

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOWN SENDROMLULARIN MİTOJENLE UYARILMIŞ
LENFOSİTLERİNDEKİ TOTAL RNA DÜZEYLERİNİN SAĞLIKLI
KONTROLLERİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan
Zuhal HASKÖSE (HAMURCU)**

**Tezi Yöneten
Prof.Dr.Halil DEMİRTAŞ**

**Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Mayıs 2006
KAYSERİ**

**T.C
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOWN SENDROMLULARIN MİTOJENLE UYARILMIŞ
LENFOSİTLERİNDEKİ TOTAL RNA DÜZEYLERİNİN SAĞLIKLI
KONTROLLERİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan
Zuhal HASKÖSE (HAMURCU)**

**Tezi Yöneten
Prof.Dr.Halil DEMİRTAŞ**

**Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 01.11.05 nolu proje ile desteklenmiştir.

**Mayıs 2006
KAYSERİ**

Prof. Dr. Halil DEMİRTAŞ danışmanlığında **Zuhal HAMURCU (HASKÖSE)** tarafından hazırlanan “**Down Sendromluların Mitojenle Uyarılmış Lenfositlerindeki Total RNA Düzeylerinin Sağlıklı Kontrolleri ile Karşılaştırılması**” konulu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

..../.../2006

JÜRİ :

İmza

Üye :

Üye :

Üye :

Üye :

Üye :

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Meral AŞÇIOĞLU

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince yardım ve önerilerini esirgemeyen, her türlü desteği sağlayan değerli hocam, tez yöneticim Sayın Prof.Dr.Halil DEMİRTAŞ'a, çalışmalarım boyunca beni destekleyen ve yönlendiren Prof. Dr. Hamiyet DÖNMEZ-ALTUNTAŞ'a, Doç.Dr.Nurhan CÜCER'e ve sıkıştığım anlarda yardımlarını esirgemeyen arkadaşım Araş.Gör.Nalan İMAMOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmamın yapılmasını kolaylaştıran, İmmünoloji Laboratuar Sorumlusu Sayın Prof. Dr. Türkan PATIROĞLU'na, İmmünoloji Laboratuarında bulunan arkadaşlarım Nilay BAYSAL'a, Hamza ÖTER ve Çiçek SAVRAN'a yardımlarından ve verdikleri kan örneklerinden dolayı teşekkür ederim.

Özel Eğitim ve Rehabilitasyon Merkezlerinde bulunan DS'lu hastalardan kan almamı sağlayan ve yardım eden Sayın Prof. Dr. Sefer KUMANDAŞ'a ve malzeme yardımında bulunan Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL'a teşekkürlerimi sunarım.

İstanbul Pakize İ.Tarzi Laboratuvarları'nda İmmünoloji Laboratuar Sorumlusu olan ve Flow Sitometri bilgileri konusunda yardım ve desteğini esirgemeyen Sayın Dr. Gülderen DEMİREL-YANIKKAYA'ya teşekkürlerimi sunarım.

New York Kanser Araştırma Merkezi'nde bulunan ve Flow Sitometri'de RNA ölçümünde bilir kişi olan Prof.Dr.Z.DARZYNKIEWICZ'e ve Niigata Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde bulunan K. TOBA'ya yorumlarından ve verdikleri fikirlerden dolayı teşekkür ederim.

**DOWN SENDROMLULARIN MİTOJENLE UYARILMIŞ
LENFOSİTLERİNDEKİ TOTAL RNA DÜZEYLERİNİN SAĞLIKLI
KONTROLLERİ İLE KARŞILAŞTIRILMASI**

ÖZET

Down sendromu (DS) ya da trizomi 21, insanlarda doğuştan gelen en yaygın kromozom bozukluklarından birisidir. Kromozom 21, diğer genlerin yanı sıra, aynı zamanda rRNA gen familyasının bir setini taşır. Bu çalışmanın amacı fazladan bulunan kromozom 21'in DS'lu hastaların mitojenle uyarılmış lenfositlerindeki total RNA içeriğinde bir artışa neden olup olmayacağını tanımlamaktır. Otuz sekiz DS'lu hasta ve 28 sağlıklı kontrollerin RNA seviyeleri flow sitometride ölçüldü. Örnekler yaşlarına göre iki gruba ayrıldı 12 DS'lu hasta 12-26 yaş arasında, kalan 26 hasta da 0-10 yaş arasındadır. Sekiz sağlıklı kontrolün yaşları 11-27 yaş arasında ve 20 sağlıklı kontrol de 0-10 yaş arasındadır. Bu gruplar sırasıyla "yetişkin grup" ve "çocuk grubu" olarak tanımlanmıştır. DS'luların çocuk grubunun RNA içeriği kontrol grubunun RNA içeriğine göre daha yüksek bulunmuştur ($p=0.026$). Ancak yetişkin DS'luların RNA içeriği kontrol yetişkin grubunun RNA içeriğine göre oldukça düşük bulunmuştur ($p=0.001$). DS'luların lenfositlerinde nispi RNA içeriği yaşlanmaya bağlı olarak düzenli ve önemli bir şekilde azalırken ($r=-0.70$, $p=0.000$), sağlıklı kontrollerin hücrelerinde RNA içeriği ile yaşlanma arasında önemli bir ilişki bulunamamıştır ($r=0.275$, $p=0.157$). DS'lu lenfositlerin mitojene karşı transkripsiyonel cevabının yaşla azaldığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Down sendromu, flow stometri, RNA içeriği, yaşlanma

**COMPARED WITH THAT OF THE HEALTHY CONTROLS
OF TOTAL RNA LEVELS IN MITOGEN- STIMULATED LYMPHOCYTES
OF DOWN SYNDROME PATIENTS**

SUMMARY

Down syndrome (DS) or trisomy 21 is the most common congenital chromosomal aberration in human beings. Beside the other genes, chromosome 21 carries also a set of the rRNA gene family. The aim of this work was to determine whether additional chromosome 21 causes an increase in total RNA content in mitogen-stimulated lymphocytes of DS patients. RNA levels of 38 DS patients and 28 healthy controls were studied with flow cytometry. Subjects were divided into 2 age groups. Twelve DS patients were between 12 and 26 years old, and 26 other were between zero and 10 years old. Eight healthy controls were between 11 and 27 years and 20 were between zero and 10 years old. These groups were defined respectively and arbitrarily as “adult groups” and “child groups”. Child group’s RNA content of DS was found higher than those of the child control group ($p=0.026$). Whereas, RNA content of DS’s adult was significantly lower than those of the adult control group ($p= 0.001$). Relative RNA content in DS lymphocytes decreases significantly and regularly with age ($r=-0.70$, $p=0.000$). While, no significant relationship was found between the age range and RNA content in the cells of healthy controls ($r=0.275$, $p=0.157$). We concluded that transcriptional responsiveness of DS lymphocytes to the mitogen decreases with ages.

Key words: Ageing, Down syndrome, flow cytometry, RNA content

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
İÇ KAPAK.....	I
KABUL ONAY SAYFASI	II
TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
SUMMARY	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLO LİSTESİ.....	VIII
ŞEKİL LİSTESİ.....	IX
KISALTMALAR	X
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. ÇEKİRDEKÇİK.....	3
2.2. ÇEKİRDEKÇİĞİN YAPISI.....	4
2.3. ÇEKİRDEKÇİĞİN GÖREVLERİ	5
2.4. ÇEKİRDEKÇİK VE YAŞLANMA.....	5
2.5. ÇEKİRDEKÇİĞİ OLUŞTURAN BÖLGELER	6
2.6. NOR PROTEİNLERİ.....	7
2.7. RİBONÜKLEİK ASİT (RNA)	8
2.8. RİBOZOMAL RNA (rRNA)	9
2.9. RİBOZOMAL RNA (rRNA)'nın SENTEZİ	10
2.10. SENTEZİN ANA HATLARI	11
2.11. SENTEZLENEN ÖNCÜL-rRNA'ların İŞLENMESİ VE OLGUNLAŞMASI..	12
2.12. RİBOZOMAL GEN ATİVİTESİNİN DÜZENLENMESİ	13
2.13. RİBOZOM SENTEZİ	14
2.14. RİBOZOMLARIN BİRLEŞMESİ	14
2.15. DOWN SENDROMU (Trizomi 21)	15

2.16. DOWN SENDROMLULARDA SİTOGENETİK ÇEŞİTLİLİK	16
2.16.1. Klasik Tip Trizomi 21	16
2.16.2. Translokasyon Tip Kromozom 21	17
2.16.3. Mozaik Tip Trizomi 21	17
2.17. DOWN SENDROMU VE YAŞLANMA	17
2.18. FLOW SİTOMETRİ	19
2.18.1. Çalışma İlkesi	20
2.18.2. Yöntem	22
2.18.3. Flow Sitometrinin Kullanım Nedenleri.....	23
2.18.4. Flow Sitometrinin Kullanım Alanları	23
2.18.5. Flow Sitometri ve RNA Çalışmaları	24
2.18.6. Akridin Oranj (AO)	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. GEREÇLER	29
3.2. YÖNTEM	31
3.2.1. Hastalar ve Kontrol Grupları.....	31
3.2.2. Kullanılan Solüsyonlar	31
3.2.3. Yönteminin Olgunlaşması İçin Yapılan Denemeler	33
3.2.4. Kullanılan Yöntem	35
3.3. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM	37
4. BULGULAR	38
4.1. İLK ÇALIŞMALARDAN ELDE EDİLEN BULGULAR	39
4.2. FL3=640 nm DALGA BOYUNDA LONG PASS FİLTRE KULLANILARAK YAPILAN ÇALIŞMA SONUÇLARI	44
4.3. DS'LU HASTALAR VE KONTROLLERİN RNA İÇERİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI SONUCU ELDE EDİLEN BULGULAR	56
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	64
6. KAYNAKLAR	67
ÖZGEÇMİŞ	

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa no</u>
Tablo 2.1 : Propidium iodide (PI), ethidium bromide (EB), akridin oranj (AO) ve floresan izotiyosiyanat (FITC)'in 488 nm'deki emisyonları.	21
Tablo 4.1 : Hücrelerin RNA içeriklerinin Flow sitometrik ve spektrofotometrik ölçüm sonuçları.	56
Tablo 4.2 : Çocuk grubunu oluşturan DS'lu hastaların ve kontrollerin yaş ortalamasıyla nispi RNA içerikleri (F ₆₄₀ mean-X).	57
Tablo 4.3 : Yetişkin grubunu oluşturan DS'lu hastaların ve kontrollerin yaş ortalamasıyla nispi RNA içerikleri (F ₆₄₀ mean-X).	57
Tablo 4.4 : Yaşlar dikkate alınmadan, DS'lu hasta grubu ile kontrol grubunun RNA içerikleri (F ₆₄₀ mean-X).	57
Tablo 4.5 : Yetişkin DS'lu hastaların (n=12) yaşları, cinsiyetleri ve nispi RNA içerikleri.....	60
Tablo 4.6 : Çocuk DS'lu hastaların (n=26) yaşları, cinsiyetleri ve nispi RNA içerikleri.....	61
Tablo 4.7 : Yetişkin sağlıklı kontrollerin (n=8) yaşları, cinsiyetleri ve nispi RNA içerikleri.....	62
Tablo 4.8 : Çocuk sağlıklı kontrollerin (n=20) yaşları, cinsiyetleri ve nispi RNA içerikleri.....	62
Tablo 4.9 : Çocuk DS'lu hasta grubu ile yetişkin DS'lu grubun RNA içerikleri (F ₆₄₀ mean-X)'nin karşılaştırılması.....	63
Tablo 4.10 : Çocuk kontrol grubu ile yetişkin kontrol grubun RNA içerikleri (F ₆₄₀ mean-X)'nin karşılaştırılması.....	63

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa no</u>
Şekil 2.1:	Flow sitometri birbiriyle ilişkili 4 ana bölümden oluşur 20
Şekil 4.1 :	Sağlıklı bir kişinin sıfıncı saateki nispi RNA içeriği 40
Şekil 4.2 :	Sağlıklı bir kişinin 72 saatlik total kan kültürü sonrası nispi RNA içeriğinin, sıfıncı saate göre artması gerekirken azaldığı bulundu 41
Şekil 4.3 :	Sağlıklı bir kişinin 72 saatlik izole edilmiş lökosit kültürü sonrası nispi RNA içeriğinin sıfıncı saate göre arttığı bulundu 42
Şekil 4.4 :	Sağlıklı bir kişinin Ham's F10 kullanılarak yapılmış 72 saatlik izole edilmiş lökosit kültürü sonrası nispi RNA içeriği..... 45
Şekil 4.5 :	Sağlıklı bir kişinin Peripheral blood medyum kullanılarak yapılmış 72 saatlik izole edilmiş lökosit kültürü sonrası nispi RNA içeriği, Ham's F10 kullanılarak yapılan kültürün nispi RNA içeriğine göre daha yüksek bulundu..... 46
Şekil 4.6 :	Sağlıklı bir kişinin 72 saatlik total kan kültürü sonrası nispi RNA içeriği 47
Şekil 4.7 :	Sağlıklı bir kişinin 72 saatlik izole edilmiş lökosit kültürü sonrası nispi RNA içeriği 72saatlik total kan kültürü sonrası nispi RNA içeriğine göre yüksek bulundu... 48
Şekil 4.8 :	Sağlıklı bir kişinin sıfıncı saateki nispi RNA içeriği 49
Şekil 4.9 :	Sağlıklı bir kişinin 24 saatlik izole edilmiş lökosit kültürü sonrası nispi RNA içeriği sıfıncı saate göre çok farklı bulundu..... 50
Şekil 4.10 :	Sağlıklı bir kişinin 48 saatlik izole edilmiş lökosit kültürü sonrası nispi RNA içeriği, 24 saatlik kültür sonrası RNA içeriğine göre daha yüksek bulundu... 51
Şekil 4.11 :	Sağlıklı bir kişinin 72 saatlik izole edilmiş lökosit kültürü sonrası nispi RNA içeriği, 24 ve 48 saatlik kültür sonrası nispi RNA içeriklerine göre daha fazla bulundu... 52
Şekil 4.12 :	Hastaların yaşları ve uyarılmış lenfositlerindeki nispi RNA içerikleri (emisyon F ₆₄₀) arasındaki ilişki. DS'lularda, yaş arttıkça RNA içeriğinin azaldığı bulundu.... 58
Şekil 4.13 :	Sağlıklı kontrollerin yaşları ve uyarılmış lenfositlerindeki nispi RNA içerikleri (emisyon F ₆₄₀) arasındaki ilişki. Kontrollerde yaş ve RNA içeriği arasında fark bulunamadı.... 58
Şekil 4.14 :	Hastaların yaşları ile uyarılmış hücre %'si arasındaki ilişki. DS'lularda yaş ilerledikçe uyarılmış hücre %'sinin azaldığı bulundu ... 59
Şekil 4.15 :	Kontrollerin yaşları ile uyarılmış hücre %'si arasındaki ilişki. Kontrollerde, yaş ve uyarılmış hücre %'si arasında bir ilişki bulunamadı 59

KISALTMALAR

AD	: Alzhemier Hastalığı
AgNOR	: Gümüşle boyanan NOR proteinleri
AO	: Akridin oranj
APP	: Amyloid Precursor protein (ön-amiloid protein)
DNAaz-I	: Deoksiribonukleaz -I
DS	: Down Sendromu
EDTA	: Etilendiamintetraasetikasit
FC	: Flow cytometry
FHA	: Fitohemagglutinin
FITC	: Floresanzotiyosiyanat
FM	: Fibriler Merkez
GB	: Granüler Bölge
mRNA	: Haberci RNA
NORs	: Çekirdekçiği Oluşturan Bölgeler (Nucleolus Organizing Regions)
PBS	: Fosfat Buffer Solusyonu (Fosfat tamponu çözeltisi)
PE	: Fikoeritrin
PI	: Propidyum iyodid
pRb	: Retina Blastoma Tümörü
rDNA	: Ribozomal DNA
RNA	: Ribonükleik asit
RNAaz-A	: Ribonükleaz -A
rRNA	: Ribozomal RNA
SL1	: Seçicilik faktörü
tRNA	: Transfer RNA
UBF	: Genin uç bölgesine bağlanan faktör
YFB	: Yoğun Fibriler Bölge

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Down Sendromu (DS) en çok çalışılmış en iyi bilinen, en sık rastlanan sendromlardan biri olmasına karşılık, zeka engelini oluşturan temel (moleküler) etmenler henüz tam olarak bilinmemektedir. DS'lularda fazladan bulunan 21. kromozom, bu hastaların bir rRNA gen familyası taşımasına neden olur. Daha önceki çalışmalarımız bu hastaların uyarılmış lenfositlerindeki NOR (nucleolus organizer region) alanlarının sağlıklı kontrollerinkine göre % 40'lara varan artışlar gösterdiğini ortaya koymuştur (1). NOR alanları, rDNA, rRNA, RNA polimeraz I, transkripsiyon faktörleri NOR proteinleri ve diğer bilmediğimiz moleküllerden oluşmadırlar. Bu durumda DS'luların uyarılmış lenfositleri, ya RNA, ya NOR proteinleri ya da her ikisinin sentez kontrollerini sağlıklı bireyler gibi yapamamaktadırlar.

Amacımız, bu durumu DS'luların mitojenle uyarılmış lenfositlerindeki rRNA içeriklerini ölçerek moleküler düzeyde kanıtlamaktır. Hücre içindeki RNA'ların %80 kadarını rRNA' lar oluşturmaktadır. Bu oran hücrelerin metabolik durumuna göre fazla değişiklik göstermemektedir.

Flow sitometri (FC) ile hücrelerin total RNA içeriklerini ölçmek mümkündür. DS' lu hastaların total RNA içeriklerinin bilinmesi, bu hastaların rRNA düzeyi hakkında bize bilgi sağlayacaktır.

DS'lu hastaların uyarılmış lenfositlerindeki rRNA'ların sağlıklı kişilerinkinden anlamlı ölçüde fazla bulunması durumu, bu hastaların hiç bilinmeyen bir özelliğini ortaya çıkartacaktır. O da rRNA sentez ayarını sağlıklı kişiler gibi yapamadıklarıdır. Bu gereksiz RNA sentezi temel bir handikapı ortaya koyacak ve DS literatürüne temel bir katkı getirecektir. Total RNA düzeyinin kontrollerinkiyle eşit bulunması durumunda ise gereksiz sentez ve enerji harcanışı bu kez de NOR proteinleri için düşünölmeye başlanılacaktır. Sonuçta gereksiz sentez ve enerji harcanımı bu hastalardaki fenotipi ve zeka kusurunu açıklayan bir hipotez ortaya koyacaktır: Boşa harcanan enerji hipotezi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.ÇEKİRDEKÇİK

Çekirdekçik, çekirdek içerisinde bulunan, tüm ökaryotik hücrelerin canlılığı için gerekli olan, zarı bulunmayan (2), bilinen en önemli görevi ribozom biyogenezi olan bir organeldir (2-5). Çekirdekçikler diğer hücre içi organellerle karşılaştırıldığında oldukça yoğun kütleyle sahiptir ve ilk olarak 39 yıl önce rat ve domuz ciğerinden izole edilmiştir (4). Ribonükleik asit (RNA) ve proteinlerin yoğunluğundan dolayı çekirdekçik, ışık ve elektron mikroskopuyla gözlenebilen dikkat çekici bir yapıdır (2). Ardışık olarak yinelenen çok sayıdaki rRNA genleri etrafında organize olmuştur (6, 7). Çekirdekçik sayısı, genişliği ve morfolojisi insan kanserlerinde teşhis edici bir belirteç olarak da kullanılmaktadır (2, 3, 8). Ribozomal genlerin organizasyonu ve RNA polimeraz-I, çekirdekçiğin oluşumunu ve yerini etkiler (2). Hücre döngüsünün en belirgin özelliklerinden biri de mitoz sırasında çekirdekçiğin kaybolmasıdır. Ribozomal DNA (rDNA) transkripsiyonunun durması ve öncül rRNA'ların işlenmesinin baskılanmasıyla çekirdekçiğin yapısal olarak kaybolması birbiriyle uyumludurlar (2, 6, 9). Mitoz tamamlandıktan sonra çekirdekçik

yeniden oluşur (5). Çekirdekçiklerin varlığı aktif rRNA gen transkripsiyonuna bağlıdır (7). Çekirdekçiğin korunmasında RNA polimeraz-I'in transkripsiyonel aktivitesi oldukça önemli olmasıyla birlikte, nükleolar elemanların moleküler etkileşimi, RNA'nın transkripsiyonu, işlenmesi ve olgunlaşma mekanizmaları, RNA ve rDNA içeriği de etkilidir (2, 6). Ribozom biyogenezinin anlaşılmasıyla insan hücrelerinin çekirdekçiklerinde yaklaşık 350 protein tanımlanmıştır (2). Bu proteinlerin çoğunluğu rRNA sentezinde, işlenmesinde ve ribozomları birleşmesinde, geri kalanı ise çeşitli nükleolar fonksiyonlarda bulunurlar (4).

2.2.ÇEKİRDEKÇİĞİN YAPISI

Elektron mikroskobunda çekirdekçiğin üç temel nükleolar bölgeden oluştuğu gözlenmiştir (2, 3, 6, 10, 11) Hücrenin tipine, gelişme ve fizyolojik durumuna bağlı olarak çekirdekçik geniş bir morfolojik değişkenlik gösterir (2, 6, 12). Örneğin dinlenme halinde olan insan periferel kan lenfositleri genellikle bir tek küçük çekirdekçik içerir ve bir tane fibriler bölge bulundurur, fitohemagglutinin (FHA) ile uyarıldığı zaman birkaç tane çekirdekçik ve çok sayıda fibriler bölge içerir (2, 8, 10, 13, 14).

1. Fibriler Merkez (FM): Genellikle yuvarlak yapıdadır Elektron mikroskobundaki görüntüsüne ve birkaç kıstasa göre FM ile Nükleolar Organizer Regions (NORs) yani çekirdekçiği oluşturan bölgeler birbirine benzerdir ve FM mitotik NOR'un interfazik karşılığı olarak değerlendirilir (2, 15). Bu bölge, ribozomal genleri içerir. Ama FM' deki ribozomal genlerin aktivitesi ile ilgili yoğun şüpheler vardır. Çeşitli araştırma gruplarına göre aktif ribozomal genler, ya FM/YFB (yoğun fibriler bölge) sınırında FB içinde ya da YFB/FM sınır bölgesinde YFB'nin içerisinde bulunur (2, 10, 14-16). FM memeli hücrelerde aktif ribozomal genlerin düzenlenmesi için mimari açıdan önemli bir role sahip olmasına rağmen, FM, öncelikli olarak inaktif genlerin deposu

olarak görev yapar. Aynı zamanda zayıf ifade edilen genler, yeni oluşmuş öncül-RNA zincirleri FM içinde bulunabilir (2).

2. Yoğun Fibriler Bölge (YFB) : Bu bölge genellikle FM'nin etrafını çevrelemiş biçimde bulunur, bazen çıkıntılarla FM içine girer ve bir intranükleer retikulum şeklini verebilir. YFB oldukça yoğun Ribonükleer Proteinler (RNP'ler) ve yeni sentezlenen öncül rRNA'lar topluluğundan oluşur (2, 6, 11, 17). Çeşitli araştırmalara göre rDNA transkripsiyonu ve rRNA işlenmesinin ilk basamakları yoğun fibriler bölgede yapılır (2, 14). Öncül ribozomal parçacıkların işlenme ve birleşmesinin son basamakları için YFB'den granüler bölgeye doğru hareket ederler (6, 10, 11).

3. Granüler Bölge (GB) : Granüler bölge fibriler yapıları çevreler (17). FM'ler ve YFB'ler nükleolar granüler parça olarak adlandırılan yaklaşık 15 nm kalınlığında paketlenmiş granüler bölgeye gömülürler (2). Sitoplazmaya çıkmak için hazır hemen hemen işlenmesi tamamlanmış öncül rRNA'ları içerir (2, 6, 11, 17).

2.3.ÇEKİRDEKÇİĞİN GÖREVLERİ

Çekirdekçiğin görevleri, ribozom biyogenezi, rRNA sentezi, rRNA'ların olgunlaşması, geçici non-ribozomal proteinlerle ve ribonükleer proteinlerle etkileşimini içerir (2, 5). Son zamanlarda çekirdekçiklerin tek amacı olan ribozom üretmenin dışında, ek görevlere sahip olduğu da ortaya çıkmıştır. Birkaç küçük RNA'ların nükleotid değişimlerinde (4, 9), hücre yaşlanmasında (2-4, 6, 9, 18), viral enfeksiyonlarda, nükleer harekette (9) ve hücre döngüsünün kontrolünde (2, 4) görev alır.

