

**LÖSEMİ HÜCRE HATLARINDA *ELK-1* GENİ VE
BU TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜNÜN
HEDEFİNDEKİ GENLERİN
EKSPRESYONLARINDAKİ DEĞİŞİMLERİN
BELİRLENMESİ**

Hande AKALAN

**Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Anabilim Dalı
Danışman**

Yrd. Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN

2015

T.C.
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**LÖSEMİ HÜCRE HATLARINDA *ELK-1* GENİ ve BU
TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜNÜN HEDEFİNDEKİ GENLERİN
EKSPRESYONLARINDAKİ DEĞİŞİMLERİN BELİRLENMESİ**

Hande AKALAN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Yrd. Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN

TEKİRDAĞ-2015

Her hakkı saklıdır

Bu tez NKÜBAP tarafından NKUBAP.00.10.YL.13.04 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN danışmanlığında, Hande AKALAN tarafından hazırlanan “Lösemi Hücre Hatlarında *ELK-1* Geni ve Bu Transkripsiyon Faktörünün Hedefindeki Genlerin Ekspresyonlarındaki Değişimlerin Belirlenmesi” isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Juri Başkanı : Yrd. Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN *İmza :*

Üye : Doç Dr. Cenk ARAL *İmza :*

Üye : Yrd. Doç. Dr. İbrahim İsmet ÖZTÜRK *İmza :*

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU

Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

LÖSEMİ HÜCRE HATLARINDA *ELK-1* GENİ VE BU TRANSKRİPSİYON FAKTÖRÜNÜN HEDEFİNDEKİ GENLERİN EKSPRESYONLARINDAKİ DEĞİŞİMLERİN BELİRLENMESİ

Hande AKALAN

Namık Kemal Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN

Akut lösemi klinik ve biyolojik heterojenite gösteren malign ve klonal bir hematopoetik kök kücre hastalığıdır. Ülkemizde her yıl binlerce insanda görülen lösemnin hücrel kökeninin ve hücrelerin malignan değişimini tetikleyen genetik mekanizmaların anlaşılması için özellikle moleküler genetik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Transkripsiyon faktörü olarak fonksiyon gören *ELK-1* proteininin miyojenik farklılaşmadaki rolü iyi bilinmektedir. Ancak yaptığımız literatür taramasında *ELK-1* aşırı ekspresyonu ile hematolojik malignansiler arasında ilişki bildiren bir yayına rastlanmamıştır. Yaptığımız çalışmada HL-60, Jurkat, Daudi ve K-562 lösemi hücre hatlarında *ELK-1*'in gen ekspresyonundaki değişimlerin belirlenmesi planlanmıştır. Ayrıca *ELK-1*'in lökomogenezdeki rolünün aydınlatılabilmesi için beraber fonksiyon gördüğü düşünülen diğer genlerin (*BCL10*, *CEBPB*, *MCL1*, *ZC3H12A*, *SRF*) ekspresyon düzeyleri de araştırılmıştır. Proje kapsamında *Elk1* geni ve kodladığı transkripsiyon faktörünün hedefinde olan beş gen bölgesinin ekspresyon düzeyleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle karşılaştırılmıştır. Daudi hücre hattında *ELK-1* ve *SRF* gen ifadesinin arttığı, Jurkat hücre hattında ise sadece *ELK-1* gen ifadesinin arttığı belirlenmiştir. Diğer hücre hatlarında *ELK-1* veya hedefi olabilecek genlerin ifadesinde değişim belirlenmemiştir.

Anahtar kelimeler: *ELK-1*, lösemi, RNA, cDNA, ters transkriptaz PZR, gerçek zamanlı PZR

2015, 61 sayfa

ABSTRACT

MSc. Thesis

DETERMINATION OF ELK-1 AND POSSIBLE TARGETS OF THIS TRANSCRIPTION FACTOR IN LEUKEMIA CELL LINES

Hande AKALAN

Namık Kemal University

Institute of Science

Department of Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN

Acute leukemia is a malignant, clonal, hematopoietic stem cell disorder; comprising numerous clinical and biologic heterogeneities. Every year thousands of people are suffering from acute leukemia's in our country. To understand the cellular origins and several distinct genetic mechanisms that lead to malignant transformation of hematopoietic stem cells, especially research using molecular techniques have become important. Role in myogenic differentiation of ELK-1 protein is well studied but up to our knowledge no research indicated correlation between *ELK-1* over expression and hematologic malignancies. With this project in HL-60, Jurkat, Daudi and K-562 cell lines we aimed to investigate expression of *ELK-1* gene. In addition effects of *ELK-1* over expression on ELK-1 candidate target genes *BCL10*, *CEBPB*, *MCL1*, *ZC3H12A* and *SRF* were investigated. Expression levels of *ELK1* and target genes were determined using real-time PCR analysis. Daudi cell line over Express *ELK-1* and *SRF* and Jurkat cell line over expresses only *ELK-1*. No change in transcription of *ELK-1* or targets were determined in other cell lines.

Key words: *ELK-1*, leukemia, RNA, cDNA, reverse transcriptase PCR, real-time PCR

2015, 61 pages

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ÇİZELGE DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ÖNSÖZ	x
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	4
2.1 Kan Doku	4
2.1.1 İnsan Kanının Bileşimi	4
2.1.1.1 Plazma (serum)	4
2.1.1.2 Alyuvarlar (Eritrositler)	4
2.1.1.3 Akyuvar (Lökositler)	4
2.1.1.4 Trombosit (kan pulcukları)	5
2.2 Hematopoitik Sistem	5
2.3 Hematolojik Malignansiler	7
2.4 Lösemi	7
2.4.1 Akut Lösemiler	8
2.4.1.1 Akut Myeloid Lösemi (AML)	8
2.4.1.2 Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)	9
2.4.2 Kronik Lösemiler	10
2.4.2.1 Kronik Myeloid Lösemi	10
2.4.2.2 Kronik Lenfositik Lösemi (KLL)	13
2.5 Hücre Hatları	13
2.5.1 HL-60 Hücre Hattı (Akut promiyelosit lösemi hücre hattı)	14
2.5.2 K-562 Hücre Hattı (Kronik myeloid lösemi hücre hattı)	15
2.5.3 Daudi Hücre Hattı (Burkitt lenfoma hücre hattı)	16
2.5.4 Jurkat Hücre Hattı (T hücre lösemi hücre hattı)	16
2.6 ETS (E-twenty-six) Transkripsiyon Faktör Ailesi	16
2.7 TCF (Ternari Kompleks Faktör) Ailesi	18
2.8 <i>ELK-1</i> Geni	18
2.9 <i>ELK-1</i> Transkripsiyon Faktörünün Hedefindeki Diğer Genler	20
2.9.1 <i>SRF</i> (Serum Cevap Faktörü) Geni	21
2.9.2 <i>ZC3H12A/MCPIP1</i>	21
2.9.3 <i>MCL1</i> (Myeloid hücre lösemisi-1) Gen Bölgesi	25
2.9.4 <i>CEBPβ</i> Gen Bölgesi	27
2.9.5 <i>BCL10</i> (B-Hücre Lenfoma/Lösemi 10) Gen Bölgesi	28
2.10 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	28
2.11 Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)	29
2.12 Gerçek Zamanlı Kantitatif Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu	30
2.13 Housekeeping Genlerin Gerçek Zamanlı PZR Çalışmalarındaki Önemi	34
2.13.1 GAPDH (Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz)	34
3. MATERYAL VE METOD	36
3.1 Materyal	36
3.1.1 Kullanılan Cihazlar	36
3.1.2 Kullanılan kimyasal maddeler	36

