



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**PEDİATRİK AKUT MYELOİD LÖSEMİ TEDAVİSİNDE  
KULLANILAN METİLPREDNİZOLON'UN  
DNA METİLASYONU  
ÜZERİNE ETKİSİ**

**Işıl YÜKSELEN**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU**

**2011- ANKARA**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PEDİATRİK AKUT MYELOİD LÖSEMİ TEDAVİSİNDE  
KULLANILAN METİLPREDNİZOLON'UN  
DNA METİLASYONU  
ÜZERİNE ETKİSİ**

**Işıl YÜKSELEN**

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU**

**Bu tez, Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Derneği - Terry Fox Kanser Araştırmaları  
Destekleri Fonu'na desteklenmiştir.**

**2011- ANKARA**

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Programı

Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından  
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 28/07/2011



Prof. Dr. Nuray ULUSU  
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Biyokimya Anabilim Dalı



Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı



Prof. Dr. Fulya TEKŞEN  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı



Doç. Dr. Aslıhan AVCI  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



Yrd. Doç. Dr. O. Sena AYDOS  
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında, AML’de sıklıkla metile olduğu bildirilen *p15*, *ER* ve anormal ekspresyonu görülen *BC1-2* ve *CDX2* genlerinin steroid tedavisi öncesi ve sonrası metilasyonuna bakılarak, metilprednizolonun etkisini, epigenetik yoldan gösterip göstermediğini araştırmaktır. Bu çalışmada, akut myeloid lösemi hücre serisi HL-60, hücre hattına metilprednizolon uygulanarak  $5 \times 10^{-3}$  etken doz saptandı ve 24. ve 48.saatlerdeki apoptotik ve farklılaşma etkisine bakıldı. Ayrıca, metilprednizolon uygulanmasını takiben hücrelerde akım sitometri analiziyle HL-60 hücrelerine özgü ve olgun myeloid hücre yüzey belirteçlerinin analizi ve apoptozis tayini Annexin V ile yapıldı. Yüksek ve etken doz olan  $5 \times 10^{-3}$ ’ün hücreleri farklılaşmaya götürdüğü ancak bunu epigenetik yolak mekanizmalarından biri olan DNA metilasyonu üzerinden yapmadığı saptandı. 6 yeni tanı AML hastasının tedavi öncesi ve sonrası kemik iliği örneklerinden yapılan analizler sonucu da ilacın etkisini DNA metilasyonu üzerinden göstermediğini doğruladı.

Bana tez çalışmamı yapma fırsatı tanıyan ve bu süreçte bilgisiyle, tecrübesiyle bana ışık tutan, desteğiyle hep yanımda olan sayın danışman hocam Prof.Dr. Asuman SUNGUROĞLU’na, çalışmalarımızı ortak yürüttüğümüz, örnek temini konusunda yardımlarını esirgemeyen ve her ihtiyacım olduğunda desteğini gördüğüm değerli hocam sayın Prof.Dr. Mualla ÇETİN’e, teşekkür ederim.

Akım sitometri analiziyle ilgili olarak bilgi birikimini paylaşan ve bize değerli zamanını ayıran Dr. Hande CANPINAR’a teşekkür ederim.

Tez çalışmamda kullandığım teknikleri öğrenmemde büyük emeği geçen, deneylerin her aşamasında büyük fedakarlıkla katkı veren Araştırma Görevlisi Tülin ÖZKAN’a teşekkür ederim.

Deneylerimin her aşamasında yardımlarını benden esirgemeyen Dr. Buket ALTINOK’a, Uzman Biyolog Aynur KARADAĞ’a ve Uzman Biyolog N. Seda ILGAZ’a ve Uzman Biyolog Gülşah ÖZTÜRK’e teşekkür ederim.

Bu tez çalışmamı hazırlamam sırasında bana verdikleri sonsuz destek, gösterdikleri fedakarlık ve anlayıştan dolayı canım anneme, babama ve kardeşime teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER	viii
ÇİZELGELER	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Akut Myeloid Lösemi	1
1.2. Pediatrik Akut Myeloid Lösemi	4
1.3. Epigenetik	9
1.3.1. DNA Metilasyonu	10
1.4. Kanserde DNA Metilasyonu	14
1.5. AML’de DNA Metilasyonu ve Anormal Gen İfadesi	16
1.5.1. AML’de DNA Metilasyonu	16
1.5.1.1. Östrojen Reseptörü (ER) Geni Promotor Metilasyonu	21
1.5.1.2. Siklin Bağımlı Kinaz 2B (CDKN2B/ P15) Geni Metilasyonu	22
1.6.2. AML’de Anormal Gen İfadesi	23
1.6.2.1. Caudal Type homeobox 2 (CDX2) Geninin İfadesi	23
1.6.2.2. B-hücreli lenfoma 2 (BCL-2) Geninin İfadesi	24
1.7. AML Tedavisinde Steroidlerin Kullanımı	25
2. GEREÇ VE YÖNTEM	30
2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar	30
2.1.1. Hücre Kültürü	30
2.2. Çalışma Grubu	31
2.2.1. HL-60 Hücre Serisi	32
2.3. HL-60 Hücre Serisinde Metilprednizolon Doz Denemeleri	32

2.3.1. [3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromid] (MTT) Sitotoksitate Testi	32
2.3.2. Akım Sitometri İle Apoptozis Tayini	33
2.3.2.1 Anneksin V ve Propidyum İyodür ile İşaretleme Protokolü	33
2.3.3. Akım Sitometri İle Farklılaşma Tayini	34
2.3.3.1. Akım Sitometride Hücre Yüzey Antijenleri İşaretleme Protokolü	34
2.4. DNA İzolasyonu	35
2.4.1. DNA'ların Spektrofotometrik Olarak Ölçümü	36
2.4.2. DNA'ların Jelde Görüntülenmesi	36
2.5. Metilasyon Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu (MSP)	37
2.5.1. Bisülfid Modifikasyon Protokolü	38
2.6. İstatistiksel Analiz	41
3. BULGULAR	42
3.1. HL-60 Hücre Serisinde Metilprednizolon Doz Denemeleri Sonucu	42
3.1.1. MTT Testi İle Sitotoksitate Tayini	42
3.1.1.1. MTT Sonuçlarının İstatistiksel Analizi	44
3.1.2. Akım Sitometri Analizi İle Apoptozis Tayini	44
3.2. DNA İzolasyonu	48
3.3. DNA Modifikasyonu	49
3.3.1. Metilasyon Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu	49
4. TARTIŞMA	60
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	72
ÖZET	74
SUMMARY	75
KAYNAKLAR	76

## SİMGELER VE KISALTMALAR

AML	Akut Myeloid Lösemi
MDS	Myelodisplastik sendrom
APL	Akut Promyleositik Lösemi
FLT-3	Fms-like tirozin 3
CBF $\beta$	Core Binding Factor
NPM	Nükleofosmin
WT1	Wilm's tümör
MP	Metilprednizolon
MDS	Myelodisplastik Sendrom
FAB	French-British-American
SAM	S-adenozilmetionin
MBD	Metil bağlayıcı proteinler
MGMT	Metilguanin-DNA metiltransferaz
CDH1	Kaderin-1
WHO	World Health Organization
ATRA	All-trans retinoik asit
İnv	İnversiyon
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNMT	DNA metiltransferaz
HDAC	Histondeasetilaz
GC	Glukokortikoid
GR	Glukokortikoid reseptör
GRE	Glukokortikoid reseptör elementleri
HDMP	High-dose methylprednislone
ER	Östrojen reseptörü
CDKN2B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B
HOX	Homeobox

CDX2	Caudal Type homeobox 2
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
CD	Cluster of Differentiation
PCR	Polimerase Chain Reaction
MSP	Metilasyon Spesifik PCR
PI	Propidyum İyodür
DMSO	Dimetilsülfoksit
FBS	Fetal Bovine Serum
-CH <sub>3</sub>	metil grubu
$\alpha$	alfa
$\mu$ l	mikrolitre
ml	mililitre
mg	miligram
g	gram
NaOH	Sodyum Hidroksit
EtOH	Etil alkol
M	Molar



## ŞEKİLLER

<b>Şekil 1.1.</b>	Sitozin Metilasyonu	11
<b>Şekil 1.2.</b>	Metilasyonun oluşumu ve devamlılığı	11
<b>Şekil 1.3.</b>	Aktif ve İnaktif promotorların Kromatin Yapısı	13
<b>Şekil 1.4.</b>	Ökaryotlarda transkripsiyonunun normal kontrolü	14
<b>Şekil 1.5.</b>	Hücrelerde tümör oluşum mekanizması	15
<b>Şekil 1.6.</b>	Tümör baskılayıcı genlerin bialelik inaktivasyon mekanizmaları	16
<b>Şekil 1.7.</b>	BCL-2'nin apoptozis, nekroz ve otofajiyi baskılama mekanizması	24
<b>Şekil 2.1.</b>	Bisülfid muamelesi sonucunda oluşan deaminasyon tepkimesi Kristansen ve Hansen,2009	38
<b>Şekil 3.2.</b>	Metilprednizolon uygulanan hücrelerin CD13 antikoruna ile akım sitometri analiz sonuçları	46
<b>Şekil 3.3.</b>	Metilprednizolon uygulanan hücrelerin CD33 antikoruna ile akım sitometri analiz sonuçları	47
<b>Şekil 3.4.</b>	Metilprednizolon uygulanan hücrelerin CD11b antikoruna ile akım sitometri analiz sonuçları	47
<b>Şekil 3.5.</b>	Metilprednizolon uygulanan hücrelerin HLA-DR antikoruna ile akım sitometri analiz sonuçları	48
<b>Şekil 3.6.</b>	DNA'ların %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri	48
<b>Şekil 3.7.</b>	P15 geninin MSPCR sonucu elde edilen ürünlerinin %2'lik jelde görüntülenmesi	51
<b>Şekil 3.8.</b>	ER geninin MSPCR sonucu elde edilen ürünlerinin %2'lik jelde görüntülenmesi	53
<b>Şekil 3.9.</b>	CDX2 geninin MSPCR sonucu elde edilen ürünlerinin %2'lik jelde görüntülenmesi	56
<b>Şekil 3.10.</b>	BCL-2 geninin MSPCR sonucu elde edilen ürünlerinin %2'lik jelde görüntülenmesi	58

## ÇİZELGELER

<b>Çizelge 1.1.</b>	FAB ve WHO Sınıflandırması	3
<b>Çizelge 1.2.</b>	Sitogenetiğe Dayalı Risk Sınıflandırması	3
<b>Çizelge 1.3.</b>	AML’de metile olan genler	18
<b>Çizelge 2.1.</b>	Hücre kültüründe kullanılan malzeme ve gereçler	30
<b>Çizelge 2.2.</b>	Agaroz jel elektroforezi için gerekli malzemeler	30
<b>Çizelge 2.3.</b>	Yükleme Tamponu İçin Gerekli Malzemeler	31
<b>Çizelge 2.4.</b>	Yürütme Tamponu İçin Gerekli Malzemeler	31
<b>Çizelge 2.5.</b>	EDTA Solüsyonu için gerekli malzemeler	31
<b>Çizelge 2.6.</b>	Etidyum Solüsyonu için gerekli malzemeler	31
<b>Çizelge 2.7.</b>	Çalışmada kullanılan antikorlar	34
<b>Çizelge 2.8.</b>	Çalışılan genlerin metilasyon spesifik pcr için tasarlanan primer dizileri	41
<b>Çizelge 3.1.</b>	MTT testinin dozlara ve zamana bağımlı olarak sitotoksiteye olan etkisinin sayısal verileri	42
<b>Çizelge 3.2.</b>	MTT testinin 24. Saatteki dozlara bağımlı olarak sitotoksiteye olan etkisinin sütun grafiği ile gösterimi	43
<b>Çizelge 3.3.</b>	MTT testinin 48. Saatteki dozlara bağımlı olarak sitotoksiteye olan etkisinin sütun grafiği ile gösterimi	43
<b>Çizelge 3.4.</b>	MTT analizine göre hücrelerin farklı dozlarda, 24. ve 48. saatlerdeki canlılık yüzdeleri	44
<b>Çizelge 3.5.</b>	DNA’ların spektrofotometrik olarak miktar tayini	49
<b>Çizelge 3.6.</b>	P15 Geni Promotor Bölgesinin Çoğaltılması İçin PCR Karışımının Hazırlanması	50
<b>Çizelge 3.7.</b>	P15 geninin primerlerinin çalıştığı PCR şartları ve yeterli ürün için gerekli döngü sayısı	50
<b>Çizelge 3.8.</b>	ER Geni Promtor Bölgesinin Çoğaltılması İçin PCR Karışımının Hazırlanması	52
<b>Çizelge 3.9.</b>	ER geninin primerlerinin çalıştığı PCR şartları ve yeterli ürün için gerekli döngü sayısı	52

<b>Çizelge 3.10.</b> CDX2 Geni Promotor Bölgesinin Çoğaltılması İçin PCR Karışımının Hazırlanması	55
<b>Çizelge 3.11.</b> CDX2 geninin primerlerinin çalıştığı pcr şartları ve yeterli ürün için gerekli döngü sayısı	55
<b>Çizelge 3.12.</b> BCL-2 Geni Promotor Bölgesinin Çoğaltılması İçin PCR Karışımının Hazırlanması	56
<b>Çizelge 3.13.</b> BCL-2 geninin primerlerinin çalıştığı PCR şartları ve yeterli ürün için gerekli döngü sayısı	57

# 1.GİRİŞ

## 1.1. Akut Myeloid Lösemi

Akut myeloid lösemi (AML), hematopoez sürecinde farklılaşmanın durmasıyla karakterize olan bir hematopoetik kök hücre bozukluğu olup, blast hücre popülasyonunun çoğalmasıyla sonuçlanan bir hastalıktır. Hematopoetik hücrelerdeki bu malign değişim, hematopoetik hücrelerde fonksiyon kaybına neden olur ve tedavi edilmezse klinik seyrine bağlı olarak haftalar ve aylar içinde ölümlerle sonuçlanır (Shibley ve ark.,2009).

AML, yetişkinlerde en yaygın görülen lösemi tipi olmasının yanısıra hayatta kalım oranının en düşük olan lösemi tipidir. Genç yaş grubundaki AML hastalarında bu oran önemli derecede azalırken, yaşlı hastalarda prognoz oldukça kötü seyretmektedir. Amerikan Kanser Örgütü, yılda 31.500 bireyin lösemi tanısı aldığını ve yaklaşık 21.500 bireyin bu hastalıktan dolayı öldüğünü rapor etmiştir. Tüm kanser tipleri arasında akut lösemilerin görülme sıklığı %3'ten az olmasına rağmen, bu hastalık çocuklarda ve yaşı 39'dan küçük olan bireylerde, kansere bağlı ölümlerin sebebinin oluşturmaktadır. AML, batılı ülkelerde lösemilerin yaklaşık %25'ini oluşturmakta ve bu yüzden en sık rastlanan lösemi tipi olmaktadır. Dünyada ise AML en çok Amerika, Avustralya ve Batı Avrupa 'da görülmektedir (Deschler ve Lübbert,2006).

Standart indüksiyon tedavisi gören AML hastalarında %50-%85 oranında remisyon görülmektedir. Bununla birlikte hastaların büyük çoğunluğunda remisyonda oldukları 2 yıl içinde hastalık nüksekmekte ve buna bağlı olarak da morbidite görülmektedir. Remisyon oranı ve tümenden sağkalım hastanın yaşı, sitogenetiği, malign lösemik klonlardaki diğer moleküler değişimler, daha önceden geçirdiği kemik iliği hastalıkları (myelodisplastik sendrom (MDS) veya bir myeloproliferatif hastalık gibi) ve eş zamanlı hastalıklar da dahil olmak üzere birçok faktörden etkilenmektedir (Shibley ve ark.,2009).

AML, tek bir anomaliyle oluşan bir hastalık olmayıp, birçok malignite taşıyan hematopoetik öncül hücrelerin sayısındaki anormal artış sonucu meydana gelir. Bu durum da kemik iliğinde normal hematopoezin karakteristiği olan farklılaşma ve kendini yenileme arasındaki hassas dengenin bozulmasına neden olur. Translokasyonlar gibi anormal genetik değişimlerin transkripsiyonu düzenleyen faktörlerin fonksiyonunu değiştirmesi, AML'nin bir nedeni olarak görülmektedir ve hem genetik hem de epigenetik seviyede gen programlamasını bozduğu bilinmektedir (Altucci ve ark.,2006).

AML, French-American-British (FAB) sınıflandırmasında blast morfolojileri, immünofenotipleri, sitogenetikleri ve klinik özelliklerine göre alt gruplara ayrılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflandırması ise, bu parametrelere, biyolojik olarak homojen olan ve prognostik ve terapötik açıdan ilişkili olan bir takım özellikleri tanımlamak amacıyla AML'nin genetik ve klinik özelliklerini eklemiştir (Çizelge-1.1).

En çok çalışılan AML alt tipi akut promyeloitik lösemi (APL; FAB M3) olup, bu hastaların %90'ından fazlası t(15;17) translokasyonunu ve bunun sonucu oluşan PML-RAR $\alpha$  füzyon proteinini taşır (Altucci,2005). t(15;17)(q21;q21), AML M3'e spesifik bir kromozomal anomali olup, başka bir malign hastalıkta görülmemektedir ve tüm AML M3 vakalarında meydana geldiği düşünülmektedir. AML M3'ün all-trans retinoik asid (ATRA) ile tedavisi, promyelositleri farklılaşmaya indüklemeye ve çoğalmaları yerine ölmelerini sağlama temeline dayanmaktadır. Bir başka anomali trizomi 8, AML'de en sık görülen sayısal anomali olup, herhangi bir FAB alt grubuyla ilişkilendirilmese de M1, M4, M5'te sıkça görülmektedir. Kromozom 5 ve 7'deki tümenden veya kısmi delesyonlar özellikle ikincil veya terapi ilişkili myelodisplazi ve AML ile ilişkilidir. Diğer bir translokasyon olan t(8;21) translokasyonu ilk 1973'te tanımlanmıştır. t(8;21) görülen hastaların %90'ında M2 görülmekteyken, M2 hastalarının %40'ı t(8;21) translokasyonu taşımaktadır. Translokasyon moleküler seviyede 8. kromozomdaki *eto* ve 21. kromozomdaki *AML1* genlerini kapsamaktadır. Bu genlerin füzyonu yeni bir kimerik protein oluşumuyla sonuçlanmaktadır (Stevens, 1996). Inv(16), M4'te karakteristik olarak görülen bir anomali olup, bu karyotipi taşıyan hastaların %90'ından fazlası bu morfolojik alt tipte sınıflandırılmaktadır (Stevens 1996).

**Çizelge 1.1.** FAB ve WHO Sınıflandırması (Beksaç, 1997; Altucci ve ark.,2005)

	<b>French-American-British(FAB)</b>	<b>WHO</b>
AML Sınıflandırılması		
M0	Minimal Farklılaşma	Tekrarlayan genetik anomalili AML
M1	Olgunlaşmamış Myeloblastik Lösemi	Multilinear Displazili AML
M2	Olgunlaşma Gösteren Lösemi	
M3	Akut Promyelositer Lösemi	AML ve myelodisplastik sendrom; tedavi-ilişkili AML
M4	Akut Myelomonositer Lösemi	
M5	Akut Monositoid Lösemi	Ayrıca kategorize edilmemiş
M6	Akut Eritro Lösemi	Kökene belli olmayan akut lösemiler
M7	Akut Megakaryoblastik Lösemi	

AML'nin prognozu ve genetiği birbiriyle yakından ilgilidir (Shibley ve ark.,2009). AML'de görülen sitogenetik anomaliler sayısal veya yapısal olabilir ve tek başına veya birkaç anomali beraber meydana gelir (Stevens, 1996). Sitogenetiğe dayalı risk sınıflandırmasında hastalar, iyi, orta ve kötü sitogenetik olmak üzere üç ana gruba ayrılır (Çizelge 1.2). Her grupta spesifik kromozomal anomaliler görülmesine rağmen ve bu durum tüm çalışmalarda tutarlı olmadığı halde bu sınıflandırmada genel bir konsensus vardır (Shibley ve ark.,2009).

**Çizelge 1.2.** Sitogenetiğe Dayalı Risk Sınıflandırması (Foran, 2010)

<b>Risk Grubu</b>	<b>Sitogenetiği</b>
Düşük Risk	t(8;21)(q22;q22) inv(16)(p13.q22), t(16;16)(p13.q22) t(15;17)
Orta Risk	Normal Sitogenetik +8 t(3;5) t(9;11)(p22q23) Diğer tanımlanmayan anomaliler
Yüksek Risk	Kompleks karyotype (>3 anomaliler) Monozomal Karyotip + -5, 5q- -7, 7q- Diğer 11q23 anomalileri [non- t(9;11)] inv(3)(q21q26.2), t(3;3)(q21q26.2) t(6;9), t(9;22) (17p) anomalileri

AML'nin, farklı ancak birliktelik gösteren genetik mutasyonların sonucu oluşması, lösemik hücrelere proliferatif özellik ve hayatta kalma avantajı kazandırır ve farklılaşmayı ve apoptozisi azaltır. Bazı genlerde görülen mutasyonlar, proliferasyon ve/veya hayatta kalma avantajı sağlamakta ancak farklılaşmayı etkilememektedirler. AML'de Sınıf I mutasyonları olarak tanımlanmış olan bu mutasyonlar (Fms-like tirozin 3) FLT3, ALM, onkojenik Ras ve Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11 (PTPN11), BCR/ABL ve TEL/PDGFR gen füzyonlarını kapsamaktadır. AML'de Sınıf II mutasyonlarında farklılaşma ve apoptozis azalmakta olup, AML/ETO ve PML/RAR $\alpha$  füzyonları, MLL yeniden oluşumları ve *CEBPA*, *CBF*, *HOX* ailesi üyelerindeki mutasyonlar, *CBP/P300* ve *TIF1*'in koaktivatöründe görülen mutasyonlar bu gruba girmektedir (Rubnitz ve ark.,2008; Rubnitz ve ark.,2010). Gen mutasyonları ve translokasyonları sonucu oluşan bu füzyonlar, farklılaşma ve apoptozisi engellemektedirler. Hematopoetik öncül hücreler, hem Sınıf I hem Sınıf II genetik anomalileri kazandığında AML oluşmaktadır (Rubnitz ve ark.,2010).

AML'deki kromozomal değişimleri değerlendirmenin diğer bir yolu anomalileri, "dengeli" ve "dengeli olmayan" anomaliler olarak sınıflandırmaktır. Dengeli anomalilere örnek olarak t(8;21), t(15;17) translokasyonları ve dengeli olmayan anomalilere ise örnek olarak -7 ve -5 gibi tümenden veya kısmi kromozomal delesyonları verebiliriz. De novo ve tedavi-ilişkili AML vakalarında görülen dengeli anomaliler, DNA topoizomeraz II'nin aktivitesindeki hata ile meydana gelen rekombinasyonlar sonucu oluşabilirken, dengeli olmayan anomaliler DNA veya diğer hücresel hedeflerin alkilenmesi sonucu oluşabilmektedir. Sonuç olarak, kromozomal ve klonal genetik anomaliler tanı, prognoz ve hastalığın kontrolünde önemli bir etkiye sahiptir. (Stevens,1996).

## 1.2. Pediatrik Akut Myeloid Lösemi

Geçtiğimiz on yıl boyunca AML tedavisinde ve hastalığın patogenezinin aydınlatılmasında önemli gelişmeler kaydedilmiştir. Son yıllarda pediatrik AML hastalarının %65'inde etkili bir anti-lösemik tedavi ile destekleyici bakımdaki gelişmeler sayesinde, buldukları risk grubuna da bağlı olarak uzun süreli hayatta

kalım sağlanabilmektedir. Çocukluk çağı lösemilerinin sonlanmasının, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine bağlı olduğu düşünülmektedir. Akut lösemilerin %35'i çocukluk çağı kanserlerini ve akut lösemilerin %15 ila %20'si AML'yi kapsamaktadır. AML'nin ortaya çıkma oranı, yaşamın ilk iki yılında en yüksek seviyelere ulaşmakta ve sonra yaklaşık 9 yaşlarında azalmakta ve ergenlik çağı boyunca yavaşça artış göstermektedir (Rubnitz ve ark.,2010; Krstovski ve ark.,2010). De novo AML görülen çocukların çoğunda, bu hastalığa zemin hazırlayan herhangi bir faktör bulunamamıştır. Çocukluk çağı lösemilerin etiyolojisi hala kesinleştirilememiştir ama birçok risk faktörü AML'nin gelişimiyle ilişkili bulunmuştur. Bilinen risk faktörleri arasında Down sendromu, Fanconi anemi, Diamond-Blackfan sendromu, Bloom sendromu, Kostmann sendromu, nörafibromatosis gibi kongenital ve genetik hastalıklar bulunmaktadır. Bu kalıtsal hastalıklar hatalı DNA onarımı, kromozom anöploidisi ve translokasyon gibi kromozomal anomaliler ile karakterizedir. İyonize radyasyonun, birtakım ilaçların, alkile edici ajanlar gibi bazı toksik maddelere maruz kalmanın, topoizomeraz inhibitörü ve benzen gibi ajanların çocukluk çağı lösemileri ile nedensel bir ilişkisi olduğu bilinmektedir (Krstovski ve ark.,2010).

AML'nin oluşumunda, kök hücrelerde farklılaşmanın farklı aşamalarında normal hematopoetik hücre gelişimi bozulurken kendini yenileme kapasitesinin korunduğu görülmektedir. Kromozomal anomaliler AML'li çocukların büyük çoğunluğunda saptanmıştır ve tek bir mutasyonun tek başına AML için yeterli olamayacağı gösterilmiştir. AML'nin oldukça heterojen bir yapısı olmasına rağmen, çeşitli alt tiplerinde lösemiye neden olan ortak yolakları paylaştıkları görülmektedir (Krstovski ve ark.,2010; Verdeguer,2010; Manola,2009). Şimdiye kadar çalışılan modellerde AML'nin, kendini yenileme ve farklılaşmayı düzenleyen iki farklı sınıf mutasyonun birliktelik göstermesiyle ortaya çıktığı gösterilmiştir (Pui ve ark.,2011). Çok basamaklı patogeneze sürecinde, aynı hematopoetik kök hücrede proliferatif avantaj sağlayan Sınıf I mutasyonların ve farklılaşma sürecini bozan sınıf II mutasyonların sinerjistik bir şekilde oluşumu akut lösemi oluşumuna neden olur. Reseptör tirozin kinazlardaki mutasyonları kapsayan Sınıf I mutasyonları ve GTPaz Ras ailesindeki mutasyonlar blast hücrelerine bölünme ve hayatta kalma avantajı sağlar. Sınıf II mutasyonların farklılaşma ve olgunlaşmayı bozdukları saptanmıştır ancak tek başlarına ifade edilmeleri lösemiye neden olacak kadar yeterli değildir. Sitogenetik analizler AML'li



çocukların %70-85'inde klonal kromozom anomalileri olduğunu göstermektedir. Kromozomlardaki belirli yeniden düzenlenmeler tanımlanmıştır ve belirli alt gruplarla ilişkilendirilip, diagnostik, prognostik ve takip amaçlı önemli parametreler olarak belirlenmiştir. Çocuk AML hastalarında belirli kromozom anomalilerinin prognostik önemi belirlenmiş olmasına rağmen, daha az sıklıkla görülen ve tekrarlayan anomaliler, düşük sıklıkla rastlanması ve farklı çalışma gruplarının farklı tedavi protokolleri uygulaması nedeniyle tanımlanamamıştır. Bazı kromozom yeniden düzenlenmeleri lösemi oluşum sürecini başlatan önemli olaylar olarak tanımlanmıştır. Bu yapısal kromozom değişimleri üzerine yapılan çalışmalar ile kromozom kırıklarının olduğu yerdeki genler tanımlanıp, lösemi oluşum sürecinde yer alan proteinler karakterize edilmiştir (Krstovski ve ark.,2010; Verdeguer,2010; Manola,2009).

Bazı araştırmacılar, AML biyolojisi ve buna bağlı olarak prognozun yetişkinlerde bile yaşa bağlı olarak değişeceği görüşünde birleşmektedirler. Belirli moleküler veya sitogenetik anomalilerin sadece yeni doğanlarda veya çok küçük yaştaki çocuklarda görülmesi hastalığın yaşa bağlı olarak biyolojik farklılıklar gösterdiğinin kanıtıdır (Verdeguer,2010). Yeni doğanlarda AML'nin kötü sonuçlandığı bilinmekle beraber, çocukluk çağı AML'sinde hayatta kalım süresinin azlığında çocukların 16 yaşından büyük olmasının etken olduğu gösterilmiştir (Verdeguer,2010). Yaşamın ilk üç yılında daha yüksek sıklıkla rastlanan AML vakalarında 11q23 anomalilerine +8, t(8;21), t(15;17) veya inv(16)'dan daha fazla rastlanmaktadır. Örneğin 11q23 yeniden düzenlenme anomalisine rastlanma sıklığı yaş artışıyla birlikte azalmaktadır. Bu anomali yeni doğanların %50'sinde rastlanırken, 13-24 aylık çocuklarda yaklaşık %39, 24 aylıktan büyük çocuklarda %8-9 ve yetişkinlerde %4-7 oranında rastlanmaktadır. t(1;22) ve t(7;12) gibi yeniden düzenlenmeler genellikle küçük yaştaki çocuklar ve yeni doğanlarla sınırlı kalmaktadır. t(8;21) ve inv(16) gibi anomaliler çocuklarda yetişkinlere göre daha fazla rastlanmaktadır. Bu farklılıkların sebebi hala bilinmemekle beraber, pediatrik, ergen ve yetişkin AML'lerinin biyolojik farklılıklar taşıması nedeniyle olduğu düşünülmektedir. FAB sınıflandırması da yaşa göre farklılıklar göstermektedir. M4, M5 ve M7 erken çocukluk döneminde daha yaygın görülürken, M0, M1, M2 ve M3 ileri yaştaki çocuklarda daha sık görülmektedir (Manola,2009).