2.4.ÇEKİRDEKÇİK VE YAŞLANMA

Son çalışmalar ökaryot hücrelerin yaşlanmasında çekirdekçiğin önemli bir rolü olduğuna dikkat çekmişlerdir (3, 6, 9, 18). Çekirdekçikte bulunan bazı genlerin mutasyona uğraması erken yaşlanmaya neden olur. Örnek olarak bira mayasında bulunan SİR geni (silent information regulation) çekirdekçikte bulunur. Bu genin ürünü olan SİR proteini susturucu bir proteindir ve bira mayasının ömrünü uzatır. Bu proteinin

mutasyona uğraması yaşlanmaya neden olur (3, 6, 18). Bira mayasında bulunan ikinci bir gen de Sgs1 genidir. Bu genin mutasyona uğraması fenotipte yaşlanmaya neden olur (3, 6, 18) ve yaşam ömrünü % 60 kısaltır (18). Sgs1 genin insanlarda homologu Werner genidir (WRN), çekirdekçikte bulunur (3, 6, 18) ve burada rDNA metabolizmasını etkiler (18). WRN proteinin çekirdekçik içindeki yerleşimi, RNA polimeraz-I'in transkripsiyon aktivitesi ile yakın bir ilişki içinde olduğunu gösterir (3) ve burada rDNA metabolizmasını etkiler (18). Bu genin mutasyona uğraması da insanlarda Werner sendromu olarak bilinen erken yaşlanma bozukluğuna neden olur. Bu bulgular hücrel yaşlanma mekanizmasında çekirdekçiğin yer aldığını gösterir (3, 6, 18).

2.5.ÇEKİRDEKÇİĞİ OLUŞTURAN BÖLGELER (NORs)

Çekirdekçiği oluşturan bölgeler (Nucleolar Organizer Regions: NORs) ilk olarak Heitz (1931) ve McClinton (1934) tarafından zayıf boyanan kromatin bölgeleri olarak tanımlanmıştır (19). Çekirdekçiği oluşturan bölgeler olarak adlandırılan NOR'lar, rRNA genlerinin bulunduğu bölgelerdir ve beş çift akrosentrik kromozomların (13, 14, 15 21 ve 22. kromozomların) ikincil boğumlarını oluştururlar (2-4, 19-23). Asidik proteinlerin özel bir grubu NOR'larla aynı bölgede bulunur, böylece bu asidik proteinler gümüş nitrat boyama yöntemiyle NOR'ların oldukça hızlı boyanmasına izin verir. İnterfaz sırasında NOR'lar çekirdekçiğin fibriler bölgesinde bulunur. Bu yüzden çekirdekçik, metafaz NOR'nun interfazdaki karşılığıdır (2, 19, 24). Metafaz ve interfaz NOR'lar arasında sayısal olarak bir ilişki yoktur. İnterfaz NOR'ları bir tek RNA sentezi için yapısal olarak fonksiyoneldir. Ribozomal transkripsiyon için gerekli tüm elemanlar interfaz NOR'u içinde bulunur. Bu elemanlar: rRNA genleri, RNA polimeraz-I, genin üst kısmına bağlanan faktör ve topoizomeraz-I'dir (19). İnterfazik NOR'ların sadece bir kısmı transkripsiyonel olarak aktif olan ribozomal genleri içerirler. Hala bazı NOR'lar transkripsiyonel mekanizmanın elemanları için ya da gümüş boyama için pozitif değildirler (2, 19, 20, 24). Uyarılmamış lenfositlerde çekirdekçik dışında rDNA bölgeleri vardır. Bunlar transkripsiyonel olarak inaktiftirler. FHA

ile uyarıldıktan sonra lenfositlerde çekirdekçik oluşumuna katılan NOR sayısının arttığı gösterilmiştir (14). Bu da, uyarılmayla birlikte daha önce inaktif olan NOR'ların aktifleşerek çekirdekçik oluşumuna katıldığını işaret eder (14). Fakat bu NOR'lar susturulmuş genler mi içeriyorlar? Daha önceki interfazda inaktif olan genleri mi içeriyorlar? Hala bu soruların cevabı tam olarak açıklanamamıştır (2). Hem insan fibroblastlarında hem de lenfositlerinde gümüş boyama ile görünen NOR'ların sayısında yaşla ilişkili bir azalma olduğu rapor edilmiştir (12, 22, 25).

2.6.NOR PROTEİNLERİ

İnterfaz NOR'ların asıl elemanları AgNOR proteinleridir. Gümüşle boyanan asidik NOR proteinleri AgNOR proteinleri olarak tanımlanırlar (14, 15, 17, 19, 20, 24, 26). Transkripsiyon ve hücre çoğalması olmasa bile AgNOR proteinleri çekirdekçikte bazal seviyede bulunurlar (24). Asidik proteinler metafaz kromozomlarının NOR bölgelerinde bulunduğu kadar, interfaz çekirdekçiklerinin aktif ribozomal genlerinde de bulunurlar (24, 26). AgNOR proteinleri aktif rRNA senteziyle sürekli ilişkili değildir, en azından bir kısmı transkripsiyonel aktiviteden bağımsızdır ve bu proteinler daha çok ribozomal genlerde yapısal bir fonksiyona sahiptirler (8, 16, 17, 24, 26, 27). AgNOR proteinleri insan hücrelerinde intarfaz ve mitoz evresinde aynı değildirler. İnterfazda bulunan AgNOR proteinleri Nükleolin, protein B23 (ya da nükleofosmin), 42-, 40-, 29 kDal (kilo Dalton) proteinlerdir. Mitoz sırasında bulunan AgNOR proteinleri ise RNA polimeraz alt birimine, 135 kDal NOR proteinine, Upstream bağlama faktör (UBF)'ne ve 50 kDal proteinlere karşılık gelir ve bunlar ribozomal genlerle ilişkili majör AgNOR proteinleridir (19, 24).

Nükleolin: İnsan hücrelerinde 105 kDal ağırlığında bir fosfoproteindir. rRNA moleküllerinin transkripsiyonunda önemli bir rol oynar. %5'den daha az miktarı mitoz sırasında ribozomal genlerle bağlı kalır. Aynı zamanda nükleolin yapısal bir fonksiyona da sahiptir (19, 24, 27).

Protein B23: 38–39 kDal ağırlığında bir fosfoproteindir, öncül-ribozomal parçaların organizasyonun son aşamasında görev alır, daha çok sitoplazmada bulunur (19, 24).

Aktif transkripsiyon ve çoğalma sırasında tanımlanan ana AgNOR proteinleri protein B23 ve nükleolindirler. Bu nedenle kanser hücrelerinin çoğalması için kullanılan test çoğunlukla nükleer proteinlerin seviyesine dayanır, doğrudan ribozomal gen transkripsiyonu içermez (24).

2.7.RİBONÜKLEİK ASİT (RNA)

RNA'lar dinamik moleküllerdir, sentez işleme ve fonksiyonlar sırasında konformasyonlarını değiştirirler. RNA'ların sentezi RNA polimeraz enzimleri tarafından yapılır. rRNA sentezinde görev alan bu enzimler çekirdekte bulunur. Ökaryotik hücreler üç çeşit RNA polimeraz içerir, bunların yapı ve fonksiyonları birbirinden farklıdır. RNA polimeraz-I 28s, 18s ve 5.8s rRNA'yı, RNA polimeraz-II mRNA'yı ve RNA polimeraz-III tRNA ve 5s RNA'yı sentezler. 28s, 5.8s ve 18s rRNA çekirdekte, 5s rRNA çekirdekte sentezlenmeyip nükleoplazma içinde farklı genlerde sentezlenir (28, 29). Dinlenme halindeki lenfosit RNA polimerazlarının aktivite seviyeleri düşük olmasına rağmen, çekirdeği üç çeşit RNA polimerazı içerir. Uyarılan lenfositlerde üç çeşit RNA polimerazın hücresele seviyeleri artar, polimeraz-I ve III, polimeraz II'ye göre daha fazla artar. Ancak RNA polimeraz aktivitesinde görülen artış, total RNA sentez oranında görülen artış kadar büyük olmaz. Bu istirahat halindeki hücrelerde daha fazla miktarda RNA polimeraz bulunduğunu gösterir. Polimeraz-I ve III'ün hücresele seviyeleri hücresele büyüme ve çoğalmanın daha fazla olduğu hücrelerde daha fazladır, halbuki RNA polimeraz-II'nin seviyesi nispeten sabit kalır (28).

Hücre büyümesinin kontrolü ve rRNA arasındaki ilişkiyi tanımlamak için, son çalışmalar rRNA transkripsiyonunda tümör supressör proteinlerin rolü üzerine olmuştur. Retinoblastoma tümör supressör proteini (pRb) hücrelerin hem büyümesini hem de çoğalmasını baskılar. pRb polimeraz-I tarafından rRNA'nın sentezlenmesini baskılayabilir. pRb'nin RNA polimeraz-II ve III ile yapılan transkripsiyon üzerinde de

etkisi vardır. Bundan dolayı, pRb üç polimeraz sistemi arasında önemli düzenleyici bir bağ sağlar, düzen bozulduğu zaman kontrolsüz hücre çoğalması ve büyümesine yol açabilir (3).

Çoğu hücre tipinde hücresel total RNA'nın yaklaşık %80'nini rRNA'lar oluşturur. Kalan total RNA'nın %15'ini t-RNA ve %5'lik kısmını da mRNA'lar oluşturur (29, 30).

2.8. RİBOZOMAL RNA (rRNA)

Bira mayasından ileri yapılı ökaryotik hücrelere kadar tüm somatik hücreler onlarca, yüzlerce ardışık şekilde yinelenen çok sayıda ribozomal genleri içerir ve bu genler rDNA olarak adlandırılır. Çoğunlukla her genom ardışık olarak düzenlenen genlerin yaklaşık 300-400 kopyasını içerir. Bu genler 13., 14., 15., 21. ve 22. kromozomlar olmak üzere beş çift akrosentrik kromozomun ikincil boğumlarında bulunur ve onlarca ardışık tekrarlar halinde organize olurlar (2-3, 5-8, 22, 25). rDNA transkripsiyonu ve rRNA işlenmesinin ilk basamakları yoğun fibriler bölgede olur (2, 17, 25).

Ribozomal genlerin ikinci önemli özelliği, ribozomal kromatinin genişlemiş 2-3 nm kalınlığında DNA filamentler topluluğundan oluşan non-nükleozomal yapıda olması ve histon içermemesidir. Bu ribozomal kromatin yapısı transkripsiyonel aktivite ile değişmez, bağımsızdır (15, 16, 20). Ribozomal kromatinin sadece bir kısmı transkripsiyonel olarak aktiftir (16) ve memelilerde rRNA genlerinin yaklaşık %40'ı transkribe edilir (8). Aynı zamanda ribozomal genler, diğer genlerin tersine tüm hücrelerde ifade edilir (18). NOR proteinlerin en azından bir kısmı nükleer transkripsiyonel aktiviteden bağımsız görünür, belki bunlar yapısal fonksiyonla yani replikasyon için nükleer kromatini hazırlamakla ilişkilidir. Bu yüzden gümüş boyamanın kantitatif tanımı sürekli tam olarak rRNA genlerinin transkripsiyon sayısı olarak tanımlanamaz (8).

rRNA genleri, hücre büyümesi ve çoğalmasını kontrol eden sinyal iletim ağının anahtar bir elemanını oluştururlar (7). rRNA'lar nükleolar yapı ve ribozom biyogenezinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamasına rağmen, rRNA sentezi aktif rRNA gen sayısındaki değişikliklerden

etkilenmez, yani sentez total gen sayısına bağılı değildir (7, 8). Örneğin fibroblastların in vitro yaşlanması sırasında transkripsiyon ünitelerinin sayısının değişmeden kaldığı görülmüştür (8).

Hücrel RNA içeriği sabit bir artış göstermez, kültür şartlarıyla ve kültür yaşıyla değişir (31). İstirahat halindeki lenfositlerde rRNA sentezi çok düşük seviyede bulunur, FHA ile etkileşimden sonra rRNA sentezi artar, önceden inaktif olan rRNA genleri transkripsiyon için aktif hale gelir (8-13). Çekirdek transkripsiyon aktivitesi hücrenin metabolik durumuyla yakından ilişkilidir. Çünkü protein sentezi, rRNA içeren sitoplazmik ribozomları kullanır.

rRNA genlerinin sayısında yaşla bir kayıp olduğu bilinmektedir. (12, 22, 25).

2.9.RİBOZOMAL RNA (rRNA)'nın SENTEZİ

rRNA'ların sentezi, çekirdekçiklerin kayb olduğu sırada mitozda durdurulur, fakat mitozun sonunda çekirdekçikler yeniden oluşur ve rRNA sentezi yeniden başlar (2). Öncül rRNA sentezi oldukça aktif bir süreçtir. rRNA genleri RNA polimeraz-I tarafından transkribe edilir ve ribozomal proteinlerle ribozom biçiminde paketlenir (5, 7). rDNA transkripsiyonun, çekirdekçiğin FM ve YFB'nin sınırlarında oluştuğu kabul edilir (2, 10, 29). Maya ve memelilerde büyümeyi ve çoğalmayı etkileyen faktörler rRNA genlerinin transkripsiyonu üzerinde hem doğrudan hem de hızlı bir etkiye sahiptir (2). Ribozomal genlerin transkripsiyonu hücre büyümesi ve hücre döngüsü sırasında aşırı düzenleme/ayarlamaya uğrar. G1 başlarında ribozomal genlerin transkripsiyonu düşük olup, S ve G2 evresinde maksimuma ulaşır, mitoz sırasında transkripsiyon tamamen durdurulur (2). Transkripsiyon büyümedeki değişikliklere ve birçok çevresel uyarılara cevap vermek için düzenlenir (7). rRNA sentezinin düzeyi metabolik aktivitesi fazla olan memeli hücrelerinde yüksek, tersine tamamen farklılaşmış hücrelerde rRNA üretimi çok düşük olabilir. İnsan periferik lenfositleri böyle durgun hücrelerin bir örneğidir. Yüksek ya da düşük rRNA

üretimini, zayıf beslenme, hormon ya da ilaç tedavisi, yaşlanma, tümörler ve viral enfeksiyon gibi olaylar sağlar (2, 29).

2.10.SENTEZİN ANA HATLARI

Memelilerde rDNA transkripsiyonu RNA polimeraz-I tarafından yapılır. Her bir ribozomal gen ünitesi genellikle bir transkribe edilen bölge ve uçta transkribe edilmeyen bölge içerir. Memeli hücrelerinde gen promotor bölgesi üst bölgeyi kontrol eden elemanlar (upstream control element) ve iç promotor (core promotor)'dan oluşan iki önemli dizi içerir. Bunlar transkripsiyon başlama kompleksinin oluşmasını sağlar. Bu kompleks polimeraz-I'in yanı sıra, rDNA'nın transkripsiyonunun başlaması seçici faktör 1 (SL1), üst bölgeye bağlanan faktörünü (UBF), TATA'ya bağlanan proteini (TBP), transkripsiyonu aktive eden faktörleri ve diğer birkaç faktörü içerir. Başlama kompleksinin oluşumu, ptomotor bölgesine SL1'in gelmesinden önce ya da sonra kromatinin yeniden yapılanmasını da içeren bir süreçtir. UBF 97 kDal ağırlığında bir polipeptittir ve RNA promotorunun DNA kontrol elemanlarını tanıır. SL1 rRNA promotor bölgesine tek başına bağlanamaz. Ancak UBF varlığında SL1, rRNA promotor seviyesinde DNA'ya bağlanan kompleksleri düzenler (2, 3, 29). rRNA'ların transkripsiyonu spesifik olup, SL1 sadece aynı kökenden gelen modelin transkripsiyonunu yönetir (3).

Polimeraz-I, uzun öncül rRNA'ları sentezler. Bu öncül molekül 18s, 5.8s ve 28s rRNA dizilerini, ayrıca iç ve dış transkribe edilmeyen bölgelerin dizilerini içerir (2, 29) .

rRNA genlerinin susturulması transkripsiyon sonlandırıcı faktör olan TTF-I ile başlar ve bu faktörle başlayan susma, promotor yakınındaki nükleozomların toplanmasına neden olur. Bu faktör, rRNA geninin sessizleşmesine öncülük eden ribozomal kromatinin yeniden oluşmasına yani DNA'nın metilasyonuna ve histon'un deasetilasyonuna neden olur. Sonuçta deasetilasyon, rDNA sentezinin durmasına katkıda bulunur, UBF de metillenmiş promotora bağlanamaz ve transkripsiyon aktivasyon şelalesi bozulur (2, 29).

2.11.SENTEZLENEN ÖNCÜL-rRNA'ların İŞLENMESİ VE OLGUNLAŞMASI

Olgun ribozomal rRNA'nın biyogenezi kompleks bir işlemdir. Bu işlem için, non-ribozomal proteinlerin ve çeşitli küçük çekirdekçik RNA'larını (snoRNAs) içeren ribonükleoproteinlerin (RNPs) bulunması gereklidir. Öncül rRNA'lar büyük ve öncül molekül olarak sentezlenir. Yeni sentezlenen öncül-rRNA'ların işlenmesinde endonükleaz ve ekzonükleaz kesim enzimleri görev alır. Ribozomun küçük alt biriminin 18s rRNA ve 5.8s rRNA'ları ile büyük alt biriminin 28s rRNA'sını serbest bırakmak için bu kesme işlemleri yapılır. Psödoüridin sentaz ve metil transferaz yaklaşık 200 nükleotidlik rRNA düzenlenmesinde bulunur. RNA helikaz ve RNA chaperon RNA katlanması/yeniden yapılanmasına aracılık eder. GTPaz ve ATPaz protein birleşmesine ve ayrılmasına yardım eder (2). Metilasyon ise ya metil transferazlarla ya da küçük nükleolar riboproteinlerle (snoRNP) yapılır. SnoRNP'ler uygun snoRNA'lar ve

protein parçacıkları içerir. SnoRNP'lerin çoğu 18s rRNA oluşumu için gereklidir (5, 32).

Öncül-rRNA'ların işlenmesi yapılırken hem trans etkileşimli faktörler, hem de ribozomal proteinlerin büyük bir çoğunluğu öncül-rRNA'lar üzerinde toplanır. Öncül-ribozomal partiküller işlenmelerine paralel biçimde YFB'den GB'ye doğru hareket eder ve partiküller alt ünitelerine ayrılmadan önce nükleoplazmaya girerler ve hemen hemen tamamlanmış ribozomal alt üniteleri çekirdekten özel adaptor moleküllerin yardımıyla nükleer por kompleksinden sitoplazmaya çıkarlar (2, 29). Burada 40s ve 60s ünitelerinin son olgunlaşmaları yapılır. İşlenmenin çoğu basamağında düzenleme vardır.

Çekirdekçik, rRNA'ların işlenmesi için en uygun bölgeler olarak bilinir. Bununla birlikte diğer bazı RNA türlerinin işlenmesi de çekirdekçikte olur. Örneğin çekirdekçik öncül t-RNA ve aynı zamanda t-RNA'nın 5' ucunu işleyen RNaz proteinlerini (RNaz P) içerir (11).

2.12.RİBOZOMAL GEN ATİVİTESİNİN DÜZENLENMESİ

Ribozomal genlerin önemli bir kısmı transkripsiyonel olarak inaktiftir yani ifade olmazlar. rRNA genlerinin sentezini düzenleyen birkaç mekanizmanın olduğu ileri sürülmüştür. rRNA sentezini düzenleyen mekanizmalar oldukça karışık olup, kromatinin yeniden düzenlenmesini, ribozomal genlerin susturulmasını ve aktif genlerin transkripsiyon durumuna geçişini içerir. Bu düzenleme mekanizmasıyla genler ya susturulur ya da açık duruma (aktif) getirilir. Susturulmuş ribozomal genler nükleozom içerir ve kapatılmış heterokromatin durumundadır, geriye kalan ribozomal genler nükleozom içermez ve açık ökromatin durumundadır. Kromatinin açık olması bir gerekliliği gösterir ama ribozomal genlerin aktifliği için yeterli değildir. Tam tersine kromatinin kapalı formu, ribozomal genlerin inaktif olması için yeterlidir (2).

Çok sayıda RNA polimeraz transkripsiyonel faktörleri vardır. Bunların görevleri, fosforilasyon, asetilasyon ve protein-protein etkileşim mekanizmalarıyla düzenlenir. rDNA'nın transkripsiyonunda görev alan proteinlerin fosforilasyonu, öncül rRNA'ların sentezinde hem negatif hem de pozitif etki yapar. Örneğin UBF'nin fosforilasyonu interfazda rDNA'nın transkripsiyonunu artırır, mitoz sırasında rDNA transkripsiyonunu durdurur. Asetilasyon ve metilasyon rDNA transkripsiyonunun düzenlenmesinde de rol oynar. Metilasyon rDNA'nın etkisizleşmesine neden olurken, asetilasyon transkripsiyonunu artırır (29).

Çeşitli sinyal yolları da rRNA transkripsiyonunun düzenlenmesinde bulunur (2, 7, 11, 29). Aynı zamanda retinoblastoma pRb UBF'ye bağlanarak, protein p53 de SL1'e bağlanarak polimeraz-I'in transkripsiyonunu sürdürmesini baskılar. Transkripsiyon faktörünün görev durumu aynı zamanda protein-protein etkileşimiyle düzenlenir. Bu etkileşim transkripsiyon faktörünün aktivitesini ya artırır ya da baskılar (2).

2.13.RİBOZOM SENTEZİ

Ribozom sentezi hem büyüme, çoğalma, hücrel adaptasyon ve enerji için hem de hücrelerin biyosentetik talebi için gereklidir (29). Hızlı büyüyen hücreler kaynakların birçoğunu tüketir ve hem maya hem de insan hücrelerinde hücrenin büyümesi ve düzenlenmesi için ribozom sentezi anahtar kontrol noktası olarak ortaya çıkar (11). Tüm organizmalarda ribozom biyosentezi sırasında polisistronik öncül rRNA transkripti, 40s alt ünitenin olgun 18s rRNA ve 60s alt ünitenin olgun 25/28s rRNA ve 5.8s rRNA'larının olgunlaşması için işlenir (11, 32). Bu işlenme sırasında olgun rRNA sekansları geniş nükleotid modifikasyonlarına çok sayıda snoRNA'lar tarafından yönetilmeye maruz kalırlar. İlâveten rRNA'lar ribozomal proteinlerle ve bağımsız olarak sentezlenen 5s rRNA ile birleşirler (32).

2.14.RİBOZOMLARIN BİRLEŞMESİ

Üç tane temel öncül ribozomal partikül tanımlanmıştır. 90s ilk partikül 66s ve 43s öncül-ribozomlar şeklinde işlenir, bunlar da 60s ve 40s olgun ribozomal alt ünitelerinden oluşan olgun 80s ökaryot ribozomlarını oluşturur. Küçük ünite olan 40s partikül, 18s rRNA ve 33 çeşit protein içerir. Daha büyük olan 60s alt ünite 28s, 5.8s ve 5s rRNA ile 49 çeşit protein içerir (5, 32). Ribozomlarla yapılan protein sentezi hücre büyümesi, çoğalması ve çevresel değişikliklere uyum için çok önemlidir. Örneğin büyüyen bir HeLa hücresi dakikada yaklaşık 7500 ribozomal alt ünite üretir ve yaklaşık 300.000 ribozomal proteinler, çok sayıda trans etkileşimli faktörlerin birleşmesini ve ayrılmasını gerektirir. Bu nedenle ribozomal sentezin her seviyesinde düzenleme gereklidir (2, 11, 29).

2.15.DOWN SENDROMU (Trizomi 21)

1959'da Lejeunei, Gauteier ve Turpin Down Sendromu (DS) ile üç adet kromozom 21 arasındaki ilişkiyi keşfetmişlerdir (33). Trizomi 21 ya da DS insanlarda görülen en yaygın kromozomal anomalilerden biridir. Doğumlarda oluşma sıklığının 1/600-1/800 arasında olduğu tahmin edilmektedir. DS, mental retardasyonun temel otozomal genetik sebebi olarak bilinir ve karakteristik yüz özelliklerine sahiptirler. Temel özellikleri, kalp bozukluğu, yaşlı insanlarınkine benzer immün sistem değişiklikleri, bakteri ve viral enfeksiyonlara yatkınlık, lösemi sıklığı, yaklaşık 40 yaşlarının başlarında Alzheimer tipi nöropatolojinin gelişmesidir. Bu sendrom genellikle mayotik ayrılamamadan oluşur (34-38) ve bu durumun anne yaşıyla ilgili olduğu bilinir (34). Bireylerin çoğunluğu yaklaşık %95'i kromozom 21'in üç kopyasını içerirler ve bunlar klasik tip trizomi şeklindedir, % 4-5'i translokasyon tipine, %1'lik kısmı da mozaik forma sahiptirler (34, 35).