3.1.3 Kullanılan kitler	37
3.1.3.1 Hücreden RNA izolasyon kiti	37
3.1.3.2 Kandan RNA izolasyon kiti	37
3.1.3.3 cDNA reverse transkripsiyon kiti	37
3.1.3.4 Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyon kiti	37
3.1.4 Kullanılan Besiyeri	39
3.1.4.1 RPMI 1640	39
3.1.5 Kullanılan Solüsyonlar	39
3.1.5.1 %70 Etanol	39
3.2 Yöntemler	39
3.2.1 Hücre Kültürü	39
3.2.2 Hücre Sayımı	39
3.2.3 Hücreden RNA İzolasyonu	40
3.2.4 Kandan RNA İzolasyonu	41
3.2.5 Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu	42
3.2.6 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	43
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	45
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	53
6. KAYNAKLAR	55
ÖZGEÇMİŞ	61

Çizelge 2.1: FAB sınıflandırmasına göre AML sınıfları	9
Çizelge 2.2: Dünya Sağlık Örgütü'ne göre KML fazları ve karakteristik özellikleri	12
Çizelge 2.3: LL hücre hatlarının sınıflandırılması	14
Çizelge 3.1: Bir reaksiyon için gereken bileşenler ve miktarları	38
Çizelge 3.2: cDNA reaksiyonu bileşenleri ve miktarları	42
Çizelge 3.3: Isısal döngü cihazının süre ve sıcaklıkları	42
Çizelge 3.4: RT-PZR bileşenleri ve miktarları	43
Çizelge 3.5: Gerçek zamanlı PZR reaksiyon sıcaklık ve süreleri	44
Çizelge 3.6: Mikroplakalara örnek yerleşimi	44
Çizelge 4.1: BCL10, CEBPB, SRF, MCL1 gen bölgelerine ait amplifikasyon eğrileri x: döngü sayısı, y:Rn değeri	47
Çizelge 4.2: ZC3H12A, ELK1, GAPDH gen bölgelerine ait amplifikasyon eğrileri x: döngü sayısı, y:Rn değeri	48
Çizelge 4.3: Kontrol grubu ve hücre hatlarına ait Ct değerleri	50
Çizelge 4.4: Kontrol grubu ve hücre hatlarından elde edilen ortalama Ct değerleri	50
Çizelge 4.5: Kontrol grubu ve hücre hatlarında elde edilen RQ değerleri	51

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1: Hematopoietik sistem	6
Şekil 2.2: 9 nolu kromozom ile 22 nolu kromozom arasındaki karşılıklı translokasyon ve Philedelphia kromozomunun oluşumu.....	11
Şekil 2.3: ETS Transkripsiyon faktör ailesinin alt sınıfları	17
Şekil 2.4. ETS Transkripsiyon faktör ailesinin bütün alt üyeleri hedef gen promotorundaki aynı dizilere bağlanmaktadır	17
Şekil 2.5: SRE dizisi üzerinde oluşan ternari kompleksi	19
Şekil 2.6: ELK-1 Proteinin yapısı	20
Şekil 2.7: ZC3H12A geninin lokalizasyonu ve MCPIP proteini	22
Şekil 2.8: MCPIP1 aktivasyonu	24
Şekil 2.9: MCPIP sinyal yolağı.....	25
Şekil 2.10: MCL1 ile BCL2 arasında dizi benzerliği.....	26
Şekil 2.11: Taq-Man® prob sistemi	30
Şekil 2.12: Taq-Man® prob sistemi ve FRET oluşumu	31
Şekil 2.13: Gerçek zamanlı PZR amplifikasyon eğrisi; Ct= eşik değeri, Cq= eşik değerinin tekabül ettiği	33
Şekil 2.14: Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz	35
Şekil 4.1: HL-60 hücre hattının mikroskopik görüntüsü	45
Şekil 4.2: K-562 hücre hattının mikroskopik görüntüsü	45
Şekil 4.3: Daudi hücre hattının mikroskopik görüntüsü	46
Şekil 4.4: Jurkat hücre hattının mikroskopik görüntüsü	46
Şekil 4.5: Kontrol grubu ve hücre hatlarında elde edilen RQ değerleri bar grafiği.....	51

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Alfa
$^{\circ}\text{C}$: Santigrat
ABL	: Murin lösemi viral onkogen homolog 1
ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi
AML	: Akut Myeloid Lösemi
AMV	: Avian Myeloblastosis Virüs
APL	: Akut Promiyelositik Lösemi
AS-D	: Kloroasetat esteraz
ATP	: Adenozin Trifosfat
BCL	: B hücre lenfoma
BCR	: Break point Cluster Region (Kırılma Bölgesi)
bp	: Baz Çifti
c myc	: Myelocytomatosis viral onkogen
Ca^{+2}	: Kalsiyum
cAMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
CBP	: CREB bağlanma proteini
cDNA	: Komplementer Deoksiribonükleik Asit
CEBP-A	: CAAT/enhancer bağlanma proteini alfa
c-fos	: Hücresel onkogen c-fos
c-jun(AP1)	: Jun protoonkogen
cm^2	: Santimetre kare
CO_2	: Karbondioksit
Cq	: Eşik Değerinin tekabül ettiği siklus
CSF	: Koloni Uyarıcı Faktör
Ct	: Eşik değere ulaşılan siklus
del	: Delesyon
dH ₂ O	: Distile su
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksiribonükleotid trifosfat
dTTP	: Deositimidin Trifosfat
dUTP	: Deoksiuridin Trifosfat
EAC	: Eritrosit Antikor ve Komplementerleri ile ilişkili
EBNA	: EBV nükleer antijen
EBV	: Epstein Barr Virüs
<i>ELK-1</i>	: ETS benzeri transkripsiyon faktörü
ER	: Endoplazmik Retikulum
ERK	: Ekstraselüler Sinyal Düzenleyici Kinaz
EtOH	: Etanol
FAB	: French-American-English (Fransız- Amerikan- İngiliz)
FBS	: Fetal Sığır Serum
Fc	: Kristalize parça
FRET	: Floresan Rezonans Enerji Transferi
GAPDH	: Glutaraldehyt fosfat Dehidrogenaz
GC	: Guanin Sitozin
GRP78	: Guanin Nükleotid saran 78
HAT	: Histon Asetil Transferaz
HSP40	: Isı Şoku Proteini 40