Çocukluk Çağı AML'de görülen WHO tarafından tanımlanmış genetik anomaliler aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- t(8;21)(q22;q22) translokasyonu, 8. kromozomdaki *ETO* ve 21. kromozomdaki *AML1* genlerinin füzyonuyla sonuçlanmaktadır. 2 yaşından büyük çocuklarda en sık rastlanan yapısal anomalidir. İyi prognozla ilişkilendirilmesine rağmen yaklaşık %50'sinde nüks görülmektedir.
- İnv(16)(p13.1q22) ve t(16;16) AML M4 alt tipinde görülmektedir ancak M0, M1, M2 ve M5 alt tiplerinde de bu anomaliye rastlanmıştır. Relaps için düşük risk faktörü olarak düşünülmektedir. Translokasyon sonucu 16q22'deki "çekirdek bağlanma faktörü (CBFβ)" geni ile 16q13'teki "düz kas miyozin ağır zincir" (MYH11) geninin füzyonu oluşur. İnv(16)/t(16;16) görülme sıklığı çocuklarda %3-8 arasında değişmektedir, ancak bu oran Çinli çocuklarda %11,6'ya çıkmaktadır. Bu anomalilerin görüldüğü hastalarda normal karyotipli hastalardan daha iyi bir prognoz ve daha yüksek tümenden sağkalım oranı görülmektedir.
- t(15;17)(q22;q21) translokasyonu sonucu oluşan PML-RARα füzyon proteini promyleositik safhada olgunlaşmayı durdurmaktadır. Bu translokasyon görülen hastalara uygulanan All-trans-retinoic acid (ATRA) tedavisi sonucu iyi bir prognoz gözlenmektedir.
- 11q23 translokasyonları ve MLL yeniden düzenlenmeleri sıkça çocukluk çağı AML'de rastlanmaktadır. Birçok vakada *MLL* geni kötü prognoza neden olmaktadır. t(9;11)(p22;q23) (*MLL AF9*) taşıyan hastalarda ise daha iyi bir prognoz görülmektedir.
- DEK-CAN t(6;9)(p23;34) translokasyonu genç yetişkinlerde görülmektedir, Çocuklarda ise az sayıda hastada saptanmıştır. AML-M2 veya M4 ile ve kötü prognoz ile ilişkilendirilmektedir.
- inv(3)(q21q26), t(3;3)(q21;q26), t(3;21), 3q kazanımları ve kayıpları kapsayan 3. kromozom anomalileri AML'li çocuklarda nadir rastlanan yüksek risk grubundaki anomalilerdir. Fankoni anemili hastalarda görülen 3q yeniden düzenlenmeleri *EVII* geninin yüksek ifadesi ile sonuçlanmakta olup, kötü prognoza sebep olmaktadır (Manola,2009).
- t(1;22)(p13;q13) translokasyonu sadece yeni doğanlarda görülmektedir. Translokasyon sonucu 1p13'te yer alan *OTT (RBM15)* geniyle 22. kromozomda yer

alan *MAL (MLK1)* geni, *OTT-MAL* füzyon genini oluşturur. AML-M7'ye spesifik bir kromozomal anomalidir. 6 aylıktan küçük çocuklar genellikle t(1;22)'yi tek başına bir anomali olarak taşıırken, 6 aylıktan büyük çocuklar t(1;22)'yi de içeren kompleks bir karyotipe sahiptir (Verdeguer,2010;Manola 2009).

Diğer yapısal ve sayısal sitogenetik anomalileri ise şu şekilde sıralayabiliriz:

- t(7;12)(q36;p13) translokasyonu *ETV6/TEL* genini içeren ve nükseden bir translokasyondur. Hastalığın kötü sonuçlandığı gösterilmiştir. Yeni doğan AML'lerinde daha sıkça rastlanmakta ve yeni doğan AML'lerinin %30'unda görülmektedir.
- Monozomi 7 veya 7q delesyonu pediatrik AML'lerin %2-7'sinde saptanmıştır. İki anomali kötü risk faktörleri arasında yer almaktadır. FAB sınıflandırmasına göre kötü prognoz görülen gruba dahil edilmektedir.
- Trizomi 8 çocukluk çağı AML'lerinin %5-10'unda saptanmış olup, tekrarlayan diğer kromozomal anomalilerle ilişkili olduğu düşünülmektedir.
- Kazanılmış trizomi 21 ise tekrarlayan diğer kromozomal anomaliler arasındadır. Prognostik olarak orta risk grubunda yer almaktadır. Akut megakaryoblastik lösemili çocuklarda bu anomaliye rastlanma sıklığı çok yüksektir (Verdeguer,2010; Manola,2009).

Normal karyotipe sahip olup, moleküler anomali rastlanılan çocuklar çocukluk çağı AML hastalarının %20-30'unu oluşturmaktadır. Normal karyotipli hastalar orta risk grubunda yer alsalar da moleküler yeniden düzenlenmeler farklı bir prognoz oluşturmaktadır. Örnek olarak, Fms-benzeri tirozin kinaz (*FLT3*), nükleofosmin (*NPM1*) ve *CEBP $\alpha$* , Wilm's tümör 1 (*WT1*), *N-RAS* mutasyonları verilebilir. *FLT3* genindeki mutasyonlar AML'de önemli rol oynamaktadır ve pediatrik vakalarda %20-25 sıklıkla en çok rastlanılan somatik mutasyondur. *FLT3* mutasyonu çocukluk çağı AML'de kötü prognoza neden olmaktadır. *NPM1* mutasyonu ise, çocuk hastalarda %20-30 sıklıkla görülmekte olup, yetişkinlere göre daha az rastlanmaktadır. *NPM1* mutasyonu çocuklarda iyi prognoza işaret etmektedir (Manola,2009;Verdeguer,2010). *CEBP $\alpha$*  mutasyonları yetişkin AML'lerde daha yaygın görülmektedir ve daha uzun süreli sağ kalıma, düşük relaps oranına işaret etmektedir. *WT1* mutasyonu çocuklarda yetişkinlere göre daha sıklıkla görülmektedir ve kötü sonlanıma neden olmaktadır. Hastalarda dirence sebep olmasından ve

hastalığın tekrarlama riskini artırmasından dolayı kötü prognozla sonuçlanmaktadır. *KIT*, *N-RAS* ve *K-RAS* mutasyonlarının prognostik önemi hala tam olarak belirlenememiştir (Verdeguer,2010).

Çocukluk çağı AML'nin biyolojisinin daha iyi anlaşılmasıyla hastalığın oldukça heterojen olduğu ortaya çıkmıştır. Bu bulgu, farklı hastalarda hastalıklarının altında yatan spesifik anomalileri hedefleyen tedavilere ihtiyaç olduğunu ortaya koymaktadır. AML'deki en çarpıcı ilerleme, APL'nin ATRA ve arsenikli ilaçlar ile tedavi edilebilmesi olmuştur. Daha fazla hedefleyici tedavilerin oluşturulması, hastalığın iyi sonlanımının sağlanması açısından ümit verici olacaktır (Clark ve ark.,2003).

### **1.3. Epigenetik**

Organizmayı oluşturan tüm hücreler aslında aynı DNA dizisine sahip olmasına rağmen, hücre tipi ve fonksiyonları gen ifadesindeki kalitatif ve kantitatif farklılıklardan dolayı değişiklik gösterir ve gen ifadesinin kontrolü bu açıdan gelişim ve farklılaşmanın temelinde yer alır. Farklılaşmış hücreleri karakterize eden gen ifade modelleri gelişim süresince ortaya çıkarlar ve mitoz ile bölünen hücrelerde bu modeller korunur. Bu nedenle, kalıtsal genetik bilgiye ek olarak hücreler DNA'nın nükleotit dizisinde kodlanmayan bu bilgiyi de aktarırlar. Epigenetik, DNA dizisindeki değişikliklerden kaynaklanmayan, stabil kalabilen ve gen ifadesini düzenleyici mekanizmada meydana gelen, mitotik olarak (ve imkan dahilinde mayotik olarak da) kalıtsal değişiklikler olarak tanımlanmaktadır (Waterland,2006; Oki ve Issa,2010). Amerika Ulusal Sağlık Enstitüsü ise son çalışmalarında epigenetiği, gen aktivitesi ve ifadesindeki kalıtsal değişiklikler ve kalıtsal olmasa da hücrenin transkripsiyonel potansiyelindeki stabil, uzun süreli değişimler olarak tanımlamaktadır (Gibney ve Nolan,2010). Gen ifadesindeki bu değişimler doğal gelişim süreci olan embriyogenezde önemli rol oynar, epigenetik kodun yeniden oluşturulduğu bu süreç, döllenme gerçekleşikten kısa bir süre sonra meydana gelir ve bu şekilde hücrenin kaderi, hangi hücre tipine farklılaşacağı belirlenir. Epigenetik aynı zamanda genetik olarak aynı bireyler arasında fenotipik varyasyona neden olarak biyolojik çeşitlilikte de rol oynamaktadır (Taby ve Issa,2010).

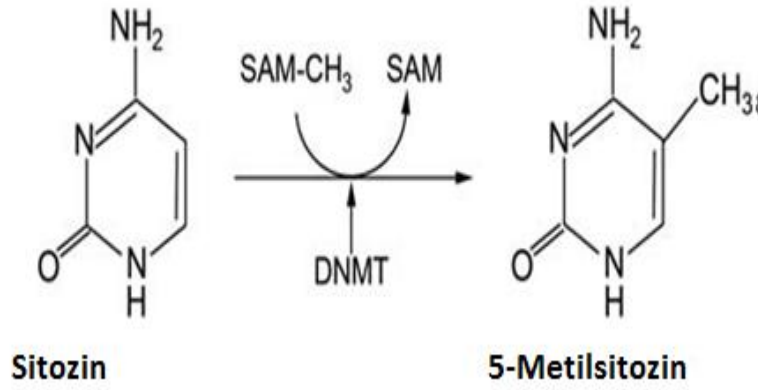
Normal hematopoez süresince gen ifadesindeki muntazam kontrolü ve düzenli işleyişi, “epigenetik gen regülasyonu” olarak bilinen DNA dizisinden bağımsız biyokimyasal olaylar yoluyla kısmen kontrol edilir. Bu olaylar; DNA metilasyonu ve histon asetilasyonu, metilasyonu, fosforilasyonu, übikitinasyonu ve sumolasyonu ile sınırlı değildir. DNA dizisindeki genetik bilgiye benzer şekilde, epigenetik bilgi de nesiller boyunca kalıtılabilir, anneden yavru hücreye aktarılabilir ve bu kalıtım yaşamın devamlılığı için gereklidir (Melnick, 2010).

Epigenetik mekanizmalar, DNA metilasyonu ile asetilasyon ve metilasyon gibi histon kuyruk modifikasyonlarını kapsar. Bu epigenetik değişiklikler önemli genlerin susturulmasıyla karsinogeneze neden olmaktadır. DNA metilasyonu oldukça stabildir ve embriyogenez gibi özel durumlar haricinde ilk oluştuğunda meydana gelen profil korunmaktadır. Histon modifikasyonları, gen ifadesinin düzenlenmesinde görülen daha dinamik biyokimyasal değişikliklerdir. Daha esnek olan bir başka epigenetik mekanizma ise, transkripsiyonel ve transkripsiyon sonrası gen susturulmasını gerçekleştiren kodlanmayan RNA’lardır, ancak karsinogenez sürecindeki rolleri henüz belirlenmemiştir. Son yıllarda, löseminin oluşum sürecinde DNA metilasyonundaki ve histon modifikasyonlarındaki değişikliklerin etkili olduğu ortaya çıkarılmıştır ve AML ve diğer hematolojik hastalıkların tedavisi için hedef olarak belirlenmiştir (Oki ve Issa, 2010).

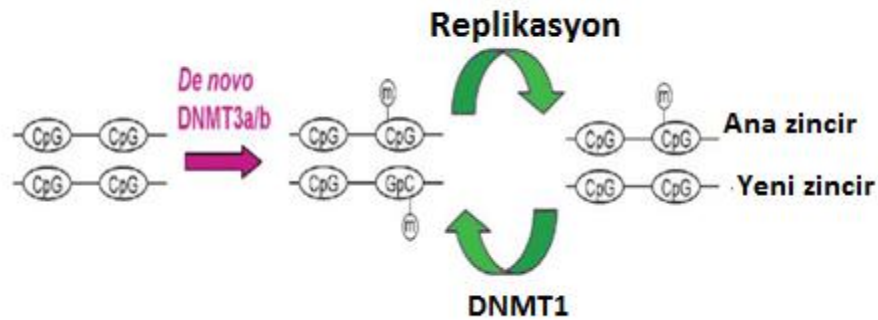
### **1.3.1. DNA Metilasyonu**

DNA metilasyonu, 5'-sitozin-guanozin (CpG) dizisindeki 5. pozisyondaki karbon atomuna bir metil (CH<sub>3</sub>) grubunun DNA metiltransferazlar (DNMT) aracılığıyla enzimatik olarak eklenmesiyle gerçekleşmektedir (Şekil-1) (Blum ve Marcucci,2005). 5' pozisyonundaki sitozinlerin metilasyonları DNA'nın geri çevrilebilir kovalent modifikasyonudur (Oki ve Issa,2010; Gibney ve Nolan,2010). DNMT'ler aracılığıyla katalizlenen metil grubu transferi replikasyon bağımlı bir reaksiyon olup, S fazı süresince replikasyonda CpG dinükleotitleri DNA metilasyonunun hedefi olmaktadır (Taby ve Issa,2010). DNA metiltransferazlar, DNA metilasyonundan sorumlu enzim ailesidir. Bugüne kadar memelilerde DNMT1, DNMT2, DNMT3A ve DNMT3B olmak üzere dört DNMT enzimi tanımlanmıştır. DNA metiltransferaz

aracılığıyla sitozinin 5-metilsitozine dönüşümü, DNMT'nin S-adenozilmetioninden (SAM) bir metil grubunu sitozinin 5. karbonuna aktarmasıyla gerçekleşmektedir (Gibney ve Nolan,2010). DNMT3A ve DNMT3B, yeni oluşan DNA zincirindeki de-novo metilasyonu kontrol ederken, DNMT1'in var olan metilasyon profilinin sürdürülmesinde görev aldığı düşünülmektedir (Şekil-2) (Blum ve Marcucci,2005). Bir diğer DNMT tipi olan DNMT3L'nin katalitik aktivitesi olmayıp, DNMT3A ve DNMT3B'nin katalitik aktivitesinin stimülatörü olduğu düşünülmektedir. DNA'da CpG dinükleotitleri bir kez metillendiğinde, DNMT'ler replikasyon çatalında lokalize olup yeni sentezlenen hemi-metile zincir üzerinde çalışarak metilasyon profilinin hücre bölünmesinden sonra sürdürülmesini sağlarlar (Şekil-2) (Oki ve Issa,2010).



**Şekil 1.1.** Sitozin Metilasyonu (Gibney ve Nolan,2010).

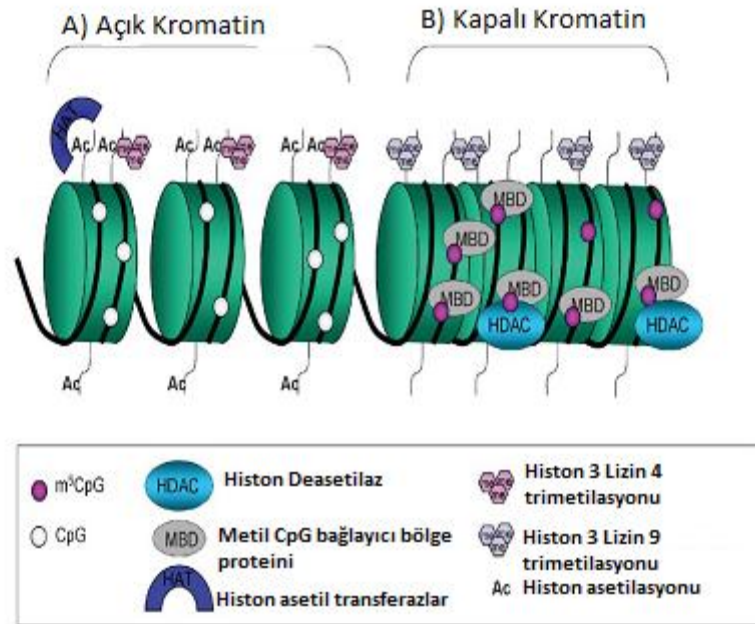


**Şekil 1.2.** Metilasyonun oluşumu ve devamlılığı (Gronbaek ve ark.,2007)

İnsan DNA'sındaki sitozinlerin %3'ü metiledir. Sitozine bir metil grubu eklenerek DNA'da 5-metilsitozin oluşması hücrel gelişim, farklılaşma ve karsinogenez üzerinde genetik ve epigenetik etkiye sahiptir. Memeli DNA'sında sitozin metilasyonu için, sitozini takip eden bir guanozinden oluşan bir CpG dinükleotiti (CpG adalarını temsil eden "p" sitozin ve guanin nükleotitlerini bağlayan fosfodiester bağı göstermektedir.) olması gerekir (Oki ve Issa,2010; Gibney ve Nolan,2010).

Metil grupları, normal hidrojen bağı oluşumuna imkan verir ve DNA'nın biyofiziksel özelliğini değiştirmek üzere DNA'nın büyük oluğuna yerleşir. Dört nükleotidin (A, T, G, C) DNA'da 16 farklı dinükleotit çifti oluşturma ihtimali vardır. CpG çiftleri tüm genomda beklenenden daha az sıklıkla meydana gelmektedir ama genomda yoğun olarak buldukları bazı bölgelerde "CpG adaları" olarak adlandırılmaktadırlar. CpG adaları ortalama 1000 baz çiftinden oluşmaktadır ve genlerin yaklaşık %50'sinin promotor bölgelerinde bulunmaktadır. Illingworth ve arkadaşları yaptıkları son çalışmada CpG adalarının yaklaşık yarısının genomda promotorlarla bağlantılı olmadığını ama gen içi (intergenik) veya genler arası (intragenik) bölgelerde lokalize olduklarını göstermiştir. CpG adalarının kodlanmayan RNA'lar için transkripsiyon başlama bölgelerini gösterebileceğini de önermektedirler (Gibney ve Nolan , 2010; Taby ve Issa;2010). Her durumda, CpG adalarının gen ifadesinin kontrolünde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. İfadelenen genlerin yaklaşık yarısı, kodlayan bölgelerinde CpG adalarına sahiptir ve CpG adaları yüksek oranda ifadesi görülen tüm genlerde ve yarısından azı ise doku bağımlı olarak ifade edilen genlerde yer almaktadır (Gibney ve Nolan, 2010). Normal memeli hücrelerinde DNA metilasyonunun asıl hedefi tekrarlı transpozon dizileridir, ancak imprinting ve X kromozomu inaktivasyonunda da rol oynamaktadırlar. CpG bölgelerinin insanda tahmin edilenden daha az sıklıkta görülmesinin nedeni, evrim süresince metilsitozinin mutasyonu ile sitozinin timine dönüşerek elimine olmasıdır. Diğer bir taraftan insan genomu, beklenenden daha fazla sıklıkla küçük CpG bölgeleri içermektedir. İnsandaki tüm genlerin yaklaşık yarısı promotor bölgelerinde CpG adalarına sahiptir ve bunlar normal dokularda genin transkripsiyonel durumuna bağlı olarak genellikle metile değildir. Bir CpG adasındaki metilasyon, kromatin organizasyonundaki değişikliğe ve gen transkripsiyonunun baskılanmasına bağlı olarak değişir (Oki ve Issa,2010). Metile CpG dinükleotitleri, genel olarak ökaryotik hücrelerin perisentromerik heterokromatin

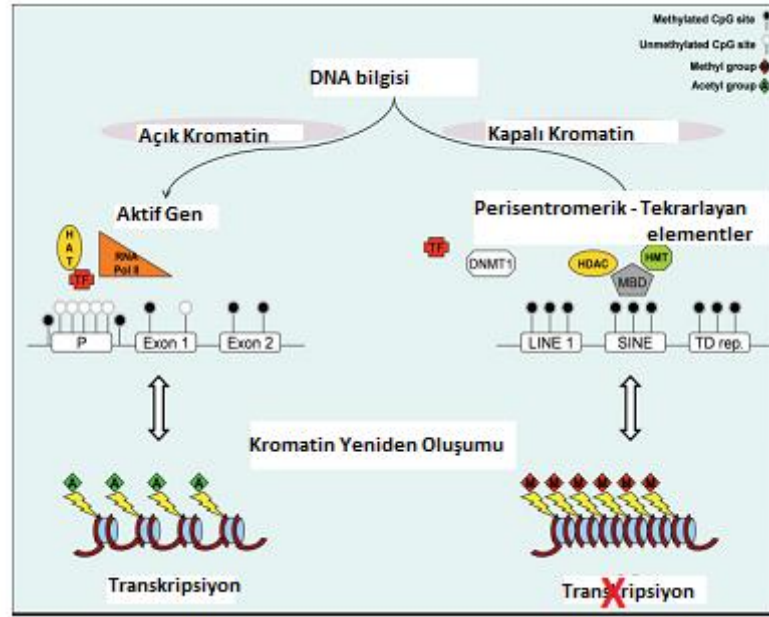
bölgelerinde deastile histonlarla birlikte yoğun nükleozom konformasyonunu oluştururlar (Şekil-3). Bu bölgeler transkripsiyonun gerçekleşmediği bölgelerdir. Metilasyon, transkribe olduğunda genetik instabiliteye sebep olabilecek uzun tekrar elementlerinin, ekli viral dizilerin ve bu DNA bölgelerindeki transpozonların susturulmasında pilot rolü oynamaktadır. Tam tersine, CpG adaları olarak adlandırılan metile olmayan CpG dinükleotitleri promotor bölgelerinde oldukça yoğun bir şekilde bulunur ve insanda ifadelenen genlerin yaklaşık %50'sinde CpG adalarına rastlanır. Bu bölgeler genellikle asetilasyonun görüldüğü ve transkripsiyon faktörlerinin ve gen fonksiyonunu düzenleyen diğer regülatörlerin etkileşime girebildiği açık kromatin (ökromatin) bölgeleridir (Şekil 4) (Blum ve Marcucci,2005).



**Şekil 1.3.** Aktif ve İnaktif promotorların Kromatin Yapısı (Gronbaek ve ark.,2007)

Transkripsiyonel olarak aktif kromatin metillenmemiş sitozin ve asetillenmiş histon kuyruklarıyla karakterizedir, histon H3 teki lizin4 metiledir. Kapalı kromatinde ise sitozinler, metile olduğunda HDAC'ların toplanmasını sağlayan metil bağlayıcı proteinlere (MBD) bağlanırlar. Böylece histon kuyruklarından asetil grupları uzaklaştırılır. Histon H3'teki lizin 9 metilasyonu da bu olayla birliktelik gösterir.





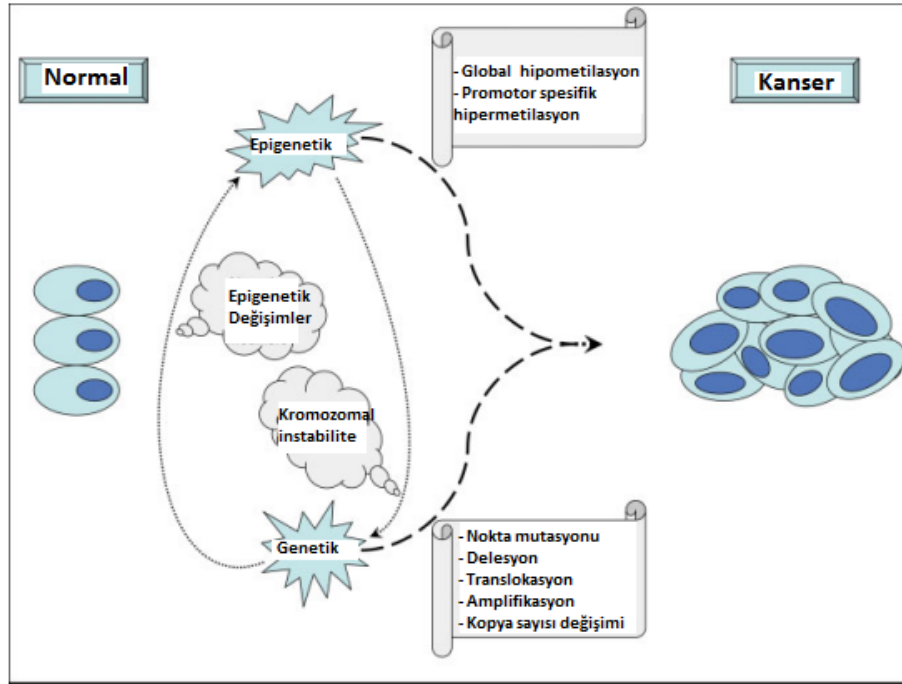
**Şekil 1.4.** Ökaryotlarda transkripsiyonunun normal kontrolü (Taby ve ark.,2010)

CpG metilasyonu hücre bölünmesinden sonra da sürdürüldüğü için DNA metilasyonu gen susturulması da devamlılığını korur ve bir defa oluştuktan sonra da stabil kalır. Sadece fizyolojik olarak değiştirilebilir ve embriyogenezin ilk evrelerinde sıfırlanabilir. İnsan genlerinin yaklaşık yarısının promotorlarında CpG adaları bulunmaz. Bu durumlarda, DNA metilasyonu susturulmuş durumu işaret eder ancak gen ifadesinin aktivasyonu ile fizyolojik olarak geri çevrilebilir. Buna bağlı olarak non-CpG adalarının metilasyonunun karsinogenezde oynadığı rol hala bilinmemektedir (Oki ve Issa,2010).

#### 1.4. Kanserde DNA Metilasyonu

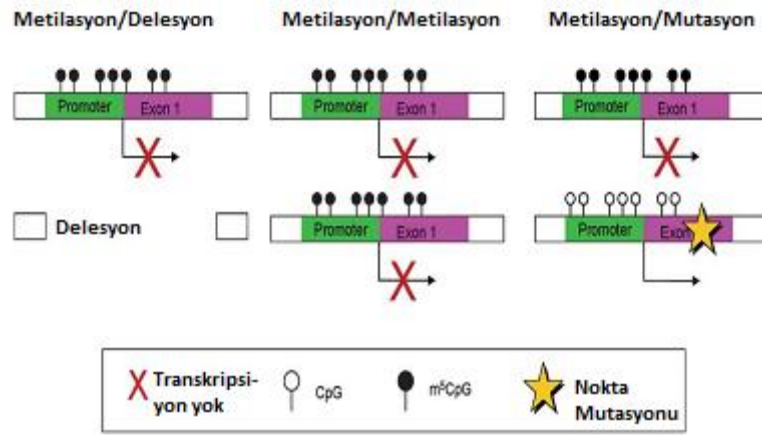
DNA metilasyon profili kanserde sıklıkla değişir. Malign hücrelerde global DNA metilasyon seviyesi sıklıkla azalır. Eş zamanlı olarak da genomun diğer bölgelerinde hipermetilasyon meydana gelir. Hipometilasyonun başlarda, onkogenleri aktive ederek karsinogenezin oluşumunda yer aldığı düşünülmekteydi. Hipometilasyonun *in vitro* olarak kromozom instabilitesiyle ilişkili olduğu ve bu şekilde karsinogenezde rol oynadığı da bilinmektedir (Oki ve Issa,2010; Blum ve Marcucci,2005). Tümör

oluşumu onkogenik aktivasyon ve/veya proapoptotik veya tümör baskılayıcı yolların inaktivasyonu sonucu oluşmaktadır. Başlangıçta, tümör oluşumunun mutasyon, amplifikasyon, gen yeniden oluşumları veya delesyonları gibi genetik değişimler sonucu oluştuğuna düşünülmekte iken artık tümör baskılayıcı genlerin susturulmasında genetik mutasyonlarının olduğu kadar DNA metilasyonunun da etkili olduğu bilinmektedir. Tümör oluşum mekanizmasında metilasyonun rolüne örnek olarak, kolorektal kanserde yanlış onarım geni insan mutL homolog1 (*MLH1*) metilasyonu, gliomalar ve kolorektal kanserlerde O-6-metilguanin-DNA metiltransferaz (*MGMT*) metilasyonu, kolorektal ve diğer kanserlerde hücre döngüsü regülatörü *p16* (siklin-bağımlı kinaz inhibitör 2A [*CDKN2A*]) metilasyonu örnek verilebilir. DNA metilasyonu yollardaki etkisini, direkt tümör baskılayıcı genlerin promotorlarını etkileyerek veya indirekt olarak onkogenlerin inhibitörlerini susturarak göstermektedir. Mutasyonlarda olduğu gibi tümör baskılayıcı genlerin susturulması, hücrelere proliferatif avantaj kazandırarak tümörün yayılmasını sağlayarak metastazı kolaylaştırmaktadır (Şekil 1.5.)(Taby ve Issa,2010).



