarak örnekler yüksek hızda 3 dakika santrifüj edildi.
- Plastik pipetle arta kalan tüm süpernatant atıldı. Örnekler 10- 20 dakika oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
- 30 µL. Tris EDTA (TE) tamponu eklendi. Eklenecek TE' nin hacmi DNA'nın miktarına ve tasarlanan kullanım için gerekli konsantrasyona bağlıdır. [Örneğin; eğer 25 µL. TE eklenirse, 1 µg. DNA'nın final konsantrasyonu 40 ng/µl. olmalıdır. Pelet tamamen resüspense olana kadar yavaşça ve kuvvetli bir şekilde vorteks yapılır. El ile hafif vuruşlar yapılır. Fakat santrifüj yapılmaz]
- Örnekler 15 dakika 55°C' de sıcak su banyosunda inkübe edildi.
- Yüksek hızda 2- 3 dakika santrifüj edildi ve örnekler (süpernatant) yeni tüplere aktarıldı.
- MSP işlemi yapıldı veya hemen MSP yapılmayacaksa 2 aya kadar -15° C ile -25° C arasında, 6 aya kadar ise -80°C' de saklandı.
- Yapılacak MSP için, PCR tüplerine Ajan III' ün transferinden kaçınıldı. İlk olarak tüpler daima santrifüj edildi.

3. 2. 3. MSP (Metilasyon Spesifik PCR)

DAPKI geni promotor bölgesinin metilasyon durumu MSP (Metilasyon Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu) yöntemi ile araştırılmıştır. MSP; Sitozinlerdeki metilasyon durumunun tespiti için geliştirilen metotlardan biridir.

Metilasyon Spesifik PCR; “CpG WIZ® DAP-kinase Amplification Kit” (Chemicon-Katalog No:S7801) protokolüne göre (Çizelge 3. 3) ve ayrıca *DAPKI* promotor primer dizisi tasarlanarak (Çizelge 3. 4. ve Çizelge 3. 5.) gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3. 3. DNA Amplifikasyon KİT’i kullanılarak yapılan PCR içeriği

	Örnek		U Kontrol DNA	M Kontrol DNA	W Kontrol DNA
	U	M			
10xPCR Buffer	2,5 µL.	2,5 µL.	2,5 µL.	2,5 µL.	2,5 µL.
2,5 mM.dNTP	2,5 µL.	2,5 µL.	2,5 µL.	2,5 µL.	2,5 µL.
dH ₂ O	13 µL.	13 µL.	13 µL.	13 µL.	16 µL.
Primer	1µL.	1µL.	1 µL.	1µL.	1µL.
DNA	5µL.	5µL.	5µL.	5µL.	2µL.
1U Taq Pol. (Hot Start)	1µL.	1µL.	1µL.	1µL.	1µL.
Toplam	25µL.	25µL.	25µL.	25µL.	25µL.

Çizelge 3. 4. KİT kullanılmadan yapılan PCR içeriği

	Örnek		U Kontrol DNA	M Kontrol DNA	W Kontrol DNA
	U	M			
10xPCR Buffer	2,5 µL.	2,5 µL.	2,5 µL.	2,5 µL.	2,5 µL.
2,5 mM. dNTP	2,5 µL.	2,5 µL.	2,5 µL.	2,5 µL.	2,5 µL.
dH ₂ O	10 µL.	10 µL.	10 µL.	10 µL.	16 µL.
Primer (F-Forward R-Reverse)	2 µL UF 2 µL UR	2 µL MF 2 µL MR	2µL.UF 2 µL UR	2 µL MF 2 µL MR	1µL.
DNA	5µL.	5µL.	5µL.	5µL.	2µL.
1U Taq Pol. (Hot Start)	1µL.	1µL.	1µL.	1µL.	1µL.
Toplam	25µL.	25µL.	25µL.	25µL.	25µL.

Çizelge 3. 5. DAP kinaz promotoru primer dizisi

DAPKI Promotoru Primer Dizisi		
Metile Olmayan	Sense	5’ - GGA GGA TAG TTG GAT TGA GTT AAT GTT - 3’
	Antisense	5’ - CAA ATC CCT CCC AAA CAC CAA - 3’
Metile Olan	Sense	5’ - GGA TAG TCG GAT CGA GTT ACC GTC - 3’
	Antisense	5’ - CCC TCC CAA ACG CCG A - 3’

Tüpler thermocycler bloklarına yerleştirilir ve aşağıda belirtilen koşullarda tepkime gerçekleştirilir.