Kromozom 21 en küçük kromozomlardan biridir ve otozomların aktif genetik materyalinin en az miktarına sahip olduğu bulunmuştur (39). Kromozom 21'in tamamlanmış sekansının tamamı DNA'nın yaklaşık 33,5 Mb kısmına karşılık geldiği bilinir ve Gardiner'a göre (37) yaklaşık 300 gen içerir. Kromozom 21 üzerinde bulunan genler metabolik zincirde ve biyolojik sistemde görev alır. Örnek olarak mitokondrial enerji üretimine ve reaktif oksijen metabolizmasına katıldığı görülen en azından 16 gen vardır, ya da tahmin edilmektedir. 10 tane gen merkezi sinir sisteminin yapısı ve fonksiyonu üzerinde etkiye sahiptir ve DS'luların nöropatolojisinde bir rolü olabilir. Kromozom 21 üzerinde bulunan en azından 6 gen, gen ifadelerinin kontrolünü yapan metil grubu metabolizmasında bir role sahiptir (33).

DS'na genellikle fazladan bulunan kromozom 21'in sebep olmasına rağmen (37, 39), bazen kromozom 21'in uç kısmının yarısının bulunması da (21q22-21qter bandı) sebep olur. Yalnız bu bandın üç kopyasının varlığı DS'nun tüm majör fenotipini ortaya çıkarmak için yeterlidir. Yaklaşık 10 tane gen bu bölgede bulunur. Bunlardan biri kromozomun aktif transkripsiyon bölgesinde bulunan protein kodladığı bilinen HMG-14 genidir ve bu gen aktif kromatin yapısında bulunur. Bu genin rolünden dolayı aşırı ifade olması DS'lu hastaların hücrelerinde RNA sentez oranının düzensizliğine yol açabilir. Sonuçta HMG-14 proteinin yükselmiş seviyeleri DS'luların etiyolojisine katkıda bulunan bir faktör olabileceği ihtimalini yükseltir (40, 41).

Trizomi 21'in nasıl DS fenotipini oluşturduğuna dair iki hipotez ileri sürülmüştür. Bunlardan birincisi kromozom 21 üzerinde bulunan genlerin tamamının değil, fakat belli bir kısmın fazladan kopyalarının bulunması, kompleks DS fenotipinin oluşmasında katkıda bulunabilir. İkinci hipoteze göre ise, bu genlerin ürünleri diğer gen ya da gen ürünlerinin ifade olmasını doğrudan veya belki de dolaylı işlemler aracılığıyla etkileyebilir (42).

2.16.DOWN SENDROMLULARDA SİTOGENETİK ÇEŞİTLİLİK

2.16.1.Klasik Tip Trizomi 21 (47,XX ya da XY, +21)

21. kromozomun iki yerine üç kopyasının bulunması sonucu ortaya çıkan bir düzensizliktir. Vakaların % 95'i bu tipte bulunmaktadır ve mayotik ayrılmamadan yani mayoz-I'de kromozomlar kutuplara ayrılırken bir tetradin olduğu gibi bir kutba gitmesinden ya da mayoz-II'de bir kromozomun sentromerinden ayrılamaması (non disjunction)'ından kaynaklanır. Bu hataların başlangıcı şu şekilde sıralanabilir (43):

1) Trizomi 21 ile sonuçlanan mayozdaki hatalar büyük bir ihtimalle maternal (anne) kaynaklıdır. Çünkü spermatogenez sırasında sadece yaklaşık % 6.7 ihtimalle trizomi 21 oluşur.

2) Anne kaynaklı mayozda hataların çoğunluğu mayoz-I'de ortaya çıkar. Anne yaş ortalamasıyla ilgilidir ve yaş ortalaması genel olarak 31.2 kabul edilir. Mayoz-I'deki hatalar maternal mayotik hataların % 77.5'ini oluşturur ve bu durum klasik tip trizomi 21'in tüm örneklerinin % 68'ini açıklar.

3) Maternal mayoz-II'deki hatalar maternal kaynaklı hataların % 22.5'ini içerir. Bu hatalarda ortalama anne yaşı 32.5'tir.

4) Trizomi 21'in küçük bir kısmı yaklaşık % 6.7'si paternal (baba kaynaklı) ayrılmamadan kaynaklanır. Hatalar mayoz-I'den ziyade daha çok mayoz-II'de oluşur.

5) Klasik tip trizomi 21'li vakaların yaklaşık % 5.5'i mitozdaki bir hatadan ortaya çıkar. Mitotik hatalarda fazla olan kromozom 21'in anne ya da babadan gelme olasılığı eşittir.

2.16.2.Translokasyon Tip Kromozom 21 [46,XX ya da XY der (14;21)(q10q10)+21 ve 46,XX ya da XY der (21;21)(q10q10)+21]

Vakaların % 5'i translokasyon tip trizomi 21'e sahiptir. Translokasyonların en yaygını t(14;21) ve t(21;21)'dir. Bu tür translokasyonlar Robertsonion tip translokasyon olarak da adlandırılır. Fazla olan 21. kromozom çoğunlukla maternal orijindir ve anne yaş ortalaması

29.2'dir. Bu vakaların az bir bölümü anne ya da babanın taşıyıcı olmasından kaynaklanır. Çoğunluğu ise gametogenez sırasında ortaya çıkar. Bu olayların oluşmasına neden olan en muhtemel mekanizma mayoz-I'de krosing over'dan önce translokasyonun oluşmasıdır ve bu mayoz-I ve II'deki normal ayrılmalarla takip edilir.

2.16.3.Mozaik Tip Trizomi 21 (46/47, XX ya da XY, +21)

Vakaların çok az bir kısmı bu tipte bulunur. Hücrelerden bir kısmı 46, bir kısmı da 47 kromozomludur. Mozaik birey oluşumu zigot bölünmesinin ilk evrelerindeki 21.kromozomun ayrılmamasına dayanır.

2.17.DOWN SENDROMU VE YAŞLANMA

DS'lular yaşlanmayla ilgili bozuklukların erken başlaması yüzünden hızlı yaşlanmanın iyi bir modeli olarak düşünülür (36, 39). Çünkü erişkin DS'lularda normal yaşlanmayla ilgili klinik işaretlerin çoğu daha erken yaşlarda ortaya çıkar (35). Örneğin saçların erken beyazlaşması, otoimmünitede bozukluk artışı, amiloid dejeneratif vasküler hastalık ve katarakt gibi. DS'da yaşlanmayı etkileyen genetik durumu incelemek için 5 yetişkin erkek ve 6 yetişkin DS'lu kadının biyolojik yaşları hesaplanmış ve DS'da biyolojik yaşa göre yaşlanma oranının, sağlıklı kişilere göre hemen hemen iki kat arttığı bulunmuştur. Bu kişilerde biyolojik yaşlanmanın düzensiz olması, kısmen immün bozukluk ve immün sistemin erken yaşlanmasına bağlı olabilir (44). DS'da temel DNA tamir enzimlerinin seviyesi ve aktivitesi yaşla özellikle de 13-25 ve 26'dan büyük yaş grubu arasında düştüğü bulunmuştur. Bu trizomi 21'lerde görülen hızlı yaşlanma semptomları için sebeplerden biri olabilir (39). Kromozomal fragil bölgeler hastalıklar ya da yaşlanma için önemli genetik bölgelerdir. Fragil bölge 6p21 sadece yaşlı DS'lu bireylerde gözlenmiştir. Burada bulunan gen kromozomal değişikliklerle ilgili olabilir ve DS'ın yaşlanma işlevinin primer mekanizması olabilir (35). Alzheimer hastalığı (AD)'nın ve normal yaşlıların karakteristik özelliği nörotik plakalarda ve serebrede amiloid proteinlerin depolanmasıdır. Amyloid β proteini (A β), Amyloid Precursor Protein

(APP)'nin büyük bir parçası olarak sentezlenir. Membranla ilgili glikoprotein olan APP haberci proteindir. APP'yi kodlayan gen 21.kromozom üzerinde bulunur. Beyinde APP'nin rolü henüz açıklanmamasına rağmen, serin proteaz inhibitörü olarak fonksiyon gösterir. APP'nin aşırı üretimi ya da işlevindeki hata A β 'nin aşırı üretimine neden olur. Sonuçta amiloid plaklarında depolanma ve nörotoksisite oluşur. APP'deki bu artış DS'da erken yaşlanmaya sebep olabilir (45). DS'lu bireylerde AD'nin başlaması genel popülasyondaki yaşlı bireylere göre 20'li yaşlar olarak bilinir. 40 yaşına kadar hemen hemen tüm DS'lu bireyler nöropatolojik değişikliklere beyinlerinde nörotik plaklara ve A β protein depolarına sahip olurlar (36). Yapılan bir çalışmaya göre, yaş ortalaması 28.7 olan DS'lu hastaların lenfositlerinde, APP'nin içeriği, yaş ortalaması 28.3 olan genç sağlıklı gruba göre oldukça yüksek bulunmuştur (45). Alzheimer tipi nöropatolojinin gelişmesi DS'lu erkeklerde kadınlara göre daha erken yaşlarda başlar ve AD'nin gelişmesinin daha fazla olduğu gösterilmiştir. Normal popülasyonda ise AD'nin sıklığı erkeklere göre kadınlarda daha yüksektir. Telomer uzunluğu normal somatik hücrelerin çoğalmasında bir biomarker olduğu için, DS'lu bireylerin lökositlerinde telomer kaybı normal popülasyonla kıyaslandığında hızlanmıştır ve bu DS'ularda erken yaşlanmayı yansıtabilir (36). İnsanlarda CuZnSOD enzimi (SOD-1) kromozom 21 üzerinde 21q22 bölgesinde bulunan bir gen tarafından kodlanır. SOD-1'in görevi hidrojen peroksit oluşturmaktır. DS'ularda üç kopyası bulunan bu segment mental retardasyon, erken yaşlanma ve Alzheimer tipi sinirsel patolojinin gelişmesine katkıda bulunabilir ya da sorumlu olabilir. Bu hipotezi test etmek için insan CuZnSOD genini taşıyan transgenik fare geliştirilmiş ve SOD-1 aktivitesinin dolayısıyla da lipit peroksidaz seviyesinin transgenik farelerin beyinlerinde kontrollere göre yüksek olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, CuZnSOD geninin dozaj etkisi DS'lu hastaların beyinlerinde gelişen hızlı erken yaşlanma patogenezinde rol oynayabilir (46).

1983–1997 yıllarını kapsayan bir çalışmada , DS'luların yaş ortalaması 1983 yılında 25 iken, 1997'de 49'a yükselmiştir (33). DS'u genellikle erken ölüme yol açmasına rağmen tıbbın ilerlemesi ve bu insanların bakımı için iyi planlanmış sağlık yönetimleri ile DS'ın yaşam ömrü önemli ölçüde uzatabilmiştir (44).

2.18.FLOW SİTOMETRİ

İlk kez 1934 yılında Moldaven tarafından bir akım içindeki beyaz kürelerin fotoelektrik yöntemlerle sayılmasından sonra, flow sitometri teknikleri geliştirilmiş, modern tıpta vazgeçilmez tanı yöntemlerinden biri olmuştur.

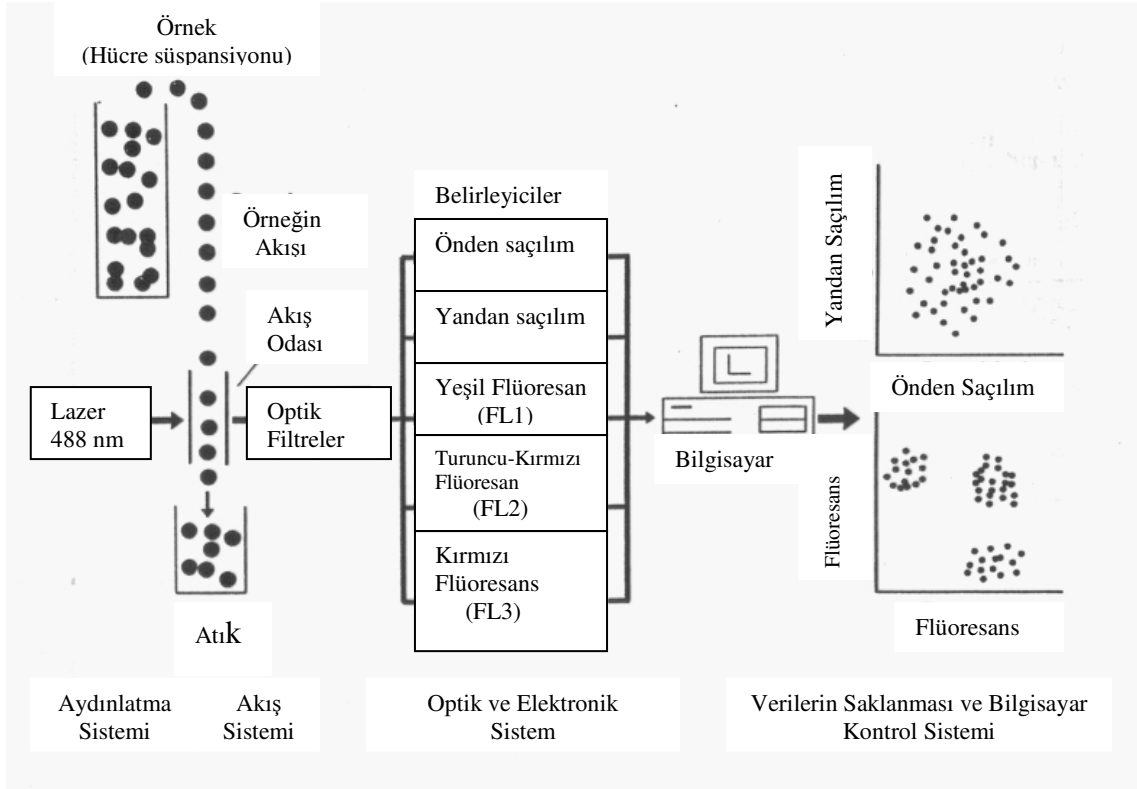
1965'te bilgisayar yardımıyla multiparametrik incelemeler yapılmaya başlanmış, lazer ışınlarının yardımıyla cihazlar geliştirilerek, 1970'li yıllarda immünoloji laboratuvarlarının bir parçası haline gelmiştir.

Günümüzde flow stometri, immünoloji, patoloji, genetik gibi birçok bilim dalında rutin ve araştırma amaçlı olarak kullanılan, tanı, izlem ve prognoz tahmini açısından nesnel ve yinelenen bilgiler üreten bir yöntem olarak güncelliği artmaktadır (47).

2.18.1.Çalışma İlkesi

Flow sitometri çok karmaşık bir alettir, birbiriyle ilişkili dört ana bölüm olmak üzere birçok sistemin birleşmesinden oluşmuştur (Şekil 2.1) (48). Bunlar ;

1. Örneği toplayıcı ve taşıyıcı sistem
2. Akış sistemi (sheath fluid)
3. Işık kaynağı (lazer kaynağı)
4. Silindirik filtreler
5. Odaklama aynaları
6. Sinyal dedöktörleri (optik ve elektrik sinyal)
7. Bilgisayar (veri toplanması, saklanması, sunumu ve analiz).



Şekil 2.1. Flow sitometri birbirisiyle ilişkili dört ana bölümden oluşur.

Süspansiyon haline getirilmiş ve işaretlenmiş olan hücreler hava basıncı ile sheat fluid içinden geçirilir. Sheat fluid içindeki sıvının akışı çok hızlı olduğundan bir basınç oluşturur ve bu basınçla hücreler camdan yapılmış akış kabine (flow chamber) gelir. Bu kabinin geometrik şekli ve sıvının laminar akışı, hücrelerin tek bir sıra halinde geçişini sağlar ve tek sıra halindeki hücreler lazer ışığı içinden geçerek görünür hale gelirler.

Lazer kaynağı olarak argon iyonu, kripton, helyum-neon ya da helyum-kadmiyum kullanılır. İşaretlemede kullanılan proplar lazer ışığı ile aktive olduklarından ışın yayarlar ve bu sayede tespit edilebilirler.

Genelde lazer kaynağı olarak argon iyon lambası kullanılır. 488 nm dalga boyundadır. Propidyum iyodid (PI), etidyum bromür (EB), akrinin oranj (AO) 488 nm'de aktive olurlar. Fakat bunların emisyonları farklıdır (30) (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Propidium iodide (PI), ethidium bromid (EB), akrinin oranj (AO) ve floresan izotiyosiyanat (FITC)'in 488 nm'deki emisyonları

Boya	Substrat	Lazerle uyarılma	Emisyon dağılımı
AO	DNA	488 nm	510-530
AO	RNA	488 nm	590-640

ED	DNA, RNA	488 nm	550-640
PI	DNA, RNA	488 nm	550-640
FITC	Protein	488 nm	510-530

Hücreye bağlı florokrom, lazer ışığı ile aktifleşir ve bu enerjiyle ışın yayar. Bu yayılan ışığın yoğunluğuna göre hücre boyutu, içyapısı, yüzey morfolojisi ve hücrelerin canlılığı hakkında bilgi edinilir.

Aktifleşme sonucu açığa çıkan flüoresan, fotodiadlara toplanır, ışık yayan (photo multiply) tüplerle (PMT) elektrik sinyaline çevrilerek amplifiye edilir ve sonuçlar bilgisayara iletilir (47, 48).

Flow sitometri ölçümünde kullanılan 3 parametre vardır (48). Bunlar :

- 1. Önden Saçılım (Forward Angle Light Scatter=FALS=FS) :** Önden saçılımı sağlar. Hücre boyutunu, büyüklüğünü gösterir.
- 2. Yandan Saçılım (Right Angle Light Scatter=RALS=SS) :** Yandan saçılımı sağlar ve hücrenin granülaritesini, içyapısını gösterir.
- 3. Flüoresans (F=FL1,FL2,FL3) :** Flüoresansı gösterir. 488 nm de uyarılırlar. FL1 (520 nm) yeşil, FL2 (530 nm) turuncu, FL3 (>600 nm) kırmızı rengi gösterir.

Bu parametreler kullanılarak bir süspansiyon içindeki hücrelerin büyüklükleri, parçacıkları (granülariteleri) ve taşıdıkları flüoresan işaretler aynı anda değerlendirilir.

FS/SS histogramı ile hücre süspansiyonundaki farklı popülasyonlar birbirinden ayrılabilir. Örneğin periferik kanda lenfositler küçüktür ve az granülarite gösterirler, monositler orta büyüklüktedir ve orta granülarite gösterirken, granülositler ise daha büyük ve daha fazla granulariteye sahiptir (47).

2.18.2.Yöntem

Flow sitometri çalışmasının aşamaları şunlardır (47, 48) :

- 1. Hücre süspansiyonunun hazırlanması:** Ölçüm için hücrelerin mutlaka suspanse halde olması gerekir. Kan, kemik iliği, beyin omurilik sıvısı (BOS), idrar gibi doğal olarak süspansiyon haldeki hücreler genellikle doğrudan kullanılır. Fikse edilmiş ve parafine gömülmüş doku örneklerinin ise parçalanarak süspansiyon haline getirilmesi gerekmektedir

2. Hücrelerin işaretlenmesi: Hücreler, izolasyondan ve saf eldesinden sonra bir veya daha fazla flüoresan işaretli monoklonal antikörlerle konjuge edilir. Flüoresan bağlı bu monoklonal antikörlere prob denir. Hastalığın teşhisi hangi hücre popülasyonu ile çalışılacağını gösterir ve o hastalığa özgün problemler kullanılır. Birden fazla monoklonal antikör kullanıldığında aynı dalga boyunda uyarılan fakat farklı dalga boylarında ışık yayan flüoresan boya ile işaretli olması gerekir. Bu amaçla genellikle FITC (flüoresan izotiyosiyanat: yeşil) ve PE (fikoeritrin: kırmızı) flüoresan boya kullanılır. Farklı flüoresan işaretli boya kullanılması aynı anda iki farklı parametrenin tayinine olanak sağlar.

Hücre işaretleme her zaman yüzeydeki antijene özgü monoklonal antikörlerle olmaz. Canlılığı etkilemeksizin hücre zarı geçirgen hale getirilerek hücre içine giren DNA ve RNA ya bağlanan flüoresan boya kullanılabilir. Örneğin akridin oranj aynı anda hem DNA'yı hem de RNA'yı boyayarak hücrenin DNA ve RNA içeriği ölçülebilir.

3. Veri toplama ve değerlendirme: Veriler nokta dağılımı grafiklerinde ve histogramlarda toplanır. FS/SS histogramında hücre popülasyonunu seçerken kapılama işlemi kullanılır. Örneğin bir kan örneğinde lenfositler seçildikten sonra CD4 ve CD8 oranları saptanabilir. Histogramlarda hücre sayısına karşı hücrelerin büyüklük granülarite ve flüoresan boya alma şiddetleri ayrı ayrı incelenebilir.

2.18.3.Flow Sitometrinin Kullanım Nedenleri

1. Kantitatif tek hücre seviyesinde hızlı, ve çok parametrelili analiz imkanı sağlanması,
2. Hücre alt gruplarının sayısal ve yapısal farklılaşmasında kullanılabilmesi,
3. Hücreleri fonksiyonel, biyokimyasal, morfolojik veya sitogenetik karakterizasyonuna ek olarak hücre alt gruplarının sınıflandırılmasına olanak sağlanması.

2.18.4.Flow Sitometrinin Kullanım Alanları

Flow sitometri sistemi, süspansiyon halindeki hücrelerde yüzey antijenlerinin belirlenmesi, B hücreleri ile T hücre alt gruplarının tayini

lösemi ve lenfoma tiplmesi DNA, RNA analizi gibi birçok konuda kullanılmaktadır.

1. Heterojen hücre popülasyonlarının tanımlanması,
2. Hücre büyüklüğü ve granülarite (parçacıkları),
3. Hücre içi ve yüzey antijenlerinin saptanması,
4. DNA içeriği,
5. RNA içeriği,
6. Sitokin tayini ve NK aktivitesi ölçümü,
7. Nötrofil fonksiyonları-fagositoz tayini,
8. Apoptosis ölçümü,
9. Trombosit tayini.

Bunlardan immünfenotipleme en çok çalışılan konudur. İmmünfenotipleme, hücre yüzeyinde ifade olan antijen moleküllerine karşı özgün antikor kullanılarak hücrelerin tanımlanmasıdır. Lösemi ve lenfoma immünfenotiplemesinde yaygın olarak kullanılır. Böylece hastalığın tanısı ve tedavisi hakkında bilgi edinilmektedir.

DNA'ya özgü boyalar kullanılarak flow sitometride bir tek hücrenin DNA içeriğini ve hücrenin çoğalma aktivitesini ölçmek mümkündür. Bu nedenle flow stometri kemoterapinin düzenlenmesinde büyük öneme sahiptir.

DNA analizi sonucu iki tip bilgi edinilir;

1. Go ve G₁ fazında bulunan hücrelerin DNA içerikleri,
2. Hücre döngüsünün fazları tespit edilebilir.

2.18.5.Flow Sitometri ve RNA Çalışmaları

Hücre metabolizması, hücrenin spesifik fonksiyonları ile ilgili özel gereksinimler kadar, temel ihtiyaçlara karşı hücreyi ayarlamak amacıyla da düzenlenir. Bu düzen çoğunlukla proteinlerle ilişkilidir,

proteinler genlerin ifadesi olarak değerlendirilir. DNA ve proteinler arasındaki bağlantı, transkripsiyon ürünü olan RNA ile, translasyon için gerekli olan matriksle ve bu işe karışan çok sayıda düzenleyici basamaklarla sağlanır (49).

RNA iki farklı bakış açısından çalışılmaktadır (49) :

Birincisi, total RNA global hücre metabolizmasını yansıttığı için çalışılır

İkincisi, genlerin ifadelenmesinin karşılığı olan genler hakkında bilgi verdiği için spesifik mRNA üzerine çalışmalar yoğunlaşmıştır.