Şekil 1.5. Hücrelerde tümör oluşum mekanizması (Taby ve ark,2010)

Knudson'ın "iki vuruş" hipotezine göre tümör baskılayıcı gen inaktivasyonu için, tümör baskılayıcı genin iki allelinin de hipermetilasyonla veya hipermetilasyon ve delesyon kombinasyonu ile inaktive olması gerekmektedir. Temel olarak, genetik veya epigenetik olayların herhangi bir kombinasyonu tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonuna sebep olabilmektedir (Şekil 1.6). Bununla birlikte, bir aleli metile olup, diğer aleli mutant olan genlere az rastlanmaktadır (Gronbaek ve ark.,2007).



**Şekil 1.6.** Tümör baskılayıcı genlerin bialelik inaktivasyon mekanizmaları (Gronbaek ve ark.,2007)

## 1.5. AML'de DNA Metilasyonu ve Anormal Gen İfadesi

### 1.5.1. AML'de DNA Metilasyonu

Heterokromatin hipometilasyonu yaygın bir şekilde görülmesine rağmen, AML'nin epigenetiği üzerine yapılan birçok çalışmada, tümör baskılayıcı genlerin CpG adalarının hipermetilasyonu sonucu malign blastlarda bir takım genlerin susturulduğu gösterilmiştir (Oki ve Issa,2010; Blum ve Marcucci,2005). Normal dokulardaki bazı genlerde yaşlanma süresince hipermetilasyon görülmektedir. Farklı malign hastalıklar kendine özgü bir DNA metilasyon paternine sahiptir. Örneğin, Retinoblastoma 1 (*RBI*) geninin metilasyonu özellikle retinoblastoma hastalığında; "von Hippel-Lindau tumor suppressor (*VHL*)" geninin metilasyonu özellikle renal hücre karinomasında görülmektedir. (Oki ve Issa,2010; Blum ve Marcucci,2005).

Belirli genetik anomalilerin (t(8;21), inv(16), t(15;17) v.b) AML hastaları için hastalığa özgü ve prognostik öneme sahiptir. Bununla birlikte birçok AML hastasında normal karyotip görülmektedir ve bu hastalarda, hastalığın sonlanımı tahmin etmek zor olmaktadır. *FLT3*, *NPM1* genlerinin mutasyonlarını ve *p15*, *ER* veya kaderin-1 (*CHDI*) genlerinde görülen DNA metilasyonunu kapsayan yeni moleküler belirteçlerin AML hastalarındaki prognostik önemi belirlenmiştir. Normal sitogenetik profil görülen lösemilerde büyük kromozomal değişiklikler olmadığı için epigenetik değişimlerin löseminin patogenezinde önemli olabileceği düşünülmektedir. Daha önceki çalışmalarda tümör baskılayıcı genlerin metilasyonunun AML'li hastalarda prognostik olarak önemli olabileceğinin gösterilmesi, myeloid malignansilerde etkinliği saptanan yeni demetile edici tedavilere ilginin artmasına neden olmuştur (Griffiths ve ark.,2010). İnv16, t(8;21), t(15;17) ve 11q23 gibi sitogenetiği tanımlanmış AML alt tiplerinin kendine özgü ve belirli bir metilasyon profiline sahip olduğu saptanmıştır. Lösemiye neden olan PML/RARA, AML1/ETO ve MLL proteinlerinin DNA metiltransferazlarla ilişkili olabileceği veya DNA metilasyonunu organize edebileceği önerilmektedir (Figuroa ve ark;2010). Alvarez ve arkadaşlarının AML hastaları ile farklı bir DNA metilasyon profillemeye metodu kullandıkları çalışmada da benzer bulgular elde etmişlerdir (Alvarez ve ark.,2010). Örneğin, lösemik bir onkogen olan *EVII*'in yüksek seviyede ifadesinin spesifik bir DNA metilasyonu ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Anormal olarak metile olan *EVII* geni saptanan AML'lerde *EVII*'in çinko parmak motifi için bağlanma bölgesine sahip olmasıyla karakterize olduğu ve bu şekilde lösemiye neden olan genlere bağlanmaktadır. *EVII* daha sonra DNMT3A ve 3B'ye bağlanarak metilasyona neden olmaktadır (Melnick,2010).

AML'de birçok tümör baskılayıcı genin promotorunda metilasyon meydana geldiği bilinmektedir. Örneğin, *p15* (INK4B) geninin promotorunda CpG metilasyonu meydana geldiği bilinmektedir ve bu geninin metilasyonu MDS'de kötü prognozla ilişkilendirilmekte olup, hastalığın AML'ye dönüşme ihtimalinin yüksek olduğuna işaret etmektedir. Çizelge 3'te AML'de metilasyonuna sıkça rastlanan diğer genler yer almaktadır (Oki ve Issa, 2010).

**Çizelge 1.3.** AML’de metile olan genler (Oki ve Issa, 2010)

Gen	Metilasyon Sıklığı	Genin Fonksiyonu
<i>p15</i>	%31-71	Siklin-bağımlı kinaz inhibitörü, TGF-beta tarafından indüklenen büyümenin duraklaması, hedef tümör baskılayıcı
<i>p16</i>	%0-38	Siklin-bağımlı kinaz inhibitörü, tümör baskılayıcı
<i>p73</i>	%10-13	DNA hasarına apoptotik cevapta rol oynar, hedef tümör baskılayıcı
<i>HIC1</i>	2. intron-%83 Promotorda %0	Transkripsiyon faktörü, hedef tümör baskılayıcı
<i>ID4</i>	%87	DNA- bağlayıcı inhibitör, hedef tümör baskılayıcı
<i>RARβ2</i>	%18-20	Çekirdekte gen ekspresyonunu düzenleyerek birçok hücre tipinin büyümesini sınırlandıran transkripsiyonel regülatör
<i>DAPK</i>	%3-61	Apoptozisi pozitif yönde düzenleyen serin-treonin kinaz
<i>CDH1</i>	%13-69	Kalsiyum bağımlı hücre adezyon proteini ve invazyonu baskılayıcı
<i>SHP1</i>	%52	JAK/STAT sinyal yolağının negatif regülatörü
<i>MGMT</i>	%5	DNA’da alkile guanini onarr
<i>FHIT</i>	%14	Pürin metabolizmasında görev alır, hedef tümör baskılayıcı gen
<i>CRBP1</i>	%28	Retinol transportunda taşıyıcı protein, hedef tümör baskılayıcı
<i>ER</i>	%40-54	Östrojen reseptörü
<i>SOCS1</i>	%39	Sitokin sinyalinin negatif regülatörü
<i>WIT-1</i>	%49	Bilinmiyor
<i>MYOD1</i>	%61	Hücre döngüsünü durdurarak kas hücresi farklılaşmasını düzenleyen transkripsiyon faktörü
<i>PITX2</i>	%64	Prokollajen lizil hidroksilaz gen ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörü
<i>GPR37</i>	%47	G-protein-bağımlı reseptör 37 öncülü
<i>SDC4</i>	%56	Heparan sülfatı taşıyan hücre yüzey proteoglikanı
<i>MEIS1</i>	AML1-ETO taşıyan AML’lilerin %64’ü	Hox49 ile birliktelik eden homeodomain genleri
<i>THBS1</i>	%25	Hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerine aracılık eden adezif glikoprotein
<i>Kalsitonin</i>	%71	Serum kalsiyumu azaltan peptid hormonu

Bu genlerden bir kısmının tümör baskılayıcı işlevi olduğu bilinmektedir ve bu genlerden bazıları da normal hematopoetik hücrelerde ifade edilmemektedir. Kanserde promotor hipermetilasyonu bu nedenle önemli genlerin susturulmasında sınırlama gerektirmemektedir. Bazı vakalarda metilasyon deneysel olarak saptanabilmektedir ancak bazılarının metilasyon seviyelerinin düşük olması nedeniyle veya genlerin

promotor bölgelerinde CpG adaları bulunmaması nedeniyle saptanamamaktadır. Bu yüzden, metile CpG adalarının bazıları neoplastik süreçte patofizyolojik olarak önemlidir. Buna rağmen, gen spesifik metilasyon sıklığı hastalıkların sınıflandırılmasında ve prognozunda önemli bir değer olarak düşünülmektedir (Oki ve Issa,2010).

Anormal DNA metilasyonu karsinogenezde tümör baskılayıcı genleri susturmaktadır ve bu şekilde işlevsel proteinlerin ekspresyonunu engelleyen delesyon ve fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlara alternatif bir mekanizma olarak önemli rol oynamaktadır (Oki ve Issa,2010; Blum ve Marcucci,2005). Anormal promotor metilasyonu bir kez meydana geldiğinde, belirli transkripsiyon faktörlerinin (AP2, E2F ve nükleer faktor-κB gibi) inhibisyonuyla ve/veya transkripsiyonu baskılayıcı faktörlerin bir araya gelmesiyle transkripsiyon engellenir. Bu bağlamda metile CpG bağlanma bölgeleri içeren represör protein kompleksleri, metile CpG adalarını tanır ve histon deasetilazların da (HDACs) toplanmasıyla, kromatin transkripsiyonel olarak etkisiz bir hale gelir (Blum ve Marcucci,2005).

Hücre proliferasyonu, farklılaşma ve apoptozisi düzenleyen yollarda çalışan birçok gen, myeloid blastlarda metilasyonla susturulmuştur ve bu genlerin transkripsiyonel olarak inaktivasyonları lösemi oluşumuyla ilişkilendirilmektedir (Blum ve Marcucci,2005).

Epigenetik olarak modifiye olmuş genlerin metilasyona duyarlı tedaviler için hastaları sınıflandırmada biyobelirteç olarak kullanılabilmesi rağmen AML’de metilasyonu görülen bazı genler, belirli hasta gruplarıyla ilişkilendirilmektedir. Örneğin, proapoptotik bir serin/treonin kinaz olan “ölümle ilişkili protein kinaz”, hedef bir tümör baskılayıcı gen olup, de-novo AML’ye göre terapi-ilişkili AML’de sıklıkla metilasyonuna rastlanılan bir genidir. Benzer şekilde, *WIT-1* genindeki susturulma direnç gösteren ve tekrarlayan AML hastalarında kemosenesitif olanlara göre daha sıklıkla rastlanmıştır. Tedavi öncesi bireylerde *WIT-1* metilasyonu, primer dirençli AML hastalarında %87,5 oranında görülürken, tam remisyona giren hastaların %37’sinde saptanmıştır. Son yıllarda da JAK/STAT sinyal iletim yolağında önemli bir gen olan *SOCS-1*’in promotor bölgesinin metilasyonu sitogenetik olarak

önemli farklılıklar gösteren yeni tanı AML hastalarının %60'ında rapor edilmiştir (Blum ve Marcucci,2005).

Normal ve malign hematopoezde gen susturulmasında önemli rol oynayan olaylar olarak görülen histon deasetilasyonu ve gen promotorundaki CpG adaları metilasyonu arasındaki etkileşim şu yollarla gerçekleşmektedir:

1. Aktif üç DNA metiltransferazın (DNMT1, DNMT3A, DNMT3b) histon deasetilazlarla etkileşime girerek birçok haberci gen sistemlerinin transkripsiyonel olarak susturulmasını indükler.
2. Aşırı derecede metilasyon görülen heterokromatin oluşum sürecinde histonlar deasetile olurken, DNMT1, hücre döngüsünün ileri S fazı süresince HDAC2 ile replikasyon çatalında lokalize olur.
3. Histon deasetilasyonu ve DNA metilasyonu arasındaki diğer bir ilişki metil-bağlayıcı proteinlerin aktivitesiyle gerçekleşmektedir. Bu proteinlerin metile bir promotora bağlanması, HDAC'ların oraya toplanmasını sağlar.

Son çalışmalar, asetilasyondan başka translasyon sonrası histon modifikasyonlarının da genomik metilasyonun kontrolünde aktif bir rol oynadığını göstermektedir.

CpG bakımından zengin promotorları olan genlerde transkripsiyonel susturulma, CpG adalarına komşu olan CpG bakımından fakir DNA bölgelerinin metilasyonu ile meydana gelir. Bu komşu bölgelerin metilasyonunun histon H3 lizin 4 ve 9 uçlarının metilasyonu ile regüle edildiği düşünülmektedir. Histon H3 lizin 9 metilasyonu transkripsiyonel baskılanmayla ilişkili iken histon H3 lizin 4 metilasyonu transkripsiyonel olarak aktif kromatinle ilişkilidir (Blum ve Marcucci,2005).

Birçok AML vakasında, transkripsiyon aktivatörlerinin DNA'ya bağlanan bölgeleriyle füzyon oluşturarak, transkripsiyonel olarak suskunluğa neden olan kromozomal translokasyonlar, myeloid farklılaşmayı düzenleyen hedef genlerin ifadenmesinde azalmaya neden olmaktadır ve bu şekilde myeloid farklılaşmanın duraklamasıyla karakterize olan akut lösemi oluşumuna sebep olmaktadır. AML1-ETO ve PML-RARA gibi füzyon proteinlerinin transkripsiyonel olarak susturulmasının histon

asetilasyonu ve promotor metilasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Brown ve Smith,2008). Sonuç olarak, AML blastlarında ifadelenen kimerik füzyon proteinleri gen represyonunun düzenlenmesinde hem DNMT hem HDAC'ları toplayarak temel regülatör olarak çalışmaktadırlar. Di Croce ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, PML/RARA füzyon proteininin hem DNMT hem de HDAC'ları toplayarak retinoik asit hedef genlerinin transkripsiyonunu susturduğu gösterilmiştir (Di Croce ve ark.,2002). Benzer şekilde Liu ve ark., AML1/ETO füzyon proteini ile ilgili yaptıkları çalışmada, AML1/ETO'nun hedef genlerinin susturulmasında HDAC'lara ek olarak DNMT1 ile de ilişki kurduğu gösterilmiştir (Liu ve ark.,2005). Genlerin promotor bölgelerindeki CpG adalarının metilasyonu ile meydana gelen transkripsiyonel susturma ve histon asetilasyonunun neden olduğu kromatin konformasyonundaki değişimlerin her ikisi de tedavi sürecinde hedeflenebilir değişimlerdir. DNA metiltransferaz inhibitörleri ve histon deasetilaz inhibitörleri ile epigenetik olarak susuturulmuş genlerin ifadelenmeleri sağlanabilir ve lösemik fenotipin değişmesi sağlanabilmektedir (Brown ve Smith,2008). Transkripsiyonel baskılanmanın işleyişini gösteren veriler ve olası mekanizmalar göz önünde tutulduğunda, HDAC veya DNMT inhibitörleri gibi “epigenetik hedefleyici ilaçlar”ın tedavi protokolüne eklenmesinin kanser tedavisini daha etkin kılacağı düşünülmektedir (Blum ve Marcucci,2005).

#### **1.5.1.1. Östrojen Reseptörü (ER) Geni Promotor Metilasyonu**

*ER* geni, kromozom 6q25.1'de lokalizedir. Östrojen reseptörleri nükleer steroid-tiroid hormon reseptör ailesinin üyelerindedir. *ER* promotorunun anormal olarak metilasyonu ve buna bağlı olarak *ER* ifadesinin epigenetik olarak susturulması, birçok kanser türünde özellikle meme kanseri ve kolorektal kanser türlerinde bildirilmiştir. Akut lösemilerde *ER* promotorunun anormal olarak metilasyonu, epigenetik olarak bu genin susturulmasıyla bağlantılıdır ve lösemilerin tanı, prognoz ve tedavisinde epigenetik belirteç olarak kullanılmaktadır. %50-90 sıklıkla akut ve kronik lösemide metile olduğu analiz edilmiştir (Yao ve ark.,2008). Östrojen normal hematopoezin negatif regülatörü olarak bilinmektedir. *ER* genini içeren kromozom 6q insan hematopoetik neoplazilerde sıklıkla değişmektedir(Issa ve ark.,1996). CpG hipermetilasyon derecesini ölçmek için yapılan bisülfid genomik sekanslamada, CpG



bakımından zengin promotor bölgesi olan 22 CpG adacığı ölçülmüştür ve analiz edilen normal kemik iliğı örneklerinde *ER*'in bu bölgesinde herhangi bir metilasyon bulunmamıştır. Bunun tam tersine, AML hastalarının %54'ünde kemik iliğı örneklerinde, 22 CpG adacığında düşük seviyede metilasyon saptanmıştır. Metilasyon profili oldukça heterojen olmasıyla birlikte, 15 'ten 20'ye kadar olan CpG adacıkları ortak bir şekilde metillenmiştir (Melki ve ark.,1999). Leone ve ark. yaptıkları çalışmada, insanlarda görülen kanserlerde, hücredeki birçok yolakta olduğu gibi hormonal cevapta rol alan östrojen reseptörünün hipermetilasyonla inaktive olduğunu göstermiştir. AML'li hastalarda östrojen reseptör promotorunun metilasyonun sıklığının %40-69 olduğu belirtilmiştir (Leone ve ark.,2008). Ekmekçi ve ark. yaptıkları çalışmada AML hastası çocuklarda *ER* metilasyonunu %55 bulmuşlardır (Ekmekçi ve ark.,2004).

#### 1.5.1.2. Siklin Bağımlı Kinaz 2B (CDKN2B/ P15) Geni Metilasyonu

*CDKN2B/ p15* geni, kromozom 9p21'de yerleşiktir. Bu gen, CDK4 veya CDK6 ile kompleks oluşturan silkin-bağımlı kinaz inhibitörünü kodlar ve CDK kinazların aktivasyonunu engeller. Bu yüzden bu genin kodladığı protein, hücre büyümesi regülatörü olarak işlev görür ve bu şekilde hücre döngüsünün G1'e ilerlemesini kontrol eder. *CDKN2B*'nin metilasyonu MDS ve AML'de belirteç olarak ve tek başına veya diğer lokuslarla birlikte prognostik indikatör olarak kullanılmaktadır (Candiloro ve ark.,2008). Bu tümör supresör geni sıklıkla AML'de promotor hipermetilasyonu ile susturulur. 5-aza-2'-deoxycytidine gibi DNA metilasyon inhibitörleri *p15INK4B* promotor metilasyonunu geri çevirir. Decitabinin bazı AML hastalarında *P15* geninin anormal hipermetilasyonunu geri çevirdiğı gösterilmiştir (Stuart ve ark.,2007). Ekmekçi ve ark., Melki ve ark.'nın sonuçlarıyla tutarlı olarak *P15* geninin metilasyonunun AML'de kritik olduğunu bulmuştur. *ER* dışında *P15* geninin de prognostik bir işaret için önemli olduğunu bildirmişlerdir. Leone ve ark. hücre döngüsünde işlevi olan *P15* geninin metilasyon sıklığını %30-71 bulmuşlardır. Hematolojik malignansilerde *P5INK4b* tümör baskılayıcı geninin anormal DNA hipermetilasyonu ALL ve AML'li hastaların en az yarısıyla ilişkilendirilmiştir (Shimamoto ve ark.,2005).

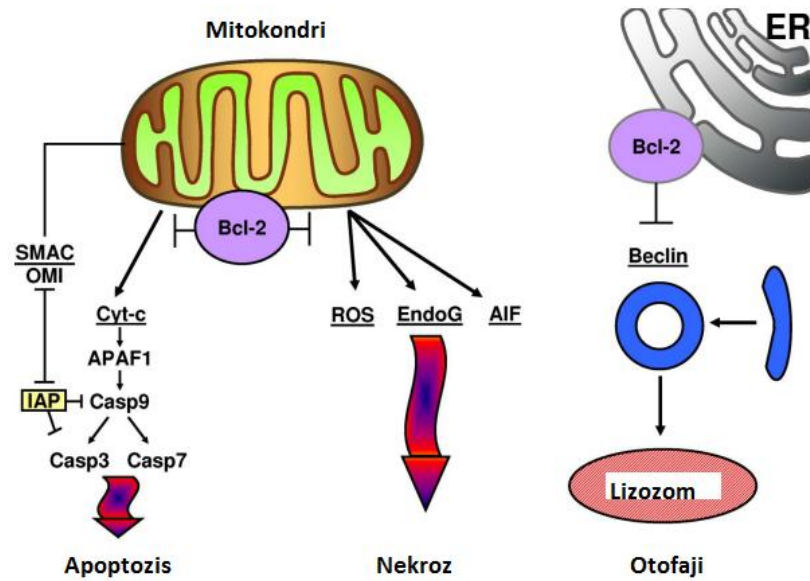
## 1.6.2. AML’de Anormal Gen İfadesi

### 1.6.2.1. Caudal Type Homeobox 2 (CDX2) Geninin İfadesi

Kümelenmiş homeobox (HOX) genleri hematopoetik gelişim ve devamlılık açısından önemlidir ve hematopoetik öncül hücrelerde bu genin ifadesi görülmektedir. Hematopoetik kök hücrelerin kendini yenileme süreçlerinde HOX genlerinin ifadesi görülürken, terminal farklılaşmada ifadeleri azalmaktadır. Son veriler HOX genlerinin lösemi oluşum sürecinde önemli etkileri olduğunu göstermektedir. Akut Myeloid Lösemi ve Akut Lenfoblastik Lösemi dokularında yapılan gen ifadesi çalışmalarının büyük çoğunluğunda HOX geninde bozukluk saptanmıştır. Gelişim süresince hematopoezde Hox gen ifadesinin regülasyonunun önemine bağlı olarak, AML’de HOX genlerinin yukarı bölgesindeki regülatörler hakkındaki bilgilerin yetersizliği, CDX proteinlerinin AML patogenezinde rolü olabileceğini akla getirmiştir. Bir AML vakasında *CDX2* geninde resiprokal translokasyon saptanması, bu genin AML patogenezinde önemli rolü olduğunu göstermiştir. *CDX2* geni gastrointestinal sistemde hücreye bağlı olarak hem tümör baskılayıcı hem de protoonkogen aktivitesi göstermektedir. Buna ek olarak, Homeobox transkripsiyon faktörü olan *CDX2* embriyonik gelişimde önemli rol oynar ve yetişkinlerde intestinal epitel hücrelerin farklılaşması ve proliferasyonunu düzenler. *CDX2* lokusunun yüksek seviyede amplifikasyonu, dizin-temelli karşılaştırmalı genomik hibridizasyon yöntemiyle bir grup AML hastasında gösterilmiştir (Fröhling ve ark.,2007). Scholl ve ark. yaptıkları çalışmada, AML’li hastalarının %90’ında *CDX2*’nin ifade edildiğini ama normal bireylerdeki hematopoetik ve kök hücrelerde ifadesinin olmadığını bulmuşlardır. Gelişim sürecinde düzenleyici bir protein olan *CDX2*’nin, yetişkin hematopoetik hastalarda anormal olarak ifadesi, AML patogenezinde sıklıkla görülen bir olaydır ve myeloid progenitör hücrelerin kendini yenileme potansiyelini ve proliferasyon kapasitesini kolaylaştıracak bir yolakta etken bir rolü olduğu göstermekte ve birçok AML hastasında görülen *HOX* geninin ifadesinin değişmesinden *CDX2* geninin sorumlu olduğu düşünülmektedir (Scholl ve ark.,2007)

### 1.6.2.2. B-hücreli Lenfoma 2 (BCL-2) Geninin İfadesi

*BCL-2* apoptozisi düzenleyen bir onkogendir. Yüksek seviyede ifadesi, lenfoid ve myeloid kökenli hematolojik kanserlerin içinde olduğu birçok malign hastalığı gösterilmiştir. *BCL-2* onkoprotein miktarının artması, malign hücelere yaşamsal avantaj sağlayan iç apoptotik yolağın disregülasyonu ile sonuçlanmaktadır. Normal şartlarda, dış apoptotik sinyalin hücre zarından mitokondriye taşınması sitokrom c salınımı ve kaspaz-aracılı yolağın indüklenmesiyle sonuçlanmaktadır. Artan miktarlardaki *BCL-2* proteininin iç mitokondri zarında stabilize olması sitokrom c salınımını engellemektedir ve kaspaz aktivitesini sekteye uğratmaktadır. *BCL-2*, memeli otofaji sisteminin temel bileşeni olan Beklin proteinine bağlanarak otofajiyi de baskılamaktadır (Şekil 1.7) (Reed, 2008).



**Şekil 1.7.** BCL-2'nin apoptozis, nekroz ve otofajiyi baskılama mekanizması (Reed, 2008)

*BCL-2* onkoproteininin ifadesinin susturulması apoptotik yolağın tekrar oluşmasını sağlamaktadır ve bu sayede malign hücelerin antikanser tedavi ajanlarına hassasiyet kazanmaktadır. *BCL-2* geninin ifadesinin artması, standart kemoterapötik ajanlara direnç, erken relapsa ve tümenden sağkalım süresinin azalmasıyla karakterize olan agresif malign klonlar ile ilişkilendirilmektedir. AML hastalarındaki lösemi hücrelerinde *BCL-2* proteininin yüksek seviyede ifadesi tedaviye kötü cevap ve kötü klinik sonlanım ile ilişkilendirilmektedir (Chanan-Khan,2004;Nayera ve ark.,2009).

### 1.7. AML Tedavisinde Steroidlerin Kullanımı

Glukokortikoidler hipotalamus-hipofiz bezi-adrenal aksisinin sitokinle stimülasyonundan sonra adrenal bezlerden üretilen steroid hormonlardır. Tüm doğal steroid hormonlar ortak bir kimyasal yapıyı paylaşırlar ve aktivasyonlarına özel olarak çekirdeğe bağlanan ek kimyasal gruplara sahiptirler. Glukokortikoidler immün cevap, metabolizma, hücre büyümesi, çoğalması, gelişimi ve üremeyi içeren birçok biyolojik süreçte işlev görürler. Glukokortikoidlerin antiproliferatif etkisi sayesinde, immün baskılama, inflamasyon tedavisi ve sitotoksinin indüklenmesi için kullanılmaktadırlar. Glukokortikoidler apoptozisi indüklemektedirler ve lösemi, lenfoma ve Multiple Myeloma(MM) gibi birçok hematolojik hastalığın tedavisinde anahtar rol oynamaktadırlar (Sionov ve ark.,2008). Glukokortikoidler (dekzametazon gibi), eklem iltihabı gibi ateşli hastalıklar, astım, dermatitis ve otoimmün hastalıkların tedavisinde çok önemli bir yere sahiptir. Dahası glukokortikoidler kanser tedavisinde de yaygın olarak kullanılmaktadır, 1960'ların başlarında çocukluk çağı lösemilerinde, hastalığın gerilemesini sağlamak için kullanılmaya başlanmıştır. Daha sonra glukokortikoidlerin etkili bir şekilde lenfoid hücreleri öldürdüğünün bulunmasıyla, glukokortikoidler lenfoid hastalıklarda uygulanan tüm kemoterapi protokollerine katılmıştır. Glukokortikoidlerin normal ve tümörlü hücreleri antiproliferatif etkiye zorladığı gösterilmiştir. Çeşitli hücre serilerinde *in vitro* yapılan çalışmalarda, glukokortikoidlerin uzaklaştırılmasından sonra hücre döngüsünün senkronize şekilde ilerlediği gösterilmiş, buna bağlı olarak glukokortikoidlerin antiproliferatif etkisinin, hücre döngüsünün ilerleyişinde tersinir G1-blokajına aracılık edebileceği bildirilmiştir (Mattern,2007).

Glukokortikoid reseptörü (GR), steroid/tiroid hormon reseptör süper ailesinin bir üyesi olup, cinsiyet hormonlarının, tiroid hormonlarının, vitamin D'nin, mineralokortikoidlerin ve retinoidlerin reseptörleri bu aileye aittir. İhtiyaç duyulduğu anda eksprese olan, ligand-bağımlı bir transkripsiyon faktörü olup, büyüme, gelişme, metabolik fonksiyon ve stres cevabını etkilemektedirler. Glukokortikoid reseptörleri hem çekirdek reseptörü olarak hem de hücre zarına bağlı reseptör olarak eksprese olmaktadır. Çekirdek reseptörleri, glukokortikoid reseptör elementleri (GRE) olarak bilinen spesifik DNA dizileriyle homodimer oluşturarak çok sayıda genin

ekspresyonunu aktive ederek veya baskılayarak düzenlemektedirler. Ligandına bağlanmamış dinlenme halindeki hücre içi GR proteini heterooligomerik kompleks olarak sitoplazma içinde yer alır. Bu kompleks yapı, bir steroid bağlayıcı protein ve bir de lipofilik hormon ligandına bağlanabilen birden çok alt üniteye sahip steroid olmayan bir bileşenden oluşmaktadır. Ligandının bağlanmasıyla, GR'nin konformasyonel yapısı değişikliğe uğrar ve reseptör, inhibitör etkisi olan hsp90 şaperonundan ve diğer moleküllerden ayrılır. Reseptörün inhibitör moleküllerden ayrılması, GR'nin çekirdeğe girerek GRE'ye bağlanmasına ve transkripsiyon modülatörü olarak çalışmasına neden olur. Uygun GRE'ye bağlanır bağlanmaz, GR hedef genlerinin transkripsiyonunu kontrol etmeye başlar. GR tarafından pozitif regüle edilen genler promotor bölgelerindeki GR elementleri ile karakterize edilirler. GR aynı zamanda negatif GRE ile etkileşime geçerek baskılayıcı olarak da çalışıp, gen transkripsiyonunu inhibe edebilmektedir (Greenstein, 2002).