95°C - 5 dakika	} 40 döngü
95°C - 45 saniye	
58 °C - 45 saniye	
72°C - 60 saniye	

3. 2. 4. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

MSP sonucunda; 10µl PCR ürünü ve DNA markeri uygun yükleme tamponu (10 mL. Su, 10 mL. Gliserol, 1M. 100 µL. Tris, 1M. 100 µL. EDTA -pH: 8- karıştırılır ve karışıma, renk mavi olana dek brom fenol blue eklenerek hazırlanır) ile %2'lik agaroz (2 gr. Agaroz 10 mL.1xTBE ve 90 mL. dH₂O karışımında çözüldü ve buna 10mg/ml EtBr eklendi) yüklenip 130 voltta 10- 15 dakika yürütülerek, UV altında değerlendirildi. DNA Amplifikasyon KİT içeriğinde bulunan U ve M kontrol DNA'ların beklenen büyüklüğü Çizelge 3. 6. te gösterilmektedir.

Çizelge 3. 6. Kontrol DNA'lerden beklenen ürünlerin büyüklükleri

Kontroller	DAPKI
U Primer / U DNA	105
M Primer / M DNA	97
W Primer / W DNA	99

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

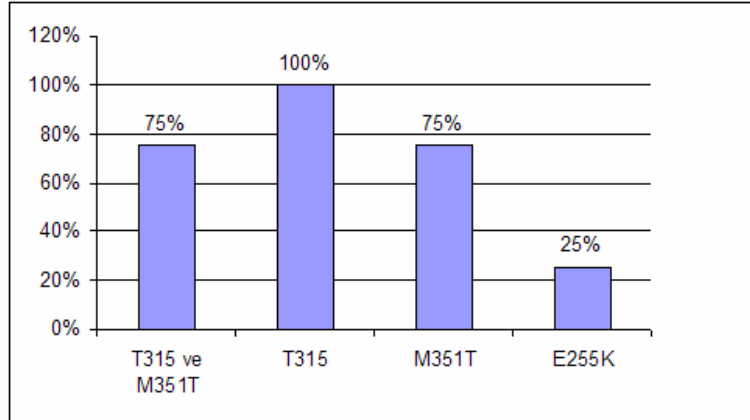
Çalışmada 35 KML (12 Gleevec dirençli KML ve 23 KML) ve 25 sağlıklı kontrol örneği analiz edilmiştir. 12 dirençli KML örneğinin 4'ü metile (M) ve metile olmayan (U) olmak üzere her iki alele sahip olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.1.) (Şekil 4.1). Buna karşın dirençli olmayan KML örneklerinin hepsi ve tüm kontrol grubu örnekleri metile olmayan alele sahiptir. Kontrol ve KML hasta grubunun *DAPK1* promotor hipermetilasyon durumlarının dağılımı ise Şekil 4.2'de gösterilmektedir. 4 dirençli hastanın 3'ünde (%75) ise T315I ve M351T mutasyonları birliktelik göstermektedir. T315I mutasyonu 4 dirençli hastanın hepsinde (%100), M351T mutasyonu 4 dirençli hastanın 3'ünde (%75), E255K mutasyonu ise 4 dirençli hastanın 1'inde (%25) tespit edilmiştir (Çizelge 4.2).

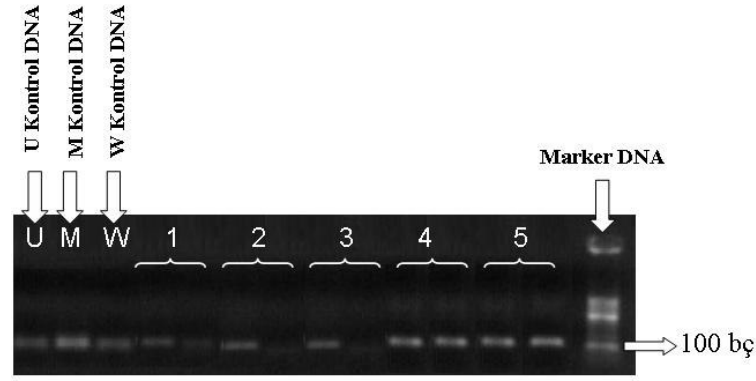
Çizelge 4. 1. Hasta ve Kontrol Gruplarında *DAPK1* Promotor Hipermetilasyon Durumları

<i>DAPK1</i>		Toplam	U	M	U ve M
Hasta (KML) Grubu	Dirençli	12	8	-	4
	Dirençsiz	23	23	-	-
Kontrol Grubu		25	25	-	-

