

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KRONİK MİYELOİD LÖSEMİ (KML)  
HASTALARINDA sFRP1 GENİNİN PROMOTÖR  
BÖLGESİNİN EPİGENETİK VE GENETİK  
DEĞİŞİKLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

**MELEK PEHLİVAN**

**TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİMDALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**İZMİR 2008**

T.C.  
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KRONİK MİYELOİD LÖSEMİ (KML)  
HASTALARINDA sFRP1 GENİNİN PROMOTÖR  
BÖLGESİNİN EPİGENETİK VE GENETİK  
DEĞİŞİKLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİMDALİ  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MELEK PEHLİVAN**

Danışman Öğretim Üyesi: Yrd. Doç. Dr. H.Ogün Sercan

Bu araştırma DEÜ Araştırma Fon Saymanlığı tarafından 04.KB.SAG.074 ve  
07.KB.SAG.036.no'lu projeler ile desteklenmiştir.

T.C.  
DOKUZ EYLUL UNIVERSITY  
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

**INVESTIGATION OF THE GENETIC AND  
EPIGENETIC ALTERATIONS IN THE PROMOTOR  
REGION OF sFRP1 GENE IN CHRONIC MIYELOID  
LEUKEMIA (CML) PATIENTS**

MEDICAL BIOLOGY AND GENETICS DEPARTMENT

**MASTER THESIS**

**MELEK PEHLIVAN**

Coordinator of thesis: H. OGUN SERCAN, PhD.

# DİZİN

	<u>Sayfa No</u>
<b>DİZİN</b>	i
Tablo Listesi	v
Şekil Listesi	vi
Kısaltmalar	x
Teşekkür	xii
<b>ÖZET</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	2
<b>1.GİRİŞ VE AMAÇ</b>	3
<b>2.GENEL BİLGİLER</b>	5
2.1. CANONİCAL (β-CATENİN) YOLAK	6
2.2. NON-CANONİCAL WNT SİNYAL İLETİ YOLAKLARI	7
2.3. WNT SİNYAL İLETİSİNDE ROL OYNAYAN BAŞLICA PROTEİNLER	9
2.3.1. Wnt proteinleri	9
2.3.2. Frizzled proteinleri	10
2.3.3. LRP ( Lipoprotein Receptor Related Protein) 5-6	10
2.3.4. Dishevelled	10
2.3.5. GSK3β	11
2.3.6. Axin	11
2.3.7. APC	11
2.3.8. β-katenin	12
2.3.9. TCF/LEF	12
2.4. WNT SİNYAL İLETİMİNİN ANTAGONİSTLERİ	13
2.4.1. Dickkopf	13
2.4.2.Wnt Inhibitory Factor (WIF-1)	13
2.4.3. Cerberus	13
2.4.4. sFRP (Secreted Frizzled Related Protein )	13

2.5. sFRP1 GENİ	16
2.5.1. sFRP1'in kanserle ilişkisi	18
2.6. LÖSEMİLER	21
2.7. KRONİK MİYELOİD LÖSEMİ (KML)	21
2.7.1. KML'de hücrelerin kendi devamlılıklarını sağlayabilme yetenekleri	24
2.7.2. KML ve Wnt sinyal iletiminin ilişkisi	27
2.8. EPİGENETİK DÜZENLENMELER	28
2.8.1. DNA Metilasyonu	30
2.8.2. Metilasyon saptama yöntemleri	32
2.8.2.1. Bisülfid modifikasyonu	32
2.8.2.2. Metilasyon Özgül PCR (MS-PCR)	33
2.8.2.3. Bisülfid PCR	35
<b>3.GEREÇ VE YÖNTEMLER</b>	36
3.1. ÇALIŞMA MATERYALİ	37
3.2. SİTOGENETİK ANALİZ	38
3.3. HÜCRE KÜLTÜRÜ	38
3.4. GENOMİK DNA İZOLASYONU	39
3.5. sFRP1 GENİNİN PROMOTÖR BÖLGESİNDEKİ GENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN SAPTANMASI	41
3.5.1. SSCP Analizi	42
3.5.1.1. SSCP amaçlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	42
3.5.1.2. Agaroz Jel Elektroforezi	44
3.5.1.3. Denatüre olmayan %8'lik poliakrilamid jel hazırlanması	44
3.5.2. DNA Dizi Analizi	46
3.5.2.1. DNA Dizi Analizi için Polimeraz Zincir Reaksiyonu	46
3.5.2.2. Agaroz Jel Elektroforezi	48
3.5.2.3. DNA dizilerinin analiz edilmesi	48

3.6. sFRP1 GENİNİN PROMOTÖR BÖLGESİNDEKİ EPİGENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN SAPTANMASI	48
3.6.1. Bisülfid DNA Modifikasyonu	49
3.6.2. Metilasyon Özgül Polimeraz Zincir Reaksiyonu (MS-PCR)	53
3.6.2.1. Metilasyon Özgül PCR'ın hazırlanışı	53
3.6.2.2. Agaroz Jel Elektroforezi	55
3.6.3. Bisülfid Polimeraz Zincir Reaksiyonu	55
3.6.3.1. Bisülfid PCR'ın hazırlanışı	55
3.6.3.2. Agaroz Jel Elektroforezi	57
3.6.4. DNA Dizi Analizi	57
3.6.5. K562 hücrelerinin demetile edici ajan ile muamelesi sonrası metilasyon düzeyindeki değişikliklerin saptanması	57
3.7. sFRP1 GEN İFADESİNİN ANALİZİ	58
3.7.1. Total RNA izolasyonu	58
3.7.2. Komplementer DNA (cDNA) eldesi	60
3.7.3. Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)	62
3.7.4. Agaroz Jel Elektroforezi	64
<b>4. BULGULAR</b>	65
4.1. DNA İZOLASYONU	65
4.2. sFRP1 GENİNİN PROMOTÖR BÖLGESİNDEKİ GENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN SAPTANMASI	66
4.2.1. Tek Zincir Konformasyon Polimorfizm Analizi (Single Strand Conformation Polymorphism-SSCP) analizi	66
4.2.1.1. PCR reaksiyonu	66
4.2.1.2. SSCP poliakrilamid jel elektroforezi	67
4.2.2. DNA Dizi Analizi	68
4.2.2.1. DNA analizi amacı ile yapılan PCR reaksiyonu	68
4.2.2.2. DNA Dizi Analizi Sonuçları	69
4.3. sFRP1 GENİNİN PROMOTÖR BÖLGESİNDEKİ EPİGENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN SAPTANMASI	90
4.3.1. Metilasyona Özgül PCR (MS-PCR)	90
4.3.2. Bisülfid PCR	95

4.3.3. K562 hücrelerine demetile edici ajan DAC verilerek metilasyon düzeyindeki değişikliklerin saptanması	97
4.4.GEN İFADESİNİN ANALİZİ	100
4.5. PHILADELPHIA KROMOZOMU VE HASTALIK PROGRESYONU İLE sFRP1 METİLASYONUNUN İLİŞKİSİ	102
<b>5.TARTIŞMA</b>	104
<b>6.KAYNAKÇA</b>	111

## TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No:</u>
<b>Tablo 3.1.</b> Polimeraz zincir reaksiyonu içeriği	43
<b>Tablo 3.2.</b> SSCP analizi için kullanılan PCR primerleri	43
<b>Tablo 3.3.</b> SSCP için ısı profili	43
<b>Tablo 3.4.</b> Polimeraz zincir reaksiyonu içeriği	47
<b>Tablo 3.5.</b> DNA Dizi Analizi için kullanılan PCR primerleri	47
<b>Tablo 3.6.</b> DNA Dizi Analizi için ısı profili	48
<b>Tablo 3.7.</b> Dönüşüm reaksiyonu içeriği	51
<b>Tablo 3.8.</b> Dönüşüm için ısı profili	51
<b>Tablo 3.9.</b> Desülfonasyon solüsyonu içeriği	52
<b>Tablo 3.10.</b> Metilasyon özgül PCR reaksiyon içeriği	54
<b>Tablo 3.11.</b> Metile, metile olmayan PCR için kullanılan PCR primerleri	54
<b>Tablo 3.12.</b> Metilasyon Özgül PCR (metile, metile olmayan) reaksiyon ısı profili	55
<b>Tablo 3.13.</b> Bisülfid PCR reaksiyon içeriği	56
<b>Tablo 3.14.</b> Bisülfid PCR için kullanılan PCR primerleri	57
<b>Tablo 3.15.</b> Bisülfid PCR reaksiyon ısı profili	57
<b>Tablo 3.16.</b> cDNA sentezi Karışım I reaksiyon içeriği	61
<b>Tablo 3.17.</b> cDNA sentezi Karışım II reaksiyon içeriği	62
<b>Tablo 3.18.</b> RT-PCR reaksiyon içeriği	63
<b>Tablo 3.19.</b> sFRP1 ekspresyonu için kullanılan PCR primerleri	63
<b>Tablo 3.20.</b> $\beta$ -aktin ekspresyonu için kullanılan PCR primerleri	63
<b>Tablo 3.21.</b> RT-PCR için ısı profili	64
<b>Tablo 4.1.</b> DNA dizi analizi ve SSCP analizi sonuçları	88
<b>Tablo 4.2.</b> Metilasyon özgül PCR sonuçları	93
<b>Tablo 4.3.</b> Metile, hemimetile ve rasgele seçilmiş iki metile olmayan hastadaki CpG adalarının metilasyon durumu	97
<b>Tablo 4.4.</b> 57 adet CpG'nin metilasyon durumu	98
<b>Tablo 4.5.</b> sFRP1 promotöründe metile hastaların sitogenetik verileri	103



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa No:

<b>Şekil 2.1.</b> Canonical Wnt sinyal iletimi	7
<b>Şekil 2.2.</b> Noncanonical Wnt sinyal ileti yolları	8
<b>Şekil 2.3.</b> sFRP ve Frizzled'in homoloji gösteren domainleri	14
<b>Şekil 2.4.</b> sFRP'nin Wnt sinyal iletimindeki rolü	15
<b>Şekil 2.5.</b> sFRP1'in genomik haritası	17
<b>Şekil 2.6.</b> sFRP1'in disülfid bağlarının yerleşimi ve glikolizasyon bölgesi	17
<b>Şekil 2.7.</b> KML'de Philadelphia kromozomu ve BCR-ABL'in domain yapısının şematik gösterimi	23
<b>Şekil 2.8.</b> Lösemi transformasyonu ve hematopoetik kök hücre gelişimi boyunca kendi kendini yenileme özelliğinin karşılaştırılması	25
<b>Şekil 2.9.</b> Normal hematopoez, kronik faz ve blast faz KML arasında kök hücre gelişiminin kıyaslanması	26
<b>Şekil 2.10.</b> Sitozinin 5-metil sitoze dönüşümü	30
<b>Şekil 2.11.</b> Metilasyonun transkripsiyonu etkileme mekanizması	31
<b>Şekil 2.12.</b> Bisülfid modifikasyonu	33
<b>Şekil 2.13.</b> Metilasyon Özgül PCR	34
<b>Şekil 2.14.</b> Metilasyon Özgül primer dizaynı	34
<b>Şekil 4.1.</b> sFRP1 geni promotör bölgesi ile genetik ve epigenetik değişikliklerin analizi için kullanılan primerlerin çakışma noktaları	65
<b>Şekil 4.2.</b> DNA örneklerinin %1'lik agaroz jeldeki görüntüsü	65
<b>Şekil 4.3.</b> PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü	66
<b>Şekil 4.4.</b> Denatüre olmayan %8'lik poliakrilamid jelde yürütülen PCR ürünlerinin görüntüsü	67
<b>Şekil 4.5.</b> Denatüre olmayan %8'lik poliakrilamid jelde yürütülen PCR ürünlerinin görüntüsü	68

<b>Şekil 4.6.</b> DNA dizi analizi PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü	69
<b>Şekil 4.7.</b> sFRP1 promotör bölgesinin DNA dizi analizinde gözlenen üç nükleotidlik delesyon polimorfizmi	70
<b>Şekil 4.8.1.</b> 3 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen homozigot delesyon	70
<b>Şekil 4.8.2.</b> 3 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen homozigot delesyon	71
<b>Şekil 4.9.1.8</b> numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	71
<b>Şekil 4.9.2.8</b> numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	71
<b>Şekil 4.10.1.11</b> numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	72
<b>Şekil 4.10.2.11</b> numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	72
<b>Şekil 4.11.1.12</b> numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	72
<b>Şekil 4.11.2.12</b> numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	73
<b>Şekil 4.12.1.13</b> numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	73
<b>Şekil 4.12.2.13</b> numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	73
<b>Şekil 4.13.1.14</b> numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	74
<b>Şekil 4.13.2.14</b> numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	74
<b>Şekil 4.14.1.16</b> numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen homozigot delesyon	74
<b>Şekil 4.14.2.16</b> numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen homozigot delesyon	75

Şekil 4.15.1.20 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	75
Şekil 4.15.2.20 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	75
Şekil 4.16.1.21 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	76
Şekil 4.16.2.21 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	76
Şekil 4.17.1.22 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	76
Şekil 4.17.2.22 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	77
Şekil 4.18.1.23 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	77
Şekil 4.18.2.23 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	77
Şekil 4.19.1.24 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	78
Şekil 4.19.2.24 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	78
Şekil 4.20.1.26 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	78
Şekil 4.20.2.26 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	79
Şekil 4.21.1.27 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	79
Şekil 4.21.2.27 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	79
Şekil 4.22.1.28 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	80
Şekil 4.22.2.28 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	80

Şekil 4.23.1.33 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	80
Şekil 4.23.2.33 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	81
Şekil 4.24.1.35 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	81
Şekil 4.24.2.35 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	81
Şekil 4.25.1.37 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	82
Şekil 4.25.2.37 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	82
Şekil 4.26.1. 38 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen homozigot delesyon	82
Şekil 4.26.2. 38 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen homozigot delesyon	83
Şekil 4.27.1.40 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	83
Şekil 4.27.2.40 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	83
Şekil 4.28.1.43 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	84
Şekil 4.28.2.43 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	84
Şekil 4.29.1.48 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	84
Şekil 4.29.2.48 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	85
Şekil 4.30.1.52 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	85
Şekil 4.30.2.52 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	85

Şekil 4.31.1.53 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	86
Şekil 4.31.2.53 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	86
Şekil 4.32. HEK hücre hattına ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon	86
Şekil 4.33. SKBR hücre hattına ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen homozigot delesyon	87
Şekil 4.34. NCBI, “Sequece Viewer”da sFRP1 geninin verilen DNA dizisinde “CAG” delesyonunun yerleşim bölgesi ve delesyondan sonra oluşan kodonun şematik görüntüsü	87
Şekil 4.35. Hastaların ve kontrollerin metilasyon özgül PCR sonrası %4'lük Nusieve agaroz jeldeki görüntüsü	90
Şekil 4.36. Hastaların ve kontrollerin metilasyon özgül PCR sonrası %4'lük Nusieve agaroz jeldeki görüntüsü	91
Şekil 4.37. Hastaların ve kontrollerin metilasyon özgül PCR sonrası %4'lük Nusieve agaroz jeldeki görüntüsü	91
Şekil 4.38. Hastaların ve kontrollerin metilasyon özgül PCR sonrası %4'lük Nusieve agaroz jeldeki görüntüsü	92
Şekil 4.39. Hastaların ve kontrollerin metilasyon özgül PCR sonrası %4'lük Nusieve agaroz jeldeki görüntüsü	92
Şekil 4.40. “Meth Primer” programı kullanılarak Bisülfite PCR için dizayn edilen primerlerin sınırladığı bölgede tespit edilen CpG adalarının yerleşimi	95
Şekil 4.41. Bisülfite PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü	96
Şekil 4.42. 1µM ve 5µM DAC ile muamele edilen ve kontrol K562 hücrelerinin metilasyon özgül PCR sonrası %4'lük Nusieve agaroz jeldeki görüntüsü	98
Şekil 4.43. Gen ifadesinin analizi için yapılan PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü	100
Şekil 4.44. Normal kontroller ile kıyaslandığında metile, hemimetile	

ve metile olmayan hastalardaki sFRP1 ekspresyonun düzeyleri	101
<b>Şekil 4.45.</b> Kontrol (muamele edilmeyen) ve 1 $\mu$ M ve 5 $\mu$ M DAC ile muamele edilmiş K562 hücreleri	102

## KISALTMALAR

**Fzd:** Frizzled

**TCF/LEF:** T hücre spesifik transkripsiyon faktör / lenfoid enhancer bağlayıcı faktör (T cell factor / lymphoid enhancer factor)

**LRP:** Düşük Dansiteli Lipoprotein Reseptör İlişkili Protein (Low-density lipoprotein receptor-related protein)

**APC:** Adenomatöz polipozis koli (Adenomatous Poliposis Coli)

**GSK3 $\beta$ :** Glikojen sentaz kinaz 3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ )

**Dvl:** Dishevelled (memelilerde)

**Dsh:** Dishevelled (meyve sineğinde)

**HDAC:** Histon Deasetilaz (Histone deacetylase)

**Ca<sup>++</sup>/CamKII:** Kalsiyum/Kalmodülin bağımlı kinaz (Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II)

**PKC:** Protein Kinaz C (Protein Kinase C)

**PCP:** Planar hücre polaritesi (Planar cell polarity )

**JNK:** Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinaz (Jun N-terminal Kinase)

**PLC $\beta$ :** Fosfolipaz C $\beta$  (Phospholipase C $\beta$ )

**sFRP:** Salgılanan Frizzled İlişkili Protein (Secreted Frizzled Related Protein)

**CRD:** Sisteince Zengin Domain (Cysteine – Rich Domain)

**PAR-1:** Proteazla Aktive Reseptör-1 (Protease-Activated Receptor 1)

**CKII:** Kazein kinaz II (Casein kinase II)

**WIF-1:** Wnt İnhibitör Faktör-1 (Wnt inhibitory Factor-1)

**NTR:** Netrin benzeri domain ( Netrin-like domain)

**aa:** Aminoasit (Amino acid)

**SARP2:** Salgılanan Apoptoz İlişkili Protein-2 (Secreted apoptosis-related protein-2)

**FrzA:** Frizzled in aorta

**Wg:** Wingless

**HSPG:** Heparan Sülfat Proteoglikan (Heparan Sulfate Proteoglycan)

**BIK:** BCL2-interacting killer

**PAC:** P1-Derive Yapay Kromozom (P1-Derived Artificial Chromosome)

**MMP-9:** Matriks Metalloproteinaz-9 (Matrix Metalloproteinase 9)

**HKH:** Hematopoetik Kök Hücre (Hematopoetic Stem Cell)  
**KML:** Kronik Miyeloid Lösemi (Chronic Myeloid Leukemia)  
**Ph:** Philadelphia kromozomu (Philadelphia Chromosome)  
**ABL:** Abelsan Mürin Lösemi Virüsü (Abelsan murine leukemia virus)  
**BCR:** Kırılma Noktası Küme Bölgesi (Breakpoint cluster region)  
**HTY:** Hematolojik Tam Yanıt (Complete Hematologic remission)  
**IM:** İmatinib Mesilat (Imatinib Mesylate)  
**GMP:** Granülosit Makrofaj Öncülleri (Granulocyte-Macrophage Progenitor)  
**HAT:** Histon asetil transferazlar (Histone Acetyltransferase)  
**HDAC:** Histon deasetilazlar (Histone deacetylase)  
**HMT:** Histon metil transferaz (Histone Methyltransferase)  
**DNMT:** DNA metiltransferaz (DNA Methyltransferase)  
**MBD:** Metilasyon bağlayıcı proteinler (Methylation Binding Protein)  
**BSP:** Bisülfite sekans PCR (Bisulfite Sequence PCR)  
**MS-PCR:** Metilasyon Özgül PCR (Methylation Specific-PCR)  
**PBS:** Fosfat tuz tamponu (Phosphate Buffered Saline)  
**SSCP:** Tek Zincir Konformasyon Polimorfizm (Single Strand Conformational Polymorphism)  
**PCR:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)  
**TBE:** Tris-Borik asit-EDTA (Tris-Boric asit-EDTA)  
**APS:** Amonyum Persülfat (Ammonium Persulfate)  
**DAC:** 5-aza-deoksisitidin (5-aza-2-deoxycytidine )  
**cDNA:** Komplementer DNA (Complementary DNA)  
**RT-PCR:** Reverse transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real time Polymerase Chain Reaction)  
**M:** Metile (Methylated)  
**U:** Metile olmayan (Unmethylated)  
**NKİ:** Normal kemik iliği (Normal Bone Marrow)  
**RPMI:** Roswell Park Memorial Institute  
**DMEM:** Dulbecco'nun modifiye ortamı (Dulbecco's Modified Eagles Medium)  
**FBS:** Fötal Sığır Serumu (Fetal Bovine Serum)  
**nm:** Nanometre  
**rpm:** Bir dakikadaki devir sayısı (Rotation per Minute)



## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitiminin sürecinde yaptığı her türlü katkı ve yardımlarından dolayı danışmanım Yrd. Doç.Dr. H.Ogün Sercan'a ve Yrd. Doç.Dr. Zeynep Sercan'a, çalışmada kullanılan normal kemik iliği örneklerini sağladığı için Dr.Cenk Erdal'a, kontrol grubu olarak kullanılan normal bireylerin DNA örneklerini sağladığı için Yrd. Doç.Dr. Çiğdem Eresen Yazıcıoğlu'na ve manevi desteğini benden esirgemeyen aileme teşekkürlerimi bir borç biliyorum.

Melek PEHLİVAN

## ÖZET

Hematolojik malignansilerde Wnt Sinyal iletiminin deregülasyonu ilk olarak Kronik miyeloid lösemi'de(KML) tanımlanmıştır. Wnt sinyal iletiminin antagonistleri olan sFRP'ler (Secreted Frizzled related protein), Wnt proteinlerinin aktivitesini inhibe etme yeteneğine sahiptirler. sFRP genlerinin epigenetik sessizleşmesi, canonical Wnt sinyal iletiminin sürekli aktivasyonuna neden olmaktadır.

Bu çalışmada 48 kronik faz KML hastasında sFRP1 geninin promotör bölgesindeki genetik ve epigenetik değişiklikler incelenmiştir. Yapılan iki yönlü DNA dizi analizinde, bu değişikliğin nükleotid 38, 39, 40. nükleotidlerde (CAG) çerçeve delesyonu olduğu gözlenmiştir. Bu üç nükleotidlik delesyon, kodon 13 ve 14'ü etkilemektedir ve ardarda gelen alanin rezidülerini kodlamaktadır. Oluşan yeni kodon yine alanin'dir.

48 kronik faz KML hastasının sFRP1 promotör metilasyon durumu incelendiğinde, bunların 1'inin tam metile, 41'inin metile olmayan, 6'sının da hemimetile olduğu gösterildi. Her ne kadar sFRP1 promotör metilasyonu kronik faz KML'de sık gözlenmese de, hastalığın ilerleyişi ve terapiye dirençle ilişkili olduğu gözlenmiştir. 6 hemimetile hastanın 5'inde sadece parsiyel sitogenetik yanıt veya sitogenetik yanıt gözlenmezken, sFRP1 promotörü metile olmayan 41 hastanın tümünde majör veya tam sitogenetik yanıt izlenmiştir. Tam metile olan hastada, ek kromozomal anomalilerle birlikte sitogenetik ilerleme gözlenmiştir.

sFRP1 promotör metilasyonu, hastalığın terapiye direnç gösteren ve genetik olarak stabil olmayan formunda terapiye dirençle ilişkilidir ve terapiye direnç gösteren hastalarda biyolojik farklılıklar yaratır. Ek olarak sFRP1 promotör metilasyonunun KML'de canonical Wnt sinyal iletiminin aktivasyonu için olası bir mekanizma olabileceği düşünülmektedir.

**Anahtar sözcük:** Kronik Miyeloid Lösemi, BCR-ABL, Wnt Proteinleri, sFRP, DNA metilasyonu

## ABSTRACT

The first description of deregulated Wnt signaling in a hematological malignancy was reported in chronic myeloid leukemia (CML). The Wnt signaling antagonists, secreted frizzled related proteins (sFRPs), are able to inhibit the activity of Wnt proteins. Epigenetic silencing of sFRP genes lead to constitutive activation of the canonical Wnt-signaling pathway.

In this present study we investigated genetics and epigenetics alteration in promotor region of the sFRP1 gene in 48 chronic phase CML patients. Bi-directional sequencing show that the variation is an inframe deletion of nucleotides 38, 39 and 40 (CAG). This three-nucleotide deletion affects codons 13 and 14, and both encoding for consecutive alanin residues. The resulting just in-frame codon also encodes for alanin.

When investigated methylation status of the sFRP1 promotor in 48 chronic phase CML patients show that it's fully methylated in 1, hemi-methylated in 6 and unmethylated in 41 patients. Albeit observed infrequently in chronic phase CML, sFRP1 promoter methylation correlates with therapy resistance and disease progression. Forty-one patients that were unmethylated at the sFRP1 promoter all achieved major or complete cytogenetic remission; while five of the six hemi-methylated patients have only achieved partial cytogenetic remission or no cytogenetic remission. The full-methylated patient has shown cytogenetic progression with additional chromosomal abnormalities.

sFRP1 promoter methylation may indicate a genetically more unstable form of disease resistant to therapy and provide a key biological difference in therapy resistant patients. In addition to a possible mechanism for the observed activation of canonical Wnt signaling in CML.

**Keywords:** Chronic myeloid leukemia, BCR-ABL, Wnt proteins, sFRP, DNA methylation

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Wnt sinyal iletimi, kanser biyolojisi alanında son yıllarda araştırmaların yoğunlaştığı önemli sinyal ileti yolaklarından biridir. Günümüzde Wnt sinyal iletiminin, canonical (klasik) ve non-canonical (klasik olmayan) olarak ikiye ayrıldığı kabul edilmektedir. Canonical yolağın temelinde,  $\beta$ -katenin'in sitoplazmik artışı ve sonrasında hücre çekirdeğine geçişi yer alır.  $\beta$ -katenin, çekirdekte transkripsiyon faktörleri TCF/LEF ile kompleks oluşturarak, c-myc ve siklin D gibi çoklu hedef genlerle etkinleşerek transkripsiyonuna yol açmaktadır. Planar cell polarity (PCP) ve Wnt/ $Ca^{2+}$  yolakları olarak iki "non-canonical" Wnt sinyal ileti yolağı tanımlanmıştır. Non-canonical yolağın aktivasyonu  $\beta$ -katenin'den bağımsızdır.

Wnt sinyal ileti yolaklarında rol alan proteinler olan sFRP (Secreted Frizzled Related Protein) ailesi, Wnt sinyal yolağının düzenleyicileri olarak tanımlanmışlardır. sFRP1, bu ailenin bilinen beş üyesinden biridir. sFRP'ler, Frizzled reseptörlerinin, Wnt bağlama bölgesine benzer domaine sahiptirler. Bu domainleri aracılığı ile Wnt'lerle bağlanarak, inaktif komplekslerin oluşumuna ve hücre içinde Wnt sinyal yolağının engellenmesine neden olurlar. sFRP1'in, insan tümörlerinde heterozigozite kaybının sıklıkla olduğu 8p12'de lokalize olması ve Wnt sinyal iletiminin antagonisti olarak fonksiyon göstermesi bu genin aday tümör supressör gen olarak çalışılmasına neden olmuştur.

Kronik miyeloid lösemi (KML), klonal hematopoetik kök hücre hastalığıdır. KML'de malign transformasyon, t(9;22)(q34;q11) translokasyonu sonucu Philadelphia kromozomunun oluşumu ile meydana gelir. KML, üç fazdan oluşan myeloproliferatif bir hastalıktır. Kronik faz ile başlayan, daha sonra akselere faz ve blastik krize ilerleyen bir seyir gösterir. Hastalığın hangi genetik veya epigenetik değişiklikler sonucu bu fazlar arası geçişi düzenledikleri henüz tam olarak bilinmemektedir.

Günümüzde, KML patogenezinde Wnt sinyal iletimine ait bozuklukların etkili olduğunu gösteren veriler bulunmaktadır. Wnt sinyal ileti yolağının, hematopoetik kök hücrenin (HKH) kendi devamlılıklarını sağlamada rol aldığı, KML'de  $\beta$ -katenin birikimi ile canonical yolağın aktive olduğu ve normal BCR gen ürününün, Wnt sinyal yolağında düzenleyici olduğu gösterilmiştir.

Wnt sinyal iletiminin sürekli aktivasyonunun tümör gelişiminde çok önemli rolü olduğu bilinmektedir. sFRP genlerinin epigenetik sessizleşmesi, canonical Wnt sinyal iletim

yolağının sürekli aktivasyonuna neden olmaktadır. Genin promotör bölgesindeki CpG adalarının metilasyonunun, pek çok kanser çeşidi ve lösemide sFRP genlerinin ifadelerinin baskılanmasına neden olduğu gözlenmiştir. Akut ve kronik lenfoid lösemilerde, yapılan çalışmalar, malign hematopoezde Wnt sinyal iletiminin rolü hakkında bilgi vermektedir. Wnt sinyal iletimi aktivasyonunun, akut miyeloid lösemi, kronik lenfositik lösemi, kronik miyeloid lösemi ve multiple miyeloma'nın patogenezinde rol aldığı gözlenmiştir. Ancak Wnt sinyal iletiminde rol alan genlerde, bu yolağın kontrolsüzlüğüne neden olabilecek herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. Bu nedenle sFRP gibi Wnt antagonistlerinin, promotör hipermetilasyonu nedeni ile sessizleşerek Wnt sinyal iletimini aktif halde tutmasının, lösemilerin gelişimi açısından önemli olabileceği düşünülmektedir.

sFRP'lerin epigenetik mekanizmalar ile sessizleşmesinin KML'nin prognozu ve tedavi tepkilerindeki farklılıkların açıklanması açısından önemli olacağını düşünmekteyiz. Bu nedenle hipotezimiz; KML'de sFRP1 geninin genetik ve/veya epigenetik değişiklikler nedeni ile sessizleşerek, Wnt sinyal iletiminin sürekli aktivasyonuna neden olmasının hastalığın gelişimine ve ilerleyişine katkısı olduğu yönündedir. Araştırmamız, KML'de sFRP1 geninin genetik ve epigenetik değişikliklerini inceleyen literatürdeki ilk çalışmadır.

## 2. GENEL BİLGİLER

Hücre sinyal ileti yolları, hücre ile ilgili bütün biyolojik süreçlerde rol oynarlar. Embriyogenik dönemde bu yollar, hücre gruplarının işlevlerini düzenleme ve hücreler arasındaki kritik iletişimi sağlamada; erişkin dönemde de homeostazisin sürdürülmesi ve rejenerasyon gibi süreçlerde önemli roller üstlenirler. İleti yollarında oluşabilecek işlevsel bozukluklar, hücrelerde patolojik değişikliklere neden olmaktadır. Bu patolojiler, embriyolojik dönemde gelişim bozuklukları olarak karşımıza çıkarken, erişkin dönemde başta kanser olmak üzere pek çok farklı hastalık olarak kendini gösterebilmektedir. Gerek gelişim, gerekse kanser biyolojisi alanlarında son yıllarda araştırmaların yoğunlaştığı sinyal ileti yollarından biri de Wnt sinyal ileti yolağıdır.

Wnt adı, Wingless (Wg) ve Int genlerinin birleşimi ile ortaya çıkmıştır. Wingless geni, "*Drosophila melanogaster segment polarite geni*" olarak tanımlanmıştır. Metamorfozda erişkin eklem oluşumu ve embriyogenez boyunca işlev göstermektedir. Int genleri ise, omurgalı genleri olarak tanımlanmıştır. Int-1 ve Wingless geninin kodladığı ürünler evrimsel olarak korunmuş benzer aminoasit dizilerine sahiptirler ve Wingless, Int1'in *Drosophila* homologudur (1).

Wnt'ler ilk olarak memeli onkogenleri, daha sonra da embriyogenez boyunca hücre-hücre etkileşimlerini düzenleyen genler olarak tanımlanmışlardır (2). Wnt proteinleri; evrim süresince yüksek düzeyde korunmuş, hayvanlarda çok önemli gelişimsel ve homeostatik role sahip moleküllerdir (3,4). Hücre yapışması (adhezyon), hücre göçü (migrasyon), apoptoz, hücre kutuplaşması (polaritesi), çoğalma (proliferasyon), gelişim (development), organogenez ve onkogenezinde dahil olduğu birçok biyolojik süreçte rol almaktadırlar (4,5).

Memeli Wnt proteinleri; salgılanan, lipid modifiye, sistein aminoasidi açısından zengin glikoproteinlerdir (4,6). Wnt aile üyeleri, aminoasit dizi benzerliklerine göre gruplandırılmışlardır. Omurgasız canlılar ve memeli genomunun tamamen anlaşılması ile insan ve farede 19, *Drosophila*'da 7, ve *C. elegans*'ta 5 adet Wnt geni tanımlanmıştır (7).

Hücreden salgılanan Wnt proteinleri, membranı yedi kez geçen Frizzled (Fzd) reseptör ailesi için ligand işlevi görürler ve Fzd proteinleri üzerinden, hücrede parakrin/otokrin sinyal iletilerini tetiklerler (4,6). Memelilerde tanımlanmış olan 19 Wnt ve 10 Fzd proteini arasındaki

ligand-reseptör özgülüğü ile değişik ligand-reseptör birleşimlerinin, farklı hücre içi sinyal yollarını ne şekilde etkinleştirdiği tam olarak bilinmemektedir(5).

Günümüzde Wnt sinyal iletilisinin “canonical” ve “non-canonical” olarak ikiye ayrıldığı kabul edilmektedir (5).

## 2.1. CANONICAL ( $\beta$ -KATENİN) YOLAK:

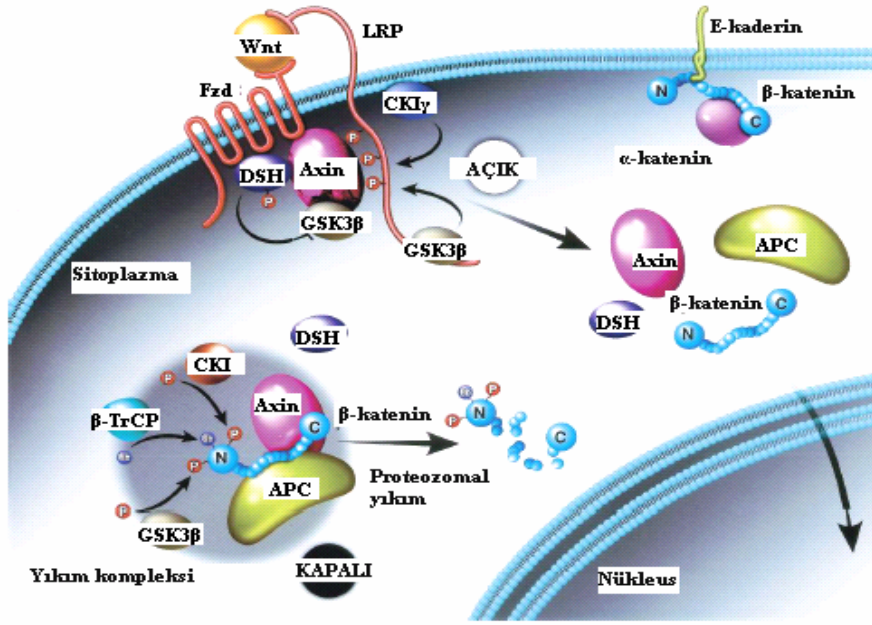
Canonical yolak, Wnt/ $\beta$ -katenin yolağı olarak da adlandırılır. Genel olarak bu yolda, Wnt proteini ile Frizzled reseptörünün eşleşmesi sonucu,  $\beta$ -katenin’in yıkılımı engellenir. Bu şekilde bulunduğu hücre sitoplazmasında miktarı artan  $\beta$ -katenin, sitoplazmadan çekirdek içine geçer (nükleer translokasyon) (4,5).  $\beta$ -katenin, çekirdekte transkripsiyon faktörleri TCF/LEF (T hücre spesifik transkripsiyon faktör / lenfoid enhancer bağlayıcı faktör) ile kompleks oluşturarak, aralarında c-myc ve siklin D’inde bulunduğu birçok hedef genin transkripsiyonunu olumlu ve olumsuz yönde etkiler.

Yolağın detaylarına baktığımızda; Wnt sinyal iletimi olmadığında,  $\beta$ -katenin yıkım kompleksi etkindir (4,5).  $\beta$ -katenin; Axin /APC(Adenomatöz polipozis coli)/ Casein kinaz 1’i içeren protein kompleksinde, GSK3 $\beta$  (Glikojen sentaz kinaz 3 $\beta$ ) tarafından NH<sub>2</sub> terminalinden fosforillenir. Fosforilenen  $\beta$ -katenin, ubiquütinasyon proteozom yolağı ile kısa sürede yıkılır (8).

Drosophila’da Wnt sinyalinin yokluğunda TCF Groucho ile kompleks oluşturarak, Wnt/Wg hedef genleri için baskılayıcı olarak hareket eder. Bu etki Groucho’nun Histon Deasetilaz (HDAC) ile ilişkisi aracılığıyla olmaktadır.  $\beta$ -katenin nükleusa girince, TCF baskılayıcı kompleksini, transkripsiyonel aktive edici komplekse dönüştürür. Aktivasyonun, TCF/LEF kompleksinden Groucho’nun ayrılması ve TCF/LEF’e histon asetilaz CBP/p300’ün bağlanması ile gerçekleştiği düşünülmektedir (7).

Wnt ligandının, koreseptör LRP 5 veya 6’nın (Low-density lipoprotein receptor-related protein) varlığında Fzd reseptörüne bağlanmasıyla Wnt sinyal iletilisi tetiklenir ve sinyal hücre içine aktarılır (4,9). Böylece, normalde  $\beta$ -katenin’i yıkım için hedefleyen Axin-APC (Adenomatöz polipozis coli)-GSK3 $\beta$  (Glikojen sentaz kinaz 3 $\beta$ ) kompleksi baskılanır (4,5). Bu süreçte anahtar rol, Dishevelled (Dvl) proteininin aktive olmasıdır. Kazein kinaz 1( Casein KinaseI-CKI) ve PKC $\alpha$  tarafından Dishevelled proteinlerinin fosforilasyonu tetiklenir(10). Fosforillenmiş olan Dvl, Axin-APC-GSK3 $\beta$  kompleksini bozarak  $\beta$ -katenin’in fosforillenmesini engeller (8). Hipofosforile  $\beta$ -katenin, sitoplazmada birikir ve hücre

çekirdeğine geçer. Burada TCF /LEF transkripsiyon faktörleri ile kompleks oluşturarak hedef genlerin ekspresyonunu uyarır (8,11) ( Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Canonical Wnt sinyal iletimi (12).

Wnt sinyal iletimi üzerine yapılan çalışmalar daha çok β-katenin yolağı (canonical yolak) üzerinde yoğunlaşmış olmakla beraber, son yıllarda Wnt proteinleri ve ilişkide oldukları diğer proteinlerin, β-katenin yolağından bağımsız etkileri de araştırılmaya başlanmıştır. Wnt/β-katenin yolağına ek olarak iki “non-canonical” Wnt sinyal ileti yolağı tanımlanmıştır.

## 2.2. NON-CANONICAL WNT SİNYAL İLETİ YOLAKLARI:

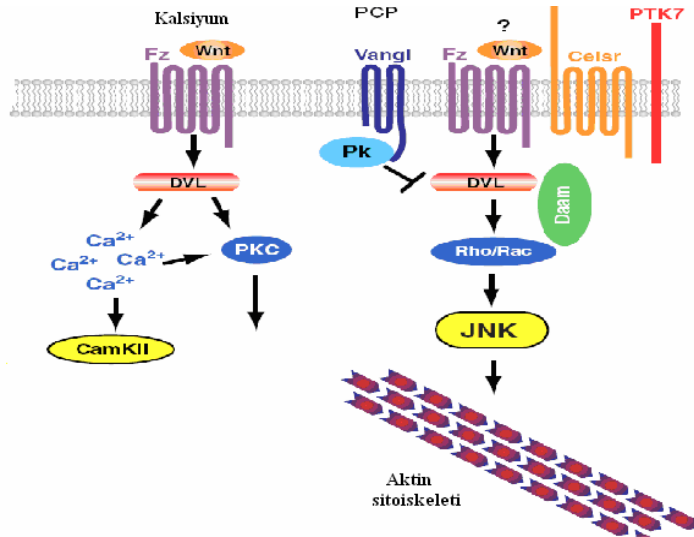
Non-canonical sinyal ileti yolları, omurgalılarda Wnt/kalsiyum ve Wnt/Jnk yolları olarak ikiye ayrılır. Non-canonical Wnt sinyal ileti yolları, β-katenin yolağına oranla daha az anlaşılmıştır. Bu yollarla Wnt ligandları, yine Fzd reseptörüne bağlanmakta ve Dvl aktive olmaktadır. Ancak yolağın daha alt noktalarında bu bağlanma GSK3β veya β-katenin ile ilişkilendirilmemektedir. Hatta bazı tanımlanmış durumlarda, non-canonical yolların Wnt proteinlerinden bağımsız Fzd ve Dvl proteinlerini kullanabildikleri gösterilmiştir. Bu durum, Fzd reseptörlerinin Wnt dışında başka ligandlarla da aktive olabildiğini göstermektedir (5,13).