GC muamelesinden etkilenen birçok gen için, hücre döngüsünün ilerleyişi özellikle G1'den S fazına geçiş oldukça önemlidir. Steroidler tarafından düzenlenen hücre döngüsü regülatörleri siklin D3 ve c-myc proteinlerini içermektedir. GC'lerin kemoterapötik etkilerinin bir bölümünü, hücre döngüsü üzerindeki inhibitör etkileri oluşturmaktadır. Hem apoptozis hem proliferasyon, hem de hücre ve doku homeostazisi için gereklidir. Hücre döngüsü süreci bu iki süreçle bağlantılıdır ve ikisi de apoptotik uyarılardan etkilenmektedir. GC'lerin insan T lösemi hücrelerinde G1 fazında hücre döngüsünü durdurduğu ve lösemik hücreleri lenfoid hücrelere dönüştürdüğü bilinmektedir. Hücre döngüsünün duraklaması, özellikle yüksek oranda çoğalan kanser hücrelerinde tek başına bir apoptotik sinyaldir. Tam tersine hücre döngüsünün inhibisyonu hücre döngüsüyle ilişkili olayların bir dizisinin bir parçası da olabilir. c-myc ve siklin-D3'ün ekspresyonunun azalması, çoğalan hücrelerde GC ile indüklenen hücre ölümü için önemlidir. Buna ek olarak, GC ile hücre döngüsünün duraklatılması birçok hematolojik malignansilerde *p21<sup>Waf1</sup>* ekspresyonunun indüklenmesiyle ilişkili bulunmuştur. E2F, p53 ve Rb gibi diğer G1 regülatörleri apoptozise, programlı hücre ölümü ile hücre döngüsü bağlantısı sayesinde dahil olmaktadır. Tüm bu bilgiler birleştirildiğinde, GC ile indüklenen hücre döngüsü blokajı hücrenin sağkalım ve proliferatif faktörlerinin baskılanmasıyla birliktelik etmektedir (Greenstein, 2002).

Metilprednizolon, sentetik bir glukokortikoid olup, doğal glukokortikosteroidin, hidrosikortizonun kimyasal bir modifikasyonudur. Büyük ölçüde dokulara dağılır, oral biyoyararlanımı yüksektir ve kan-beyin bariyerini geçebilir. Birçok *in vitro* çalışma, deksamethazonun ve prednizolonun bazı fare ve insan myeloid lösemi hücrelerinde makrofaj ve granüositlere farklılaşmayı indüklediğini göstermiştir (Sloka ve Stefanelli,2005). Yüksek doz metilprednizolon (High-dose methylprednisolone-HDMP) tedavisi boyunca lösemi hücrelerinin sayısında ciddi azalma ve buna bağlı olarak myelosit, metamyelosit ve granüositlerin hem periferal kanda hem kemik iliğinde arttığı görülmüştür (Hiçsönmez ve ark.,1993). Glukokortikoid yapıda bir ilaç olan dexamethazonun yüksek konsantrasyonda verildiğinde fare myeloid hücrelerin çoğalmasının duraklatılması sağlanmıştır. İnsan promyelositik lösemi hücre serisinde (HL-60) kortikosteroidlerin ve APL (Akut Promyelositik Lösemi) hücrelerinde deksamethazonun anti-proliferatif etkisi vardır. Hiçsönmez va arkadaşları 1988'den beri yeni AML tanısı konmuş çocuklar (AML'nin çeşitli alt tiplerinde ) ve hastalığı tekrarlayanların tedavisinde, HDMP'nin belirgin bir lösemi karşıtı etkisi olduğunu göstermişlerdir (Hiçsönmez ve ark.,2006). Ayrıca kısa süreli (5-7 gün) kullanılan HDMP tedavisiyle, farklılaşma ile veya farklılaşma olmadan myeloid lösemi hücrelerinin apoptozise indüklendiği gösterilmiştir. HDMP tedavisiyle sitokinlerin baskılanmasının lösemi hücrelerinde apoptozisi indüklemeye rol oynadığı bildirilmiştir (Hiçdönmez ve ark.,1996). Kortikosteroidler lenfoblastlarda, hücre döngüsünde duraklama, kaspaz ve p53 geninin aktivasyonunda artış, *AP-1*, *NF-K B*, *c-myc* gibi genlerin transkripsiyonunu düşüş, IL-6, RAFTK, SHP-2 VE STAT-3 gibi hücre-sinyal transdüksiyon moleküllerinin regülasyonu, hücre içi kalsiyumun artışı yoluyla apoptotik etki gösterirler. Buna ek olarak kısa süreli HDMP tedavisi CD34 (+) hematopoetik progenitör hücreleri stimüle ederek lökosit iyileşmesini hızlandırdığı da bildirilmiştir (Hiçsönmez ve ark, 2006; Cetin ve ark. 1996).

HDMP'nin etkisinin incelendiği bir diğer çalışmada, HDMP 4 gün için, tek dozda 30mg/kg ağız yoluyla yeni tanı konmuş 16 ALL'li ve 7 AML'li hastaya verilmiştir. Sonuçta, sitotoksik T hücreleri ve doğal öldürücü hücreler artarken, blast hücrelerinin yüzdesi azalmıştır. HDMP tedavisinin başlangıcından 4 saat sonra blast hücre sayısındaki düşüşle ilişkili olarak apoptoziste artış saptanmıştır (Erduran ve ark.,2006). HDMP tedavisinden dört gün sonra blast hücrelerinin kaybolduğu, normal granüosit

hücrelerin arttığı görülmüş. (Hiçsönmez ve ark.,1993). Son zamanlarda birçok çalışma, sıklıkla farklılaşan hücrelerde görülen hormonlarla indüklenen gen ekspresyonunun, asetilasyon, metilasyon ve fosforilasyon gibi modifikasyonlarla ana kromatin şeklinde değişikliğe yol açması sayesinde olduğunu göstermiştir. Tanımlanmış birçok modifikasyon arasında en fazla çalışılanlar asetilasyon ve metilasyondur, çünkü histon H3 modifikasyonları transkripsiyonun açılıp kapanmasıyla ilişkilidir. Lizin 9/14'te histon H3 kuyruğunun asetilasyonu ve histon H3 kuyruğunun lizin 4'te metilasyonu transaktivasyonla ilgilidir. Diğer taraftan, H3 kuyruğundaki lizin 9'da histon metilasyonunun transkripsiyonun baskılanmasıyla ilgili olduğu bilinmektedir (Mochuziku ve ark.,2008).

Çocukluk çağı lösemilerinin tedavisinde 1960'ların başından beri kullanılan glukokortikoidlerden biri olan metilprednizolon, 1988'den beri yeni AML tanısı konmuş çocuklar ( AML'nin çeşitli alt tipleri görülen) ve hastalığı tekrarlayanların tedavisinde yüksek dozda kullanıldığında başarılı sonuçlar vermektedir (Hiçsönmez ve ark.,2000). Metilprednizolon, myeloid lösemi hücrelerinin granüositlere ve makrofajlara farklılaşmasını ve hem farklılaşma ile eşzamanlı hem de farklılaşma olmadan myeloid lösemi hücrelerinin apoptozisini indüklemekte ve antiproliferatif etki göstermektedir (Hiçdönmez ve ark.,1996). Bu çalışmada metilprednizolonun, AML'deki malign blastik hücrelerin diferansiyasyonunda epigenetik mekanizmalardan olan DNA metilasyonu üzerindeki etkisi araştırılacaktır. Bu çalışma kapsamında *p15*, *CDX2*, *ER*, *BCL-2* genlerinin metilasyon profilleri incelenecektir. Çalışma planlanırken hücre döngüsü ve proliferasyon ile ilgili genler seçilmiştir. Seçtiğimiz genlerden *p15* geninin kodladığı protein, hücre büyümesinin negatif regülatörü olarak işlev görür ve bu şekilde hücre döngüsünün G1'e ilerlemesini kontrol eder. *P15* ve *ER* genleri AML'de sıkça metilasyonuna rastlanmaktadır (Tsuji-Takayama ve ark.,2004). *ER* büyüme ve metastazı baskılayıcı etkiye sahip olup, hematopoezin negatif regülatörüdür(Issa ve ark.,1996). *CDX2* geni ise AML'de anormal olarak ifade edilmektedir ve lökomogenezisi indüklemektedir (Scholl ve ark.,2007). Anti-apoptotik gen ve bir onkogen olan *BCL-2* geninin AML'de artmış ifadesi görülmektedir.

Metilprednizolonun, etkisini epigenetik düzeyde DNA metilasyon paterni üzerinde değişiklik yaparak gösterdiğini düşünerek, bu projede AML'de hücre döngüsü,

proliferasyondan sorumlu genlerin metilasyon profilinin araştırılması planlanmıştır. Bu araştırmanın sonucunda metilprednizolon uygulamasını takiben metilasyon profiline bakmayı amaçladığımız genlerin pediatrik AML'li hastalarda tedavi amaçlı kullanılan bu ajanın etki mekanizması aydınlatılmaya çalışılacaktır. Alınacak sonuca göre metilprednizolonun epigenetik mekanizmalar üzerine etkisi belirlenecek ve tedavinin etkinliği ve hasta takibi için bir belirteç olarak kullanımı konusunda bilgi sahibi olunacaktır.



## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar

#### 2.1.1. Hücre Kültürü

**Çizelge 2.1.** Hücre kültüründe kullanılan malzeme ve gereçler

<b>Besi yeri</b>	Hyclone marka, Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 (1X), No: SH30096.0 1 (L-glutaminsiz)
<b>Fötal Dana Serumu (FBS)</b>	Hyclone marka, No: SV20160.03
<b>L-Glutamin</b>	PAA marka, 200mM (100X), No: M11-004
<b>Penisilin-Streptomisin</b>	PAA marka, No: P11-010
<b>Hücre Dondurma tüpleri</b>	Applichem marka, No: 67-68-5
<b>Dimetilsülfoksit (DMSO)</b>	Greiner bio-one marka, 2 ml
<b>PBS 10X</b>	Hyclone marka- HyQ Phosphate Buffered Saline .067M (PO4) No: SH30258.01
<b>Flask (75 cm<sup>2</sup>)</b>	Orange Scientific marka, No: 5520200

### 2.2. Agaroz Jel Elektrofrezisi

**Çizelge 2.2.** Agaroz jel elektrofrezisi için gerekli malzemeler

<b>Malzeme adı</b>	<b>Üretici firma</b>	<b>Katalog no</b>
Agaroz	Prona	
Tris	Bio basic inc	TB0194
Borik asit	Amresco	0588
EDTA	Applichem	A2937
Etidyum bromür	Applichem	A1151

### 2.3. Yükleme Tamponu

**Çizelge 2.3.** Yükleme Tamponu İçin Gerekli Malzemeler

Malzeme adı	Üretici firma	Katalog no
Xylene cyanol	Amresco	0819
Gliserol	Applichem	A2926

### 2.4. Yürütme Tamponu

**Çizelge 2.4.** Yürütme Tamponu İçin Gerekli Malzemeler

Malzeme adı	Üretici firma	Katalog no
Tris	Bio Basic Inc	TB0194
Borik asit	Amresco	0588
EDTA	AppliChem	A2937
NaOH	Sigma-Aldrich	06203

### 2.5. EDTA solüsyonu

**Çizelge 2.5.** EDTA Solüsyonu için gerekli malzemeler

Malzeme adı	Üretici firma	Katalog no
EDTA	Applichem	A2937
NaOH	Sigma-Aldrich	06203

### 2.6. Etidyum Solüsyonu

**Çizelge 2.6.** Etidyum Solüsyonu için gerekli malzemeler

Malzeme adı	Üretici firma	Katalog no
Etidyum bromür	Applichem	A1151

### 2.2. Çalışma Grubu

Çalışmaya Pediatrik Akut Myeloid Lösemi Tedavisinde Kullanılan Metilprednizolon'un DNA Metilasyonu üzerine etkisini tespit etmek üzere Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji Ünitesi'nden Akut Myeloid Lösemi

tanısı almış 6 çocuk ve akut myeloid lösemi hastalığını taklit eden HL-60 hücre serisi dahil edilmiştir. Hastaların yaşları 6 ila 17 arasında değişmektedir. Hastalardan birinin cinsiyeti kız diğerlerinin ise erkektir. Hastalardan aydınlatılmış onamları alındıktan sonra ilk tanı kemik iliği örneklerinden ve 5-7 günlük yüksek doz metilprednizolon tedavisinden sonra alınan kemik iliği örneklerinden yaklaşık 1-2 ml alınmıştır. Onam formu ekte sunulmuştur.

### **2.2.1. HL-60 Hücre Serisi**

Belirli myeloid özellikleri taşıyan HL-60 hücre serisi ilk 1977 yılında Collins ve arkadaşları tarafından akut promyelositik lösemili bir hastadan elde edilmiştir. *In vitro* olarak farklılaşmaya indüklenebilme özelliği ile lösemik hücre serisi çalışmalarında önemli yere sahip olmuştur. Granülosit, monosit ve makrofaj farklılaşmasını kontrol eden mekanizmalara bakış açısı getirmesi, lösemili hastalara uygulanan tedavilere yeni yaklaşımlar sağlaması, onkogen ekspresyonu ile hematopoetik farklılaşma süreci arasındaki ilişkinin aydınlatılması gibi farklı konuların çalışılması için önemli bir model oluşturmaktadır (Collins, 1987). HL-60 hücrelerinin iki katına çıkma süreleri yaklaşık 36-48 saattir. Bu çalışmada, HL-60 hücreleri %10 serum, %1 L-glutamin, %1 streptomisin-penisilin içeren RPMI 1640 besiyeri ortamında çoğaltıldılar. Büyümeleri için gerekli olan 37°C sıcaklık ve %5 CO<sub>2</sub> içeren etüvde inkübe edildi.

### **2.3. HL-60 Hücre Serisinde Metilprednizolon Doz Denemeleri**

Çalışmada Prednol-L (Mustafa Nevzat) kullanıldı. 10<sup>-2</sup>, 5x10<sup>-3</sup>, 10<sup>-3</sup>, 5x10<sup>-4</sup> ve 10<sup>-4</sup> ve 10<sup>-5</sup> dozları denendi. 24. ve 48.saatlerdeki sonuçlar analiz edildi. Toksik doz, apoptotik doz ve farklılaşma için etkin doz belirlendi.

#### **2.3.1. [3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromid] (MTT)**

##### **Sitotoksisite Testi**

Metilprednizolonun hücreler üzerindeki sitotoksisite düzeylerini saptamak amacıyla MTT yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla aşağıda yer alan protokol izlenmiştir.

- 96 kuyucuklu plakın ekim yapılacak her bir kuyucuğuna 10 µl MTT (5 mg/1 ml) koyulduktan sonra üzerine 100 µl hücre- besiyeri karışımından eklenmiştir. 100 µl 'de 10.000 hücre olacak biçimde ekim yapılmıştır.
- Bu hücreler 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde en az 4 saat bekletildikten sonra her bir kuyucuğa. 100 µl lizis solüsyonundan eklendikten sonra tekrar aynı koşullarda konularak 1 gece beklendi.
- Ertesi gün spektrofotometrede (Epoch marka ) 550 nm ve 690 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.

### **2.3.2. Akım Sitometri İle Apoptozis Tayini**

Lösemik blast hücrelerini apoptoza ve farklılaşmaya götürdüğü bilinen yüksek doz metilprednizolonun bu çalışmada kullanılan dozlarda, HL-60 hücrelerinde etkisini gösterip göstermediğini doğrulamak amacıyla akım sitometri analizleri yapılmıştır. Apoptozis tayini için, hücreler Annexin V ve propidyum iyodür ile işaretlenerek Accuri C6 cihazı ile akım sitometri analizi ile gerçekleştirilmiştir.

#### **2.3.2.1 Anneksin V ve Propidyum İyodür ile İşaretleme Protokolü**

BD Pharmingen FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit kullanılmıştır. Kitin protokolü uygulanmıştır.

1. 1 ml besiyerinde 10<sup>6</sup> hücre olacak şekilde hücreler ependorfa aktarıldı.
2. 2500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
3. Süpernatant atılıp, peletin üzerine 1X PBS eklendi. Hafifçe elle vurularak pelet çözüldü.
4. 2500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
5. Süpernatant dökülüp, üzerine tekrar 1XPBS eklendi. Hafifçe elle vurularak pelet çözüldü.
6. 2500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
7. Süpernatant dökülüp pelete katten çıkan 1X Binding Buffer'dan 200 µl eklendi.

8. Bu karışımdan 50 µl başka bir ependorfa aktarıldı. Aktarılan hücrelere 2,5 µl AnnexinV ve 2,5 µl PI eklendi.
9. Karanlıkta 15 dakika beklendi.
10. Üzerlerine 1X Binding Buffer'dan 200 µl eklendikten sonra akım sitometri analizine başlandı.

### 2.3.3. Akım Sitometri İle Farklılaşma Tayini

Hücrelerin farklılaşmasını saptamak amacıyla da HL-60 hücrelerine özgü CD13, CD33 pozitifliği ve HLA-DR negatifliği saptanmış ve olgun myeloid hücre yüzey antijeni olan CD11b'nin Accuri C6 cihazı ile akım sitometri analizi yapılmıştır.

#### Çizelge 2.7. Çalışmada kullanılan antikorlar

CD Hücre Yüzey Belirteci	Marka	Katalog No
CD13-PE	Becton-Dickinson	347406
CD33-FITC	Biolegend	303304
HLA-DR-FITC	Becton-Dickinson	347400
CD11B-FITC	Biolegend	301404
Isotype-FITC	Biolegend	400110
Isotype-PE	Biolegend	400112

#### 2.3.3.1. Akım Sitometride Hücre Yüzey Antijenleri İşaretleme Protokolü

1. 1 ml'de  $10^6$  hücre olacak şekilde hücreler bir ependorfa alındı.
2. 2500 rpm'de 1 dakika santrifüj edilip, üstte kalan besiyerleri atıldı.
3. Pelet üzerine 90 µl boyama solüsyonu ve 10 µl antikor koyulduktan sonra 30 dakika buzda ve karanlıkta bekletildi.
4. Boyama solüsyonundan kurtulmak amacıyla boyama solüsyonundaki hücrelere 500 µl PBS eklendikten sonra 2500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
5. Üst kısmı atıldıktan sonra pelet üzerine 100 µl steril PBS konularak Accuri C6 cihazı ile akım sitometri analizi yapıldı.

## 2.4. DNA İzolasyonu

Hastaların ilk geliş ve yüksek doz metilprednizolon tedavisi sonrası alınan kemik iliği örneklerinden, HL-60 hücrelerinden DNA izolasyonu, Invitrogen PureLink™ Genomic DNA Kits (Catalog nos. K1820-01, K1820-02, K1821-04) ile yapılmıştır.

### DNA İzolasyon Protokolü

**“Invitrogen Purelink Genomic DNA” kiti kullanılmıştır.**

1. 200 µL kemik iliği örneği ependorfa alındı.
2. 20 µL proteinaz K, 20 µL RNase eklendi, kısa bir vorteks yapıldıktan sonra oda sıcaklığında 2 dakika beklendi.
3. 200 µL Purelink Genomic Lysis/Binding Buffer eklendi ve homojen bir solüsyon için vorteksle iyice karıştırıldı.
4. 55°C su banyosunda 15 dakika inkübe edildi.
5. 200 µL %96-100'lük etanol eklendikten sonra homojen bir solüsyon için 5 saniye vorteksle karıştırıldı.
6. Elde lizat kitten çıkan “Purelink Spincolumn” adlı kolonlu tüplere aktarıldı.
7. 10.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi.
8. Kolon yeni bir “Collection Tüpü”ne aktarıldı.
9. Kolona 500 µL Wasbuffer I eklendikten sonra, 10.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi.
10. Kolon yeni bir “Collection Tüpü”ne aktarıldı.
11. Kolona 500 µL Wasbuffer II eklendikten sonra, 13.000 rpm’de 3 dakika santrifüj edildi.
12. Kolon temiz bir ependorfa alındıktan sonra 100 µL “Genomic Eluting Buffer” eklendi.
13. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.
14. 13.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. (Bu aşamda DNA artık tüptedir.)

15. Kolona tekrar 100 µL “Genomic Eluting Buffer” eklendi.
16. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.
17. 13.000 rpm’de 1,5 dakika santrifüj edildi.
18. DNA artık tüpte olduğu için kolonlar atıldı.
19. DNA’lar -20°C’de saklandı.

#### **2.4.1. DNA’ların Spektrofotometrik Olarak Ölçümü**

İzole edilen DNA’ların saflık derecesi ve konsantrasyonu Biotek marka Epoch model spektrofotometre cihazı ile tayin edilmiştir.

#### **2.4.2. DNA’ların Jelde Görüntülenmesi**

DNA’lar %1’lik agaroz jelde görüntülenmiştir.

##### **10X TBE Hazırlanışı:**

Tris base        81 g

Borik asit       41,5 g

EDTA            30 ml

Tartılan kimyasallar yaklaşık 500 ml dH<sub>2</sub>O’da çözülür, pH: 8’e ayarlanır. Son hacim 750 ml’ye tamamlanır.

##### **Yükleme Tamponu Hazırlanışı:**

Xylene Cyanol 25 mg

Gliserol 5 ml

dH<sub>2</sub>O ile 10 ml’ye tamamlanır. Vortekslenerek karıştırılır.

### **Etidyum bromür (10 mg/ml stok) Hazırlanışı:**

Etidyum bromür 10 mg

sdH<sub>2</sub>O 1ml

Etidyum su içerisinde vortekslenerek çözülür.

10X TBE stok solüsyonu 10 kat sulandırılarak 1X TBE tamponu hazırlandı. 1X TBE hem agaroz jelin hazırlanması hem de yürütme tamponu için kullanıldı.

100 ml 1X TBE solüsyonuna 1 gr agaroz eklenerek mikrodalga fırında 330 derecede 4-5 dakika kaynatılarak hazırlandı. 3,5 µl ETBr eklenip iyice karıştırıldıktan sonra donmaya bırakıldı. Donduktan sonra örneklerden 5 µl ve yükleme tamponundan 1 µl pipetleme yapılarak karıştırılıp jel kuyularına yüklendi. 130 voltta 15 dakika yürütüldü.

### **2.5. Metilasyon Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu (MSP)**

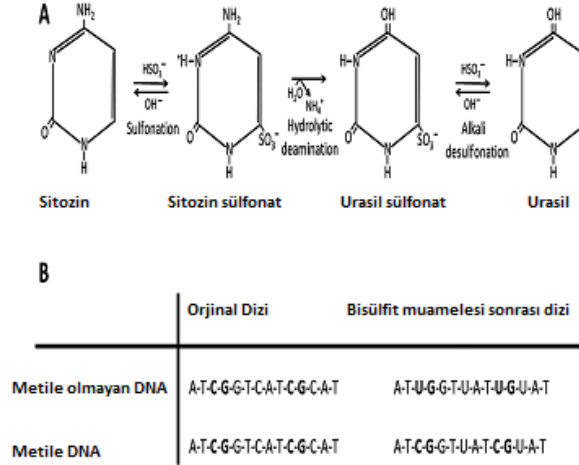
MSPCR yöntemi, Herman ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olup, CpG adacıklarındaki herhangi bir CpG grubunun metilasyon profilini tespit etmek için kullanılan bir yöntemdir. Bir DNA bölgesindeki metilasyon varlığının analizi için kullanılan hızlı nitel bir tekniktir. Bisülfid muamelesinden sonra metile ve metile olmayan DNA arasındaki dizi farklılığını göstermeyi sağlayan yöntemdir. Sitozinler demaninasyon sonucu urasile dönüşür ve PCR sonucunda urasiller timin olarak replike olmaktadır (Herman ve ark.,1996; Momparler ve Bovenzi,2000).

MSP, üç basamakta gerçekleştirilir:

1. Bisulfit DNA modifikasyonu; Sodyum bisülfid ile sitozin bazı reaksiyona girdiği zaman seçici olarak urasile dönüşürler. Tek zincirli DNA'nın sodyum bisülfid ile kimyasal reaksiyonu düşük pH'da ve yüksek sıcaklıkta gerçekleşmektedir. İlk basamakta sitozinin 6. pozisyonundaki karbonunun sülfonasyonu gerçekleşir, takiben 4. pozisyonundaki karbonun hidrolitik geri dönüşümsüz deaminasyonu ile



urasil sülfonat oluşur ve en sonunda alkali koşullarda desülfonasyon sonucu urasil oluşumu gerçekleşir (Şekil 2.1). Sodyum bisülfid muamelesi ile orijinal DNA dizisindeki metile olmayan sitozinler urasile dönüşürken, metile sitozinler sitozin olarak kalmaktadır (Kristansen ve Hansen, 2009).



**Şekil 2.1.** Bisülfid muamelesi sonucunda oluşan deaminasyon tepkimesi Kristansen ve Hansen,2009

2. PCR; İkinci aşama olan PCR'da ise ilgilenilen bölgeye uygun spesifik metile olan ve metile olmayan DNA'yı çoğaltabilecek primerler seçilerek polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirildi..
3. Jelde görüntüleme; PCR sonuçları agaroz jelde değerlendirildi.

### 2.5.1. Bisülfid Modifikasyon Protokolü

Kenik iliğinden ve hücre hatlarından izole edilen DNA'ların modifikasyonu CpGenome™ DNA Modifikasyon Kiti (S7820) kullanılarak üretici firmanın önerdiği yöntemle modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir.

#### Solüsyonların Hazırlanması:

##### 1- 3M NaOH:

Her kullanım için taze hazırlanmalıdır.

0,5 gr NaOH, 4,15 ml dH<sub>2</sub>O'da çözülür.

## 2- Reaktif I:

Kullanmadan önce Reaktif I'in oda sıcaklığına gelmesi beklendi.

Her bir örnek için;

- 0,227 g DNA modifikasyon reaktif I
- 0,571 mL steril dH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldü. Solüsyonun pH değerinin 5 olması gerekmektedir. Bu nedenle 3M NaOH solüsyonu eklenerek pH değeri 5'e ayarlandı.

## 3- Reaktif II:

Reaktif II'nin her kullanım için taze hazırlanması ve ışıktan korunması gerekmektedir.

Kullanmadan önce toz halindeki Reaktif II'nin oda sıcaklığına gelmesi beklendi.

20 mL ddH<sub>2</sub>O içerisine 1µL β-merkaptöetanol (Amresco, 0534B17) ilave edildi.

Her bir örnek için;

1,35 g DNA modifikasyon Reaktif II

750 µL β-merkaptöetanol/ ddH<sub>2</sub>O içerisinde çözüldü

## 3- 20 mM NaOH/%90 EtOH

Her kullanım için taze hazırlanmalıdır.

940 µL EtOH (%96)

53.4 µL steril dH<sub>2</sub>O

6.6 µL 3M NaOH bir ependorf'ta karıştırılarak hazırlandı.

## DNA Modifikasyon Protokolü

1. 71 µL dH<sub>2</sub>O, 2 µL reaktif IV, 20 µL DNA ve 7 µL 3M NaOH sırasıyla eklenerek bir ependorf tüpünde karıştırıldı.
2. Bu karışım 50°C su banyosunda 10 dakika inkübe edildi.
3. 550 µL Reaktif I eklenerek, tekrar 50°C su banyosuna koyulup, 16 saat inkübe edildi.

4. Su banyosundan alınan tüplere 5 µL Reaktif III pipetlenerek koyuldu.
5. Üzerine 750 µL Reaktif II eklendikten sonra 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
6. 6000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildikten sonra üstleri pelete değmeden pipetle çekildi.
7. 1 ml %70'lik etanol eklendi, pelet elle vurularak çözüldü.
8. 6000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. **7. ve 8. aşamalar 3 kez tekrarlandı**
9. Son santrifüj aşamasında üstleri atıldıktan sonra, kalan sıvıdan kurtulmak için tüpler 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
10. Üstleri pipetle çekildikten sonra pelete 65 µL **20 mM NaOH/%90 EtOH** eklendi. Yavaşça vurarak pelet çözüldü ve 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
11. İnkübasyondan sonra 1 ml %96'lık etanol eklendi, pelet elle vurularak çözüldü.
12. 6000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. **7. ve 8. aşamalar 3 kez tekrarlandı**
13. Son santrifüj aşamasında üstleri atıldıktan sonra, kalan sıvıdan kurtulmak için tüpler 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
14. Pipetle üstü atıldıktan sonra kalan alkolden kurtulmak için oda sıcaklığında 30 dakika kurumaya bırakıldı.
15. Pelet kurduktan sonra 35 µL Tris-EDTA buffer eklenerek hafifçe elle vurularak karıştırıldı.
16. 55°C su banyosunda 15 dakika inkübe edildikten sonra örnekler 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
17. Süpernatant pelete değmeden başka bir tüpe alındı.
18. Modifiye DNA'lar -20 °C'de saklandı.