U- Metile Olmayan Alel
M-Metile Alel

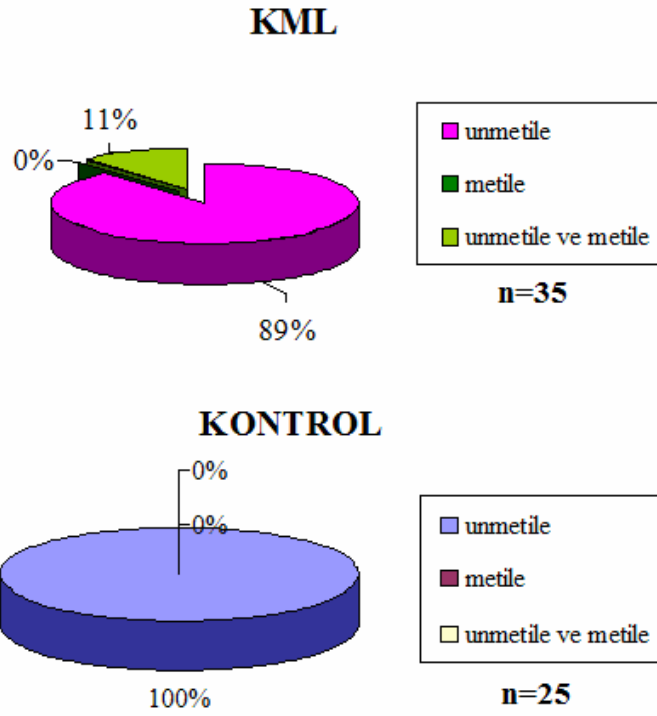
Çizelge 4.2. *DAPK1* hipermetilasyonu olan Imatinib Dirençli Hastalarda Mutasyonların Dağılımları





- 1- Metile (M) ve Unmetile (U) Alel- KML
- 2- Sadece Unmetile (U) Alel- Kontrol
- 3- Sadece Unmetile (U) Alel- KML
- 4- Metile (M) ve Unmetile (U) Alel- KML
- 5- Metile (M) ve Unmetile (U) Alel- KML

Şekil 4. 1. Kontrol ve KML hasta DNA'larının MSP sonucu Hipermetilasyon Durumlarının Jel Gösterimi



Şekil 4. 2. Kontrol ve KML hasta grubunun DAPK1 promotor hipermetilasyon durumlarının dağılımı

İlaca direnç geliştiren ve geliştirmeyen hastalar arasında uygulanan "Fisher's Exact Test" ile dirençli olan ve olmayan örnekler DAPK1 hipermetilasyonu açısından anlamlı ($p < 0.05$) olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4. 3. İlacı dirençli olan ve olmayan hastaların DAPK1 metilasyon dağılımları

		UM	
		U	UM
Direnç	Yok	23	0
		<u>%100</u>	<u>%0</u>
	Var	8	4
		<u>%66.7</u>	<u>%33.3</u>
Toplam		31	4
		<u>%88.6</u>	<u>%11.4</u>

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tümör baskılayıcı genlerde gözlenen hipermetilasyonun yanı sıra onkogen aktivasyonuna yol açan DNA hipometilasyonu tümör hücrelerinde sıkça ortaya çıkan epigenetik düzenlemelerdir. Bu değişimler solid tümörlerin yanı sıra lösemilerde de bildirilmektedir (Melki ve Clark 2002).

KML'de birçok genin hipermetilasyon düzeyi araştırılmıştır. KML hastalarının kemik iliği örnekleri ve kemik iliğinin hematopoetik öncü hücrelerinde *ABL* promotorunun hipermetilasyon durumları tespit edilmiştir. Kronik faz KML örneklerinden elde edilen birçok kolonide *ABL* promotor hipermetilasyonu bulunmuştur. *ABL* metilasyonu olan normal kemik iliği hücrelerinde nested Bcr-Abl/RT-PCR saptanmamıştır ve hematopoetik öncü hücrelerde *ABL* promotor hipermetilasyonunun erken marker olarak kullanılabileceği belirtilmektedir. (Sun vd 2001). KML'nin blastik kriz safhasındaki 5 hastadan 1'inde bir hücre döngüsü inhibitörü olan *p14^{ARF}* geni hipermetile olarak tespit edilmiştir (Kusy vd 2004). Nyugen ve arkadaşları (2000) ise KML'nin kronik ve akselere fazında sırasıyla %7 ve %9 oranında *p15^{INK4b}* metilasyonu saptamışlardır. KML dışında AML (%70) ve MDS (%40)'de de *p15^{INK4b}* metilasyonu gözlenmiştir (Kusy vd 2004). INK4 ailesinin hipermetilasyonu ile KML arasında direk bir ilişki bulunamazken, daha büyük seri çalışmaya ihtiyaç duyulduğu belirtilmiştir. Liu TC ve arkadaşları (2003) 112 KML hastasının blastik (%67) ve kronik fazında (%46) *SOCS1* genini hipermetile olarak tespit etmişlerdir. KML'de CpG adacıklarının metilasyonu yolu ile *SOCS1* geni susturulmaktadır. Sitokin sinyalinin negatif regülasyonunu regüle eden *SOCS1* geninin kaybı, KML oluşumunda rol oynayabilmektedir (TC vd 2003). Ancak literatürde DAPK1 metilasyonu ve KML ile ilgili tek bir yayın yer almaktadır (Katzenellenbogen vd 1999).