$\beta$ -katenin bağımsız Wnt yolaklarının ilk keşfi *Xenopus* oositlerinde, Wnt 11 ve Wnt 5'in aşırı ekspresyonu sonucunda  $\beta$ -katenin düzeyi etkilenmeden hücre içi kalsiyum seviyesindeki artışının gözlenmesi ile olmuştur. Daha sonraki çalışmalar Wnt ve Fzd'lerin değişik kombinasyonlarının kalsiyum/kalmodülün bağımlı kinaz ( $Ca^{++}$ /CamKII) ve protein kinaz C (PKC) yollarını aktive ettiğini göstermiştir (5,13).

**Wnt/Jnk yolağı:** İlk *Drosophila*'da tanımlanmıştır (14,15). Düzlemsel hücre kutuplaşması (planar cell polarity (PCP)) yolağı olarak da adlandırılır (5,13). Bu sinyal yolağının hücrede yapısal (morfojenik) kutuplaşma ve hareketliliğin düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. Bu yolda yine Fzd ve Dvl proteinleri anahtar rol oynarlar ancak koreseptör LRP proteinleri rol almazlar. Aktive olmuş olan Fzd reseptörü Dvl'i etkinleştirerek bir G proteini olan RhoA üzerinden sinyalin küçük GTPazlar ve JNK'a (C-Jun NH2-terminal kinaz) aktarımını sağlar (16).

**Wnt/ $Ca^{+2}$  yolağı:** Bu yolda da LRP proteinleri yer almaz. Wnt-Fzd eşleşmesi fosfolipaz C $\beta$  'yi (PLC $\beta$ ) etkinleştirir ve hücre içi  $Ca^{+2}$  düzeyi artarak PKC aktivasyonuna yol açar. Aynı zamanda  $Ca^{+2}$  bağımlı CamKII aktive olur. Bu yolağın hücre yapışmasının düzenlenmesinde önemli rol oynadığı bilinmektedir (13) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Noncanonical Wnt sinyal ileti yolları(17).

Non-canonical Wnt yollarıyla ilgili genel kabul gören bir görüş, bu yolağın / yolların etkinleştirdikleri süreçlerin canonical Wnt/ $\beta$ -katenin yolağına ters etkili

(antagonist) olduğu yönündedir (5,13).

Hücrelerin farklı biyolojik özelliklerinin düzenlenmesindeki yaygın rolünden dolayı, Wnt sinyal ileti yolağının oldukça karmaşık olması da kaçınılmazdır. Wnt sinyal iletiminde ko-reseptörlerin (LRP5/6) veya salgılanan Wnt antagonistlerin (sFRP'ler -Soluble Frizzled Related Proteins- ve Dickkopf proteinleri) varlığı veya yokluğu, bu yolağa ait moleküler düzeneklerin açıklanmasını daha da karmaşık bir hale getirmektedir (4,5).

Wnt sinyal iletiminin, neoplazi gelişiminde önemli rol oynadığı bilinmektedir. İnsan kanserlerinde Wnt'in aşırı ekspresyonunun prevelansı henüz tam olarak bilinmemekle beraber, hücre içi efektörler ve modülatörlerdeki mutasyonlar sonucu Wnt sinyal iletiminin aktivasyonu birçok kanser türünde sıklıkla izlenmektedir. Özellikle APC ve  $\beta$ -katenin'deki mutasyonlar kolon karsinomasının %80-90'ında ve yine  $\beta$ -katenin mutasyonları, melanoma ve hepatoselüler karsinomada yaygın olarak gözlenmektedir (18).

### **2.3. WNT SİNYAL İLETİSİNDE ROL OYNAYAN BAŞLICA PROTEİNLER:**

#### **2.3.1. Wnt proteinleri:**

Wnt proteinleri, farklı dokularda ifade olan, salgılanan sinyal moleküllerinin bir ailesidir. Bugün insanda bilinen on dokuz Wnt proteini vardır (19). Örtüşmeler olmakla beraber Wnt proteinleri, "canonical" (Wnt 1, Wnt 3, Wnt 3a, Wnt 7a, Wnt 7b, Wnt 8) ve "non-canonical" (Wnt 5a, Wnt 5b, Wnt 4, Wnt 11) yolak etkinleştiricileri olarak gruplandırılırlar (4,6). Çeşitli Wnt proteinleri hem canonical hemde noncanonical yolağı etkinleştirme özelliğine sahiptir.

Wnt'lerin çoğu, 350 aminoasit uzunluğunda ve yaklaşık 40 kDa moleküler ağırlığındadırlar (3). Tüm Wnt'lerin ortak özelliği, sekresyon için sinyal dizisine, yüklü aminoasit birimlerine ve potansiyel glikolizasyon bölgelerine sahip olmalarıdır. Wnt proteinlerinin lipid modifikasyonları, işlevleri için gereklidir. Özellikle Wnt proteinlerinin palmitillenmeleri, onları hidrofobik hale dönüştürerek membrana yönelmelerini sağlamaktadır. Wnt proteinlerinin palmitillenmeleri, N-bağımlı glikolizasyonları için gereklidir. Böylece Wnt'in hücreler arası naklinde, Wnt ile Wnt'e yanıt veren hücrelerin yüzeyinde bulunan heparan sülfat proteoglikanlarının ilişkisini arttırdıkları düşünülmektedir. Ayrıca Wnt palmitillenmesi için gerekli olan bölgelerin mutasyonunun, Wnt-Frizzled etkileşimini azalttığı öne sürülmüştür (20).

### **2.3.2. Frizzled proteinleri:**

Frizzled proteinleri, Wnt ailesi için reseptör görevi görür. Frizzled reseptörleri, CRD (cysteine – rich domain ) olarak isimlendirilen uzun amino terminal uca, yedi hidrofobik transmembran  $\alpha$  helikse, üç sitoplazmik hücre içi ilmiğe ve bir protein fosforilasyon bölgesi içeren C-terminal kuyruğuna sahiptir (7). Bugün memelilerde bilinen on Frizzled proteini vardır, ancak işlevsel farklılıklar ve ligand özgüllükleri henüz çok iyi bilinmemektedir (6). Frizzled molekülünün topolojisi, özellikle heptahelikal sinyal iletim alanı, bu reseptörün heterodimerik G proteinleri aracılığı ile sinyal iletimini gerçekleştirdiklerini göstermektedir (7). Yapılan genetik ve biyokimyasal analizler, G-proteinlerinin Fzd sinyal iletimine yanıtta aktif olduklarını göstermiştir (20).

### **2.3.3. LRP ( Lipoprotein Receptor Related Protein) 5-6:**

Wnt sinyali sadece işlevsel Fzd'a değil, aynı zamanda LRP 5-6 olarak adlandırılan transmembran moleküllere de ihtiyaç duymaktadır (7). LRP5 ve 6 proteinleri, olası protein etkileşim alanlarını içeren büyük bir hücre dışı domaine ve oldukça küçük bir sitoplazmik parçaya sahip; membranı bir kez geçen proteinlerdir (20,21). Henüz kanıtlanmamış olsa da, Wnt molekülünün LRP'ye de bağlandığı ve Frizzled ile trimerik kompleks oluşturduğu düşünülmektedir (7).

### **2.3.4. Dishevelled :**

Sitoplazmik bir fosfoprotein olan Dishevelled, meyve sineği ve memeli hücrelerinde Axin-APC-GSK3 $\beta$  kompleksinin baskılanmasında rol oynayan bir proteindir. Meyve sineğinde tek bir Dishevelled geni (Dsh) tanımlanmışken, memelilerde üç farklı Dishevelled (Dvl) geni tanımlanmıştır. Bu genin, Wnt sinyal ileti yolağında gerekliliği uzun bir süredir bilinmekle beraber, henüz ne şekilde aktive olduğu net olarak açıklanamamış değildir. Tüm organizmalarda Dsh aile üyeleri üç domaine sahiptir; amino terminal-DIX (Dsh ve Axin) domaini, merkezde PDZ domain (Postsynaptic density-95, Discs-large, Zonula occludens-1), karboksi terminalinde DEP domain (Dsh, Egl-10, Pleckstrin). Üç farklı domaininin farklı etkileşimleri sonucunda, canonical ve noncanonical yolakta rol almaktadırlar. Bu tanımlanmış üç domaine ek olarak, hem canonical Wnt sinyalini aktive etme yeteneği olan hem de hücre içi yayılımını düzenleyebilen iki yeni domain tanımlanmıştır (22). Aktivasyonu için

kendisinin de fosforillenmesi gereken Dishevelled, proteazla aktive reseptör (protease-activated receptor 1- PAR-1) ve kazein kinaz I (Casein kinase I-CKI) tarafından fosforillendiğine dair veriler olmasına rağmen; ancak bu kinazların Wnt sinyal iletimini ne şekilde Dishevelled proteinine ulaştırdığı tam olarak bilinmemektedir (4,5).

### **2.3.5. GSK3 $\beta$ :**

Multifonksiyonel serin treonin kinaz GSK3 $\beta$ , Wnt sinyal iletim yolağında anahtar bir proteindir. Kinaz özelliğinden dolayı çeşitli proteinlere bağlanarak fosforile etme yeteneğine sahiptir. Wnt/  $\beta$ -katenin sinyal iletimindeki rolü, farklı işlevlerinden sadece birisidir. Bunun yanında pek çok onkogenik transkripsiyon faktörü ve proto-onkoprotein, GSK3 $\beta$  kinaz substratı olduğu varsayılmakta ve inaktivasyonlarının buna bağımlı olduğu düşünülmektedir. Bu görüşe göre, GSK3 $\beta$  neoplastik transformasyon ve tümör gelişiminde rol oynamaktadır (23).

### **2.3.6. Axin:**

Axin, ilk olarak *Xenopus* embriyosunda Wnt sinyal iletim yolağının inhibitörü olarak tanımlanmıştır ve APC,  $\beta$ -katenin, GSK3 $\beta$  ve Dsh'a doğrudan bağlandığı gösterilmiştir (6). Axin,  $\beta$ -katenini fosforilleyen GSK3 $\beta$ 'nin etkinliğini arttırmak için iskele protein olarak rol oynar (19). Axin, ayrıca LRP-6'nın sitoplazmik kuyruğuna bağlanma özelliğine sahiptir. Axin'in LRP-6 kuyruğuna bağlanması, LRP-6'nın fosforilasyonu ile gerçekleşmekte ve sinyalin aktivasyonu GSK3 $\beta$  tarafından düzenlenmektedir. Bu ilişki  $\beta$ -katenin'in kaderini değiştirir. Yıkılmasını sağlamak yerine, birikimini sağlar (20). Hiperfosforile olan LRP5/6 domaini yüksek affinite ile Axin'e bağlanarak onu yıkım kompleksinden ayırır (12).

### **2.3.7. APC:**

APC tümör supressör gen ürünü,  $\beta$ -katenin yıkım kompleksinin bir parçasıdır (12). APC ilk olarak kolon karsinoma gelişiminde tümör supressör gen olarak tanımlanmıştır. Daha sonra,  $\beta$ -katenin ve GSK3 $\beta$ 'ya doğrudan bağlandığı gösterilmiştir. GSK3 $\beta$  tarafından APC'nin fosforilasyonu, APC'ye  $\beta$ -katenin'in bağlanmasını hızlandırır. Böylece  $\beta$ -katenin'in stabilizasyonunun bozulmasına neden olur. Bu da APC'nin Wnt sinyal iletiminde negatif düzenleyici olarak rol aldığını gösterir (9). İnsan kanserlerinin birçoğu, APC ve Axin

proteinlerinde meydana gelen mutasyonlar aracılığı ile Wnt sinyal ileti yolağının kontrolünün kaybı ile ilişkilidir (10).

### **2.3.8. $\beta$ -katenin:**

$\beta$ -katenin, hücrelerarası adheren bağlantılardaki E-kadherin komplekslerinin yapısal bir elemanıdır ve kadherin hücre adhezyon molekülünün sitoplazmik alanına bağlanarak hücre-hücre adhezyonunda görev alan bir polipeptiddir (12,24,25). Aynı zamanda nükleusta transkripsiyonu aktive etmek için, kromatin yeniden modelleme kompleksine katılır (12). Bununla birlikte  $\beta$ -katenin, Wnt proteinleri tarafından başlatılan sinyal iletim yolağının merkez oyuncularındandır.  $\beta$ -katenin aktivitesi, onun yerleşimini ve stabilitesini etkileyen çok sayıda protein tarafından kontrol edilmektedir (9).

$\beta$ -katenin düzeyi Wnt uyarımı yokken, proteozomal yolak tarafından yıkıldığından düşüktür, ancak Wnt sinyali varlığında proteozomal yıkımdan kurtulur ve düzeyi artar (22,25).  $\beta$ -katenin geninde (CTNNb1) meydana gelen mutasyon,  $\beta$ -katenin yıkımı için gerekli olan serin ve threonin birimlerini etkiler. Bu mutasyon,  $\beta$ -katenin'in amino terminalindeki dizi ile direk ilişkisini sağlayan  $\beta$ -TRCP ( $E_3$  ubiquitin ligazın bir bileşeni) ile  $\beta$ -katenin'in etkileşimine bağlı fosforilasyonu engeller.  $\beta$ -katenin'deki bu düzenleyici dizi, çoğu insan kanser türlerinde mutanttır (6). Pek çok tümör hücre hattında, onkogenik  $\beta$ -katenin mutasyonları sitozolde  $\beta$ -katenin'in birikimine neden olur (24).

### **2.3.9. TCF/LEF:**

TCF ve LEF,  $\beta$ -katenin'in yokluğunda transkripsiyonel baskılayıcılarla ilişkiye giren ko-transkripsiyon faktörleridir.  $\beta$ -katenin varlığında TCF, LEF'e bağlanır ve baskılayıcıların yerine geçer. Transkripsiyonu  $\beta$ -katenin-TCF/LEF tarafından aktive edilen 75 farklı gen bulunmaktadır. Bu genlerin bazıları hücre döngüsünün ilerlemesi (c-myc, Cyclin D), bazıları axis formasyonunun gelişimi (siamois, twin), bazıları da dokuların yeniden modellenmesi gibi işlevlerde görev alırlar (5).

## **2.4.WNT SİNYAL İLETİMİNİN ANTAGONİSTLERİ:**

### **2.4.1. Dickkopf:**

Dickkopf proteinleri, salgılanan ve omurgalılarda Dkk1, 2, 3, 4 olmak üzere 4 temel üyesi bulunan bir ailedir (26). Wnt sinyal iletiminin hücre dışı antagonistleri olarak bilinmektedirler. Dickkopf proteinleri Wnt ile doğrudan ilişki kurmazlar, ancak canonical sinyal iletim yolağında LRP5/6 koreseptörünün etkisini engellerler (14). Dkk 1, 2 ve 4 farklı affinitelerle LRP5 ve 6'ya bağlanır; oluşan Dkk /LRP kompleksi, kremen proteini ile etkileşerek yıkım için hücre zarından hücre içine alınır. Böylece sinyal iletiminde rol oynayacak Wnt koreseptör sayısı azalır (27). Bunun yanında Dkk 2'nin, LRP-6'yı aktive ederek  $\beta$ -katenin'in birikimine neden olabileceği de ileri sürülmektedir (26).

### **2.4.2.Wnt Inhibitory Factor (WIF-1):**

İlk olarak *Xenopus* ve Zebrafish'de tanımlanmıştır. Wnt sinyal iletiminin antagonistleri olarak rol oynayan WIF-1, sFRP veya Fzd'in CRD domaini ile herhangi bir homoloji veya paylaşım göstermemektedir. WIF-1, N- terminal sinyal dizisine ve türler arasında korunan bir birime sahiptir (28). Prostat, meme, akciğer ve mesane kanserleri gibi pek çok kanser çeşidinde, WIF1 geninin hipermetilasyonu nedeni ile ekspresyonunun baskılandığı gözlenmiştir (29).

### **2.4.3. Cerberus:**

Cerberus, WIF-1 ve sFRP'ler gibi Wnt antagonistidir. *Xenopus*'dan elde edilmiştir ve ön endoderm de eksprese olduğu bilinmektedir. Cerberus, multivalent büyüme faktörü antagonistidir ve baş oluşumu ile gövde baskılanmasına neden olan üç sinyal iletim yolağını baskılar (28).

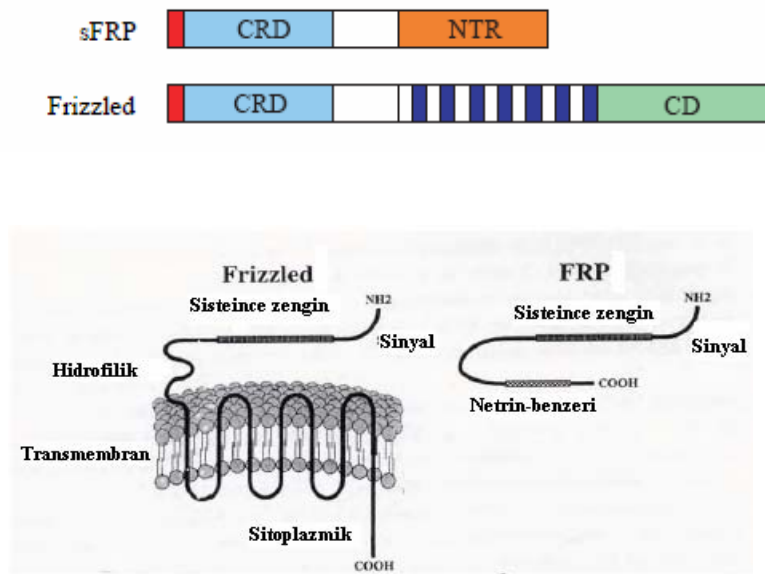
### **2.4.4. sFRP (Secreted Frizzled Related Protein) :**

İlk olarak Wnt sinyal iletiminin antagonistleri ve apoptozun düzenleyicileri olarak tanımlanan, yaklaşık 30 kDa büyüklüğünde, salgılanan glikoproteinlerdir (30). Memelilerde sFRP (Secreted Frizzled related Protein) ailesi, beş adet salgılanan Frizzled ilişkili proteinden oluşur ve işlev benzerliklerine göre iki gruba ayrılırlar: sFRP 1, 2 ve 3 bir grupta, sFRP 4 ve 5

diğer grubta yer alır ( 28,31). Wnt sinyalinin birçok açıdan düzenleyebilme yeteneği olan sFRP ailesinin farklı üyeleri, farklı ekspresyon paternlerine sahiptirler (32). Memeli hücre hatlarında yapılan çalışmalar sonucunda farklı sFRP'lerin zıt etkilere sahip olduğu ve bunların bazılarının Wnt'lerden bağımsız işlevleri olduğu gösterilmiştir (28,33).

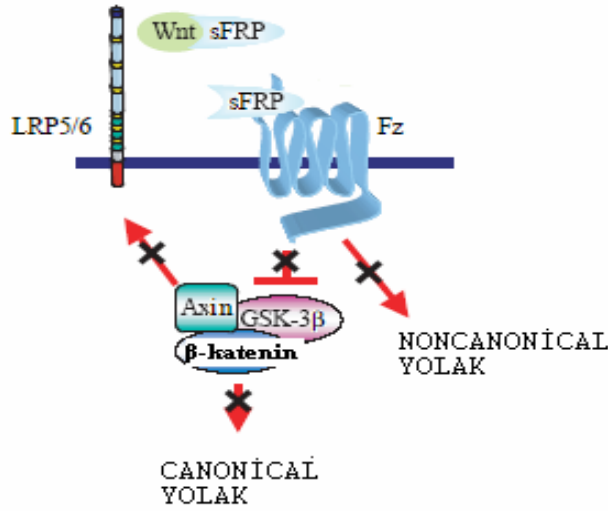
sFRP'ler salgılanıyor olmakla beraber, hücre kültürü çalışmaları onların hücre zarında ve/veya hücre dışı matrikste bulunabildiklerini göstermiştir. Hücre dışı matrikste sFRP'lerin, sülfat proteoglikanları ile etkileşerek, sFRP –Wnt komplekslerini stabilize ettiği gösterilmiştir (28).

sFRP'ler, Fzd ile %30-50 DNA dizi homolojisi gösterirler (28). sFRP'lerin Fzd proteinlerine zıt olarak, hücre içerisine sinyal göndermek için gerekli olan sitoplazmik uçları ve transmembran bölgeleri yoktur (8). sFRP'ler, CRD domaini ve karboksi terminal netrin domaini (NTR=netrin-like domain ) olmak üzere iki yapısal ünite içerirler. sFRP'lerin N-terminalindeki CRD domainleri, Fzd'in hücre dışı sisteince zengin amino terminal domainine homoloji gösterir (6-30). COOH domaini de, NTR ile bazı bölgelerde zayıf dizi homolojisi gösterir (14,28) (Şekil 2.3). Altı sistein birimi ve çeşitli korunmuş hidrofobik birimlerin segment ve ikincil yapılarını içeren bu NTR modülünün, doku metalloproteinaz inhibitör ve bazı proteinlerde bulunduğu; proteaz inhibitör aktivitesinden dolayı metalloproteazların aktivitesini baskılayabildiği gözlenmiştir (28,30).



Şekil 2.3. sFRP ve Frizzled'in homoloji gösteren domainleri (28).

sFRP'ler, Fzd'lar gibi CRD domainleri aracılığı ile Wnt'lere bağlanarak sinyal iletiminin düzenlenmesinde rol oynarlar (30). sFRP'lerin CRD veya C terminal domaini aracılığı ile Wnt ligantlarıyla ilişkiye girmesinin, Wnt sinyal iletimini engellediği öne sürülmektedir. sFRP1 CRD bölgesinin, hem Fzd, hemde kendisi ile ilişkiye girebildiği gösterilmiştir. Böylece sFRP'ler, Fzd ile işlevsel olmayan kompleksler oluşturarak ya da Wnt proteinlerinin Fzd proteinlerine bağlanmasını önlemek için onlarla etkileşerek, Wnt sinyalini engelleyebilmektedirler (28) ( Şekil 2.4).



**Şekil 2.4.** sFRP'nin Wnt sinyal iletimindeki rolü (28).

sFRP'lerin düşük ve yüksek ekspresyonunun çeşitli hastalıklarda apoptozun hızlanması veya baskılanması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. sFRP'lerin ekspresyonunun yüksek olması, Wnt sinyal iletimini baskılayarak apoptozu tetikler. Meme ve servikal kanserlerden alınan dokularda, sFRP'lerin çok düşük ekspresyona olduğu gözlenmiştir. sFRP gen mutasyonları, kanserlerde çok az gözlenmekle birlikte son zamanlarda sFRP ekspresyon kaybı, DNA metilasyonu ile ilişkilendirilmiştir (34). sFRP gen ailesi sıklıkla hatalı DNA metilasyonunun hedefidir ve sFRP genlerinin metilasyonu veya ifadesinin baskılanması kolorektal, mesane, prostat, endometrium, akciğer, meme, mezotelyoma ve kronik lenfositik lösemi gibi çeşitli kanserlerde gösterilmiştir. Bu gözlemlere dayanarak, sFRP'lerin tümör supressör gen olarak işlev gösterdikleri ileri sürülmektedir(8).

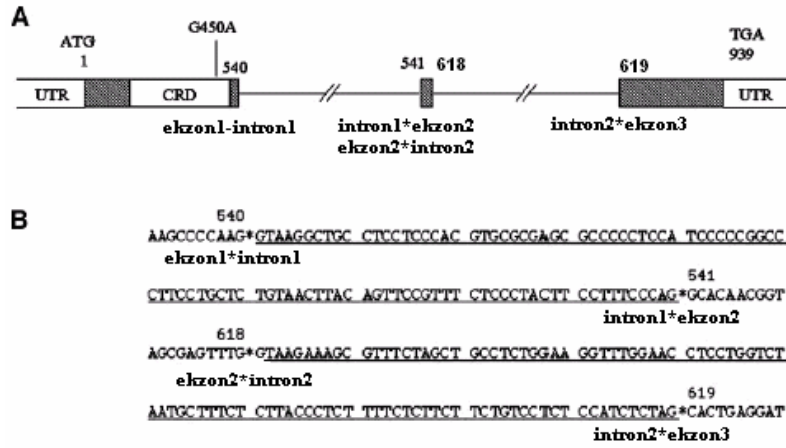


## 2.5. sFRP1 GENİ: .

sFRP1, sFRP protein ailesinin bilinen beş üyesinden biridir ve SARP2 (Secreted apoptosis-related protein-2), FrzA (Frizzled in aorta) olarak da isimlendirilir (2). İnsan sFRP1 geni, kanserde heterozigozite kaybının sıklıkla olduğu bir bölge olan 8p21'de yerleşiktir (28). İnsan embriyonik fibroblast hücre hatlarından elde edilen ortamda, hepatosit büyüme faktörleri ile birlikte saflaştırılan 36 kDa'luk proteinin kısmi dizisi saptanmıştır. Dejenere oligonükleotid prob ile insan embriyonik akciğer fibroblastlarından yapılan cDNA kütüphanesi taranarak, aminoasit (aa.) sekansı elde edilmiştir. 314 aa.'lik protein kodlayan cDNA, Fzd proteinlerinin ligant bağlayan domainlerine %30- 40 benzerlik gösteren sisteyince zengin bir domain içermesi nedeniyle FRP (Frizzled Related Protein) olarak adlandırılmıştır. (1).

İnsan sFRP1 proteini; 110 aminoasitlik, N- terminal CRD domaini, 90 aminoasitlik Netrin benzeri heparin bağlayan C- terminal bölgesi ve 26 aminoasitlik C- terminali'nden oluşan bir glikoproteindir (35,36). Beş adedi CRD domaininde ve üç adedi Netrin (NTR) domaininde olmak üzere toplam sekiz disülfid bağ içerir. NTR domaini, sFRP1'in heparin bağlayan bölgesini içerir ve Wg ile ilişkisini sağlar (30).

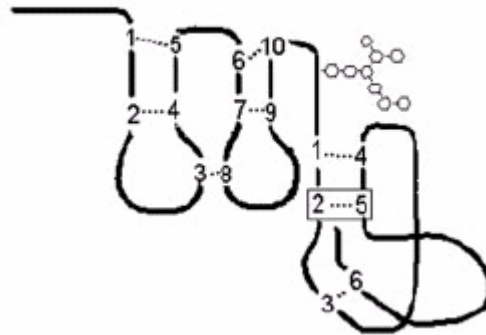
sFRP1 geni, yaklaşık 47 kb uzunluğundadır (37). sFRP1'in genomik haritasını doğrulamak amacı ile PAC (P1-derived Artificial Chromosome) klonu kullanılarak yapılan çalışmada 540/541 ve 618/619 nükleotidlerinde iki intronun varlığı ortaya çıkmıştır (14). Genin üç ekzonu, uzunlukları 5077 baz çifti (bç) ve 37972 bç olan bu iki intron tarafından ayrılır. Gen 4445 nükleotid uzunluğunda bir transkript ürünü verir. Bu transkript 314 aminoasitlik polipeptidi kodlar (37) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. sFRP1'in genomik haritası (14).

sFRP1 geninin genomik haritası, sFRP1 proteininin beklenen domain yapısı ile uyuşmaktadır. İlk kodlayan ekzon CRD domainini, üçüncü ekzon ise Netrin domainini içerir (14). sFRP1, N-terminal CRD domaininde 1-5, 2-4, 3-8, 6-10, 7-9 sisteinleri arasında disülfid bağlantı desenlerine sahiptir. Heparin bağlayan domainlerinin disülfid bağlantıları da 11-14, 12-15, 13-16 sisteinleri arasındadır. sFRP1, Asn<sup>172</sup> ve Asn<sup>262</sup> 'de N- bağlantılı glikolizasyon bölgesine sahiptir (36) (Şekil 2.6). Fajlarla yapılan çalışmalarda sFRP1'e bağlanmak için "DGR"(Aspartik asit, Glisin, Arjinin) peptid dizisinin kor motif olabileceği ve DGR motifini içeren proteinlerin, sFRP1 etkileşimi için yeni adaylar olabileceği öne sürülmüştür (30).

İnsan sFRP1 proteini



Şekil 2.6. sFRP1'in disülfid bağlarının yerleşimi ve glikolizasyon bölgesi (36).

Normal dokularla yapılan çalışmalarda sFRP1'in, hücre apikalinde ve perinükleer sitoplazmada yerleşim gösterdiği gözlenmiştir. sFRP1 salgılandıktan sonra hücre membranı ile ilişkisine devam edebilmektedir (14,38).

sFRP1, Wnt proteinleri ile etkileşerek ve Fzd reseptörlerine bağlanarak işlevsel olmayan reseptör komplekslerinin oluşumuna neden olur. Bu yolla Wnt sinyal iletimini baskılayabilir (38). Wnt aile üyeleri ve Frizzled reseptörleri arasında bağlanma özgülüğü, farklı sinyal ileti etkilerine neden olmaktadır. Bu sürece sFRP'ler ve Wnt proteinleri arasındaki bağlanma özgülüğü de eklenince olay daha da karmaşık hale dönüşmektedir. sFRP1'in; Wnt1, Wnt2, Wnt8, Wnt4 ve Wnt3a ile bağlanabildiği bilinmektedir. sFRP1'in Wnt1'e bağlanması, Wnt aktivitesine antagonist olduğunun bir göstergesidir (39). Wnt1 ve Wnt5a'nın biyokimyasal özellikleri oldukça benzemesine rağmen sFRP1 (FrzA) Wnt5a ile etkileşime girmez (40).

sFRP/ Wnt bağlanmasında Heparin /HSPG'nin (Endojen heparan sülfat proteoglikan), oldukça etkili olabileceği ve Fzd/ Wnt etkileşimini etkileyebileceği ileri sürülmüştür. Heparin ve HSPG'nin, *Drosophila*'da sFRP1 ve Wg arasındaki etkileşime yapısal destek vererek bu bağlanmayı kolaylaştırdığı gözlenmiştir. Alternatif olarak heparin ve HSPG, ligant veya reseptör oligomerizasyonunu hızlandırarak; veya onların karşılıklı affinitelerini arttırarak da sFRP1 ile Wg'ın bağlanmasını kolaylaştırıyor olabilir (15).

*Drosophila*'da sFRP1, düşük ve yüksek affinite ile Wg'ye bağlanabilme bölgelerine sahiptir. Bunlardan yüksek affinite ile bağlanan bölge Wg sinyal iletimini tetiklerken, düşük affinite ile bağlanan bölgenin Wg sinyal iletimini engellediği ileri sürülmüştür. Her ne kadar Wg ve omurgalı Wnt arasında yüksek bir benzerlik olsada, sFRP1 ve Wg arasındaki ilişkinin, sFRP1 ve Wnt arasında olup olmadığı bilinmemektedir (28).

sFRP1'in endotelial hücre göçü, kapiller tüp oluşumu, miyofibroblast ve kollajen yıkımı ile MMP-9( Matriks metalloproteaz-9) aktivitesinde azalmayı sağlamak gibi işlevleri bulunmaktadır. sFRP1 erişkinlerde, kapiller ve arterlerin endotelinde; embriyonik yaşamda vaskülarizasyon işleminin erken evrelerinde yüksek düzeyde eksprese olmaktadır (41).

### **2.5.1 sFRP1'in kanserle ilişkisi:**

sFRP1, Wnt sinyal iletimi antagonisti olarak bilinmektedir (35). sFRP1 proteini apoptozu kolaylaştırabilir veya tümörlerin invazif özelliklerini ve göçünü kontrol edebilir.

Wnt yolağındaki çeşitli hedef genler, tümör invazyonu ve lenf nodu metastazı ile ilişkilidir. Kromozom 8p12'de genlerin DNA hipermetilasyonu yolu ile fonksiyonel inaktivasyonu, erken tümör gelişiminde gözlenir (38). Ayrıca kromozom 8p'nin interstitial delesyonu, prostat kanseri (8), skuamoz hücre baş ve boyun kanserleri (42) ve kolorektal karsinoma (43) gibi farklı kanser tiplerinde gözlenmektedir (14). sFRP1'in, insan tümörlerinde heterozigozite kaybının sıklıkla olduğu 8p12'de lokalize olması ve Wnt sinyal iletiminin antagonisti olarak işlev göstermesi bu genin aday tümör supressör gen olarak düşünülmesine neden olmuştur (14,43).

sFRP1'in ekspresyonunun düşük ya da yüksek olması,  $\beta$ -katenin'in Wnt-bağımlı stabilizasyonunda zıt etki göstermesine neden olmaktadır (41). sFRP1 ekspresyonu yüksek olduğunda Wnt'in etkisini yok ederken, ekspresyonu düşük olduğunda Wnt'in etkisini arttırabileceği öne sürülmüştür (44). sFRP1 geninin promotor bölgesinin hipermetilasyonu ve paralelinde gen ekspresyonunun azalışının, birçok kanser tipi ile ilişkili olduğu bulunmuştur (38). sFRP1 ekspresyonunun meme kanseri, yumurtalık kanseri, mesane kanseri, mezotelyoma, prostat kanseri, servikal kanseri, böbrek karsinomalarında, kolorektal kanser ve küçük hücreli akciğer kanserinde ve hepatoselüler karsinomada baskılandığı bilinmektedir (45).

Yumurtalık kanserlerinde, gen mutasyonu olmamasına rağmen sıklıkla izlenen  $\beta$ -katenin protein ekspresyon artış nedeninin, sFRP1 inaktivasyonu olduğu ileri sürülmüştür. Yumurtalık kanser hücre hatlarında yapılan bir çalışmada, RMG1 hücrelerinde, metilasyon ve ekspresyon arasında bir etkileşim bulunamamıştır. RMG1 hücrelerinde sFRP1 geni metile olmamasına rağmen, tamamen eksprese olmaktadır. Bunun, metile olmayan allelde bir mutasyon sonucu sFRP1 mRNA'sının çabuk yıkımından dolayı olabileceği ya da sFRP1 transkripsiyonu için gerekli olan faktörlerin eksikliğinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür (46).

Hepatoselüler karsinoma (HCC)'da sFRP1 promotör metilasyonunun, kolorektal kanserden daha az, yumurtalık kanserinden daha sık olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte kronik hepatit enfeksiyonu sonucu gelişen hepatokarsinogeneizde, sFRP1 promotör metilasyonunun rolü olabileceği öne sürülmektedir (47). sFRP1 işlev kaybı, sürekli Wnt sinyal iletiminin aktivasyonuna yol açarak epitel hücrelerinin çoğalmasına ve invazif özellik

kazanmasına neden olmaktadır (14).

Meme tümörlerinde sFRP1 ekspresyonunun baskılanmasının zayıf prognoz ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Genin eksprese olması tekrar sağlandığında, meme tümör hücre hatlarında proliferasyonu engellediği izlenmiştir. Meme tümör hücrelerinde sFRP1'in p-ERK1/2 düzeyini düşürmesi, Wnt aracılıklı ERBB transaktivasyonunun ERK1/2 sinyalin oluşumunda önemli bir role sahip olduğunu gösterir (10). Bu nedenle sFRP1, yeni bir meme tümör belirteci için iyi bir aday olabilir. Hem duktal hem de medullar karsinomada görülen lenfoplasmositik stromanın, sFRP1-pozitif tümörlerde gözlenmesi, sFRP1 ekspresyonunun immün reaksiyonlar ile doğrudan veya dolaylı olarak ilişkili olduğunu düşündürmektedir. sFRP1 ekspresyon kaybının, hormonal reseptörlerin varlığı ve tümör progresyonu ile ilişkili; fakat meme tümörünün patolojik evreleri ile ilişkili olmadığı ileri sürülmüştür (2). Genellikle sFRP1 mRNA düzeyinin düşük olması, lenf nodu metastazı ve mortalite artışı ile ilişkilendirilirken, kolorektal tümörlerde sFRP1 ekspresyon düzeyi ve lenf nodu metastazının gelişimi ya da diğer klinik ve patolojik özellikler arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (14).

sFRP1 geninin ekspresyonunun artışıyla sitoplazmadaki  $\beta$ -katenin düzeyinin azalışı, osteogenezisin azalışı ve apoptozun artışı ilişkilidir (48,49). Ancak sFRP1 tarafından apoptozun düzenlenmesi halen tartışma konusudur. Gerçekte sFRP1 farklı konsantrasyonlarda farklı etkileri olan iki yönlü modülatörlerdir. sFRP1'in apoptozisteki etkisi, p53, caspase-3, caspase-9, BIK( BCL2-interacting killer) gibi çeşitli apoptoz ilişkili genlerin düzenlenmesi ile ilişkilidir. sFRP1'in, p53, Bax ve kaspazlar'ın düzenlenmesi aracılığı ile fibroblastların apoptoz düzeyini düşürdüğü ileri sürülmüştür. Örneğin sFRP1 tarafından BCL2 ekspresyonunun tetiklenmesi, p53 bağımlı mitokondrial apoptotik yolağı inhibe etmektedir (32). sFRP1 tarafından apoptozun düzenlenmesi, hücre hedefler doğrultusunda değişiklik göstermektedir; MCF7 meme hücre hattında apoptozu tetiklerken, dişeti fibroblastlarında engellediği bildirilmiştir (50). sFRP1'in devamlı eksprese olması, periodontal ligamentlerde ve dermal fibroblastlarda apoptozun engellenmesine katkı sağlamaktadır (51). Buna ek olarak, yoğun östrojenik koşullar altında yüksek sFRP1 ekspresyonunun, uterin leyomiyolarının gelişimine katkı sağladığı ileri sürülmektedir (32,52). Literatürdeki verilerden de anlaşıldığı üzere, sFRP1'in apoptoz sürecindeki rolü henüz tam olarak tanımlanabilmiş değildir.

Yukarıdaki verilerden de anlaşıldığı gibi; sFRP1, Wnt sinyal iletiminin düzenlenmesinde çok önemli fonksiyonu bulunan bir gendir. Bugün Wnt sinyal iletimi,

kanserin de dahil olduğu birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir. Wnt sinyal iletiminin hücre içindeki efektörleri veya modölatörleri nedeniyle sürekli aktivasyonunun, belirli kanserlerde yüksek sıklıkta gözleendiği bildirilmiştir. Özellikle, APC’de ve  $\beta$ -katenin’de meydana gelen mutasyonların kolon kanserlerinin %80-90’ında gözleendiği ve  $\beta$ -katenin mutasyonlarının melanoma ve hepatoselüler karsinomada yaygın olduğu gözlenmiştir (18).

Bugün farklı solid tümörlerde Wnt sinyal iletiminin etkinleşmesiyle ilgili birçok yayın bulunmaktadır. Bununla birlikte, lösemilerle Wnt sinyal iletiminin ilişkisini anlatan yayın sayılarında da artış gözlenmektedir. Wnt sinyal iletiminin hematopoetik sistemde kök hücrelerin kaderini belirlemede rol aldıkları; hem hematopoetik kök hücrelerin kendi devamlılıklarını sağlamalarında, hem de onkogenezi düzenlemede etkili oldukları gösterilmiştir (53).

## **2.6. LÖSEMİLER:**

Lösemiler, beyaz kan hücrelerinin kontrolsüz çoğalması sonucunda oluşan kanserlerdir. Kanser kemik iliğinde başlar, daha sonra kana, lenf nodlarına, dalağa, karaciğere, santral sinir sistemine, testislere ve diğer organlara yayılır. Lösemiler; Akut lenfositik lösemi, Kronik lenfositik lösemi, Akut miyeloid lösemi ve Kronik miyeloid lösemi olmak üzere dört sınıfa ayrılır. Genel olarak, akut lösemiler çocuklarda ortaya çıkarken, kronik lösemiler sıklıkla yetişkinlerde gözlenmektedir.

Lösemilerin doğası solid tümörlerden farklıdır. Erişkin organizmada hematopoetik sistem, kendi sürekliliğini sağlama yeteneğine sahip hematopoetik kök hücre (HKH) topluluklarından köken alan ve genellikle kısa yaşam ömrüne sahip hücrelerden oluşmaktadır. Wnt proteinleri ve/veya Wnt sinyal iletimi yolağının aktivatörleri tarafından hematopoetik öncüllerin ve kök hücrelerin uyarılması, onların genişlemesine neden olmaktadır (19,54). Hatalı Wnt sinyal iletiminin, hem miyeloid hem de lenfoid kökenli lösemilerde gözleendiği belirtilmiştir (42,55) Son zamanlarda yapılan çalışmalar, embriyonik gelişimde görev alan Wnt sinyal iletimi yolağının KML sürecinde etkili olabileceğini göstermiştir.