### **2.5.2. Metilasyon Spesifik PCR (MSPCR) Primer Dizileme**

Bu araştırmada çalışılması planlanan p15, ER, CDX2 ve BCL-2 genlerinin metilasyon spesifik PCR analizi için primer dizaynları PERLPRIMER primer dizileme programı ile gerçekleştirilmiştir.

**Çizelge 2.8.** Çalışılan genlerin metilasyon spesifik pcr için tasarlanan primer dizileri

<b>p15 UF</b>	GCGTTCGTATTTTGCGGTT	9p21	p15	19 -mer
<b>P15 UR</b>	CGTACAATAACCGAACGACCGA	9p21	p15	22 -mer
<b>P15 MF</b>	TGTGATGTGTTTGTATTTTGTGGTT	9p21	p15	25 -mer
<b>P15 MR</b>	CCATACAATAACCAAACAACCAA	9p21	p15	23 -mer
<b>ER UF</b>	TGGGTTGTTTGGTTTTATTGGATT	6q25.1	ER	25 -mer
<b>ER UR</b>	ATAACCACAAACAAAATACAAACCA	6q25.1	ER	25 -mer
<b>ER MF</b>	CGGGTCGTTTCGGTTTTATCGGATTC	6q25.1	ER	25 -mer
<b>ER MR</b>	TCGCGAACAAAATACAAACCG	6q25.1	ER	21 -mer
<b>CDX2 UF</b>	TGTAGAGTGTGTGTTGTGTTTT	13q12.3	CDX2	22 -mer
<b>CDX2 UR</b>	CACAATACTCCACTAACTCCTCACA	13q12.3	CDX2	25 -mer
<b>CDX2 MF</b>	GTGCGCGTTGCGTTTC	13q12.3	CDX2	16 -mer
<b>CDX2 MR</b>	CGCGATACTCCGCTAACTCCT	13q12.3	CDX2	21 -mer
<b>BCL-2 UF</b>	TGTTGTGTTTTTGGGGGTT	18q21.3	BCL-2	19 -mer
<b>BCL-2 UR</b>	CAAACATAAACACAAACCCACACA	18q21.3	BCL-2	22 -mer
<b>BCL-2 MF</b>	CGCGTTTTTCGGGGGTC	18q21.3	BCL-2	16 -mer
<b>BCL-2 MR</b>	CGAACTAAACGCAAACCCCG	18q21.3	BCL-2	20 -mer

MSPCR ürünleri %2'lik jelde görüntülenmiştir. 10X TBE stok solüsyonu 10 kat sulandırılarak 1X TBE tamponu hazırlandı. 1X TBE hem agaroz jelin hazırlanması hem de yürütme tamponu için kullanıldı.

100 ml 1X TBE solüsyonuna 2 gr agaroz eklenerek mikrodalga fırında 330 derecede 4-5 dakika kaynatılarak hazırlandı. 3,5 µl ETBr eklenip iyice karıştırıldıktan sonra donmaya bırakıldı. Donduktan sonra ürünlerinden 10 µl ve yükleme tamponundan 1 µl pipetleme yapılarak karıştırılıp jel kuyularına yüklendi. 130 voltta 15 dakika yürütüldü.

## 2.6. İstatistiksel Analiz

MTT sonuçlarının istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı Chi-Square testi ile analiz edildi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. HL-60 Hücre Serisinde Metilprednizolon Doz Denemeleri Sonucu

HL-60 hücrelerine farklı dozlarda metilprednizolon (Prednol-L) uygulanarak etkin doz saptandı. HL-60 hücrelerine  $5 \times 10^{-3}$ ,  $10^{-3}$ ,  $5 \times 10^{-4}$ ,  $10^{-4}$  dozlarında MP uygulaması yapıldı. Uygulama sonucunda MTT sitotoksitate testi, akım sitometri ile apoptozis ve farklılaşma tayini yapılmıştır. İlaç uygulanan hücrelerden DNA izolasyonu yapıldıktan sonra bisülfite modifikasyonu yapıldı ve modifiye DNA'lar ile metilasyon spesifik PCR yapıldı.

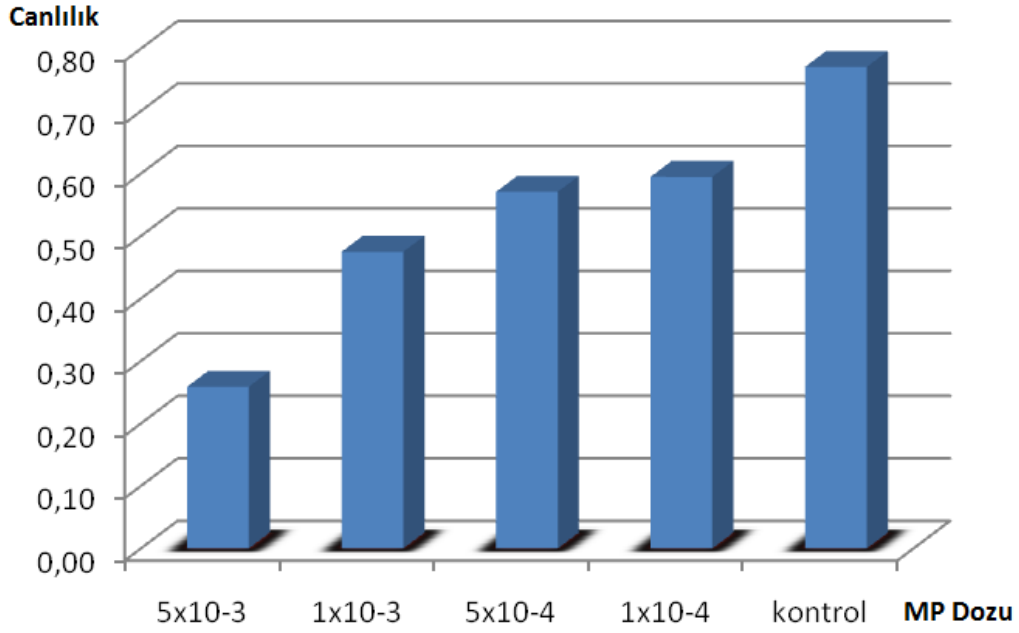
##### 3.1.1. MTT Testi İle Sitotoksitate Tayini

MTT yöntemi ile bir hücre topluluğundaki canlı hücreler kolorimetrik ve kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam mitokondrianın MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. MTT testi sonucunda tripan mavisi canlılık testiyle tutarlı olarak  $5 \times 10^{-3}$  dozunun sitotoksitateye neden olduğu saptanmıştır. Diğer dozların uygulandığı grubun kontrol grubuyla farklılık göstermediği saptandı.

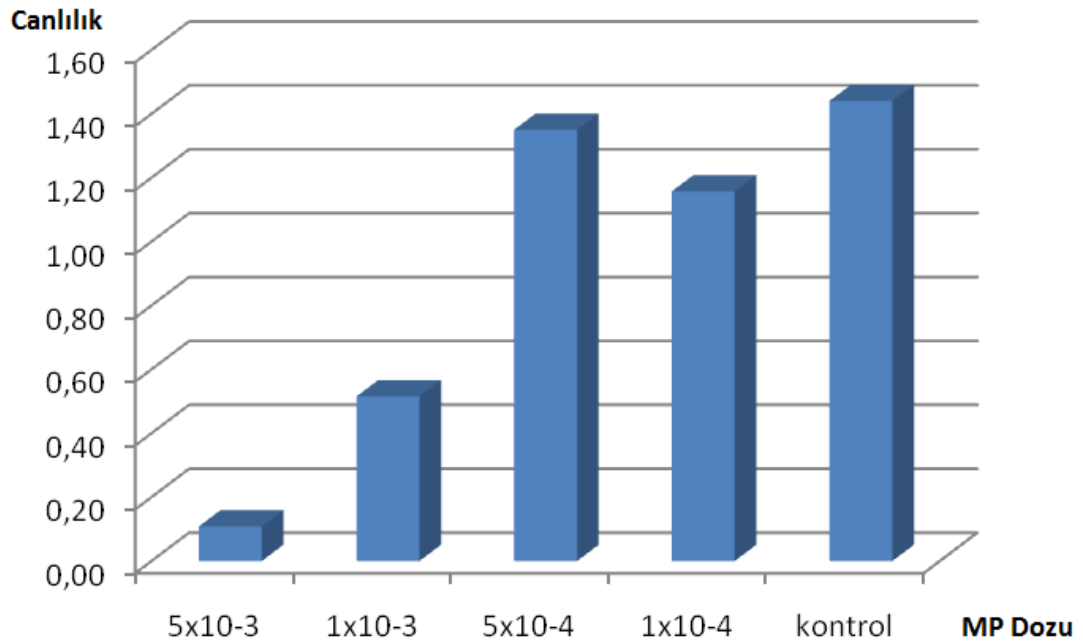
**Çizelge 3.1.** MTT testinin dozlara ve zamana bağımlı olarak sitotoksitateye olan etkisinin sayısal verileri

DOZ	24. saat	48. saat
$5 \times 10^{-3}$	0,259	0,108
$10^{-3}$	0,475	0,515
$5 \times 10^{-4}$	0,571	1,35
$10^{-4}$	0,595	1,157
kontrol	0,771	1,44

**Çizelge 3.2.** MTT testinin 24. Saatteki dozlara bağımlı olarak sitotoksiteye olan etkisinin sütun grafiği ile gösterimi



**Çizelge 3.3.** MTT testinin 48. Saatteki dozlara bağımlı olarak sitotoksiteye olan etkisinin sütun grafiği ile gösterimi



### 3.1.1.1. MTT Sonuçlarının İstatistiksel Analizi

MTT analizi sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, 24. ve 48. saatlerde doz arttıkça canlılık anlamlı olarak azalmaktadır ( $p<0.001$ ). Tüm dozlarda 48., saatte, 24. saate göre canlılık anlamlı olarak azalmaktadır ( $p<0.001$ ).

**Çizelge 3.4.** MTT analizine göre hücrelerin farklı dozlarda, 24. ve 48. saatlerdeki canlılık yüzdeleri

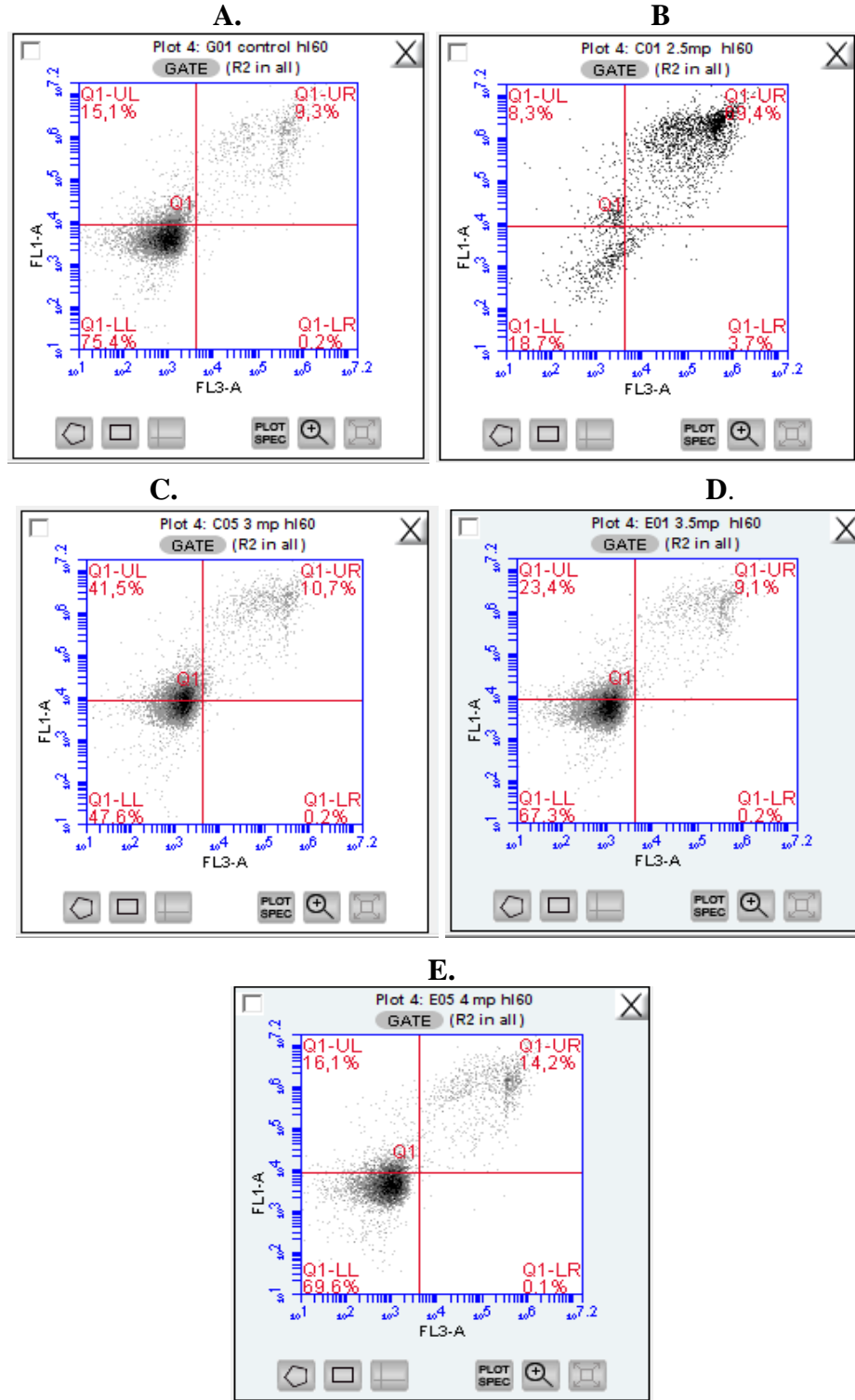
Zaman	$5 \times 10^{-3}$	$10^{-3}$	$5 \times 10^{-4}$	$10^{-4}$
24.saat	%35.2	%69.4	%81.7	%80.9
48.saat	%7,5	%35.8	%94.3	%80.3

### 3.1.2. Akım Sitometri Analizi İle Apoptozis Tayini

Hücrelere uygulanan tüm dozların 24. ve 48. Saatteki apoptotik etkilerini araştırmak amacıyla her doz için örnek alınmıştır. Örnekler, Propidyum İyodur (PI) ve Annexin V ile işaretlenerek akım sitometri analizi yapılmıştır. PI, akım sitometride FL-2 filtresinde ışığa verirken, Annexin-V FL-1 filtresinde ışığa vermektedir.

Annexin V erken apoptozis, propidyum iyodur ise geç apoptozis ve nekrozu tayin etmektedir. Sonuçlara göre, yüksek doz olarak belirlenen  $5 \times 10^{-3}$  M doz erken apoptozis ve geç apoptozise neden olmaktadır. Uygulanan doz düştükçe geç apoptozise giren hücre sayısı da doğru orantılı olarak azalmaktadır. Uygulanan dozun azalmasıyla erken apoptozise giren hücre sayısının yüzdesinde azalma görülmektedir.

### Doz Uygulamalarının 48. Saatteki Apoptotik Etkileri



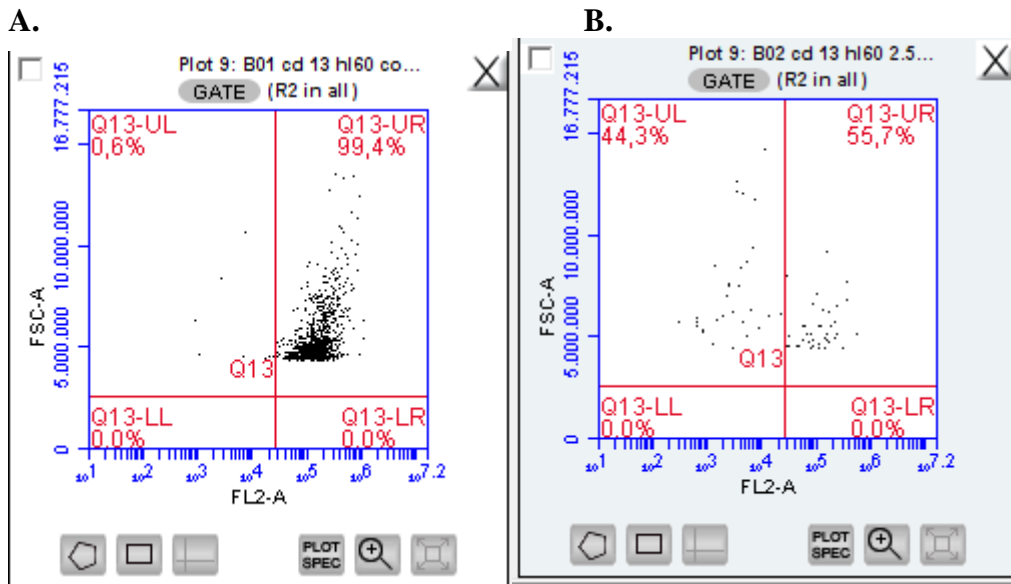
**Şekil 3.1.** Metilprednizolon uygulanan hücrelerin akım sitometri analiz sonuçları

**A.** MP uygulanmayan kontrol hücre popülasyonu. **B.**  $5 \times 10^{-3}$  M MP uygulanan hücre popülasyonunun **Anneksin V** ve **PI** ile işaretlenmiş Hücre Popülasyonunun Dağılımı. **C.**  $10^{-3}$  M MP uygulanan hücre popülasyonunun **Anneksin V** ve **PI** ile işaretlenmiş Hücre Popülasyonunun Dağılımı. **D.**  $5 \times 10^{-4}$  M MP uygulanan hücre popülasyonunun **Anneksin V** ve **PI** ile işaretlenmiş Hücre Popülasyonunun Dağılımı. **E.**  $10^{-4}$  M MP uygulanan hücre popülasyonunun **Anneksin V** ve **PI** ile işaretlenmiş Hücre Popülasyonunun Dağılımı



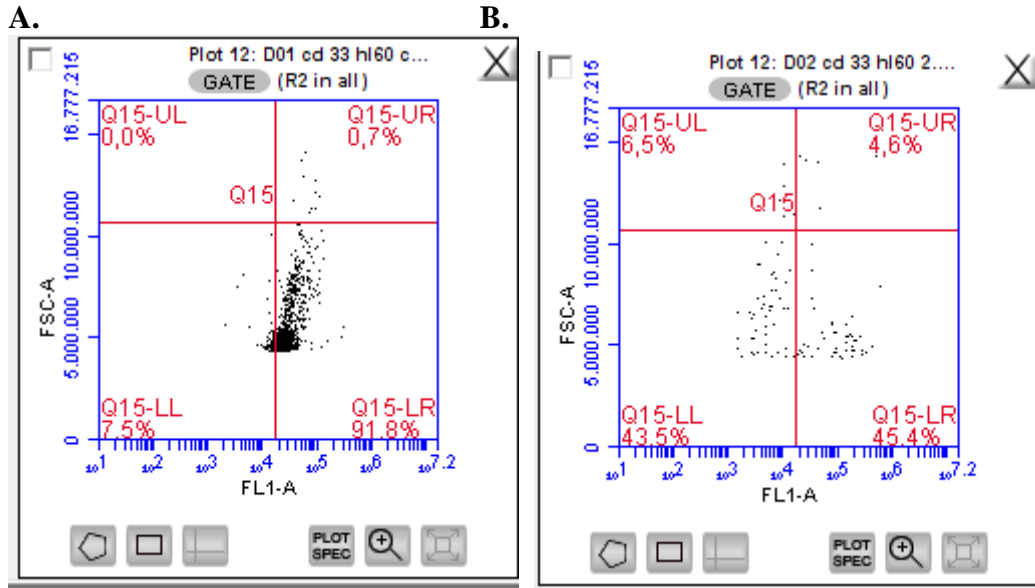
### Akım Sitometri İle Farklılaşma Tayini

HL-60 hücrelerinin farklılaşıp farklılaşmadığını belirlemek için CD13, CD33, HLA-DR ve CD11b antikorları ile işaretleme yapılmıştır. HL-60 hücreleri normal şartlarda CD13 ve CD33 antijenlerini eksprese etmektedir. Bu hücreler granulosit farklılaşma belirteci olan CD11b 'den yoksundurlar. Bununla birlikte, insan lökosit antijeni olan HLA-DR'yi ise eksprese etmemektedirler. HL-60 hücreleri farklılaştığında CD13 ve CD33 antijen oranında azalma, CD11b oranında ise artma beklenmektedir. HLA-DR bakımından yoksun olan HL-60 hücrelerinin farklılaştıklarında bu lökosit antijenini eksprese etmeleri gerekmektedir. Bu verilere dayanarak HL-60 hücrelerinde 24. Saat ve 48. Saatlerde her dozdan örnek alınarak CD33, CD13, CD11b ve HLA-DR antikorları ile işaretleme yapıldı.  $5 \times 10^{-3}$  M olarak belirlenen yüksek dozda kontrol grubuna göre hücrelerde anlamlı bir farklılaşma saptandı. CD33 ve CD13 oranında azalma, CD11b oranında ve HLA-DR pozitifliğinde artış saptandı.



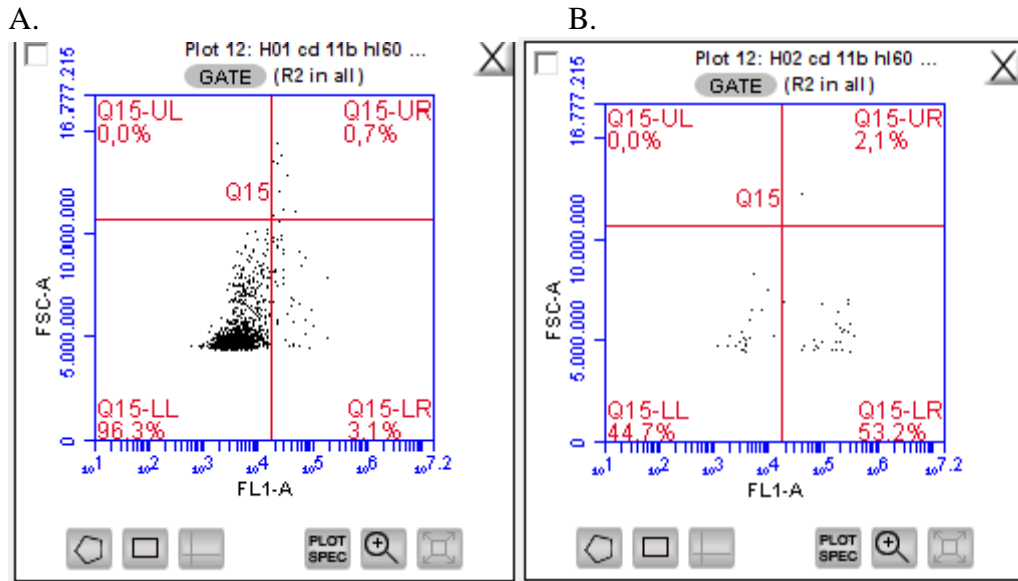
**Şekil 3.1.** Metilprednizolon uygulanan hücrelerin CD13 antikoruna ile akım sitometri analiz sonuçları

**A.** HL-60 Kontrol Grubunun **CD13** antikoruna ile işaretlendiği populasyon. **B.**  $5 \times 10^{-3}$  M MP uygulanan HL-60 hücrelerinin **CD13** antikoruna ile işaretlendiği populasyon



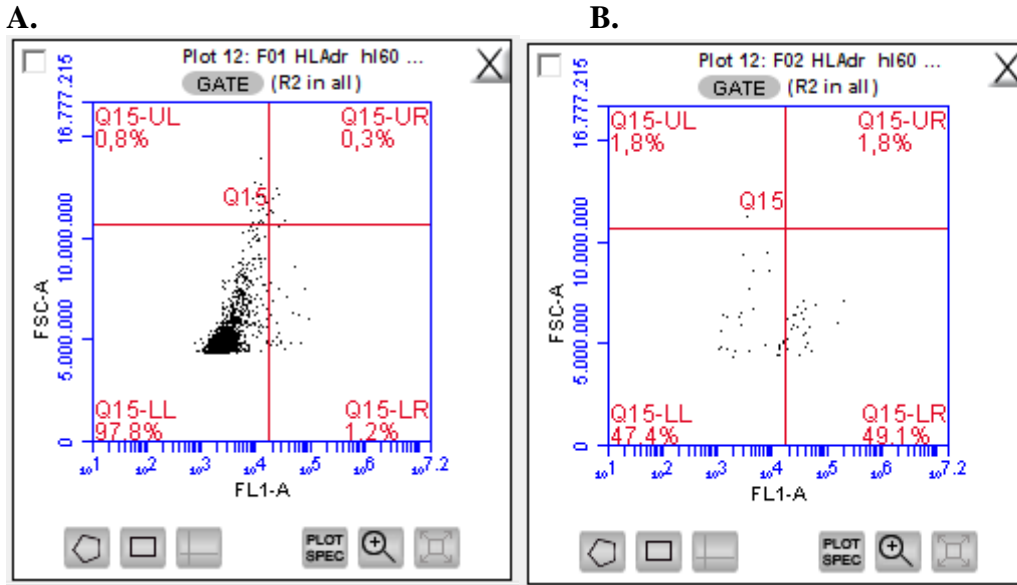
**Şekil 3.2.** Metilprednizolon uygulanan hücrelerin CD33 antikorunu ile akım sitometri analiz sonuçları

**A.** HL-60 Kontrol Grubunun **CD33** antikorunu ile işaretlendiği popülasyon. **B.**  $5 \times 10^{-3}$  M MP uygulanan HL-60 hücrelerinin **CD33** antikorunu ile işaretlendiği popülasyon



**Şekil 3.3.** Metilprednizolon uygulanan hücrelerin CD11b antikorunu ile akım sitometri analiz sonuçları

**A.** HL-60 Kontrol Grubunun **CD11b** antikorunu ile işaretlendiği popülasyon. **B.**  $5 \times 10^{-3}$  M MP uygulanan HL-60 hücrelerinin **CD11b** antikorunu ile işaretlendiği popülasyon

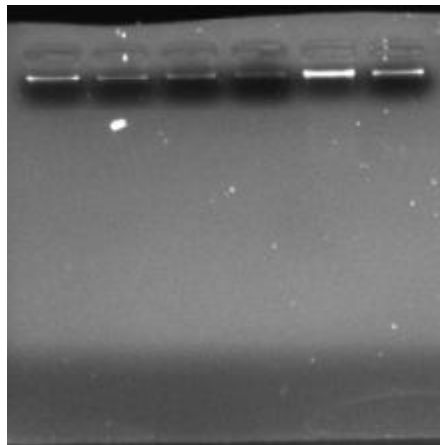


**Şekil 3.4.** Metilprednizolon uygulanan hücrelerin HLA-DR antikoruna ile akım sitometri analiz sonuçları

**A.** HL-60 Kontrol Grubunun(MP uygulanmayan) **HLA-DR** antikoruna ile işaretlendiği populasyon. **B.**  $5 \times 10^{-3}$  M MP uygulanan HL-60 hücrelerinin **HLA-DR** antikoruna ile işaretlendiği populasyon

### 3.2. DNA İzolasyonu

Akut myeloid lösemi tanısı almış 6 hastanın ilk tanı kemik iliği örnekleri ve steroid tedavisi sonrası kemik iliği örneklerinden ve MP uygulaması yapılan HL-60 hücrelerinden “İnvitrogen Purelink Genomic DNA” kiti kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA’lar %1’lik agaroz jelde 130 voltta 15 dakika yürütülerek görüntüledi ve spektrofotometrik olarak miktar tayini yapıldı.



**Şekil 3.5.** DNA’ların %1’lik agaroz jeldeki görüntüleri

**Çizelge 3.5.** DNA'ların spektrofotometrik olarak miktar tayini

<b>Örnek (DNA)</b>	<b>Miktar (ng/µl)</b>
<b>Hastalar</b>	
Hasta 1 (İlk geliş kemik iliği)	93,49
Hasta 1 (Steroid sonrası kemik iliği)	86,98
Hasta 2 (İlk geliş kemik iliği)	2,65
Hasta 2 (Steroid sonrası kemik iliği)	60,85
Hasta 3 (İlk geliş kemik iliği)	9,62
Hasta 3 (Steroid sonrası kemik iliği)	1
Hasta 4 (İlk geliş kemik iliği)	56,46
Hasta 4 (Steroid sonrası kemik iliği)	4,72
Hasta 5 (İlk geliş kemik iliği)	78,99
Hasta 5 (Steroid sonrası kemik iliği)	16,3
Hasta 6 (İlk geliş kemik iliği)	38,54
Hasta 6 (Steroid sonrası kemik iliği)	17,94
<b>HL-60 Hücre Serisi</b>	
24.saat Kontrol	14.799
24.saat $5 \times 10^{-3}$ MP	4.445
48.saat Kontrol	17.766
48.saat $5 \times 10^{-3}$ MP	5.699

### 3.3. DNA Modifikasyonu

Kemik iliği ve hücre serisinden izole edilen DNA'ların modifikasyonu CpGenome™ DNA Modifikasyon Kiti (S7820) kullanılarak üretici firmanın önerdiği yöntemle modifiye edilerek gerçekleştirildi.