Çoğu hücre tipinde hücresel total RNA'nın yaklaşık % 80'nini rRNA'lar oluşturur, kalan RNA'nın çoğunu tRNA'lar ve total RNA'nın minör kısmını da mRNA'lar oluşturur. Total RNA'nın içeriği bu yüzden aslında her bir hücrenin ribozom sayısının bir göstergesidir ve hücrenin potansiyel translasyonunu yansıtır. Daha çok öncül-rRNA'lar olan nükleer RNA'lar aynı zamanda hücrenin protein sentez kapasitesi ile ilgilidir ve bunların artması sitoplazmada ribozomal mekanizmanın oluşmasına çoğunlukla öncülük eder. Böylece ya tam hücrenin ya da izole edilen çekirdeğin RNA değerinin ölçümü hücrenin translasyon kapasitesinin bir işaretidir. Her bir hücrenin RNA içeriği arasındaki farklılıklar iki olaya bağlıdır (30)=

1. Doku tipine ya da translasyon aktivitesinin seviyesi ile ilgili hücre farklılaşmasına bağlıdır. Dokuya özgü protein üreten hücreler (plazma hücreleri ya da nöronlar), protein ürettiği ya da salgıladığı bilinen hücreler genellikle yüksek RNA içeriği ile tanımlanır. Bu olaylarda hücresel RNA içeriği farklılaşmış hücrelerin fenotipini yansıtır.

2. RNA içeriğindeki değişikliğin ikinci sebebi hücre çoğalmasıyla ilgilidir. Bölünen hücrelerde hücre döngüsü sırasında ribozomların sayısı dahil hücre öğeleri iki kat artar. Hücre döngüsü boyunca ilerleme hücresel RNA içeriğindeki artışla ilgilidir ve RNA içeriğindeki artış hücrenin çoğalması ile orantılıdır. Hücresel RNA içeriği bu yüzden hücre

döngüsünde hücre olgunlaşmasını yansıtır, yani hücrelerin erken ve geç G1 fazlarını ayırt etmeye izin verir. Hücre büyümesi sırasında hücre genişliği (ribozomların sayısı) ve çoğalma oranı iki katına çıktığı için RNA bu yüzden aynı zamanda hücre çoğalmasının dolaylı bir işaretidir.

Hücre döngüsünden çıkan hücreler (Go evresinde) hücre döngüsü sırasındaki ribozomlardan ortalama 5–10 kat daha az ribozom içerirler. Böylece RNA içeriğindeki farklılıklar hücre döngüsüne girmeyen hücrelerin tanımlanmasını sağlar ve hücrelerin mitojenik uyarılmasında belirleyici olarak kullanılabilir. Bu şimdiye kadar kullanılan RNA metodunun en yaygın uygulama alanıdır.

Hücrel RNA ölçümleri klinik onkolojide birkaç uygulamada kullanılır. Tümör hücrelerinde RNA içeriğinin bazı kanser çeşitlerini belirlemede bir işaret olduğu gösterilmiştir. Çünkü tümör oluşumu, kontrolsüz hücre çoğalmasının ya da hücre farklılaşmasındaki bozukluğun bir sonucudur. Bu olaylar hücrel RNA içeriği ile ilgilidir. Aynı zamanda yaygın olarak bilinir ki, nükleolar aktivitenin tüm işaretleri yani öncül-rRNA'nın senteziyle ilgili aktivite tümörlerde belirleyici bir değerdir. Çoğu anti-tümör ilaçlar hücre döngüsüne özgü olduğu için, hücrel RNA içeriği aynı zamanda böyle ilaçlara karşı tümör hücrelerinin duyarlılığını gösterir. Ayrıca anti-tümör ilaçlarla etkileştirilen hücrelerin dengesiz büyümesi, ilaca karşı hücrenin cevabı, hücre ölümünü ve iyileşmesini gösteren bir faktör olarak RNA içeriğinin ölçümlerinden tahmin edilebilir (30).

Genelde RNA, çoğu tümör hastalıklarının tanı ve teşhisinde kullanmak için ilginç bir parametre olarak gösterilmiştir. Bu geniş klinik uygulamaların yanı sıra RNA veya DNA ölçümleri birçok temel çalışmalar için de kullanılabilir (49).

RNA içeriğini ölçmek için kullanılan en yaygın boya AO'dır (50, 51).

2.18.6.Akridin Oranj (AO)

Flow stometri kullanılarak yapılan RNA çalışmalarının çoğunluğu AO'ın flüoresan özelliğine dayanır. AO'ın özelliği, çift veya tek zincirli nükleik asitlere bağlandığı zaman absorpsiyonu ve emisyonunun değişiklik göstermesidir. Boyanın emisyon ve absorpsiyon spektrumundaki değişme metakromazi adını alır ve bu yüzden AO metakromatik florokrom bir boyadır.

AO'ın metakromatik özelliğinden dolayı nükleik asitlerin konformasyonunu ve içeriğini belirlemede yaygın bir prob olarak kullanılır.

AO'ın maksimum absorpsiyonu yaklaşık 455–490 nm'dir. 488 nm argon iyon lazeri uyarılmada kullanılan en yaygın dalga boyudur. Merkur ya da ksenon lambalarıyla aydınlatılan aletlerde uyarıcı mavi filtre kullanılır (30, 49).

AO çift zincirli nükleik asitlere interkalasyon (araya girme)'la bağlanır ve mavi ışıkla uyarıldığı zaman yeşil flüoresan verir, maksimum emisyonu 530 nm'dir. Tek zincirli nükleik asitlerle etkileşimi komplekstir ve çok basamaklı bir süreçtir. Komşu bazlar arasına AO'ın girmesiyle başlar, bu katyonik boya polimer nötralizasyonunu oluşturur, daha sonra yoğunlaşma ve çökelme olur. Yoğunlaşan ürünün parlaklığı (ışığı) kırmızıdır ve emisyonu da 640 nm'dir. Sonuçta hücrelerin DNA içeriği yeşil flüoresanda, RNA içeriği de kırmızı flüoresanda ölçülebilir (30, 49).

Hücrelerde rRNA ve tRNA'nın büyük bir kısmı çift zincirli halde bulunur. Bu yüzden AO'la DNA ve RNA'nın farklı boyanmasını sağlamak için, DNA'nın çift zincirli yapısının korunacağı şartlar altında seçici denaturasyon yapılması gereklidir (30, 49). Parçalayıcı ajan

EDTA'nın varlığında AO'la hücrelerin muamelesi, seçici olarak çift zincirli RNA'nın denaturasyonuna neden olur. Kararlı olan çift zincirli RNA'nın ribozomlarda RNA-protein birleşiminin kırılmasıyla, EDTA çift zincirli RNA'nın denaturasyonunu başlatır. AO'nun seçici RNA denaturasyon özelliği, tek zincirli DNA'ya göre tek zincirli RNA'ya daha yüksek afiniteyle bağlanmasından dolayıdır (30).

AO'la hücre boyaması, nispeten yüksek iyonik kuvvetli tuz solüsyonlarında yapılır, ve AO'nun nükleik asitlere bağlanmasında elektrostatik elemanların önemi vardır (30).

Seçici RNA denatürasyonu kuvvetli iyonik solüsyonda ve boyanın sınırlı bir konsantrasyonunda gerçekleşir. Düşük AO konsantrasyonu tamamen RNA'yı denatüre etmez, sonuçta düşük AO konsantrasyonu hem DNA'yı hem de RNA'yı yeşile boyar. Yüksek konsantrasyonu ise DNA'nın denaturasyonuna yol açabilir. Hem RNA hem de DNA kırmızıya boyanabilir. Bu yüzden AO flow sitometride kullanılan boyaların tersine çok sıkı ve zor şartlar gerektirir. Özellikle de boya konsantrasyonu ve boya solüsyonunun iyonik kuvveti önemlidir (30).

Şimdiye kadar AO RNA içeriğini ölçmek için en yaygın kullanılan boya olmuştur. Buna rağmen alternatif boya prosedürleri vardır. Tiyoflavin T, Tiyazole Oranj retikülosit analizlerini görüntülemek için kullanılır. Pironin Y (PY) retikülositin otomatik sayımı için de kullanılır, ama PY çift zincirli RNA'ya özgüdür ve aynı zamanda RNA içeriğinin analizi için metilen-yeşili gibi diğer boyalarla ya da fikse edilmeyen hücrelerde DNA ya da RNA analizi için Höst 33342 ile birlikte kullanılır (49). AO'la boyamanın avantajı çeşitli hücre tipine ve olgunlaşma durumuna göre değişen RNA'nın tam miktarını ölçmeye yardım eder (52). AO'la boyama metodu hücre döngüsü boyunca (G_1 , S, G_2+M) uyarılan hücrelerin durumunu analiz etmeyi de sağlar (50).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.GEREÇLER

Demirbaş Malzemeler

1. Flow Sitometri (Coulter, EPİCS XL)
2. Laminar air flow kabin (N Class II, Crouzet CH 48 G)
3. Etüv (Heto/Cell Hause 200)
4. Santrifüj (Jouan C 312)
5. Hassas terazi (Kern S2000)
6. Otomatik pipet
7. Mikroskop (Olympus model CHK)
8. Derin dondurucu
9. Buzdolabı
10. pH metre

Sarf Malzemeler

1. 50 ml'lik polisitren steril kültür flaskı (Greiner flask 690160)
2. Dereceli stten kapaklı 17x17ml'lik 10 ml steril Polisitren steril tp (Greiner 184261)
3. Dereceli stten kapaklı 12x75ml'lik 5 ml steril Polipropilen tp (Greiner 115261)
4. Toma lamı
5. Özel pipet
6. RNA izolasyon kiti (High pure RNA izolasyon kiti)
7. Periferel Blood medyum (Sigma P 2602)
8. RPMI 1640 medyum (Sigma, r 0883)
9. Fikol-Histopak (Sigma 1077-1)
10. Akridin Oranj (Merck 1333)
11. DNAaz-I (Sigma)
12. RNAaz-A (Amresco)
13. Triton X-100 (Sigma T 9284)
14. HCl (Merck)
15. Na₂HPO₄.H₂O (Merck)
16. Sitrik asit (Horasan Kimya)
17. NaCl (Merck)
18. Na₂EDTA (Merck)
19. KCl (Merck)
20. KH₂PO₄ (Merck)
21. MgCl₂ (Merck)
22. Glasial asetik asit (Merck)
23. Aktinomisin-D (Cosmogen flakon, 0.5 mg Aktinomisin D)
24. 5 ml'lik ampullerde steril distile su
25. Distile su
26. İzoton (Coulter Izoton 2)
27. Klenz solüsyonu (Coulter Clenz)
28. Enjektör
29. Çamaşır suyu (Aslan)

3.2.YÖNTEM

3.2.1.Hastalar ve Kontrol Grupları

Çalışma için, yaşları 0–27 arasında olan ,38 Down sendromlu (DS) ve 28 sağlıklı kişi kullanılmıştır. DS'lu hastalar Özel Eğitim ve Rehabilitasyon merkezlerinden ve Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri Polikliniğinden toplanmıştır. DS dışında başka bir genetik anomaliye sahip olmayan ve herhangi bir ilaç kullanmayan hastalarda çalışılmıştır. Kontrol olarak normal diploid kromozoma sahip olan ve klinik açıdan sağlıklı olan herhangi bir ilaç kullanmayan kişiler kullanılmıştır. Hasta ve kontrol örneklerimiz 12–27 yaş arası (yetişkin grup) ve 0–10 yaş arası (çocuk grup) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. 12–27 yaş grubunda 12 DS'lu hasta ve 8 sağlıklı kişide, 0–10 yaş grubunda ise 26 DS'lu hasta ve 20 sağlıklı kişide çalışılmıştır. 0–11 aylık olan bebekler 0 yaş olarak kabul edilmiştir. Çocuk grubunda olan 26 DS'lu hastanın 24'ü klasik tip trizomi 21 karyotipine sahipken, iki kişi translokasyon tipi kromozom 21'e sahiptir [46, XX der (14;21)(q10q10)+21 ve 46, XY der (14;21) (q10q10)+21]'tir. Yetişkin grubunda bulunan tüm hastaların klasik tip trizomi 21 (47, XX+21 ve 47, XX+21)'e sahiptir. Yetişkin grubunda bulunan DS'lulardan 1'i kız ve 11'i erkek, çocuk grubunda bulunan DS'ların 13'ü kız ve 13'ü erkektir. Sağlıklı kişilerin ise yetişkin grubu 4 erkek ve 4 kız, çocuk grubu 10 erkek ve 10 kızdan oluşmaktadır.

3.2.2.Kullanılan Solüsyonlar

Akridin Oranj (AO) stok solüsyonu: 1mg/ml

10 mg AO

10 ml ditile su

Çözelti karıştırıldı ve alüminyum-folye ile sarılarak buzdolabında +4°C'de saklandı (51, 53).

Permabilizasyon Solüsyonu pH:1.2 (Solüsyon A)

0.1 ml Triton X-100 (son konsantrasyonu % 0.1)

8 ml 1N HCl (son konsantrasyonu 0.08 N)

0.877 g NaCl (son konsantrasyonu 0.15 N)

100 ml'ye distile su ile tamamlandı. Alüminyum-folye ile sarılarak buzdolabında +4°C'de saklandı (51, 53).

AO Boyama Solüsyonu pH:6.0 (Solüsyon B)

37 ml 0.1M sitrik asit

63 ml 0.2 M Na₂HPO₄

0.877 g NaCl (son konsantrasyonu 0.15 M)

34 mg disodyum EDTA (son konsantrasyonu 1mM)

0.6 ml stok AO (20 µM)

Alüminyum-folye ile sarılarak buzdolabında +4°C' de saklandı (51, 53).

2 mM MgCl₂'lü Fosfat Çözelti Solüsyonu pH: 7.2-7.4 (2 mM MgCl₂-PBS)

8 g NaCl

0.2 g KCl

1.44 g Na₂HPO₄.2H₂O

0.2 g KH₂PO₄

1000 ml'ye distile su ile tamamlandı. PBS'in her bir litresine 4.9 M MgCl₂'den 0.408 ml ilave edildi. Buzdolabında +4°C' de saklandı (51).

DNAaz Solüsyonu pH:5.5

10 mg DNAaz

1000 µl 2 mM MgCl₂-PBS

RNAaz Solüsyonu pH:8.0

2 mg RNAaz

200 µl 2 mM MgCl₂-PBS

Lökosit saymak için kullanılan solüsyon:

3 ml glasiyal asetik asit

97 ml distile su

3.2.3.Yöntemin Olgunlaşması İçin Yapılan Denemeler

AO Konsantrasyonunun Belirlenmesi : 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M ve 40 μ M olmak üzere 4 farklı konsantrasyonda AO içeren 4 tane boyama solüsyonu hazırlandı. Sağlıklı bir kişinin kan örneğinin lökositleri izole edildikten sonra sıfırcı zamanda (in vivo) 4 farklı konsantrasyondaki boya solüsyonu kullanılarak hücreler boyandı ve flow sitometride ölçüm yapıldı. Sonuçlara göre hem FL3=620 nm hem de FL3=640 nm'de en iyi konsantrasyonun 20 μ M AO olduğuna karar verildi.

Hücrelerin DNAaz-I ile Etkileştirilmesi : Hücrelerin DNaz'la etkileştirilmesi literatür doğrultusunda uygulandı (30). İki tüp hazırlandı. Tüplerden biri kontrol olarak kullanıldı, diğeri DNAaz-I'le etkileştirildi. Etkileştirmek için aşağıdaki yöntem uygulandı.

Uygulanan yöntem=

1. 200 μ l hücre süspansiyonu (lökosit)
2. 400 μ l Solüsyon A eklendi.
3. 500 μ l AO içermeyen boyasız solüsyon B eklendi.
4. 500 μ l $MgCl_2$ -PBS eklendi.
5. 200 μ l DNAaz solüsyonu eklendi.
6. Oda sıcaklığında 30' bekletildi.
7. 900 rpm'de 5' santrifüj yapıldı, üst kısım tamamen atıldı.
8. Üzerine 200 μ l $MgCl_2$ -PBS, 400 μ l Solüsyon A eklendi ve 15 saniye bekletildikten sonra 1200 μ l Solüsyon B eklendi.
9. 2' sonra flow sitometri de ölçüm yapıldı.

Kontrol tüpü için işlemler aynen uygulandı. Sadece 5. basamaktaki DNAaz solüsyonu eklenmeyip, onun yerine 200 μ l $MgCl_2$ -PBS eklendi

Hücrelerin RNAaz-A ile Etkileştirilmesi : İki tüp hazırlandı. Tüplerden biri kontrol olarak kullanıldı, diğesine RNAaz-A eklendi (30). Bunun için aşağıdaki yöntem uygulandı.

Uygulanan yöntem:

1. 100 µl hücre süspansiyonu (lökosit)
2. 400 µl Solüsyon A eklendi
3. 1200 µl Solüsyon B eklendi
4. 100 µl RNAaz A solüsyonu eklendi
5. Tüm solüsyonlar eklendikten sonra tüp yavaşça alt üst edildi ve 30' oda sıcaklığında (24–25°C) bekletildi
6. Sonra flow sitometride ölçüm yapıldı.

Kontrol tüpü için işlemler aynen uygulandı. Sadece 4. basamaktaki RNaz-A solüsyonu eklenmeyip, onun yerine 100 µl MgCl₂-PBS eklendi.

Spektrofotometrede RNA Ölçümü : Sağlıklı bir kişiden kan alınarak lökositleri izole edildi ve 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi. Kültürden sonra hücrelerin bir kısmı flow sitometride ölçüm için kullanıldı. Bir kısmının ise RNA'ları izole edildi ve içerikleri spektrofotometrede ölçüldü.

RNA İzolasyonu ;

1. İzolasyon için High Pure RNA izolasyon kiti kullanıldı.
2. 1×10^6 hücre bulunan 200µl hücre süspansiyonu üzerine 400 µl lizing solüsyonu (guanidium hidroklorid ve triton X-100) eklendi
3. Bu karışım kolonlu bir tüpe aktarıldı ve 10.000 rpm'de 15-20 sn santrifüj yapıldı.
4. Daha sonra hücrelerin üzerine 10 µl DNAaz solüsyonu ve 90 µl inkübasyon solüsyonu eklendi ve 15' oda ısısında bekletildi.
5. Üzerine 500 µl yıkama çözeltisi (guanidium hidroklorid) eklendi ve 15 sn 10.000 rpm'de santrifüj yapıldı ve bu işlem bir kez daha yinelenildi.
6. Sonra 500 µl yıkama yıkama çözeltisi eklendi. 2' 13.000 rpm'de santrifüj yapıldı.
7. Hücreler toplandıktan sonra üzerine 50 µl süzme çözeltisi eklendi. 10.000 rpm'de 1' santrifüj yapıldı ve RNA izole edilmiş oldu.
8. Hemen ölçüm yapılmayacaksa RNA -20 °C'de saklandı.

Sağlıklı bir kişide kan alınarak lökositleri izole edildi ve 24, 48 ve 72 saat inkübe edildi. Kültürden sonra hücrelerin bir kısmı flow sitometride ölçüm için kullanıldı. Bir kısmının ise RNA'ları yukarıdaki yöntemle göre izole edildi ve içerikleri spektrofotometrede ölçüldü. Ölçüm için 10µl RNA alındı üzerine 90 µl distile su eklendi ve spektrofotometrede 260 nm'de ölçüm yapıldı.

3.2.4.Kullanılan Yöntem

A. Hücre Kültürü

1. 4 ml heparinli kan 1640 RPMI medyumla seyreltildi (seyrelti 1:1).
2. 4 ml fikol-histopak üzerine yayıldı.
3. 1300 rpm'de 25' santrifüj edildi.
4. Lökosit tabakası başka bir steril tüpe alındı.
5. Üzerine hücre süspansiyonunun iki katı medyum (RPMI 1640) eklendi.
6. 900 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılarak yıkandı.
7. Üst kısım atıldı ve üzerine başlangıçta eklenen medyum miktarı kadar yeniden medyum eklendi ve 6. basamakta yapılan santrifüj işlemi uygulandı.
8. İki kez yıkama yapıldıktan sonra dipte kalan hücre süspansiyonunun üzerine 500 µl medyum eklendi.
9. Süspansiyondaki hücre sayısı toma lamında sayılarak belirlendi
10. 5ml periferel blood medyum bulunan kültür flasklarına ml'de 2×10^6 hücre bulunacak şekilde hücre süspansiyonu ekildi (52).
11. Hücreler %5 CO₂'li etüvde 37 °C'de 72 saat inkübe edildi.
12. FHA ile uyarılan hücreler, 72 saatin sonunda kültürden çıkarıldı.
13. Hücreler flasktan enjektörle alınarak steril bir tüpe aktarıldı
14. 2mM MgCl₂ içeren PBS ile iki kez yıkandı. Yıkama için 6.basamaktaki işlem uygulandı.
15. Hücreler 500 µl 2 mM MgCl₂'lü PBS'te resüspanse edildi.
16. Hücre süspansiyonunun 200 µl'sinde 2×10^5 hücre olacak şekilde, MgCl₂'lü PBS'le seyreltildi.

B. Hücrelerin Boyanması

Fikse edilmemiş hücrelerde çalışıldı ve bu hücrelerin RNA içeriklerini ölçmek için uygun olan yöntem kullanıldı (53-54) .

1. 200 µl (2×10^5 hücre) hücre süspansiyonu 12x75mm'lik tüpe transfer edildi.
2. 400 µl solüsyon A yavaş yavaş eklendi ve 15 saniye bekletildi.
3. 1200 µl solüsyon B yavaş yavaş eklendi.
4. 2 dakika sonra flow sitometrede ölçüldü.

C. Flow Stometride Ölçüm

AO'nun maksimum absorpsiyonu yaklaşık 455–490 nm'dir (30). AO uyarılması için tek lazerli 488 nm dalga boyunda argon iyon lambası kullanıldı. Uyarılma sonucunda kırmızı flüoresan emisyonu (F_{640} , FL3) RNA içeriğini ve yeşil flüoresan emisyonu (F_{530} , FL1) DNA içeriğini gösterir. Değerlendirme için elde edilen verilerden FL1 (DNA) ve FL3 (RNA)'ün mean X değerlerine bakılmıştır.

Hücrelerin DNA ve RNA içeriklerinin eş zamanlı ölçümü için uygun bir protokol hazırlandı. Ölçümden önce “flow çek” (cihazın ayarlarını kontrol etmek için kullanılan solüsyon) geçirilerek cihazın ayarları kontrol edildi. Daha sonra flow çek temizleninceye kadar cihaz yıkandı. Yıkama için; önce cihazdan distile su geçirildi, “klenz” işlemi (clenz solüsyonu kullanılarak cihazın, akışı sağlayan hortumlarının yıkanması) yapıldı, daha sonra yeniden distile su geçirildi. Tıkanıklığı açmak için “prime” yapılır (akışı sağlayan hortumların açılmasını sağlayan bir işlemdir, izoton solüsyonu kullanılarak yapılır). Prime hücre ölçümü sırasında da hücrelerin akışını sağlamak için de yapılır. Sonra hücrelerin ölçümü yapıldı. Her ölçüm için 10.000 hücre geçirildi. Ölçüm sonuçları cihaza kaydedildi. Ölçümün güvenilirliği için her bir örnekten iki ayrı tüp hazırlanarak iki kez ölçüm yapılmıştır.

AO yapışkan bir boya olduğu için geçirilen her tüpten sonra yukarıda anlatıldığı gibi uzun bir süre yıkama yapılmıştır. Cihazın temizliğinden sonra ölçüm yapılmıştır. Çünkü denemeler sonucunda cihazın temizliğinin ölçüm sonuçlarını etkilediği bulunmuştur.

3.3. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

DS'lu hasta ve kontrollerin RNA içerikleri arasındaki farklılığı test etmek için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Yaş ve RNA içerikleri arasındaki ilişkiyi test etmek için lineer regresyon analizi kullanıldı.

4. BULGULAR

Çalışmamızda DS'lu hasta ve kontrollerin mitojenle uyarılmış lenfositlerindeki total RNA düzeyleri Flow stometri (FC) kullanılarak ölçülmüştür. Ancak, FC'de RNA ölçüm yöntemini daha önce Türkiye'de hiç çalışan bir merkez ya da kişi olmadığı için yöntemi olgunlaştırmaya yönelik çok sayıda çalışmalar yapılmıştır. Birbirleriyle tutarlı sonuçlar elde edinceye kadar çok sayıda sağlıklı kişilerin kan örnekleri üzerinde RNA ölçümü yapılmıştır. Ayrıca, FC'de RNA ölçümünde 1970'li yıllardan beri bu konuda çalışmış, alanında bilir kişi olan New York Kanser Araştırma Merkezi'nde bulunan Prof. Z. Darzynkiewicz ile sürekli yazışmalar yapıldı ve önerileri doğrultusunda yöntemde düzeltmeler yapıldı. FC sonuçlarımızın doğru ve güvenilir olduğu sonucuna varıldıktan sonra, DS'lu hasta ve kontrollerin mitojenle uyarılmış lenfositlerinde RNA ölçümüne başlandı.