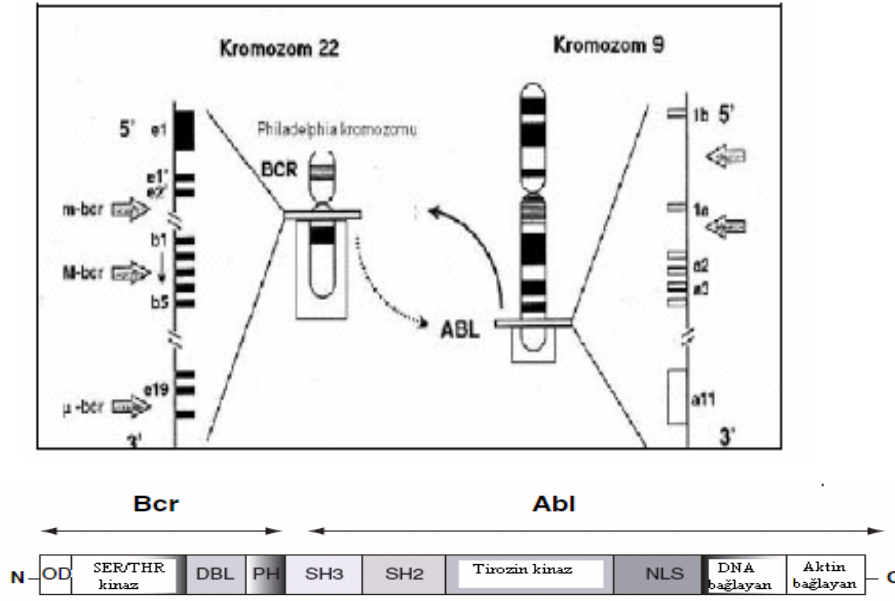
## **2.7. KRONİK MİYELOİD LÖSEMİ (KML):**

Kronik Miyeloid Lösemi (KML), farklılaşmanın tüm aşamalarında miyeloid seri hücrelerinin artışı ile karakterize olmuş klonal hematopoetik kök hücre hastalığıdır. İlk olarak 19.yüzyılda tanımlanmıştır. Sonraki yüzyıllarda yapılan araştırmalar hastalığın kliniğine ve

morfolojik özelliklerine hedeflenmiştir. KML, batı ülkelerinde yılda 1/100.000 oranında, çoğunlukla yetişkinlerde izlenen bir hastalıktır. Erkeklerde kadınlara oranla daha sık gözlenmektedir. Yaşın artışı ile hastalığın görülme sıklığı artmaktadır. KML tanısının konulmasında, periferik kan yayması ve kemik iliği incelemesi ile paralel olarak karyotip analizi ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır (56).

Hastalık, üç farklı klinik evreye ayrılmıştır. Hastalık kronik faz olarak nitelendirilen ilk faz ile başlar, daha sonra ikinci ve üçüncü faz olan akselere faz ve /veya blastik krize doğru ilerler (56). Tedavi uygulanmazsa, progresyon (ilerleme) kaçınılmazdır (57,58). Aşağıda detaylı olarak anlatılacak olan kimerik BCR-ABL geni, KML'deki primer genetik kusur olarak kabul edilmiş olsa da, diğer ek mutasyonlar ve epigenetik modifikasyonlar hastalığın blastik krize doğru ilerleyişi için gereklidir (59). Blastik fazda hastaların, 2/3'ü akut miyeloblastik lösemi, 1/3'ü de akut lenfoblastik lösemi kliniği gösterir (57).

Birçok lösemi, spesifik kromozomal translokasyonlar ile ilişkilidir. Bu kromozomal translokasyonlar, transforme hücre popülasyonunun genişlemesini tetikler ve /veya farklılaşmayı engeller. Bu translokasyonlar genellikle onkogenik füzyon ürünü ile sonuçlanır. KML, başlangıç transformasyonunun hematopoetik kök hücrede oluşması açısından ilginçtir (60). Nowell ve Hungerford, 1960 yılında, KML hastalarında G-grubu kromozom anormalliğini tanımlamışlar ve keşfedildiği şehrin onuruna Philadelphia kromozomu (Ph) adını vermişlerdir. KML'de malign transformasyon, t(9;22)(q34;q11) translokasyonu sonucu Philadelphia kromozomunun oluşumu ile gerçekleşmektedir (42,61). Philadelphia kromozomu, KML hastalarının sitogenetik olarak %95'inde pozitifdir. Kalan %5'lik grup ise, moleküler olarak BCR-ABL kimerik onkogenini taşırlar. BCR-ABL, kromozom 9'un uzun kolunda bulunan ABL (Abelson murine leukemia virus) proto-onkogeninin ortadan kırılarak kromozom 22'deki BCR (breakpoint cluster region) genine bitişik resiprokal translokasyonu ile oluşmaktadır (59). Bu genetik değişiklik, BCR-ABL kimerik proteinin oluşumuna neden olmaktadır. BCR-ABL kimerik geni iki farklı tip BCR-ABL mRNA'sını transkribe edebilmektedir (b3a2 ve b2a2 transkriptleri) (62). BCR-ABL füzyon ürünü, 210.000 Da moleküler ağırlıkta kimerik protein olarak eksprese olur (63) (Şekil 2.7).



**Şekil 2.7.** KML’de Philadelphia kromozomu ve BCR-ABL’in domain yapısının şematik gösterimi(63,64).

BCR-ABL füzyon proteini, ABL’in SH<sub>2</sub> domaininin BCR’ın N terminaline bağlanması ile oluşur. BCR, çeşitli enzimatik işlevleri olan bir multidomain proteindir ve serin-treonin kinaz olarak işlev görür. Oluşan BCR-ABL füzyon proteininde, normal ABL proteininin amino ucu yerine, BCR’ın amino ucuna ait diziler bulunur. Proteine BCR dizilerinin eklenmesi, bir tirozin kinaz olan ABL’in kontrolsüz aktivitesine neden olarak hücre transformasyonuna yol açar (63). BCR-ABL kinaz, hücre bölünmesi ve diğer işlevlerde etkili olan çok sayıda hücre içi proteini fosforilleyerek programlanmış hücre ölümünü engeller, bu hücrelerin tutunma özelliklerinde değişikliğe neden olur. Kök ve progenitör hücre çoğalmasını ve KML’nin gelişimini tetikler (56,65).

KML tedavisinde başlangıçta hastalığın biyolojik seyrini değiştirmeyen hücre azaltıcı sitotoksik tedaviler (başlıca hidroksiüre ve bisülfan) kullanılmıştır. Sonraki dönemde sitogenetik remisyon sağlamak için, biyolojik yanıt düzenleyici ilaçlar (interferon ve interferon/ARA-C kombinasyonu) kullanılmıştır (66). Tedaviye yanıt kriterleri klinik, hematolojik ve sitogenetik düzeyde değerlendirilir. Klinik tam yanıt, KML’nin neden olduğu semptom ve bulguların kaybolması, hematolojik tam yanıt (HTY) dolaşımda lökosit sayısının  $<10 \times 10^3/\text{mm}^3$ , trombosit sayısının  $<450 \times 10^3/\text{mm}^3$  olması, miyeloid öncül hücre olmaması ve dalağın palpe edilmemesidir. Sitogenetik yanıt ise, konvansiyonel sitogenetik yöntem ile Ph



kromozomu % 0 ise tam , % 1-34 kısmi ve % 35-65 ise minor sitogenetik yanıt olarak değerlendirilir. Tam ve kısmi yanıt birlikte major sitogenetik yanıt olarak adlandırılır. Kazanılmış direnç, elde edilen hematolojik, sitogenetik veya moleküler yanıtın kaybolmasıdır (64).

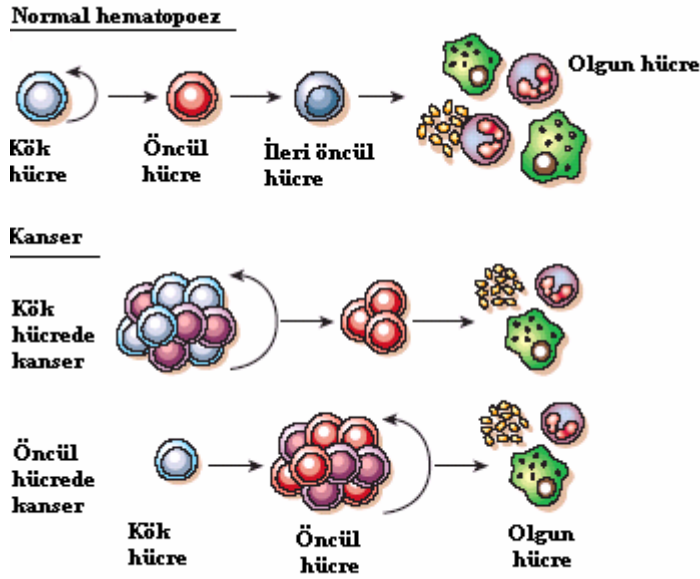
Son zamanlarda tedavide yaygın olarak kullanılan İmatinib Mesilat (IM) (Glivec, Gleevec, STI -571; Novartis, Basel, Switzerland), özellikle kronik fazda hematolojik, sitogenetik hatta moleküler remisyon (BCR-ABL füzyon transkriptinin kaybolması) sağlayabilmektedir. IM, bir 2-fenilaminopirimidin bileşiğidir. Özgül terapötik bir ajan olan IM, BCR-ABL'in enzimatik aktivitesini inhibe etmek için tasarlanmıştır. IM, ABL kinaza ATP'nin bağlanmasını bloklayarak BCR-ABL eksprese eden hematopoetik hücrelerin büyüme ve gelişimini engeller ve bu hücrelerde apoptozisi tetikler (67). İnterferona dirençli KML hastalarında İmatinib ile yapılan Faz II çalışmalarında % 95 tam hematolojik remisyon, % 65 major sitogenetik yanıt, % 48 tam sitogenetik yanıt elde edilmiştir (66).

### **2.7.1. KML'de hücrelerin kendi devamlılıklarını sağlayabilme yetenekleri:**

Her gün insan vücudunda, HKH'lerden oluşan yeni kan hücreleri üretilmektedir. Çoğu olgun kan hücresi kısa yaşam süresine sahiptir. Bu nedenle HKH'ler, bu süreci devam ettirirler. Kök hücrelerin en önemli özelliği, bölündüklerinde biri farklılaşabilen biri de kök hücre olarak kalan iki yavru hücre oluşturmalarıdır. Kan hücreleri, kemik iliğindeki pluripotent kök hücresinden gelişirler. Pluripotent erişkin kök hücreleri, köken aldıkları doku ya da ilgili dokulara farklılaşma özelliği gösterirler. Farklılaşmış hücrelerin öncülleri, olgunlaşma sürecinde birkaç kez bölünürler. Fakat farklılaşmanın son aşamasında hücre çoğalması durur. Kök hücreler kendi popülasyonlarını yenileyebildiklerinden, farklılaşmış hücrelerin üretimi için de bir kaynak olmaktadır (68).

Normal kök hücrelerin kendi kendini yenileme özellikleri kanser hücreleri ile paralellik göstermektedir. Normal hematopoezde sinyal iletim yolları, kendini yenileme özelliğini kontrol ederler. Hücrelerin transformasyonunda bu yolların bozulması onlara kontrolsüz çoğalma ve bazen de kök hücreler gibi kendi kendini yenileme özelliği kazandırır. Hematopoetik sistemde kök hücreler, sınırlı öncüller ve farklılaşmış hücrelerin hepsi transforme olabilirler. Miyeloid lökemojenezde hücre ölümünün engellenmesi önemli bir olaydır. Neoplastik proliferasyon için hücrelerde mutasyonlar birikir. Kök hücrelerde mutasyonların birikimi, kök hücrelerden gelişen ilk öncüllerin neoplastik proliferasyonuna

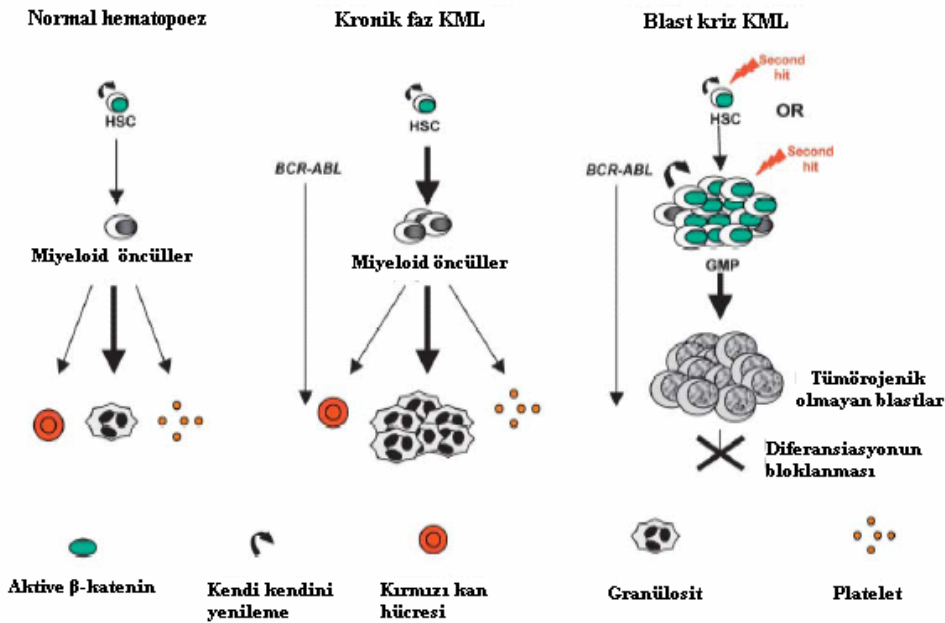
neden olmaktadır (53) (Şekil 2.8.).



**Şekil 2.8.** Lösemi transformasyonu ve hematopoetik kök hücre gelişimi boyunca kendi kendini yenileme özelliğinin karşılaştırılması (53).

Normal hematopoetik kök hücreler ve lösemi hücrelerinin alt gruplarının ortak özelliği, kendi kendini yenileme yetenekleridir. Dikkat çeken görüş, blast krizdeki KML hastalarından veya tedaviye direnç gösteren hastalardan elde edilen granülosit makrofaj öncüllerinin (GMP) normalde böyle bir yetenekleri olmamasına rağmen, kendi kendini yenileme yeteneği gösterdiğidir (69). Buna göre KML’de kendi kendini yenileyen üç hücre popülasyonu mevcuttur: normal kök hücreler, transforme kök hücreleri ve GMP hücreleri. Bu durumda kendini yenileme yeteneği kazanmış olan GMP, lösemik kök hücre olarak değerlendirilmektedir (Şekil 2.9).

KML’de GMP popülasyonunun kendi kendini yenileme kapasitesine sahip olmasının, hastalığın ilerleyişiyle lösemi kök hücrelerinin belirli özellikler kazanmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda, KML’de tüm fazlarda hastalık ilerleyişi ile birlikte miyeloid öncül grupların genişlemesi söz konusu iken, ilginç bir şekilde HSC kompartmanlarının büyüklüğü aynıdır. Blast krizde ise, granülosit makrofaj kompartmanlarının büyüklüğü artar (58).



**Şekil 2.9.** Normal hematopoez, kronik faz ve blast faz KML arasında kök hücre gelişiminin kıyaslanması(58).

Kronik faz KML’de GMP hücre popülasyonunun genişleme gösterdiği, fakat Ph(+) kök hücre kompartmanlarının büyüklüğünün aynı kaldığı belirtilmiştir (70). GMP öncül hücre popülasyonunda BCR-ABL tarafından sinyal iletim yollarının aktivasyonu, bu kompartmanların genişlemesini etkiler. Kronik faz KML’de  $\beta$ -katenin aktivitesi HKH’ler ile sınırlı iken, blastik krizde  $\beta$ -katenin aktivitesi GMP popülasyonunda da gözlenmiştir. Blastik krizde,  $\beta$ -katenin aktivasyonuna bağlı olarak bir ikinci mutasyon, GMP kompartmanlarında kendi kendini yenileme özelliği kazandırır. Bu ikinci mutasyon, HKH kompartmanlarında veya GMP öncül popülasyonunda meydana gelebilir. Kronik faz KML’den farklı olarak BCR-ABL, GMP kompartmanına kendi kendini yenileme özelliği kazandırır. Ek olarak BCR-ABL transkriptleri, öncül hücrelere göre kök hücrelerde daha fazladır, fakat bu patern hastalığın blastik krize ilerlemesi ile tersine dönebilir (58). Hastalığın ilerleyişi boyunca BCR-ABL transkriptlerinin düzeyi hematopoetik kök hücrelerde sabit kalırken, granülosit makrofaj öncüllerde BCR-ABL ekspresyonunun arttığı gözlenmektedir (69). Böylece blastik kriz KML’de, BCR-ABL kinaz aktivitesi ve GMP’lerin kendi kendini yenileme özelliğinin ilişkili olduğu saptanmıştır.

### 2.7.2. KML ve Wnt sinyal iletiminin ilişkisi:

Hematolojik malignansilerde, Wnt sinyalinin kontrolünün bozulması (deregölasyonu) ilk olarak KML'de tanımlanmıştır (69). Çeşitli yayınlarda KML'de canonical sinyal iletim yolağının aktivasyonu ve  $\beta$ -katenin birikiminin gösterilmesi, hastalığın patogenezinde yolağın bozulduğunu gösteren kanıtlardır (31,42,55,69,71,72). Wnt genlerindeki ekspresyon değişiklikleri, KML'de hastalığın ilerleyişi ile ilişkilidir (53,61). Buna ek olarak normal BCR proteininin, Wnt sinyal ileti yolağını baskılayan bir negatif düzenleyici olduğu gösterilmiş, Philadelphia translokasyonu sonucunda oluşan kimerik BCR-ABL gen ürününün bu aktiviteye sahip olmadığı, aksine dominant-negatif etkiyle canonical Wnt/ $\beta$ -katenin yolağını etkinleştirdiği ortaya konulmuştur (31).

$\beta$ -katenin'in kan hücrelerinde nükleer yerleşimi, hematopoetik kök hücreler için sınırlıdır ve  $\beta$ -katenin, kök hücrelerde kendi kendini yenileme yeteneğini düzenlemektedir (42,73). BCR-ABL (+) KML hücrelerinin kendi kendini yenileme özelliği, aktif serin /treonin (S/T)-fosforile olmayan  $\beta$ -katenin tarafından korunur. KML hücrelerinde BCR-ABL seviyesi, onun tirozin/serin/treonin fosforilasyonunu etkileyerek,  $\beta$ -katenin protein stabilizasyonunun düzeyini kontrol edebilir. BCR-ABL fiziksel olarak,  $\beta$ -katenin ile etkileşir. BCR/ABL'in onkogenik tirozin kinaz aktivitesi, tirozin 86(Y86) ve 654(Y654) rezidülerinden  $\beta$ -katenin fosforillenmesi için gereklidir (71).

Blast krizdeki hastada granölisit makrofaj öncüllerinin kendi kendini yenileyen popölasyonu, KML'de yeni tedavi yaklaşımları için hedef olabilir. Hem normal kök hücreler, hemde granölisit makrofaj öncülleri kendilerini yenilemek için bu mekanizmayı kullansa da tedavi için  $\beta$ -katenin yolağı hedef olabilir (70). KML tedavisinde, İmatinib tarafından  $\beta$ -katenin'in fosforilasyonunun engellenmesi, KML hücrelerinde APC/Axin/GSK3 $\beta$  kompleksine  $\beta$ -katenin'in bağlanma eğilimini arttırır ve yıkılımlını hızlandırır. Böylece  $\beta$ -katenin/TCF ilişkili transkripsiyon azalır (71). Bununla birlikte Axin'in aşırı ekspresyonu, lösemik blastların kendi kendini yenileme potansiyelini azaltarak,  $\beta$ -katenin yıkılımlının artışına neden olur (53,71).

KML'nin patogenezinde Wnt-sinyal iletimine ait bozukluklarının etkili olduğu görüşünü destekleyen önemli veriler bulunmaktadır; Wnt sinyal ileti yolağı, hematopoetik kök hücrelerin kendi devamlılıklarını sağlamada önemli rollere sahiptir.  $\beta$ -katenin birikimi ile canonical yolak KML'de aktive olur. Normal BCR proteini, Wnt sinyal ileti yolağında düzenleyicidir (31,42,55,69,71,72). Wnt sinyalinin blastik kriz boyunca aktif olup, hastalığın

diğer aşamalarında inaktif olmasının nedeni henüz bilinmemektedir. Bunun nedeni  $\beta$ -katenin, Axin, APC ve diğer Wnt sinyal iletimi komponentlerinde oluşan mutasyonlar olabilir (55). Bir diğer olasılık ise, sFRP'ler gibi Wnt antagonistleri olabilir.

sFRP genlerinin epigenetik sessizleşmesinin, canonical Wnt sinyal ileti yolağında sürekli aktivasyona neden olduğu bilinmektedir. Genin promotör bölgesindeki CpG adalarının metilasyonu, pek çok kanser çeşidi ve lösemide sFRP genlerinin ifadelerinin baskılanmasına neden olur (74,75). Son zamanlarda akut ve kronik lenfoid lösemilerde yapılan çalışmalar, malign hematopoezde Wnt sinyal iletiminin rolü hakkında bilgi vermektedir. Akut miyeloid lösemi, kronik lenfositik lösemi, kronik miyeloid lösemi ve multiple miyeloma'nın patogenezinde Wnt sinyal iletimi aktivasyonunun rolü olmasına rağmen, Wnt sinyal iletimi genlerinde bu yolağın anormal regülasyonuna neden olabilecek herhangi bir mutasyon saptanmamıştır (76). Bu nedenle sFRP gibi Wnt antagonistlerinin promotör hipermetilasyonu nedeni ile sessizleşerek Wnt sinyal iletimini aktif halde tutması, lösemilerin gelişimi açısından önemlidir. Yapılan çalışmalarda ALL'de sFRP1'in metilasyon oranının %51(77), KLL'de ise % 100 olduğu saptanmıştır(74). Ancak, henüz literatürde KML'de, sFRP1 genindeki epigenetik değişiklikleri saptamaya yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle yüksek lisans tez projemizde, KML hastalarında sFRP1 geninin promotör bölgesindeki epigenetik değişiklikler incelenmiştir.

## **2.8. EPİGENETİK DÜZENLENMELER:**

Epigenetik, DNA dizisinden bağımsız olarak gen ifadesinde meydana gelen kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanır. Epigenetiğin kanser biyolojisinde, viral enfeksiyonlarda, mobil elemanların aktivasyonunda, somatik gen tedavisinde, gelişimsel anormalliklerde ve X inaktivasyonunda önemli rol oynadığı bilinmektedir (75).

Gen ifadesi temel olarak iki mekanizmayla düzenlenmektedir. Bu mekanizmalar; transkripsiyonu aktive eden ve baskılayan proteinlerin aktivitelerinin düzenlenmesi ve DNA ile kromatinde meydana gelen modifikasyonlardır (epigenetik kontrol).

Epigenetik mekanizmalar; histon modifikasyonları, RNA ile indüklenen sessizleşme (RNA-induced silencing) ve DNA metilasyonu olmak üzere üç ana başlıkta toplanmaktadır (78). Bu mekanizmaların birlikte çalışması sonucu gen ifadesinde kalıtsal değişiklikler meydana gelmektedir. Mekanizmaların herhangi birindeki hata, genlerin ifadesinin aşırı artmasına veya baskılanmasına neden olarak epigenetik hastalıklara yol açmaktadır.

**Histon modifikasyonları:** Kromatin yapı ve işlevini değiştirdiği için epigenetik düzenleyiciler olarak bilinmektedir. Modifikasyonlar, histonların elektrostatik yükünü etkileyerek kromatin yapısını değiştirmektedir ve histon-DNA, histon-histon ilişkisini etkileyerek, DNA'nın paketlenmesi, replikasyonu, tamiri ve gen ifadesinin kontrolü gibi birçok biyolojik olayı kontrol edebilmektedir (62). Belli başlı histon modifikasyonları; asetillenme, deasetillenme, metilasyon ve fosforillenmedir.

Histonların asetillenmesi: Histon H3 ve H4, 9. lizinden histon asetil transferazlar (HAT) tarafından asetillenirler. Histonlardaki lizinler, yoğun "+" yüklü aminoasitlerdir. Asetillenmiş histonların "+" yükü azalır ve histonların DNA ile olan ilişkileri zayıflar. Gevşek paketlenme olur ve kromatin açılır, transkripsiyon aktif hale geçer.

Histonların deasetillenmesi: Histon deasetilazlar (HDAC) asetil gruplarını uzaklaştırır. Histonlardaki "+" yükün artmasına neden olurlar. Bu da "--" yüklü DNA ile "+" yüklü histonların ilişkisini artırır. Histonlar sıkıca paketlenir ve transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya ulaşması engellenir.

Histonların metillenmesi: Histonların metilasyonu, N terminal kuyrukta bulunan lizin ve arjinin birimlerinin histon metil transferaz (HMT) enzimi tarafından metillenmesi ile gerçekleşir (79).

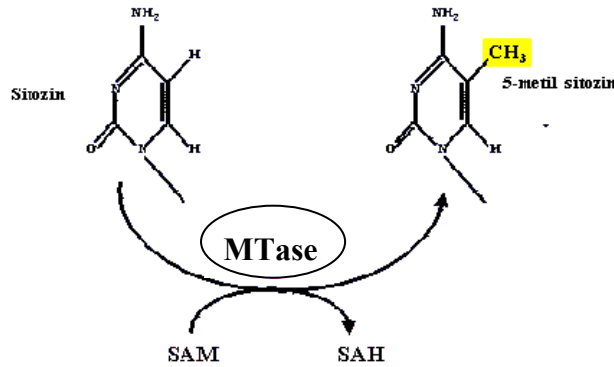
Histonların fosforillenmesi: Histonlar, mitoz esnasında ve sinyal iletiminde kinazlar aracılığı ile serin rezidülerinden fosforillenirler.

**RNA ile indüklenen sessizleşme (RNA-induced silencing):** Bazı özel RNA'ların, histon modifikasyonlarının ve DNA metilasyonunun başlaması için tetikleyici olduğu ileri sürülmüştür. Heterokromatin bölgenin oluşumuna katkı sağlayarak kalıtsal olarak sessizleştirilmesine neden olduğu düşünülmektedir. Son yıllarda, kodlamayan RNA (non-coding RNA) adı verilen bazı küçük RNA moleküllerinin epigenetik süreçte rol aldıkları gösterilmiştir. Örneğin; RNA interferans olarak bilinen, posttranskripsiyonel ve posttranslasyonel sessizleştirilmelerde görevli olan miRNA (micro RNA), siRNA (small-interfering RNA) ve X kromozom inaktivasyonundan sorumlu olan XIST RNA bu süreç için örneklerdir (62).

**DNA metilasyonu:** Gen sessizleşmesinin araştırılmasında sıklıkla çalışılan diğer bir epigenetik mekanizmadır. Direk olarak DNA ile ilişkilidir.

### 2.8.1. DNA Metilasyonu:

DNA metilasyonu, DNA'yı doğrudan etkileyen epigenetik bir mekanizmadır. DNA'nın CpG bölgelerindeki sitozin halkasının 5.pozisyonundaki karbonuna, metil grubunun eklenmesiyle, 5-metil sitozin olarak sonuçlanan kovalent kimyasal bir modifikasyondur (75,80). S-Adenozil metiyonin (SAM) 'den metil grubunun sitozine aktarımı, DNA metiltransferazlar (DNMT) tarafından katalizlenir (80) (Şekil 2.10) .



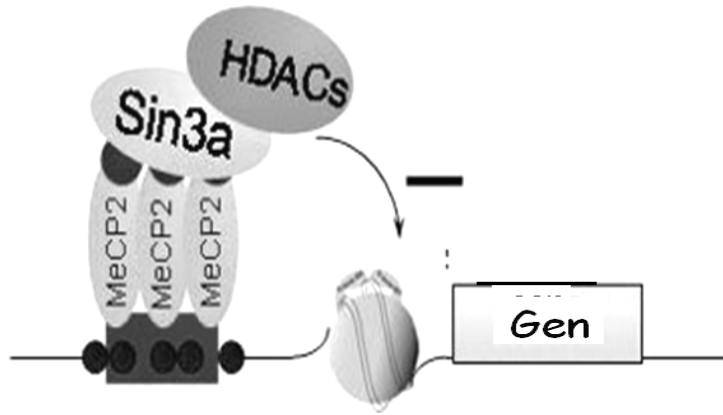
Şekil 2.10. Sitozinin 5-metil sitozine dönüşümü (81) .

DNA metilasyonu, embriyogenez ve genomik baskılanma, yaşlanma, X kromozomunun transkripsiyonel inaktivasyonu, kanser gibi biyolojik süreçlerde önemlidir (82,83). Normal hücrelerde DNA metilasyonu, sıklıkla LINE (long interspersed repetitive elements), SINE (short interspersed repetitive elements) ve satellit DNA'ları içeren tekrarlayan genomik bölgelerde meydana gelir (84). Hareketli elemanlar ve diğer tekrarlanan DNA dizileri hipermetile olduğundan, hareketli elemanların transpozisyonu engellenir. Böylece tekrarlanan diziler arasında rekombinasyon meydana gelmez. Kromozomun kararlı halde kalması sağlanır (80).

Metilasyon, CpG dinükleotidlerindeki sitozin birimlerinde meydana gelir. Çoğu gen promotörü CpG dinükleotitler açısından zengindir (85). Promotörlerde CpG dinükleotidlerinin yoğunlaştığı bölgeler, CpG adaları olarak tanımlanır. CpG adaları 0,5 ile 5 kb uzunluğundadır ve genellikle 100 kb'de bir gözlenirler. Bu bölgeler metile olmayan, GC zengin, CpG'nin GpC'ye oranının en az 0,6 olduğu bölgelerdir. İnsanlarda tüm genlerin neredeyse yarısı CpG adalarına sahiptir (75). CpG adaları ile ilişkili olmayan CpG

dinüklotidleri yoğun bir biçimde metile iken, promotörlardaki CpG adaları metilasyondan korunurlar (82,85).

Metile sitozinler; DNMT'lerle, metil CpG bağlayan proteinlerle (MBD), histon deasetilazlarla, transkripsiyon baskılayan proteinlerle ve geç replike olan kromatin yapısı ile ilişkilidir (80,84). DNA metilasyonunun gen ifadesini baskılama sürecini, transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını engelleyerek veya metile DNA'ya bağlanan protein kompleksleri sayesinde kromatin yapısını değiştirerek gerçekleştirdiği düşünülmektedir (75). Transkripsiyonel sessizleşmede, aktif kromatin önce "de nova" metilasyona uğrar. Ardından metile olmuş DNA'ya, metile DNA dizisini tanıyıp bağlanma özelliği olan MeCP2 proteinleri bağlanır. Bu proteinler, transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını engeller ve deasetilaz aktivitesine sahip diğer enzimler için tanıma bölgesi oluştururlar. Ardından korepressör Sin3A bağlanır ve histon deasetilaz kompleksleri bu sürece dahil olur. Histon H3 ve H4 üzerinde lizinler, deasetile olurlar. Histon kor yapısı ve DNA arasında sıkı bir paketlenme gerçekleşir, transkripsiyon baskılanır ve gen sessizleşir. İnaktif kromatin ise, DNA replikasyonu sonrasında, DNA metil transferazların sürece eklenmesi ile metilasyon deseni korunur ve inaktif kromatin olarak kalır. Dolayısıyla DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları birbiri ile örtüşen olaylardır (79) (Şekil 2.11).



**Şekil 2.11.** Metilasyonun transkripsiyonu etkileme mekanizması (86).

DNA metilasyonunun, kanser sürecine önemli katkı sağladığı gözlenmiştir. Tümör hücrelerinde hipometilasyon, genomun tekrarlayan bölgelerinden metilasyonun kaybına ve



genlerin yeniden aktivasyonuna neden olur. Genomik metilasyonun kaybı, kanserde sık ve erken gözlenen bir olaydır. Bu kayıp pek çok tümör çeşidinde metastatik potansiyel ve hastalığın şiddeti ile ilişkilidir (84,87). Promotör bölgelerinde hatalı sitozin birimlerinin hipermetilasyonu ise, tümör supressör genlerin transkripsiyonel sessizleşmesine, gen ekspresyonunda değişikliğe ve DNA tamir genlerinin inaktivasyonuna neden olmaktadır (75, 82, 88). Bu iki özellikte tümör hücresinin gelişimi için büyük bir avantaj kazandırmaktadır.

Kanserde, DNA hipermetilasyonuna uğrayan sayısız gen bildirilmiştir. Bu genler, hücre döngüsünü düzenleyen genler (*p16INK4a*, *p15INK4a*, *Rb*, *p14ARF*), DNA tamir mekanizması ile ilişkili olan genler (*BRCA1*, *MGMT*), apoptoz genleri (*DAPK*, *TMS1*), ilaç direnci, detoksifikasyon, farklılaşma, anjiyogenez ve metastazla ilgili genlerdir (75).

DNA metilasyonunun birçok gen üzerinde etkili olması nedeni ile memeli hücrelerinde CpG adalarının metilasyon desenlerinin tanımlanması, normal ve patojenik gen ekspresyonları açısından önemlidir (83). Bu amaçla sürekli gelişmekte olan moleküler biyoloji teknikleri, bütün genomdaki ve özellikle tek genlerdeki metilasyon desenlerinin analizine olanak sağlamaktadır (89).

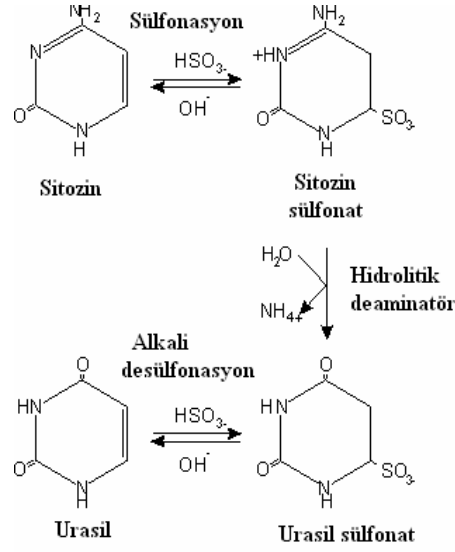
## **2.8.2. Metilasyon saptama yöntemleri:**

Günümüzde DNA metilasyon analizi için kullanılan çok sayıda yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemler, hibridizasyon (Southern blot, mikroarray), metilasyon duyarlı restriksiyon enzimlerle kesme, bisülfid genomik DNA dizi analizi ve nicel-nitel PCR teknikleri temeline dayanmaktadır.

DNA metilasyonunu çalışmak için altın standart, bisülfid muamelesi tarafından sitozinin urasile dönüşüm modifikasyonu ve bunu takiben dizideki değişikliklerin PCR ve DNA dizi analizi ile saptanmasıdır (90).

### **2.8.2.1. Bisülfid modifikasyonu:**

Bisülfid modifikasyonu, genomda bulunan tüm metile ve metile olmayan CpG adalarını saptamak için kullanılır. Sodyum bisülfid, tek iplik DNA'da lokalize olan sitozini deamine eder (89). Bu reaksiyonda DNA, önce denatürasyon ile tek zincirli forma geçer. Ardından sırasıyla; sitozinin bisülfid reaksiyonu ile sitozin sülfonata, hidrolitik deaminasyon ile urasil sülfonata ve alkali desülfonasyon ile urasile dönüşümü gerçekleşir (Şekil 2.12). Böylece tüm sitozinler urasile dönüşür, ancak "metile sitozin", sitozin olarak kalır (90)



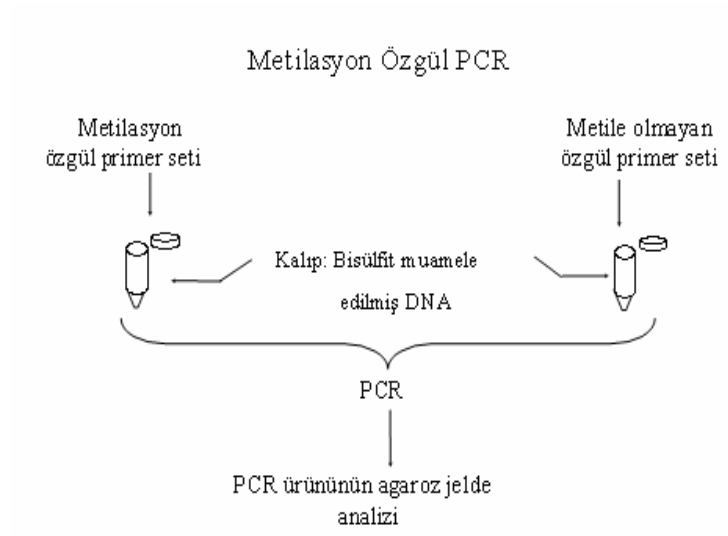
**Şekil 2.12.** Bisülfıt modifikasyonu (91).

Bisülfıt modifikasyon işleminde dikkat edilmesi gereken önemli noktalar bulunmaktadır. Örneğin, reaksiyonun alkalın ortama dönmesi, sodyum bisülfıtın degradasyonuna neden olmaktadır. Ayrıca bisülfıt ile inkübasyon süresi uzun tutulursa, pürin bazlarının %60'ında ve DNA molekülündeki fosfodiester bağlarda hasarlar oluşur, primidin bazları yıkılır (89).

Bisülfıt kimyasal modifikasyondan sonra metile olan ve olmayan DNA'nın analizi için farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar kalitatif (Metilasyon özgül PCR vs.) ve kantitatif ( Bisülfıt genomik sekanslama, COBRA vs.) metilasyon analiz yöntemleridir.

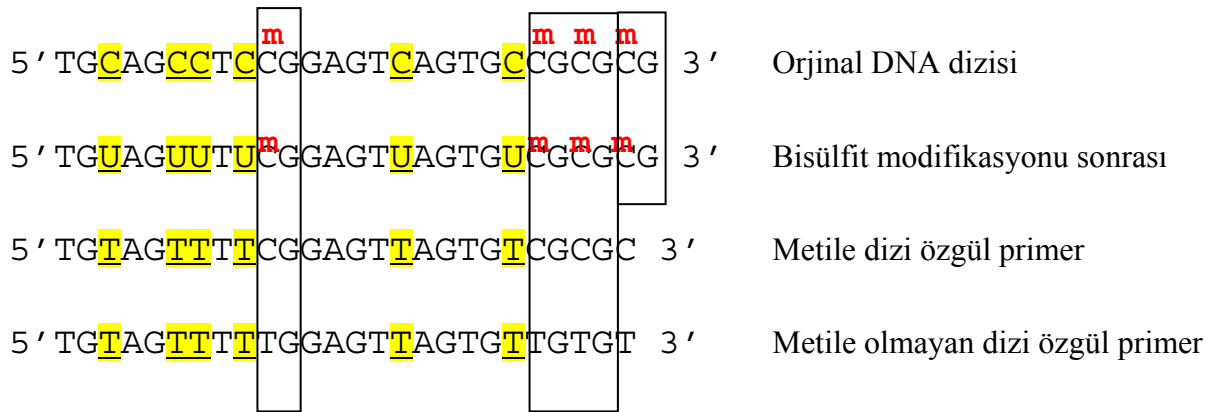
### 2.8.2.2. Metilasyon Özgül PCR (MS-PCR)

Metilasyona özgül PCR, ilk olarak Herman et al. (1996'da) tarafından tanımlanmış bir tekniktir. Metilasyon için özgül ve duyarlı bir yöntemdir. Metilasyon özgül PCR'da, kalıp olarak kullanılacak DNA, bisülfıt muamelesi ile modifiye edilir. Böylece metile olmayan sitozin urasile dönüşür. Her DNA örneği için iki PCR reaksiyonu yapılır ( Şekil 2.13).



**Şekil 2.13.** Metilasyon Özgül PCR.

Bisüfit modifiye DNA'da, metile olmayan DNA'dan metile DNA'yı ayırmak için iki farklı metilasyon özgül primer seti kullanılır (92). Metile primer, metilasyondan dolayı CG içerirken, metile olmayan primer aynı DNA bölgesine yerleşmekle beraber TG içerir (80)(Şekil 2.14).



**Şekil 2.14.** Metilasyon Özgül primer dizaynı.

Metilasyon özgül PCR'da primerlerin seçimi önemlidir. Hem metilenmiş, hem de metile olmayan DNA dizisine özgül primer çiftleri tasarlanmalıdır. Primerler sık sitozin

içeren bölgelerden seçilmelidir. Metile ile metile olmayan alleli ayırmak için, primerin 3' ucunda en az bir CpG bölgesi olmalıdır. Metile ve metile olmayan diziyeye özgül primer çifti, aynı CpG bölgesini içermelidir (83). PCR ürünleri denatüre olmayan poliakrilamid jel ya da agaroz jelde elektroforez ile ayrılır ve etidyum bromid ile boyanarak değerlendirilir. Uygun moleküler ağırlıkta bantlar, metile olan ve olmayan allellerin veya her iki allelin örnekteki varlığını gösterir. İdeal PCR ürün uzunluğu 200 bp olarak kabul edilir (83,92).

MS-PCR ile kaç adet CpG olduğu saptanamaz, ancak bölgenin metilasyon varlığı hakkında bilgi verir. Bununla birlikte basit, az zaman isteyen ve az miktar DNA'dan sonuç elde edilebilen bir yöntemdir. İkinci olarak çok az maliyet gerektirir ve çok fazla sayıda örneğin analizine olanak sağlar (92). Bu nedenle sık kullanılan bir metilasyon analiz yöntemidir.