#### 3.3.1. Metilasyon Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Hastaların tedavi öncesi ve sonrası promotor metilasyon profilinin değişip değişmediğini ve MP uygulanan hücre serisinde kontrol grubuna göre metilasyon profilinde bir değişiklik olmadığını saptamak amacıyla metilasyon spesifik pcr yapıldı.

P15, ER, CDX2 ve BCL-2 genlerinin metilasyon profili incelendi. P15, ER, BCL-2 ve CDX2 genlerinin primerlerinin metile olmayan kontrol ve metile kontrol DNA'ları ile MSPCR optimizasyonu yapıldı.

### P15 geninin MSPCR şartları

Dizilenen primerlerle yapılan PCR sonucunda elde edilen ürün boyu 154 baz çiftidir.

**Çizelge 3.6.** P15 Geni Promotor Bölgesinin Çoğaltılması İçin PCR Karışımının Hazırlanması

Malzemeler	Konsantrasyon	Hacim
PCR tamponu	10 X, - MgCl <sub>2</sub>	2.5 µl
MgCl <sub>2</sub>	25mM	4 µl
dNTP	2,5 mM	2.5 µl
Primer F	10 pmol	1 µl
Primer R	10 pmol	1 µl
Hot Start taq polimeraz enzimi	5U/ µl	0.2 µl
Modifiye DNA		3 µl
dH <sub>2</sub> O		10,8 µl
<b>Toplam Hacim</b>		<b>25 µl</b>

**Çizelge 3.7.** P15 geninin primerlerinin çalıştığı PCR şartları ve yeterli ürün için gerekli döngü sayısı

Derece	dakika(′), saniye (″)	Döngü sayısı
95 °C	13′	
95 °C	45″	40 döngü
60 °C	30″	
72 °C	45″	
75 °C	5′	

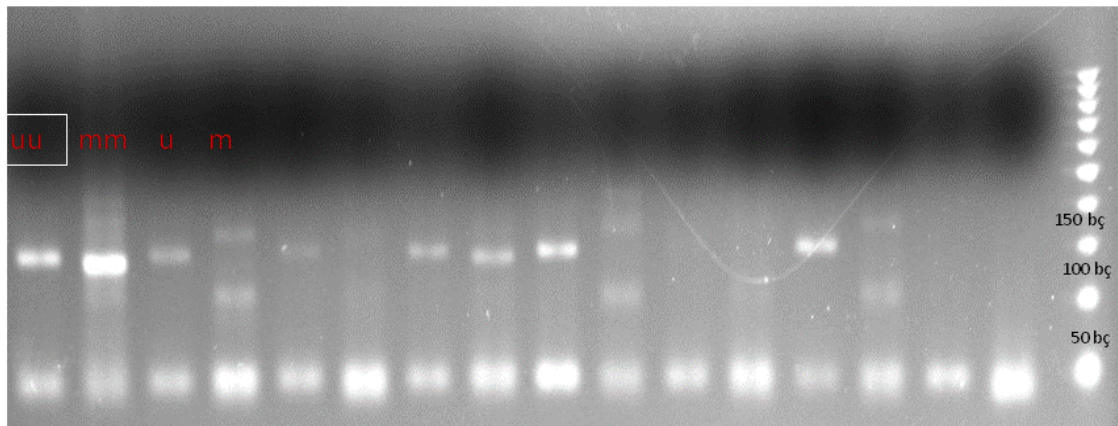
### P15 Geninin Metilasyon Spesifik PCR Sonuçları

P15 genini çoğaltmak için dizilenen primerlerinin çalışıp çalışmadığını belirlemek için metile olmayan ve metile kontrol DNA'ları ile MSPCR yapılmıştır. metile olmayan

primer ve metile olmayan DNA ile konulan PCR ürünü “UU” ile, metile primer ve metile DNA ile konulan PCR ürünü “MM” ile temsil edilmiştir.

HL-60 hücrelerinde farklılaşma için etkin doz olarak bulunan  $5 \times 10^{-3}$  M MP uygulanan ve hiç MP uygulanmayan kontrol grubu hücrelerinden elde edilen DNA’lar modifiye edildikten sonra her örneğin hem metile olmayan hem metile DNA’ya göre dizilenen primerler ile MSPCR analizi yapılmıştır. Metile olmayan primer ile MSPCR’ı yapılan örnekler “U” ile, metile primer ile MSPCR’ı yapılan örnekler ise “M” ile temsil edilmiştir.

MSPCR sonrasında elde edilen ürünler %2’lik agaroz jelde 130 voltta 20 dakika yürütülmüştür.



**Şekil 3.6.** P15 geninin MSPCR sonucu elde edilen ürünlerinin %2’lik jelde görüntülenmesi

MSPCR sonucunda, P15 geni promotoru HL-60 hücrelerinde metile bulunmamıştır. MP uygulanan hücreler ile MP uygulanmayan kontrol grubu arasında metilasyon profilinde farklılık saptanmamıştır. 6 hastanın ilk tanı ve tedavi sonrası modifiye DNA örneklerinden yapılan MSPCR sonucunda 3 hastanın hemimetile olduğu saptanmıştır. Hemimetile hastaların bir aleli metile bir aleli metile değildir. Diğer 3 hastanın da metile olmadığı saptanmıştır. 6 hastanın hiçbirinde tedavi sonrası metilasyon profillerinde değişiklik olmamıştır.

### ER geninin MSPCR şartları

Dizilenen primerlerle yapılan PCR sonucunda elde edilen ürün boyu 184 baz çiftidir.

**Çizelge 3.8.** ER Geni Promtor Bölgesinin Çoğaltılması İçin PCR Karışımının Hazırlanması

Malzemeler	Konsantrasyon	Hacim
PCR tamponu	10 X, - MgCl <sub>2</sub>	2.5 µl
MgCl <sub>2</sub>	25mM	4 µl
dNTP	2,5 mM	2.5 µl
Primer F	10 pmol	1 µl
Primer R	10 pmol	1 µl
Hot Start taq polimeraz enzimi	5U/ µl	0.2 µl
Modifiye DNA		3 µl
dH <sub>2</sub> O		10,8 µl
<b>Toplam Hacim</b>		<b>25 µl</b>

**Çizelge 3.9.** ER geninin primerlerinin çalıştığı PCR şartları ve yeterli ürün için gerekli döngü sayısı

Derece	dakika(°), saniye (‘‘)	Döngü sayısı
95 °C	13‘	40 döngü
95 °C	45’’	
60 °C	30’’	
72 °C	45’’	
75 °C	5‘	

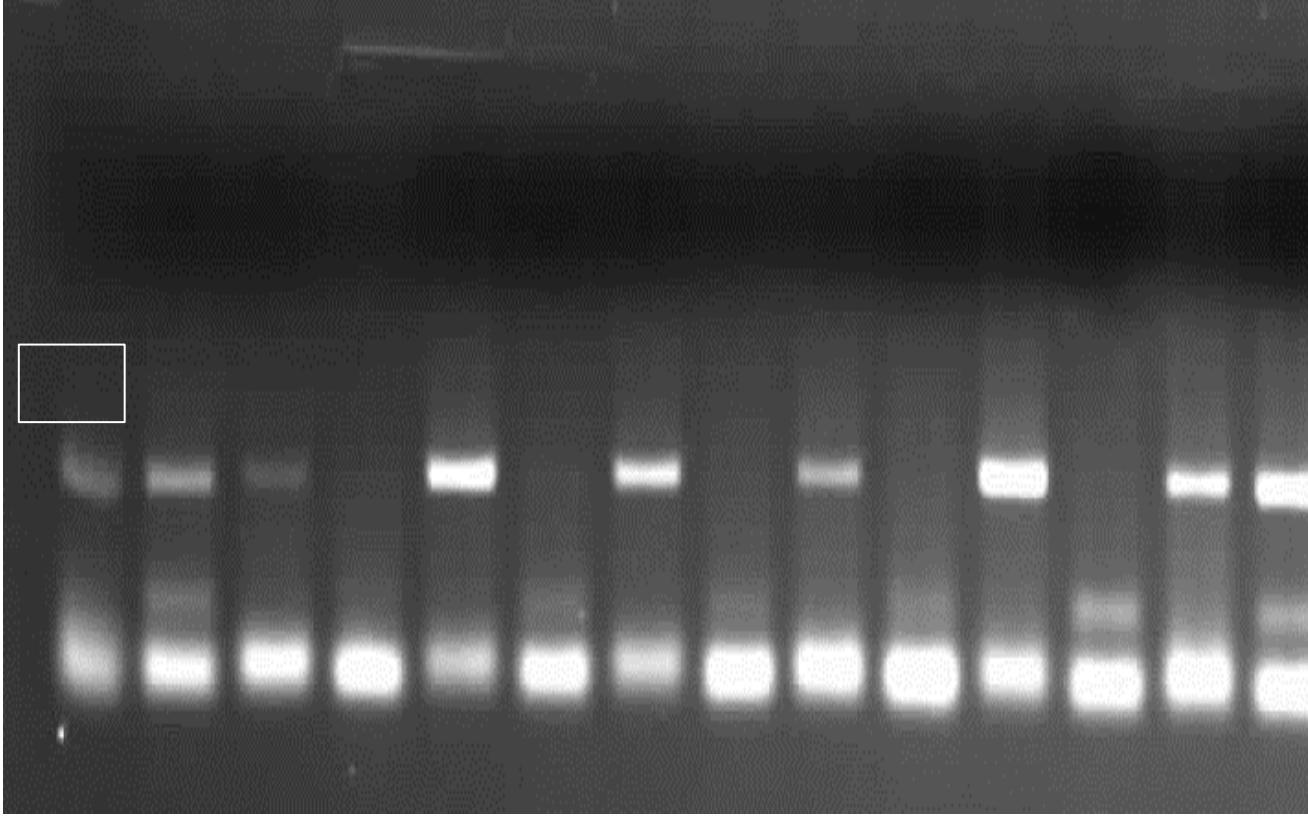
### ER Geninin Metilasyon Spesifik PCR Sonuçları

ER genini çoğaltmak için dizilenen primerlerinin çalışıp çalışmadığını belirlemek için metile olmayan ve metile kontrol DNA’ları ile MSPCR yapılmıştır. Metile olmayan primer ve metile olmayan DNA ile konulan PCR ürünü ‘‘UU’’ ile, metile primer ve metile DNA ile konulan PCR ürünü ‘‘MM’’ ile temsil edilmiştir.

HL-60 hücrelerinde farklılaşma için etkin doz olarak bulunan  $5 \times 10^{-3}$  M MP uygulanan ve hiç MP uygulanmayan kontrol grubu hücrelerinden elde edilen DNA’lar modifiye edildikten sonra her örneğin hem metile olmayan hem metile DNA’ya göre dizilenen

primer ile MSPCR analizi yapılmıştır. Metile olmayan primer ile MSPCR'ı yapılan örnekler "U" ile, metile primer ile MSPCR'ı yapılan örnekler ise "M" ile temsil edilmiştir.

MSPCR sonrasında elde edilen ürünler %2'lik agaroz jelde 130 voltta 20 dakika yürütülmüştür.



**Şekil 3.7.** ER geninin MSPCR sonucu elde edilen ürünlerinin %2'lik jelde görüntülenmesi

MSPCR sonucunda, ER geni promotörü HL-60 hücrelerinde metile bulunmuştur. MP uygulanan hücreler ile MP uygulanmayan kontrol grubu arasında metilasyon profilinde farklılık saptanmamıştır. 6 hastanın ilk tanı ve tedavi sonrası modifiye DNA örneklerinden yapılan MSPCR sonucunda 4 hastanın umetile olduğu saptanmıştır. Diğer 2 hastanın da hemimetile olduğu saptanmıştır. Hemimetile hastaların bir aleli metile bir aleli metile değildir. 6 hastanın hiçbirinde tedavi sonrası metilasyon profillerinde değişiklik olmamıştır.



**CDX2 geninin MSPCR şartları**

Dizilene primerlerle yapılan PCR sonucunda elde edilen ürün boyu 264 baz çiftidir.

**Çizelge 3.10.** CDX2 Geni Promotor Bölgesinin Çoğaltılması İçin PCR Karışımının Hazırlanması

Malzemeler	Konsantrasyon	Hacim
PCR tamponu	10 X, - MgCl <sub>2</sub>	2.5 µl
MgCl <sub>2</sub>	25mM	4 µl
dNTP	2,5 mM	2.5 µl
Primer F	10 pmol	1 µl
Primer R	10 pmol	1 µl
Hot Start taq polimeraz enzimi	5U/ µl	0.2 µl
Modifiye DNA		3 µl
dH <sub>2</sub> O		10,8 µl
<b>Toplam Hacim</b>		<b>25 µl</b>

**Çizelge 3.11.** CDX2 geninin primerlerinin çalıştığı pcr şartları ve yeterli ürün için gerekli döngü sayısı

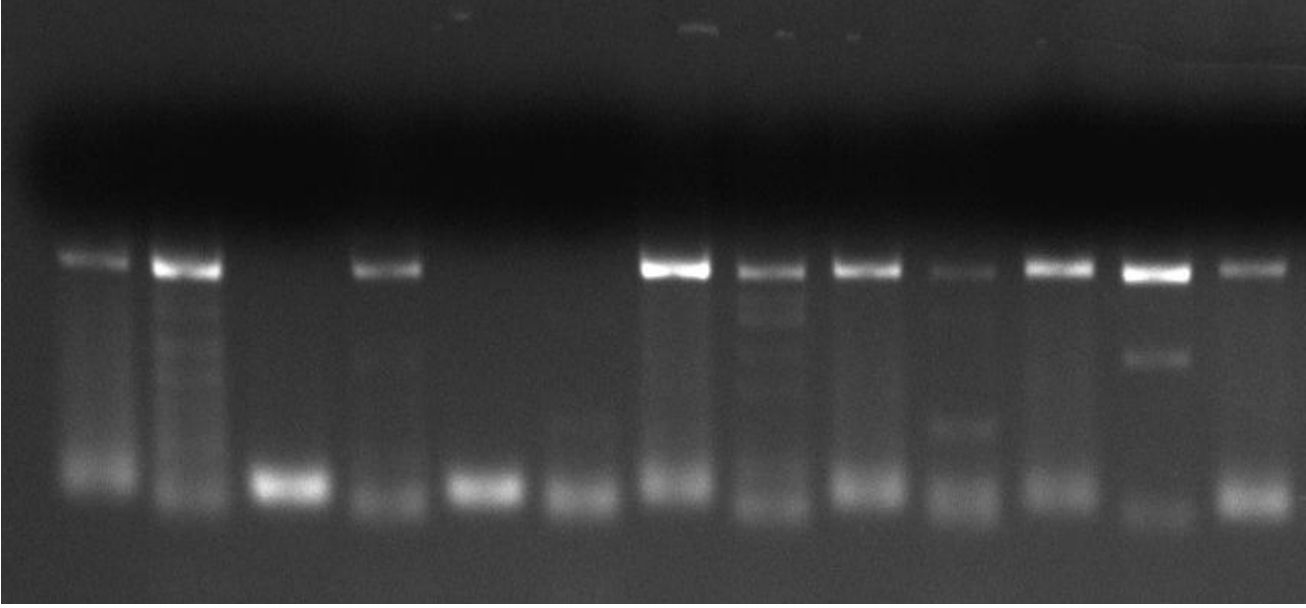
Derece	dakika(‘), saniye (’’)	Döngü sayısı
95 °C	13’	
95 °C	45’’	40 döngü
63 °C	30’’	
72 °C	45’’	
75 °C	5’	

### CDX2 Geninin Metilasyon Spesifik PCR Sonuçları

CDX2 genini çoğaltmak için dizilenen primerlerinin çalışıp çalışmadığını belirlemek için metile ve metile olmayan kontrol DNA’ları ile MSPCR yapılmıştır. Metile olmayan primer ve metile olmayan DNA ile konulan PCR ürünü “UU” ile, metile primer ve metile DNA ile konulan PCR ürünü “MM” ile temsil edilmiştir.

HL-60 hücrelerinde farklılaşma için etkin doz olarak bulunan  $5 \times 10^{-3}$  M MP uygulanan ve hiç MP uygulanmayan kontrol grubu hücrelerinden elde edilen DNA’lar modifiye edildikten sonra her örneğin hem metile hem metile olmayan DNA’ya göre dizilenen primer ile MSPCR analizi yapılmıştır. Metile olmayan primer ile MSPCR’ı yapılan örnekler “U” ile, metile primer ile MSPCR’ı yapılan örnekler ise “M” ile temsil edilmiştir.

MSPCR sonrasında elde edilen ürünler %2’lik agaroz jelde 130 volta 20 dakika yürütülmüştür.



**Şekil 3.8.** CDX2 geninin MS-PCR sonucu elde edilen ürünlerinin %2'lik jelde görüntülenmesi

MSPCR sonucunda, CDX2 geni promotörü HL-60 hücrelerinde metile bulunmuştur. MP uygulanan hücreler ile MP uygulanmayan kontrol grubu arasında metilasyon profilinde farklılık saptanmamıştır. 6 hastanın ilk tanı ve tedavi sonrası modifiye DNA örneklerinden yapılan MSPCR sonucunda 6 hastanın hemimetile olduğu saptanmıştır. Hemimetile hastaların bir aleli metile bir aleli metile değildir. 6 hastanın hiçbirinde tedavi sonrası metilasyon profillerinde değişiklik olmamıştır.

### **BCL-2 geninin MS-PCR şartları**

Dizilenen primerlerle yapılan PCR sonucunda elde edilen ürün boyu 157 baz çiftidir.

**Çizelge 3.12.** BCL-2 Geni Promotor Bölgesinin Çoğaltılması İçin PCR Karışımının Hazırlanması

Malzemeler	Konsantrasyon	Hacim
PCR tamponu	10 X, - MgCl <sub>2</sub>	2.5 µl
MgCl <sub>2</sub>	25mM	4 µl
dNTP	2,5 mM	2.5 µl
Primer F	10 pmol	1 µl
Primer R	10 pmol	1 µl
Hot Start taq polimeraz enzimi	5U/ µl	0.2 µl

Modifiye DNA		3 µl
dH <sub>2</sub> O		10,8 µl
<b>Toplam Hacim</b>		<b>25 µl</b>

**Çizelge 3.13.** BCL-2 geninin primerlerinin çalıştığı PCR şartları ve yeterli ürün için gerekli döngü sayısı

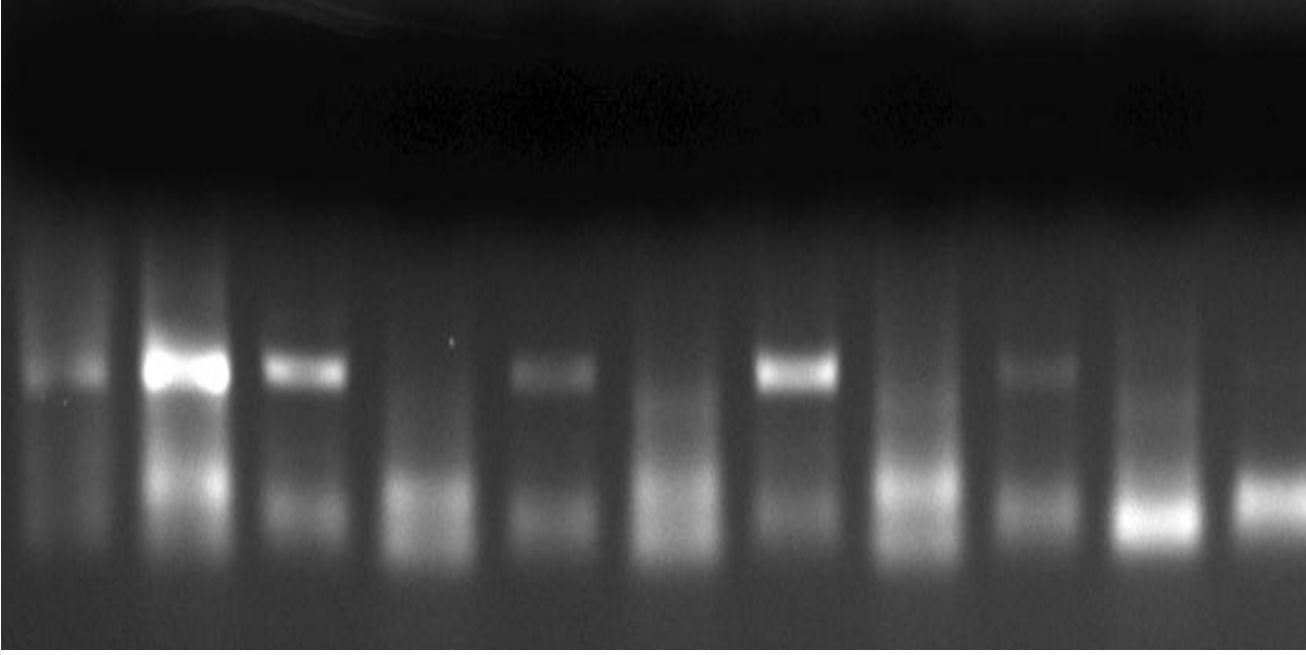
Derece	dakika(‘), saniye (‘‘)	Döngü sayısı
95 °C	13‘	
95 °C	45’’	40 döngü
61,5 °C	30’’	
72 °C	45’’	
75 °C	5‘	

### **BCL-2 Geninin Metilasyon Spesifik PCR Sonuçları**

BCL-2 genini çoğaltmak için dizilenen primerlerinin çalışıp çalışmadığını belirlemek için metile ve metile olmayan kontrol DNA’ları ile MSPCR yapılmıştır. Metile olmayan primer ve metile olmayan DNA ile konulan PCR ürünü “UU” ile, metile primer ve metile DNA ile konulan PCR ürünü “MM” ile temsil edilmiştir.

HL-60 hücrelerinde farklılaşma için etkin doz olarak bulunan  $5 \times 10^{-3}$  M MP uygulanan ve hiç MP uygulanmayan kontrol grubu hücrelerinden elde edilen DNA’lar modifiye edildikten sonra her örneğin hem metile hem metile olmayan DNA’ya göre dizilenen primer ile MSPCR analizi yapılmıştır. Metile primer ile MSPCR’ı yapılan örnekler “U” ile, metile primer ile MSPCR’ı yapılan örnekler ise “M” ile temsil edilmiştir.

MSPCR sonrasında elde edilen ürünler %2’lik agaroz jelde 130 voltta 20 dakika yürütülmüştür.



**Şekil 3.9.** BCL-2 geninin MSPCR sonucu elde edilen ürünlerinin %2'lik jelde görüntülenmesi

MSPCR sonucunda, BCL-2 geni promotorunun HL-60 hücrelerinde metile olmadığı belirlenmiştir. MP uygulanan hücreler ile MP uygulanmayan kontrol grubu arasında metilasyon profilinde farklılık saptanmamıştır. 6 hastanın ilk tanı ve tedavi sonrası modifiye DNA örneklerinden yapılan MSPCR sonucunda 3 hastanın hemimetile olduğu saptanmıştır. Hemimetile hastaların bir aleli metile bir aleli metile değildir. Diğer 3 hastanın da metile olmadığı belirlenmiştir. 6 hastanın hiçbirinde tedavi sonrası metilasyon profillerinde değişiklik olmamıştır.



#### 4. TARTIŞMA

Genlerin promotor bölgelerinde kümelenen palindromik CpG adacıklarındaki sitozinlerin metilasyonu epigenetik susturulmada oldukça önemlidir. Hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve apoptozisi düzenleyen yolaklardaki birçok gen myeloid blastlarda metilasyon ile susturulmakta ve bu genlerin transkripsiyonel olarak inaktivasyonu lösemi oluşumu ile ilişkilendirilmektedir. DNA metilasyonu sadece lösemnin gelişim sürecinde değil, hastalığını gelişiminde ve tekrarlamasında da önemli etkiye sahip olmaktadır. DNA metilasyonu ve posttranslasyonel histon modifikasyonları gibi DNA dizisini değiştirmeyip gen ekspresyonunu kontrol eden mekanizmalar lösemilerin tedavisinde farmakolojik olarak hedeflenmektedir. DNA metiltransferaz veya histon deasetilaz inhibitörleri gibi ilaçlar bu mekanizmaları değiştirerek normal gen fonksiyonunu tekrar yerine getirmektedir (Blum ve Marcucci,2005).

Son 20 yılda AML tedavisinde uygulanan yoğun kemoterapi ve kemik iliği transplantasyonunda önemli gelişmeler kaydedildi. Ancak tedavi nedenli myelotoksisite hastalık ve ölüm için önemli risk faktörü olmaktadır. Buna ek olarak, kemoterapi ile indüklenen myelosupresyon tedavi protokolündeki kemoterapötik ajanlara cevabı engellemekte ve klinik sonlanımı etkilemektedir. Diğer taraftan, yüksek doz metiprednizolon myeloid lösemi hücrelerinin farklılaşmasını ve apoptozisini indüklemekle beraber akut lösemili çocuklarda remisyonu indükleme ve sürdürme tedavileri süresince CD34+ hematopoetik öncül hücreleri uyarmaktadır. (Aytaç-Elmas ve ark.,2005). Metilprednizolon çekirdek hormon reseptör ailesine ait çinko parmak üyelerine bağlanarak işlev gören, vitamin D3 ve retinoik asiti kapsayan steroid hormon ailesinin bir üyesidir. Bu reseptör proteinleri hedef genlerin promotor bölgelerindeki spesifik DNA tanıma dizilerine bağlanır ve bu sayede transkripsiyonel değişikliğe neden olur. Metilprednizolonun da dahil olduğu steroid hormonlar, spesifik glukokortikoid nükleozolde yer alan reseptörlerine bağlanarak hücreler üzerindeki etkilerine göstermektedirler. Bu reseptörler steroidlerle birleştiğinde, spesifik DNA bölgelerine bağlanarak transkripsiyon faktörü olarak işlev görmektedirler (Uzunoglu ve ark.,1999). 1970'lerin başından beri, Prednizolon (PRD) ve Dekzametazon (Dex)

üzerine yapılan birçok deneysel çalışma sonucunda, fare myeloid hücrelerini makrofaj ve granüositlere farklılaştıran en etkili ajanların Prednizolon ve Dekzametazon olduğu bulunmuştur. Dahası yüksek konsantrasyonda dekzametazonun fare myeloid lösemi hücrelerinin proliferasyonunu durdurduğu gösterilmiştir. Dekzametazonun veya Metilprednizolonun (MP) farklılaşmayı ve/veya apoptozisi indükleyici etkisini araştırmak amacıyla insan primer AML hücreleri ve HL-60, NB4, U-937 gibi myeloid lösemi hücre hatları üzerinde *in vitro* olarak da doz-bağımlı çalışmalar yapılmıştır. 1988'den beri Hacettepe Üniversitesi Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı'nda AML'nin herhangi bir alt tipi olan yeni tanı ve hastalığı nükseden çocuklara yüksek doz Metilprednizolon uygulanmakta kayda değer önemli bir antilösemik etki saptanmaktadır.

Bu tez çalışmasında öncelikle AML hücre serisi olan HL-60 üzerinde MP uygulaması yapılarak etken doz saptandı ve metilasyon profilinde değişiklik olup olmadığı araştırıldı. Bizim yaptığımız çalışmada HL-60 hücrelerine ilk olarak metilprednizolonun saf hali olan 6 $\alpha$ -metilprednizolon uygulandı. MP, 1:1 oranında metanol: kloroform karışımında çözüldükten sonra besiyeri ile sulandırılarak konsantrasyon düzeyi belirlendi. Özbek ve ark.larının yaptıkları çalışmada *in vitro* ortamda etkili yüksek doz olarak belirlenen 10<sup>-3</sup> M ve düşük doz olarak belirlenen 10<sup>-6</sup> M ile bu dozların ara dozları olan 10<sup>-4</sup> M ve 10<sup>-5</sup> M dozlar da hücrelere uygulandı (Özbek ve ark.,1999). Tüm dozların etkileri 24., 48., 72. ve 96. saatlerde analiz edildi. Yüksek doz olan 10<sup>-3</sup> M MP uygulanan hücrelerin ekildiği plakta, ilacın besiyeri ile sulandırıldığında çözünmemesine bağlı olarak çökme meydana geldiği görüldü. Bu durum, ilacın konsantrasyonunu ve buna bağlı olarak hücrelere olan etkisini de değiştirdiğini düşündürdü. Bu hücrelerde MTT testi ve aneksin V-PI işaretlemesi ile akım sitometride apoptozis tayini yapıldı. MTT testi sonucunda yüksek doz MP uygulanan hücrelerde düşük doz uygulananlara göre her saatte belirgin bir ölüm gözlenirken diğer düşük dozlar arasında kontrole göre canlılıkta bir değişim gözlenmedi. Bununla birlikte, 72. ve 96. saatlerde hücrelerin besin yetersizliğinden dolayı ölmeye başladığı saptandı. Akım sitometride apoptozis tayini sonucunda ise yüksek doz ilaç uygulanan hücrelerde 24. saatte apoptozise ve 48.saatten sonra da yüksek dozda hücrelerin nekroza gitmeye başladığı saptandı. Bununla birlikte, granüosit ve monosit farklılaşma belirteçleri olan CD11b, CD14 antikorları ile her



saat ve her doz için işaretleme yapıldı ancak hücrelerin farklılaşmaya gitmediği saptandı. Bu durumun ilacın çözünürlüğüyle ilgili olabileceği düşünüldüğünden ilacın çözüldüğü madde değiştirildi.