HSR	: Homojen boyanma bölgesi
IEG	: Immediately Early Gene (erken cevap geni)
IL	: İnterlökin
IRE1 α	: İnozitol Bağımlı element 1 alfa
ITD	: İnternal Tandem Duplikasyonu
JNK	: c- Jun N- terminal Kinaz
kb	: Kilo Baz
KCl	: Potasyum Klorür
kDa	: Kilo Dalton
KLL	: Kronik Lenfositik Lösemi
KML	: Kronik Myeloid Lösemi
LL	: Lenfoma Lösemi
LPS	: Lipopolisakkarit İndükleyen Promotor
MAPK	: Mitojen Aktif Protein Kinaz
MCP-1	: Monosit Kemoatraktan Protein-1
MCPIP1	: Monosit kemotaktik protein-1-kaynaklı protein-1
MEK	: Mitojenle aktive edilmiş protein kinaz
Mg ⁺²	: Magnezyum
MGB	: Minor Grove Binding (Küçük Oluğa Bağlanma)
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
mm ³	: Milimetre küp
MMLV	: Moloney Mürin Lösemi Virüsü
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit
NAD	: Nikotin Amid Dinükleotid
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NES	: Nükleer Eksport Sinyali
NFQ	: Floresan olmayan boya
Nf κ B	: Nükleer Faktör kappa beta
NK	: Naturel Killer (Doğal Öldürücü hücre)
NLS	: Nükleer Lokalizasyon Sinyali
nM	: Nano Molar
nt	: Nükleotit
PARP	: poly ADP Riboz Polimeraz
PDI	: Disülfid İzomeraz
pH	: Bir sıvının asit veya bazlık derecesi
PMA	: Forbol 12-miristat 13-asetat
PML	: Promyelositik Lösemi
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Raf	: Proto-onkogen, serin /treonin protein kinaz
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
rpm	: Dakikada ki devir sayısı
RPMI 1640	: Roswell Park Memorial Enstitü besiyeri 1640
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmi
SRE	: Serum Cevap Elementi
SRF	: Serum Cevap Faktörü
Sumo	: Sumoilasyon
TCF	: Ternari Kompleks Faktörü
Tm	: Erime Sıcaklığı

TNF α	: Tumor Nekroz Faktörü alfa
TPA	: 12-O-tetradekanoilforbol-13-asetat
μ M	: Mikro Molar
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
ZC3H12A	: Çinko parmak CCCH domain içeren protein 12A
β - Me	: Beta Merkaptoetanol
β	: Beta

ÖNSÖZ

Tez çalışmam ve yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benden esirgemeyen, eğitimimin her aşamasında gösterdiği sabır ve değerli katkılarından dolayı sayın danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Duygu YAŞAR ŞİRİN'e;

Tez çalışmam dışında farklı çalışmalarda yer almamı sağlayan, emeğini hiçbir zaman esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Cenk ARAL'a;

Kendileri ile çalışabilme şansını yakalamış olmaktan onur duyduğum sayın hocalarım Doç. Dr. Rıfat BİRCAN, Yrd. Doç. Dr. Deniz ŞİRİN, Doç. Dr. Türker BİLGİN'e ve diğer tüm Biyoloji A.D. mensuplarına;

Değerli çalışma arkadaşlarım; Gürkan AKYILDIZ, Serdar FINDIK, Esra ULU ve Aysel EREN'e;

Tez çalışmamda kullandığım hücre hatlarının temin edilmesinde yardımcı olan Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi sayın Yrd. Doç. Dr. Mehtap KILIÇ EREN'e;

Hayatımın her anında destek ve sevgileri ile yanımda olan annem Nejla AKALAN, babam Hayri AKALAN ve kardeşim Emir Can AKALAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Şubat 2015

Hande Akalan

Biyolog

1. GİRİŞ

Her yıl ülkemizde yaklaşık 150000 erişkin kanser olgusu ve 0-14 yaş grubunda 2500-3000 kanser olgusu gözlenmektedir (Kutluk 2010). T.C. Sağlık Bakanlığı, 2009-2015 yılı kanserle savaş dairesi başkanlığı ulusal kanser programı verilerine göre 2005 yılında Türkiye’de kemik iliği kanserlerinin görülme sıklığı 6,63 / 35 ile sekizinci sırada yer almaktadır (Tuncer 2009-2015). Kemik iliği kanserlerinden akut lösemnin iki ana tipi bulunmaktadır. Bunlar Akut Myeloid Lösemi (AML) ve Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) olarak adlandırılmaktadır. AML erişkinlerde en çok rastlanan akut lösemi türüdür (Grimwade 2001). ALL ise en sık karşılaşılan ve genetik olarak en iyi karakterize edilmiş çocukluk çağı tümörleridir (Mullighan 2010). Hematolojik malignansilere genellikle tekrarlayan anöploidide veya hematopoitik transkripsiyon faktörü ve tirozin kinaz fonksiyonunda düzensizliğe neden olan kromozomal yeniden düzenlenmeler neden olmaktadır (Grimwade 2001, Mullighan 2010). Bu kromozomal değişimler lökomogenezin başlamasında önemli bir yere sahiptir ve tedavi protokolü olguda saptanan kromozomal anomaliye göre düzenlenmektedir. Akut lösemnin hücresel kökenini ve hematopoitik kök hücrenin malignant değişimini tetikleyen genetik mekanizmaları anlamaya yönelik sitogenetik, FISH ve moleküler tekniklerin kullanıldığı birçok çalışma yapılmış, birçok çalışmada da lösemi hücre hatları model olarak kullanılmıştır (Kearney ve Horsley 2005, Calasanz ve Cigudosa 2008).