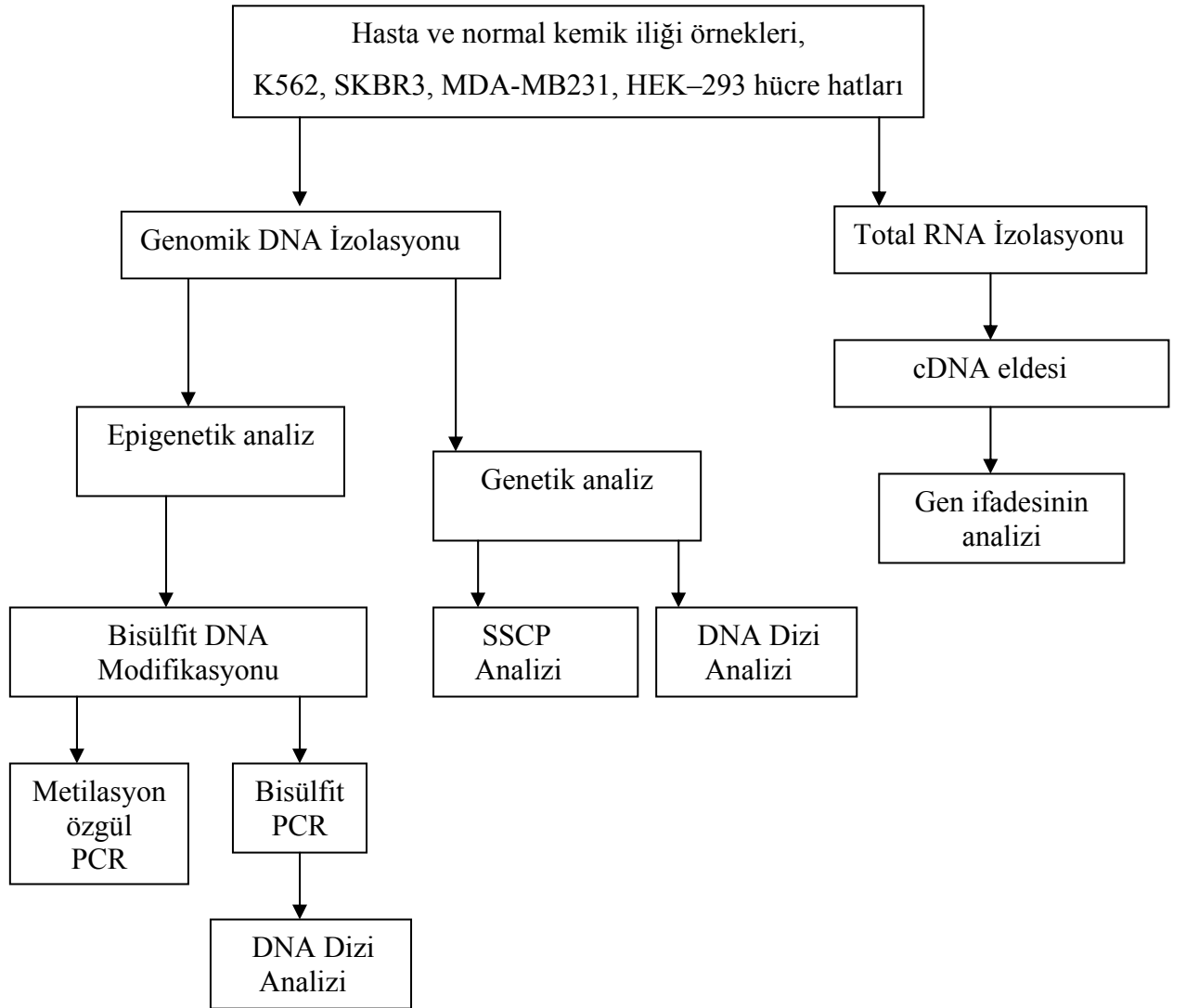
### **2.8.2.3. Bisülfıt PCR:**

Bisülfıt PCR, bisülfıt modifikasyonu sonrasında ilgilenilen bölgedeki her CpG'nin metilasyon durumu ile ilgili bilgi verir. Metilasyon durumu incelenmek istenen DNA bölgesini kapsayacak primerler, modifiye edilmiş DNA'daki değişiklikler göz önüne alınarak tasarlanır (92). MS-PCR'dan farklı olarak sadece bir çift primer ile reaksiyon kurulur. Kullanılan primerlerde CpG dizisi bulunmaz ve CpG bölgelerini sınırlandırır (83).

Bisülfıt PCR sonrasında elde edilen ürün, iki farklı şekilde analiz edilebilir. Bunlardan ilki, restriksiyon enzimler kullanılarak elde edilen PCR ürünündeki kesim sonrası analizidir. Bu yöntemde CGCG dizisini tanıyan BstUI gibi bir enzim kullanılarak bu dizilerdeki değişime (metilasyon var ise dizi korunur, metilasyon yok ise TGTG'ye dönüşür ve kesim bölgesi kaybolur) bağlı desen elektroforez sonrası incelenir. Bu teknik COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis) olarak adlandırılır. Daha duyarlı sonuç veren diğer yöntem ise elde edilen bisülfıt PCR ürününün çift yönlü DNA dizi analizidir. Elde edilen analiz sonucu, referans DNA dizisi ile kıyaslanarak metilasyon analizi kantitatif olarak gerçekleştirilir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

BCR-ABL kimerik gen ürünü açısından pozitif olan Kronik Miyeloid Lösemi hastalarında, sFRP1 geninin promotör bölgesindeki epigenetik ve genetik değişiklikleri incelemek amacıyla yapılan çalışmaların akış şeması aşağıda verilmiştir:



### 3.1. ÇALIŞMA MATERYALİ

Tez projemizde materyal olarak;

- 1) Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı rutin laboratuvarına, KML ön tanısıyla gönderilen ve moleküler analiz sonrasında BCR/ABL kimerik gen ürünü açısından pozitif olan hastaların kemik iliği örnekleri kullanılmıştır. Gelen kemik iliği örnekleri, öncelikli olarak hastanın istek nedenlerinin analizi için kullanılmıştır. Kalan kemik iliği örnekleri, hastaların onayı alınarak çalışmamız için kullanılmıştır (Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Klinik ve Laboratuar Araştırmaları Etik Kurulu, 22.12.2005- 5554 sayılı izin) . Konvansiyonel ve gerçek zamanlı RT-PCR yöntemi ile BCR-ABL (p210) füzyon ürününün varlığı gösterilen, 48 adet KML hastası seçilmiştir. Hastaların yaş ortalaması 45 (12-79 yaş), cinsiyet oranları ise, 1.0-1.2 (erkek-kadın)' dir.
- 2) Normal bireylerin kemik iliği, sFRP1 geninin promotör bölgesinin metilasyon ve ekspresyon düzeyini belirlemek ve hastalar ile kıyaslamak için kullanılmıştır. Normal kemik ilikleri, Göğüs Kalp Damar Cerrahisi'nin ameliyatları sırasında elde edilmiştir. Hastaya hiçbir ek müdahale gerektirmeyen işlemle, açık kalp ameliyatları sırasında göğüs kafesinin açılması ile ortaya çıkan kemik iliği kullanılmıştır. 6'sı erkek 4'ü bayan olan normal kemik iliği donörlerinin, yaş ortalaması 56'dır (4-82 yaş). Toplam 10 adet normal kemik iliği, hastaların onayları ile Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi İlaç ve Klinik Araştırmalar Kurumu Etik Komitesinin 06 Nisan 2006 tarih ve 73/2006 sayılı izni ile alınmıştır.
- 3) Promotör bölgeye ait genetik analiz sırasında kontrol grubu olarak, kan hastalığı olmayan 30 adet normal birey genomik DNA'sı kullanılmıştır. Bu DNA'lar Dr. Çiğdem Eresen Yazıcıoğlu'ndan sağlanmıştır.
- 4) Genetik ve epigenetik çalışmalar için kontrol hücre hattı olarak K562, SKBR3, MDA-MB231 ve HEK-293 hücre hatları kullanılmıştır.
  - K562 hücre hattı, insan kronik miyeloid lösemi hücre hattıdır. Terminal blast kriz döneminde, KML hastası olan 53 yaşındaki bir kadının plevral efüzyonundan elde edilmiştir (93).
  - MDA-MB231 hücre hattı, meme adenokarsinom hücre hattıdır. sFRP1 geni promotör bölgesi için metilasyon pozitif kontrol olarak kullanılmıştır(43).

- SKBR3 hücre hattı, bir kadının plevral efüzyonundan elde edilen insan meme adenokarsinom hücre hattıdır. sFRP1 geni promotör bölgesi için metilasyon pozitif kontrol olarak kullanılmıştır (99).
- HEK-293 hücre hattı, insan embriyonik böbrek hücre hattıdır ve sFRP1 geni promotör bölgesi için metilasyon negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

### 3.2. SİTOGENETİK ANALİZ:

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı rutin laboratuvarına, KML ön tanısıyla gönderilen hasta örneğinden konvansiyonel sitogenetik analizleri yapılmıştır. Kromozom analizi tüm hastalar için direk (örnek alındığında) ve 24 saat kültür sonrasında gerçekleştirilmiştir. Harvest işlemi, metafaz kromozomunun G bantlama yöntemi ile boyanması ve karyotip analizi referans 94'de ( Rooney DE, Czepulkowski BH. Human Cytogenetics) tanımlanmış olan yöntem ile yapılmıştır.

### 3.3. HÜCRE KÜLTÜRÜ

K562, SKBR3, MDA-MB231, HEK-293 hücre hatlarının kültür koşulları aşağıda açıklandığı şekilde yapılmıştır:

*Gereç ve solüsyonlar:*

- 1) İverted faz kontrast ışık mikroskobu (Nikon-Diaphot 200)
- 2) Pipetör (Greiner Labortechnik 000424NS- 9)
- 3) 1, 2, 5 ve 10 ml'lik steril pipetler (LP Italiana spa sterile plastic pipette)
- 4) 25, 75,125 cm<sup>2</sup> lik hücre kültürüne özel filtreli flasklar (Greiner Bio-one, Kat No:690175)
- 5) CO<sub>2</sub> inkübatörü (Heraeus )
- 6) DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) besi ortamı (BiochromAG, Kat No: FG 0415)
- 7) RPMI 1640 besi ortamı (BiochromAG, Kat No: FG 1385)
- 8) FBS (Fötal Bovin Serum) (Biochrom AG, Kat No:S0115)
- 9) L-Glutamin (Biochrom AG, Kat.No:KO281)
- 10) Penisilin /Streptomisin (Biochrom AG, Kat.No:A 2210)
- 11) Steril çalışma kabini (Holten Laminair, HBB2448 )

### *Yöntem:*

- 1) Kültürde süspanse olarak üreyen K562 hücreleri, 2mM konsantrasyonda L-glutamin, 1µg/ml konsantrasyonda penisilin/streptomisin ve %10 oranında FBS içeren RPMI 1640 içerisinde üretildi. K562 hücreleri, süspanse olarak üredikleri için 1 ml'deki hücre sayısı  $1.5 \times 10^6$  'da sabitlenerek 2-3 günde 1/3 oranında pasajları yapıldı.
- 2) HEK-293 hücreleri, 2mM konsantrasyonda L-glutamin, 1µg/ml konsantrasyonda penisilin/streptomisin ve %15 oranında FBS içeren DMEM içerisinde tek tabaka olarak üretildi.
- 3) Kültürde yüzeye tutunarak tek tabaka halinde üreyen MDA-MB231 ve SKBR3 hücreleri, 2mM konsantrasyonda L-glutamin, 1µg/ml konsantrasyonda penisilin/streptomisin ve %10 oranında FBS içeren DMEM/F12 (1:1) içerisinde üretildi. MDA-MB231 ve SKBR3 hücreleri, yüzeye tutunarak tek tabaka halde üredikleri için kültür flasklarının yüzeyini % 70 oranında kapladıkça pasajlandı. Hücre pasajlamalarında, hücreleri kaldırmak için Tripsin /EDTA (%0.05 / %0.02) solüsyonu kullanıldı.
- 4) Tüm işlemler, steril çalışma kabini içerisinde gerçekleştirildi. Hücrelerin inkübasyonu, 37 °C'de % 5 CO<sub>2</sub> 'li etüvde yapıldı.

### **3.4. GENOMİK DNA İZOLASYONU**

Genomik DNA izolasyonu, hasta ile normal kemik iliği örneklerinden ve hücre hatlarından "DNeasy Tissue Isolation kit" (Qiagen #69508) kullanılarak yapılmıştır. Yöntem üretici firmanın belirttiği şekilde uygulanmıştır.

### *Gereç ve Solüsyonlar:*

- 1) Standart masa üstü mikrosantrifüj (Eppendorf centrifuge,5417 R)
- 2) 1.5 ml'lik DNase ve RNase içermeyen mikrosantrifüj tüpleri
- 3) Fosfat tuz tamponu (PBS) (pH 7.2, 50mM potasyum fosfat;150 mM NaCl) (Biochrom AG, Kat No:L1825)
- 4) Etil alkol (%96-100)(Merck, K35815971 610)
- 5) Su banyosu (Pharmacia Biotech, Multi temp III)
- 6) Karıştırıcı (VELP scientifica)
- 7) " DNeasy Tissue Isolation" kit (Qiagen #69508)



*Kit içeriği:*

- Filtre tüpleri
- 2 ml'lik toplama tüpleri
- AL Lizis Tamponu
- AW1 Yıkama Tamponu
- AW2 Yıkama Tamponu
- AE Elüsyon Tamponu
- Proteinase K

*Yöntem:*

Çalışma tamponlarının hazırlanması:

Çalışmada kullanılacak tamponlar, üretici firma talimatları doğrultusunda hazırlandı. Kullanmaya başlamadan önce AW1 yıkama tamponuna 25 ml, AW2 yıkama tamponuna 30 ml saf etil alkol eklendi.

Genomik DNA izolasyonu:

1)

- Materyal olarak kemik iliği kullanıldığında, izole edilecek olan DNA için;

a- 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne 150 µl kemik iliği eklendi.

b- Kemik iliğinin üzerine, PBS eklenerek hacim 220 µl'ye tamamlandı.

- Materyal olarak hücre hatları kullanıldığında, izole edilecek olan DNA için;

a- Maksimum  $5 \times 10^6$  adet hücre içeren kültür, 300 g'de 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü.

b- Hücrelerin üzerine 200 µl PBS eklenerek hücre çökeltisi süspanse edildi.

Bu aşamadan sonraki basamaklar her iki başlangıç materyali için ortaktır.

2) Birinci basamakta hazırlanan 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerinin içerisine 20 µl Proteinaz K (20mg/ml) eklendi.

3) Üzerine 200 µl AL lizis tamponu eklendi. Karıştırıcı kullanılarak, tüp içeriğinin (hücreler, proteinaz K ve lizis tamponu) iyice karıştırılması sağlandı.

4) Bu karışım su banyosunda 70 °C'de 10 dakika inkübe edildi.

- 5) Üzerine 200 µl saf etil alkol eklendi. Karıştırıcı ile homojenize edildi.
- 6) Filtre kolonu, 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilerek, beşinci basamaktaki karışım filtre tüpünün içerisine eklendi. 6000 x g' de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü, filtre tüpünden alta geçen sıvı ile birlikte atıldı.
- 7) Filtre kolonu, yeni bir 2 ml 'lik toplama tüpüne yerleştirildi. 500 µl AW1 yıkama tamponu eklendi. 6000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Filtre tüpünden alta geçen karışım atıldı.
- 8) 500µl AW2 yıkama tamponu eklendi. 20000 x g'de 3 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü, filtre tüpünden alta geçen karışım ile birlikte atıldı.
- 9) Filtre kolonu, yeni bir 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi.
- 10) Filtre kolonu membranı üzerine 200 µl AE elüsyon tamponu eklendi. Oda sıcaklığında 1dakika inkübe edildi. Ardından 6000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.
- 11) Filtrasyon kolonunda membrana bağlanmış olan DNA, 1.5 ml'lik yeni mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.

#### DNA miktar tayini:

İzole edilen genomik DNA'dan 1/15 oranında dilüsyon hazırlanarak, spektrofotometrede (Pharmacia Biotech Ultraspec 2000) 260 ve 280 nm.'de absorbansları ölçüldü. Aşağıdaki formül kullanılarak DNA konsantrasyonu hesaplandı.

$$\text{DNA konsantrasyonu} = A_{260} \times \text{Dilüsyon Faktörü} \times 50\mu\text{g/ml}$$

$A_{260} / A_{280}$  hesaplanarak DNA'nın saflık derecesinin 1.8- 2.0 arasında olup olmadığı kontrol edildi.

### **3.5. sFRP1 GENİNİN PROMOTÖR BÖLGESİNDEKİ GENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN SAPTANMASI:**

Hastalar, normal kemik iliği örnekleri ve K562, SKBR3, MDA-MB231, HEK-293 hücre hatlarından elde edilen genomik DNA'lar, sFRP1 geninin promotör bölgesindeki olası genetik değişikliklerin saptanmasında kullanıldı.

Bu amaçla;

- 1) SSCP ( Single Strand Conformational Polymorphism ) analizi,
- 2) DNA Dizi Analizi yapıldı. sFRP1 geni (NCBI, Ref Seq: NC 000008.9) için olası promotör bölgesi "Promotor 2.0" (100) programı ile saptanmıştır. Bu bölgeye özgül primerlerin dizaynı için "Oligos v.9.4" programından yararlanılmıştır.

### **3.5.1. SSCP Analizi:**

#### **3.5.1.1. SSCP Amaçlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR):**

*Gereç ve Solüsyonlar:*

- 1) Mikrosantrifüj (Eppendorf Mini Spin )
- 2) Thermal Cycler (Eppendorf mastercycler personal )
- 3) 0.2 ml'lik tüp
- 4) Otomatik pipet seti
- 5) Diziye özgül primer
- 6) DNA polimeraz (Roche Fast Start Taq DNA Polymerase, Kat no:12032902001)
- 7) dNTP mix. (Promega,U1511)

*Yöntem:*

- 1) 0.2 ml' lik tüp içerisinde Tablo 3.1'de verilen reaksiyon karışımları hazırlandı. PCR için primer dizileri Tablo 3.2.'de verilmiştir.
- 2) PCR tüpleri "PCR Thermal cycler" cihazına konuldu ve Tablo 3.3' deki PCR programı kullanıldı.

**Tablo 3.1.** Polimeraz zincir reaksiyonu içeriği:

KİMYASAL	EKLENEN MİKTAR	SON KONSANTRASYON
dH <sub>2</sub> O	10.6 µl	
10XPCR tamponu (500mM Tris/HCl, 100mM KCl, 50mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 20mM MgCl <sub>2</sub> )	2.5 µl	1X
MgCl <sub>2</sub> solüsyonu (25mM)	2.5 µl	2.5mM
5' İleri Primer	1 µl	0.4 pmol
3' İleri Primer	1 µl	0.4 pmol
dNTP mix (dATP,dGTP,dCTP,dTTP)	1 µl	200 µM (Herbirinden)
Fast Start Taq DNA Polimeraz	0.4 µl	2U
DNA	1 µl	500 ng
GC zengin solüsyon 5X kons.	5 µl	1X
Total hacim	25 µl	

**Tablo 3.2.** SSCP analizi için kullanılan PCR primerleri:

Primer	Dizi	Ref Sekans	Konumu	PCR ürün büyüklüğü
sFRP1 SSCP S	5'GGAGGTCCCTGGAAGTTTGC 3'	NC000008.9	-88,-69	205 bp
sFRP1 SSCP U	5'GAAGCTCACGTAGTCGTACTIONCGC 3'		+117,+ 95	

**Tablo 3.3.** SSCP için ısı profili:

Denatürasyon	95 °C	5 Dakika	1 döngü
Denatürasyon	95 °C	30 saniye	32 döngü
Bağlanma	55 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	30 saniye	
Son uzama	72 °C	5 Dakika	1 döngü

### 3.5.1.2. Agaroz Jel Elektroforezi:

Örnekler, %2'lik agaroz jelde elektroforeze edilerek büyüklük ve özgül olmayan amplifikasyonlar açısından değerlendirildi. %2 'lik agaroz jel, 2 gram agarozun 100 ml 0,5 X TBE'de çözülmesiyle hazırlandı. Çözülme işlemi ısıtılarak gerçekleştirildi. Çözünen agarozun sıcaklığının düşmesi için kısa süre oda sıcaklığında beklendikten sonra, son konsantrasyonu 0,5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromid eklendi. Hazırlanan jel, jel döküm aparatına dökülerek, kuyuların oluşması için tarak yerleştirildi. Jelin soğuyarak, jelleşme sürecinin tamamlanması için 30 dakika oda sıcaklığında beklendi. Donan jel'den tarak dikkatli biçimde çıkarılarak yüklemenin yapılacağı kuyular elde edildi. Hazırlanan jel içerisinde 0,5XTBE bulunduran elektroforez tankına yerleştirildi.

Elektroforeze edilecek örnekler, 6X jel yükleme tamponu ile karıştırılarak birbirlerine sızma olmayacak biçimde kuyulara yüklendi. 10V/cm gerilim uygulanarak örneklerin elektroforeze olması sağlandı. Örneklerin büyüklüklerinin saptanması için jelde örnekler ile eş zamanlı olarak moleküler ağırlık belirleyici de (Mass Ruler DNA Ladder Low Range MBI Fermentas # SM0383) yürütüldü. Elektroforez sonuçları "Vilber Lourmat INFINITY Bio-1D" sistemi ile görüntülendi.

### 3.5.1.3. Denatüre olmayan %8'lik poliakrilamid jel hazırlanması:

*Gereç ve Solüsyonlar:*

- 1) Üre (SIGMA U-5378)
- 2) Akrilamid /Bisakrilamid solüsyonu (%40, 49:1)( Applichem A3757,0250)
- 3) Amonyum Persülfat çözeltisi (APS)(Applichem, A2941,0100)
- 4) TEMED (SIGMA, T-7024)
- 5) 0.5X TBE (Tris-borik asit-EDTA)(Applichem, 5X TBE Buffer, 6U000177)
- 6) 1mm'lik Spacer
- 7) Vertikal elektroforez camları
- 8) 0.45 mikron por çaplı filtre (CORNING, 431220)
- 9) Syber<sup>®</sup> Green II (AMRESCO, K143)

*Yöntem:*

Jelin içeriği:

*100 ml. hacimde %8'lik jel:*

- 1) 5gr Üre
- 2) 20 ml Akrilamid /Bisakrilamid solüsyonu (%40, 49:1)
- 3) 420 µl % 10' luk Amonyum Persülfat çözeltisi (APS)
- 4) 70 µl TEMED
- 5) 0.5X TBE ile 100 ml'ye tamamlandı.

Jelin Hazırlanışı:

- 1) Jeli dökceğimiz camlar bol su ile temizlendi.
- 2) Camların iç yüzeyleri % 70'lik etil alkol ile bir kez, izopropanol ile üç kez silindi.
- 3) İki cam arasına kalınlığı 1mm olan "Spacer" (aralayıcı) yerleştirilerek kısıkaçlar ile iki cam birbirine tutturuldu.
- 4) Akrilamid /Bisakrilamid solüsyonu ve üre, 0.5X TBE ile 40 ml.'ye tamamlandı. Karıştırıcıda hafif ısıtılarak çözülmesi sağlandı.
- 5) Çözelti, 0.45 mikron por çaplı filtreden geçirildi.
- 6) Jel dökülmeden önce 210 µl Amonyum Persülfat ve 35 µl TEMED eklendi.
- 7) 50 ml'lik enjektör aracılığı ile iki cam arasına hava kabarcığı olmayacak şekilde döküldü ve kuyucukları oluşturan tarak yerleştirildi.
- 8) 60 dakika polimerleşmesi için oda sıcaklığında beklendi.

Örneklerin yüklenmesi:

- 1) Örnek olarak, SSCP PCR'ı sonrası elde edilen PCR ürünleri kullanıldı.
- 2) Tarak jele hasar vermeden çıkarıldı ve kuyular enjektör yardımıyla 0.5 X TBE ile yıkandı.
- 3) Camlar vertikal elektroforez tankına yerleştirildi. Üst ve alt rezervuarlara 0.5 X TBE döküldü.
- 4) Örnekler yüklenmeden önce, jele 1 saat ön yürütme işlemi uygulandı.
- 5) Örnekler 1:1(v/v) oranında %98'lik (w.v) formamidli yükleme tamponu (10mM EDTA,1mg/ml Xylene Cyanol,1mg/ml Bromophenol blue) eklendi ve karışım 95 °C'de 10

dakika inkübe edilerek DNA'ların denatüre olması sağlandı. Ardından hemen buz üzerine alındı.

- 6) Kuyular, örnekler yüklenmeden önce, çöken ürenin uzaklaştırılması için tekrar yıkandı.
- 7) Denatüre edilmiş örneklerden 6 µl jele yüklendi.
- 8) Elektroforez sistemi soğuk odaya yerleştirildikten sonra, jel 25W'da 2 saat yürütüldü.
- 9) Elektroforez tamamlandıktan sonra aralayıcılar çıkarılarak jelin camlardan ayrılması sağlandı.
- 10) Syber Green II ile boyandı.( 200 ml su içerisine 40 µl Syber Green eklenerek kullanıldı.)

Jelin görüntülenmesi:

Jel Vilber Lourtmat Infinity- 1000/26 MX görüntüleme sistemi ile görüntülendi.

### **3.5.2. DNA Dizi Analizi:**

#### **3.5.2.1. DNA Dizi Analizi için Polimeraz Zincir Reaksiyonu:**

*Gereç ve Solüsyonlar:*

- 1) Standart masaüstü mikrosantrifüj
- 2) Thermal Cyclers
- 4) 0,2 ml'lik eppendorf tüp
- 5) Otomatik pipet seti
- 6) Diziye özgül PCR primerleri
- 7) Taq DNA polimeraz (Roche Fast Start Taq DNA Polymerase, Kat no:12032902001)
- 8) dNTP mix. (Promega,U1511)

*Yöntem:*

- 1) 0.2 ml' lik tüp içerisinde Tablo 3.4'de verilen reaksiyon karışımları hazırlandı. PCR için primer dizileri Tablo 3.5.'de verilmiştir.
- 2) PCR tüpleri "PCR Thermal Cycler" cihazına konuldu ve Tablo 3.6' daki PCR programı kullanıldı.

**Tablo 3.4.** Polimeraz zincir reaksiyonu içeriği:

<b>KİMYASAL</b>	<b>EKLENEN MİKTAR</b>	<b>SON KONSANTRASYON</b>
dH <sub>2</sub> O	10.6 µl	
10XPCR tamponu (500mM Tris/HCl, 100mM KCl, 50mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 20mM MgCl <sub>2</sub> )	2.5 µl	1X
MgCl <sub>2</sub> solüsyonu (25mM)	2.5 µl	2.5 mM
5' İleri Primer	1 µl	0.4 pmol
3' Geri Primer	1 µl	0.4 pmol
dNTP mix (dATP,dGTP,dCTP,dTTP)	1 µl	200µM (Her birinden)
Fast Start Taq DNA Polimeraz	0.4 µl	2U
DNA	1 µl	500 ng
GC zengin solüsyon 5X kons.	5 µl	1X
Total hacim	25 µl	

**Tablo 3.5.** DNA Dizi Analizi için kullanılan PCR primerleri:

<b>Primer</b>	<b>Dizi</b>	<b>Ref Gen</b>	<b>Konumu</b>	<b>PCR ürün büyüklüğü</b>
sFRP-1 Seq S	5'GTGACGGACGTGGTAACGAGTG3'	NC 000008.9	-403,-382	646 bp
sFRP-1 Seq U	5'CAGGTTGGGCAGCACCATCTTC3'		+243,+222	



**Tablo 3.6.** DNA Dizi Analizi için ısı profili:

Denatürasyon	95 °C	5 Dakika	1 döngü
Denatürasyon	95 °C	40 saniye	35 döngü
Bağlanma	61 °C	40 saniye	
Uzama	72 °C	40 saniye	
Son uzama	72 °C	5 Dakika	1 döngü

### 3.5.2.2. Agaroz Jel Elektroforezi:

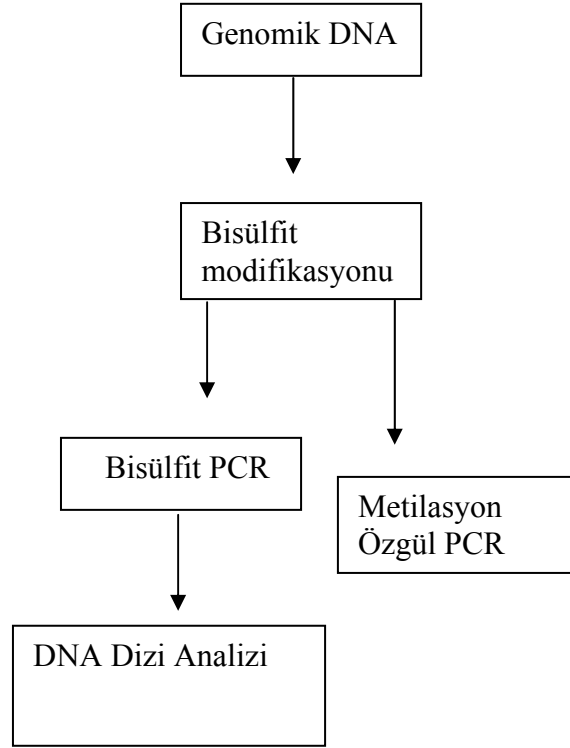
3.5.1.2. bölümünde anlatıldığı şekilde hazırlanmış olan agaroz jelde, örnekler yürütülerek büyüklük ve özgül olmayan amplifikasyonlar açısından kontrol edildi.

### 3.5.2.3. DNA dizilerinin analiz edilmesi:

DNA dizisindeki değişiklikleri test etmek için, PCR primerleri ile sınırlandırdığımız DNA bölgesinin dizi analizi, Güney Kore “Macrogen” firmasında hizmet alımı olarak yaptırıldı. Örnekler PCR için dizayn ettiğimiz primerler kullanılarak iki yönlü olarak okutturuldu. Elde edilen sonuçlar, Chromas (Ver.1.41) programı kullanılarak analiz edildi.

## 3.6. sFRP1 GENİNİN PROMOTÖR BÖLGESİNDEKİ EPİGENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN SAPTANMASI:

sFRP1 geni promotör bölgesini genetik değişiklikler açısından araştırdıktan sonra, aynı bölgedeki olası epigenetik değişikliklerin varlığını da analiz ettik. Bu amaçla, hasta, normal birey örneklerinden ve hücre hatlarından elde edilen genomik DNA kullanıldı. Bu süreçteki temel nokta, genomik DNA'nın metilasyon analizini yapabilmemize olanak tanıyacak biçimde modifiye edilmesidir. Modifikasyon işlemi sonrasında hedef bölgenin metilasyon analizi aşağıdaki şemada gösterildiği biçimde gerçekleştirildi.



sFRP1 geni (NCBI, Ref Seq: NC 000008.9) için olası promotör bölgesi “Promotor 2.0” programı ile saptanmıştır. Bu bölgeye özgöl primerlerin dizaynı için “Oligos v.9.4” programından yararlanılmıştır.

### 3.6.1. Bisülfıt DNA Modifikasyonu:

İzole edilen DNA’lar epigenetik çalışmalar için, “Active Motif Methyl Detector Bisülfıt Modifikasyon Kiti” aracılığı ile modifiye edildi.

*Gereç ve Solüsyonlar:*

- 1) Standart masa üstü mikrosantrifüj
- 2) Active motif Methyl Detector Bisülfıt Modifikasyon Kiti
- 3) 0,2 ve 1,5 ml ’lik mikrosantrifüj tüpleri
- 4) Vortex
- 5) Standart masaüstü mikrosantrifüj
- 6) Thermal Cycler
- 7) 0,2 ml’lik tüp

## 8) Otomatik pipet seti

### *Kit içeriği:*

- 1) Dönüşüm solüsyonu
- 2) Denatürasyon solüsyonu
- 3) Hydroquinone
- 4) Tampon A
- 5) Tampon B
- 6) DNA bağlama tamponu
- 7) DNA yıkama tamponu
- 8) DNA elüsyon tamponu
- 9) DNA pürifikasyon tamponu
- 10) P16 kontrol primerleri
- 11) 10X PCR tamponu

### *Yöntem:*

#### 1.Aşama:

1) Dönüşüm solüsyonu ve Hydroquinone üretici firmanın belirttiği şekilde hazırlandı.

#### Dönüşüm solüsyonu:

Dönüşüm solüsyonunu hazırlamak için, liyofilize haldeki dönüşüm solüsyonu tüpünün içerisine ;

—700 µl dH<sub>2</sub>O

—350 µl Solüsyon A

—175 µl Denatürasyon ajanı eklendi.10 dakika oda sıcaklığında belli aralıklara vortekslendi.

#### Hydroquinone:

On dönüşüm reaksiyonu için, bir tüp liyofilize Hydroquinone tüpünün içerisine 100 µl dH<sub>2</sub>O eklenerek solüsyon hazırlandı.

2) Modifiye edilecek olan DNA örnekleri 500 ng olacak şekilde dilüe edildi.

3) PCR tüpü içerisine Tablo 3.7' deki ajanlar eklenerek her örnek için dönüşüm reaksiyonu karışımı hazırlandı.

**Tablo 3.7.** Dönüşüm reaksiyonu içeriği:

<b>KİMYASAL</b>	<b>1 REAKSİYON İÇİN</b>
DNA	13 µl (Toplam 500 ng )
dH <sub>2</sub> O	-
Hydroquinone	7 µl
Dönüşüm solüsyonu	120 µl
Total hacim	140 µl

4) Reaksiyon karışımını içeren tüp “Thermal cycler ”a yerleştirildi. Tablo 3.8’de belirtilen reaksiyon profili uygulandı:

**Tablo 3.8.** Dönüşüm için ısı profili:

Başlangıç sıcaklığı	94 °C	3 Dakika
Dönüşüm için	50 °C	9 Saat
Soğuma	4°C	.....

5) Reaksiyon sonrasında tüp çıkarıldı ve DNA örneği + 4 °C ‘de karanlık ortamda saklandı.

### 2.Aşama:

#### Desülfonasyon ve DNA pürifikasyonu:

1) Tablo 3.9’da verildiği biçimde desülfonasyon solüsyonu hazırlandı.

**Tablo 3.9.** Desülfonasyon solüsyonu içeriği:

<b>KİMYASAL</b>	<b>1 REAKSİYON İÇİN</b>
Solüsyon B	22 µl
dH <sub>2</sub> O	88 µl
% 100 İzopropanol	110 µl

- 2) Her dönüşüm reaksiyonu için, 1,5 ml tüp içerisine 500 µl DNA bağlama solüsyonu ve birinci aşamada elde edilen dönüşüm reaksiyonu karışımı eklendi ve vortekslendi.
- 3) DNA pürifikasyon kolonu toplama tüpüne yerleştirildi.
- 4) Karışım kolona eklendi ve 10.000 rpm’de 30 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpüne geçen sıvı atıldı.
- 5) Kolona 200 µl DNA yıkama solüsyonu eklendi ve 10.000 rpm’de 30 saniye santrifüj edildi.
- 6) 200 µl desülfonasyon solüsyonu eklendi. Oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi.
- 7) 10.000 rpm’de 30 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpüne geçen sıvı atıldı.
- 8) 200 µl DNA yıkama solüsyonu eklendi ve 10.000 rpm’de 30 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpüne geçen sıvı atıldı. Kolon çıkarıldı ve yeni 1,5 ml’lik tüpe yerleştirildi.
- 9) 50 µl DNA elüsyon solüsyonu eklendi. 3 dakika oda sıcaklığında 10.000 rpm’de 30 saniye santrifüj edildi. Böylece modifiye edilmiş olan DNA, kalıp olarak metilasyon özgül PCR için kullanılacak biçimde elde edilmiş oldu.

### 3.Aşama :

Kit içeriğindeki pozitif kontrol olan P16 primerleri kullanılarak dönüşüm reaksiyonunun gerçekleşip gerçekleşmediği kontrol edildi.

### 3.6.2. Metilasyon Özgül Polimeraz Zincir Reaksiyonu (MS-PCR)

#### 3.6.2.1. Metilasyon Özgül PCR'ın hazırlanışı:

*Gereç ve Solüsyonlar:*

- 1) Mikrosantrifüj
- 2) Thermal Cyclers
- 3) DNA polimeraz
- 4) 0,2 ml'lik ependorf tüp
- 5) Otomatik pipet seti
- 6) Diziyeye özgül primer
- 7) dNTP mix

*Yöntem:*

- 1) 0.2 ml 'lik tüp içerisinde Tablo 3.10'da verilen reaksiyon karışımı hazırlandı.
- 2) Metile ve metile olmayan PCR primerleri kullanılarak aynı DNA kalıplarından iki ayrı PCR reaksiyon kuruldu. PCR için primer dizileri Tablo 3.11.'de verilmiştir.
- 3) PCR tüpleri "Thermal cyclers" cihazına konuldu ve Tablo 3.12'deki PCR programı kullanıldı.

**Tablo 3.10.** Metilasyon özgül PCR reaksiyon içeriği:

<b>KİMYASAL</b>	<b>EKLENEN MİKTAR</b>	<b>SON KONSANTRASYON</b>
dH <sub>2</sub> O	8.6 µl	
10XPCR tamponu (500mM Tris/HCl, 100mM KCl, 50mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 20mM MgCl <sub>2</sub> )	2.5 µl	1X
MgCl <sub>2</sub> solüsyonu (25mM)	2.5 µl	2.5 mM
5' ileri Primer	1 µl	0.4 pmol
3' geri Primer	1 µl	0.4 pmol
dNTP mix (dATP,dGTP,dCTP,dTTP)	1 µl	200 µM
Fast Start Taq DNA Polimeraz	0.4 µl	2U
Dönüştürülmüş DNA	4 µl	500 ng
GC zengin solüsyon 5X kons.	5 µl	1X
Total hacim	25 µl	

**Tablo 3.11.** Metile, metile olmayan PCR için kullanılan PCR primerleri (26):

<b>Primer</b>	<b>Dizi</b>	<b>Konumu</b>	<b>PCR ürün büyüklüğü</b>
sFRP-1 Met S	5'TGTAGTTTTTCGGAGTTAGTGTGCGGC3'	-300, -275	126 bç
sFRP-1 Met U	5'CCTACGATCGAAAACGACGCGAACG3'	-161,-185	
sFRP-1 Unmet S	5'GTTTTGTAGTTTTTGGAGTTAGTGTGTGT3'	-304, -275	126 bç
sFRP-1 Unmet U	5'CTCAACCTACAATCAAAAACAACACAAACA3'	-156,-185	

**Tablo 3.12.** Metilasyon Özgül PCR (Metile, metile olmayan ) reaksiyon ısı profili:

Denatürasyon	95 °C	5 Dakika	1 döngü
Denatürasyon	95 °C	45 saniye	35 döngü
Bağlanma	59 °C	45 saniye	
Uzama	72 °C	45 saniye	
Son uzama	72 °C	5 Dakika	1 döngü

### 3.6.2.2. Agaroz Jel Elektroforezi:

Örnekler, %4'lük nusieve agaroz jelde elektroforeze edildi. %4 'lük nusieve agaroz jel, 2 gram nusieve agaroz ve 2 gram agarozun 100 ml 0,5 X TBE'de çözülmesiyle hazırlandı. Çözülme işlemi ısıtılarak gerçekleştirildi. Çözünen agarozun sıcaklığının düşmesi için kısa süre oda sıcaklığında beklendikten sonra, son konsantrasyonu 0,5 µg/ml olacak şekilde etidyum bromid eklendi. Hazırlanan jel, jel döküm aparatına dökülerek, kuyuların oluşması için tarak yerleştirildi. Jelin soğuyarak, jelleşme sürecinin tamamlanması için 30 dakika oda sıcaklığında beklendi. Donan jel'den tarak dikkatli biçimde çıkarılarak yüklemenin yapılacağı kuyular elde edildi. Hazırlanan jel içerisinde 0,5X TBE bulunduran elektroforez tankına yerleştirildi.

Elektroforeze edilecek örnekler 6X jel yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra, aynı örneğe ait metile ve metile olmayan primerler kullanılarak elde edilen PCR ürünleri yan yana olacak şekilde kuyulara yüklendi. 10 V/cm gerilim uygulanarak örneklerin elektroforeze olması sağlandı. Örneklerin büyüklüklerinin saptanması için jelde örnekler ile eş zamanlı olarak moleküler ağırlık belirleyici de (Mass Ruler DNA Ladder Low Range MBI Fermentas # SM0383) yürütüldü. Elektroforez sonuçları "Vilber Lourmat INFINITY Bio-1D " sistemi ile görüntülendi.