Özçimen ve Çetin'in yaptıkları çalışmada 6 $\alpha$ -metilprednizolon etanolde çözülerek U-937 hücre serisine uygulanmıştır (Özçimen ve Çetin,2007). Buradan yola çıkılarak aynı şekilde 6 $\alpha$ -metilprednizolon etanolde çözülüp, besiyeri ile sulandırılarak hücrelere uygulandı. Ancak besiyerinde ilacın çökeldiği gözlemlendi. Bu denemede de MTT testi ve apoptozis tayini yapıldı ve hücrelerin etanol:kloroformda olduğu gibi yüksek dozda canlılıklarını kaybettikleri ancak düşük dozlarda kontrole göre canlılıkta belirgin bir fark olmadığı saptandı. 48.saatten sonra her dozda hücrelerin besin yetersizliğinden dolayı canlılıklarını kaybettikleri saptandı. Farklılaşma belirteçlerine bakıldığında ise hücrelerin farklılaşmadığı ve ilacın çözünürlüğünde oluşan problemin bu duruma sebep olabileceği düşünüldü. Saf MP'nin tam olarak çözünmemesinden dolayı hücrelere MP'nin hastalara verilen ve suda çözünen formu olan Prednol-L (Mustafa Nevzat) uygulandı. Uygulanan dozlar da değiştirilerek etken doz saptandı. Bu denemede 10<sup>-2</sup> M, 10<sup>-3</sup> M, 10<sup>-4</sup> M ve 10<sup>-5</sup> M MP uygulaması yapıldı. Tüm dozlardan 0. saat, 24. saat, 48.saat ve 72. saatte alınan örnekler analiz edildi. MTT sitotoksite testi, tripan mavisi ile canlılık testi, apoptozis ve farklılaşma tayini yapıldı. Tüm saatlerde 10<sup>-2</sup> M dozun nekroza sebep olduğu saptandı. 10<sup>-3</sup> M dozda 24. ve 48. saatlerde hücrelerin apoptoza gittiği ancak farklılaşmadığı saptandı. 72. ve 96. saatlerde ise 10<sup>-3</sup> M, 10<sup>-4</sup> M ve 10<sup>-5</sup> M MP uygulanan dozlarda hücrelerin apoptoz ve nekroza gittiği saptandı. Özçimen'in HL-60 hücrelerine MP'nin saf formu olan 6 $\alpha$ -metilprednizolon uygulayarak doz denemeleri yaptığı çalışmada, 72. ve 96. saatte 10<sup>-4</sup> M dozda anlamlı farklılaşma saptamıştır (Özçimen, 2006,basılmamıştır). Ancak bizim çalışmamızda 72. ve 96. saatlerde hücreler canlılıklarını kaybetmeye başladı ve buna bağlı olarak da farklılaşma saptanamadı.

Bu denemeler sonucunda, hücrelerin canlılığını yitirmemesi ve yüksek dozda farklılaşmanın saptanabilmesi için deneyin 48. saatte sonlandırılmasına ve ara dozların denenmesine karar verildi. Jian ve ark., HL-60 hücrelerine arsenik tri oksit (ATRA) uygulayarak farklılaşma baktıkları çalışmada, 24. saatte %42.3 oranında ve 48. saatte %59.2 oranında farklılaşma saptamışlardır. Bu çalışma bize 24. ve 48. saatlerde

farklılaşmanın saptanabileceğini göstermiştir. Bu verilere dayanarak, ara dozlar olarak belirlenen  $5 \times 10^{-3}$  M,  $10^{-3}$  M,  $5 \times 10^{-4}$  M ve  $10^{-4}$  M dozlarda MP (Prednol-L) uygulandı.  $5 \times 10^{-3}$  M dozda hücrelerin apoptoza gittiği ve farklılaştıkları saptandı. Akım sitometri analizi sonucunda HL-60 hücrelerinin belirteçleri olan CD13 ve CD33 ekspresyonunda azalma, farklılaşma belirteçi olan CD11b oranında artma ve HLA-DR pozitifliği saptandı. Bu sonuç, yüksek doz MP'nin apoptoza ve farklılaşmaya götürdüğü bilgisini doğruladı.

Uzunoğlu ve ark., HL-60 hücre serisine MP uyguladıkları çalışmada, toksik olmayan ve farklılaşmaya neden olan dozu  $10^{-4}$  M olarak saptamışlardır (Uzunoğlu ve ark.,1999). Bizim çalışmamızda bu dozdan farklı olarak yüksek doz olarak belirlenen  $5 \times 10^{-3}$  M dozda farklılaşma saptanmıştır.  $10^{-4}$  M dozda farklılaşma görülmemektedir.

Metilprednizolonun etkisini, epigenetik yollardan biri olan DNA metilasyonu üzerinden gösterip göstermediğini araştırmak amacıyla, metilasyonun saptanmasında kullanılan metilasyon spesifik PCR yöntemi uygulandı. Bu amaçla apoptozis ve farklılaşma için anlamlı doz olan  $5 \times 10^{-3}$  M uygulanan hücrelerden DNA izolasyonu yapıldıktan sonra, bisülfid modifikasyonu gerçekleştirildi. Modifiye edilen DNA'lar ile P15, CDX2, ER ve BCL-2 genlerinin metilasyon spesifik pcr'ları yapıldı. MP uygulanmayan kontrol grubu HL-60 hücrelerinde P15 geni promotörü ve BCL-2 geni promotörü metile bulunmamıştır, ER geni promotörü ve CDX2 geni promotörü metile bulunmuştur. MP uygulanan hücrelerde kontrol grubuna göre metilasyon profilinde bir farklılık saptanmadı.

Paul ve ark.larının bulgularıyla tutarlı olarak bizim çalışmamızda da HL-60 hücrelerinde P15 geni promotörü metile bulunmamıştır (Paul ve ark.,2010). Lakshmikuttyamma ve ark. da yaptıkları çalışmada, HL-60 hücrelerinde P15 geni promotörünün metile olmadığını ve ifadesinin görüldüğünü saptamışlardır (Lakshmikuttyamma ve ark.,2010). P15 geni promotörünün metile olmaması, bu genin ifade edildiğini göstermektedir. Bizim çalışmamızda da 24. saat ve 48. saat MP uygulamasından sonra P15 geninin MP uygulanmayan kontrol grubuyla aynı şekilde metilasyon profilinde bir değişiklik olmadığı saptanmıştır.

Bizim çalışmamızda ER geni (alfa izoformu) promotörü, HL-60 hücrelerinde Issa ve ark. larının bulgularıyla tutarlı olarak metile bulunmuştur (Issa ve ark.,1996). Yao ve ark., lösemi hücre hatlarında ER geninin promotör metilasyonunu araştırdıkları çalışmalarında, HL-60 hücrelerinde ER geni(alfa izoformu) promotörünün metile olduğunu bulmuşlardır (Yao ve ark.,2009). Bu çalışmanın da bulguları bizim bulgularımızla tutarlıdır. 24. saat ve 48. saat MP uygulamasından sonra ER geninin MP uygulanmayan kontrol grubuyla aynı şekilde metile olduğu saptanmıştır. MP uygulaması ER geninin promotör metilasyon profilinde bir değişikliğe neden olmamıştır.

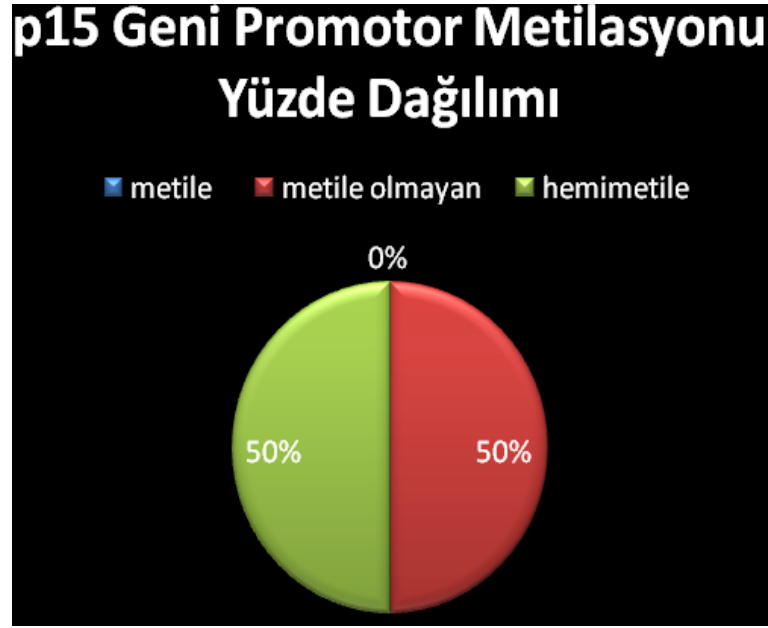
CDX2 geni AML'de anormal olarak ifadesi görülen ve lösemi oluşumunda rolü olduğu düşünülen bir genidir. Scholl ve ark. çalışmalarında ,AML hastalarının %90'ında CDX2 geninin yüksek seviyede ifadelenmediğini saptamışlardır. Aynı çalışmada, HL-60 hücrelerinde de CDX2'nin ifadelenip ifadelenmediğini araştırmışlardır ve CDX2'nin ifadelenmediğini saptamışlardır. Bu çalışmayla uyumlu olarak, bizim çalışmamızda CDX2 geninin 24. saat ve 48. saat MP uygulanan ve uygulanmayan kontrol gruplarında metile olduğu belirlenmiştir. MP'nun CDX2 promotör metilasyon profilinde değişikliğe sebep olmadığı saptanmıştır. Promotör metilasyonu saptanan genlerin ekspresyonu olmamaktadır. Bu bağlamda, bizim çalışmamızla Scholl ve ark.larının yaptıkları çalışma sonucu tutarlı olmaktadır (Scholl ve ark.,2007). Çünkü alellerden biri metile olmadığı gen ifadesi görülmektedir.

Anti-apoptotik bir gen olan BCL-2, AML hastalarında yüksek seviyede ifadelenmektedir. Bizim çalışmamızda, 24. saat ve 48. saat MP uygulanan gruplarda ve kontrol gruplarında BCL-2 geni promotörünün metile olmadığı saptanmıştır. Wang ve ark., yaptıkları çalışmada HL-60 hücrelerinde BCL-2'nin yüksek seviyede ifade edildiğini ve bölünmeyi durdurucu ajanlar ile muamele edildiğinde ifadesinin azaldığını saptamışlardır (Wang ve ark.,2011). Bizim çalışmamızda, BCL-2 geninin metile olmaması, bu genin ifade edildiğini göstermektedir. Bu bağlamda, bulgularımız Wang ve ark.larının yaptığı çalışma ile tutarlıdır.

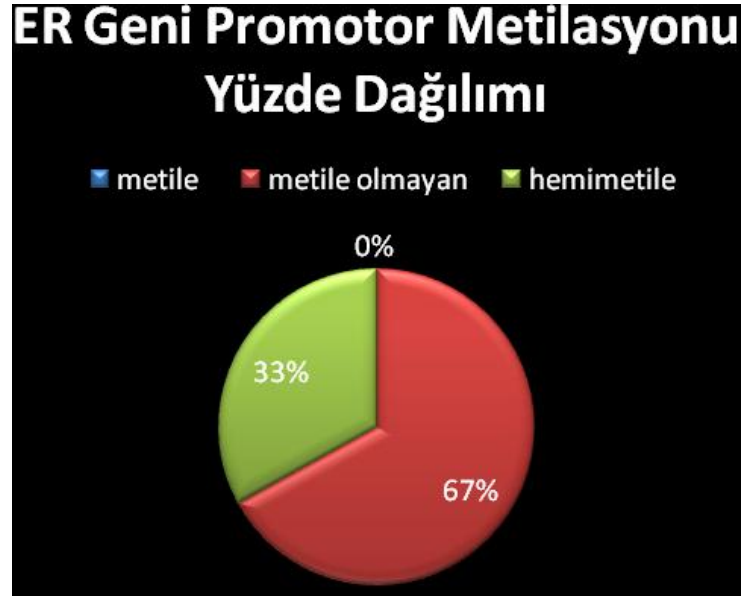
Bu tez çalışmasında, HL-60 hücrelerinde yapılan MP uygulamasına ek olarak Hacettepe Üniversitesi Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı'ndan AML hastalarından

alınan MP tedavi öncesi ve sonrası kemik iliği örneklerinin DNA metilasyon profili karşılaştırılmıştır. Bu bağlamda, tez çalışması süresi kapsamında toplanan 6 hastanın tedavi öncesi ve sonrası kemik iliği örneklerinden elde edilen DNA'lar modifiye edildikten sonra P15, ER, CDX2 ve BCL-2 gen bölgelerinden metilasyon spesifik PCR yapıldı ve uygulanan ilacın hücrelerdeki farklılaşma düzeyleri ile metilasyon profilini etkileyip etkilemediği araştırıldı.

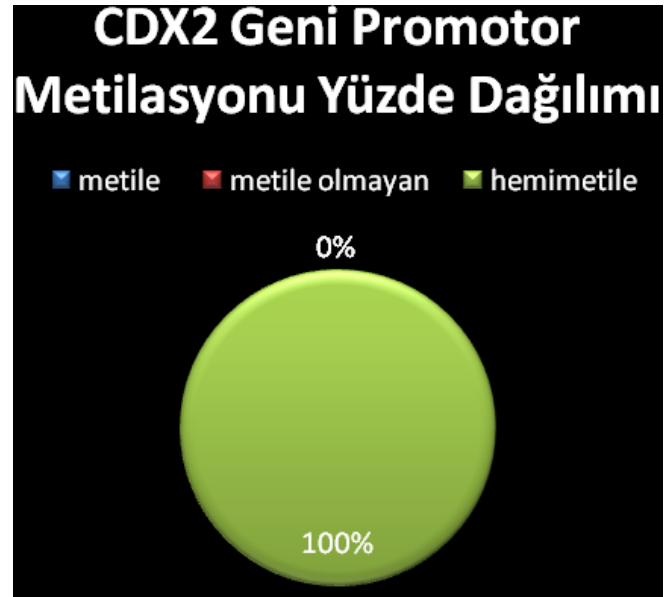
Sonuç olarak, P15 geni promotoru hastaların üçünde metile olmayıp, üçünde hemimetile, ER geni promotoru hastaların dördünde metile olmayıp, ikisinde hemimetile, CDX2 geni promotoru hastaların hepsinde hemimetile, BCL-2 geni promotoru ise hastaların üçünde metile olmayıp, üçünde hemimetile olduğu saptanmıştır (Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3.,Şekil 4.4). Aşağıda bununla ilgili literatür tartışmasına yer verilmiştir.



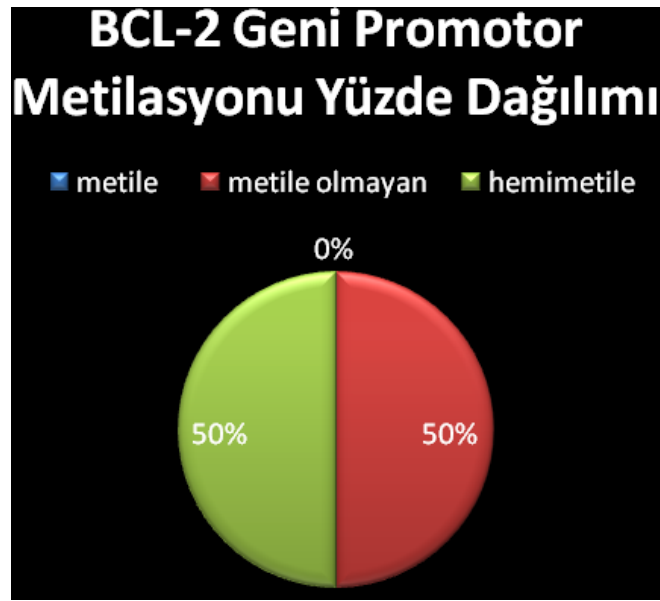
**Şekil 4.1.** Pediatrik AML hastalarında p15 geni promotor metilasyonunun metile alel, metile olmayan alel ve hemimetile alellere göre yüzde dağılımı



**Şekil 4.2.** Pediatrik AML hastalarında ER geni promotor metilasyonunun metile alel, metile olmayan alel ve hemimetile alellere göre yüzde dağılımı



**Şekil 4.3.** Pediatrik AML hastalarında CDX2 geni promotor metilasyonunun metile alel, metile olmayan alel ve hemimetile alellere göre yüzde dağılımı



**Şekil 4.4.** Pediatrik AML hastalarında BCL-2 geni promotor metilasyonunun metile alel, metile olmayan alel ve hemimetile alellere göre yüzde dağılımı

Siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan P15 geni promotorunun metilasyonuna AML’de sıklıkla rastlanmaktadır. Myelopoez sürecinin ileri safhaları ile P15 geninin ifadesi arasında bir ilişki olduğuna dair birçok kanıt vardır. P15 geninin ifadesi myeloblast progenitör hücrelerde, interlökin-6 (IL-6) ve interferon (INF- $\beta$ ) gibi büyümeyi durduran ve monositik farklılaşmayı stimüle eden sitokinlere cevap olarak uyarılmaktadır. Erken CD34+ hematopoetik progenitörlerde p15 geninin ifadesi ile ilgili yapılan çalışmalarda, *in vitro* sitokin uygulaması sonucu p15 geninin ifadesi uyarılmış ve gen ifadesinin başlaması da myeloid farklılaşmayı indüklemiştir (Rosu ve ark.,2008). Shimamoto ve ark. yaptıkları çalışmada, 61 AML hastasında P15 geninin metilasyon profiline bakmıştır ve bu hastaların %51’inde anormal promotor hipermetilasyonuna rastlanmıştır. CD34+ hücreleri G-CSF veya IL-3 ile kültüre edildiklerinde erken blast progenitörlerinde p15 geninin ekspresyonunun indüklenmesiyle beraber CD11b gibi myeloid farklılaşma ile ilgili genlerin de ekspresyonu başlamıştır (Shimamoto ve ark.,2005). Ekmekçi ve ark., AML hastalarında tümör baskılayıcı genlerin metilasyonunu araştırdıkları çalışmada, 28 hastada P15 geninin metilasyonuna bakılmıştır. 18 yetişkin hastanın %50’sinde, 10 çocuk hastanın %30’unda P15 geni metile bulunmuştur (Ekmekçi ve ark.,2004). Bizim

çalışmamızda yeterli hasta sayısına ulaşamadığımız için istatistiksel olarak anlamlı bir sıklık verilememiştir. Bununla birlikte, altı hastanın tedavi öncesi ve sonrası metilasyon profili karşılaştırıldığında, yüksek doz MP uygulanan AML hastalarında, P15 geninin promotor metilasyon profilinde bir değişiklik olmadığı saptanmıştır.

Östrojen reseptör geni (ER), normal hematopoetik hücrelerde metile değilken, AML hastalarında metilasyonuna rastlanmaktadır. ER geninin büyümeyi veya metastazı baskılayıcı etkisinin olduğu birçok hücre tipinde gösterilmiştir. Östrojenin hematopoez üzerinde negatif etkisi olduğu saptanmıştır (Issa ve ark.,1996). Issave ark. yaptıkları çalışmada, 23 yetişkin AML hastasının %91'inde ER promotoru metile bulunmuştur. Lösemi hücre serileri ile yaptıkları ER metilasyon analizinde ise HL-60 hücrelerinde ER geni promotorunun metile olduğu saptanmıştır (Issa, 1996). Ekmekçi ve ark., AML hastalarında tümör baskılayıcı genlerin metilasyonuna baktıkları çalışmada, 10 çocuk hastanın %55'inde ve 18 yetişkin hastanın %39'unda ER geni promotoru metile bulunmuştur (Ekmekçi ve ark.,2004). Li ve ark., 261 AML hastasında ER geni metilasyonuna ve sağkalımla ilişkisine bakıldığı çalışmada, hastaların %61'inde metilasyon saptanmıştır. Tümünden sağkalımın ER metilasyonu ile doğru orantılı olarak arttığını öne sürmektedirler. Ancak bununla birlikte sağkalımla östrojen reseptör metilasyon ilişkisinin hala net olmadığı vurgulanmaktadır. ER gen metilasyonunun yaş arttıkça azaldığı ve FAB sınıflandırmasında M4 ve M5 alt tiplerindeki hastalarda da belirgin derece az olduğu saptanmıştır (Li ve ark.,1999). Bizim çalışmamızda çalışılan 6 AML hastasında, ER gen promotoru hastaların dördünde metile olmayıp, ikisinde hemimetile olarak belirlendi, yeterli hasta sayısına ulaşamadığımız için istatistiksel olarak anlamlı bir sıklık verilemedi. Bununla birlikte, altı hastanın yüksek doz MP tedavi öncesi ve sonrası metilasyon profili karşılaştırıldığında ER geninin metilasyon profilinde bir değişiklik olmadığı saptanmıştır.

Hematopoez süresince HOX genleri, hücrelerin kökenine veya buldukları safhaya özgü olarak ifade edilmektedir. Bununla birlikte, myeloid veya eritroid seriye farklılaşım farklılaşmayacağı HOX geninin global olarak ifadesinin baskılanmasıyla sağlanmaktadır. CDX2 geninin gelişim süresince HOX genlerinin regülatörü olarak rol oynadığı dikkate alındığında, hematopoetik progenitör hücrelerde CDX2 geninin ektopik ekspresyonunun, HOX genleriyle sıkı bir şekilde regüle edile kan hücrelerinin

farklılaşma programını bozabileceği beklenen bir sonuçtur (Rice ve Licht,2007). Scholl ve ark.larının 170 AML hastasında CDX2 geninin ekspresyonunu araştırdıkları çalışmada, 170 hastanın %90'ında CDX2 geninin ektopik ifade edildiğini saptamışlardır. Bizim çalışmamızda pediatrik AML hastalarının tümünde CDX2 geni hemimetile olması nedeniyle bu genin altı hastada da ifade edildiğini söyleyebiliriz. Ancak bu sonucun doğrulanması için, çalışmanın devamı olarak CDX2 geninin ifade düzeyine bakılması planlanmıştır. Bununla birlikte, altı hastanın yüksek doz MP uygulanması öncesi ve sonrası metilasyon profili karşılaştırıldığında CDX2 geninin promotor metilasyon profilinde HL-60 hücre serileri ile uyumlu olarak bir değişiklik olmadığı saptanmıştır.

Metilprednizolonun apoptotik etkisini DNA metilasyonu üzerinden gösterip göstermediğini aydınlatmak için anti-apoptotik bir gen olan BCL-2 promotor metilasyon profiline bakıldı. Bcl-2 apoptozisi durdurarak hücre bölünmesini uyarayan bir proteindir. Lösemi hücre hatlarında ve AML'de yüksek seviyede ekspresyonu görülen bu onkogen etkisini, mitokondriyal sitokrom c salınımını ve kaspaz-3 aktivasyonunu engelleyerek kemoterapötik ajanlara karşı direnç şeklinde gerçekleştirmektedir. Shakankiry ve ark., AML hastalarında BCL-2 geninin ifadesine baktıkları çalışmada, hastalarda bu geninin ekspresyonunun kontrole göre anlamlı derecede yüksek olduğunu saptamışlardır (Shakankiry ve ark., 2009). AML hastalarında BCL-2 geninde metilasyon çalışması literatürde yer almamıştır. Bizim çalışmamızda hastaların üçü metile olmayıp, diğer üçü de hemimetile olduğu için, bu hastalarda BCL-2 geninin ifadelenmesini beklenmektedir. Bulgularımıza göre bu sonuç, literatürdeki yayınlarla tutarlı bir bulgudur. Ancak bu bulgunun, ifade analizi ile doğrulanması gerekmektedir. Ayrıca, altı hastanın MP tedavisi öncesi ve sonrası metilasyon profili karşılaştırıldığında BCL-2 promotor metilasyon profilinde bir değişiklik olmadığı saptanmıştır.

Kan hücrelerinde, farklılaşma süresince kromatin kondensasyonunun çok önemli rol oynamaktadır ve farklılaşmanın son evresindeki hücrelerde kondensasyonunun payı maksimum seviyeye ulaşmaktadır. İnsan kan hücrelerinin farklılaşması kromatin kondensasyonunun regülasyonunu göstermek açısından elverişli bir sistemdir. Farklılaşma sürecinde, malign hücreler herhangi bir safhada ortaya çıkarak farklı



lösemi tiplerinin oluşumuna neden olmaktadır. Lukasova ve ark., sınırlı bölünme kapasitesine sahip farklılaşmış beyaz kan hücreleri ve bu özelliğini tamamen yitirmiş granülositler arasındaki kromatin kondensasyonu farklılığını saptamak amacıyla yaptıkları çalışmada, HL-60 hücrelerini retinoik asit (RA) ile farklılaşmaya indükledikten sonra H3K9 metilasyon profiline bakmışlardır. HL-60 hücrelerinde kromatinde H3K9'un -mono, -di, -tri metilasyonunun ve metilasyon sürecinde yer alan HP1 proteinlerinin varlığının sağlıklı insan granülositlerindeki kromatinde olmadığını saptamışlardır. RA'in kontrol grubuna göre H3K9 metilasyon profilinde değişikliğe neden olmadığını saptamışlardır. Farklılaştırıcı ajanlardan biri olan RA'in her ne kadar hücreleri terminal bölünmeye indükleyip, tümörjenik özelliklerini kaybetmelerini sağlasa da kromatin yapısının tamamen normal hale gelmediğini öne sürmektedirler. Normal insan granülositlerindeki H3K9 histon metilasyonunun varlığının lösemik hücrelerde olmamasının kromatinde instabiliteye ve buna bağlı olarak nükse sebep olabileceği düşünülmektedir (Lukasova ve ark.,2005). Balint ve ark., HL-60 hücrelerini retinoik asitle farklılaşmaya indükledikleri çalışmada, H4 arjinin 3 (H3R4) ve H3 lizin 4 (H3K4) metilasyon profilini araştırmışlardır. Myeloid farklılaşma sürecinin ilk aşamalarında, H4R3 metilasyonunda artış ve H3K4 metilasyonunda azalma saptanmıştır. Bu modifikasyonların transkripsiyondan önce gerçekleştiği ve takiben hormonla regüle edilen transkripsiyonların gerçekleştiği öne sürülmektedir. H4R3 metilasyonunun, pozitif bir epigenetik belirteç olduğu ve farklılaşma sürecinde transkripsiyonel cevabı regüle etmede ve epigenetik hafızayı sağlamada bir sinyal mekanizması gibi görev gördüğü belirtilmektedir (Balint ve ark.,2005). Bu bağlamda, farklılaştırıcı etkisi olduğunu bildiğimiz ve etki mekanizmasını araştırdığımız metilprednizolonun, RA'ten farklı olarak H3K9 histon metilasyonuna veya RA gibi H4R3 metilasyonuna etki edebileceği düşünülebilir.

AML'de p15 geninin promotor bölgesindeki DNA metilasyonunun histon ile olan ilişkisinin araştırıldığı çalışmada Paul ve ark., p15 metilasyonu olan ve olmayan hasta örneklerinde ve HL-60 hücrelerinde H3K4 ve H3K27 trimetilasyonunu araştırmışlardır. p15 metile olan hastalarda, aktif kromatinden sorumlu H3K4 trimetilasyonu olmadığı, kapalı kromatinden sorumlu H3K27 trimetilasyonu olduğu, p15 metile olmayan hastalarda, H3K4 ve H3K27 trimetilasyonu olduğu saptanmıştır. HL-60 hücrelerinde ise, p15 geninin metile olmadığı saptanmıştır. Bununla birlikte

H3K4 trimetilasyonu varlığı ve H3K27 trimetilasyonu olmadığı görülürken, p15 geninin ekspresyonunun düşük seviyede olduğu saptanmıştır (Paul ve ark.,2010). Bu veriler ışığında, bizim çalışmamızda metilasyonunu araştırdığımız genlerin ekspresyonlarını takiben H3K27 ve H3K4 trimetilasyonunun da çalışılması planlanmıştır.