DAPK1 promotorunun hipermetilasyonu, erken evre NSCLC (NSCLC-Non Small Cell Lung Cancer)' de yaygın (%25- 44) görülen bir durumdur. 135 tümörün 59'unda (%44), *DAPK1* promotoru hipermetile bulunmuştur (Tang vd 2000). Kawaguchi (2004); 45 LMS (Leiomyosarkoma) olgusunun 10'nunda (%22) *DAPK1* hipermetilasyonu tespit etmiştir. Wong ve arkadaşları (2002) 24 nazofaringeal karsinom (NPC) primer tümör biyopsisinde (%75) ve 4 NPC hücre serisinde (%80) *DAPK1* hipermetilasyonu gözlemişlerdir. *DAPK1* promotor hipermetilasyonu; baş-boyun kanseri (%18- 33), mide karsinomu (%34) ve servikal kanserleri içeren birçok solid tümörde görülmektedir (Ng 2002, Tang vd 2000). *DAPK1*, solid tümörlerin yanı sıra, çeşitli hematopoetik kanser hücre serilerinde de farklı oranlarda metile olarak tespit edilmiştir. Örneğin, *DAPK1*'in metilasyon sıklığı; B hücrelerinde (27/34) T hücrelerinden (9/19) daha fazladır. NK-T hücre malignansisinde (15/24) DNA metilasyonu gözlenmiş (Nakatsuka vd 2003) olup Nakatsuka ve arkadaşları *DAPK1* promotor metilasyon sıklığının; B hücre neoplazilerinde (27/34) T hücreden (9/19) daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Normal B hücrelerinde gözlenmeyen *DAPK1* hipermetilasyonu, transforme B hücrelerinin karakteristiği olarak bilinmektedir (Katzenellenbogen vd 1999). Ayrıca Voso ve arkadaşları (2005) foliküler lenfomada DAP kinazı sıklıkla hipermetile olarak tespit etmişlerdir.

Lenfomaların dışında lösemilerde de *DAPK1* hipermetilasyonu gözlenmektedir. *DAPK1* hipermetilasyonu, MDS ile birlikte gözlenen AML ve anormal karyotip gösteren AML' de daha sıklıkla bulunmaktadır. Voso ve arkadaşları (2004) yaptıkları çalışmada AML' de %27. 5 (44/160) ve MDS' de %47 (16/34) oranında *DAPK1* hipermetilasyonu tespit etmişlerdir.

Çeşitli solid tümör ve hematopoetik malignesilerde yüksek oranda *DAPK1* metilasyonu gözlenmesine rağmen Reddy ve arkadaşları (2003), 143 sağlıklı bireyin 75' inde (%52), düşük *DAPK1* promotor hipermetilasyon varlığına işaret etmektedirler. *DAPK1* m-RNA ve protein ekspresyonunun B-lenfoma ve lösemi hücre serilerinde (%80), mesanede (%29), meme (%30) ve renal karsinoma hücre serilerinde (%40) artmış olması *DAPK1*'in tümör baskılayıcı bir işlevi olduğunu destekler niteliktedir (Ng 2002).

İnsan tümörlerinde *DAPK1* promotor hipermetilasyonu, majör bir *DAPK1* inaktivasyon mekanizmasıdır. *DAPK1*, apoptotik ve otofajik hücre ölümü ile tümör ve metastazın baskılanmasında etkili bir proteindir (Gozuacik ve Kimchi 2006). Buna dayanarak bu tez çalışmasında KML oluşumu ve ilaç direnci geliştiren KML hastalarında *DAPK1* metilasyon durumları arasındaki ilişki araştırılmıştır. KML'li 23 hastanın hiçbirinde *DAPK1* promotor hipermetilasyonu olmadığı saptanmıştır. Ayrıca, dirençli olan ve olmayan KML hastaları ile sağlıklı kontroller karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (p>0.05). Bu sonuca bağlı olarak KML oluşumu ile *DAPK1* promotor hipermetilasyonu arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Böylece hücre ölümünü indükleyen ve hücre proliferasyonunu engelleyici rolü olduğu gösterilen *DAPK1*'in artmış tirozin kinaz aktivitesini direkt baskılayıcı etkisi olmadığı düşünülmektedir.

35 KML örneğinden 4 tanesinde (%11) *DAPK1* hipermetilasyonu tespit edilmesi, Katzenellenbogen ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (1999) ise 13 KML örneğinde sadece bir örnekte (<%15) *DAPK1* hipermetilasyonunun saptanması bizim sonuçlarımızın literatürle uyumlu olduğunu göstermektedir.

DAPK1'in ERK1/2 üzerinden gerçekleşen proliferasyonu ve intrinsik/ekstrinsik apoptoz yolları üzerinden de tümör gelişimini inhibe edici etkisi bilinmektedir. BCR-ABL füzyon tirozin kinaz proteini ise KML hücrelerinde proliferasyonu ve hücre ölümünü engelleyici etkisini; Ras, Jak/STAT, PI3 kinaz ve Myc sinyal yolları gibi birden fazla hücre içi sinyal yolu üzerinden gerçekleştirmektedir (Gozuacik ve Kimchi 2006, Melo vd 2004, Deininger vd 2000). Ras yolağında, Ras aktivasyonu sonrası MAPK (Mitojen aktive edici protein kinaz) yolunun aktive olması, bunu takiben ERK'in nükleusa transportu ile ERK'in nükleer hedefi olan Elk-1 aktivasyonu yoluyla hücre proliferasyonuna yol açmaktadır. *DAPK1* ise BCR-ABL'in etkili olduğu bu Ras yolağı üzerinde ERK'in nükleusa girişini engellemekte ve proliferasyonu engelleyici etkisini bu şekilde göstermektedir.