### 3.6.3. Bisülfid Polimeraz Zincir Reaksiyonu:

#### 3.6.3.1. Bisülfid PCR'ın hazırlanışı:

*Gereç ve Solüsyonlar:*

- 1) Mikrosantrifüj
- 2) Thermal Cyclers



- 3) DNA polimeraz
- 4) 0.2 ml'lik ependorf tüp
- 5) Otomatik pipet seti
- 6) Diziyeye özgül primer
- 7) dNTP mix

*Yöntem:*

- 1) 0,2 ml 'lik tüp içerisinde Tablo 3.13'de verilen reaksiyon karışımı hazırlandı. PCR için primer dizileri Tablo 3.14.'de verilmiştir.
- 2) PCR tüpleri "PCR Thermal Cycler" cihazına konuldu ve Tablo 3.15'deki PCR programı kullanıldı.

**Tablo 3.13.** Bisülfite PCR reaksiyon içeriği:

<b>KİMYASAL</b>	<b>EKLENEN MİKTAR</b>	<b>SON KONSANTRASYON</b>
dH <sub>2</sub> O	8.6 µl	
10XPCR tamponu (500mM Tris/HCl, 100mM KCl, 50mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 20mM MgCl <sub>2</sub> )	2.5 µl	1X
MgCl <sub>2</sub> solüsyonu (25mM)	2.5 µl	2.5 mM
5' ileri Primer	1 µl	0.4 pmol
3' geri Primer	1 µl	0.4 pmol
dNTP mix (dATP,dGTP,dCTP,dTTP)	1 µl	200 µM (Herbirinden)
Fast Start Taq DNA Polimeraz	0.4 µl	2U
Modifiye edilmiş DNA	4 µl	500 ng
GC zengin solüsyon 5X kons.	5 µl	1X
Total hacim	25 µl	

**Tablo 3.14.** Bisülfid PCR için kullanılan PCR primerleri (26):

Primer	Dizi	Konumu	PCR ürün büyüklüğü
sFRP-1Bis S	5'TGGTTTTGTTTTTTAAGGGGTGTTGAGT3'	-490,-463	429 bç
sFRP-1Bis U	5'TCCTACCACAAACTTCCAAAAACCTCC 3'	-63, -88	

**Tablo 3.15.** Bisülfid PCR reaksiyon ısı profili:

Denatürasyon	95 °C	5 Dakika	1 döngü
Denatürasyon	95 °C	45 saniye	35 döngü
Bağlanma	60 °C	45 saniye	
Uzama	72 °C	45 saniye	
Son uzama	72 °C	5 Dakika	1 döngü

### 3.6.3.2. Agaroz Jel Elektrofrez:

3.5.1.2. bölümünde anlatıldığı şekilde hazırlanmış olan agaroz jelde örnekler yürütülerek büyüklük ve özgül olmayan amplifikasyonlar açısından kontrol edildi.

### 3.6.4. DNA Dizi Analizi:

DNA dizi analizi için, bisülfid primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılan DNA Bölgeleri, Güney Kore “Macrogen” firmasına analiz için gönderildi. Bu işlem “Hizmet Alımı” şeklinde yapıldı.

### 3.6.5. K562 hücrelerinin demetile edici ajan ile muamelesi sonrası metilasyon düzeyindeki değişikliklerin saptanması:

K562 hücrelerine, demetile edici ajan olan 5-aza-2-deoxycytidine (DAC) (Sigma-SIA3656) verilerek metilasyon düzeyinde değişiklik oluşturulmaya çalışıldı. Oluşan değişikliğe bağlı olarak sFRP1 ekspresyonu analiz edildi.

K562 hücreleri,  $5 \times 10^5$  hücre/ kuyu olacak şekilde üretildi. Hücreler 24. saatte ortamları değiştirilerek, DNA metilasyonunu bloklamak için  $1 \mu\text{M}$  and  $5 \mu\text{M}$  olacak şekilde iki

farklı konsantrasyonda DAC ile muamele edildi. 48 saatlik inkübasyondan sonra hücreler PBS ile yıkandı. Bu hücrelerden genomik DNA izolasyonu yapıldıktan sonra, bisülfid modifikasyonları gerçekleştirildi. Hem metilasyon özgül PCR hem de bisülfid PCR yöntemi ile metilasyon durumları saptandı.

### **3.7. SFRP1 GEN İFADESİNİN ANALİZİ**

#### **3.7.1. Total RNA izolasyonu:**

Total RNA izolasyonu, hasta ile normal kemik iliği örneklerinden ve hücre hatlarından “QIAamp RNeasy Blood mini kit “ kullanılarak yapılmıştır. Yöntem üretici firmanın belirttiği şekilde uygulanmıştır.

*Gereç ve Solüsyonlar:*

- 1) Standart masaüstü mikrosantrifüj
- 2) 1.5 ml 'lik mikrosantrifüj tüpleri
- 3) 15 ml 'lik tüpler
- 4) PBS (pH 7.2, 50mM potasyum fosfat; 150 mM NaCl)
- 5) Etil alkol (%96-100)
- 6) Etil alkol (%70)
- 7) 14.5 M  $\beta$ -merkaptoethanol
- 8) Su banyosu
- 9) Vortex
- 10) DNase I enzimi (Qiagen # 79254)
- 11) “QIAamp RNeasy Blood mini kit “ (Qiagen # 52304)

*Kit içeriği:*

- 2 ml'lik toplama tüpleri
- 1.5 ml'lik toplama tüpleri
- EL lizis tamponu
- RLT lizis tamponu
- RW1 yıkama tamponu

- RPE yıkama tamponu
- QIAmp döndürme kolonu
- QIAshredder döndürme kolonu
- RNase free su

*Yöntem:*

Çalışma tamponlarının hazırlanması:

Çalışmada kullanılacak tamponlar, üretici firma talimatları doğrultusunda hazırlandı. RPE tamponunun içerisine 44 ml %96-100 etil alkol eklendi. RLT tamponunun içerisine, her 1 ml RLT tamponu için 10µl olacak şekilde β-merkapt ethanol eklendi.

*Total RNA izolasyonu:*

1)

- Materyal olarak kemik iliği kullanıldığında, izole edilecek olan RNA için;

a-600 µl kemik iliği ile 3ml EL tamponu (1/5 oranında ) karıştırıldı.

b-Buz üzerinde 10-15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresince iki defa vortekslendi.

c-400 g'de 10 dakika + 4 °C'de santrifüj edildi ve süpernatant kısmı tamamen uzaklaştırıldı.

d-Pelletin üzerine 1200 µl (başlangıçtaki kemik iliği miktarının 2 katı) EL eritrosit lizis solüsyonu eklendi. Vortekslenerek hücreler tekrar çözüldü.

e-400g'de 10 dakika + 4 °C'de santrifüj edildi ve üst faz tamamen uzaklaştırıldı.

- Materyal olarak hücre hatları kullanıldığında, izole edilecek olan RNA için;

a-Maksimum  $1 \times 10^7$  hücre içeren kültür, 5 dakika 300 g'de santrifüj edildi.

b- Pellet, 200 µl PBS'de tekrar çözüldü.

c-5 dakika 300 g'de santrifüj edildi. Üst faz tamamen uzaklaştırıldı.

Bu aşamadan sonraki basamaklar her iki materyal için ortaktır.

2) Birinci basamakta hazırlanan ve içerisinde hücre çökeltisi bulunan 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerinin içerisine 600 µl RLT lizis solüsyonu eklendi, vortekslendi ve lizat hazırlandı.

3) 2 ml 'lik toplama tüpüne "QIA shredder" döndürme kolonu yerleştirildi ve lizat tüpe aktarıldı. İki dakika maksimum devirde santrifüj edildi. Kolon çıkarıldı ve homojenize lizat saklandı.

- 4) Lizatın üzerine 1 :1 oranında %70 etil alkol eklendi ve pipetleyerek homojenize edildi.
- 5) Bu karışım yeni bir “QIAamp” döndürme kolonuna aktarıldı.
- 6) 15 saniye 8000 g’de santrifüj edildi. Toplama tüpü, alta geçen karışım ile birlikte atıldı.
- 7) Kolon yeni bir 2 ml ’lik toplama tüpüne aktarıldı.350 µl RW1 yıkama tamponu eklenerek 15 saniye 8000 g’de santrifüj edildi. Toplama tüpü alta geçen karışım ile birlikte atıldı.
- 8) 10 µl DNase I stok solüsyonu (1500 unit), 70 µl RDD tamponuna eklendi. Tüp alt üst edilerek karışması sağlandı.
- 9) DNase I inkübasyon karışımı (80 µl) direk kolonun üzerine eklendi ve 15 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- 10) 350 µl RW1 yıkama tamponu eklenerek 15 saniye 8000 g’de santrifüj edildi. Alta geçen karışım atıldı.
- 11) 500 µl RPE yıkama tamponu eklenerek 15 saniye 8000 g’de santrifüj edildi. Alta geçen karışım atıldı.
- 12) 500 µl RPE yıkama tamponu eklenerek 3 dakika 20000 g’de santrifüj edildi. Toplama tüpü alta geçen karışım ile birlikte atıldı.
- 13) Kolon 2 ml’lik yeni toplama tüpüne yerleştirilerek 1dakika maksimum hızda çevrildi.
- 14) Kolon 1.5 ml’lik yeni ependorfa yerleştirildi ve firma tarafından sağlanan 30 µl RNase içermeyen su eklendi. 8000 g’de 1 dakika santrifüj edildi.

#### *RNA miktar tayini:*

İzole edilen total RNA’ların, spektrofotometrede (Pharmacia Biotech, Ultraspec 2000) 260 ve 280 nm’de absorpsiyonları ölçüldü. Aşağıda belirtilen formül kullanılarak RNA konsantrasyonu hesaplandı:

$$\text{RNA konsantrasyonu: } A_{260} \times \text{Dilüsyon Faktörü} \times 40\mu\text{g/ml}$$

$A_{260} / A_{280}$  hesaplanarak RNA’nın saflık derecesinin 1.8-2.0 arasında olup olmadığı kontrol edildi.

#### **3.7.2. Komplementer DNA (cDNA) eldesi:**

İzole edilen total RNA’lardan 2µg cDNA sentezinde kalıp olarak kullanıldı. cDNA sentezinde Reverse Transkripsiyon kiti (Invitrogen Superscript First Strand Synthesis kit, Invitrogen #11904-018 ) kullanıldı. Üretici firmanın belirttiği protokol, 50 µl cDNA elde edilecek şekilde modifiye edildi.

*Gereç ve Solüsyonlar:*

- 1) Standart masaüstü mikrosantrifüj
- 2) Thermal Cyclers
- 3) 0.2 ml'lik ependorf tüp
- 4) Otomatik pipet seti
- 5) Invitrogen Superscript First Strand Synthesis kit, Invitrogen #11904-018

*Kit içeriği:*

- 1) Süperscript II RT
- 2) 10mM dNTP mix
- 3) Oligo dT
- 4) DEPC 'li su
- 5) 10X RT tamponu
- 6) 25 mM MgCl<sub>2</sub>
- 7) 0,1 M DTT
- 8) RNaseOUT (Rekombinant Ribonükleaz İnhibitör)

*Yöntem:*

- 1) 0.2 ml 'lik tüp içerisinde Tablo 3.16'da verilen birinci reaksiyon karışımı hazırlandı.

**Tablo 3.16.** cDNA sentezi Karışım I reaksiyon içeriği:

<b>KİMYASAL</b>	<b>EKLENEN MİKTAR</b>	<b>SON KONSANTRASYON</b>
Total RNA	7.5 µl	2 µg
10mM dNTP mix	2 µl	0.4 mM
Oligo dT (0.5 µg/µl)	1 µl	0.01 µg
DEPC 'li su	9.5 µl	
Total hacim	20 µl	

2) 65 °C’de 5 dakika inkübe edildi ve hemen buz üzerine alındı. En az bir dakika buz üzerinde bekletildi. Tablo 3.17’de verilen ikinci reaksiyon karışımı hazırlandı.

**Tablo 3.17.** cDNA sentezi Karışım II reaksiyon içeriği:

<b>KİMYASAL</b>	<b>EKLENEN MİKTAR</b>	<b>SON KONSANTRASYON</b>
10X RT tamponu	5 µl	1 X
25 mM MgCl <sub>2</sub>	10 µl	5mM
0.1 M DTT	5 µl	0.01M
RNaseOUT (40unit/ µl)	1 µl	0.8 unit
DEPC ‘li su	9 µl	
Total hacim	30 µl	

- 4) 42 °C’de 2 dakika inkübe edildi.
- 5) 1 µl Süperscript II Reverse Transkriptaz eklendi.
- 6) 42 °C’de 50 dakika inkübe edildi.
- 7) 70 °C’de 15 dakika ile reaksiyon sonlandırıldı.
- 8) 1 µl RNase H eklendi.
- 9) 37 °C’de 20 dakika inkübe edildi.
- 10) Elde edilen cDNA -20 °C’de saklandı.

### **3.7.3. Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR):**

Elde edilen cDNA’lar kalıp olarak kullanılarak öncül primerler aracılığı ile PCR reaksiyonu kuruldu. sFRP1, NCBI NM\_003012 referans dizisi kullanılarak “Oligos v 9.4 “ programı yardımı ile primerler dizayn edildi. Kontrol olarak da β-Aktin genine özgül primerler kullanıldı. Gerçek zamanlı PCR, Light Cycler ® 2.0 (Roche Diagnostics) cihazı ve Light Cycler Fast Start DNA Master <sup>PLUS</sup> SYBR Green 1 (Roche Diagnostics) kiti kullanılarak yapıldı.

*Yöntem:*

- 1) 0,2 ml 'lik tüp içerisinde Tablo 3.18'de verilen reaksiyon karışımı hazırlandı. PCR için primer dizileri Tablo 3.19 ve 3.20'de verilmiştir.
- 2) PCR tüpleri "PCR Light Cycler ® 2.0 (Roche Diagnostics)" cihazına konuldu ve Tablo 3.21'deki PCR programı kullanıldı.

**Tablo 3.18.** RT-PCR reaksiyon içeriği:

<b>KİMYASAL</b>	<b>EKLENEN MİKTAR</b>	<b>SON KONSANTRASYON</b>
SYBR Green reaksiyon karışımı	2 µl	
5' ileri Primer	1 µl	0.5 pmol
3' geri Primer	1 µl	0.5 pmol
cDNA	5 µl	
dH <sub>2</sub> O	5 µl	
Total	20 µl	

**Tablo 3.19.** sFRP1 ekspresyon analizi için kullanılan PCR primerleri:

<b>Primer</b>	<b>Dizi</b>	<b>Ref Gen</b>	<b>Konumu</b>	<b>PCR ürün büyüklüğü</b>
sFRP1 Exp S	5'CAAGAAGAAGAAGCCCCTGA3'	NM_003012	983, 1002	123 bç
sFRP1 Exp U	5'AAGTGGTGGCTGAGGTTGTC3'		1086, 1105	

**Tablo 3.20.** β-aktin ekspresyonu analizi için kullanılan PCR primerleri:

<b>Primer</b>	<b>Dizi</b>	<b>Ref Gen</b>	<b>Konumu</b>	<b>PCR ürün büyüklüğü</b>
Bactin S	5'CAAGAAGAAGAAGCCCCTGA3'	NM_003012	983, 1002	205 bç
Bactin U	5'AAGTGGTGGCTGAGGTTGTC 3'		1086, 1105	



**Tablo 3.21.** RT-PCR için ısı profili:

Denatürasyon	95 °C	10 Dakika	1 döngü
Denatürasyon	95 °C	10 saniye	40 döngü
Bağlanma	59 °C	5 saniye	
Uzama	72 °C	10 saniye	
Son uzama	72 °C	5 Dakika	1 döngü

4) Flouresan ölçümü, Light Cyler Software 4.0.0.23 (Roche Diagnostic) tarafından yapıldı.

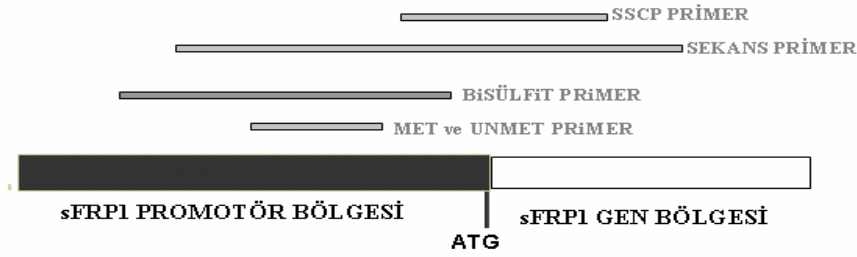
5) Örnekler %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek büyüklük ve özgül olmayan amplifikasyonlar açısından kontrol edildi.

#### **3.7.4. Agaroz Jel Elektroforezi**

3.5.1.2. bölümünde anlatıldığı şekilde hazırlanmış olan agaroz jelde örnekler yürütülerek büyüklük ve özgül olmayan amplifikasyonlar açısından kontrol edildi.

## 4. BULGULAR

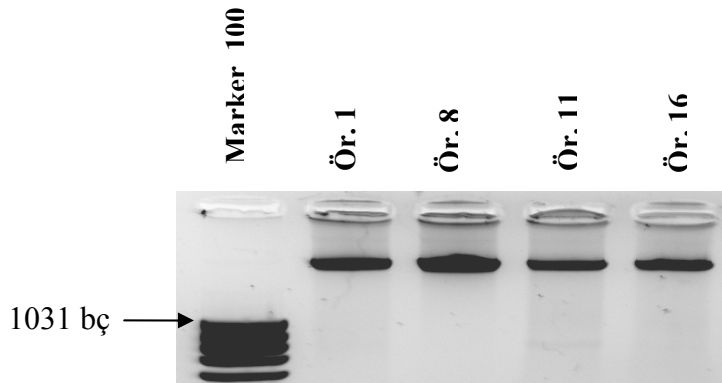
sFRP1 geninin promotör bölgesindeki genetik ve epigenetik değişikliklerin analizi için, SSCP, DNA dizi analizi ve metilasyon analizleri (metilasyon özgül PCR, bisülfite DNA dizi analizi) gerçekleştirildi. Kullanılan her yöntem için incelediğimiz DNA bölgesi primerleri ile sFRP1 geninin promotör bölgesine ait çakışma noktaları Şekil 4.1’ de verilmiştir.



Şekil 4.1. sFRP1 geni promotör bölgesi ile genetik ve epigenetik değişikliklerin analizi için kullanılan primerlerin çakışma noktaları.

### 4.1. DNA İZOLASYONU

Kontrol hücre hatları, hasta ve normal kemik iliği örneklerinden genomik DNA izole edildikten sonra, 260/280 nanometrede spektrofotometrede değerlendirmeleri yapıldı, örneklerin 260/280 nm.’de optik dansite oranı yaklaşık 1.8 bulundu. Genomik DNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi sonrasında, bütünlüklerini korudukları saptandı (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. DNA örneklerinin %1’lik agaroz jeldeki görüntüsü.(Marker; Mass Ruler DNA Ladder Low Range, Fermentas SM0383’tür.)

## 4.2. sFRP1 GENİNİN PROMOTÖR BÖLGESİNDEKİ GENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN SAPTANMASI

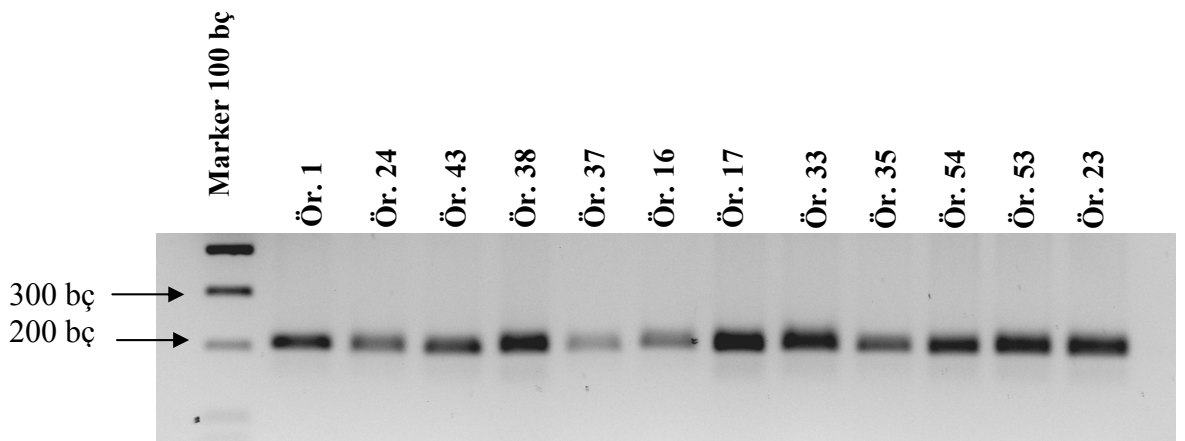
### 4.2.1. Tek Zincir Konformasyon Polimorfizm Analizi (Single Strand Conformation Polymorphism-SSCP) analizi:

SSCP analizi, denatüre edici olmayan şartlar altında tek zincir DNA molekülündeki bir veya çoklu nükleotid değişikliklerini saptayan bir yöntemdir. Poliakrilamid jel elektroforezi sonrasında, nükleotid değişimlerinin elektroforetik hareketi değiştirmesi ile normale göre olan farklılıklar saptanmaktadır.

sFRP1 promotör bölgesinde olası genetik değişiklikleri saptamak amacı ile yapmış olduğumuz SSCP analizinde; hastalar, normal kemik iliği örnekleri ve K562, SKBR3, MDA-MB231, HEK-293 hücre hatlarından elde edilen genomik DNA kalıp olarak kullanılarak PCR reaksiyonu kuruldu. PCR ürünleri, denatüre olmayan %8'lik poliakrilamid jelde yürütülerek değerlendirildi.

#### 4.2.1.1. PCR reaksiyonu:

sFRP1 promotör bölgesinin çoğaltılması amacı ile “*sFRP1-SSCP*” primer çifti kullanılarak PCR reaksiyonu kuruldu. Reaksiyon sonrasında elde edilen PCR ürünleri, amplifikasyon varlığı ve büyüklük açısından kontrol için %2'lik agaroz jelde yürütüldü (Şekil 4.3).

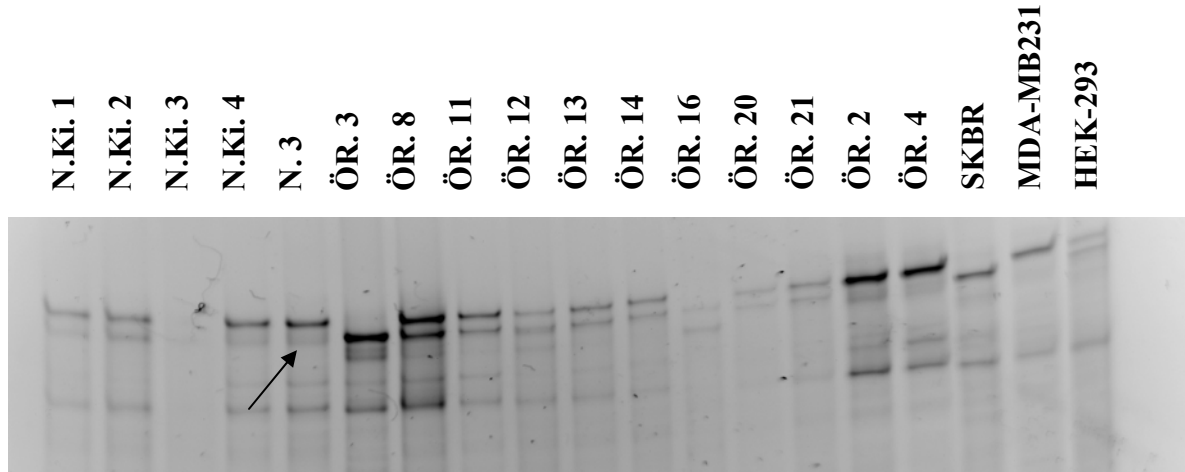


Şekil 4.3. PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. PCR ürünlerinin büyüklüğü 205 bç'dir.(Marker; Mass Ruler DNA Ladder Low Range, Fermentas SM0383'tür.)

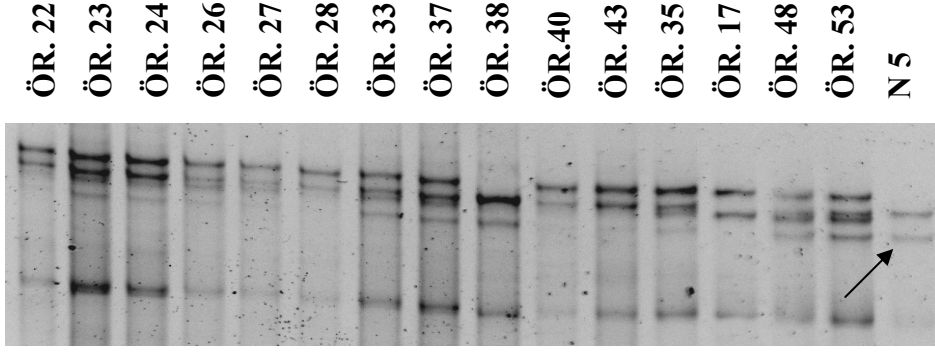
#### 4.2.1.2. SSCP poliakrilamid jel elektroforezi :

Her tek iplikli DNA molekülü, birincil yapıyı oluşturan bazların dizilim özelliği nedeniyle özgül bir konformasyona sahiptir. Birbiri ile aynı uzunlukta ve baz dizisi açısından benzer olan iki DNA ipliği, tek zincirli hale getirildiğinde tek bazdan kaynaklanan konformasyon farklılığı ortaya çıkmaktadır. Bu fark DNA dizi analizi özelliğinde poliakrilamid jel ile belirlenebilir. SSCP değerlendirmesi, farklı konformasyonların jelde farklı bant desenleri vermesi temeline dayanır.

4.2.1.1.bölümünde elde edilmiş olan PCR ürünleri denatüre edilip, denatüre olmayan %8'lik poliakrilamid jelde yürütüldü (Şekil 4.4 ve Şekil 4.5). Hastalara ait örnekler, normal bireylerden elde edilen örneklere göre değerlendirildi. Elektroforez sonrası gözlenen bant desenlerindeki değişiklikler yorumlandı. 24 KML hastasında ve HEK-293 ve SKBR hücre hatlarında normalden farklı bant deseni gözlemlendi. SSCP analizi sonuçlarının, DNA dizi analizi sonuçları ile kıyaslandığında paralellik gösterdiği saptandı. Elde edilen SSCP analiz sonuçları, DNA dizi analizi sonuçları ile birlikte Tablo 4.1 'de verilmiştir.



Şekil 4.4. Denatüre olmayan %8'lik poliakrilamid jelde yürütülen PCR ürünlerinin görüntüsü.



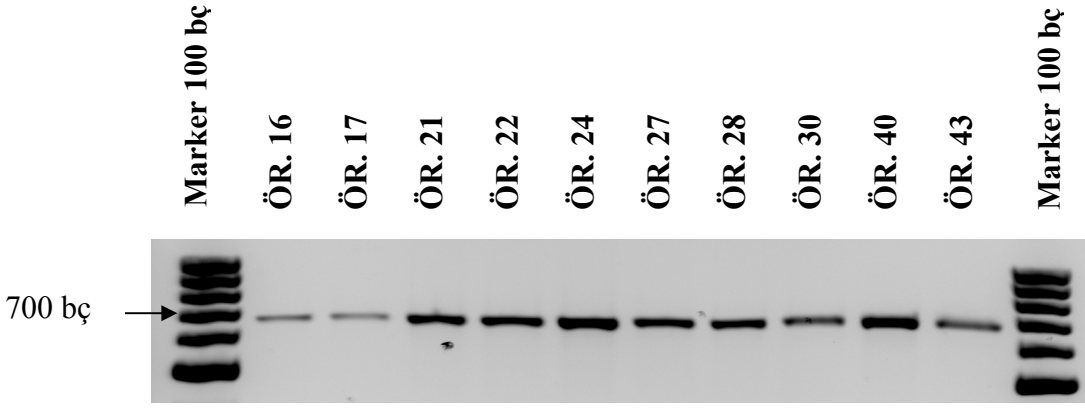
**Şekil 4.5.** Denatüre olmayan %8'lik poliakrilamid jelde yürütülen PCR ürünlerinin görüntüsü.

#### **4.2.2. DNA Dizi Analizi:**

sFRP1 promotör bölgesinde olası genetik değişiklikleri saptamak amacı ile hastalar, normal kemik iliği örnekleri ve K562, SKBR3, MDA-MB231, HEK-293 hücre hatlarından elde edilen genomik DNA kalıp olarak kullanıldı. Analiz edilecek bölge, özgül PCR primerleri ile çoğaltıldı ve PCR ürünlerinden DNA dizi analizi gerçekleştirildi. DNA dizi analizi, “Macrogen“ firmasında hizmet alımı olarak gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar, “Chromas (Ver.1.41)” programı kullanılarak analiz edildi.

##### **4.2.2.1. DNA analizi amacı ile yapılan PCR reaksiyonu:**

PCR işleminde “sFRP1-Sequence” primerleri kullanılmıştır. PCR ürünlerinin %2 agaroz jel elektroforezi sonrası görüntüsü Şekil 4.6' da verilmiştir.



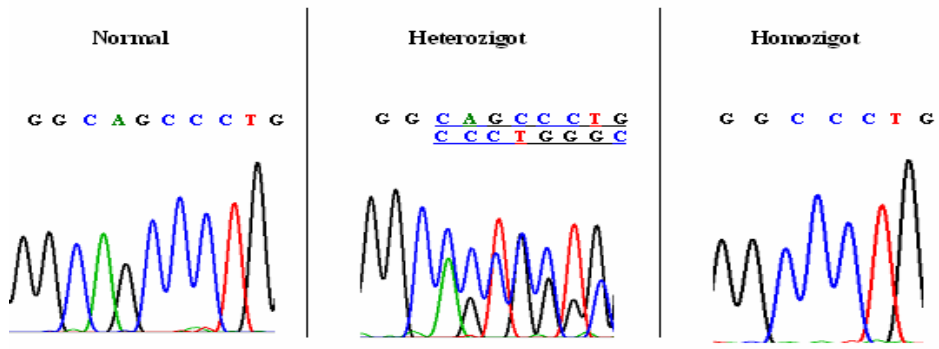
**Şekil 4.6.** DNA dizi analizi PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü. PCR ürünlerinin büyüklüğü 646 bç'dir.(Marker; Mass Ruler DNA Ladder Low Range, Fermentas SM0383'tür.

#### 4.2.2.2. DNA Dizi Analizi Sonuçları:

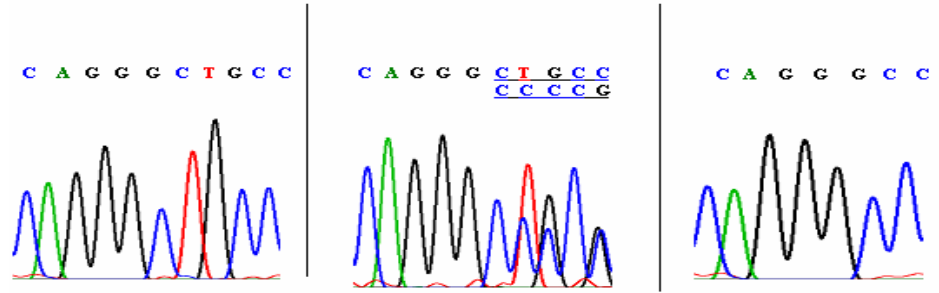
DNA Dizi analizi sonucunda hastalar incelendiğinde, herhangi bir mutasyona rastlanmadı. Ancak 48 hasta bireyin 24'ünde iki yönlü DNA dizi analizinde 38, 39, 40. nükleotidlerde delesyon (CAG) olduğu gözlemlendi. Delesyon saptanan hastaların üçünün homozigot, diğerlerinin ise heterozigot olduğu saptandı.

30 adet normal birey incelendiğinde, 15 kişide CAG delesyonu bulunduğu, bunlardan sadece bir bireyin homozigot delesyona sahip olduğu saptandı. Normal kemik iliği örneklerinde herhangi bir değişiklik saptanmadı. Şekil 4.7'de normal, heterozigot ve homozigot bireylerin ileri ve geri yöndeki sekanslarına örnek verilmiştir.

A) İleri sekans:

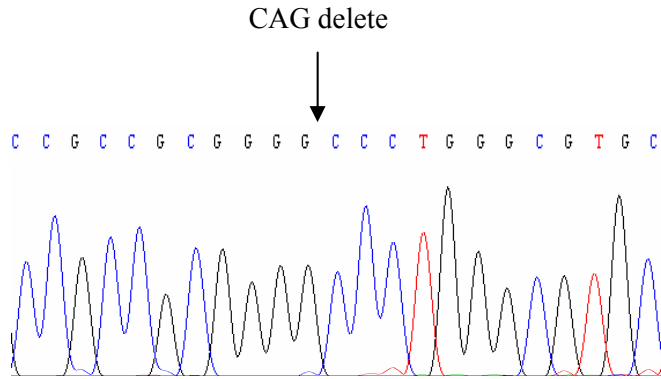


B) Geri sekans:

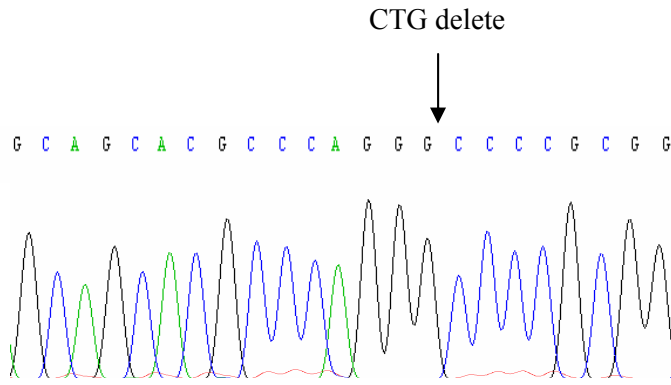


**Şekil 4.7.** sFRP1 promotör bölgesinin DNA dizi analizinde gözlenen üç nükleotidlik delesyon polimorfizmi. Heterozigot, homozigot ve wild type örneklerde ileri (A) ve geri (B) yöndeki DNA dizi analizi sonuçları.

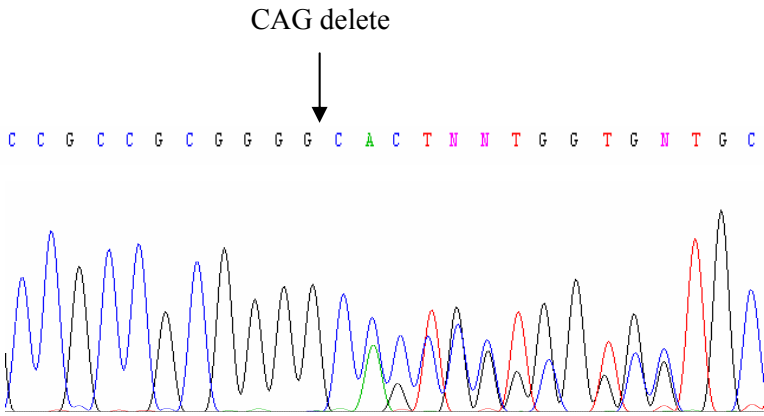
DNA Dizi analizi sonucunda, delesyon saptanan hasta bireylerin çift yönlü analiz görüntüleri aşağıdaki şekillerde verilmiştir:



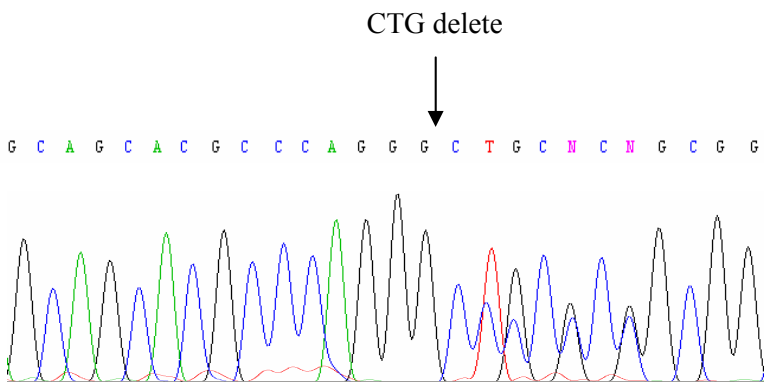
**Şekil 4.8.1.** 3 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen homozigot delesyon.