4.1.İLK ÇALIŞMALARDAN ELDE EDİLEN BULGULAR

A. Kültür İçin Yapılan Denemelerin Sonuçları

Sonuç 1: Çalışmanın kontrollü olması için iki farklı sağlıklı kişiden kan alınarak işlemler yapılmıştır.

1. 5 ml rutin olarak hazırlanmış medyum (%25 fetal kalf serum, %2 FHA, penisilin/streptomisin ve L-glutamin içeren Ham's F 10 medyum) içeren kültür tüpüne 0.4 ml heparinli tam kan örneği ekildi ve 72 saatlik kültür yapıldı.
2. Kültür sonrası hücreler 3 ml'lik histopak üzerine yayıldı ve santrifüj edildi.

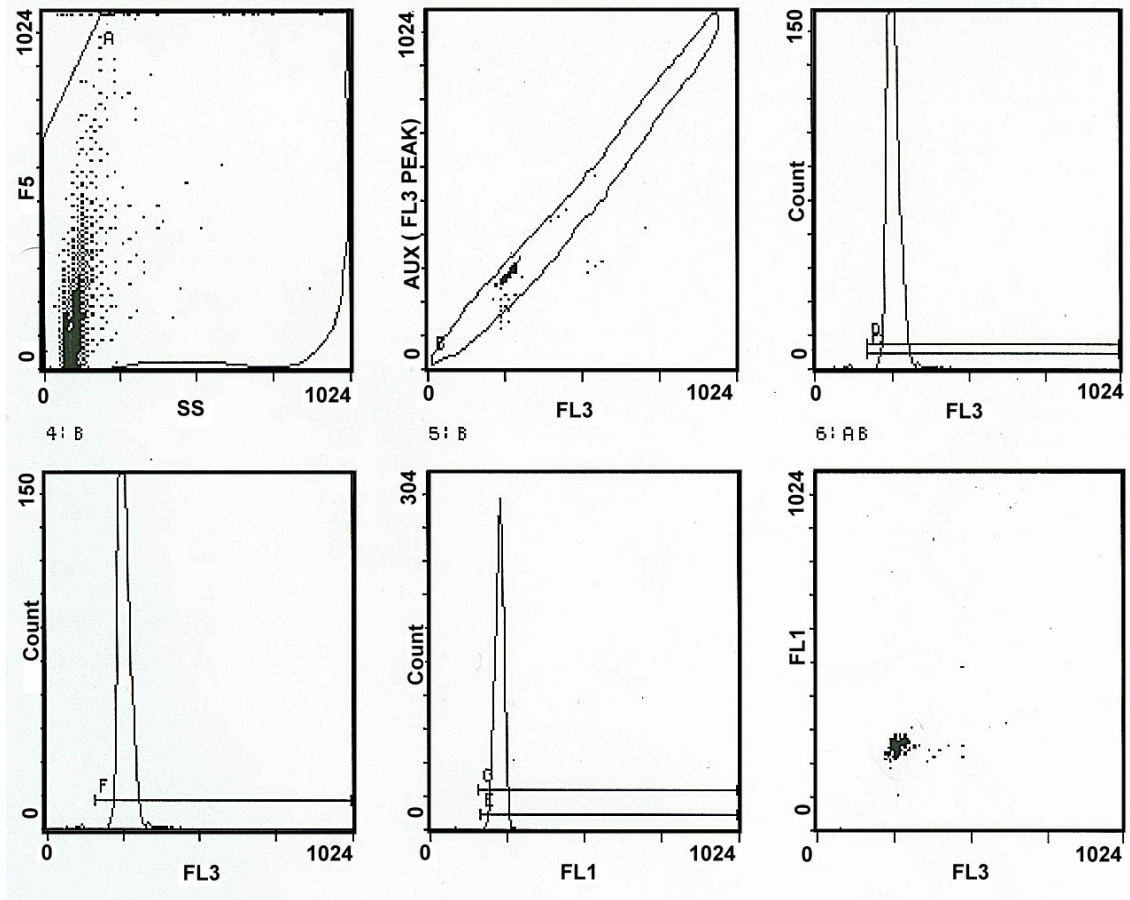
Santrifüj sonrası lökositler izole edilemedi ve ölçüm yapılamadı.

Sonuç 2: İlk denememizde kültür sonrası lökositleri ayırtıramayınca aşağıdaki çalışmanın yapılmasına karar verildi. Çalışmanın kontrollü olması için beş farklı sağlıklı kişiden kan alınarak işlemler yapıldı.

1. 20 ml'lik rutin olarak hazırlanmış medyum (Ham's F 10 medyum kullanılarak hazırlanmış) içeren kültür flaskına 3 ml heparinli tam kan örneği ekildi ve 72 saatlik kültür yapıldı.
2. Kültür sonrası hücreler 50 ml'lik tüp içerisinde bulunan 12 ml histopak üzerine yayıldı ve 1600 rpm'de 30' santrifüj yapıldı

İzole olan lökositler PBS'le 900 rpm'de 10' santrifüj edilerek iki kez yıkandı ve Flow sitometride ölçüm yapıldı.

Kültür sonrası lökositleri eritrositlerden tam olarak izole edebilmek için çeşitli miktarlarda bulunan histopak üzerine yayıldı. En uygun ayırım 12 ml histopak kullanılarak elde edildi. Her bir histopak miktarı için aynı kişiden ayrı ayrı kültür yapıldı. 72 saatlik kültür sonrasında hücrelerin RNA içeriklerinin artması beklenirken, sıfırıncı zamandaki RNA içeriğine göre azaldığı bulundu (Sıfırıncı saat F_{620} Mean X= 268.1, 72. saat F_{620} Mean X=237.5, Şekil 4.1, 4.2).

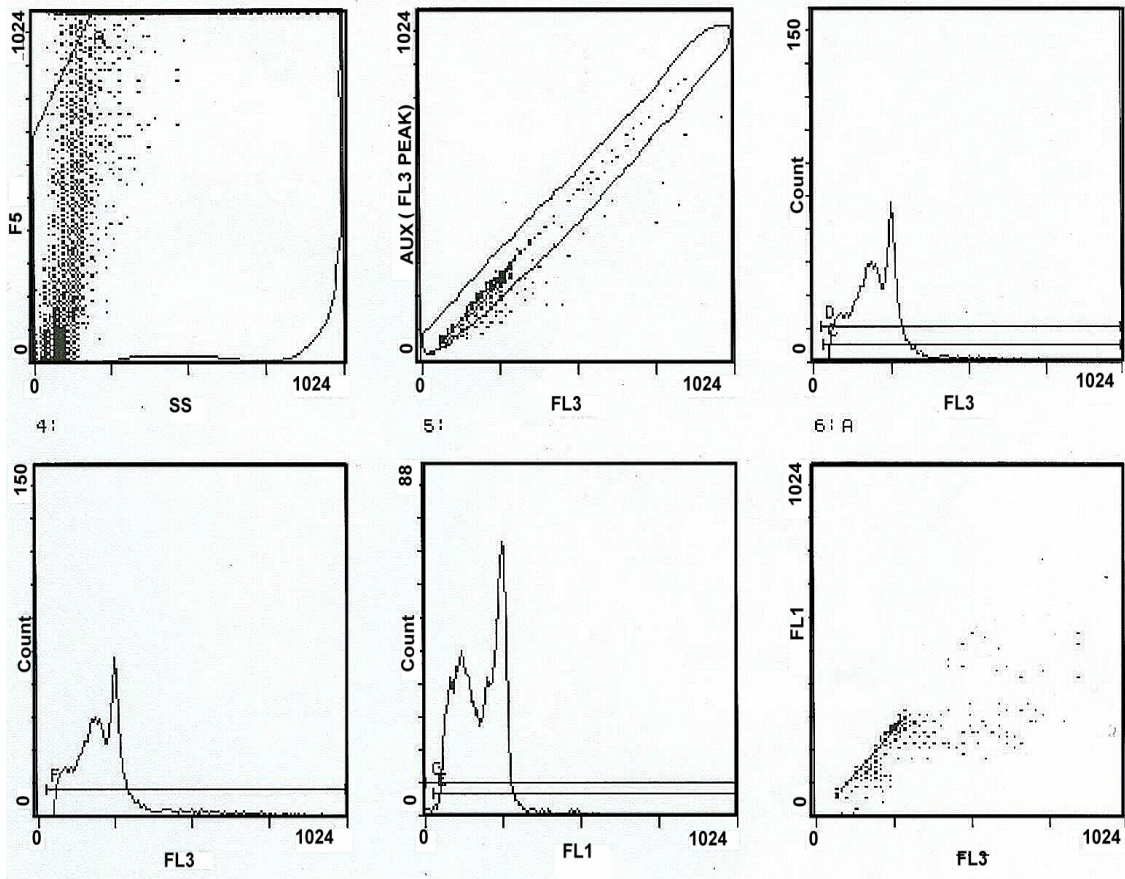


Stats : Normalized

Listgating : Disabled

Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y	PkPosX	PkPosY	PkCnt	FPCVX	FPCVY
1	A A	99.6	9958	110.4	179.8	64.0	0.0	185	65.78	96.37
2	B B	98.7	9827	264.4	266.2	256.0	264.0	798	10.38	11.23
Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Md X	PkPosX	PkCnt	HPCV	Min	Max
3	C C	99.6	9825	268.1	265.1	263.0	245	5.75	176.0	1023.0
	D D	99.6	9825	268.1	265.1	263.0	245	5.75	176.0	1023.0
4	F F	99.6	9827	268.1	265.1	263.0	245	5.75	164.0	1021.0
5	E E	99.4	9814	238.1	238.7	239.0	301	5.26	172.0	1023.0
	G G	99.5	9818	238.1	238.6	239.0	301	5.26	162.0	1023.0

Şekil 4.1. Sağlıklı bir kişinin sıfırncı saatteki nispi RNA içeriği (FL3= 620)



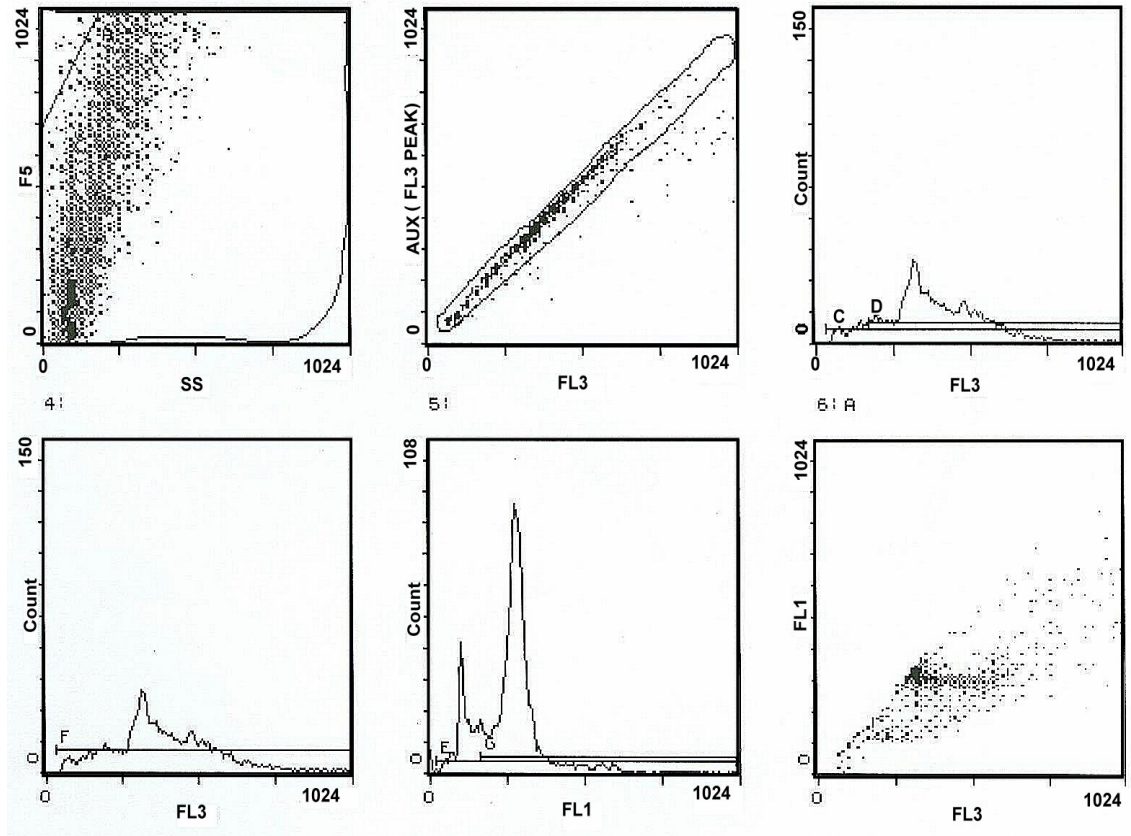
Stats : Normalized

Listgating : Disabled

Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y	PkPosX	PkPosY	PkCnt	FPCVX	FPCVY
1	A A	91.3	8061	248.6	593.1	1008.0	1008.0	363	95.57	66.90
2	B B	89.2	7190	235.0	217.0	264.0	248.0	120	52.36	54.58
Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Md X	PkPosX	PkCnt	HPCV	Min	Max
3	C C	99.1	8754	237.6	219.7	265.0	78	3.93	34.0	1021.0
	D D	99.1	8753	237.5	219.7	265.0	78	3.93	28.0	1019.0
4	F F	99.1	8754	237.6	219.7	265.0	78	3.93	30.0	1021.0
5	E E	99.1	8754	197.3	199.2	260.0	86	8.54	28.0	1019.0
	G G	99.7	8804	196.2	198.4	260.0	86	5.84	28.0	1019.0

Şekil 4.2. Sağlıklı bir kişinin 72 saatlik total kan kültürü sonrası nispi RNA içeriğinin, sıfırıncı saate göre artması gerekirken azaldığı bulundu (Mean X=237.5, FL3= 620nm).

Total kan kültüründen sonra hücrelerin RNA içeriğinin azaldığı bulununca izole edilmiş lökositlerin kültürünün yapılmasına karar verildi ve gereç ve yöntemde belirtilen (3.2.4'de A Hücre kültürü) kültür yapınca 72 saat sonra RNA içeriğinin sıfıncı saate göre arttığı bulunmuştur (72. saat F_{620} Mean X=437.9, Şekil 4.3).



Stats : Normalized			Listgating : Disabled							
Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y	PkPosX	PkPosY	PkCnt	FPCVX	FPCVY
1	A A	96.3	9631	459.3	818.2	1008.0	1008.0	1218	65.53	37.29
2	B B	86.0	8282	401.8	384.9	312.0	312.0	77	40.64	39.12
Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Md X	PkPosX	PkCnt	HPCV	Min	Max
3	C C	92.2	9215	411.0	381.6	323.0	50	3.14	34.0	1021.0
	D D	84.3	8427	437.9	402.1	323.0	50	3.14	176.0	1021.0
4	F F	92.2	9215	411.0	381.6	323.0	50	3.14	34.0	1021.0
5	E E	95.4	9544	285.0	283.6	292.0	108	4.46	20.0	1017.0
	G G	76.7	7670	325.9	294.4	292.0	108	4.46	172.0	1019.0

Şekil 4.3. Sağlıklı bir kişinin 72 saatlik izole edilmiş lökosit kültürü sonrası nispi RNA içeriğinin sıfıncı saate göre arttığı bulundu (Mean X=437.9, FL3= 620 nm).

B.Yöntemin Özgünlüğü İçin Yapılan İlk Çalışmaların Sonuçları

Çalışmalarımızda doğru olarak RNA ölçtüğümüzden emin olmak için hücrelerimizi hem sıfıncı saatte hem de 72 saatlik kültür sonrası DNAaz-I ve RNAaz-A ile etkileştirildi.

DNAaz-I ile etkileştirme sonucunda :

Sıfıncı saatte; FL1 530 nm fluoresantın (DNA'nın) % 97'si , FL3 620 nm fluoresantın (RNA'nın) %70'i kayboldu.

72 saat sonrası; FL1 530 nm fluoresantın (DNA'nın) % 87'si, FL3 620 nm fluoresantın (RNA'nın) % 54'ü kayboldu.

RNAaz-A ile etkileştirme sonucunda :

Sıfıncı saate; FL1 530 nm fluoresantın (DNA'nın) % 53'ü , FL3 620 nm fluoresantın (RNA'nın) % 49'u kayboldu.

72 saat sonrası; FL1 530 nm fluoresantın (DNA'nın) % 60'ı, FL3 620 nm fluoresantın (RNA'nın) % 57'si kayboldu.

Hücrelerin DNAaz-I ve RNAaz-A ile etkileştirilmesi sonucunda doğru RNA ölçülmediğine, DNA ve RNA'nın birbiriyle örtüştüğüne karar verildi. Çünkü RNAaz'la etkileştirilince DNA'nın azalmaması gerekirken RNA ile birlikte DNA da azaldı. Aynı şekilde DNAaz'la etkileştirme sonucunda da hem RNA hem de DNA azaldı. Bu sonuçlara göre cihazın filtresinin RNA ölçmek için uygun olmadığı sonucuna varıldı. Bu bulgulardan sonra FL3=640 nm dalga boyunda olan Long Pass Filtre kullanılarak çalışmalar yapıldı.

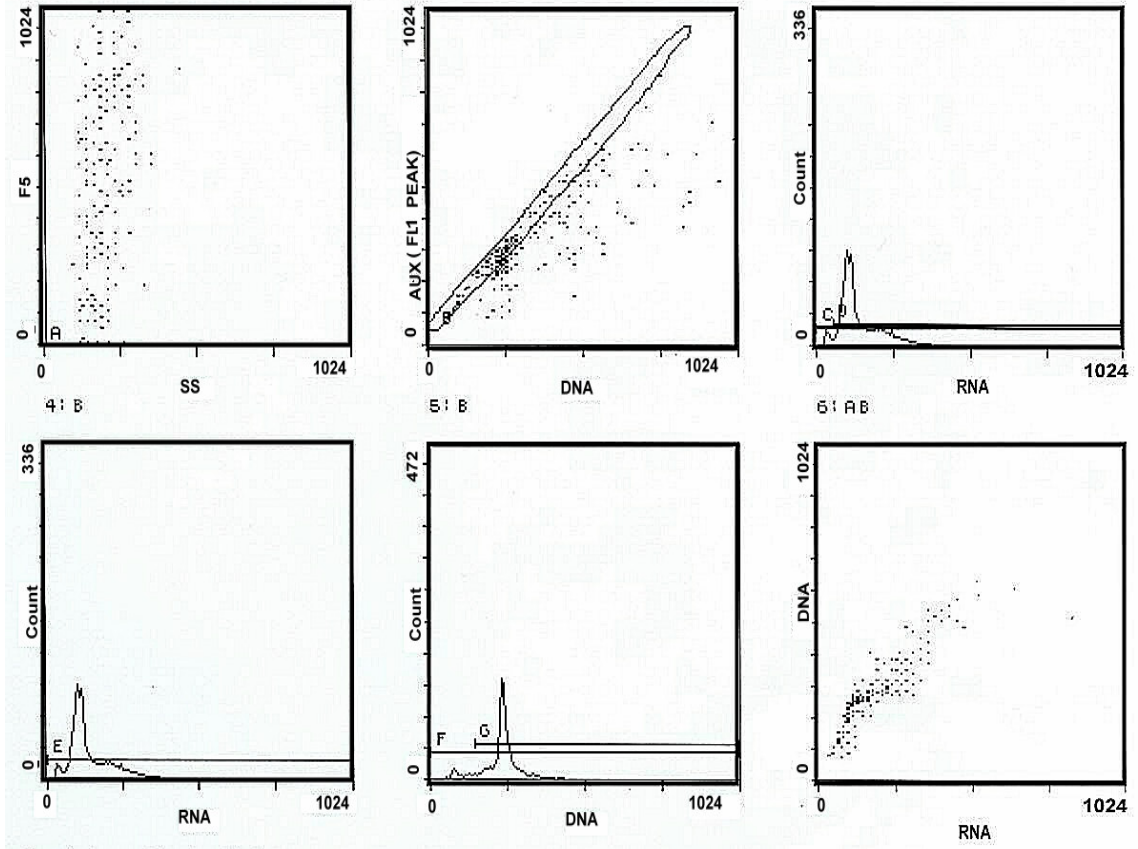
4.2. FL3=640 nm DALGA BOYUNDA LONG PASS FILITRE KULLANILARAK YAPILAN ÇALIŞMA SONUÇLARI

A. Hücre Kültürü için Yapılan Çalışma Sonuçları

Sonuç 1. Kültüre konulacak hücre sayısını belirlemek için farklı sayıda hücre içeren iki kültür yapıldı. Aynı sağlıklı kişinin kan örneği kullanılarak çalışma yapıldı Birinci kültüre 5 ml'lik medyumun (Ham's F10) ml'sinde 1×10^6 hücre (55) bulunacak şekilde, ikinci kültüre 5ml'lik medyumun (Ham's F10) ml'sinde 2×10^6 (52) hücre olacak şekilde ekim yapıldı. Sonuçta RNA içeriği ikinci kültürde yüksek bulundu ve bu sayıda hücrenin ekim yapılmasına karar verildi. (Birinci kültür F_{640} Mean X= 130.6, ikinci kültür F_{640} Mean X=160.7).

Sonuç 2. Aynı şartlar altında aynı sağlıklı kişinin kan örneği kullanılarak 5 ml rutin olarak hazırlanmış medyum içeren (Ham's F 10) kültür flaskına ve 5 ml "periferal blood medyum" içeren kültür flaskına ayrı ayrı ekim yapılmıştır. 72 saatlik kültür sonrasında periferal blood medyuma ekilmiş hücrelerde üremenin daha iyi olduğu bulunmuştur. Çünkü flow sitometrik ölçüm sonrası RNA içeriği bu kültürdeki hücrelerde oldukça yüksek bulunmuştur (Ham's F10 F_{640} Mean X=160.7, periferal blood medyum F_{640} Mean X=262.4, sırasıyla (Şekil 4.4., 4.5).

Sonuç 3. Kullanılan medyumlar arasında fark olduğu bulunduğundan periferal blood medyum kullanılarak hem tam kan hem de izole edilen lökositlerin 72 saatlik kültürü yapıldı. Ayrıca filtre değiştirildiğinden, acaba total kan kültüründe RNA içeriğinin azalması kullanılan medyumdan mı ya da filtreden mi kaynaklanmaktadır? Bunu test etmek için, her iki kültür sonrası hücrelerin RNA içerikleri ölçüldü. Total kan kültürü F_{640} Mean X=163.1, İzole lökosit kültürü F_{640} Mean X=285.8 olarak bulundu (Şekil 4.6, 4.7). Sonucun yinelenebilirliğini test etmek için başka bir sağlıklı kişiden kan alınarak aynı işlemler yapıldı ve benzer sonuçlar elde edildi.