DAPK1 promotor hipermetilasyonu ile hastalığın evresi ve metastazla ilişkili olduğu bildirilmektedir. *DAPK1* ekspresyonunun kaybına bağlı olarak apoptotik kontrolün baskılanması, metastaz sürecinde önemli bir etkidir (Inbal vd 1997). Tümör baskılayıcı genlerin downregülasyonu ile ilaç direnci arasındaki korelasyon konusunda çok sayıda yayın bulunmaktadır (Hirose vd 2003). Ancak literatürde ilaç direnci ve *DAPK1* metilasyonu arasındaki ilişkiyi gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Gleevec dirençli 12 KML hastasının 4'ünde *DAPK1* promotor hipermetilasyonu saptanmıştır ve dirençli olmayan hastalarla karşılaştırıldığında ilaç direnci ve *DAPK1* metilasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki ortaya konmuştur (p<0.05).

KML tedavisinde kullanılan İmatinib'e karşı gelişen direnç, BCR-ABL ekspresyonu ile indüklenir. Decitabine ve Arsenik trioksit kombinasyonu ile uygulanan İmatinib; tek başına İmatinib tedavisine hassasiyet gösteren hücre serilerinde etkili olmuştur. İmatinib direnç mutasyonlarını taşıyan hücre serilerine İmatinib ve Decitabine eklendiğinde sinerjistik aktivite gözlenmiştir. Tek tek uygulandığında ise daha düşük büyüme inhibisyonu saptanmıştır. T315I ve E255K mutasyonlarının varlığında ilave ajanların kullanımı, M351T veya Y253F mutantlarında ise doz artırılması gereklidir. T315I mutasyonu olan BCR-ABL ekspresyon eden hücrelerde İmatinib'in varlığı Decitabine (5-aza-2-deoksisitidin)'e olan direnci indükler (Rosée vd 2004). Yukarıdaki yayınlarda görüldüğü gibi, demetile edici ajanlar KML tedavisinde kullanılmaktadır. Hücre bölünmesi ve apoptozu kontrol eden genlerde metilasyon düzeyinin belirlenmesi, KML hastalarında İmatinib'e ilave ajanların kullanımını konusunda destekleyici bilgileri artıracaktır.

Kantarjian ve arkadaşları (2003), Decitabine cevabın blastik fazdaki hastalarda %28, akselere fazda %55 ve kronik fazda %63 olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada, bir hipometile edici ajan olan Decitabine, KML'de anlamlı bir aktivite göstermiştir. Decitabin, KML'nin tüm fazlarında anlamlı anti-lösemik bir etki göstermiştir.

Çalışmamızda 4 dirençli hastanın 3'ünde (%75) T315I ve M351T mutasyonları birliktelik göstermektedir. Mutasyonlar ve metilasyon düzeyleriyle ilgili herhangi bir yayına rastlanmamıştır. Ancak 2005'da Issa ve arkadaşları İmatinib'e dirençli hastalara düşük doz Decitabin uygulamışlardır. Decitabin, hipometilasyonu indükler ve imatinib dirençli KML hastalarında klinik aktiviteye sahiptir. Issa ve arkadaşları tedaviden sonra 2 haftadaki hipometilasyon ve bir hücre ölüm mekanizmasına neden olan cevap arasında ters (inverse) bir korelasyon bulunduğunu, bu şekilde dirençli hücrelerin hipometilasyona daha çok karşı koyabileceği şeklinde yorum yapmışlardır. Oki ve arkadaşları (2007), İmatinib direnç mutasyonları taşıyan hastalarda demetile ajanı (Decitabine) İmatinib'e ilave olarak tedavi protokolüne eklemişlerdir.

Decitabine ve imatinib arasındaki sinerji, imatinibe olan hassasiyete bağlıdır. Böylece, imatinib direnci tamamlanmış hastalara Decitabine'in eklenmesi, direnci ters çevirmek için yeterli olmayabilir. Buna uygun olarak, BCR-ABL kinaz mutasyonu olan hastalar bu kombine tedaviye özellikle direnç göstermişlerdir. Hipometilasyon düzeyi, hematolojik cevap kazanmış olan hastalarda, kazanmayanlara göre daha düşük olarak tespit edilmiştir. Bu bulgu, KML'de tek-ajan ("single-agent") düşük doz decitabine'in faz II çalışması ile tutarlılık göstermiştir. Bu olayın ortaya çıkışı ile ilgili olarak olası açıklamalar şunlardır (Oki vd 2007);

1. Dirençli olan hücreler, apoptozis olmaksızın hipometilasyona karşı koyabilir.

2. Hızlı çoğalan hücreler, yavaş çoğalanlara göre daha kötü prognoz göstermektedirler ve daha fazla hipometilasyon bulunmaktadır.
3. Decitabine, hipometilasyondan farklı bir mekanizma yoluyla klinik aktivite göstermektedir.