**Şekil 4.8.2.** 3 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen homozigot delesyon.

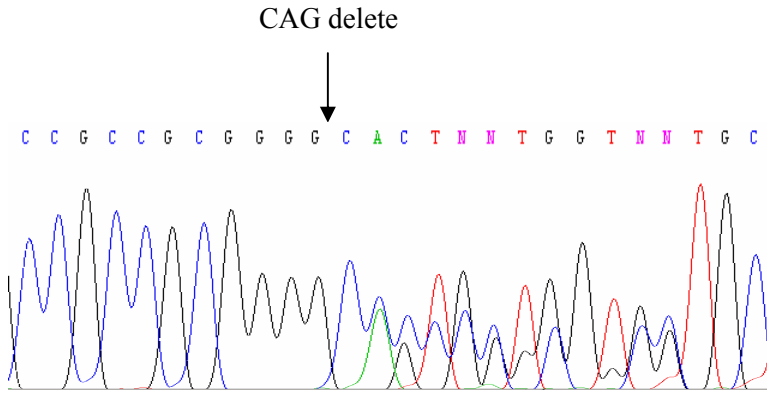


**Şekil 4.9.1.** 8 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.

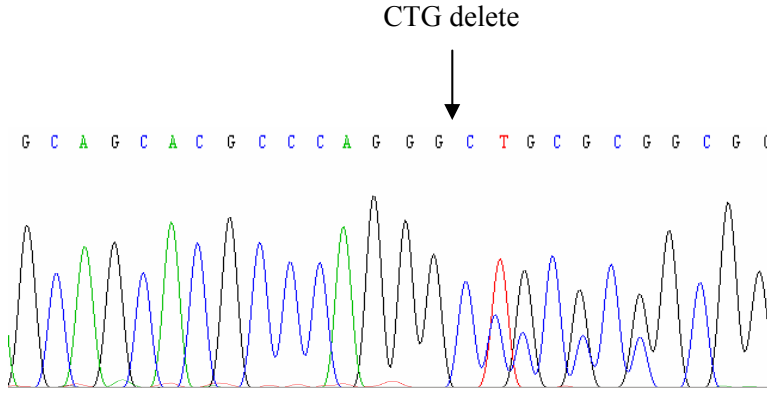


**Şekil 4.9.2.** 8 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.

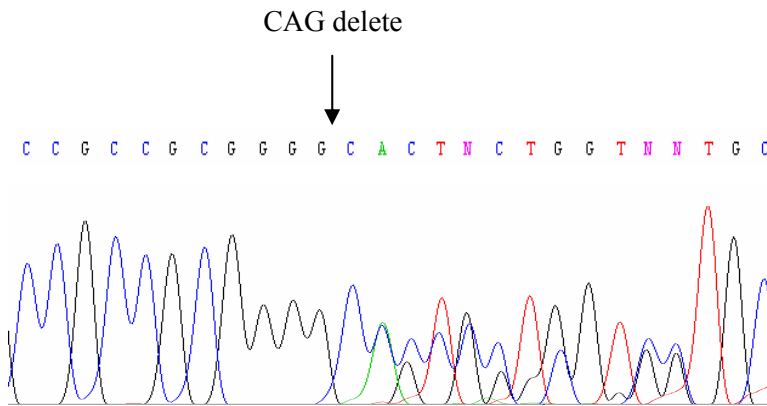




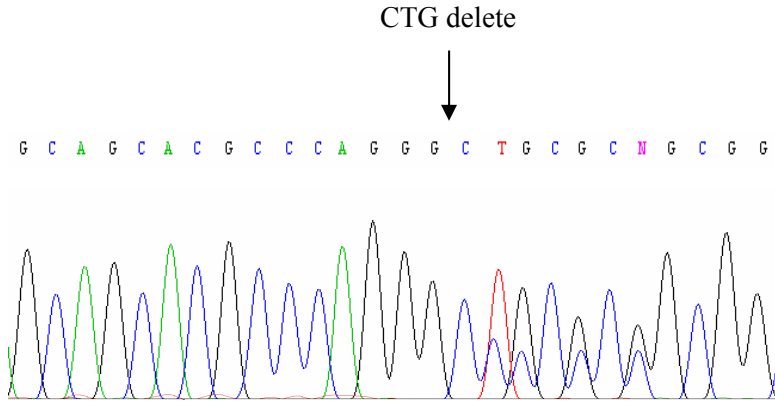
**Şekil 4.10.1.** 11 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



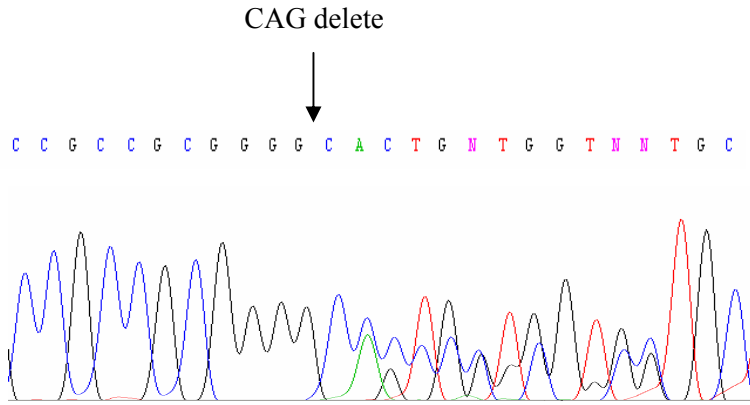
**Şekil 4.10.2.** 11 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



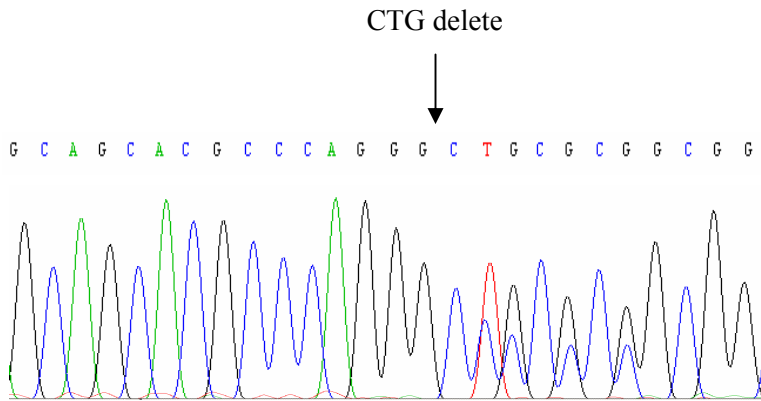
**Şekil 4.11.1.** 12 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



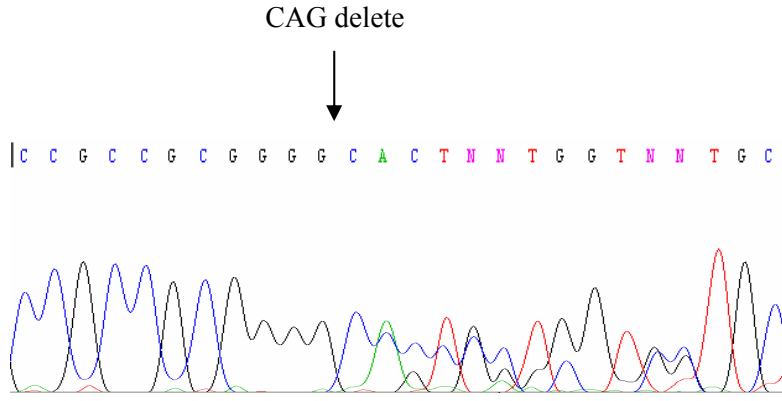
**Şekil 4.11.2.** 12 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



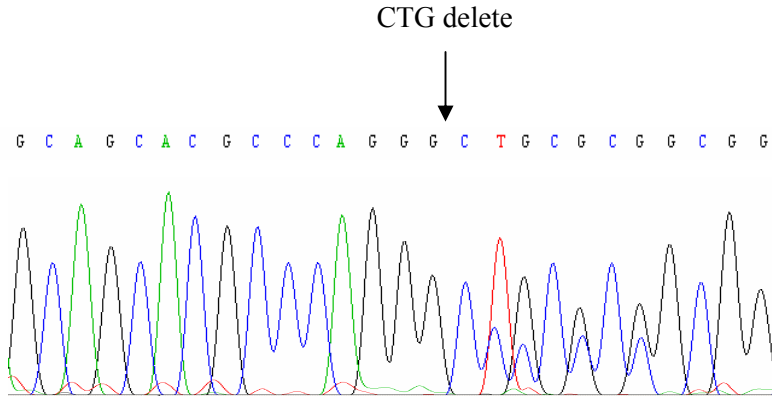
**Şekil 4.12.1.** 13 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



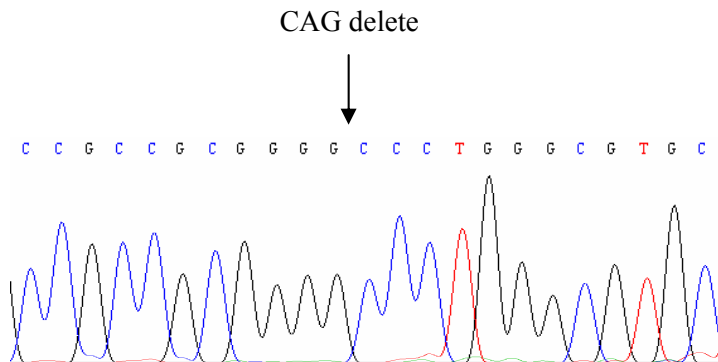
**Şekil 4.12.2.** 13 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



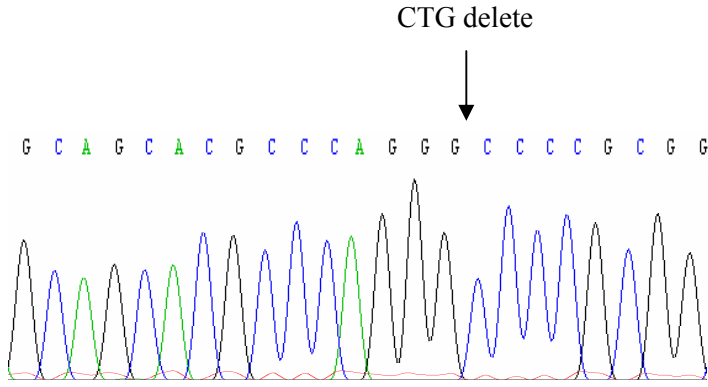
**Şekil 4.13.1.** 14 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



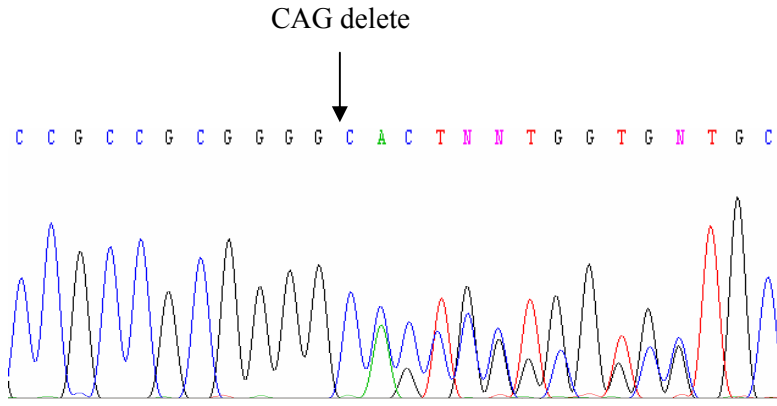
**Şekil 4.13.2.** 14 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



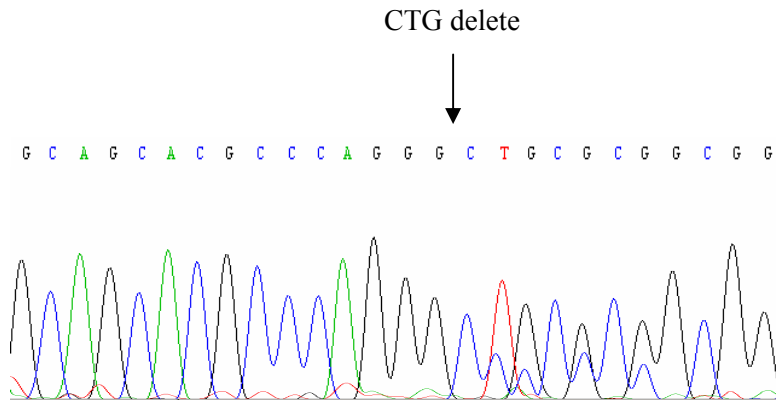
**Şekil 4.14.1.** 16 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen homozigot delesyon.



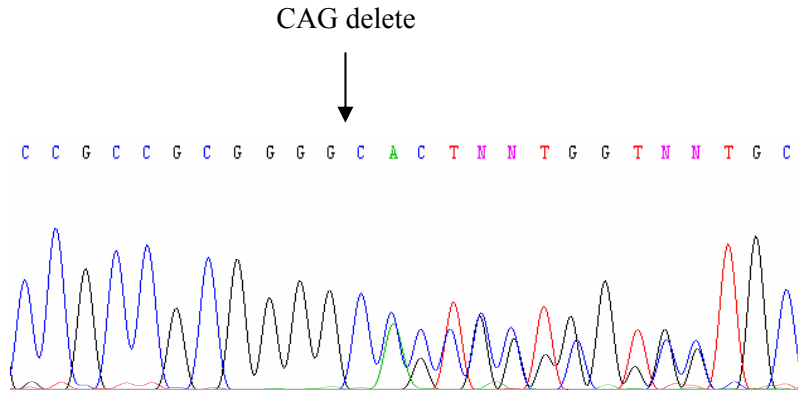
**Şekil 4.14.2.** 16 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen homozigot delesyon.



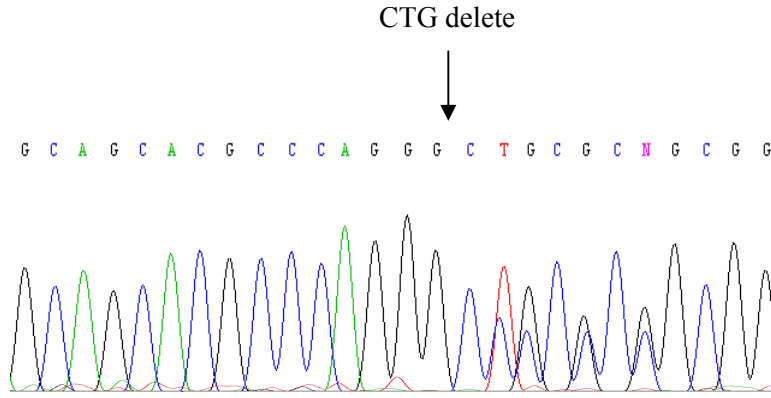
**Şekil 4.15.1.** 20 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



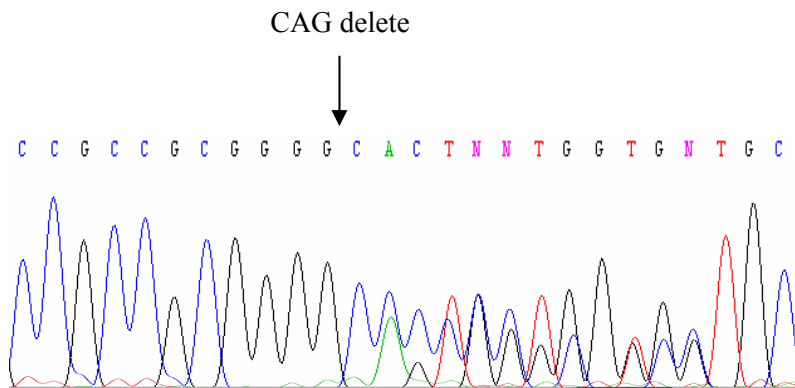
**Şekil 4.15.2.** 20 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



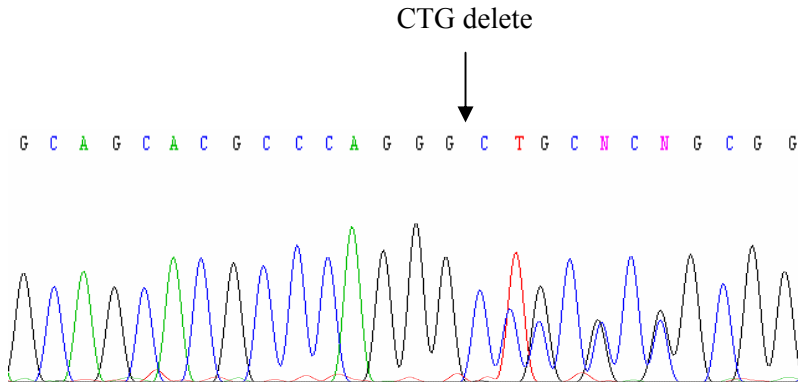
**Şekil 4.16.1.** 21 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



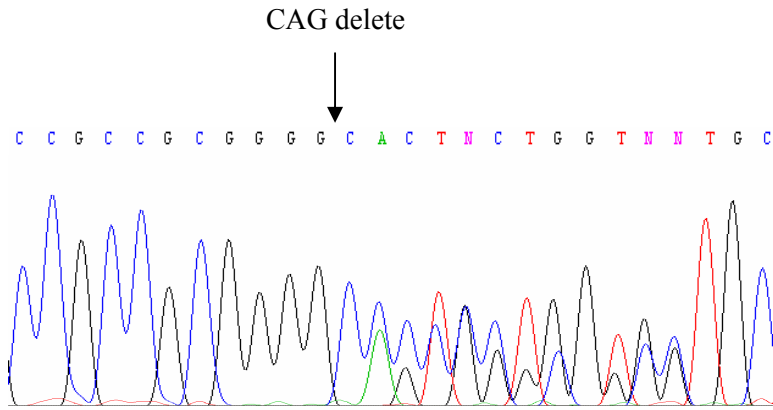
**Şekil 4.16.2.** 21 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



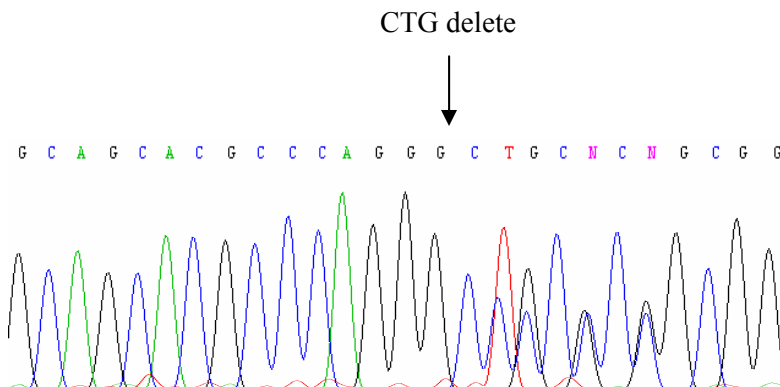
**Şekil 4.17.1.** 22 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



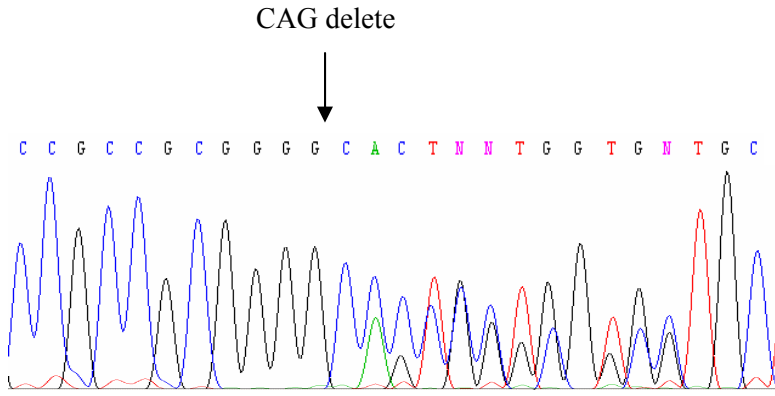
**Şekil 4.17.2.** 22 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



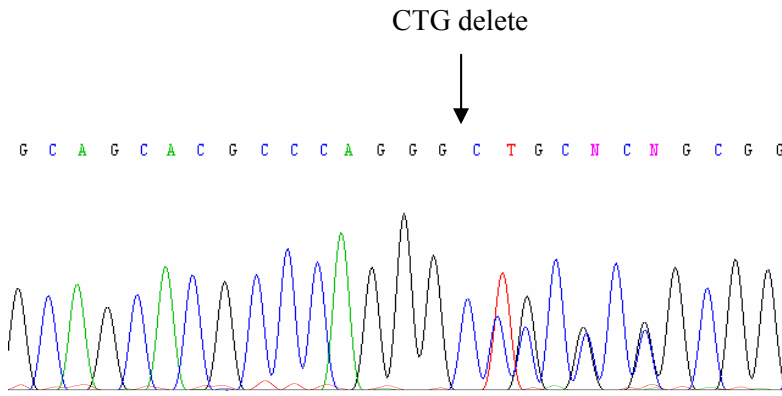
**Şekil 4.18.1.** 23 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



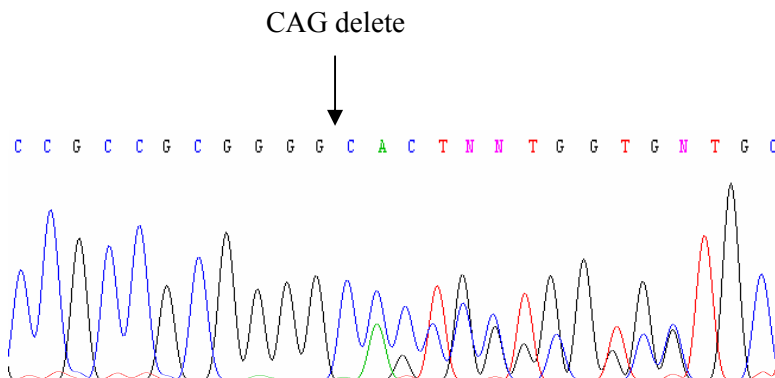
**Şekil 4.18.2.** 23 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



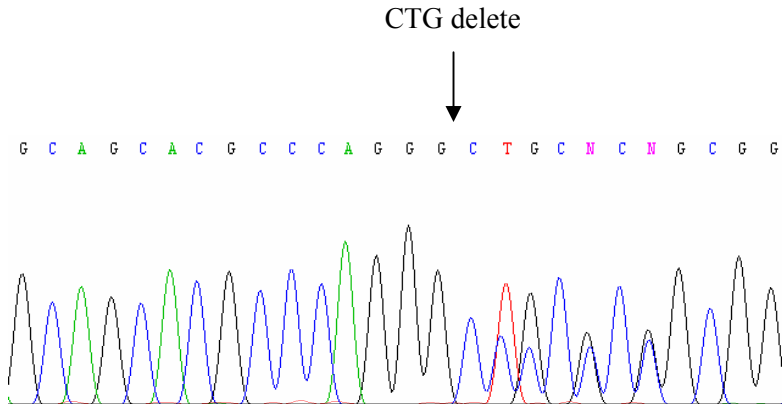
**Şekil 4.19.1.** 24 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



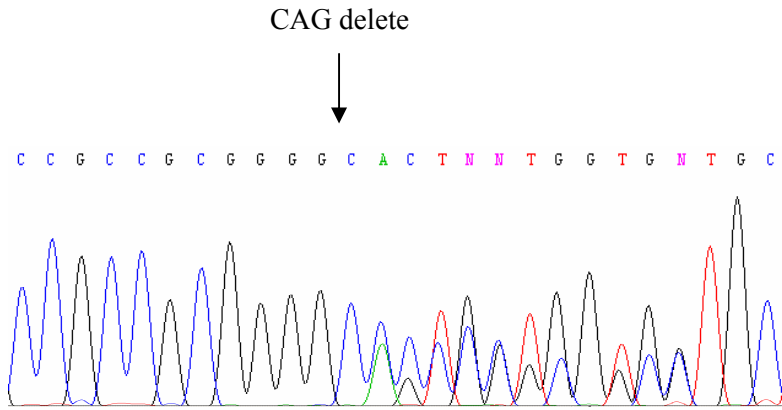
**Şekil 4.19.2.** 24 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



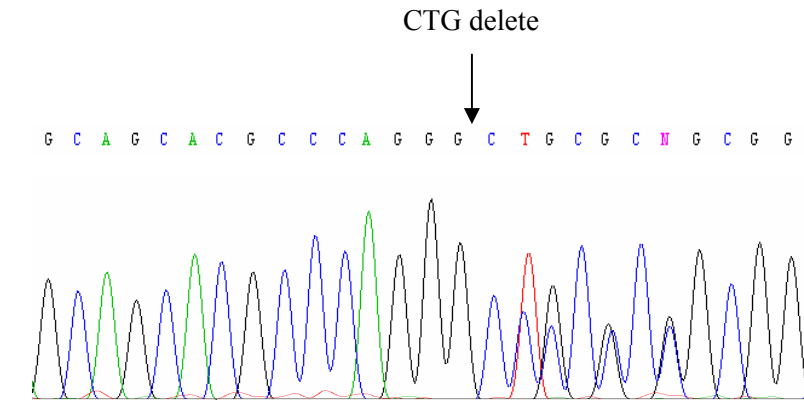
**Şekil 4.20.1.** 26 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



**Şekil 4.20.2.** 26 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.

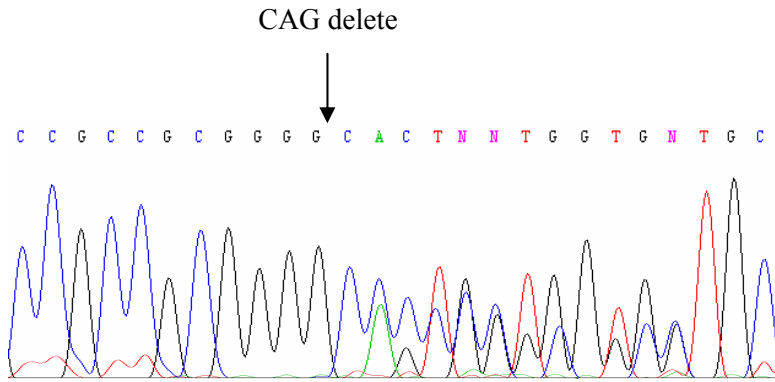


**Şekil 4.21.1.** 27 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.

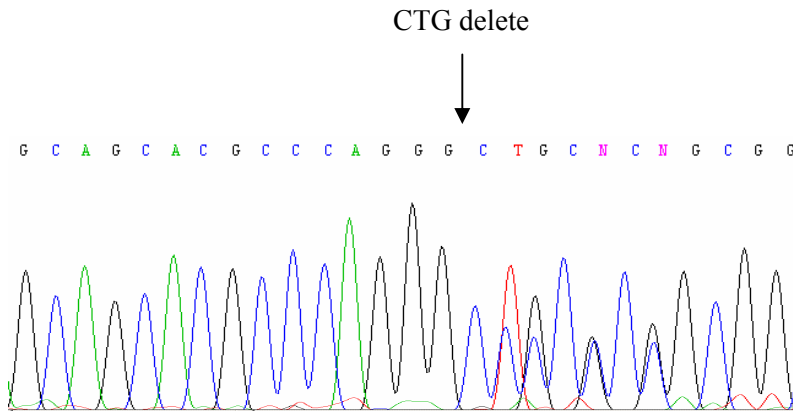


**Şekil 4.21.2.** 27 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.

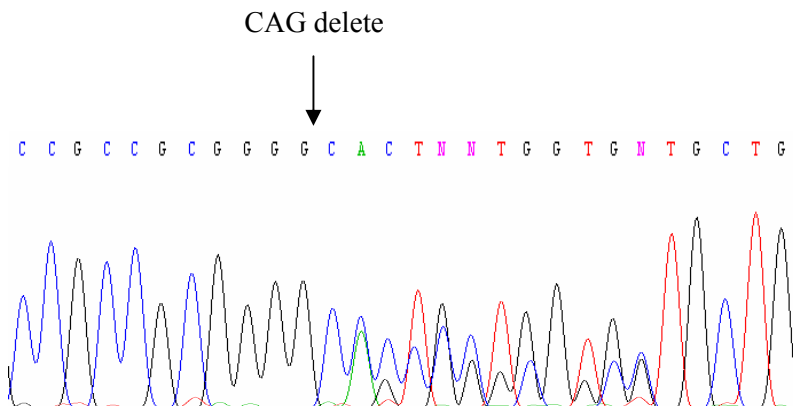




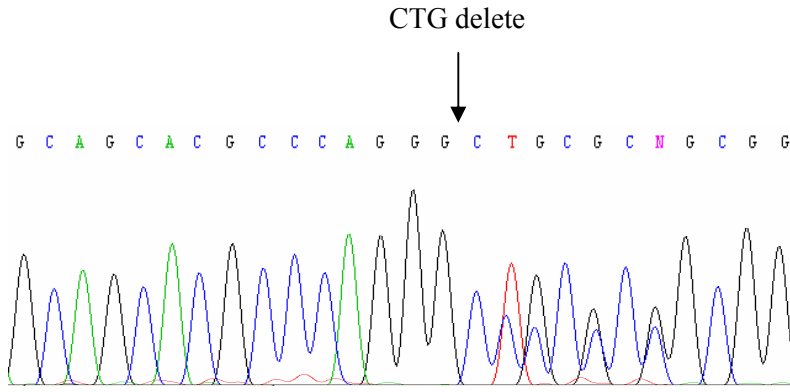
**Şekil 4.22.1.** 28 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



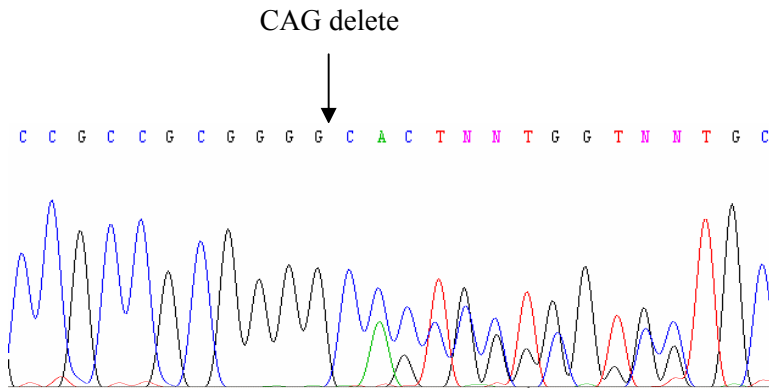
**Şekil 4.22.2.** 28 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



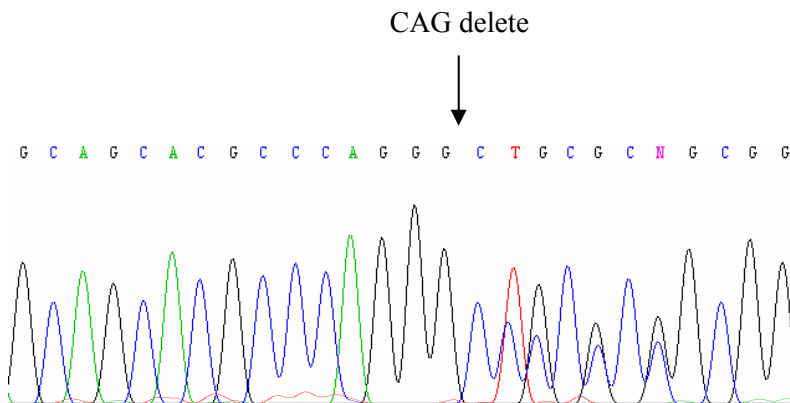
**Şekil 4.23.1.** 33 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon..



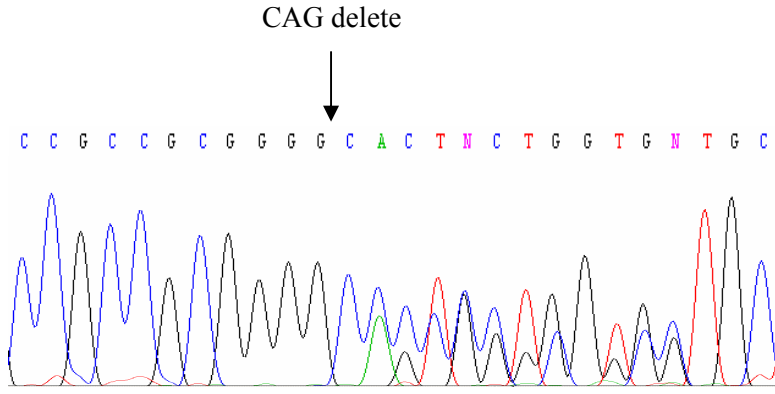
**Şekil 4.23.2.** 33 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



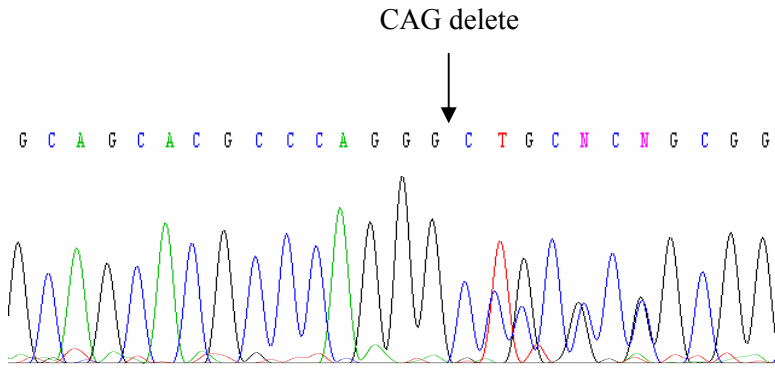
**Şekil 4.24.1.** 35 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



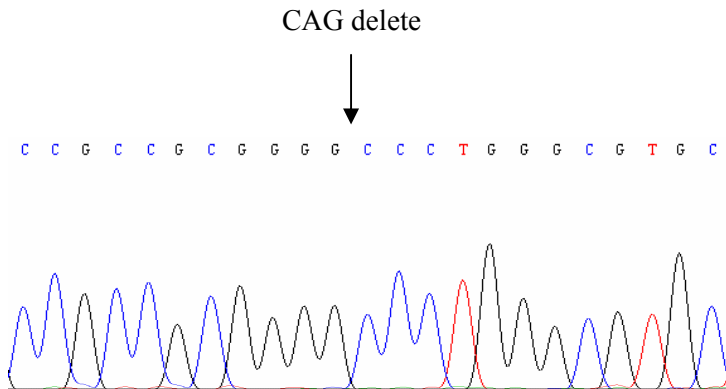
**Şekil 4.24.2.** 35 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



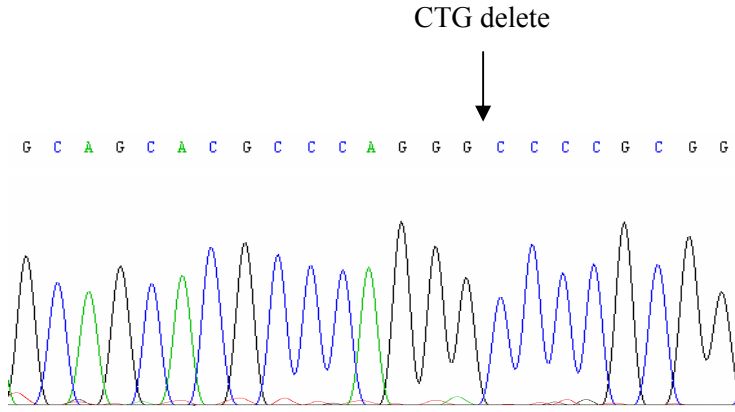
**Şekil 4.25.1.** 37 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



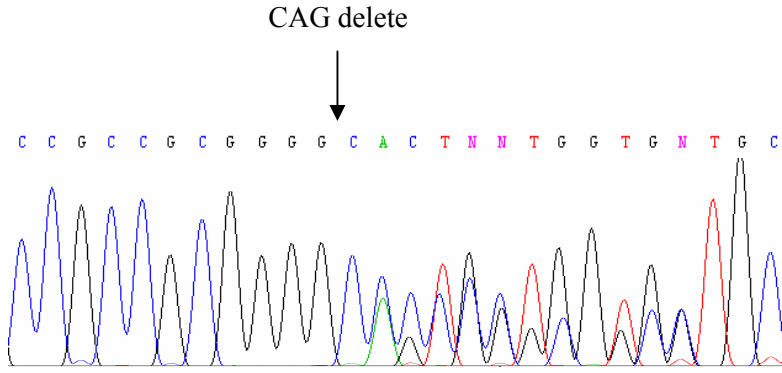
**Şekil 4.25.2.** 37 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



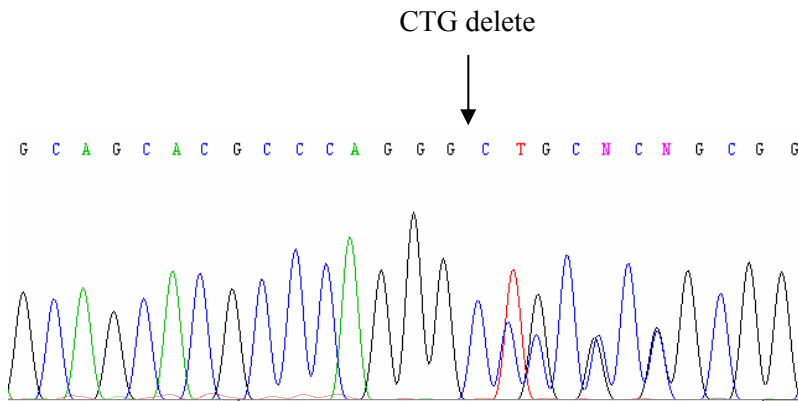
**Şekil 4.26.1.** 38 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen homozigot delesyon.



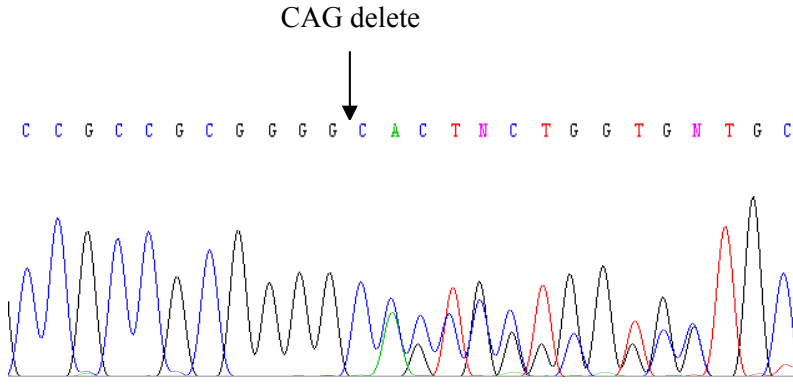
**Şekil 4.26.2.** 38 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen homozigot delesyon.



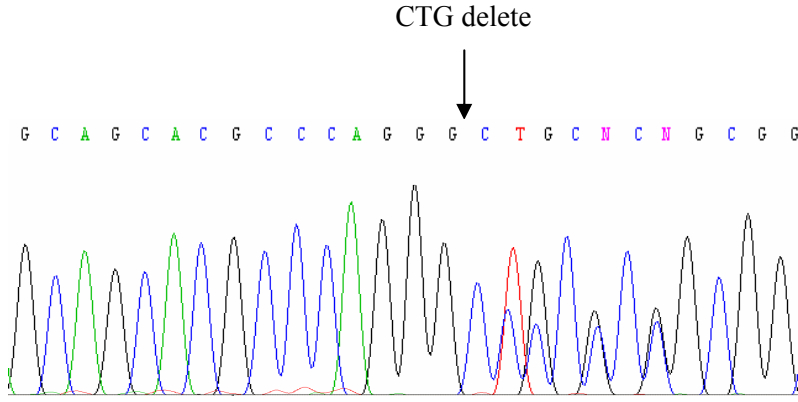
**Şekil 4.27.1.** 40 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



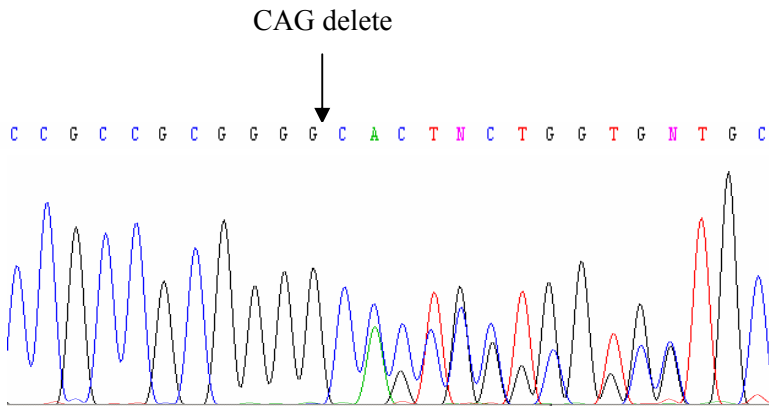
**Şekil 4.27.2.** 40 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



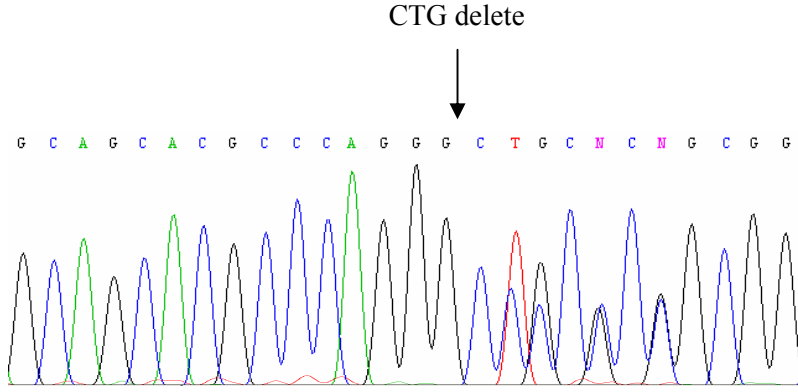
**Şekil 4.28.1.** 43 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



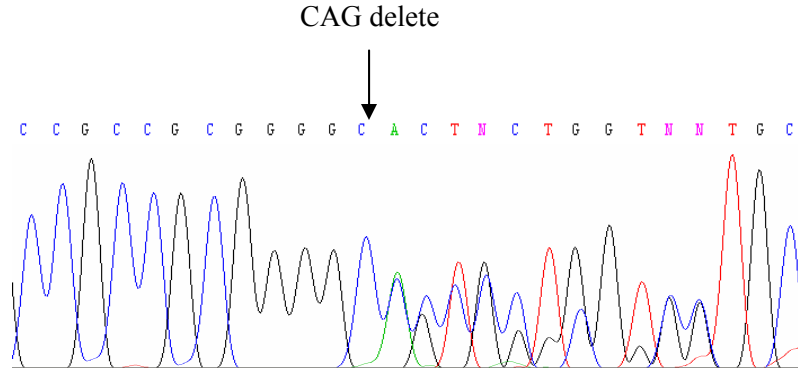
**Şekil 4.28.2.** 43 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



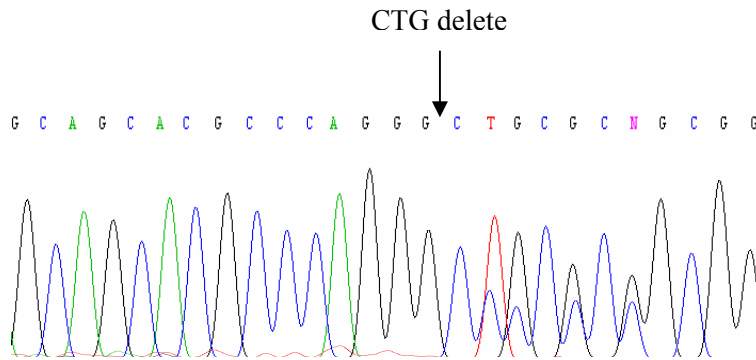
**Şekil 4.29.1.** 48 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



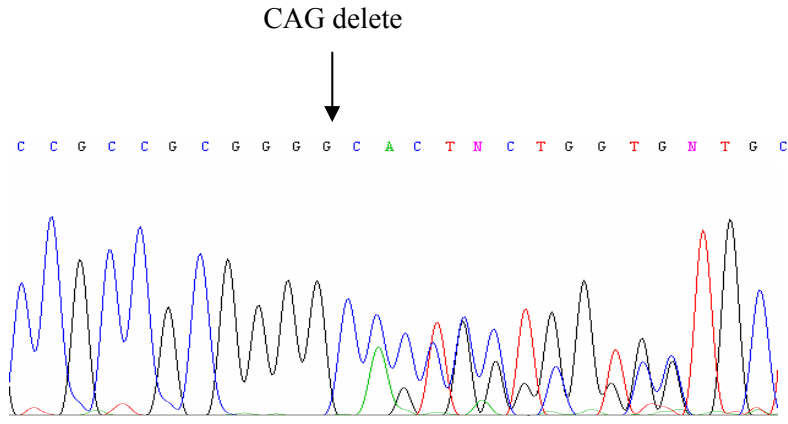
**Şekil 4.29.2.** 48 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



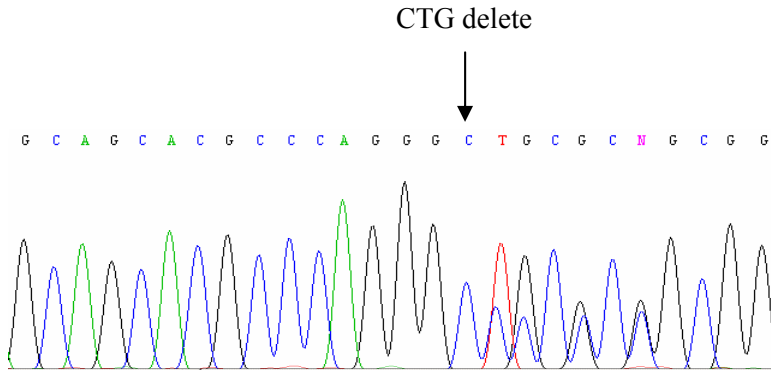
**Şekil 4.30.1.** 52 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



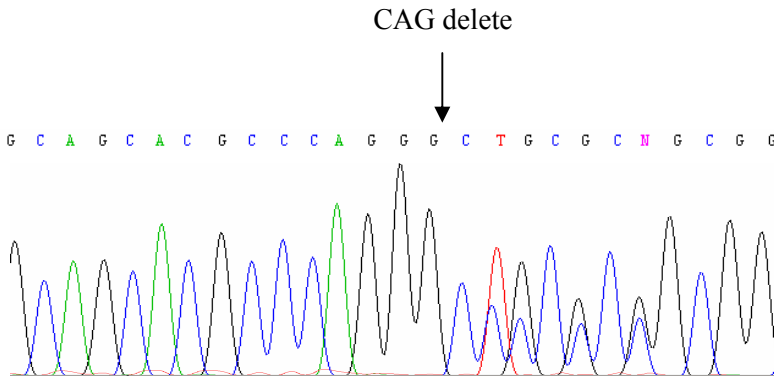
**Şekil 4.30.2.** 52 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



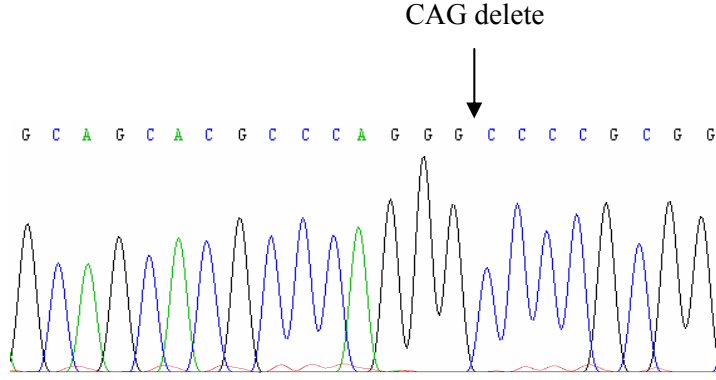
**Şekil 4.31.1.** 53 numaralı örneğe ait ileri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



**Şekil 4.31.2.** 53 numaralı örneğe ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



**Şekil 4.32.** HEK hücre hattına ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen heterozigot delesyon.



**Şekil 4.33.** SKBR hücre hattına ait geri yöndeki sekanslamada gözlenen homozigot delesyon.

Saptanan bu üç nükleotidlik delesyonun,13. ve 14. kodonu etkilediği ve bu kodonların ardarda gelen iki alanin rezidüsünü kodladığı yapılan bilgisayar analizleri ile saptandı. Bu delesyon sonucu meydana gelen yeni kodon Şekil 4.34.’de gösterildiği gibi yine alanin ‘dir.