Metilprednizolonun etkisini histon metilasyonu üzerinden gösterebileceği gibi, miRNA ekspresyonu ile de gösterebileceği düşünülmektedir. MikroRNA'lar gelişim, bölünme, apoptozis ve stres cevabı ile ilgili genlerin ekspresyonlarının kontrolünü düzenlemektedir. Hematopoez süresince mikroRNA'ların işlevi ve rolü analiz edildiğinde, hematopoetik farklılaşma ve bölünme arasındaki hassas dengeyi sağlamada birçok kompleks regülatör "loop" varlığı ortaya çıkarılmıştır. Farelerde yapılan çalışmalarda, miRNA'ların memelilerde köken-spesifik hücre farklılaşmasında önemli rol oynadığı saptanmıştır. İnsanlarda miR-107 ve miR-203'ün, granülositik farklılaşma sürecinde ekspresyonlarının başladığı görülmektedir. miRNA'lar hem onkogenik hem de tümör baskılayıcı etki göstererek lösemi oluşumunda önemli rol oynamaktadırlar. Jian ve ark., yaptıkları çalışmada, HL-60 hücrelerine ATRA (all-trans retinoik asit) verip farklılaştırdıktan sonra miRNA ekspresyonuna bakmışlardır. Farklılaşma süresince miR-663'ün ekspresyonunun indüklendiğini saptamışlardır ve lentivirüs ile miR-663'ü hücreleri muamele ettiklerinde, HL-60 hücrelerinin farklılaştığını saptamışlardır (Jian ve ark.,2011). Bu yüzden metilprednizolon uygulanan hücrelerde miRNA ekspresyonlarının araştırılmasının gerekli olduğu düşünülmektedir.

AML'de tedavide kullanılan yüksek doz MP'nin etkisini; farklılaşma, bölünme apoptozis süreçlerinde etkili oldukları bilinen bazı genlerin promotor metilasyon profilini değiştirerek etkili olabileceği düşünülerek planlanan bu tez çalışması sonuçlarına göre, MP'nin hücre serisi ve yüksek doz MP uygulanan hastalarda promotor metilasyon profilinde değişikliğe yol açmadığı dolayısı ile metilprednizolonun etkisini gen promotorunda değişiklik yaparak göstermediği literatürde ilk kez belirlenmiştir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Yüksek doz MP uygulanan HL-60 AML hücre serilerinde, MTT ve akım sitometri analizleri sonucu ilacın canlılığı istatistiksel olarak ( $p < 0.001$ ) anlamlı biçimde azalttığı saptandı. Akım sitometri ile yüksek doz MP'nin literatürle uyumlu olarak apoptozis ve farklılaşmaya neden olduğu belirlendi. HL-60 myeloid blastik hücrelerde diferansiyasyon için *in vitro* etkin MP dozu, yapılan çalışma sonrası hastalara uygulanan doz ile uyumlu olarak  $5 \times 10^{-3}$  M olarak belirlendi.
2. Bu tez çalışmasında literatürde ilk kez MP uygulanan HL-60 hücre serilerinde p15, ER, CDX2 ve BCL-2 genlerinin promotor metilasyon profili araştırılmıştır. Yüksek doz MP uygulanan hücre serilerinde (*in vitro*) ilacın etkisini, p15, CDX2, BCL-2 ve ER genlerinde promotor metilasyonu üzerinde göstermediği ilk kez belirlendi.
3. Ayrıca, yine literatürde ilk kez pediatrik AML hastalarında ilk tanı ve 5-7 günlük steroid tedavisi sonrası alınan kemik iliği örneklerinden yapılan DNA izolasyonu, bisülfid modifikasyonu ve takiben p15, CDX2, ER, BCL-2 genlerinin metilasyon spesifik PCR sonrası metilasyon profili karşılaştırıldı ve hücre serisi denemesiyle tutarlı olarak ilacın, bu genlerin promotor metilasyon profilini değiştirmedeği ilk kez saptandı.
4. Yüksek doz MP uygulanan hücrelerden ve yüksek doz MP uygulanan pediatrik AML hastalarından ilaç öncesi ve sonrası örneklerde P15, CDX2, BCL-2 ve ER genlerinin ifade düzeylerinin metilasyon profili ile uygunluğunu test etmek üzere Real-time PCR ile araştırılması planlanmıştır.
5. Gen ifadesi analizini takiben diğer bir epigenetik mekanizma olan histon modifikasyonlarından H3K27, H3K9 ve H3R4 histon metilasyonlarına bakılarak, Metilprednizolonun histonlar üzerinde bir değişikliğe neden olup olmadığı araştırılacaktır.

6. Metilprednizolonun diğer bir epigenetik yolak olan RNA interferans üzerinden miRNA ekspresyonunu değiştirip değiştirmediği araştırmak üzere, miR-107 ve miR-203 ekspresyonlarına bakılması bu çalışmanın devamı olarak planlanmıştır.
7. İstatistiksel değerlendirme için yeterli hasta sayısına ulaşılamadığından tedavi öncesi ve sonrası hasta örneği alınmaya devam edilerek, çalışılan örnek sayısı artırılacaktır.

## ÖZET

### **Pedriatrik Akut Myeloid Lösemi Tedavisinde Kullanılan Metilprednizolon'un DNA Metilasyonu Üzerine Etkisi**

Akut Myeloid Lösemi, erken hematopoetik kök hücrelerde bir dizi genetik değişiklik sonucunda normal büyüme ve farklılaşmanın bozulması, kemik iliği ve periferik kanda çok sayıda anormal olgunlaşmamış myeloid hücrenin birikimi ile karakterize olan bir hastalıktır. DNA metilasyonu, histon proteinlerinin transkripsiyon sonrası modifikasyonu ve nükleozomların yeniden modellenmesi gibi epigenetik mekanizmalar, kromatin yapısını etkiler ve gen ifadesinde kalıtsal değişikliklere neden olur. Bu değişiklikler lösemilerin çeşitli alt tipleri dahil birçok kanserin gelişimine yol açabilir. DNA'daki geri dönüşümsüz yapısal değişikliklerin aksine, epigenetik değişiklikler DNA'nın kodlayan dizisinde değişikliğe neden olmadan genin fonksiyon kaybına yol açar. Akut lösemi tedavisinde kullanılan glukokortikoidler antiproliferatif etkileri sayesinde, immün baskılama, inflamasyon tedavisi ve sitotoksitenin indüklenmesi için kullanılmaktadırlar. Sentetik bir glukokortikoid olan metilprednizolonun yüksek dozda, myeloid lösemi hücrelerinin granüositlere ve makrofajlara farklılaşmasını ve myeloid lösemi hücrelerinde apoptozisi indüklediği gösterilmiştir. Dexametazon ve metilprednizolon gibi glukokortikoidlerin normal ve tümörlü hücrelerde antiproliferatif etkisi de gösterilmiştir. Çocukluk çağı AML hastalarında metilprednizolonun epigenetik mekanizma üzerine etkisi bilinmemektedir.

ER- $\alpha$  promotörünün anormal olarak metilasyonu, epigenetik olarak bu genin susturulmasıyla bağlantılıdır ve lösemilerin tanı, prognoz ve tedavisinde epigenetik belirteç olarak kullanılmaktadır. %50-90 sıklıkla akut ve kronik lösemide metile olduğu analiz edilmiştir.

CDX2 embriyonik gelişimde önemli rol oynar ve yetişkinlerde intestinal epitel hücrelerin farklılaşması ve proliferasyonunu düzenler. AML'li hastaların %90'ında CDX2'nin eksprese olduğunu ama normal bireylerdeki hematopoetik ve kök hücrelerde ekspresyonun olmadığı saptanmıştır..

AML'de *P15*, *ER* genlerinin sıklıkla metile olduğu bildirilmektedir ve Metilprednizolon'un bu genler üzerinde metilasyon düzeyinde etkileri konusunda herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır.

Bu projenin amacı, AML'de sıklıkla metile olduğu bildirilen *p15*, *ER* ve anormal ekspresyonu görülen Bcl-2 ve CDX2 genlerinin HL-60 hücre serisinde ve AML hastalarında steroid tedavisi öncesi ve sonrası metilasyonuna bakılarak, metilprednizolonun etkisini, epigenetik yoldan gösterip göstermediğini araştırmaktır. Bu çalışmada, akut myeloid lösemi hücre serisi HL-60, hücre serisine metilprednizolon uygulanarak etken doz saptandı ve 24. ve 48.saatlerdeki kadar apoptotik ve farklılaşma etkisine bakıldı. Yüksek ve etken dozun hücreleri farklılaşmaya götürdüğü ancak bunu epigenetik yoldan mekanizmalarından biri olan DNA metilasyonu üzerinden yapmadığı saptandı. 6 yeni tanı AML hastasının tedavi öncesi ve sonrası kemik iliği örneklerinden yapılan analizler sonucu da ilacın etkisini DNA metilasyonu üzerinden göstermediğini doğruladı.

**Anahtar Sözcükler:** Akut Myeloid Lösemi, Metilprednizolon, Metilasyon, ER, BCL-2, CDX2, p15

## SUMMARY

### Effects of Methylprednisolone on DNA Methylation Used For Pediatric Acute Myeloid Leukemia Patients

Acute Myeloblastic Leukemia (AML) is a disease characterized with disruption of normal hematopoietic growth and differentiation and accumulation of numerous abnormal unmaturing myeloid cells. Epigenetic mechanisms such as DNA methylation, posttranslational modifications of histone proteins and remodeling of nucleosomes affect chromatin structure and cause heritable changes in gene expression. Epigenetic mechanisms, in particular DNA methylation, plays a major role in the modulation of gene activity in cancer and silence a large number of tumor suppressor genes in acute leukemias. In contrast to irreversible structural alterations in DNA, epigenetic alterations don't cause changes in coding DNA sequence and result in loss of gene function which can be reversed pharmacologically. But epigenetic changes can reverse pharmacologically with demethylating agents which are in use therapy of hematological malignancies. Methylprednisolone is a synthetic glucocorticoid drug which has been used with short course and high dose for treating newly diagnosed children with AML, different AML subtypes and relapsing patients. Methylprednisolone induces differentiation of myeloid leukemia cells to granulocytes and macrophages and induce apoptosis of myeloid leukemia cells with or without differentiation. It has been shown that glucocorticoids such as dexamethasone and methylprednisolone exert anti-proliferative effects on normal and tumor cells. It's still unknown if methylprednisolone has any effect on gene expression or it performs its effects through an epigenetic mechanism. *CDX2* gene expression is abnormally seen in acute leukemias. In this study, methylation *p15*, *CDX2*, *ER* and *Bcl-2* are investigated before and after methylprednisolone treatment in HL-60 cell line and in 6 AML patient and it is demonstrated if methylprednisolone shows its effect with epigenetic pathway. It's known that *P15*, *ER* genes are aberrantly methylated in AML and their methylation can be reversed with demethylating agents. Methylation analysis is done two times before and after methylprednisolone treatment. First, apoptosis determination is done with Annexin V. HL-60 specific surface antigens and mature myeloid cell surface antigens analyzed with flow cytometry analysis. Following this step, the high and effective dose for HL-60 cells established as  $5 \times 10^{-3}$ . For this dose, DNA isolation is done. After isolation, methylation pattern studied for *p15*, *ER*, *CDX2* and *Bcl-2* genes. 6 AML patients bone marrow samples before and after MP treatment are done methylation specific pcr for *p15*, *ER*, *CDX2* and *Bcl-2* genes. In conclusion both patient samples and HL-60 cell line shows that MP doesn't effect DNA methylation.

**Key Words** : Acute Myeloid Leukemia, Methylprednisolone, Methylation, ER, BCL-2, CDX2, p15

## KAYNAKLAR

- ALTUCCI L., CLARKE N., NEBBIOSO A., SCOGNAMIGLIO A., GRONEMEYER H. (2005). Acute myeloid leukemia: Therapeutic Impact Of Epigenetic Drugs. *European Journal of Cancer*. **37**; 1752–1762.
- ALVAREZ S., SUELA J., VALENCIA A. (2010). DNA Methylation Profiles And Their Relationship With Cytogenetic Status In Adult Acute Myeloid Leukemia. *Plos One* **5**.
- AYTAÇ-ELMAS S., ÇETİN M., TUNCER M., HİÇSÖNMEZ G. (2005). Myeloprotective Effect of Short-Course High-Dose Methylprednisolone Treatment Before Consolidation Therapy in Children With Acute Myeloblastic Leukemia. *American Journal of Hematology*. **80**;1-5.
- BALINT B. L., SZANTO A., MADI A., BAUER U. GRABOR P., BENKO S., PUSKAS L.G., DAVIES G.L., NAGY L. (2005). Arginine Methylation Provides Epigenetic Transcription Memory For Retinoid-Induced Differentiation in Myeloid Cells. *Molecular and Cellular Biology*. **25**; 5648-5663.
- BEKSAÇ M. (1997). Klinik Hematology. ANTIP A.Ş. Yayınları
- BLUM W., MARCUCCI G., (2005). Targeting Epigenetic Changes in Acute Myeloid Leukemia. *Clinical Advances in Hematology&Oncology*. **3**; 855- 882.
- BROWN PATRICK, SMITH FRANKLIN O. (2008). Molecularly Targeted Therapies for Pediatric Acute Myeloid Leukemia. *Pediatr Drugs*. **10**; 85-92.
- CANDILORO I., MIKESKA T., HOKLAND P., DOBROVIC A. (2008). Rapid analysis of heterogeneously methylated DNA using digital methylation-sensitive high resolution melting: application to the CDKN2B (p15) gene. *Epigenetics & Chromatin*. **1**;7
- CHANAN-KHAN A.(2004). Bcl-2 antisense therapy in hematologic malignancies. *Current Opinion in Oncology*. **16**; 581–585.
- CLARK JENNIFER J., SMITH FRANKLIN O., ARCECI ROBERT J. (2003). Update in childhood acute myeloid leukemia: recent developments in the molecular basis of disease and novel Therapies. *Current Opinion in Hematology*. **10**; 31–39.

- COLLINS J.S. (1987). The HL-60 Promyelocytic Leukemia Cell Line: Proliferation, Differentiation, and Cellular Oncogene Expression. *Blood*. **70**.
- DESCHLER B., LUBBERT M. (2006). Acute Myeloid Leukemia: Epidemiology and Etiology. *Cancer*. **107**.
- DI CROCE L., RAKER V.A., CORSARO M. (2002). Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science*. **295**; 1079-1082.
- EKMEKCI CUMHUR G., GUTIE'RREZ MARINA I., SIRAJ ABDUL K., OZBEK UGUR, AND BHATIA KISHOR. (2004). Aberrant Methylation of Multiple Tumor Suppressor Genes in Acute Myeloid Leukemia. *American Journal of Hematology*. **77**; 233–240.
- FIGUEROA ME, LUGTHART S, LI Y. (2010). DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. **17**; 13–27.
- FORAN M.J. (2010). New Prognostic Markers in Acute Myeloid Leukemia: Perspective from the Clinic. *Hematology*. 47-55.
- GIBNEY E.R., NOLAN C.M. (2010). Epigenetics and gene expression. *Heredity*. **105**; 4–13.
- GREENSTEIN S., GHAS K., KRETT N.L., ROSEN T.S. (2002). Mechanisms of Glucocorticoid-mediated Apoptosis in Hematological Malignancies. *Clinical Cancer Research*. **8**; 1681–1694.
- GRIFFITHS E. A., GORE STEVEN D., HOOKER CRAIG M., MOHAMMAD HELAI P., MCDEVITT M., SMITH B. D., KARP J.E., HERMAN JAMES G., CARRAWAY HETTY E. (2010). Epigenetic differences in cytogenetically normal versus abnormal acute myeloid leukemia. *Epigenetics*. **5**: 1-11.
- GRØNBÆK KIRSTEN, HOTHER CHRISTOFFER, JONES PETER A. (2007). Epigenetic changes in cancer. *APMIS*. **115**; 1039–1059
- HERMAN JAMES G., GRAFF JEREMY R., MYOHANEN SANNA, NELKIN BARRY D., BAYLIN STEPHEN B. (1996). Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**; 9821-9826,
- HERMAN, J.G., BAYLIN, S.B. (2003) Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *New England Journal of Medicine*. **349**; 2042–2054.



- HİÇSÖNMEZ G. (2006). The effect of steroid on myeloid leukemic cells: ‘The potential of short-course high-dose methylprednisolone treatment in inducing differentiation, apoptosis and in stimulating myelopoiesis. *Leukemia Research*. **30**; 60–68.
- HİÇSONMEZ G, ÖZSOYLU S, TUNCER A.M. (1991). Differentiation of myeloid leukemic cells induced by high-dose methylprednisolone in patients with acute myeloblastic leukemia and its therapeutic potential. *Leukemia Research*. **15**; 537-541.
- HİÇSÖNMEZ G., TUNCER A.M., GÜLER E., TAN E., TEKELİOĞLU M. (1993). The potential role of high-dose methylprednisolone on the maturation of leukemic cells in children with acute promyelocytic leukemia (APL). *Experimental Hematology*. **21**; 599-601.
- HİÇSÖNMEZ G., TUNCER A.M., ÇETİN M., GÜMRÜK F., KARA A., YALÇIN S. (1993). Morphologic evidence of in vivo differentiation in acute myeloblastic leukemia. *Acta Hematologica*. **90**; 214-215.
- HİÇSÖNMEZ G., ERDEMLİ E., TEKELİOĞLU M., TUNCER A.M., ÖZBEK N., ÇETİN M, COTTER T.G., Morphologic evidence of apoptosis in childhood acute myeloblastic leukemia treated with high-dose methylprednisolone. *Leukemia and Lymphoma*. **22**; 91-96.
- ILLINGWORTH R., KERR A., DESOUSA D., JORGENSEN H., ELLIS P., STALKER J. (2008). A novel CpG island set identifies tissue specific methylation at developmental gene loci. *PLoS Biology*. **6**; 22.
- ISSA JEAN-PIERRE J., ZEHNBAUER BARBARA A., CIVIN CURT I., COLLECTOR MICHAEL I., SHARKIS SAUL J., DAVIDSON NANCY E., KAUFMANN SCOTT H., AND BAYLIN STEPHEN B. (1996). The Estrogen Receptor CpG Island Is Methylated in Most Hematopoietic Neoplasms. *Cancer Research*. **56**; 973-977.
- JIAN P., LI W. Z., FANG Y. F., JIAN W., ZHUAN Z., MEI X. L., YAN S.W., JIAN N. (2011). Retinoic acid induces HL-60 cell differentiation via the upregulation of miR-663. *Journal of Hematology & Oncology*. **4**;20
- KROEGER H., JELINEK J., ESTECISO R.H., HE R., KONDO K., CHUNG W., ZHANG L., SHEN L., KANTARJIAN H.M., BUESO-RAMOS C.E., ISSA J. (2008). Aberrant CpG island methylation in acute myeloid leukemia is accentuated at relapse. *Blood*. **112**;1366-1373.

- KRSTOVSKI N., JANIC D., DOKMANOVI L. (2010). Childhood acute myeloid leukaemia. *Journal of Pediatric Sciences*. **2**;23.
- LAKSHMIKUTTYAMMA A., SCOTT S.A., DECOTEAU J.F., GEYER C.R. (2010). Reexpression of epigenetically silenced AML tumor suppressor genes by SUV39H1 inhibition. *Oncogene*. **29**; 576-588
- LEONE G., D'ALO FRANCESCO, ZARDO G., VOSO M.T. AND CLARA N. (2008). Epigenetic Treatment of Myelodysplastic Syndromes ve Acute Myeloid Leukamias. *Current Medical Chemistry*. **15**; 1274-1287.
- LI Q., KOPECKY J.K., MOHAN A. (1999). Estrogen receptor methylation is associated with improved survival in adult acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Research*. **5**; 1077-1084
- LIU S., SHEN T., HUYNH L. (2005). Interplay of RUNX1/MTG8 and DNA methyltransferase 1 in acute myeloid leukemia. *Cancer Research*. **65**; 1277-1284.
- LUKASOVA E., KORISTEK Z., FALK M., KOZUBEK S., GRIGORYEV S., KOZUBEK M., ONDREJ V., KROUPOVA I. (2005). Methylation oh histones in yeloid leukemias as a potential marker of granulocyte abnormalities. *Journal of Leukocyte Biology*. **77**; 100-111.
- MANOLA KALLIOPIN. (2009). Cytogenetics of pediatric acute myeloid leukemia. *European Journal of Haematology*. **83**; 391-405.
- MEHTA K., OLDHAM R.K., OZPOLAT B. (2009). Growth and Differentiation Factors As Cancer Therapeutics. *Principles of Cancer Biotherapy*. **16**; 527-668.
- MELKI J. R., CLARK S. J. (2002). DNA methylation changes in leukaemia. *Cancer Biology*. **12**;347-357.
- MELNICK ARI M. Epigenetics in AML. (2010). *Best Practice & Research Clinical Haematology*. **23**
- MOMPARLER RICHARD L., BOVENZI VERONICA. (2000). DNA Methylation and Cancer. *JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY*. **183**; 145-154
- NAYERA H. EL-SHAKANKIRY, GHADA M. EL-SAYED, M.D., SHEREEN EL-MAGHRABY, MANAR M. MONEER. (2009). Bcl-2 Protein Expression in Egyptian Acute Myeloid Leukemia. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*. **21**; 71-76,
- OKI Y., ISSA JEAN-PIERRE J. (2010). Epigenetic Mechanisms in AML-A Target for Therapy. *Cancer Treatment and Research*. **145**; 19-40.

- ÖZÇİMEN A. (2005). Steroid'in HL-60 (İnsan Akut Miyeloid Lösemi) Hücre Hattında, Apoptoz Ve Farklılaşma Üzerindeki Etkisi. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- PAUL T.A., BIES J., SMALL D., WOLFF L. (2010). Signatures of polycomb repression and reduced H3K4 trimethylation are associated with p15INK4b DNA methylation in AML. *Blood*. **115**; 3098-3108..
- PUI CHING-HON, CARROLL WILLIAM L., MESHINCHI SOHEIL, ARCECI ROBERT J. (2011). Biology, Risk Stratification, and Therapy of Pediatric Acute Leukemias: An Update. *Journal of Clinical Oncology*. **28**
- REED J.C. (2008). Bcl-2–Family Proteins And Hematologic Malignancies: History And Future Prospects. *Blood*. **111**; 3322-3330.
- RICE K.L., LICHT J.D. (2007). HOX deregulation in acute myeloid leukemia. *The Journal of Clinical Investigation*. **117**;865-868.
- ROSU-MYLES M., WOLFF L. (2008). P15Ink4b: Dual function in myelopoiesis and inactivation in myeloid disease. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. **40**; 406-409
- RUBNITZ J. E., , GIBSON B., SMITH F. O. (2010). Acute myeloid leukemia. *Hematology Oncology Clinics of North America*. **24**;35–63.
- SCHOLL C., BANSAL D., DOHNER K., EIWEN K., HUNTLY B. J.P., BENJAMIN H. LEE, RUCKER F.G., RICHARD F. SCHLENK, LARS B., HARTMUT D., D. GARY G., STEFAN F. (2007). The homeobox gene CDX2 is aberrantly expressed in most cases of acute myeloid leukemia and promotes leukemogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*. **117**;1037–1048.
- SHAKANKIRY N.H., EL-SAYED G.M. EL-MAGHRABY S., MONEER M.M. (2009). Bcl-2 Protein Expression in Egyptian Acute Myeloid Leukemia. *Journal of the Egyptian Nat. Cancer Inst*. **21**; 71-76.
- SHIMAMATO T., OHYASHIKI J.H., OHYASHIKI K. (2005). Methylation of p15 and E-cadherin genes is independently correlated with poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Leukemia Research*. **29**;653-659.
- SHIPLEY J. L., BUTERA J. N. (2009). Acute myelogenous leukemia. *Experimental Hematology*. **37**; 649–658
- STEVENS F. R. (1996). Acute myeloid leukaemia. *British Medical Bulletin*. **52**; 764-777.

- STUART A. SCOTT, ASHAKUMARY L., SHERIDAN DAVID P, SANCHE STEPHEN E., GEYER RONALD C., AND DECOTEAU JOHN F. (2007). Zebularine inhibits human acute myeloid leukemia cell growth in vitro in association with p15INK4B demethylation and reexpression. *Experimental Hematology*. **35**; 263–273.
- TABY RODOLPHE, ISSA JEAN-PIERRE J. (2010). Cancer Epigenetics. *Cancer Journal for Clinicians*. **60**; 376–392.
- UZUNOGLU S., USLU R. , TOBU M. , SAYDAM G., TERZIOGLU E., BUYUKKECECI F., OMAI S.B. (1999). Augmentation of ethylprednisolone-induced differentiation of myeloid leukemia cells by serine:threonine protein phosphatase inhibitors. *Leukemia Research*. **23**;507-512.
- VERDEGUER A. (2010). Genetic alterations in children and adolescents with acute myeloid leukaemia. *Clinical and Translational Oncology*. **12**; 90-596.
- WANG H., WEI L., Chen L., Zhao S.,WU W., Shen Z., Li J. (2011). Synergistic effect of bortezomib and valproic acid treatment on the proliferation and apoptosis of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome cells. *Annual Hematology*. **90**; 917-93.
- WANG J., LI L.,YU X.,JIA J., CHEN C. (2010). CIP2A is over-expressed in acute myeloid leukaemia and associated with HL60 cells proliferation and differentiation. *INTERNATIONAL JOURNAL OF LABORATORY HEMATOLOGY*. **33**; 290-298.
- WATERLAND RA (2006). Epigenetic mechanisms and gastrointestinal development. *Journal of Pediatrics*. **149**; 137–S142.
- YAO J., HUANG Q., ZHANG XIAO-BING, FU WEI-LING. (2009). Promoter CpG methylation of estrogen receptors in leukemia. *Bioscience Reports*. **29**; 211-216.

EK



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



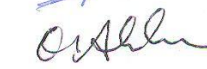



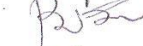




Sayı : B.30.2.HAC.0.20.05.04/ 2176  
Konu :

18 Ağustos 2009

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

**Başvuru Tarihi** : 30.06.2009  
**Toplantı Tarihi** : 13 AĞUSTOS 2009 PERŞEMBE günü  
**Toplantı No** : 2009/10  
**Proje No** : HEK 09/192 (Değerlendirme Tarihi: 16.07.2009)  
**Karar No** : HEK 09/192 -168

Fakültemiz Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Mualla Çetin 'in sorumlu araştırmacısı olduğu Prof. Dr. Asuman Sunguroğlu, Bio. Işıl Yükselen, Uzm. Bio. Tülin Özkan ve Uzm. Bio. Buket Altınok ile birlikte çalışacakları HEK 09/192 kayıt numaralı ve "Çocukluk Çağı Akut Myeloid Lösemide Steroid Tedavisinin p15, Nanog, Sox2, CDX2 ve ER ( Östrojen Reseptörü) Genlerinin Metilasyonuna Etkisi" başlıklı proje önerisi Kurulumuzda değerlendirilmiş olup, Tıbbi Etik açıdan uygun bulunmuştur.

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

## ÖZGEÇMİŞ

### I. Bireysel Bilgiler

**Adı** : Işıl  
**Soyadı** : Yükselen  
**Doğum Yeri ve Tarihi** : Hatay, 10.05.1985  
**Uyruğu** : TC  
**Medeni Durumu** : Bekar  
**İletişim adresi ve telefonu** : Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji  
 Anabilim Dalı 05333967600

### II. Eğitim

YILI	DERECESİ	ÜNİVERSİTE	ÖĞRENİM ALANI
2008-	İç Yüksek Lisans	Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Tıbbi Biyoloji
2004-2008	Lisans	Hacettepe Üniversitesi	Biyoloji

**Yabancı Dili:** İngilizce

### III. Mesleki Deneyimi

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisansı

### IV. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

- Moleküler Kanser Araştırma Derneği
- Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği
- European Association for Cancer Research (EACR)

### V. Bilimsel İlgi Alanları

Kanser, epigenetik, kök hücre

### VI. Bilimsel Etkinlikleri

#### BİLDİRİLER

- \* Aydos S, Altınok B, Özkan T, **Yükselen I**, Çalışkan E, Gökçe İ, Baltacı S, Öztuna D, Sunguroğlu S, “Prostat Kanseri Hastalarında DAP Kinaz Geninin Metilasyon Analizi”, XI. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 2009.
- \* Ozkan T, Karabay ZA , Koc A , Karadag A, Aydos S, Caliskan E, Ozturk G, Ilgaz SN, **Yukselen I**, Sunguroglu A, “Wheatgrass extract increases proliferation of RAW 264.7 macrophages induced by hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) or lipopolysaccharide (LPS)”, Planta Medica, 75, 923, (2009).

**VERİLEN SEMİNER**

- Embriyonik Transkripsiyon Faktörlerinin Etki Mekanizmaları

**KATILINAN BİLİMSEL TOPLANTILAR**

- Türkiye Bilimler Akademisi, IV. Kök Hücre Sempozyumu, 26-27 Haziran 2009
- Mediterranean Medical Genetics 2009 Meeting, 28 Haziran-1 Temmuz 2009
- Mediterranean Medical Genetics 2009 Meeting, European Society of Human Genetics- ESHG Course "Medical genetics and genomic analysis in isolated and consanguineous populations", 30 Haziran -1 Temmuz 2009
- Horizons in Molecular Biology and Genetics Symposium, Bilkent Üniversitesi, 11-12 Mayıs 2009
- Ürolojide Güncel Yaklaşımlar- II Androloji, 27-28 Şubat 2009
- Türkiye Bilimler Akademisi, VI. Kök Hücre Sempozyumu, 24-25 Haziran 2011