Bu tez çalışmasında T315I ve M351T birlikteliği, artmış *DAPKI* hipermetilasyonu ile korelasyon göstermektedir. Bu sonuçlar, klinikte İmatinib'e ilave demetile edici ajanların kullanımında yol gösterici olacaktır.

Tüm bu sonuçlardan yola çıkarak, bir tümör baskılayıcı gen olan *DAPKI* hipermetilasyonun KML oluşumunda direk etkili olmadığı ancak KML'de hastalığın seyri ve ilaç direncine eşlik edebileceği ve *DAPKI* hipo/hipermetilasyonunun dirençli hastalarda ilave ajanların kullanımı için kriter olarak kullanılabileceği sonucuna varılmaktadır.

KAYNAKLAR

- Beksaç, M. 1997. Klinik Hematoloji. A.Ü Tıp Fakültesi ANTİP A.Ş.Yayımları; 151- 153
- Bialik, S. and Kimchi, A. 2004. DAP-kinase as a target for drug design in cancer and diseases associated with accelerated cell death. *Seminars in Cancer Biology*, 14; 283- 294
- Chen, C., Wang, W., Kuo, J., Tsai, H., Lin, J., Chang, Z. and Chen, R. 2005. Bidirectional signals transduced by DAPK-ERK interaction promote the apoptotic effect of DAPK. *The EMBO Journal*, 24; 294- 304
- Chen, R., Wang, W. and Kuo, J. 2006. The tumor suppressor DAP-kinase links cell adhesion and cytoskeleton reorganization to cell death regulation. *Journal of Biomedical Science*, 13; 193- 199
- Cohen, O., Feinstein, E. and Kimchi, A. 1997. DAP kinase is a Ca^{+2} /calmodulin-dependent, cytoskeletal-associated protein kinase, with cell death-inducing functions that depend on its catalytic activity. *The EMBO Journal*, 16; 998- 1008
- Cohen, O., Inbal, B., Kissil, J., Raveh, T., Berissi, H. and Spivak-Kroizaman, T. 1999. DAP-kinase participates in TNF- α and Fas-induced Apoptosis and its function requires the death domain. *The Journal of Cell Biology*, 146; 141- 148
- Cooper, G. and Hausman, R. 3th Edition. *The Cell: A Molecular Approach*. 714
- Deininger, M., Goldman, J. and Melo J. 2000. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 96; 3343- 3356
- Deininger, M., Vierra, S. 2000. Bcr-Abl tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of CML. *Cancer Research*, 60; 2049- 2055
- Ducasse, M. and Brown, M. 2006. Epigenetic aberrations and cancer. *Molecular Cancer*, 5; 60
- Etseller, M. and Herman, J. 2002. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol*, 196; 1- 7
- Feinberg, A. 2004. The Epigenetics of cancer etiology. *Cancer Biology*, 14; 427- 432
- Galm, O., Herman, J. and Baylin, S. 2006. The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies. *Blood Reviews*, 20; 1-13
- Gozuacik, D. and Kimchi, A. 2004. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*. 23; 2891- 2906
- Gozuacik, D. and Kimchi, A. 2006. DAPk protein family and cancer. *Autophagy*, 2; 74- 77
- Hirose, M., Hosoi, E., Hamano, S. and Jalili, A. 2003. Multidrug resistance in hematological malignancy. *J Med Invest*, 50; 126- 35
- Ikeda, A., Shankar, D., Watanabe, M., Tamaoni, F., Moore, T. and Sakamoto, K. 2006. Molecular targets of the treatment of myeloid leukemia. *Molecular Genetics and Metabolism*, 88; 216- 224
- Inbal, B., Cohen, O., Polak-Charon, S., Kopolovic, J., Vadai, E., Eisenbach, L. and Kimchi, A. 1997. DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis. *Nature*, 390; 180- 84
- Inbal, B., Bialik, S., Sabanay, I., Shani, G. and Kimchi, A. 2002. DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. *The Journal of Cell Biology*, 157; 455- 468
- Issa, JP., Gharibyan, V., Cortes, J., Jelinek, J., Morris, G., Verstovsek, S., Talpaz, M., Manero, G., Kantarjian, HM. 2005. Phase II study of low-dose decitabine in patients with chronic myelogenous leukemia resistant to imatinib mesylate. *J Clin Oncol.*,23; 3948- 56