Yaşar D. ve arkadaşlarının ALL ve AML olguları ile yaptığı çalışmada Ets-like transcription factor-1 (*ELK-1*) onkogeninin duplikasyonu hem ALL hemde AML olgularında oaKGH (oligoarray karşılaştırmalı genomik hibridizasyon) tekniği ile belirlenmiştir (Yasar ve ark. 2010). *ELK-1*; bir ETS onkogen süperailisi üyesidir. Kromozomal lokalizasyonu Xp11.2 olan *ELK-1* geni ilk defa 1989’da tanımlanmıştır. ELK-1 proteini doku özgüllüğü göstermeyen bir transkripsiyon faktörüdür (Cohen-Armon 2007). ELK-1 Immediate Early Gene (IEG)’lerin transkripsiyonunu sağlamaktadır (Hao ve ark. 2011). Yapılan çalışmalar büyüme faktörü tarafından düzenlenen IEG promotorlarında ELK-1’in Serum Cevap Elementi (SRE) olarak adlandırılan DNA dizisine bağlandığını ve E Twenty Six (ETS) domain içeren transkripsiyon faktörü ve Serum Cevap Faktörü (SRF)’nü içeren yapı ile birlikte serum ile indüklenen ternari protein kompleksini oluşturduğunu göstermiştir (Schmeier ve ark. 2009).

Tanımlanmış yaklaşık 40 hücresel IEG bulunmaktadır ve bunlar arasında en iyi karakterize edilmiş olanlar *c-fos*, *c-myc* ve *c-jun*'dur (Schmeier ve ark. 2009, Jin ve ark. 2013). ELK-1 transkripsiyon faktörünün hedef genleri arasında; RNaz aktivitesi gösteren ve inflamasyonda fonksiyon gören, MCPIP proteinini kodlayan *ZC3H12A* geni (Kasza 2013), BCL-2 ailesi üyesi bir anti apoptotik protein kodlayan *MCL-1* geni ve NFkB yoluyla hücrenin apoptoza uğramasında fonksiyon gören *BCL-10* geni sayılabilir (Boros ve ark. 2009).

ELK-1 proteini transkripsiyonel aktivitesi MAPK (Mitojen Aktif Protein Kinaz) tarafından sağlanmaktadır (Cohen-Armon 2007). MAPK sinyal yolu B hücre gelişiminde düzenleyici rol oynayan temel yollardan birisidir ve fosforillenerek aktive olan MAPK, ELK-1'i fosforilleyerek aktive etmektedir (De Alvaro ve ark. 2008). AML hastalarında p-MAPK1/2'nin sağ kalımla ilgili bağımsız bir prognostik faktör olabileceği daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (Gregorj ve Maria 2007). CEBP'ler CREB super ailesi üyesi transkripsiyon faktörleridir ve enerji metabolizması, yağ depolanması, doku farklılaşması, hematopoez, immün cevap, antibakteriyel savunma ve diş üreme döngüsü gibi birçok biyolojik süreçte fonksiyon göstermektedir (Akasaka ve ark. 2007, Gade ve ark. 2008). Yapılan bir çalışma CEBPβ'nin Akut Promiyelositik Lösemi (APL) hücre farklılaşmasında kritik rol oynadığını göstermiştir (Zhang ve ark. 2010). Myeloid ve lenfoid lökomogenezin baskılanmasında rol oynayan CEBPβ proteini MAPK yolağında ELK-1 ile ilişkiye giren aday bir proteindir (Akasaka ve ark. 2007, Gade ve ark. 2008). MAPK sinyal yolağındaki aksamalar hematolojik malignansiler de dahil olmak üzere birçok kanser tipinde sayısız çalışma ile bildirilmiştir (McCormick 2011, Sugiura ve ark. 2011, Totoń 2011) . Bu sinyal yolağı sonunda aktive olan transkripsiyon faktörleri ile kanser progresyonu ve prognozu ilişkisi tanımlanmıştır (Rodriguez-Berriguete ve ark. 2010, Schmitt ve ark. 2010). ELK-1 transkripsiyon faktörü aktivitesi özellikle solid tümörlerde araştırılmış ve hücre proliferasyonunu arttırdığı hatta kemoterapötik ile indüklenen apoptoza karşı direnç sağladığı gösterilmiştir (Rodriguez-Berriguete ve ark. 2010, Schmitt ve ark. 2010, Shukla AA 2010, Zhang ve ark. 2011) . Ayrıca Ng ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada MLL-AF4 ailesi füzyon onkoproteinlerin ELK-1'i aktive ederek ERK sinyal yolu üzerinden MLL yeniden düzenlenmesi taşıyan lösemilerin patogenezinde rol oynadığını göstermiştir (Ng ve ark. 2010). Ancak yaptığımız literatür taramalarında akut lösemi patogenezi ve/veya prognozu ile ELK-1 aktivitesi arasındaki ilişki bildiren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle, *ELK-1* geni ve lösemi patogenezi ilişkisinin araştırıldığı bu projede insan myeloid hücre hattı HL-60, insan kronik myeloid lösemi hücre hattı K-562, Burkitt lenfoma hücre hattı Daudi ve T hücre lösemi hücre hattı Jurkat hücrelerinde *ELK1* ve kodladığı transkripsiyon faktörü için

hedef olabilecek *ZC3H12A*, *MCL1*, *BCL10*, *CEBPB* ve *SRF* genlerinin ifadesindeki değişimler araştırılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Kan Doku

Kan doku, damar ağının içinde dolaşan akıcı plazma (serum) ve hücrelerden meydana gelmektedir. Hücreler; alyuvarlar (eritrosit), akyuvarlar (lökositler) ve trombositler (kan pulcukları) olarak sınıflandırılmaktadır. Plazmada ise; elektrolitler, proteinler, metabolitler, vitaminler, hormonlar ve eser miktarda çeşitli kimyasal maddeler bulunmaktadır (Berkarda 2003). Kan dokunun temel işlevi; besin maddelerinin (oksijen, glikoz) ve yapısal elemanların taşınması, atık maddelerin (karbondioksit, laktik asit vb.) atılmasının sağlanması ve organizmada homeostazinin sağlanmasıdır (Anonim 2015).

2.1.1. İnsan Kanının Bileşimi

2.1.1.1. Plazma (serum): Kan hücreleri dışında kalan sıvı kısımdır. Plazmanın %90- 92'si su, geri kalan kısmı ise organik ve inorganik maddelerden oluşmaktadır. Organik ve inorganik maddelerin bulunduğu bu kısımda; aminoasitler, yağlar, karbohidratlar, hormonlar, üre, ürik asit, enzimler, antikorlar, sodyum, potasyum, iyot vb. elementler bulunmaktadır. Albumin, globulin ve fibrinojen plazmanın temel proteinleridir.