11487111	CGGAGGCAGCCCCGACGTCGCGGAGAACAGGGCGCAGAGCCGGCATGGGCATCGGGCGCAGCGAGGGGGCCGCCGCGGGG	M G I G R S E G G R R G A A L
276	.....	M G I G R S E G G R R G A A L
259	.....	M G I G R S E G G R R G A A L
259	.....	M G I G R S E G G R R G A A L
259	.....	M G I G R S E G G R R G A A L
259	.....	M G I G R S E G G R R G A L
247	.....	M G I G R S E G G R R G A L

37 38 39 40 41 42 nucleotide

G C A G C C

Ala ↓ Ala

G C C

Ala

**Şekil 4.34.** NCBI, “Sequece Viewer”da sFRP1 geninin verilen DNA dizisinde “CAG” delesyonunun yerleşim bölgesi ve delesyondan sonra oluşan kodonun şematik görüntüsü.



sFRP1 geninin promotör bölgesindeki genetik değişiklikleri saptamak için yapılmış olan DNA dizi analizi ve SSCP analizi sonuçları Tablo 4.1’ de bir arada verilmiştir.

**Tablo 4.1.** DNA dizi analizi ve SSCP analizi sonuçları.

HASTA NO	DNA DİZİ ANALİZİ	SSCP ANALİZİ
ÖR.1	Normal	Yapılmadı
ÖR.2	Normal	Normal
ÖR.3	CAG homozigot kayıp	Normalden farklı bant paterni
ÖR.4	Normal	Normal
ÖR.5	Normal	Yapılmadı
ÖR.6	Normal	Yapılmadı
ÖR.7	Normal	Yapılmadı
ÖR.8	CAG heterozigot kayıp	Normalden farklı bant paterni
ÖR.9	Normal	Yapılmadı
ÖR.10	Normal	Yapılmadı
ÖR.11	CAG heterozigot kayıp	Normalden farklı bant paterni
ÖR.12	CAG heterozigot kayıp	Normalden farklı bant paterni
ÖR.13	CAG heterozigot kayıp	Normalden farklı bant paterni
ÖR.14	CAG heterozigot kayıp	Normalden farklı bant paterni
ÖR.15	Normal	Yapılmadı
ÖR.16	CAG homozigot kayıp	Normalden farklı bant paterni
ÖR.17	Normal	Normalden farklı bant paterni
ÖR.18	Normal	Yapılmadı
ÖR.19	Normal	Yapılmadı
ÖR.20	CAG heterozigot kayıp	Normalden farklı bant paterni
ÖR.21	CAG heterozigot kayıp	Normalden farklı bant paterni
ÖR.22	CAG heterozigot kayıp	Normalden farklı bant paterni
ÖR.23	CAG heterozigot kayıp	Normalden farklı bant paterni
ÖR.24	CAG heterozigot kayıp	Normalden farklı bant paterni
ÖR.25	Normal	Yapılmadı
ÖR.26	CAG heterozigot kayıp	Normalden farklı bant paterni
ÖR.27	CAG heterozigot kayıp	Normalden farklı bant paterni
ÖR.28	CAG heterozigot kayıp	Normalden farklı bant paterni
ÖR.29	Normal	Yapılmadı
ÖR.30	Normal	Yapılmadı
ÖR.31	Normal	Yapılmadı
ÖR.33	CAG heterozigot kayıp	Normalden farklı bant paterni
ÖR.34	Normal	Yapılmadı
ÖR.35	CAG heterozigot kayıp	Normalden farklı bant paterni
ÖR.36	Normal	Yapılmadı
ÖR.37	CAG heterozigot kayıp	Normalden farklı bant paterni
ÖR.38	CAG homozigot kayıp	Normalden farklı bant paterni
ÖR.39	Normal	Yapılmadı

ÖR.40	CAG heterozigot kayıp	Normalden farklı bant paterni
ÖR.41	Normal	Yapılmadı
ÖR.42	Normal	Yapılmadı
ÖR.43	CAG heterozigot kayıp	Normalden farklı bant paterni
ÖR.44 (N.Ki.1)	Normal	Normal
ÖR.45 (N.Ki.2)	Normal	Normal
ÖR.46 (N.Ki.3)	Normal	Bant gözlenmedi
ÖR.47 (N.Ki.4)	Normal	Normal
ÖR.48	CAG heterozigot kayıp	Normalden farklı bant paterni
ÖR.49	Normal	Yapılmadı
ÖR.51	Normal	Yapılmadı
ÖR.52	CAG heterozigot kayıp	Yapılmadı
ÖR.53	CAG heterozigot kayıp	Normalden farklı bant paterni
ÖR.54	Normal	Yapılmadı
ÖR.55 (N.Ki.5)	Normal	Yapılmadı
ÖR.56 (N.Ki.6)	Normal	Yapılmadı
ÖR.57 (N.Ki.7)	Normal	Yapılmadı
ÖR.58 (N.Ki.8)	Normal	Yapılmadı
ÖR.59 (N.Ki.9)	Normal	Yapılmadı
ÖR.60 (N.Ki.10)	Normal	Yapılmadı
HEK293	CAG heterozigot kayıp	Normalden farklı bant paterni
SKBR	CAG homozigot kayıp	Normalden farklı bant paterni
MDA-MB231	Normal	Normal
N1	Normal	Yapılmadı
N2	CAG heterozigot kayıp	Yapılmadı
N3	Normal	Normal
N4	Normal	Yapılmadı
N5	Normal	Normal
N6	CAG heterozigot kayıp	Yapılmadı
N7	CAG homozigot kayıp	Yapılmadı
N8	CAG heterozigot kayıp	Yapılmadı
N9	Normal	Yapılmadı
N10	CAG heterozigot kayıp	Yapılmadı
N11	CAG heterozigot kayıp	Yapılmadı
N12	Normal	Yapılmadı
N13	CAG heterozigot kayıp	Yapılmadı
N14	Normal	Yapılmadı
N15	CAG heterozigot kayıp	Yapılmadı
N16	CAG heterozigot kayıp	Yapılmadı
N17	Normal	Yapılmadı
N18	Normal	Yapılmadı
N19	Normal	Yapılmadı
N20	CAG heterozigot kayıp	Yapılmadı
N21	CAG heterozigot kayıp	Yapılmadı
N22	Normal	Yapılmadı
N23	CAG heterozigot kayıp	Yapılmadı

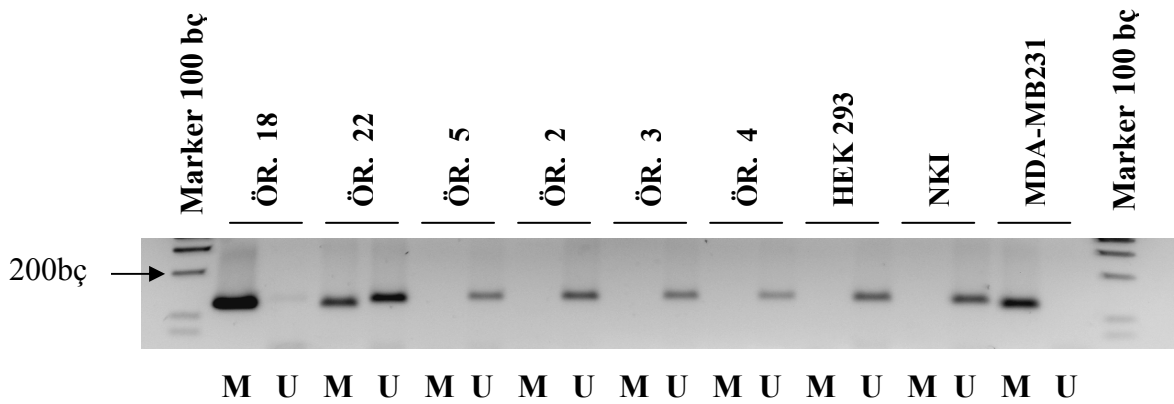
N24	Normal	Yapılmadı
N25	CAG heterozigot kayıp	Yapılmadı
N26	Normal	Yapılmadı
N27	Normal	Yapılmadı
N28	Normal	Yapılmadı
N29	CAG heterozigot kayıp	Yapılmadı
N30	CAG heterozigot kayıp	Yapılmadı

### 4.3. sFRP1 GENİNİN PROMOTÖR BÖLGESİNDEKİ EPİGENETİK DEĞİŞİKLİKLERİN SAPTANMASI

#### 4.3.1. Metilasyon Özgül PCR (MS-PCR)

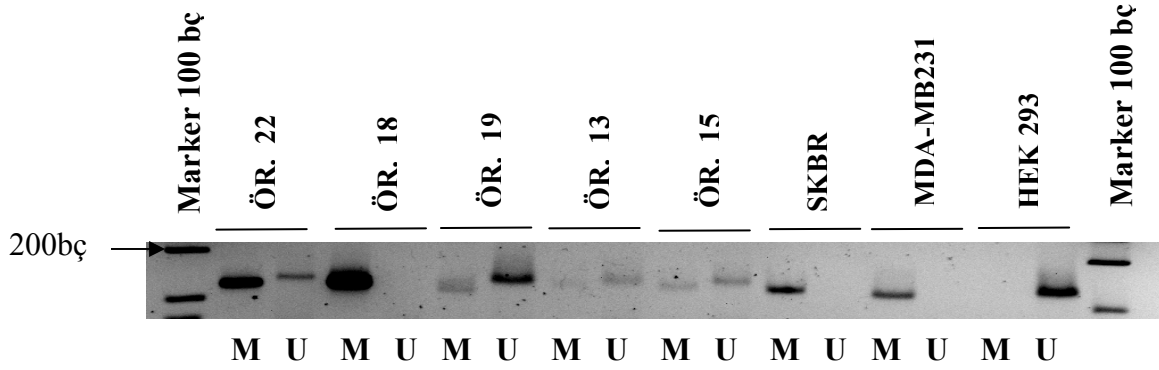
Metilasyon özgül PCR yöntemi kullanılarak, 48 adet kronik faz KML hastasının ve 10 adet normal bireyin kemik iliğinde, sFRP1 geninin promotör bölgesindeki metilasyon durumu saptandı. Pozitif kontrol olarak, metile olduğunu bildiğimiz SKBR, MDA-MB231 hücre hattı, negatif kontrol olarak da HEK-293 hücre hattı kullanıldı. sFRP1 promotör bölgesi incelendiğinde, bir KML hastasının metile, 41 hastanın ise metile olmayan, 6 hastanın da hemimetile olduğu gözlemlendi. 10 normal kemik iliği örneğinin 9'unun metile olmayan ve bir normal kemik iliği örneğinin hemimetile olduğu saptandı.

MS-PCR ürünlerinin %4'lük Nusieve agaroz jel görüntüleri aşağıdaki şekillerde verilmiştir.

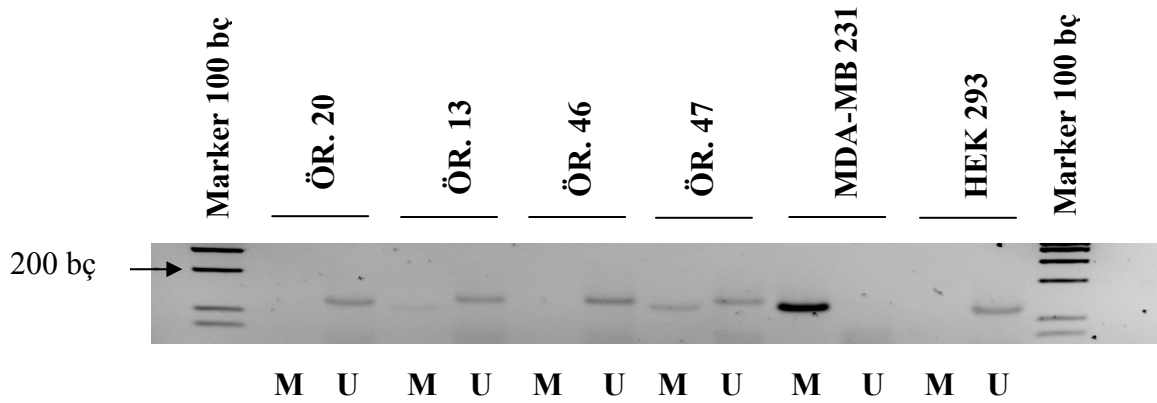


**Şekil 4.35.** Hastaların ve kontrollerin metilasyon özgül PCR sonrası %4'lük Nusieve agaroz jeldeki görüntüsü. 18 numaralı örnek metile, 22 numaralı örnek hemimetile, 5, 2, 3, 4

numaralı örnekler metile olmayan. HEK-293 negatif kontrol(metile olmayan), MDA-MB231 pozitif kontrol(metile). (M, metile U,metile olmayan; NKI normal kemik iliği). (Marker; Mass Ruler DNA Ladder Low Range, Fermentas SM0383'tür.)

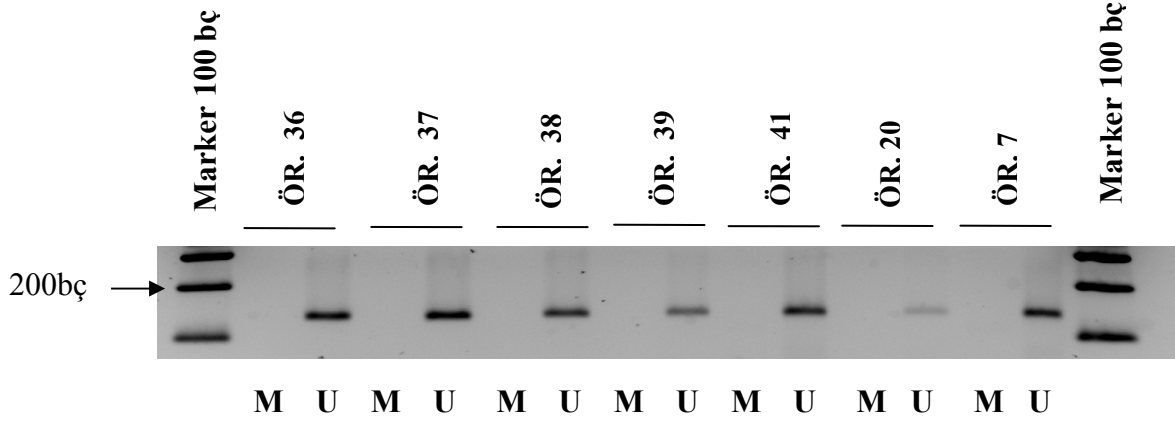


**Şekil 4.36.** Hastaların ve kontrollerin metilasyon özgül PCR sonrası %4'lük Nusieve agaroz jeldeki görüntüsü. 18 numaralı örnek metile, 22, 19, 13, 15 numaralı örnekler hemimetile. SKBR, MDA-MB231 pozitif kontrol. HEK-293 negatif kontrol.(Marker; Mass Ruler DNA Ladder Low Range, Fermentas SM0383'tür.)

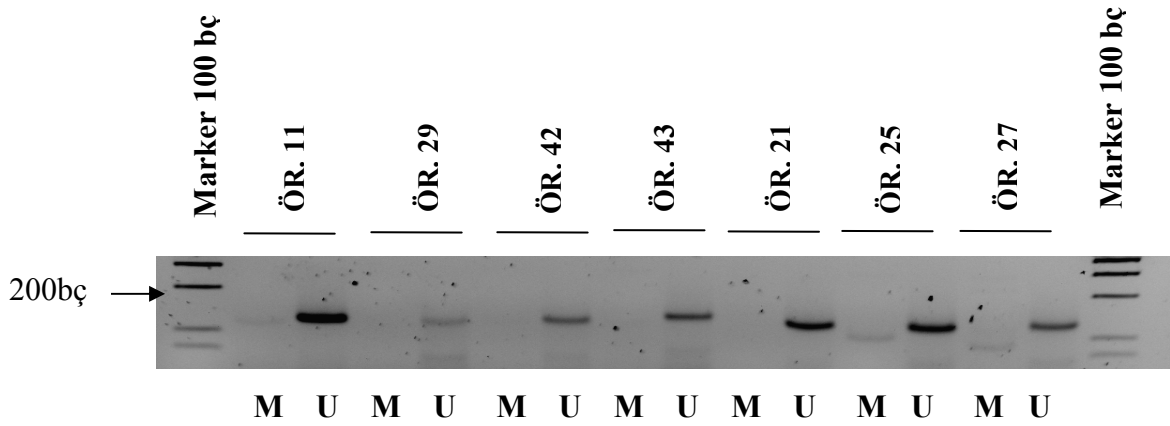


**Şekil 4.37.** Hastaların ve kontrollerin metilasyon özgül PCR sonrası %4'lük Nusieve agaroz jeldeki görüntüsü. 47 ve 13 numaralı örnek hemimetile, 20 ve 46 numaralı örnekler metile

olmayan. HEK-293 negatif kontrol, MDA-MB231 pozitif kontrol.(Marker; Mass Ruler DNA Ladder Low Range, Fermentas SM0383'tür.)



**Şekil 4.38.** Hastaların ve kontrollerin metilasyon özgül PCR sonrası %4'lük Nusieve agaroz jeldeki görüntüsü. 36, 37, 38, 39, 41, 20 ve 7 numaralı örnekler metile olmayan. (Marker; Mass Ruler DNA Ladder Low Range, Fermentas SM0383'tür.)



**Şekil 4.39.** Hastaların ve kontrollerin metilasyon özgül PCR sonrası %4'lük Nusieve agaroz jeldeki görüntüsü.11, 29, 42, 43 ve 21 numaralı örnekler metile olmayan, 25 ve 27 numaralı örnekler hemimetile. (Marker; Mass Ruler DNA Ladder Low Range, Fermentas SM0383'tür.)

sFRP1 geninin promotör bölgesindeki epigenetik değişiklikleri saptamak için KML hastaları, normal kemik iliği ve hücre hatlarında yapılmış olan metilasyon özgöl PCR sonuçları Tablo 4.2.'de verilmiştir.

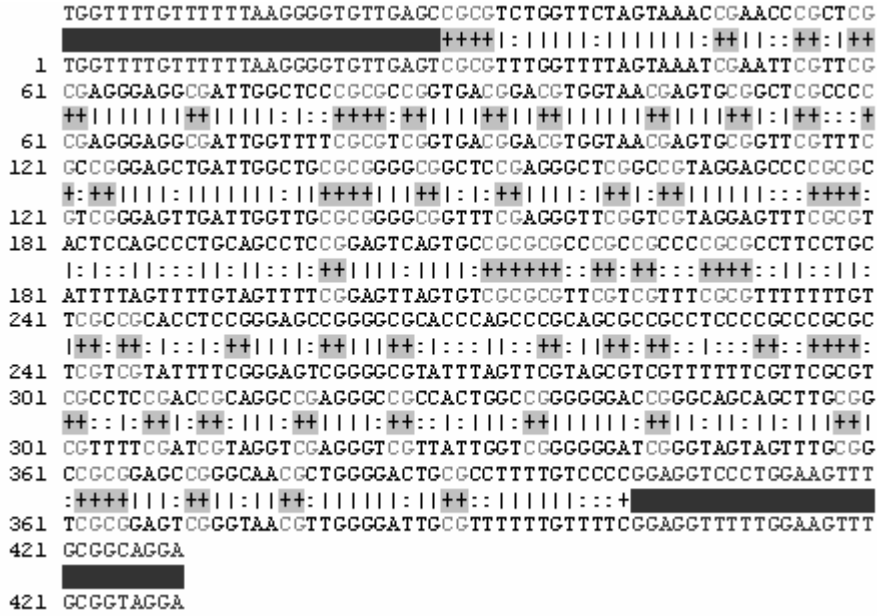
**Tablo 4.2.** Metilasyon özgöl PCR sonuçları:

HASTA NO:	METİLASYON DURUMU
ÖR.1	Metile olmayan
ÖR.2	Metile olmayan
ÖR.3	Metile olmayan
ÖR.4	Metile olmayan
ÖR.5	Metile olmayan
ÖR.6	Metile olmayan
ÖR.7	Metile olmayan
ÖR.8	Metile olmayan
ÖR.9	Metile olmayan
ÖR.10	Metile olmayan
ÖR.11	Metile olmayan
ÖR.12	Metile olmayan
ÖR.13	Hemimetile
ÖR.14	Metile olmayan
ÖR.15	Hemimetile
ÖR.16	Metile olmayan
ÖR.17	Metile olmayan
ÖR.18	Metile
ÖR.19	Hemimetile
ÖR.20	Metile olmayan
ÖR.21	Metile olmayan
ÖR.22	Hemimetile
ÖR.23	Metile olmayan
ÖR.24	Metile olmayan
ÖR.25	Hemimetile
ÖR.26	Metile olmayan
ÖR.27	Hemimetile
ÖR.28	Metile olmayan
ÖR.29	Metile olmayan
ÖR.30	Metile olmayan
ÖR.31	Metile olmayan
ÖR.33	Metile olmayan
ÖR.34	Metile olmayan
ÖR.35	Metile olmayan
ÖR.36	Metile olmayan
ÖR.37	Metile olmayan
ÖR.38	Metile olmayan

ÖR.39	Metile olmayan
ÖR.40	Metile olmayan
ÖR.41	Metile olmayan
ÖR.42	Metile olmayan
ÖR.43	Metile olmayan
ÖR.44 (N.Ki.1)	Metile olmayan
ÖR.45 (N.Ki.2)	Metile olmayan
ÖR.46 (N.Ki.3)	Metile olmayan
ÖR.47 (N.Ki.4)	Hemimetile
ÖR.48	Metile olmayan
ÖR.49	Metile olmayan
ÖR.51	Metile olmayan
ÖR.52	Metile olmayan
ÖR.53	Metile olmayan
ÖR.54	Metile olmayan
ÖR.55 (N.Ki.5)	Metile olmayan
ÖR.56 (N.Ki.6)	Metile olmayan
ÖR.57 (N.Ki.7)	Metile olmayan
ÖR.58 (N.Ki.8)	Metile olmayan
ÖR.59 (N.Ki.9)	Metile olmayan
ÖR.60 (N.Ki.10)	Metile olmayan
HEK-293	Metile olmayan
SKBR	Metile
MDA-MB231	Metile
K562	Metile
K562 DAC 1 $\mu$ M	Hemimetile
K562 DAC 5 $\mu$ M	Hemimetile

### 4.3.2. Bisülfıt PCR:

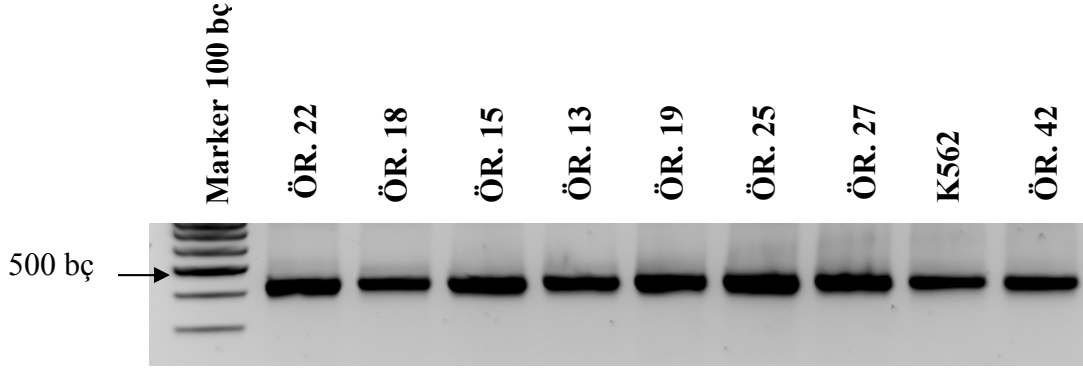
"MethPrimer" software kullanılarak, bisülfıt primerleri ile sınırlandırdığımız sFRP1 promotör bölgesinde 57 adet CpG adası olduğu tespit edildi (Şekil 4.40).



Şekil 4.40. “Meth Primer” programı kullanılarak Bisülfıt PCR için dizayn edilen primerlerin sınırladığı bölgede tespit edilen CpG adalarının yerleşimi. Bisülfıt primerler koyu gri, CpG adaları açık gri olarak gösterilmiştir.

MS-PCR ile metile ve hemimetile olduğunu saptadığımız hastalarda metilasyonun hangi CpG adalarında yoğunlaştığını belirlemek amacı ile bisülfıt PCR sonrası örnekler DNA dizi analizi ile değerlendirildi. Bisülfıt PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü Şekil 4.41’de verilmiştir.





**Şekil 4.41.** Bisülfıt PCR ürünlerinin %2'lık agaroz jeldeki görüntüsü. PCR ürünlerinin uzunluğu 429 bç'dir.(Marker; Mass Ruler DNA Ladder Low Range, Fermentas SM0383'tür.)

Bisülfıt PCR'ları yapılan örnekler, "Macrogen (Korea)" firmasına gönderilerek DNA dizi analizleri yaptırıldı. Genomik DNA'daki bisülfıt modifikasyonu sonrasında, DNA dizi analizinde metile olan CpG adaları CG, metile olmayan CpG adaları ise TG şeklinde dizileme sonucu verir. Bu şekilde, metile ve hemimetile hastalardaki promotör bölgesinin metile ve metile olmayan CpG adalarının sayısı belirlendi.

MS-PCR tarafından sFRP1 promotör bölgesinin metile olduğunu saptadığımız hastanın, bisülfıt PCR ile elde ettiğimiz PCR ürününü sekanslattığımızda, 57 adet metile CpG bölgesi tespit edildi. 6 hemimetile hastada 15 ile 47 arasında değişen metile CpG bölgesi saptandı. Rastgele seçilmiş olan iki adet metile olmayan hastada ise, 6 ve 15 CpG bölgesinin metile olduğu gözlemlendi. Önceden metile olmadığını saptadığımız hastaların bisülfıt sekansı ile bakıldığında çok düşük düzeyde metilasyon saptandı. Bu farklılığın nedeni, MS-PCR ile sınırlandırılan alan dışındaki CpG'lerin varlığıdır. Referans sekans (NCBI Nucleotide database accession no. NM 003012) ile karşılaştırıldığında 13 no'lu örnekte üç adet, 27 ve 25 no'lu örneklerde bir adet, 42 no'lu örnekte üç adet ve 39 no'lu örnekte iki adet yeni oluşan CpG saptandı. 13, 25 ve 27 numaralı örneklerde bir adet, 42 no'lu örnekte dört adet ve 39 no'lu örnekte üç adet kaybolan CpG saptandı.

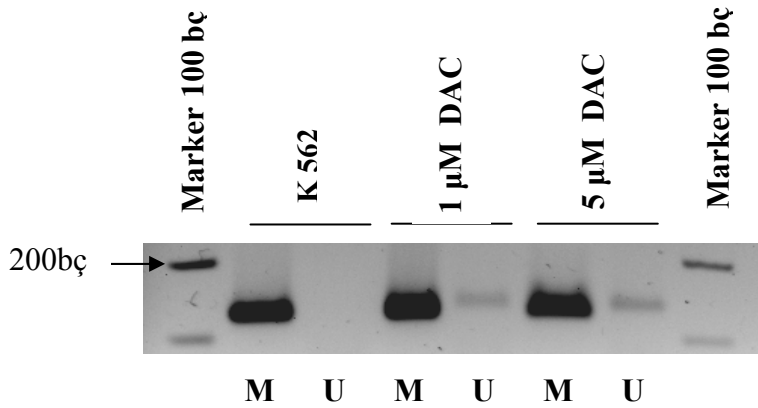
DNA dizi analizi sonucunda elde edilen CpG bölgeleri ile ilgili metilasyon verileri Tablo 4.3 'de verilmiştir.

**Tablo 4.3.** Metile, hemimetile ve rasgele seçilmiş iki metile olmayan hastadaki CpG adalarının metilasyon durumu.

Hasta no:	Met durumu	Metile CpG sayısı	Metile olmayan CpG sayısı	Yeni oluşan CpG sayısı	Kaybolan CpG sayısı
ÖR.18	MET	57	-	-	-
ÖR.13	H-MET	32	24	3	1
ÖR.22	H-MET	27	30	-	-
ÖR.19	H-MET	Hizmet aldığımız firma sonuç elde edemedi			
ÖR.15	H-MET				
ÖR.27	H-MET	22	34	1	1
ÖR.25	H-MET	15	41	1	1
ÖR.42	MET olmayan	6	47	3	4
ÖR.39	MET olmayan	16	38	2	3

#### 4.3.3. K562 hücrelerine demetile edici ajan DAC verilerek metilasyon düzeyindeki değişikliklerin saptanması:

K562 hücre hattı, eritroid blast krizdeki KML hastasından elde edilen bir hücre hattı olduğu için bu hücre hattı da, sFRP1 promotör metilasyonu yönünden analiz edildi. Yapılan analiz sonrasında K562'nin metile olduğu saptandı. K562 hücre hattı aynı zamanda 1  $\mu$ M ve 5  $\mu$ M demetile edici ajan DAC ile muamele edildi. Muamele edilmeyen kontrol K562 hücrelerine kıyasla metilasyon düzeylerinde fark olup olmadığı saptandı. 1  $\mu$ M ve 5  $\mu$ M DAC ile muamele edildiğinde K562 hücrelerinin, hemimetile duruma geçtiği gözlemlendi (Şekil 4.42).



**Şekil 4.42.** 1 $\mu$ M ve 5 $\mu$ M DAC ile muamele edilen ve kontrol K562 hücrelerinin metilasyon özgül PCR sonrası %4'lük Nusieve agaroz jeldeki görüntüsü. Muamele edilmeyen K562 metile, 1 $\mu$ M ve 5 $\mu$ M DAC ile muamele edilen K562'ler hemimetile. (Marker; Mass Ruler DNA Ladder Low Range, Fermentas SM0383'tür.)

Bisülfid sekanslama sonucu, K562 hücre hattında 57 CpG bölgesinin 53 tanesinin metile olduğu, 1 $\mu$ M DAC ile muamele edilen K562 hücrelerinde 47 CpG, 5 $\mu$ M DAC ile muamele edilen K562 hücrelerinde ise 35 CpG 'nin metile olduğu gözlemlendi. Tablo 4.4.'de 1'den 57'ye kadar her CpG 'nin metilasyon durumu verilmiştir.

**Tablo 4.4.** 57 adet CpG 'nin metilasyon durumu. ("–" işareti kaybolan CpG adalarını, "M" metile, "U" metile olmayan olduğunu göstermektedir.)

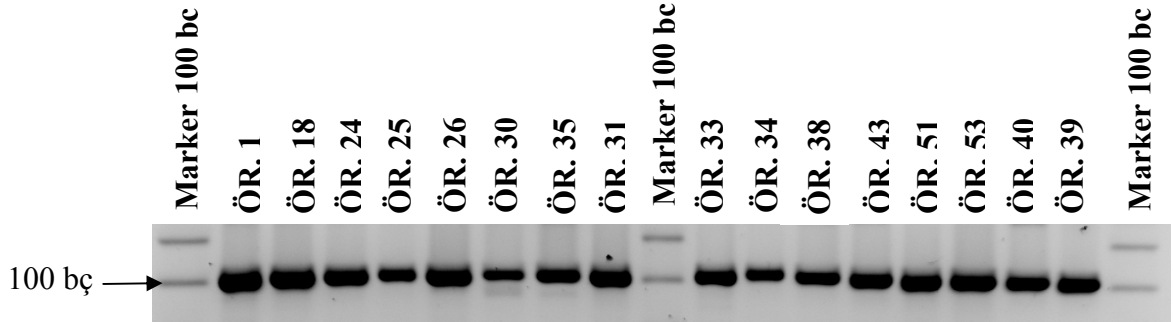
	MET	MET	H-MET	HMET	MET	H-MET	H-MET	H-MET	H-MET	UNMET	UNMET
CpG	Kontrol	K562	K562 1 $\mu$ M DAC	K562 5 $\mu$ M DAC	ÖR.18	ÖR.13	ÖR.27	ÖR.22	ÖR.25	ÖR.39	ÖR.42
1	M	U	-	-	M	-	M	M	-	U	U
2	M	M	-	U	M	M	-	U	M	U	U
3	M	M	M	-	M	M	M	U	M	U	U
4	M	M	M	-	M	M	U	U	M	M	-
5	M	M	M	-	M	M	M	U	M	U	U
6	M	M	M	M	M	M	U	U	U	M	U
7	M	M	M	-	M	U	U	M	M	M	U
8	M	U	U	-	M	M	U	U	U	U	U

9	M	M	U	U	M	M	M	U	U	U	U
10	M	M	M	M	M	M	M	U	M	U	U
11	M	M	M	M	M	M	U	M	M	M	U
12	M	M	U	-	M	M	M	U	M	U	U
13	M	M	M	M	M	U	U	U	U	U	U
14	M	M	M	M	M	M	U	U	U	U	U
15	M	M	M	-	M	M	U	U	M	U	U
16	M	M	M	-	M	M	M	U	U	M	U
17	M	M	M	M	M	U	U	U	U	U	U
18	M	M	M	M	M	U	M	U	U	U	U
19	M	M	M	M	M	M	M	U	U	U	U
20	M	M	M	M	M	U	U	U	U	U	U
21	M	M	M	-	M	U	U	M	U	U	U
22	M	M	U	U	M	M	U	U	U	U	U
23	M	M	M	-	M	M	M	M	U	U	U
24	M	M	M	M	M	U	M	M	U	U	M
25	M	M	M	M	M	M	M	M	U	M	U
26	M	M	M	M	M	M	U	M	U	M	U
27	M	M	M	M	M	M	M	M	M	U	M
28	M	M	M	M	M	M	M	U	M	U	M
29	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
30	M	M	M	U	M	M	U	M	U	U	-
31	M	M	M	M	M	M	U	M	U	U	U
32	M	M	M	M	M	U	U	M	U	U	M
33	M	M	M	M	M	M	U	M	U	M	U
34	M	M	M	U	M	U	U	M	U	U	U
35	M	M	M	M	M	U	M	M	U	U	U
36	M	U	U	U	M	U	M	M	U	U	U
37	M	M	U	U	M	U	U	M	U	U	U
38	M	M	M	M	M	U	U	U	U	U	U
39	M	M	M	M	M	M	U	M	U	M	U
40	M	M	M	M	M	M	U	U	U	U	-
41	M	M	M	M	M	U	U	M	M	-	U
42	M	M	U	U	M	U	U	M	U	U	U
43	M	M	M	M	M	U	U	U	U	U	M
44	M	M	M	M	M	U	M	U	U	U	U
45	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	U
46	M	M	M	M	M	U	U	U	U	U	U
47	M	M	M	M	M	M	M	M	U	M	U
48	M	M	U	M	M	U	U	M	U	U	U
49	M	M	M	U	M	U	U	U	U	-	U
50	M	M	M	M	M	M	U	U	U	M	U
51	M	M	M	M	M	M	M	U	U	U	U
52	M	M	M	M	M	M	U	M	U	U	U
53	M	M	M	U	M	U	U	U	U	M	-
54	M	M	M	M	M	U	U	M	U	M	U

55	M	M	M	U	M	M	U	U	U	U	U
56	M	M	M	M	M	U	U	U	U	M	U
57	M	-	M	M	M	U	M	M	M	-	U
yeni CpG	-	1	-	1	-	3	1	-	1	2	3

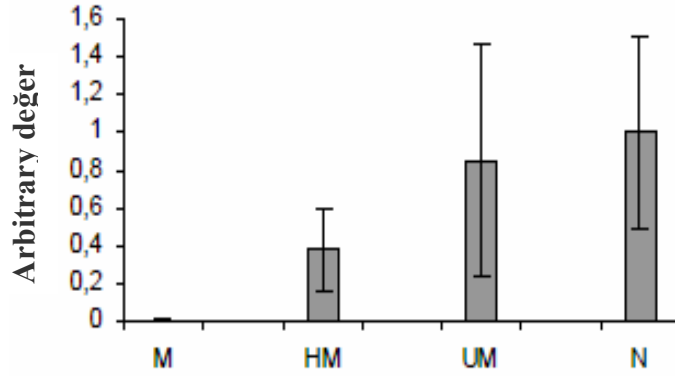
#### 4.4.GEN İFADESİNİN ANALİZİ:

Normal ve hasta kemik iliği örnekleri ve K562 hücre hatlarının RNA'larından ters transkriptaz ile sentezlenen cDNA örnekleri gen ifadesinin analizi için kalıp olarak kullanıldı. Normal kemik iliği hücrelerinde sFRP1 geninin mRNA ekspresyon düzeyini saptamak için yapılan reaksiyonlarda,  $\beta$ -aktin geni iç kontrol ve referans gen olarak kullanıldı. Tüm örnekler büyüklük ve özgül olmayan amplifikasyonlar açısından kontrol için %2'lik agaroz jelde yürütüldü (Şekil 4.43). Göreceli kantifikasyonun analiz aşamasında "Light Cycler Software version 4.0.0.23" kullanıldı ve kalibratör olarak normal kemik iliği kullanıldı.



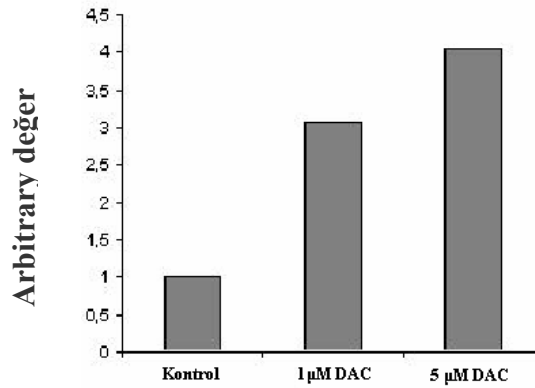
Şekil 4.43. Gen ifadesinin analizi için yapılan PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü.

Normal kemik iliğinde eksprese olan sFRP1 geninin, KML hastalarındaki ekspresyonları incelendi. Metile olmayan, hemimetile ve metile olan hastalarda göreceli ekspresyon düzeyi normal kemik iliği ile kıyaslandı. Hem normal kontrollerde hemde metile olmayan hastalarda ekspresyon düzeyleri arasında çok önemli bir farklılık saptanmadı. Metile olmayan hastalar ve normal kontroller ile kıyaslandığında, hemimetile hastalarda ekspresyon düzeyinde 10 kat azalma olduğu gözlemlendi ve metile olan hastada sFRP1 ekspresyon düzeyi yok denecek kadar düşüktü (Şekil 4.44).



**Şekil 4.44.** Normal kontroller ile kıyaslandığında metile, hemimetile ve metile olmayan hastalardaki sFRP1 ekspresyonun düzeyleri. Normal kemik iliğinde gerçekleştirilen relatif kantifikasyon reaksiyonundan sonra mRNA ekspresyonunun “arbitrary değeri (1)” olarak saptandı.