- Jang, C., Chen, C.H., Chen, C.C., Chen, J., Hsien, Y. and Chen, R. 2002. TGF- β induces apoptosis through Smad-mediated expression of DAP-kinase. *Nature Cell Biology*, 4; 51- 58
- Kantarjian, H.M., O'Brien, S., Cortes, J., Giles, F.J., Faderl, S., Issa, J.P., Garcia, G., Rios, M.B., Shan, J., Andreeff, M., Keating, M., and Talpaz M. 2003. Results of decitabine (5-aza-2'deoxyctidine) therapy in 130 patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer*;98, 522- 8.
- Katzenellenbogen, R., Baylin, S. and Herman, J. 1999. Hypermethylation of the DAP-Kinase CpG island is a common alteration in B-cell malignancies. *Blood*, 93; 4347- 4353
- Kawaguchi, K., Oda, Y., Saito, T., Yamamoto, H., Takahira, T., Tamiya, S., Iwamoto, Y. and Tsuneyoshi, M. 2004. DAP kinase alteration in soft tissue leiomyosarcoma: promotor methylation or homozygous deletion is associated with a loss of DAP kinase expression. *Human Pathology*, 35; 1266- 1271
- Kögel, D., Prehn, J. and Scheidtmann, K. 2001. The DAP Kinase family of pro-apoptotic proteins: novel players in the apoptotic game. *BioEssays*, 23; 352- 358
- Kusy, S., Larsen, C. and Roche, J. 2004. p14^{ARF}, p15^{INK4b} and p16^{INK4a} Methylation Status in Chronic Myelogenous Leukemia. *Leukemia&Lymphoma*, 45; 1989- 1994
- Laird, P. 2005. Cancer epigenetics. *Human Molecular Genetics*, 14; 65- 76
- Levine, B. and Yuan, J. 2005. Autophagy in cell death: an innocent convict?. *The Journal of Clinical Investigation*, 115; 2679- 2688
- <
- Lévy, D., Plu-Bureau, G., Decroix, Y., Hugol, D., Rosténe, W., Kimchi, A. and Gompel, A. 2004. Death-associated protein kinase loss of expression is a new marker for breast cancer prognosis. *Clinical Cancer Research*, 10; 3124- 3130
- Litzow, M. 2006. Imatinib Resistance, Obstacles and Opportunities. *Arch Pathol Lab Med*, 130; 669- 679
- Lu, Q., Qiu, X., Hu, N., Wen, H., Su, Y. and Richardson, B. 2006. Epigenetics, diseases and therapeutic interventions. *Ageing Research Reviews*, 5; 449- 467
- Melki, J. and Clark, S. 2002. DNA methylation changes in leukaemia. *Seminars in Cancer Biology*, 12; 347- 357
- Melo, V. J. and Deininger W.N.M. 2004. Biology of chronic myelogenous leukemia-signaling pathways of initiation and transformation. *Hematol Oncol Clin N Am.*,18;545-568
- Momparler, R. and Bovenzi, V. 2002. DNA methylation and Cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 183; 145- 154
- Morin, V., Diaz, F., Montecino, M., Fothergill-Gilmore, L., Puchi, M. and Imschenetzky, M. 1999. Poly(ADP-ribosylation) protects maternally derived histones from proteolysis after fertilization. *Bochem. J.*, 343; 95- 98
- Mosavi, L., Camment, T., Desrosiers, D. and Peng, Z. 2004. The ankyrin repeat as molecular architecture for protein recognition. *Protein Sci.*, 13; 1435- 1448
- Nakatsuka, S., Takakuwa, T., Tomita, Y., Hoshida, Y., Nishiu, M., Yamaguchi, M., Nishii, K., Yang, W. and Aozasa, K. 2003. Hypermethylation of death-associated protein (DAP) kinase CpG island is frequent not only in B-cell but also in T-and natural killer (NK)/T-cell malignancies. *Cancer Sci*, 94; 87- 91
- Ng, M. H. 2002. Death associated protein kinase: from regulation of apoptosis to tumor suppressive functions and B-cell malignancies. *Apoptosis*, 7; 261- 270
- Nyugen, T., Mohrbacher, A., Tsai, Y., Groffen, J., Heisterkamp, N., Nichols, P., Yu, M., Lübbert, M. and Jones, P. 2000. *Blood*, 95; 2990- 2992