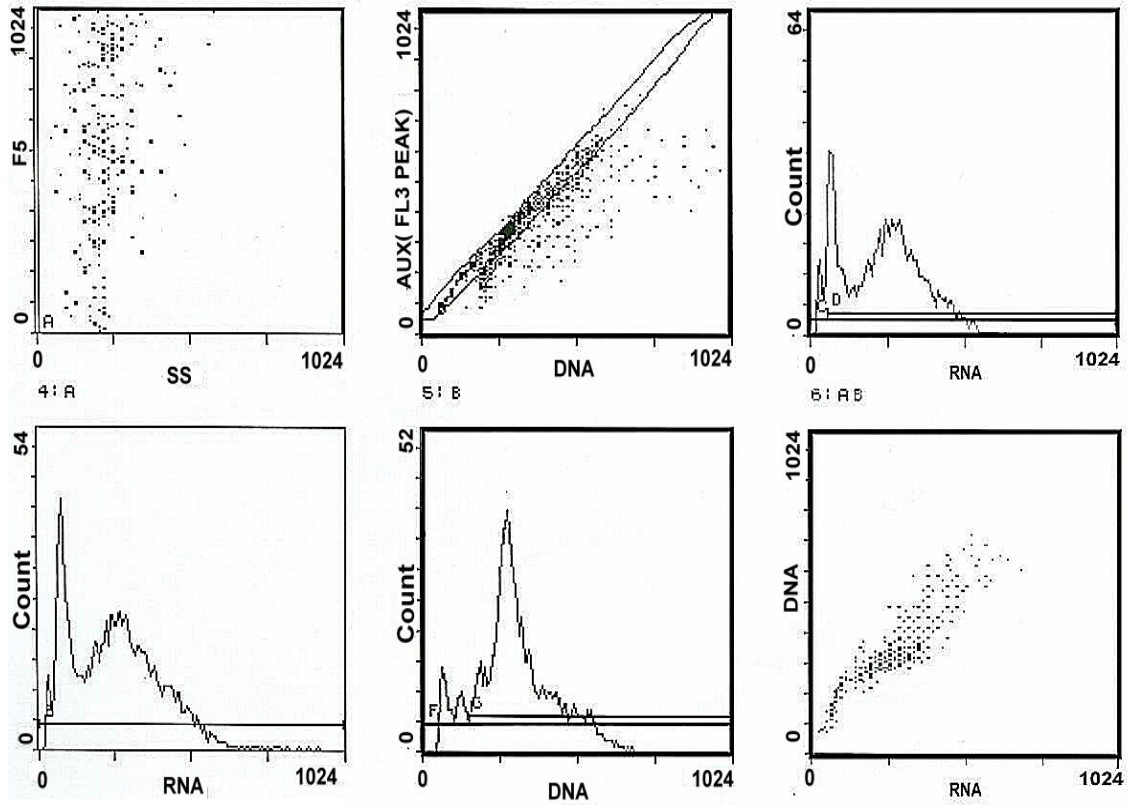


Stats : Normalized Listgating : Disabled

Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y	PkPosX	PkPosY	PkCnt	FPCVX	FPCVY
1	A A	100	10000	455.9	875.3	1016.0	1016.0	1180	65.10	31.19
2	B B	74.2	7423	244.0	273.5	240.0	264.0	264	30.82	28.24

Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Md X	PkPosX	PkCnt	HPCV	Min	Max
3	C C	100	7423	155.9	125.1	105.0	139	11.17	0.0	1022.0
	D D	95.9	7117	160.7	126.9	105.0	139	11.17	58.0	1023.0
4	F F	100	7423	155.9	125.1	105.0	139	11.17	2.0	1023.0
5	E E	100	7423	247.5	245.3	244.0	172	3.10	6.0	1023.0
	G G	90.9	6749	261.7	247.5	244.0	172	3.10	150.0	1023.0

Şekil 4.4. Sağlıklı bir kişinin Ham's F10 kullanılarak yapılmış, 72 saatlik izole edilmiş lökosit kültürü sonrası nispi RNA içeriği (Mean X=160.7, FL3= 640 nm).

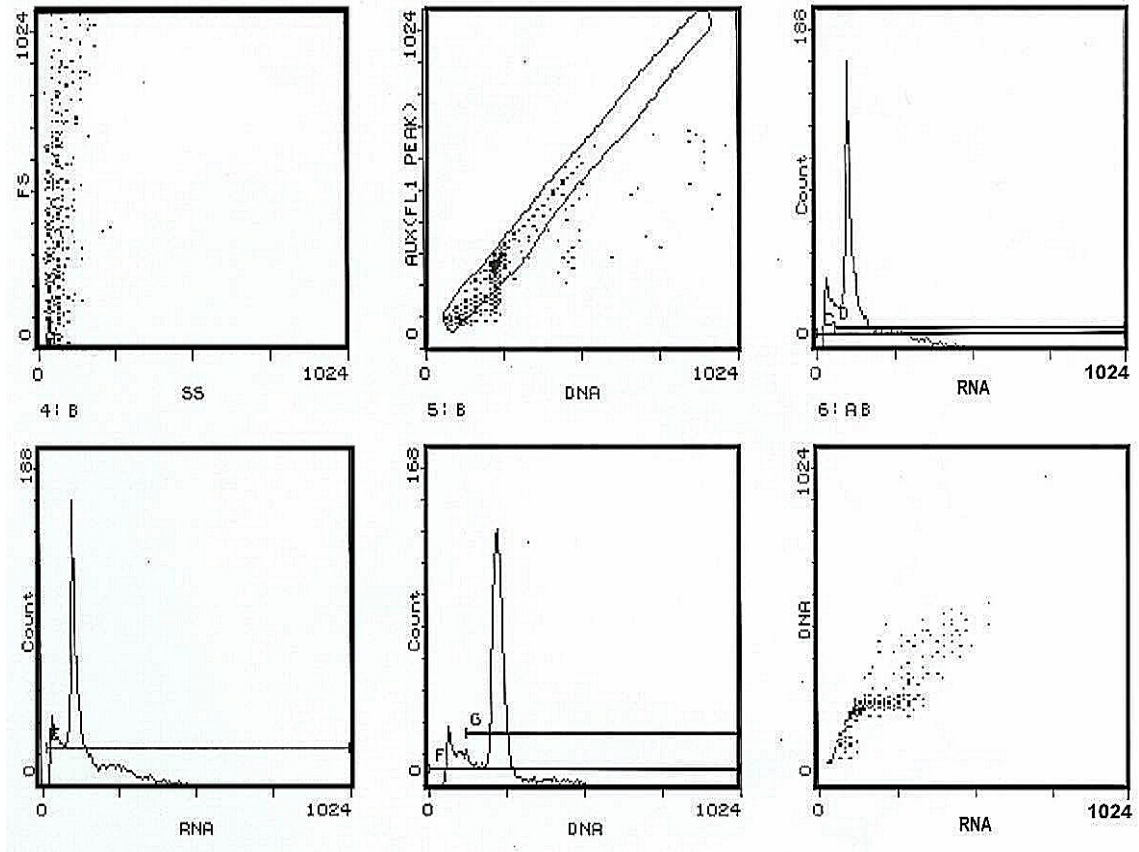


Stats : Normalized

Listgating : Disabled

Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y	PkPosX	PkPosY	PkCnt	FPCVX	FPCVY
1	A A	100	10000	685.5	971.6	1016.0	1016.0	2861	45.05	16.70
2	B B	67.7	6770	306.4	334.6	72.0	96.0	71	42.12	38.69
Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Md X	PkPosX	PkCnt	HPCV	Min	Max
3	C C	100	6770	251.5	256.2	72.0	50	8.43	0.0	1022.0
	D D	95.1	6439	262.4	236.1	72.0	50	8.43	58.0	1021.0
4	F F	99.1	9912	271.5	260.8	82.0	61	9.85	2.0	1021.0
5	E E	100	6770	310.0	294.9	275.0	47	7.23	6.0	1019.0
	G G	88.6	6001	336.6	307.6	275.0	47	7.23	150.0	1021.0

Şekil 4.5. Sağlıklı bir kişinin Peripheral blood medyum kullanılarak yapılmış 72 saatlik izole edilmiş lökosit kültürü sonrası nispi RNA içeriği, Ham's F10 kullanılarak yapılan kültürün nispi RNA içeriğine göre daha yüksek bulundu (Mean X=262.4, FL3=640 nm).

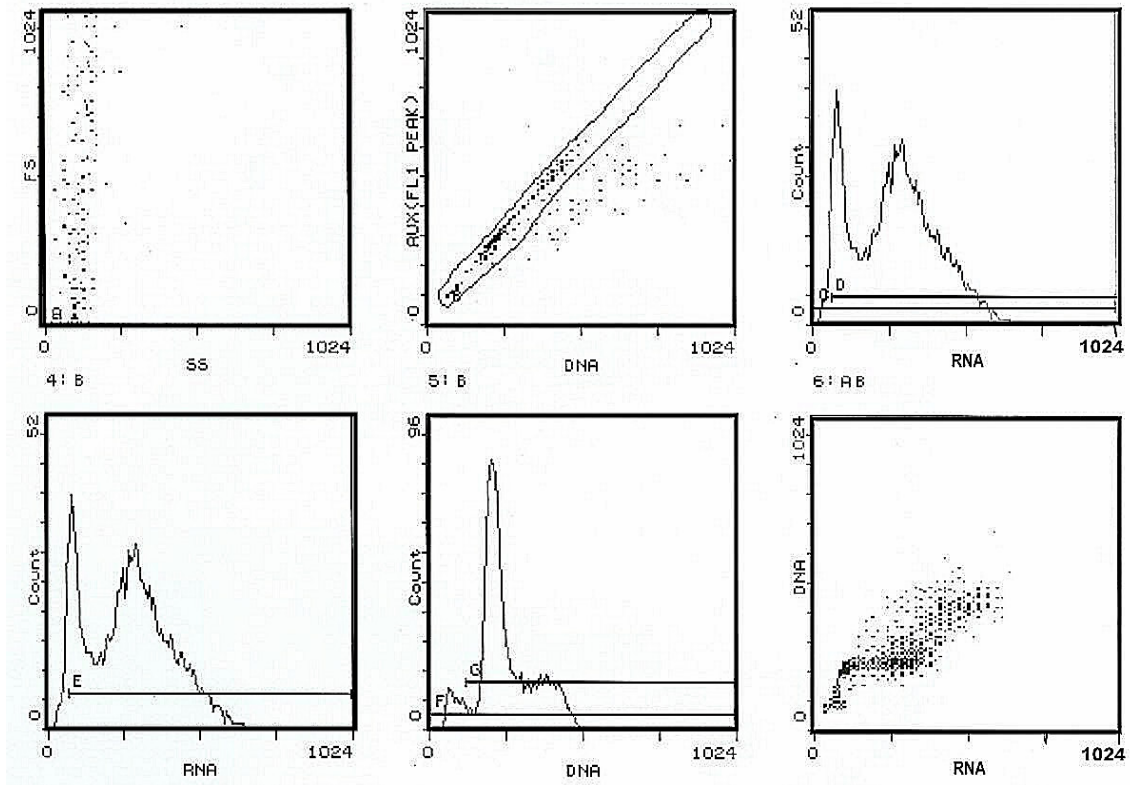


Stats : Normalized

Listgating : Disabled

Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y	PkPosX	PkPosY	PkCnt	FPCVX	FPCVY
1	A A	100	10000	322.1	885.5	1016.0	1016.0	407	79.56	31.35
2	B B	79.1	7907	220.9	235.2	232.0	264.0	142	38.63	41.60
Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Md X	PkPosX	PkCnt	HPCV	Min	Max
3	C C	100	7907	149.3	114.5	110.0	186	4.45	0.0	1022.0
	D D	88.6	7003	163.1	121.9	110.0	186	4.45	58.0	1023.0
4	F F	100	7907	149.3	114.5	110.0	186	4.45	14.0	1023.0
5	E E	100	7907	224.4	230.1	232.0	165	5.41	2.0	1023.0
	G G	85.9	6790	246.4	234.3	232.0	165	5.41	124.0	1023.0

Şekil 4.6. Sağlıklı bir kişinin 72 saatlik total kan kültürü sonrası nispi RNA içeriği (Mean X= 163.1, FL3= 640 nm).



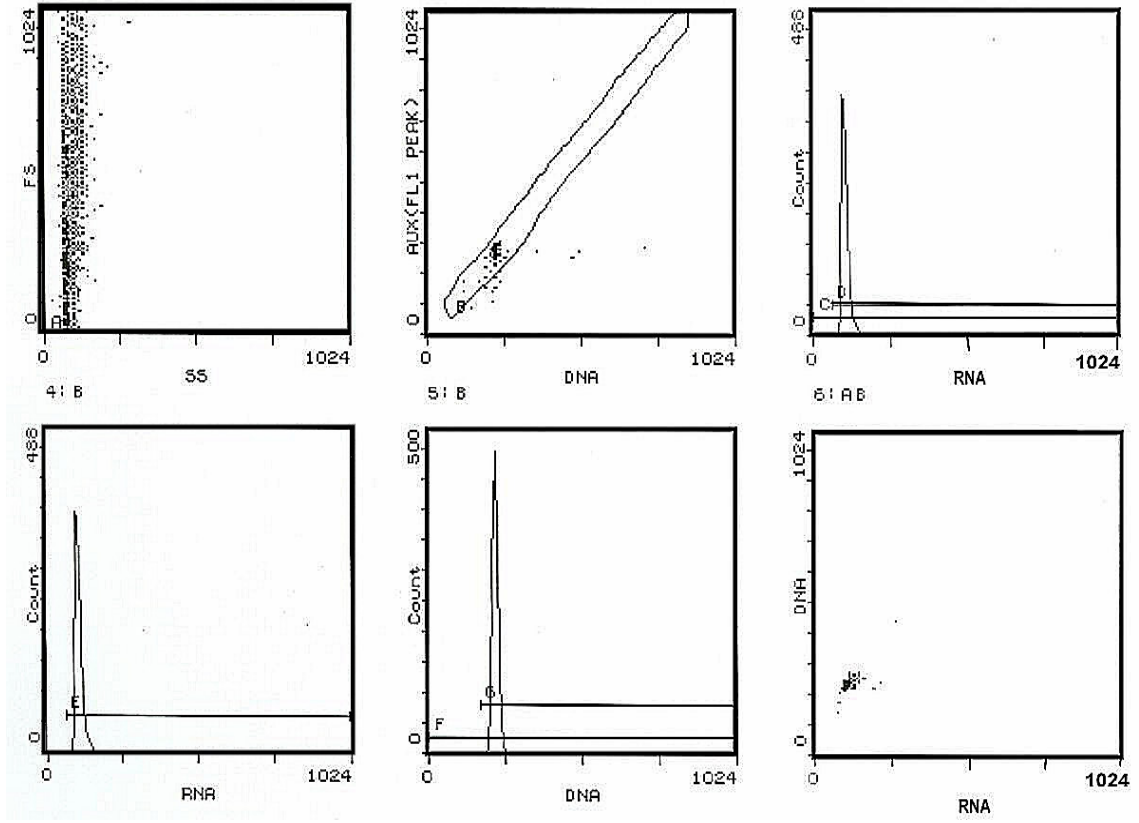
Stats : Normalized

Listgating : Disabled

Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y	PkPosX	PkPosY	PkCnt	FPCVX	FPCVY
1	A A	100	10000	554.8	971.6	1016.0	1016.0	12172	51.66	17.94
2	B B	89.9	8992	257.1	304.1	216.0	264.0	266	37.74	35.09
Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Md X	PkPosX	PkCnt	HPCV	Min	Max
3	C C	100	8992	281.2	284.9	86.0	52	10.63	0.0	1022.0
	D D	98.0	8815	285.8	288.1	86.0	52	10.63	66.0	1023.0
4	F F	96.3	8662	289.6	290.6	86.0	52	10.63	74.0	1019.0
5	E E	100	8992	260.6	234.6	208.0	96	8.09	2.0	1023.0
	G G	92.8	8341	274.0	239.3	208.0	96	8.09	124.0	1021.0

Şekil 4.7. Sağlıklı bir kişinin 72 saatlik izole edilmiş lökosit kültürü sonrası nispi RNA içeriği, 72 saatlik total kan kültürü sonrası nispi RNA içeriğine göre yüksek bulundu (Mean X=285.8, FL3= 640 nm).

Sonuç 4. Kültür zamanının belirlenmesi için 5 farklı sağlıklı kişiden kan örneği alınarak lökositleri izole edildi. Hücreler rutin olarak hazırlanmış 5 ml medium (Ham's F 10) içeren kültür flaskına ekildi. 24, 48 ve 72 saatlik kültür yapıldı. Bu kültürler sonucunda sıfırıncı zamana göre en yüksek RNA içeriği 72. saatlik kültür sonrasında bulundu. (Sıfırıncı saat F_{640} Mean X=112.2, 24. saat F_{640} Mean X= 131.1, 48.saat F_{640} Mean X=193.0, 72.saat F_{640} Mean X=287.1, sırasıyla (Şekil 4.8-4.11).

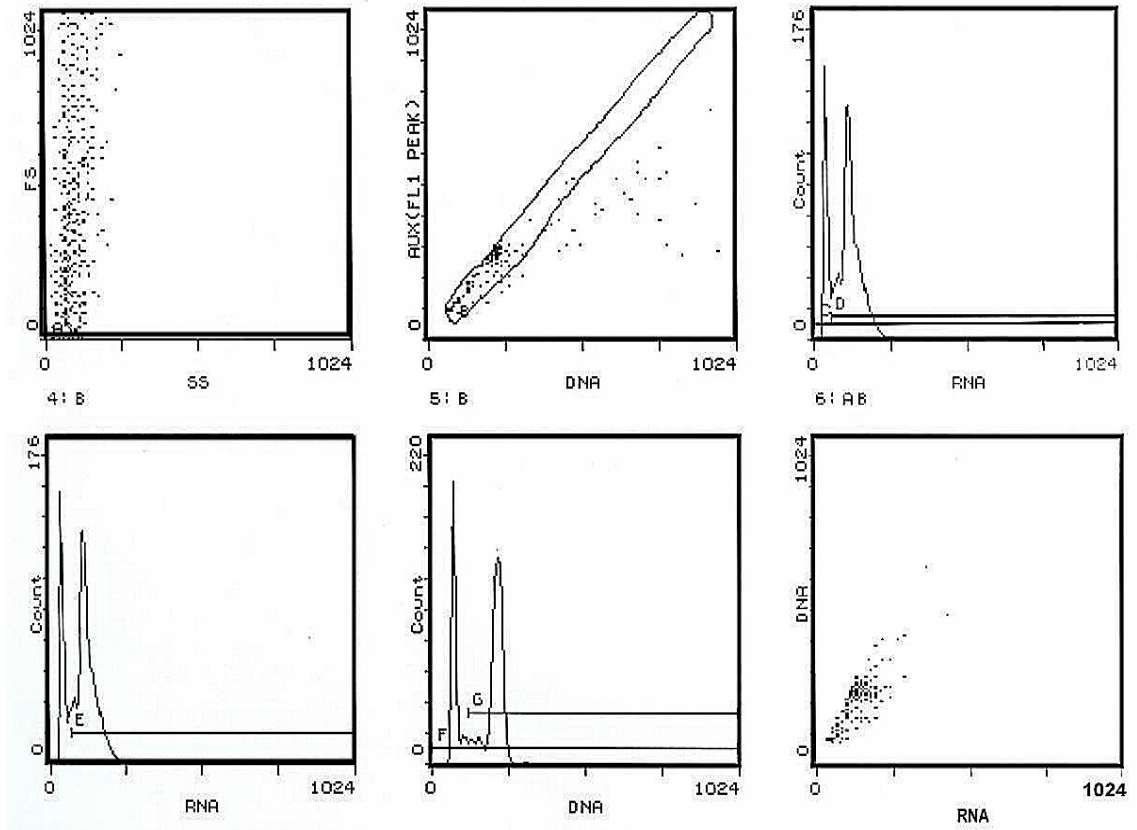


Stats : Normalized

Listgating : Disabled

Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y	PkPosX	PkPosY	PkCnt	FPCVX	FPCVY
1	A A	100	10000	107.6	572.8	120.0	1016.0	221	64.47	60.43
2	B B	96.6	9662	224.4	253.4	224.0	256.0	943	6.34	8.35
Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Md X	PkPosX	PkCnt	HPCV	Min	Max
3	C C	100	9662	111.2	109.7	102.0	486	7.68	0.0	1022.0
	D D	99.5	9614	112.2	109.8	102.0	486	7.68	68.0	1023.0
4	F F	99.5	9614	112.2	109.8	102.0	486	7.68	68.0	1019.0
5	E E	100	9662	227.9	227.9	225.0	500	3.04	2.0	1023.0
	G G	99.3	9598	228.7	228.0	225.0	500	3.04	174.0	1021.0

Şekil 4.8. Sağlıklı bir kişinin sıfırcı saatteki nispi RNA içeriği (Mean X=112.2, FL3=640nm).

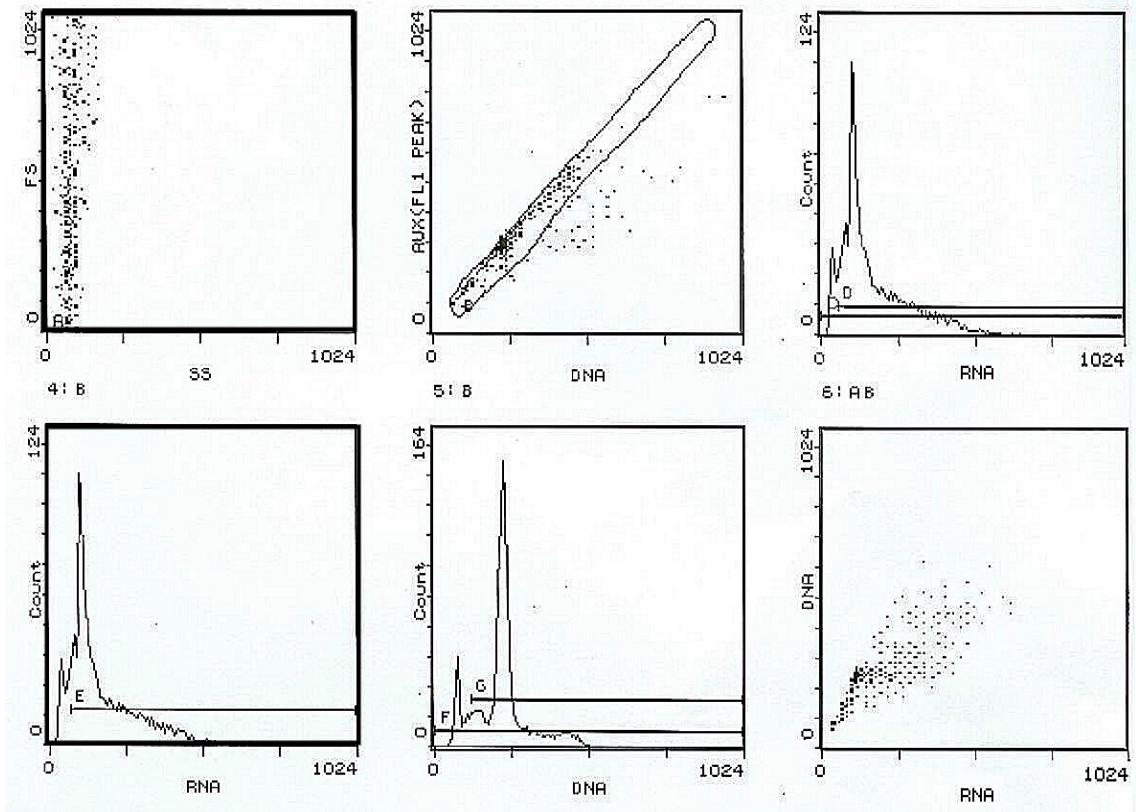


Stats : Normalized

Listgating : Disabled

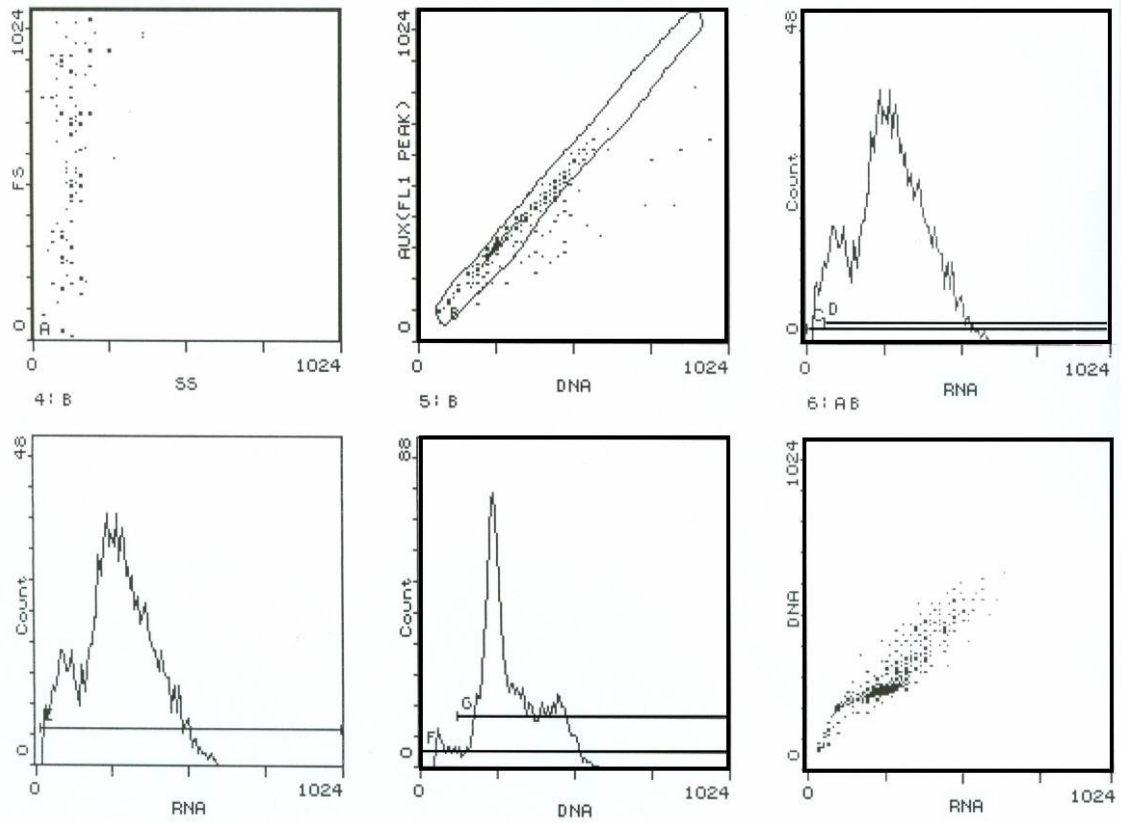
Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y	PkPosX	PkPosY	PkCnt	FPCVX	FPCVY
1	A A	100	10000	200.3	836.7	56.0	1016.0	323	101.04	37.97
2	B B	94.1	9409	174.1	204.7	80.0	104.0	858	40.14	36.61
Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Md X	PkPosX	PkCnt	HPCV	Min	Max
3	C C	100	9409	112.0	117.2	43.0	175	11.18	0.0	1022.0
	D D	77.5	7290	131.1	125.6	121.0	142	10.19	58.0	1023.0
4	F F	72.8	6848	135.4	127.5	121.0	142	10.19	74.0	1023.0
5	E E	100	9409	177.6	211.4	80.0	218	5.00	2.0	1023.0
	G G	69.3	6518	218.6	224.3	230.0	164	5.61	124.0	1023.0

Şekil 4.9. Sağlıklı bir kişinin 24 saatlik izole edilmiş lökosit kültürü sonrası nispi RNA içeriği sıfırıncı saate göre çok farklı bulunmadı (Mean X=131.1, FL3= 640 nm).