K562’de RT-PCR sonucunda mRNA ekspresyon düzeyinin çok düşük olduğu gözlemlendi. Promotör metilasyonunun, sFRP1’in ekspresyonunun baskılanmasına neden olup olmadığını belirlemek için demetilasyon ajanı kullanarak, K562 hücrelerinde sFRP1 ekspresyonuna bakıldı. 1µM ve 5µM DAC ile muamele edilen ve muamele edilmeyen kontrol K562 hücrelerinden elde edilen total RNA kullanarak, semikantitatif RT-PCR yapıldı. Göreli kantitasyon için β-aktin geni iç kontrol olarak ve referans gen olarak kullanıldı. DAC ile muamele edilmiş K562 hücrelerinde ekspresyonun doz bağımlı artışı gözlenirken, kontrolde çok düşük düzeyde sFRP1 ekspresyonunun saptanması, promotör metilasyonunun genin düzenlenmesinin bozulmasında etkin olduğunu gösterdi (Şekil 4.45).



**Şekil 4.45.** Kontrol (muamele edilmeyen K562) ve 1µM ve 5 µM DAC ile muamele edilmiş K562 hücreleri. Muamele edilmemiş K562 hücrelerinde gerçekleştirilen relatif kantifikasyon reaksiyonundan sonra mRNA ekspresyonunun “arbitrary değeri (1)” olarak alındı.

#### **4.5. PHILADELPHIA KROMOZOMU VE HASTALIK PROGRESYONU İLE SFRP1 METİLASYONUNUN İLİŞKİSİ**

Yapılan epigenetik analizler sonucunda kronik faz KML’de, sFRP1 promotör metilasyonunun yoğun olmadığı saptandı. Ancak sFRP1 promotör bölgesinin metilasyon durumu ve sitogenetik remisyonu arasında dikkat çekici bir ilişki olduğu gözlemlendi. sFRP1 promotör bölgesi için metile olmadığı saptanan 41 hastanın bir yıllık imatinib tedavisinden sonra tam veya major sitogenetik remisyon kazanmış oldukları belirlendi. 6 hemimetile hastanın 5’inde (%83) aynı zaman sürecinde (%50 -%100 Ph +) kısmi remisyon gözlendi veya hiç remisyon gözlenmedi. Bir metile hastada, önemli derecede ekspresyon azalışı ve ikinci Ph kromozomunu içeren ek anormaliler ile birlikte sitogenetik progresyon gözlendi. Sadece bir hasta AML fenotipi ile blast krize ilerlemektedir (Tablo 4.5). Böylece sFRP1 metilasyonu, her ne kadar nadir olsa da, tedaviye sitogenetik direnç ve hastalık progresyonu ile ilişkilidir.

**Tablo 4.5.** sFRP1 promotöründe metile hastaların sitogenetik verileri (Veriler Kemik iliği sitogenetik analiz sorumlusunun izni ile kullanılmıştır):

<b>Metilasyon Durumu</b>	<b>Diagnosis esnasında hastaların kemik iliği sitogenetik sonucu</b>	<b>1 yıl takipten sonra hastaların kemik iliği sitogenetik sonucu</b>
Hemimetile	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[7]	46,XX[25]/ 46,XX,t(9;22)(q34;q11)[1]
Hemimetile	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[15]	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[22]
Hemimetile	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[50]	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[20]
Hemimetile	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[10]	46,XX[16]/ 46,XX,t(9;22)(q34;q11)[9]
Hemimetile	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[25]	46,XX [11]/46,XX, t(9;22)(q34;q11)[6]
Hemimetile	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[15]	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[20]
Metile	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[10]	46,XX,t(9;22)(q34;q11),+13, +der(22)t(9;22)(q34;q11),+mar[8]/ 46,XX,t(9;22)(q34;q11)[2]



## 5. TARTIŞMA

Wnt sinyal iletimi, birçok dokuda hücre kaderinin belirlenmesi, yaşama, çoğalması ve hareketliliğinde önemli rolleri bulunan bir sinyal iletim yolağı olarak bilinmektedir(42). Yapılan çalışmalar ile Wnt sinyal iletiminin, sadece gelişimi değil aynı zamanda erişkin homeostazisini de kontrol ettiği gösterilmiştir.

Wnt sinyal iletimi, canonical ve noncanonical olmak üzere ikiye ayrılır. Canonical yolak,  $\beta$ -katenin yıkılımının engellenmesinden sorumludur. Wnt-Frizzled reseptör birleşimi,  $\beta$ -katenin'in stabilizasyonu ve nükleusa geçişi ile sonuçlanır. Nükleusta  $\beta$ -katenin'in birikimi, c-myc ve cyclin D1 gibi hedef genlerin transkripsiyonlarına neden olmaktadır(95).

Wnt sinyal iletiminde meydana gelen bozukluklar, başta kanser olmak üzere pek çok hastalıkla ilişkilidir (42). Solid tümör ve lösemi gelişiminin,  $\beta$ -katenin stabilizasyonu ile ilişkili olduğunu gösteren çok sayıda veri bulunmaktadır. Lösemnin doğası solid tümörlerden farklıdır. Erişkin organizmanın hematopoetik sistemi, hematopoetik kök hücrelerin (HKH) küçük popülasyonlarından farklılaşarak yenilenen ve genelde kısa yaşam süresine sahip hücrelerden oluşur. Pek çok lösemi, onkogenik füzyon ürünleri ile sonuçlanan özgül kromozomal translokasyonlarla ilişkilidir. Giderek artan veriler, Wnt sinyal iletiminin normal hematopoetik sistem hücrelerinin kendi kendini yenileme özelliklerinde önemli bir rolü bulunduğunu göstermektedir. Hematopoetik kök hücre ve öncüllerinde bu sinyal iletim yolağındaki bozuklukların, lösemiye neden olabileceği belirtilmiştir (95,73).

Özellikle son zamanlarda hatalı Wnt sinyal iletiminin, hem lenfoid hemde miyeloid lösemilerde etkili olduğunu gösteren yayınlar bulunmaktadır. Lösemiler akut ve kronik olmak üzere sınıflandırılabilirler. Lösemnin bu her iki tipinde de gelişen hücrelerin düzenlenmesinde Wnt sinyal iletiminin etkili olduğu gözlenmiştir (96).

Kronik miyeloid lösemi, pluripotent kök hücrelerin neoplastik transformasyonundan kaynaklanan klonal miyeloproliferatif bir hastalıktır. Klinik olarak granüositlerin aşırı üretimi ile karakterizedir. Kronik faz ile başlayan, miyeloproliferatif ve terminal blast krize ilerleyen üç fazdan oluşmaktadır. Philedelphia kromozomu der(22)t(9;22)(q34;q11), KML'nin belirleyicisidir. Bu translokasyon, kromozom 9'un uzun kolundaki ABL protoonkogeninin, 22. kromozomdaki BCR genine füzyonu ile sonuçlanır. Kimerik BCR-ABL geni KML'deki başlıca genetik bozukluktur. Fakat diğer ek mutasyonların ve/veya epigenetik modifikasyonların birikimi hastalığın progresyonunun blast krize ilerleyişi için gereklidir (59).

Kontrolsüzleşmiş Wnt sinyal iletiminin, hematolojik malignansilerdeki rolü ilk olarak KML’de tanımlanmıştır (69).  $\beta$ -katenin’in birikimi ve KML’de canonical yolağın aktivasyonu ile ilgili çalışmalar, hastalığın patogenezinde bu yolağın bozulmasının önemli bir rolü olduğunu düşündürmektedir (42,55,69).  $\beta$ -katenin’in nükleer birikimi, HKH’lerde sınırlıdır. Blastik krizde olan veya tedaviye direnç gösteren KML hastalarından elde edilen granülosit makrofaj öncülleri de, ilginç bir şekilde normalde böyle bir kapasiteleri olmamalarına rağmen, kendi kendini yenileme özelliğine sahiptirler (42,73). Ek olarak, invitro çalışmalarda Axin’in aşırı ekspresyonu tarafından  $\beta$ -katenin’in baskılanması, lösemi hücrelerinin “replate” kapasitelerini düşürür. Bu da kronik miyeloid lösemi öncüllerinin, gelişim ve kendi kendini yenileyebilme özellikleri açısından Wnt sinyal iletimi ile bağlantılı olduğunu ortaya koymaktadır (96).

Hastalığın progresyonuyla, granülosit makrofaj öncülleri  $\beta$ -katenin yolağının aktivasyonu sonucu, kendi kendini yenileme özelliği kazanır. Sonuç olarak farklı biyolojik özelliklere sahip iki Ph (+) lösemik kök hücre havuzu oluşur (31).

Bunlara ek olarak normal BCR proteininin, Wnt sinyal iletiminin negatif düzenleyicisi olarak işlev gösterdiği rapor edilmiştir (31). Ayrıca BCR-ABL onkogeninin,  $\beta$ -katenin’i spesifik tirozin rezidülerinden fosforilleyerek stabilize ettiği ve normal proteine göre ters aktivite gösterdiği saptanmıştır (71). Tüm bu veriler hastalık patogenezinde Wnt sinyal ileti bozukluklarının önemli bir yer tuttuğunu göstermektedir.

sFRP ailesi, Wnt sinyal iletiminin negatif düzenleyicileri olarak tanımlanmışlardır. sFRP’ler yapısal olarak Frizzled ile benzerlik göstermektedirler. Frizzled proteinindeki CRD domainine benzer domainleri aracılığı ile Wnt proteinlerine bağlanarak, ligant bağımlı Wnt sinyal iletimini engelledikleri bilinmektedir (96,97).

sFRP’ler gibi Wnt sinyal iletiminin antagonistlerinin baskılanması, Wnt sinyal iletiminin sürekli aktivasyonuna neden olmaktadır. Wnt sinyal iletiminin sürekli aktivasyonunun kanser sürecinde çok önemli rolleri olduğu bilindiğine göre, belki de sFRP genlerinin sessizleşmesi bu aktivasyona ve dolayısıyla kanser gelişimine neden olan etkili bir mekanizma olabilir. sFRP ailesinden sFRP1 geninin, epigenetik sessizleşmesi aracılığı ile canonical Wnt sinyal iletiminin sürekli aktivasyonuna neden olduğu birçok yayında gösterilmiştir. Birçok kanser ve lösemide, özellikle tümör baskılayıcı genlerin promotör bölgesindeki metilasyon, gen sessizleşmesi için bilinen bir mekanizmadır. sFRP genlerinin

ekspresyonlarının baskılanmasının açıklanmasında bu mekanizmanında rol oynayabileceği ileri sürülmüştür (74,98).

Çalışmamızda, kronik miyeloid lösemi hastalarında sFRP1 geninin promotör bölgesinde, genin transkripsiyonel sessizleşmesine neden olabilecek olası genetik ve epigenetik değişikliklerin var olup olmadığı araştırıldı. sFRP1 geninde olası genetik değişikliklerin saptanmasına yönelik literatürde yayınlanmış çok az çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalar; 2004 yılında Germaine M.Caldwell ve arkadaşları tarafından kolorektal kanserde ve Maria Garcia-Hoyos ve arkadaşları tarafından retinal distrofi'de yapılmıştır. Caldwell ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, sFRP1 geninde iki ayrı noktada tek baz içeren delesyon (26delG ve 67delG) ve stop kodonda da bir baz değişikliği (G450A) olduğunu saptamışlardır. Delesyonların 1.ekzonda yerleşim gösterdiğini ve bunun CRD domaini içerisinde oluşması nedeniyle, Wnt aktivasyonunda etkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir. İkinci ve üçüncü ekzonda ise herhangi mutasyona rastlamamışlardır. Yine aynı çalışmada 1.ekzonda sFRP1 allelinde nükleotid 37'den sonra protein dizisinde ekstra alanin'in varlığına neden olan üç bazlık bir eklenme bulmuşlardır. 153 bireyde bu eklenmenin varlığını araştırmışlardır; 51 kolorektal kanser hastasının 18'inin (%35), 102 kolorektal kanseri olmayan bireyin 32'sinin (%31) polimorfizm olarak tanımladıkları bu değişikliği taşıdığını ileri sürmüşlerdir (14).

Hoyos ve arkadaşlarının çalışmasında ise, kalıcı iki genetik değişiklik saptanmış ve iki farklı SNP (Single nucleotide polymorphism) (c.1352G>A ve IVS2+60 C>T) ile karakterize edilmiştir. Bunların her ikisinin de genin kodlanmayan bölgesinde lokalize olduğunu belirtmişlerdir. Birincisinin ikinci intronda, ikincisinin ise üçüncü ekzonun kodlanmayan bölgesinde yer aldığı gösterilmiştir. sFRP1 proteininin ilk alfa heliksinde bulunan ve birinci ekzonda ardışık iki kodondaki (13 ve 14) iki alanini etkileyen önemli bir delesyon (357delAGC) bulunduğunu saptamışlardır. Toplam 325 bireyde yapılan çalışmada bu değişikliğin normal populasyonun %30'unda, retinal distrofi hastalarının ise % 33'ünde saptandığı belirtilmiştir. Fakat delesyondan sonra oluşan yeni kodonda alanin aminoasidini kodladığı, bu nedenle yapısal veya fonksiyonel değişiklik oluşturmadığı öne sürülmüştür. Yapılan çalışmalar, bu üç değişikliğin patojenik etkisinin olmadığını ve herhangi bir önemli fonksiyona sahip olmadıklarını göstermiştir (37).

Projemizde; KML hastalarında sFRP1 promotör bölgesinde transkripsiyonu etkileyebilecek olan herhangi bir mutasyonun varlığını saptamak amacı ile iki yönlü genomik DNA dizi analizi yaptırıldı. 48 KML hastasında herhangi bir mutasyona rastlanılmadı. Ancak 48 hastanın 24'ünde, daha önceki mutasyon çalışmalarında belirtilen polimorfizm gözlemlendi. Bu üç nükleotidlik delesyon açısından üç hastanın homozigot olduğu, diğerlerinin ise heterozigot olduğu saptandı. Çalışma grubumuzun %50'sinin bu üçlü nükleotid delesyonunu taşıdığı gözlemlendi. Yapılan iki yönlü dizi analizi sonucunda bu değişikliğin, -transkripsiyonun başlama bölgesi 1 kabul edildiğinde- 38, 39, 40. nükleotidlerde (CAG) çerçeve delesyonuna neden olduğu gözlemlendi. Bu üç nükleotidlik delesyon, ardarda gelen alanin rezidülerini kodlayan, kodon 13 ve 14'ü etkilemektedir. Delesyon sonrasında oluşan kodon, yine alanin aminoasidini kodlamaktadır. KML hastalarından ve normal bireylerden elde ettiğimiz DNA dizi analizi sonuçları, Germaine M.Caldwell ve Maria Garcia-Hoyos'un sonuçlarından mutasyonların yerleşimi ve normal, hasta popülasyonlarında gözlenme oranları açısından farklılık göstermektedir. Mutasyon yerleşimindeki farklılığın, diğer grupların tek yönlü DNA dizi analizi yaptırmalarından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Bunun nedeni; tek yönlü dizi analizi sonrasında elde edilen verilerin diğer iki gruptakine benzer olmasıdır. Ancak iki yönlü DNA dizi analizi ile net bir biçimde mutasyonların yerleşimi belirlenmektedir. Bizim verilerimiz ile daha önceden belirtilen veriler arasında farklılıklar olmasına rağmen, bu polimorfizmin farklı popülasyonlarda yüksek sıklıkta korunduğu her üç çalışmada da gösterilmiştir.

sFRP1 geninin promotör bölgesinin hipermetilasyonu ve paralelinde gen ekspresyonu azalışının, farklı lösemi tipleri ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Wnt sinyal iletimi bozukluğunun Akut miyeloid lösemi, akut lenfositik lösemi, kronik lenfositik lösemi ve kronik miyeloid lösemide gözlemlendiği belirtilmiştir (74,76). Ancak şu ana kadar KML'de sFRP1 geninin hipermetilasyonu üzerine yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu nedenle KML hastalarında, sFRP1'in promotör bölgesi hipermetilasyonu aracılığıyla sessizleşerek sürekli Wnt sinyal iletiminin aktivasyonuna neden olmasının, hastalığın patogenezinde etkili olabileceği düşünüldü. Bu amaçla; 48 kronik faz KML hastasında ve 10 normal bireye ait kemik iliğinde, MS-PCR ile sFRP1 promotör bölgesinin metilasyon durumu araştırılmıştır. Sadece bir hastada, sFRP1 promotör bölgesinin metile olduğu, 6 hastanın hemimetile olduğu ve 41 hastanın ise metile olmadığı saptandı. Elde edilen sonuçlara göre kronik faz KML hastalarında sFRP1 promotör metilasyonunun sık olmadığı gözlemlendi.10

normal kemik iliği örneğinin sadece bir tanesinin hemimetile olduğu, dokuzunun metile olmadığı saptandı. Normal kemik iliğinde gözlediğimiz hemimetilasyonun, bisülfid modifikasyonundan kaynaklı bir kalıntı(artifak) olabileceği veya donöre özgül tahmin edilemeyen sebeplerle (viral enfeksiyon, hormonal durum, ilaç, diet vs.) oluşmuş olabileceği düşünülmektedir.

Metile, hemimetile ve rasgele seçilen iki metile olmayan hastanın MS-PCR sonuçlarını kontrol etmek amacı ile bisülfid PCR ürününe dizi analizleri yaptırılmıştır. Bisülfid PCR için kullandığımız PCR primerlerimizin kapsadığı bölgede, 57 adet CpG bölgesinin var olduğu gözlenmiştir. MS-PCR ile metile olduğunu saptadığımız hastada bisülfid dizi analizi sonucunda, 57 CpG bölgesinde metile olduğu gözlenmiştir. Altı hemimetile hastada, metile olan 15 ile 47 arasında değişen CpG bölgeleri saptanmıştır. İki metile olmayan hastanın ise 6 ve 15 adet metile CpG bölgesi içerdikleri gözlenmiştir. Önceden metile olmadığı saptanan bu iki hastada çok düşük düzeyde de olsa metile CpG bölgeleri saptanması, MS-PCR için kullanılan primerlerin sınırladığı alan dışında kalan bölgedeki CpG'leri içermesinden kaynaklanmaktadır. MS-PCR için kullanılan primerlerin sınırladığı bölgede, 12 adet CpG bölgesi bulunmaktadır. Bisülfid dizi analizi sonucunda önceden metile olmadığını saptadığımız iki hastanın birinde 12 CpG'inin 1'inin, diğer hastada ise 2'sinin metile olduğu gözlenmiştir. Bu iki hastada gözlenen diğer metile CpG 'ler bu alanın dışında bulunan CpG bölgeleridir. Bununla birlikte, sFRP1 promotör bölgesinde referans dizisi ile kıyaslandığında yeni oluşan ve kaybolan CpG bölgelerinin olduğu saptanmıştır. Bu CpG sayılarında ve yerleşimlerinde uyumsuzluk olması, düşük düzeydeki metilasyonları değerlendirirken bisülfid muamelesinden kaynaklandığını düşündüğümüz kalıntıların unutulmaması gerektiğinin göstergesidir.

Hastalarda sFRP1'in ekspresyon düzeylerini incelediğimizde, hemimetile hastalarda normal bireylere göre on kata kadar azalma olduğu ve metile olan hastada ise sFRP1 geninin ekspresyonunun olmadığı saptanmıştır. Bu verilere dayanarak, metilasyona bağlı sFRP1 promotör sessizleşmesinin kronik faz KML'de belirli bir fenomen olmadığı sonucuna varılmıştır.

Ancak hastalardaki sFRP1 promotör bölgesinin metilasyon durumu sitogenetik remisyon ile kıyaslandığında ilgi çekici bir gözlem ortaya çıkmıştır. sFRP1 bölgesi için metile olmadığını bildiğimiz 41 hastada, imatinib tedavisinden bir yıl sonra tam veya major sitogenetik remisyon kazanıldığı gözlenmiştir. Altı hemimetile hastanın beş tanesi (%83)

sadece parsiyel sitogenetik yanıt verirken veya hiç yanıt vermezken, metile olan hastanın ek kromozomal anomaliler ile sitogenetik ilerleme gösterdiği ve blastik krize yöneldiği gözlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, sFRP1 geninin promotör metilasyonu veya hemimetilasyonunun, biyolojik olarak stabil olmayan alt grupların indikatörü olabileceği düşünülmüştür. Diğer mutasyonlarla birlikte, metile olarak saptadığımız hastada, epigenetik değişikliklerin hücelere proliferatif avantaj sağlayarak hücrelerin klonal seleksiyonuna neden olduğu ve hücrelerin tedaviye direnç gösterme yeteneği kazandırdığını düşünmekteyiz.

Blastik krizdeki KML hastasından elde edilen K562 hücre hattı çok sayıda kompleks sitogenetik anormaliye sahiptir. Eğer sFRP1 promotör metilasyonu, hastalığın biyolojik olarak daha ileri forma ilerlemesinde göze çarpan bir faktör ise, bu hücre hattında da sFRP1 promotör metilasyonunun gözlenmesi gerektiği düşünülmüştür. Yapılan bisülfid dizi analizinde K562 hücrelerinde 57 CpG bölgesinin 53'ünün metile olduğu ve RT-PCR analizinde mRNA ekspresyonlarının çok düşük olduğu gözlenmiştir. Eğer promotör metilasyonu, sFRP1 ekspresyonunun baskılanmasına neden oluyor ise, bu hücreler demetile edici bir ajan [5-aza deoxycytidine (DAC)] ile muamele edildiklerinde ekspresyon düzeylerinde değişiklik olması gerekmektedir. Bu amaçla K562 hücrelerini, 1µM ve 5 µM DAC ile muamele ederek metilasyon ve ekspresyon düzeylerine bakılmıştır. DAC ile muamele edilmiş K562 hücrelerinde ekspresyonda doza bağımlı artış gözlenirken, DAC ile muamele edilmemiş K562 hücrelerinde çok düşük düzeyde ekspresyon olduğu gözlenmiştir. Normalde K562 hücreleri metile iken, DAC ile muamele edilmiş K562 hücrelerinde metilasyonun azaldığı gözlenmiştir. Yapılan bisülfid dizi analizinde, 1µM DAC'da metile olan CpG sayısı 47 iken ve 5 µM DAC' la muamele edilen K562 hücrelerinde 35 CpG bölgesinin metile olduğu gözlenmiştir.

Verilerimize göre; KML hastalarında, canonical Wnt sinyal iletiminin aktivasyonu için epigenetik değişikliklerin olası bir mekanizma sağlayabileceği düşünülebilir. sFRP1 normalde, granülosit makrofaj öncüllerinde β-katenin ekspresyonunun baskılanmasında temel role sahiptir. sFRP1'in HKH'lerde ve öncüllerin farklılaşmalarındaki rolünü kanıtlamak için ileri araştırmalara gereksinim bulunmaktadır.

Çalışmamız sonunda elde ettiğimiz verilerle, tedaviye direnç gösteren KML hastalarında, blastik krize ilerleyişin belki de sFRP1 geninde gözlenen promotör metilasyonu tarafından açıklanabileceğini düşünmekteyiz. Hastalığın ilerleyen fazlarında, yeni ajanlar ve

stratejilerin dizaynında potansiyel bir yanıt oluşturabilen bu biyolojik farklılığı doğrulamak için, daha fazla hasta grubunda çalışmaya ihtiyacımız bulunmaktadır.

## 6. KAYNAKÇA

1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=604156>
2. Ugolini F, Charafe-Jauffret E, Bardou VJ, Geneix J et al. WNT pathway and mammary carcinogenesis: Loss of expression of candidate tumor suppressor gene SFRP1 in most invasive carcinomas except of the medullary type. *Oncogene*, 2001;20:5810-5817.
3. Coudreuse D, Korswagen HC. The making of Wnt: new insights into Wnt maturation, sorting and secretion. *Development*, 2007;134:3-12.
4. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004;20:781- 810.
5. Widelitz R. Wnt signaling through canonical and non-canonical pathways: Recent progress. *Growth Factors*, 2005;23:111-116.
6. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes & Dev*, 2000;14:1837-1851.
7. Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Research*, 2005;15:28-32.
8. Nojima M, Suzuki H, Toyota M, Watanabe Y et al. Frequent epigenetic inactivation of SFRP genes and constitutive activation of Wnt signaling in gastric cancer. *Oncogene*, 2007;26: 4699–4713.
9. Willert K, Nusse R.  $\beta$ -catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Current Opinion in Genetics & Development*, 1998;8: 95–102.
10. Schlange T, Matsuda Y, Lienhard S, Huber A et al. Autocrine WNT signaling contributes to breast cancer cell proliferation via the canonical WNT pathway and EGFR transactivation. *Breast Cancer Research*, 2007;9:R63.
11. Taketo MM. Shutting down Wnt signal–activated cancer. *Nature Genetics*, 2004;36:320-322.
12. Willert K, Jones KA. Wnt signaling: is the party in the nucleus?. *Genes & Dev*, 2006;20:1394-1404.
13. Kohn AD, Moon RT. Wnt and calcium signaling:  $\beta$ -catenin-independent pathways. *Cell Calcium*, 2005;38:439-446.
14. Caldwell GM, Jones C, Gensberg K, Jan S et al. The Wnt Antagonist sFRP1 in Colorectal Tumorigenesis. *Cancer Research*, 2004;64:883–888.
15. Cadigan KM. Wnt signaling – 20 years and counting. *Trends in Genetics*, 2002;18:340-342.



16. Veeman MT, Axelrod JD, Moon RT. Review A Second Canon: Functions and Mechanisms of  $\beta$ -Catenin-Independent Wnt Signaling. *Developmental Cell*, 2003;5:367–377.
17. Montcouquiol M, Crenshaw EB, Kelley MW. Noncanonical Wnt signaling and neural polarity. *Annual Review of Neuroscience*, 2006; 29:363-386.
18. Uren A, Reichsman F, Anest V, Taylor WG et al. Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to Wingless and is a biphasic modulator of Wnt signaling. *J Biol Chem*, 2000;275:4374-4382.
19. Reya T. Regulation of Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal. *The Endocrine Society*, 2003;58:283-295.
20. Mikels AJ, Nusse R. Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene*, 2006;25:7461-7468.
21. Cadigan KM, Liu YI. Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci*, 2006;119:395-402.
22. Habas R, Dawid IB. Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier? *Journal of Biology*, 2005;4:2.1-2.4.
23. Shakoory A, Ougolkov A, Yu ZW, Zhang B et al. Deregulated GSK3 $\beta$  activity in colorectal cancer: its association with tumor cell survival and proliferation. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005;334:1365-1373.
24. Gumbiner BM. Carcinogenesis: A balance between  $\beta$ -catenin and APC. *Current Biology*, 1997;7:443–446.
25. Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt,  $\beta$ -Catenin, and Cadherin Pathways. *Science*, 2004;303:1483-1487.
26. Niehrs C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene*, 2006;25:7469–7481.
27. Krishnan V, Bryant HU, MacDougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *The Journal of Clinical Investigation*, 2006;116:1202-1209.
28. Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *J Cell Sci*, 2003;116:2627-2634.
29. Caldwell GM, Jones CE, Taniere P, Warrack R et al. The Wnt antagonist sFRP1 is downregulated in premalignant large bowel adenomas. *British Journal of Cancer*, 2006;94:922– 927.
30. Chuman Y, Uren A, Cahill J, Regan C et al. Identification of a peptide binding motif for secreted frizzled-related protein-1. *Peptides*, 2004;25:1831-1838.

31. Ress A, Moelling K. Bcr is a negative regulator of the Wnt signaling pathway. *EMBO Rep*, 2005;6:1095-1100.
32. Han X, Amar S. Secreted Frizzled-related Protein 1 (SFRP1) Protects Fibroblasts from Ceramide-induced Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004;279:2832–2840.
33. Esteve P, Trousse F, Rodríguez J, Bovolenta P. SFRP1 modulates retina cell differentiation through a  $\beta$ -catenin-independent mechanism. *Journal of Cell Science*, 2003;116:2471-2481.
34. Zou H, Molina JR, Harrington JJ, Osborn NK et al. Aberrant methylation of secreted frizzled-related protein genes in esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus. *Int. J. Cancer*, 2005;116:584–591.
35. Finch PW, He X, Kelley MJ, Üren A et al. Purification and molecular cloning of a secreted, Frizzled-related antagonist of Wnt action. *PNAS*, 1997;94:6770-6775.
36. Chong JM, Üren A, Rubin JS, Speicher DW. Disulfide Bond Assignments of Secreted Frizzled-related Protein-1 Provide Insights about Frizzled Homology and Netrin Modules. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002;277:5134–5144.
37. Garcia-Hoyos M, Cantalapiedra D, Arroyo C, Esteve P et al. Evaluation of SFRP1 as a candidate for human retinal dystrophies. *Mol Vis*, 2004;10:426-31.
38. Oberschmid BI, Dietmaier W, Hartmann A, Dahl E et al. Distinct Secreted Frizzled Receptor Protein 1 Staining Pattern in Patients With Hyperplastic Polyposis Coli Syndrome. *Arch Pathol Lab Med*, 2004;128:967-973.
39. Bafico A, Gazit A, Pramila T, Finch PW et al. Interaction of Frizzled Related Protein (FRP) with Wnt Ligands and the Frizzled Receptor Suggests Alternative Mechanisms for FRP Inhibition of Wnt Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999;274:16180–16187.
40. Dennis S, Aikawa M, Szeto W, d'Amore PA et al. A secreted Frizzled related protein, FrzA, selectively associates with Wnt-1 protein and regulates Wnt-1 signaling. *Journal of Cell Science*, 1999;112:3815-3820.
41. Dufourcq P, Couffinhal T, Ezan J, Barandon L et al. FrzA, a Secreted Frizzled Related Protein, Induced Angiogenic Response. *Circulation*, 2002;106:3097-3103.
- 42- Khan NI, Bendall LJ. Role of WNT signaling in normal and malignant hematopoiesis. *Histol Histopathol*, 2006;21:761-774.
43. Suzuki H, Gabrielson E, Chen W, Anbazhagan R et al. A genomic screen for genes upregulated by demethylation and histone deacetylase inhibition in human colorectal cancer. *Nat Genet*, 2002;31:141-149.
44. Zhong X, Desilva T, Lin L, Bodine P et al. Regulation of Secreted Frizzled-related Protein-1 by Heparin. *The Journal of Biological Chemistry*, 2007;282:20523–20533.

45. Huang J, Zhang YL, Teng XM, Lin Y et al. Down-regulation of SFRP1 as a putative tumor suppressor gene can contribute to human hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer*, 2007;7:1-15
46. Takada T, Yagi Y, Maekita T, Imura M et al. Methylation-associated silencing of the Wnt antagonist SFRP1 gene in human ovarian cancers. *Cancer Sci*, 2004;95:741–744.
47. Shih YL, Shyu RY, Hsieh CB, Lai HC et al. Promoter Methylation of the Secreted Frizzled-Related Protein 1 Gene SFRP1 is Frequent in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer*, 2006;107:579-590.
48. Bodine PVN, Billiard J, Moran RA, Ponce-de-Leon H et al. The Wnt Antagonist Secreted Frizzled-Related Protein-1 Controls Osteoblast and Osteocyte Apoptosis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2005;96:1212–1230.
49. Stoehr R, Wissmann C, Suzuki H, Knuechel R et al. Deletions of chromosome 8p and loss of sFRP1 expression are progression markers of papillary bladder cancer. *Laboratory Investigation*, 2004;84:465–478.
50. Joesting MS, Perrin S, Elenbaas B, Fawell SE et al. Identification of SFRP1 as a Candidate Mediator of Stromal-to-Epithelial Signaling in Prostate Cancer. *Cancer Res*, 2005;65:10423-10430.
51. Li CH, Amar S. Role of Secreted Frizzled-related Protein 1 (SFRP1) in Wound Healing. *J Dent Res*, 2006;85:374-378.
52. Fukuhara K, Kariya M, Kita M, Shime H et al. Secreted Frizzled Related Protein 1 Is Overexpressed in Uterine Leiomyomas, Associated with a High Estrogenic Environment and Unrelated to Proliferative Activity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2002;87:1729–1736.
53. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 2001;414:105-111.
54. Kleber M, Sommer L. Wnt signaling and the regulation of stem cell function. *Current Opinion in Cell Biology*, 2004;16:681–687.
55. Staal FJT, Clevers HC. WNT signalling and haematopoiesis: a WNT-WNT situation. *Nat Rev Immunol*, 2005;5:21-30.
56. Rabinowitz I, Larson RS. Chronic Myeloid Leukemia, Greer JP, Foerster J, Lukens JN. *WINTROBE'S Clinical Hematology*, 11.th edition, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2004, 2236-2252.
57. Radich JP. The Biology of CML Blast Crisis. *American Society of Hematology, Hematol Educ Program* 2007;2007:384-391.

58. Huntly BJP, Gilliland DG. Blasts from the past: new lessons in stem cell biology from chronic myelogenous leukemia. *Cancer Cell*, 2004;3:199-201.
59. Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M. European LeukemiaNet. Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*, 2007;370:342-350.
60. Brandon C, Eisenberg LM, Eisenberg CA. WNT signaling modulates the diversification of hematopoietic cells. *Blood*, 2000;96: 4132- 4141.
61. Radich JP, Dai H, Mao M, Oehler V et al. Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. *PNAS*, 2006;103:2794–2799.
62. Sercan HO, Eresen C, Yuksel E, Sercan Z et al. Molecular detection of bcr/abl m-RNA and cytogenetic analysis in CML patients: Comparison of results and factors affecting the methodologies used. *Turkish Journal of Cancer*, 1998; 28: 166-173.
63. Di Bacco A, Keeshan K, McKenna SL, Cotter TG. Molecular abnormalities in chronic myeloid leukemia: deregulation of cell growth and apoptosis. *Oncologist*, 2000;5:405-15.
64. [http://www.osmanilhan.com/kronik\\_miyelosit.pdf](http://www.osmanilhan.com/kronik_miyelosit.pdf)
65. Sessions J. Chronic Myeloid Leukemia in 2007. *Journal of Managed Care Pharmacy*, 2007;13:4-7.
66. Özçelik T. Kronik Miyeloid Lösemide İmatinib Tedavisi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 2004;30:63-66.
67. O'Dwyer, Gatter KM, Loriaux M, et al. Demonstration of Philadelphia chromosome negative abnormal clones in patients with chronic myelogenous leukemia during major cytogenetic responses induced by imatinib mesylate. *Leukemia*, 2003; 17:481-487.
68. Cooper GM, Hausman R.E. *The Cell: A Molecular Approach*, 3rd edition, Washington, Sinauer Associates Inc, 2004,622-623.
69. Jamieson CHM, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M et al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med*, 2004;351:657-667.
70. Clarke MF. Chronic myelogenous leukemia-Identifying the Hydra's Heads. *N Engl J Med*, 2004;351:634-636.
71. Coluccia AML, Vacca A, Dunach M, Mologni L et al. Bcr-Abl stabilizes  $\beta$ -catenin in chronic myeloid leukemia through its tyrosine phosphorylation. *The EMBO Journal*, 2007;26:1456–1466.
72. Sengupta A, Banerjee D, Chandra S, Banerji SK et al. Deregulation and cross talk among Sonic hedgehog, Wnt, Hox and Notch signaling in chronic myeloid leukemia progression. *Leukemia*, 2007;21:949–955.

73. Rattis FM, Voermans C, Reya T. Wnt signaling in the stem cell niche. *Curr Opin Hematol*, 2004;11:88-94.
74. Liu TH, Raval A, Chen SS, Matkovic JJ et al. CpG Island Methylation and Expression of the Secreted Frizzled-Related Protein Gene Family in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancer Res*, 2006;66:653-658.
75. Das PM, Singal R. DNA Methylation and Cancer. *The journal of Clinical Oncology*, 2004;22:4632-4642.
76. Gómez JR, Cordeu L, Agirre X, Velasco AJ et al. Epigenetic regulation of Wnt signaling pathway in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2006;09:1-29.
77. Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Agirre X, Prosper F et al. Lack of CpG island methylator phenotype defines a clinical subtype of T-cell acute lymphoblastic leukemia associated with good prognosis. *J Clin Oncol*, 2005;23:7043-7049.
78. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 2004;429:457-463.
79. Szyf M. DNA Methylation and Demethylation as Targets for Anticancer Therapy. *Biochemistry (Moscow)*, 2005;70:533-549.
80. Derks S, Lentjes MH, Hellebrekers DM et al. Methylation-specific PCR unraveled. *Cell Oncol*, 2004;26:291-299.
81. [www.mdanderson.org/images/meth\\_image\\_faq2.jpg](http://www.mdanderson.org/images/meth_image_faq2.jpg)
82. Bock C, Lengauer T. Computational epigenetics. *Bioinformatics*, 2008;24:1-10
83. Li LC, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*, 2002;18:1427-1431.
84. Robertson KD. DNA Methylation and Human Disease. *Nature*, 2005;6:597-610.
85. Gomez JR, Velasco AJ, Agirre X et al. Lack of CpG Island Methylator Phenotype Defines a Clinical Subtype of T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Associated With Good Prognosis. *Journal of Clinical Oncology*, 2005;23:7043-7049.
86. <http://research.dfci.harvard.edu/attractin/HMS/Epigenetics2006.ppt>
87. Gopisetty G, Ramachandran K, Singal R. DNA methylation and apoptosis. *Molecular Immunology*, 2006;43:1729-1740.
88. Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV et al. WNT and  $\beta$ -Catenin Signalling: Diseases and Therapies. *Nature*, 2004;5:689-699.

89. Sulewska A, Niklińska W, Kozłowski M et al. Detection of DNA methylation in eucaryotic cells. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 2007;45:315-324.
90. Clark SJ, Statham A, Stirzaker C et al. DNA methylation: Bisulphite modification and analysis. *Nature Protocols*, 2006;1:2353-2364.
91. [http://www.methods.info/Methods/DNA\\_methylation/Bisulphite\\_sequencing.html](http://www.methods.info/Methods/DNA_methylation/Bisulphite_sequencing.html)
92. Herman JG, Graff JR, Myöhänen S et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996;93:9821-9826.
93. <http://icbp.lbl.gov/breastcancer/celllines.php>
94. Rooney DE, Czepulkowski BH. *Human Cytogenetics: A Practical Approach: Malignancy and Acquired Abnormalities*. 3rd ed. New York: Oxford University Press Inc., 2001,39-83.
95. Sercan HO, Pehlivan M, Simsek O, Ates H, Sercan Z. Induction of apoptosis increases expression of non-canonical WNT genes in myeloid leukemia cell lines. *Oncol Rep*, 2007;6:1563-1569.
96. Reya T, Clevers H. Wnt signalling stem cells and cancer. *Nature*, 2005;434:843-850.
97. Suzuki H, Watkins DN, Jair KW et al. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nature Genetics*, 2004;36:417-422.
98. Lo PK, Mehrotra J, D'Costa A et al. Epigenetic Suppression of Secreted Frizzled Related Protein 1 (SFRP1) Expression in Human Breast Cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 2006;5:281-286.
99. Veeck J, Niederacher D, An H, Klopocki E et al. Aberrant methylation of the Wnt antagonist SFRP1 in breast cancer is associated with unfavourable prognosis. *Oncogene*, 2006; 25: 3479–3488.
100. Knudsen S. Promoter2.0: for the recognition of PolIII promoter sequences. *Bioinformatics*, 1999;15: 356-61.

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ  
KLİNİK VE LABORATUVAR ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU**

Tarih ve Sayı: 25.06.2007/233

**Etik Kurul Üyeleri**

Prof.Dr.Taner ÇAMSARI  
Prof.Dr.Tunç ALKIN  
Doç.Dr.M.Hakan ÖZDEMİR  
Doç.Dr.Ayça Arzu SAYINER  
Doç.Dr.Vesile ÖZTÜRK  
Doç.Dr.Mustafa SEÇİL  
Doç.Dr.Murat DUMAN  
Doç.Dr.Güven ASLAN  
Yard.Doç.Dr.Murat ÖRMEN  
Öğr.Gör.Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN  
Yunus KARSLI

**Etik Kurul Başkanı**

Prof.Dr.Taner ÇAMSARI

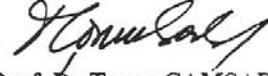
**Etik Kurul Sekreteri**  
Hatice İĞCİ

**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,**

Etik Kurulumuzun 21 Haziran 2007 tarih ve 15/16/2007 no.lu toplantısında, 220/2007 Protokol numaralı Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Yard.Doç.Dr.Ogün SERCAN'ın sorumlusu olduğu "**Salgılanan Frizzled ilişkili proteinlerin (sFRP) promotör bölgelerindeki genetik ve epigenetik değişikliklerin kronik miyeloid lösemi (KML) hastalarında araştırılması**" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.("Frezzed" kelimesinin yerine Türkçe anlamının ya da ifadesinin kullanılması uygun olacaktır)

Katılanların oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.



**Prof. Dr.Taner ÇAMSARI**  
Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları  
Etik Kurul Başkanı

Tel: 0232 412 22 54