2.1.1.2. Alyuvarlar (Eritrositler): Kanda sayıca en fazla olan hücrelerdir. Ortalama 10 mikron çapında tavla puluna benzeyen diskler şeklindedir. Eritrositler; çekirdek içermeyen, oksijen taşıyıcı protein olan hemoglobin içeren kan hücreleridir. Temel işlevi oksijen ve karbondioksit taşımaktır. Eritrositler hemoglobin aracılığıyla asit baz dengesinin düzenlenmesini sağlar ve hücre zarlarında bulunan antijenler (aglutinojenler) kan grubunu belirler. Eritrositlerin 1mm³ kandaki sayısı erişkin bir erkekte 4,5-6 milyon, erişkin bir kadında ise 4-5 milyon arasındadır.

2.1.1.3. Akyuvar (Lökositler): 10-20 mikron çapına sahip olan akyuvarlar, alyuvarlardan daha büyük olup çekirdekli hücrelerdir. 1mm³ kanda 4000-10000 akyuvar bulunur. Akyuvarlar çeşitli yollarla vücuda giren mikroorganizmaları, ölü doku atıklarını, yabancı partikülleri ya fagosite ederek ya da ürettikleri antikorlarla ve duyarlı lenfositlerle harap ederek ortadan kaldırmaktadır.

Akyuvarlar sitoplazmalarında granül bulunup bulunmamasına göre; granülosit (polimorfonükleer lökosit) ve agranülosit (mononükleer lökosit) olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Granülositler aralarında; nötrofil, bazofil ve eozinofil olmak üzere üç kısma ayrılır. Agranülositler ise lenfosit ve monosit olmak üzere iki kısma ayrılır.

Lenfosit hücreleri; B lenfositler, T lenfositler ve doğal öldürücü hücreler [natural killer (NK)] olmak üzere 3 gruba ayrılmaktadır:

- 1) B lenfositler: Humoral immün yanıtta yani antikor oluşumundan sorumludurlar.
- 2) T lenfositler: Özellikle bakteri ve virüs infeksiyonlarında immün cevabı sağlar. Ayrıca tümör hücrelerinin eliminasyonunda görev almaktadır.
- 3) Doğal öldürücü [natural killer (NK)] hücreler: Virüsler tarafından enfekte edilmiş vücut hücrelerine ve kanser hücrelerine saldırırlar. Fagositik değildirler. Saldırdıkları hücrenin zar yapısını zayıflatarak hücrenin içerisine su ve iyonların girişini sağlarlar. Bu şekilde osmotik dengesi bozulan hücrelerin dokudan eliminasyonu gerçekleşmektedir (Anonim 2014c, a, 2015).

2.1.1.4. Trombosit (kan pulcukları): Çapları 1-2 mikron olan trombositler kanın en küçük hücreleridir. Her mm³ kanda 150000-300000 civarında bulunan kan pulcukları renksiz olup kanın pıhtılaşmasında rol alırlar.

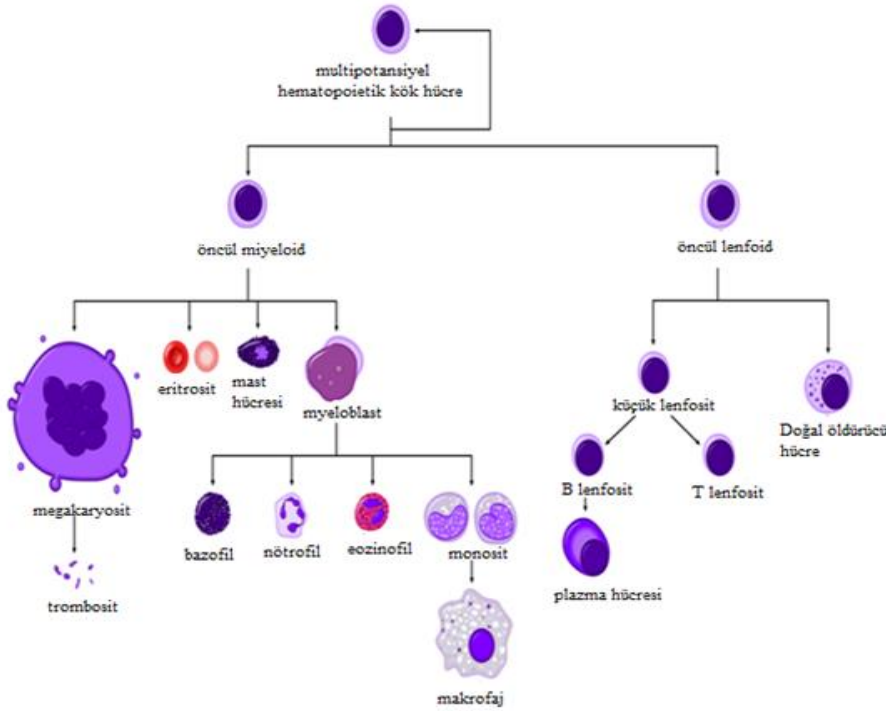
2.2. Hematopoietik Sistem

Kan hücreleri bireyin yaşına göre vücudun farklı yerlerinde yapılır. Embriyonda kan yapımı ilk iki ay kan adacıkları olarak adlandırılan vitellus kesesinde yapılır. Oluşan hücreler megaloblastiktir. Üç, dört ve beşinci aylarda ise karaciğer, dalak ve timusta kan hücreleri üretilir ve bu sırada miyeloblast hücreleri de yapılmaya başlar. Altıncı aydan itibaren esas hematopoietik organ olan kemik iliğinden kan hücreleri üretilmeye başlanır (Fernández ve Alarcón 2013).

Hematopoietik kök hücreleri de kemik iliğinde üretilmektedir. Kemik iliğinde bulunan hücrelerin %1-3'ü kadar olup yüzeylerinde CD 34 (Cluster of Differentiation: CD) antijeni taşırlar. CD 34 antijeni hücre yüzey glikoproteini olup hücre-hücre adezyon molekülü olarak görev alırlar (Blom ve Spits 2006). Kök hücreler hem bölünerek yeni kök hücreler oluşturmakta hem de farklılaşarak kan hücrelerini meydana getirmektedir.