Stats : Normalized			Listgating : Disabled							
Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y	PkPosX	PkPosY	PkCnt	FPCVX	FPCVY
1	A A	100	10000	354.6	904.1	1016.0	1016.0	702	83.79	28.02
2	B B	93.3	9334	232.0	271.6	232.0	280.0	332	40.31	36.51
Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Md X	PkPosX	PkCnt	HPCV	Min	Max
3	C C	100	9334	182.3	134.6	108.0	123	7.36	0.0	1022.0
	D D	92.8	8662	193.0	143.1	108.0	123	7.36	74.0	1019.0
4	F F	88.9	8294	198.6	148.5	108.0	123	7.36	74.0	1019.0
5	E E	100	9334	235.4	232.5	240.0	162	4.70	2.0	1023.0
	G G	87.9	8205	255.4	236.4	240.0	162	4.70	124.0	1021.0

Şekil 4.10. Sağlıklı bir kişinin 48 saatlik izole edilmiş lökosit kültürü sonrası nispi RNA içeriği 24 saatlik kültür sonrası RNA içeriğine göre daha yüksek bulundu (Mean X=193.0, FL3= 640 nm).



Stats : Normalized Listgating : Disabled

Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Mn Y	PkPosX	PkPosY	PkCnt	FPCVX	FPCVY
1	A A	100	10000	468.6	999.3	1016.0	1016.0	286	43.93	10.25
2	B B	93.6	9364	298.3	327.7	240.0	280.0	171	35.99	33.30

Hist	Region ID	%	Count	Mn X	Md X	PkPosX	PkCnt	HPCV	Min	Max
3	C C	100	9364	280.8	280.1	246.0	48	6.54	0.0	1022.0
	D D	97.4	9123	287.1	283.5	246.0	48	6.54	58.0	1023.0
4	F F	100	9364	280.8	280.1	246.0	48	6.54	14.0	1023.0
5	E E	100	9364	301.9	272.0	245.0	87	8.08	2.0	1023.0
	G G	95.4	8931	312.3	276.9	245.0	87	8.08	124.0	1023.0

Şekil 4.11. Sağlıklı bir kişinin 72 saatlik izole edilmiş lökosit kültürü sonrası nispi RNA içeriği, 24 ve 48 saatlik kültür sonrası nispi RNA içeriklerine göre daha fazla bulundu (Mean X=287.1, FL3= 640nm).

Sonuçta 72 saatlik kültür yapmaya karar verildi Bu karardan sonra metodun yinelenebilirliğini kontrol etmek için 5 ayrı sağlıklı kişiden kan örneği alınarak 72 saatlik kültür sonrası RNA ölçümü yapıldı. Ölçüm sonrası RNA içeriklerinin birbirine uygun olduğu bulundu.

Sonuç 5. Yedi DS'lu ve iki sağlıklı kişinin 72 saatlik kültür sonrası RNA içerikleri flow sitometride ölçüldü. Sonuçlara göre hasta ve sağlıklı kişilerin RNA içerikleri arasında fark olmadığı bulundu. Oysa daha önceki çalışmamızda DS ve kontrollerin NOR proteinleri arasında fark bulunmuştu. Acaba kültür yöntemimiz farklı olduğu için mi RNA'lar arasında fark bulunamadı ya da kontrollere göre DS'lu hastalarda daha düşük çıktı. Bunu test etmek için yine sağlıklı bir kişiden kan alınarak 72 saatlik hem total kan kültürü hem de izole edilmiş lökosit kültürü yapıldı. 72. saatin sonunda rutin olarak kullanılan çıkarım işlemleri yapıldı. Her iki kültürden de preparat hazırlandı. NOR boyama yapıldı (56). Her iki kültür içinde 100 interfaz hücresi, özel olarak yaptırılmış bilgisayar programı ile ölçüldü (1). Her iki kültür arasında NOR proteinleri açısından istatistiksel olarak fark bulunamadı ($p>0.05$). O halde aynı kişinin total kan kültürü ile ayrıştırılmış lenfosit kültürleri, aynı NOR aktivitesini göstermişlerdir. Sonuçta aynı uyarılmaya sahip olmuşlardır.

B. Yöntemin Özgünlüğünü Test Etmek İçin Yapılan Deneme ve Sonuçlar

Kullanılan yöntemle doğru olarak RNA ölçüldüğünden emin olmak için hücreler DNAaz-I, RNAaz-A ve Aktinomisin-D ile etkileştirildiler. Ayrıca ALL ve AML hastalarının RNA içerikleri ile kontrolün RNA içeriği karşılaştırıldı.

1. Hücrelerin DNaz-I ile etkileştirilmesi

Hücrelerin DNaz'la etkileştirilmesi yöntem gereç ve yöntemde (3.2.3 Yöntemin Olgunlaşması İçin Yapılan Denemeler) belirtildiği şekilde uygulandı. İki tüp hazırlandı. Tüplerden biri kontrol olarak kullanıldı, diğeri DNAaz-I'le muamele edildi.

Sonuç: DNA (F_{530})'nın %92'si, RNA (F_{640})'nin %7,2 'si kayboldu. DNaz-I'le muamele sonucunda DNA'nın büyük bir kısmının kaybolması RNA'nın değişmeden kalması metodumuzun RNA ölçümü için spesifik (özellik) olduğunu göstermiştir.

2. Hücrelerin RNAaz-A ile Etkileştirilmesi

Deneme 1. Enzimin çalışma pH'sının belirlemek için fikse edilen hücrelerde çalışıldı. 3 farklı pH'larda (pH=7.2, pH=5.5, pH = 8.0) hazırlanan RNAaz-A solüsyonları kullanıldı.,

RNAaz-A'nın en etkin şekilde pH=8.0'da çalıştığı bulundu. (pH=8.0 de RNA'nın %49'u, pH=7.2 de RNA'nın % 33'ü, pH= 5.5 de RNA'nın % 27'sinin azaldığı bulunmuştur).

Deneme 2. Hücreler 72 saatlik kültür sonrası RNAaz-A ile etkileştirildi.

Sonuçta RNA'nın %65'i, DNA'nın %56.83'ü kayboldu. 72 saatlik kültür yapılan hücreler kültürden çıkartılıp bir gün bekletildikten sonra RNaz ile muamele edildiğinde ise RNA'nın %74.92'si, DNA'nın %57.86'sı nın kaybolduğu bulunmuştur.

Deneme 3. Fikse edilmiş hücrelerde triton-X kullanmadan RNAaz'la muamele yapmaya karar verildi. Fikse edilmiş hücrelerin bulunduğu hücre süspansiyonu 5'er ml olacak şekilde iki tüpe paylaştırıldı. 1.tüpe 200 µl RNaz solusyonu (5 mg RNAaz/200µl PBS) ,2. tüpe 200 µl RNaz solusyonu (10 mg RNaz/200µl PBS) ilave edildi. İnkübasyondan sonra triton X içermeyen solusyon A'dan ilave edildi. 1. tüpte RNA'nın % 43.81'i, 2.tüpte % 51.66'sı kayboldu.

Deneme 4. Fikse edilmemiş hücrelerde triton-X kullanmadan RNaz'la muamele yapmaya karar verildi. 100 µl RNAaz solusyonu (10 mg RNAaz/200µl PBS) kullanıldı. RNA'nın % 40.18'i, DNA'nın % 51.93'ü kaybolduğu bulunmuştur.

Yapılan birçok denemeler sonrasında hem DNA'da hem'de RNA'da azalma bulununca, İstanbul'da bulunan Pakize İ. Tarzi laboratuvarında aynı çalışmalar yapıldı ve yaklaşık benzer sonuçlar elde edildi.

Sonuçlarımıza benzer sonuçlar Toba ve ark. (52) tarafında da bulunmuştur. Niigata University Tıp Fakültesinde bulunan Prof.K. Toba'ya sonuçlarımız gönderildi. Bu kişi de ALL ve AML hastalarının RNA içeriklerini kontrollerinki ile karşılaştırarak çalışma yapmamızı ve bu hastaların RNA içeriklerinin kontrollerden yüksek çıkması durumunda, yöntemimizin doğru olduğunu belirtmiştir.

3. ALL ve AML Hastalarının RNA İçeriklerinin Kontrollerinki ile Karşılaştırılması

ALL'li hastadan kan örneği ve AML'li hastadan hem kemik iliği hem de heparinli kan örneği alındı. RNA içerikleri sıfırıncı zamanda (in vivo) ölçüldü. Ölçüm için, lökositler izole edildikten sonra yukarıda belirtilen hücre boyama yöntemine göre boyama yapıldıktan sonra ölçüm yapıldı.

Sonuç

Kontrolde F_{640} Mean X = 112.4 , RNA Index (RI)= 10.2

ALL'li hastada F_{640} Mean X = 132.4, RI= 11,8

AML'li hastada F_{640} Mean X = 159.1, RI= 14.1 (kan örneği)

AML'li hastada F_{640} Mean X = 187.9, RI= 16.7 (kemik iliği örneği) sonuçlar bulundu.

Elde ettiğimiz RNA içeriklerinin ve RI'lerinin literatür sonuçlarıyla karşılaştırıldığı zaman benzer olduğu bulundu (57).

4. Hücrelerin Aktinomisin D ile Etkileştirilmesi

Aktinomisin-D RNA sentezini durduran, DNA sentezini etkilemeyen bir maddedir (50,54). Bu nedenle sağlıklı bir kişiden kan örneği alınarak hücreler Aktinomisin D ile etkileştirildi (0.05 mg/ml Aktinomisin D çözeltisinden 50ml'lik kültür ortamına 25 µl eklendi). Aynı kişiden iki farklı kültür yapıldı. Kültürün biri Aktinomisin D ile muamele edildi, diğer kültür kontrol olarak kullanıldı.

Sonuç. Kültürün 24. saatinde Aktinomisin D iave edildi. 48.saatte kültür sonlandırıldı. Kontrolün F_{640} Mean X = 149.7, Aktinomisin-D ile etkileştirilmiş kültürün F_{640} Mean X = 106.6 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre bir kez daha ölçülenin RNA olduğuna karar verildi.

5. Flow Stometri Ölçüm Sonuçları ve Spektrofotometri Ölçüm Sonuçlarının Karşılaştırılması ve Elde Edilen Bulgular

Flow stometride doğru olarak RNA ölçüp ölçmediğimizden emin olmak için hücrelerin sıfırncı saatte, 24, 48 ve 72 saat sonrası RNA içerikleri hem flow sitometride hem de spektrofotometride gereçler ve yöntem bölümünde belirtildiği (3.2.3 Yöntemin Olgunlaşması İçin Yapılan Denemeler) şekilde ölçüldü.

Tablo 4.1. Hücrelerin RNA içeriklerinin Flow sitometrik ve spektrofotometrik ölçüm sonuçları

Ölçüm	0.saat	24.saat	48.saat	72.saat
Spektrofotometrik ölçüm	124 µg/ml	170 µg/ml	180 µg/ml	320 µg/ml
Flow sitometrik ölçüm (F ₆₄₀ mean X)	110.8	134.8	193.0	306.2

Sonuçlara göre spektrofotometrik ve flow stometrik ölçüm sonuçlarının birbiriyle uyumlu olduğu bulunmuştur.

4.3.DS'LU HASTALAR VE KONTROLLERİN RNA İÇERİKLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI SONUCU ELDE EDİLEN BULGULAR

Hasta ve kontrol örneklerimiz 12-27 yaş arası (yetişkin grup) ve 0 -10 yaş arası (çocuk grup) olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. 12-27 yaş grubunda 12 DS'lu hasta ve 8 sağlıklı kişi, 0 -10 yaş grubunda ise 26 DS'lu hasta ve 20 sağlıklı kişi bulunmaktadır. Her iki grupta bulunan kişilerin 72 saatlik kültür sonrası FHA ile uyarılan lenfositlerindeki total RNA içerikleri flow sitometri ile ölçülmüştür. Hasta ve sağlıklı kontrollerin yaş ortalamaları ve nispi RNA içeriklerinin ortalamaları sırasıyla Tablo 4.2 ve 4.3'te gösterilmiştir.

Mann-Whitney *U* testine göre, çocuk grubundaki DS'lu hastaların FHA ile uyarılan lenfositlerindeki nispi RNA içeriği, çocuk grubunu oluşturan sağlıklı kontrollerin nispi RNA içeriğiyle karşılaştırıldığında, çocuk DS'luların RNA içeriği yüksek bulunmuştur (p=0.026, Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Çocuk grubunu oluşturan DS'lu hastaların ve kontrollerin yaş ortalamasıyla nispi RNA içerikleri (F₆₄₀ mean-X)

Gruplar	Örneklerin sayısı	F ₆₄₀ (Mean-X) ± SD	Yaş (Ort ± SD)
DS'lu hastalar	26	256.02 ± 31.55	2.17 ± 2.81
Sağlıklı kontroller	20	236.45 ± 16.68	3.30 ± 2.98

$$Z = 2.227, p = 0.026$$

Halbuki, yetişkin DS'lu hastaların FHA ile uyarılan lenfositlerindeki nispi RNA içeriği, yetişkin grubundaki kontrollerin nispi RNA içeriğinden oldukça düşük olduğu bulunmuştur (p=0.001, Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Yetişkin grubunu oluşturan DS'lu hastaların ve kontrollerin yaş ortalamasıyla nispi RNA içerikleri (F₆₄₀ mean-X)

Gruplar	Örneklerin sayısı	F ₆₄₀ (Mean-X) ± SD	Yaş (Ort ± SD)
DS'lu hastalar	12	187.28 ± 33.43	17.41 ± 4.54
Sağlıklı kontroller	8	246.30 ± 22.27	17.37 ± 5.47

$$Z = 3.086, p = 0.001$$

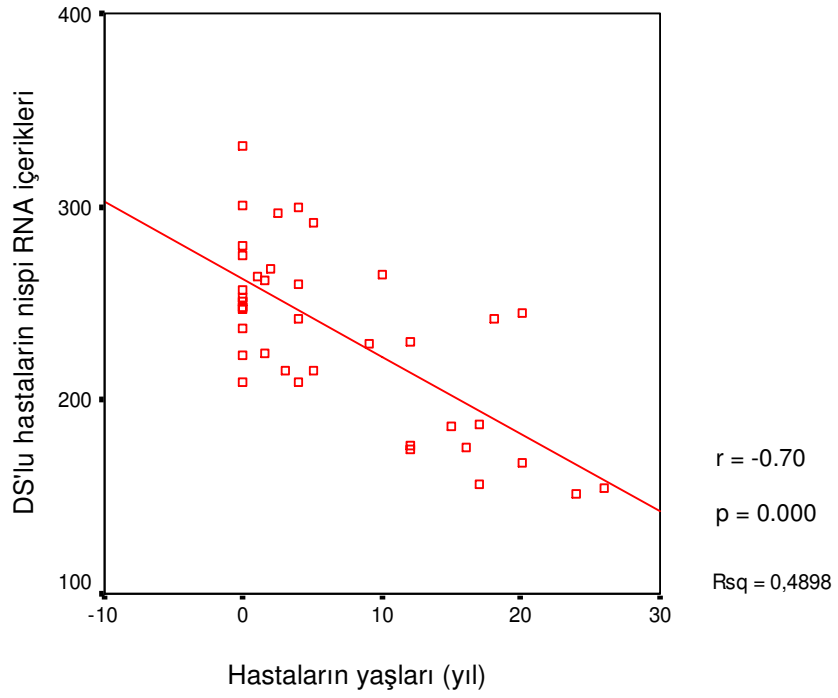
Hastaların ve kontrollerin yaşları dikkate alınmadan kontrollerle karşılaştırma yapıldığında ise her iki grubun RNA içerikleri arasında fark olmadığı bulunmuştur (p= 0.974, Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Yaşlar dikkate alınmadan, DS'lu hasta grubu ile kontrol grubunun RNA içerikleri (F₆₄₀mean-X)

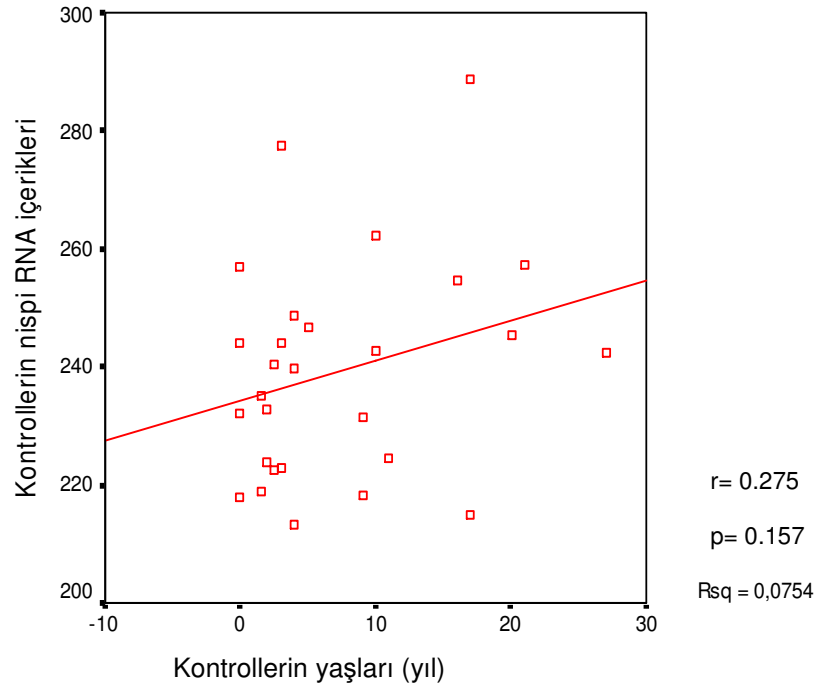
Gruplar	Örneklerin sayısı	F ₆₄₀ (Mean-X) ± SD	Yaş (Ort ± SD)
DS'lu hastalar	38	234.31 ± 45.32	6.99 ± 7.94
Sağlıklı kontroller	28	239.26 ± 18.57	7.32 ± 7.48

$$Z = 0.032, p = 0.974$$

Yaş ve RNA içeriği arasındaki ilişkiyi tespit etmek için Lineer regresyon analizi kullanıldı. Bu teste göre, DS'lu hastaların yaşı arttıkça FHA ile stimüle edilen lenfositlerindeki nispi RNA içeriğinin düzenli bir şekilde azaldığı bulunmuştur (r=-0.70, p=0.000, Şekil 4.12). Kontrol grubunda ise yaş ve FHA ile stimüle edilen lenfositlerdeki nispi RNA içeriği arasında herhangi bir ilişki bulunamamıştır (r=0.275, p=0.157, Şekil 4.13).

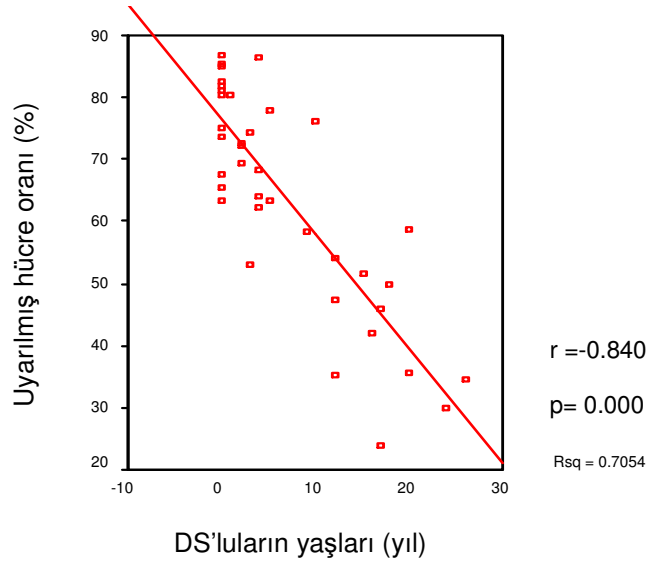


Şekil 4.12. Hastaların yaşları ile uyarılmış lenfositlerindeki nispi RNA içerikleri (emisyon F_{640}) arasındaki ilişki. DS'lularda ,yaş arttıkça RNA içeriğinin azaldığı bulundu.

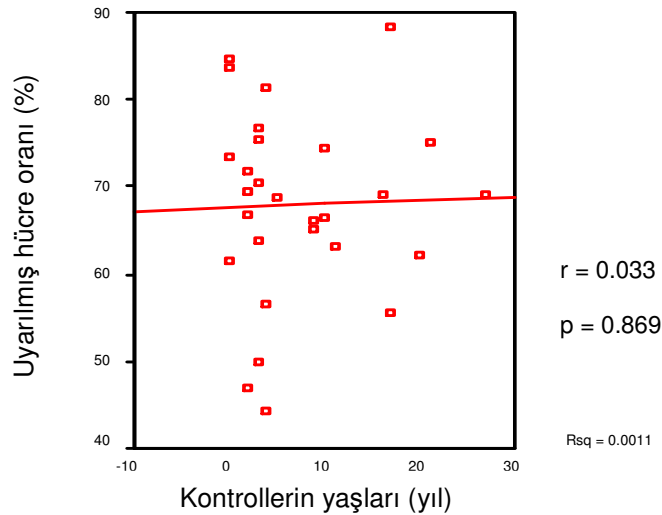


Şekil 4.13. Sağlıklı kontrollerin yaşları ile uyarılmış lenfositlerindeki nispi RNA içerikleri (emisyon F_{640}) arasındaki ilişki. Kontrollerde, yaş ve RNA içeriği arasında fark bulunamadı.

Mitojenle 72 saat uyarılmış olan hücrelerin, genel hücre sayısına oranı ile yaş arasındaki ilişki lineer regresyon analizi kullanılarak test edildi. Test sonucuna göre , DS'lular da yaş arttıkça hücrelerin mitojenle uyarılma %'sinin azaldığı bulunmuştur ($r=-0.840$, $p=0.000$, Şekil 4.14). Buna karşın kontrollerde yaş ile hücrelerin mitojenle uyarılma %'si arasında bir ilişki bulunamamıştır ($r=0.033$, $p=0.869$, Şekil 4.15).



Şekil 4.14. Hastaların yaşları ile uyarılmış hücre %'si arasındaki ilişki. DS'lularda, yaş ilerledikçe uyarılmış hücre %'sinin azaldığı bulundu.



Şekil 4.15. Kontrollerin yaşları ile uyarılmış hücre %'si arasındaki ilişki. Kontrollerde, yaş ve uyarılmış hücre %'si arasında bir ilişki bulunamadı.

Yetişkin ve çocuk olmak üzere iki grubu oluşturan, hem hasta hem de sağlıklı kişilerin RNA içerikleri (F_{640} mean X) açısından büyük kişisel farklılıklar vardır. (Tablo 4.5-4.8).