- Oki, Y., Kantarjian, H., Gharibyan, V., Jones, D., O'Brien, S., Verstovsek, S., Cortes, J., Morris, G., Manero, G. and Issa, J. 2007. Phase II study of low-dose decitabine in combination with imatinib mesylate in patients with accelerated or myeloid blastic phase of CML. *Cancer*, 109; 899- 906
- Pane, F., Intrieri M., Quintarelli C., Izoo B. 2002. BCR/ABL genes and leukemia phenotypes: from molecular mechanisms to clinical correlations. *Oncogene*, 21; 8652- 8667
- Pattingre, S., Bauvy C, Codogno P. 2003. Amino acids interfere with the ERK1/2-dependent control of macroautophagy by controlling the activation of Raf-1 in human colon cancer HT-29 cells. *J Biol Chem*, 278; 16667- 74.
- Peedicayil, J. 2006. Epigenetic therapy-a new development in pharmacology. *Indian J Med Res*, 123; 17- 24
- Raveh, T., and Kimchi, A. 2001. DAP Kinase-A Proapoptotic Gene That Functions as a Tumor Suppressor. *Experimental Cell Research*, 264; 185- 192
- Redd, J. and Pellicchia, M. 2005. Apoptosis-based therapies for hematologic malignancies. *Blood*. 106; 408-418
- Reddy, A., Jiang, W., Kim, M., Benoit, N., Taylor, R., Clinger, J., Sidransky, D. and Califano. 2003. Death-associated protein kinase promoter hypermethylation in normal human lymphocytes. *Cancer Research*, 63; 7694- 7698
- Rosée, P., Johnson, K., Corbin, A., Stoffregen, E., Moseson, E., Willis, S., Mauro, M., Melo, J., Deininger, M. and Druker, B. 2004. In vitro efficacy of combined treatment depend on the underlying mechanism of resistance in imatinib-resistant Bcr-Abl- positive cell lines. *Neoplasia*, 103; 208- 215
- Sánchez-Capelo A. 2005. Dual role for TGF-β1 in apoptosis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 16; 15-34
- Santos-Rosa, H. and Caldas, C. 2005. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *European Journal of Cancer*, 41; 2381- 2402
- Shang, T., Joseph, J., Hillard, C. and Kalyanaraman, B. 2005. Death associated protein kinase as a sensor of mitochondrial membrane potential. *The Journal of Biological Chemistry*, 280; 34644- 34653
- Shohat, G., Shani, G., Eisenstein, M. and Kimchi, A. 2001. The DAP-kinase family of proteins: study of a novel group of calcium-regulated death-promoting kinases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1600; 45- 50
- Singal, R. and Ginder, G. 1999. DNA methylation. *Blood*, 93; 4059- 4070
- Sun, B., Jiang, G., Zaydan, M., Russa, Safah, H. and Ehrlich, M. 2001. *ABL1* promoter methylation can exist independently of BCR-ABL transcription in Chronic Myeloid Leukemia Hematopoietic Progenitors. *Cancer Research*, 61; 6931- 6937
- Tang, X., Khuri, F., Lee, J., Kemp, B., Liu, D., Hong, W. and Mao, L. 2000. Hypermethylation of the Death-Associated Protein (DAP) Kinase Promotor and Aggressiveness in Stage I Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 92; 1511- 1516
- TC, Liu., SF, Lin., JG, Chang., MY, Yang., SY, Hung. and CS, Chang. 2003. Epigenetic alteration of the *SOCS1* gene in chronic myeloid leukemia. *Br J Haematol*, 123; 654- 61
- Tchurikov, N. 2004. Molecular mechanisms of epigenetics. *Biochemistry (Moscow)*, 70; 406- 423
- Toyooka, S., Toyooka, K., Miyajima, K., Reddy, L., Toyota, M., Sathyanarayana, U., Padar, A., Tockman, M., Lam, S., Shivapurkar, N. and Gazdar, A. 2003. Epigenetic Down-Regulation of Death-associated Protein Kinase in Lung Cancers. *Clinical Cancer Research*, 9; 3034- 3041

- Voso, M., Scardocci, A., Guidi, F., Zini, G., Mario, A., Pagana, L., Hohaus, S. and Leone, G. 2004. Aberrant methylation of DAP kinase in therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Blood*, 103; 698- 700
- Voso, M., Gumiero, D., D'alo', F., Guidi, F., Mansueto, G., Febo, A., Massini, G., Martini, M., Larocca, L., Hohaus, S. and Leone, G. 2006. DAP-kinase hypermethylation in the bone marrow of patients with follicular lymphoma. *Haematologica*, 91; 1252- 1256
- Walz, C., and Sattler, M. 2006. Novel targeted therapies to overcome imatinib mesylate resistance in chronic myeloid leukemia (CML). *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 57; 145- 164
- Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M. and Losick, R. 5th edition., *Molecular Biology of the Gene*. Benjamin Cummings, 732
- Wong, T., Chang, H., Tang, K., Wei, W., Kwong, D., Sham, J., Yuen, A. and Kwong, Y. 2002. High frequency of promotor hypermethylation of the Death-Associated Protein Kinase Gene in nasopharyngeal carcinoma and its detection in the peripheral blood of patients. *Clinical Cancer Research*, 8; 433- 437
- Zingde, S. 2001. Cancer genes. *Current Science*. 81; 508- 514

ÖZGEÇMİŞ

Ankara'da 1983 yılında doğdu. İlk, orta, lise öğrenimini Ankara'da tamamladı. 1999 yılında girdiği Gazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü'nden 2003 yılında Biyolog unvanıyla mezun oldu. 2004 yılında Gazi Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü'nde başladığı Orta Öğretim Alan Öğretmenliği tezsiz yüksek lisansını 2005 yılında tamamladı. 2004 yılında girdiği Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nde Temel Biyoteknoloji yüksek lisans eğitimini 2007 yılında tamamladı.