Tüm hematopoietik hücreler bir pluripotent kök hücreden köken alır ve multipotent özelliktedir (Spits 2002). Hematopoietik hücreler olgun kan hücrelerine birçok ara hücre tipinden geçerek farklılaşmaktadır. Bu farklılaşma; fibroblastlar, endotel hücreleri ve

makrofajlar tarafından oluşturulan hematopoietik büyüme faktörlerinin yardımıyla gerçekleşmektedir. Farklılaşan bu kan hücrelerinin bir kısmı öncül myeloid bir kısımda öncül lenfoid hücre serilerine dönüşür. Myeloid öncül hücreler kemik iliğinde gelişerek koloni uyaran faktörler (CSF), interlökin 3 ve eritropoetin (EPO) büyüme faktörleri yardımıyla monosit ve eritrosit hücrelerine, trombopoetin, interlökin-6, interlökin-11 yardımıyla da megakaryosit ve trombosit hücrelerine dönüşür (Blom ve Spits 2006). Multipotansiyel hematopoietik kök hücrelerden hematopoietik sistem hücrelerinin oluşumu Şekil 2.1’de şematize edilmiştir. Fetal dönemde lenfoid hücreler kemik iliğinden lenf düğümleri, dalak ve timusa göç ederek lenfositlere farklılaşır. T lenfositler IL-7R α büyüme faktörü tarafından uyarılarak farklılaşırken B lenfositlerin farklılaşmasında IL-2, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, interferon- α , β görev almaktadır. (Spits 2002, Beyaz 2004).



Şekil 2.1. Hematopoietik sistem (Anonim 2014d)

2.3. Hematolojik Malignansiler

Hematolojik sistem elemanlarında meydana gelen malign hücre çoğalmasına hematolojik malignansi adı verilmektedir. Hematolojik maligniteler çeşitli formları ile lösemi, lenfoma ve myelomları meydana getirmektedir. Kan dokusunda homeostazın sağlanması için multipotent hematopoietik kök hücrelerin kendini eşlemesi, farklılaşması, apoptozu ve hücre göçü; intrinsik ve ekstrinsik sinyal yolları ile kontrol altına alınmıştır. Bu sinyal yollarında birçok sitokin, büyüme faktörü, transkripsiyon faktörü, kromatin modelinin değişiminde rol oynayan faktörler ve hücre döngüsünü düzenleyen moleküller fonksiyon görmektedir (Spits 2002, Blom ve Spits 2006). Bu sinyal yollarında ortaya çıkan aberasyonlar hematolojik malignansilere neden olabilmektedir. Sıklıkla gözlenen hematolojik malignansilerden biriside lösemidir.

2.4. Lösemi

Lösemiler hematopoetik sistemden kaynağını alan, klonal, neoplazik kan hastalıkları olarak tanımlanabilir (Turgeon M 1999). Kan kanseri olarak bilinen lösemi; kan hücrelerinin özellikle lenfositlerin sayısında meydana gelen artış ile oluşan malign bir hastalıktır. Çok fazla sayıda çoğalan fakat farklılaşmamış olan lökositler çeşitli hematopoietik organlara, deriye, testislere, merkezi sinir sistemine istila ederek, periferik kanda birikir. Lökosit sayısının fazla olmasına rağmen farklılaşmadıklarından işlev yapan hücre sayısı azalarak anemi, nötropeni, trombositopeni oluşmaktadır. Tam olarak farklılaşmayan bu hücrelere *blast* adı verilmektedir. Lösemi, kök hücre durumundan farklılaşma aşamasına kadar herhangi bir basamakta meydana gelebilir. Lösemik dönüşüm temelde mutasyon sonucu meydana gelmektedir. Oluşan bu mutasyonlar organizma tarafından çeşitli yollarla elimine edilirken, az sayıda hücre çok fazla üreme özelliği kazanabilir. Böylece aşırı çoğalan lökositler lösemiye sebep olmaktadır. Lösemi oluşumunda mutasyonların yanı sıra çevresel ve kalıtsal etkenler de oldukça etkilidir.

Lösemiler, köken aldıkları hücre grubuna, ortaya çıkış ve ilerleme hızlarına göre sınıflandırılır. Lösemiler ortaya çıkış hızlarına göre akut ve kronik olmak üzere sınıflandırılırken köken aldıkları hücre gruplarına göre de ikişer alt sınıfa ayrılmaktadır. Bu alt sınıflar;

1. Akut Lösemiler
 - a. Akut Myeloid Lösemi (AML)
 - b. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)

2. Kronik Lösemiler

- a. Kronik Myeloid Lösemi (KML)
- b. Kronik Lenfositik Lösemi (KLL)

2.4.1. Akut Lösemiler

Akut; kelime anlamı olarak hızlı başlayan demektir. Hastalık kemik iliği ve içerisinde bulunduğu kan dokuda iri, olgunlaşmamış, anormal hücreler ile karakterize edilir.

2.4.1.1. Akut Myeloid Lösemi (AML)

Akut myeloid lösemi; beyaz kan hücrelerinin kemik iliğinde hızla çoğalıp birikmesi ile karakterizedir. Akut myeloid lösemide; trombositlerin, normal beyaz kan hücrelerinin ve kırmızı kan hücrelerinin sayısında azalma meydana gelmektedir. Trombositlerin sayısındaki azalma vücutta morarmalara, kırmızı kan hücrelerinin azalması nefes darlığına sebep olurken normal beyaz kan hücrelerinin sayısındaki azalma enfeksiyon riskini arttırmaktadır. AML genellikle yetişkinlerde görülmekte olup görülme sıklığı yaşla birlikte artar. AML'nin kesin tanısı için kemik iliği aspirasyonu ve biyopsi gerekmektedir. Kan ve kemik iliğinden alınan örneklerle konvensiyonel sitogenetik ve floresan *in situ* hibridizasyon yöntemi uygulanarak sitogenetik anamoliler tayin edilirken bu hücrelere sudan siyah, miyeloperoksidaz veya spesifik olmayan esteraz boyaları uygulanarak AML'nin alt sınıfları belirlenir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kurallarına göre AML'nin tanısı için kemik iliği veya periferik kanda lösemik myeloblastların sayısının toplam hücre sayısına oranı % 20 olması gerekirken French-America-British (FAB) kurallarına göre bu oran % 30 olarak belirlenmiştir (Yin ve ark. 2010).

FAB sınıflandırmasına göre; AML sınıflarını morfolojik, sitokimyasal, histokimyasal özelliklere göre alt gruplara ayırmaktadır (Vardiman ve ark. 2002). FAB'a göre AML sınıfları çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. FAB sınıflandırmasına göre AML sınıfları

AML M0	Akut miyeloblastik lösemi (minimal farklılaşmış)
AML M1	Akut miyeloblastik lösemi (farklılaşma yok)
AML M2	Akut miyeloblastik lösemi (farklılaşma oluşmuş)
AML M3	Akut promiyelositik lösemi (2 alt tipi vardır)
AML APL	Hipergranüler akut promiyelositik lösemi
AML APL-V	Mikrogranüler akut promiyelositik lösemi
AML M4	Akut miyelomonositik lösemi
AML-M4Eo	Artmış eozinofili ile seyreden AMMoL
AML M5	Akut monositik lösemi
AML M5a	Akut monoblastik lösemi (hafif farklılaşmış)
AML M5b	Akut monositik lösemi (farklılaşmış)
AML M6	Eritrolösemi
AML M7	Akut megakaryoblastik lösemi

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflandırması ise morfolojik, genetik ve klinik bilgiye dayanmaktadır (Vardiman ve ark. 2002).