Tablo 4.5. Yetişkin DS'lu hastaların (n=12) yaşları, cinsiyetleri ve nispi RNA içerikleri.

Hastalar	Cinsiyet	Yaş (yıl)	F_{640} Mean X
FD	E	20	167,4
AA	K	20	244,8
RC	E	18	242,1
SY	K	24	151,4
CU	E	26	154,7
SA	E	16	175,0
AY	E	17	157,0
DS	E	17	187,5
HG	E	15	186,2
NK	E	12	176,4
SU	E	12	174,2
TC	E	12	230,6
Ort. ± SS		17,41±4.54	187.28± 33.43

Tablo 4.6. Çocuk DS'lu hastaların (n=26) yaşları, cinsiyetleri ve nispi RNA içerikleri

Hastalar	Cinsiyet	Yaş (yıl)	F ₆₄₀ Mean X
SOO	K	3	215,5
AS	K	0	300,8
MK	K	0	251,3
BT*	K	1,5	223,8
SY	K	1,5	261,8
BS	K	0	257,1
OYS	E	4	299,8
IK	K	0	209,6
TT*	E	5	215,6
KT	E	5	291,8
CB	E	0	223,6
ECC	E	0	237,2
NY	K	0	248,3
NM	K	0	247,1
GS	K	0	252,7
RO	E	1	263,8
OU	E	0	279,8
LG	K	2	268,3
NA	K	0	274,8
ECÖ	E	0	331,5
IU	E	2,5	296,3
MT	E	4	259,8
SB	E	4	242,5
MKD	E	10	264,8
ID	K	4	209,3
TK	E	9	229,5
Ort. ± SS		2,17±2,81	256,02±31,55

* Translokasyon tipi (14;21)(q10q10) kromozom 21'e sahip olan hastalar.

Tablo 4.7. Yetişkin sağlıklı kontrollerin (n=8) yaşları, cinsiyetleri ve nispi RNA içerikleri.

Kontrol	Cinsiyet	Yaş (yıl)	F₆₄₀ Mean X
OG	K	11	224,5
MA	E	10	242,7
SE	K	16	254,6
ÖK	K	27	242,4
PC	E	17	214,9
EE	E	17	288,6
AA	K	21	257,4
SK	E	20	245,3
Ort. ± SS		17,37±5,47	246,30±22,27

Tablo 4.8. Çocuk sağlıklı kontrollerin (n=20) yaşları, cinsiyetleri ve nispi RNA içerikleri

Kontrol	Cinsiyet	Yaş (yıl)	F₆₄₀ Mean X
HY	E	4	213,2
ZO	K	2	224,0
OA	E	4	248,6
HAK	E	2,5	222,6
FC	K	3	222,8
IS	E	2,5	240,3
BA	E	5	246,6
RA	K	0	232,0
MG	E	0	243,9
EA	E	3	277,5
MCC	K	1,5	235,0
ED	K	1,5	219,0
MK	K	2	232,7
RU	K	0	257,1
ZK	K	0	218,0
SS	E	4	239,7
BA	E	3	244,1
KK	E	9	231,3
ÖK	K	10	262,4
GS	K	9	218,2
Ort. ± SD		3,30 ± 2,98	236,45 ± 16,68

Mann-Whitney *U* testine göre, çocuk grubundaki DS'lu hastaların FHA ile uyarılan lenfositlerindeki nispi RNA içeriği, yetişkin grubunu

oluşturan DS'lu hastaların nispi RNA içeriğiyle karşılaştırıldığında, çocuk DS'luların RNA içeriği yetişkinlere göre fazla bulunmuştur ($p=0.000$, Tablo 4.9).

Tablo 4.9. Çocuk DS'lu hasta grubu ile yetişkin DS'lu grubun RNA içerikleri (F_{640} mean-X)'nin karşılaştırılması.

Gruplar	Örneklerin sayısı	F_{640} (Mean-X) \pm SD	Yaş (Ort \pm SD)
Çocuk DS'lu hastalar	26	256.02 \pm 31.55	2.17 \pm 2.81
Yetişkin DS'lu hastalar	12	187.28 \pm 33.43	17.41 \pm 4.54

$$Z = 4.145, p = 0.000$$

Çocuk grubundaki kontrollerin FHA ile uyarılan lenfositlerindeki nispi RNA içeriği ile yetişkin grubunu oluşturan kontrollerin FHA ile uyarılan lenfositlerindeki nispi RNA içeriği Mann-Whitney U testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Sonuçlara göre çocuk grubundaki kontrollerle yetişkin grubundaki kontrollerin nispi RNA içerikleri arasında istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır ($p=0.24$, Tablo 4.10).

Tablo 4.10. Çocuk kontrol grubu ile yetişkin kontrol grubun RNA içerikleri (F_{640} mean-X)'nin karşılaştırılması.

Gruplar	Örneklerin sayısı	F_{640} (Mean-X) \pm SD	Yaş (Ort \pm SD)
Çocuk kontroller	20	236.45 \pm 16.68	3.30 \pm 2.98
Yetişkin kontroller	8	246.30 \pm 22.27	17.37 \pm 5.47

$$Z = 1.221, p = 0.237$$

Hem DS'lu hastaların hem de kontrollerin cinsiyeti ile hücrelerin RNA içeriği karşılaştırıldığında, RNA içeriği ve cinsiyet arasında herhangi bir fark bulunamamıştır ($p > 0.05$). Ancak bu sonuca temkinli yaklaşmak gerekir. Çünkü her iki grupta da kızların sayısı azdır (yetişkin grupta 1 kız, çocuk grubunda 13 kız). Bu sayı istatistiksel olarak sağlıklı bir değerlendirme için uygun olmayabilir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

İnsanlarda 21. kromozom üzerinde yaklaşık 300 gen bulunur. Fazladan bulunan kromozom 21'den dolayı, bu genlerin DS'lularda aşırı ifade edildiği ve DS fenotipinin fazla ifade edilen kromozom 21 gen ürünlerinin artmış aktivitesinden ortaya çıktığı tahmin edilmektedir (37, 42). Gerçekten de kromozom 21 üzerinde bulunan genlerin fazla ifade edilmesi, DS fenotipinin oluşmasını açıklayan ana bir hipotez olarak kabul edilmektedir (59). Fakat, bununla birlikte fazla ifade edilme bazı genler için rapor edilmiştir, tüm genler ifade olmazlar ve bazı genlerin ifade edilme düzeyi yaşa bağlı olarak değişiklik gösterir (37, 42, 58). Bu nedenle DS fenotipi basitçe gen-dozaaj etki hipoteziyle açıklanamaz (59, 60). Shim ve ark. (59) yaptıkları bir çalışmayla gen-dozaaj hipotezine karşı çıkmışlardır. Ancak mevcut çalışmamızda DS'lu hasta lenfositlerinin erken yaşlarda kontrollere göre daha fazla RNA içerdikleri, yaş ilerledikçe de kontrollerden daha az RNA içerdikleri bulunmuştur (sırasıyla $p=0.026$, $p=0.001$).

Önceki çalışmalarımız DS'lu çocukların uyarılmış lenfositlerindeki NOR alanlarının sağlıklı kontrollerinkine göre % 40'lara varan artışlar gösterdiğini ortaya koymuştur (1). AgNOR proteinlerinin tamamı aktif rRNA senteziyle ilişkili olmasa bile (17, 26, 27), bu çalışmada da DS'lu çocukların uyarılmış lenfositlerinde RNA içeriğinin aynı yaş grubundan olan kontrollere göre fazla olduğu bulunmuştur ($p=0.026$). Bu sonuç DS'lu bebeklerde/çocuklarda fazla RNA sentezi için boş ve gereksiz yere enerji harcandığını göstermektedir.

Borsatto and Smith (22) tarafından gümüş boyama yöntemi ile 40 DS'lu hastanın metafaz kromozomlarında Ag ile boyanan kromozomların sayısı incelenmiştir. DS'lu hasta grubunu 0-25 yaş (genç grup) ve 29-48 yaş (yaşlı grup) arası olmak üzere iki gruba ayırmış ve yaşlı grupta Ag ile boyanan metafaz kromozom sayısının önemli derecede genç gruba göre azaldığını bulmuşlardır (22). Çalışmamızda da yaş ilerledikçe RNA içeriğinin kontrol grubuna göre azaldığını buldu ($r=-0.70$, $p=0.000$). Dogget ve ark. (25) tarafından RNA, RNA polimeraz-I tarafından sentezlendiği için RNA polimeraz aktivitesini ölçen bir yöntem kullanılarak çalışma yapılmıştır ve FHA ile 8 saat uyarılmış olan 20 yaşından 70 yaşına kadar olan dağılım içerisinde normal insan T lenfositlerinde yaşın artmasıyla birlikte rRNA sentezinde %33 oranında bir azalmanın olduğu bulunmuştur (25). Çalışmamız gösterdi ki, normal popülasyonda yaşlı kişilerde görülen RNA içeriğindeki değişiklikler, DS'lu kişilerde daha erken yaşta başlamaktadır. DS'lu bireylerde AD'ın başlaması genel popülasyondaki yaşlı bireylere göre 20'li yaşlar ya da çok daha erken yaşlar olarak bilinir. 40 yaşlarının başlarında nöropatolojik değişiklikleri içerirler. Bu nedenle DS'lu hastalar erken yaşlanmanın bir modeli olarak kabul edilmektedir (36).

Çalışmamızda, yetişkin ve çocuk olmak üzere iki grubu oluşturan, hem hasta hem de sağlıklı kişilerin, RNA içerikleri (F_{640} mean X) açısından büyük kişisel farklılıklar gösterdiği bulunmuştur. Doggett ve ark. tarafından yapılan araştırmada da, normal sağlıklı insanların lenfosit kültürlerinde FHA ile neden olunan rRNA sentezinin artan yaşla birlikte

azaldığı bulunmuştur. Ancak aynı yaş grubunun bireyleri arasındaki kişisel farklılıkların, yaşla ilişkili farklılıklardan daha büyük olduğu rapor edilmiştir (25).

DS'uları FHA ile uyarılmış lenfositlerinde yaşa bağlı olarak RNA sentezindeki azalma yaşın artmasıyla birlikte hücrelerin mitojene karşı verdikleri cevabın azalmasıyla ilişkili olabilir. FHE ile uyarılmış yaşlı DS'lu (> 30 yaş) lökositlerde IL-2 (sitokin) üretimi ve çoğalma aynı yaş grubundan olan kontrollere göre önemli ölçüde düşük bulunmuştur (36).

McQuillan ve Choo (41) DNA-RNA hibridizasyon yöntemine göre 8 DS'lu hastanın rRNA ve mRNA seviyelerini hem uyarılmamış lenfositlerde hem de fibroblastlarda ölçmüştür ve RNA seviyelerinin kontrollerden farklı olmadığını bulmuşlardır. Ancak kontroller ve hastaların yaşları belirtilmemiştir. Bizim çalışmamızda da hastaların yaşlarını dikkate almadan (gruplara ayırmadan) kontrollerle karşılaştırma yaptığımız zaman kontrol ve hasta grubunun RNA içerikler arasında fark olmadığı bulunmuştur ($p=0.974$).

Verilerimiz kontrollerle karşılaştırıldığında çocuk grubunda bulunan DS'lu hastalarda RNA içeriğinin fazla olduğunu açıkça göstermektedir. Belki de bu fazlalık embriyonun gelişmesiyle başlamakta, gelişme devam ettikçe ve yaş ilerledikçe kontrollere göre RNA içeriği azalmaktadır. DS'lu hastaların RNA içeriğindeki bu değişiklikler, DS'lu fenotipinin oluşmasında (61) ya da bu kişilerde erken yaşlanmanın ortaya çıkmasında bir etken olabilirler.

6. KAYNAKLAR

1. Demirtas H, Imamoglu N, Donmez H, Cucer N, Yilmaz A., ve ark. Condensed chromatin surface and NORs surface enhancement in mitogen-stimulated lymphocytes of Down syndrome patients. *Ann. Génét-Paris* 2001; 44 : 77-82.
2. Raska I, Koberna K, Malinsky J, Fidlerova H, Masata M. The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Bio Cell* 2004; 96(8): 579-94.
3. Comai L. The nucleolus : a paradigm for cell proliferation and aging. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32 : 1473-1478.
4. Pederson T. Proteomics of the nucleolus : more proteins, more functions ? *Trends Biochem Sci* 2002; 27(3): 111-112.
5. Gerbi AS, Borovjagin AV, Lange TS. The nucleolus: a site of ribonucleoprotein maturation. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15: 318-325.
6. Olson MOJ., Dundr M, Szebeni A. The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends Cell Biol* 2000; 10: 189-196.
7. Moss T. At the crossroads of growth control; making ribosomal RNA. *Curr Opin Genet Dev* 2004; 14: 210-217.

8. Haaf T, Hayman DL, Schmid M. Quantitative determination of rDNA transcription units in vertebrate cells. *Exp Cell Res* 1991; 193: 78-86.
9. Olson MOJ, Hingorani K, Szebeni A. Conventional and nonconventional roles of nucleolus. *Intern Reiew Cyto* 2002; 219: 199-266.
10. Scheer U, Hock R. Structure and function of nucleolus. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 385-389.
11. Dez C, Tollervey D. Ribosome synthesis meets the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* 2004; 7: 631-637.
12. Moreno LMG, Cimadevilla JM, Pardo HG., Zahonero MC, Arias JL. NOR activity in hippocampal areas during the postnatal development and ageing. *Mech Ageing Dev* 1997; 97: 173-181.
13. Derenzini M, Farabegoli F, Pession A, Novello F. Spatial redistribution of ribosomal chromatin in the fibrillar centers of human circulating lymphocytes after stimulation of transcription. *Exp Cell Res* 1987; 170: 31-41.
14. Schedle A, Willheim M, Zeitelberger A, Gessl A, Frauendorfer K and et al. Nucleolar morphology and rDNA in situ hybridisation in monocytes. 1992; 269: 473-780.
15. Derenzini M, Hernandez-Verdun D, Pession A, Novella F. Structural organization of chromatin in nucleolar organizer regions of nucleoli with a nucleolonema-like and compact ribonucleoprotein distribution. *J Ultras Res* 1983; 84: 161-172.
16. Derenzini M, Hernandez-Verdun D, Farabegoli F, Pession A, Novello F. Structure of ribosomal genes of mammalian cells in situ. *Chromosoma* 1987; 95: 63-70.
17. Pession A, Farabegoli F, Trere D, Novello F, Montanaro L and et al. The Ag-NOR proteins and transcription and duplication of ribosomal genes in mammalian cell nucleoli. *Chromosoma*, 1991; 100: 242-250.
18. Johnson BF, Marciniak RA, Guarente L. Telomeres, the nucleolus and aging. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10:332-338.
19. Derenzini M. The AgNORs. *Micron* 2000; 31: 117-120.

20. Verma RS, Rodriguez J. Structural organization of ribosomal cistrons in human nucleolar organizing chromosomes. *Cytobios* 1985; 44: 25-28.
21. Gren JE, Rosenbaum KN, Rapoport SI, Schapiro MB, White BJ. Variant nucleolus organizing regions and the risk of Down syndrome. *Clin Genet* 1989; 35: 243-250.
22. Borsatto B, Smith MAC. Reduction of the activity of ribosomal genes with age in down's syndrome. *Gerontology* 1996; 42: 147-154.
23. Silva AMA, Payao SLM, Borsatto B, Bertolucci PHF, Smith MAC. Uuantitative evaluation of rRNA in alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev* 2000; 120: 57-64.
24. Roussel P, Hernandez-Verdun D. Identification of Ag-NOR proteins, markers of proliferation related to ribosomal gene activity. *Exp Cell Res* 1994; 214: 465-472.
25. Dogget DL, Strehler BL, Makinodan T. Age-Related RNA Polymerase I Activity in Isolated Nuclei of PHA Stimulated human lymphocytes. *Mech Ageing Dev* 1986; 36: 25-39.
26. Hernandez-Verdun D, Derenzini M, Boutelille M. Relationship between the Ag-NOR proteins and ribosomal chromatin in situ during drug-induced RNA synthesis inhibition. *J Ultras Res* 1984; 88: 55-65.
27. Trere D, Pession A, Derenzini M. The silver-stained proteins of interphasic nucleolar organizer region as a parameter of cell duplication rate. *Exp Cell Res* 1989; 184: 131-137.
28. Jaehning JA, Stewart CC, Roeder RG. DNA-Dependent RNA polymerase levels during the response of human peripheral lymphocyte to phytohemagglutinin. *Cell* 1975; 4: 51-57.
29. Leary DJ, Huang S. Regulation of ribosome biogenesis within the nucleolus. *FEBS* 2001; 509; 145-150.
30. Darzynkiewicz Z. Simultaneous analysis of cellular RNA and DNA content, *Methods in Cell Biology* 1994; Vol. 41: pp. 401-420, Academic Press.

31. Jauker F, Rinaldy AR. Population-kinetical approach to rna formation and degradation in growing and in resting cells. *Exp Cell Res* 1983; 143: 163-174.
32. Fatica A, Tollervey D. Making ribosomes. *Curr Opin Cell Biol* 2002; 14: 313-318.
33. Roizen NJ , Patterson D. Down's Syndrome. *Lancet* 2003; 361: 1281-1289.
34. Borsatto B, Smith MAC, Garcez EMDM. , Peres CA. Age-associated mosaicism and polyploidy in Down's Syndrome. *Mech Ageing Dev* 1998; 100: 77-83.
35. Smith MAC, Borsatto B. Down's Syndrome, ageing and fragile sites. *Mech Ageing Dev* 1998; 101: 167-173.
36. Park E, Alberti J, Mehta P, Dalton A, Sersen E., Schuller-Levis G. partial impairment of immune functions in peripheral blood leukocytes from aged men with Down's Syndrome. *Clin Immunol* 2000; 95: 62-69.
37. Gardiner K, Fortna A, Bechtel L, Davisson MT. Mouse models of Down syndrome: how useful can they be? Comparison of the gene content of human chromosome 21 with orthologous mouse genomic regions. *Gene* 2003; 318: 137-147.
38. Shapiro LA, Marks A, Whitaker-Azmitia PM. Increased clusterin expression in old but not young adult S100B transgenic mice: Evidence of neuropathological aging in a model of Down Syndrome. *Brain Res* 2004; 1010: 17-21.
39. Raji NS, Rao KS. Trisomy 21 and accelerated aging: DNA-repair Parameters in peripheral lymphocytes of Down's Syndrome patients. *Mech Ageing Dev* 1998; 100: 85-101.
40. Pash J, Smithgall T, Bustin M. Chromosomal protein HMG-14 is overexpressed in Down Syndrome. *Exp Cell Res* 1991; 193 (1): 232-235.
41. McQuillan CI, Choo KH. Comparison of total cellular DNA , mRNA, and rRNA levels between normal and Down Syndrome patients. *J Inher Metab Dis* 1992; 15: 112-120.

42. Antonarakis SE, Lyle R, Chrast R, Scott HS. Differential gene expression studies to explore the molecular pathophysiology of Down Syndrome. *Brain Res Brain Res Rev* 2001; 36: 265-274.
43. Antonarakis SE. 10 years of genomics, chromosome 21, and Down Syndrome. *Genomics* 1998; 51: 1-16.
44. Nakamura E, Tanaka S. biological ages of adult men and women with Down's Syndrome and its changes with ageing . *Mech Ageing Dev* 1998; 105: 89-103.
45. Pallister C, Jung SS, Shaw I, Nalbantoglu J, Gauthier S and et al. Lymphocyte content of amyloid precursor protein is increased in Down's Syndrome and aging. *Neurobiol Aging* 1997; 18: 97-103.
46. Picot IC, Nicole A, Briand P, Grimber G, Delacourte A and et al. Neuronal-specific expression of human copper-zinc superoxide dismutase gene in transgenic mice: animal model of gene dosage effects in Down's Syndrome. *Brain Res* 1991; 552: 198-214.
47. Yılmaz MT, Deniz G. Cytometry'nin çalışma mekanizması ve prensipleri. *Bilmedya grup, Aktüel Tıp Dergisi, İstanbul, 1999, ss: 1-9.*
48. Radcliff G, Jaroszeski MJ. Basic of Flow Cytometry. In: Jarazeski, M.J., Heller, R. (Eds). *Methods in Molecular Biology. Flow cytometry Protocols*, Humana Press Inc., Totawa, NJ, 1988; 91:1-24.
49. Grunwald D. Flow Cytometry and RNA studies. *Biol Cell* 1993; 78: 27-30.
50. Darzynkiewicz Z, Tragonos F, Sharpless T, Melamed MR. Lymphocyte stimulation: A rapid multiparameter analysis. *Medical Sciences*, 1976; 73: 2881- 2884.
51. Steck K, El-Naggar A. Simultaneous DNA/RNA analysis of solid and hematoreticular malignancies. In: Jarazeski, M.J., Heller, R. (Eds). *Methods in Molecular Biology. Flow cytometry Protocols*, Humana Press Inc., Totawa, NJ, 1988; 91: 167-180.
52. Toba K, Winton E F, Koike T, Shibata A. Simultaneous three color analysis of surface phenotype and DNA-RNA quantitation using 7-amino-actinomycin D and pyronin Y. *J. Immunol Meth.* 1995; 182:193-207.

53. Darzynkiewicz Z. DNA-RNA differential staining using AO. In: Robinson, J.P. (Ed). Handbook of Flow Cytometry Methods. A John Wiley and Sons Inc, USA, 1993; pp.114.
54. Traganos F, Darzynkiewicz Z, Sharpless T, Melamed MR. Simultaneous staining of ribonucleic and deoxyribonucleic acids in unfixed cells using acridine orange in a flow cytofluorometric system. *J Histochem Cytochem* 1977;25 (1): 46-56.
55. Hiraki M. Intracellular DNA and RNA in the course of tumor growth. *Kurume Med J* 1994; 41: 1-13.
56. Lindner LE. Improvements in The silver-staining technique for Nucleolar Organizer Regions (AgNOR). *J Histochem Cytochem* 1993; 41 (3): 439-445.
57. Hiddeman W, Wörmann B, Messerer D, Sprngfeld R, Büchner Th. Analysis of the cellular DNA and RNA content in acute leukemias by Flow Cytometry. *J Cancer Res Clin Oncol* 1990; 116: 507-512.
58. Harris-Cerruti C, Kamsler A, Kaplan B, Lamb B, Segal. Functional and morphological alterations in compound transgenic mice overexpressing Cu/Zn superoxide dismutase and amyloid precursor protein. *Eur J Neurosc* 2004; 19 : 1174-1190.
59. Cheon M., Shim KS, Kim SH, Hara A, Lubec G. Protein levels of genes encoded on chromosome 21 in fetal Down syndrome brain: Challenging the gene dosage effect hypothesis (Part IV). *Amino Acids* 2003; 25: 41-47.
60. Ferrando-Miguel R, Cheon MS, Lubec G. Protein levels of genes encoded on chromosome 21 in fetal Down Syndrome brain (Part V): Overexpression of phosphatidyl-inositol-glycan class P protein (DSCR5). *Amino Acids* 2004; 26: 255-261.
61. İmamoğlu N, Demirtaş H, Dönmez-Altuntaş H, Hamurcu Z, İlten A. NORs expression increases on metaphase chromosomes of Down syndrome lymphocytes, in concordance with the mitogen concentration in the culture medium. *Cytometry* 2005; 66B:36-39.

ÖZGEÇMİŞ

Zuhal HAMURCU (HASKÖSE), 05.09.1973 yılında Kayseri’de doğdu. 1984 yılında Feridun Cıngılı İlkokulundan, 1987’de 50. Yıl Dedeman Ortaokulu’ndan mezun oldu. 1990 yılında Kayseri Lisesi’ni bitirdikten sonra 1991’de Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nü kazandı. 1995 yılında aynı bölümden üçüncülükle mezun oldu. 1995 yılı güz döneminde Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nın açmış olduğu yüksek lisans sınavını kazanarak yüksek lisans eğitimine başladı. Aralık 1996’da Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü’nün açmış olduğu Araştırma Görevliliği sınavını kazanarak Aralık 1996’da araştırma görevlisi olarak göreve başladı. 1999 Temmuz ayında aynı bölümün yüksek lisans programını tamamladı. 1999 yılı güz döneminde Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nın açmış olduğu doktora sınavını kazanarak doktora eğitimine başladı ve şu anda doktora programı tez dönemindedir.

Zuhal HAMURCU(HASKÖSE)

Adres : Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi,

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı KAYSERİ

Telofon : 0 542 722 17 54

e-mail : zhamurcu@erciyes.edu.tr