AML’de en çok görülen kromozomal değişiklikler, M3 tipi olan promiyelositik lösemi (PML)’ye özgü olan (15;17) translokasyonu, M2 tipinde görülen (8;21) translokasyonu, eozinofili ile karakterize M4 tipinde (16) inversiyonu, M5’a tipindeki (8;16) translokasyonudur (Ghanem ve ark. 2012).

2.4.1.2. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)

Genellikle tümör kitleleri oluşturmayan ALL, başta kemik iliği olmak üzere birçok orguda karaciğer, dalak ve lenf nodları gibi diğer organlarda yayılım gösterebilmektedir. Bu nedenle ALL’nin alt tiplerinin belirlenmesinde hasta yaşı ve laboratuvar testlerinin sonuçlarının temel alındığı birden fazla sınıflandırma bulunmaktadır.

French-America-British (FAB) sınıflandırılması; Fransız, Amerikan ve İngiliz doktorlarından oluşan konsorsiyumun yaptığı sınıflandırma lösemi hücrelerinin rutin hematoksilen-eozin boyamalarından sonra mikroskop altındaki görünümünü temel almaktadır. Sadece akut lösemilerin sınıflandırılmasında kullanılmaktadır. FAB’a göre ALL tipleri:

ALL-L1: Mikroskopta küçük, aynı tipte ve düzgün (uniform) hücreler şeklinde gözlenmektedir. Erişkin ALL olgularının yaklaşık % 30'u, pediatrik ALL olgularının ise yaklaşık % 85'i bu gruba dahil edilmektedir. İmmünojenik fenotipleri T-hücre ya da pre-B-hücre olabilmektedir.

ALL-L2: Mikroskopta büyük ve çeşitli tiplerde hücreler şeklinde gözlenmektedir. Erişkin ALL olgularının yaklaşık % 65'i, pediatrik ALL olgularının ise %14'ü bu gruba dahil edilmektedir. İmmünojenik fenotipleri T-hücre veya pre-B-hücre olabilmektedir.

ALL-L3: Mikroskop altında vakuolleri olan büyük ve çeşitli tiplerde hücreler şeklinde gözlenmektedir. Erişkin ALL olgularının yaklaşık %5'i, pediatrik ALL olgularının ise yaklaşık %1'i bu gruba dahil edilmektedir. İmmünojenik fenotipleri B-hücre olarak belirtilmektedir.

İmmünojenotip temelli sınıflandırma; lenfositin B veya T hücre olması ve bu hücrenin farklılaşmanın hangi evresinde olduğu temeline dayanarak yapılan bu sınıflandırmaya göre ALL alt tipleri belirlenmiştir.

B-hücre ALL: ALL olgularının yaklaşık %10'u erken pre-B ALL (pro-B ALL olarak adlandırılır), %50'si yaygın B-hücreli ALL, %4'lük kısmı ise mature B-hücre ALL (Burkitt lösemi olarak adlandırılır) olarak sınıflandırılmaktadır.

T-hücre ALL: ALL tanısı olan olguların yaklaşık %5-10'u pre-T ALL ve yaklaşık %15-20'si mature T-hücre ALL alt grubunda yer almaktadır.

ALL hastalarında çok sayıda kromozom translokasyonu görülmektedir. Bunların içerisinde (4;11), (8;14), (1;19) ve (9;22) en önemli kromozom translokasyonlarıdır. Ayrıca 7p, 17p, 12p, 13q delesyonları ve 8 ve 21 numaralı kromozomların trizomisi sıklıkla rastlanan kromozomal anomolilerdir. ALL'de çocuklarda en sık gözlenen translokasyon TEL-AML genleri arasında gerçekleşen (12;21) translokasyonu iken yetişkinlerde BCR-ABL genleri arasında gerçekleşen (9;22) translokasyonudur (Bloomfield ve ark. 1981).

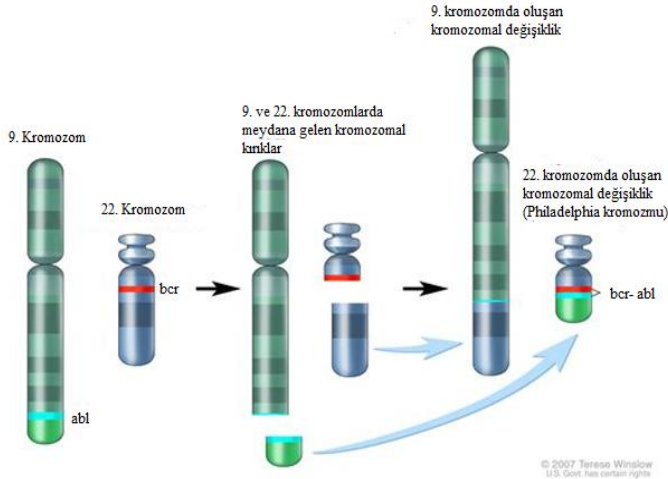
2.4.2. Kronik Lösemiler

Olgun lenfositler gibi görünmelerine rağmen vücudu savunamazlar. Bu hücreler kemik iliğinden çok fazla miktarda üretilirler. Erişkinlerde görülen bu hastalık, yavaş gelişerek ilerlerler.

2.4.2.1. Kronik Myeloid Lösemi

Kronik miyeloid lösemi, kemik iliğinde olgun granüositlerin (nötrofiller, eozinofiller, bazofiller) ve bunların öncül hücrelerinin sayısında artışın meydana geldiği myeloprolatif bir hastalıktır. Kronik Myeloid Lösemi (KML), kronik granüositik lösemi olarak adlandırılır. KML; kemik iliğinde myeloid hücrelerinin aşırı çoğalması ve kanda birikmesi ile karakterize edilmektedir. Genellikle 30-60 yaş aralığında görülmektedir. İnsanlarda bulunan malignasiler

arasında ilk spesifik kromozomal anomali ile ilişkilendirilen lösemi çeşitidir. KML hastalarında görülen (100 hastanın 95'inde) bu anomali Phidelpia kromozomu (Ph) olarak adlandırılmaktadır. Phidelpia kromozomu; 9. kromozom üzerinde bulunan ABL (Abelson) protoonkogeninin ve 22. kromozom üzerinde bulunan BCR (Break point cluster region-kırılma bölgesi) geninin translokasyonu sonucu oluşmaktadır (Şekil 2.2.). Füzyon sonucu BCR-ABL kimerik geni oluşur. Bu genin ürünü 210 kDa ağırlığında bir füzyon protein olup lösemili hücrelerin büyümesini ve çoğalmasını uyarmaktadır. Phidelpia kromozomu dışında kronik myeloid lösemide yaygın olarak; 8, 17, 19, 20 ve 21 kromozomlarında trizomi, 17q'de izokromozom ve 7. kromozomda monozomi kromozomal düzensizlikleri bulunmaktadır (Özbey 2006).



Şekil 2.2. 9 nolu kromozom ile 22 nolu kromozom arasındaki karşılıklı translokasyon ve Philedelpia kromozomunun oluşumu (Anonim)

KML; kan ve kemik iliğinde bulunan olgunlaşmamış hücrelerin (miyeloblastlar) sayısına göre kronik faz, hızlanmış faz ve blastik faz olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır. Bu üç fazın farklı sınıflandırmaları bulunmakta olup bunların içerisinde en sık kullanılan Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) göre yapılan sınıflandırma çizelge 2.2.'de gösterilmiştir (Vardiman ve ark. 2002).

Çizelge 2.2. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre KML fazları ve karakteristik özellikleri (Vardiman ve ark. 2002)

Kronik Faz	Hızlanmış Faz	Blastik Faz
Çevresel kan lökositlerin ve çekirdekli kemik iliği hücrelerinin < %10'unun blast olması	Çevresel kan lökositleri ve çekirdekli kemik iliği hücrelerinin %10-19'unun blast olması	Çevresel kan lökositlerin ve çekirdekli kemik iliği hücrelerinin %20'sinin blast olması
Çevresel kandaki bazofillerin < %20 olması	Çevresel kandaki bazofillerin ≥ 20 olması	Kemik iliği dışı (ekstramedüller) blastik proliferasyon
	Tedavi ile ilişkisiz kalıcı trombositopeni ($< 100.000/\text{mm}^3$) veya tedaviye yanıtızsız kalıcı trombositoz ($> 1.000.000/\text{mm}^3$)	Kemik iliği biyopsisinde gruplar halinde blastların olması
	Tedaviye yanıt vermeyen lökosit sayısında artış ve dalakta giderek büyüme	
	Sitogenetik olarak klonal dönüşüm	

2.4.2.2. Kronik Lenfositik Lösemi (KLL)

Kronik lenfositik lösemi; kemik iliğinde olgun lenfosit hücrelerinin aşırı üretimi sonucu kanda birikmeleri ve lenfositlerin fonksiyonlarını yerine getirememeleri ile karakterize olan lösemi çeşididir. En sık görülen lösemi olup 65-70 yaşları arasında gözlenmektedir. Seyri yavaş ilerleyen bu hastalığın tanısı için hastadan alınan kan örneğinde B lenfosit sayısının $5000/\text{mm}^3$ 'ten fazla olması gerekmektedir. Ayrıca KLL olgularında trizomi 12, 14 ve 11q, 17q, 13q delesyonları çok sık görülmektedir (Dohner ve ark. 2000).

Lösemi ve lenfomalar ile yapılan çalışmalarda hastalık için model olabileceği düşünülen çeşitli hücre hatları kullanılmamaktadır. Yaptığımız çalışmada HL-60, K562, Daudi ve Jurkat hücre hatları kullanılmıştır.

2.5. Hücre Hatları

Hücre hattı; hücrelerin sürekliliğinin sağlanması demektir. Organizmalardan bağımsız olarak hücre populasyonları üzerinde deney yapılması anlamına gelen hücre kültürü çalışmaları için hücre hatları büyük önem taşımaktadır. İnsan Burkitt lenfoması kökenli, süspansiyon tip olan ilk hematopoietik hücre hattını Nijerya Ibadan Üniversitesinden Pulvertaft kurmuştur (Drexler ve ark. 2000). Süspansiyon hücreler besleyici besiyerinde tek başına ya da kümeler halinde yüzerler. Lenfoma lösemi (LL) hücre hatları; monoklonal kökenlidir, kültür içinde sürekli çoğalırlar, uzun süre kültüre kaldıklarında genetik değişiklikler meydana gelebilmektedir. LL hücre hatları; hasta tanısına göre veya spesifik hücrelerinin immünojik durumuna, spesifik sitogenetik aberasyonlara, fonksiyonel karakterizasyonuna göre sınıflandırılır. Genellikle sınıflandırmada kullanılan yöntem normal hematopoietik hücre soylarının fiziksel spektrumuna dayalıdır. Lenfoma lösemi hücre hatlarının sınıflandırılması Çizelge 2.3.'de verilmiştir.

Çizelge 2.3 LL hücre hatlarının sınıflandırılması (Drexler ve ark. 2000)

Hücre Tipi	Fiziksel Hücre Kökeni	Hücre Hattının Tipi ve Alt tipi
Lenfoid	B Hücre	Öncül B hücre hattı Olgun B hücre hattı Plazma hücre hattı
	T Hücre	Olgunlaşmamış T hücre hattı Olgun T hücre hattı
Myeloid	NK Hücre	NK hücre hattı
	Myelositik	Myelositik hücre hattı
	Monositik	Monositik hücre hattı
	Eritrositik	Eritrositik hücre hattı
	Megakaryositik	Megakaryositik hücre hattı

2.5.1. HL-60 Hücre Hattı (Akut promiyelosit lösemi hücre hattı)

İnsan myeloid hücre hattı HL-60, Collins ve çalışma arkadaşları tarafından; akut promiyelositik lösemi hastası olan 36 yaşında, beyaz ırklı bir kadının periferik kanından elde edilmiştir (Anonim 2014h). Myeloblast morfolojik özellikte olan bu hücreler belirgin azurofilik granüller taşımaktadır. HL-60 hücrelerinin iki katına çıkma süreleri 48-72 saat arasına tekabül etmektedir. Tümörojenik yapıda olan bu hücreler N-RAS, p53, ve c-myc onkogen mutasyonlarını taşımaktadır. HL-60 hücrelerinde birçok farklı sitogenetik aberasyon gözlenmektedir. Karyotipinde baskın olarak; 45,X, -5, -8, -16, -X, + A grup markerları, + akrosentrik D grubu markerları ve submetasentrik D grubu markerları bulunmaktadır. Bu hücreler Fc-IgG1 ve C3b reseptörlerine ve aynı zamanda kemotaktik tripeptid formil-metionil-leusil-fenilalanin ve insülin için reseptörlere sahiptir. HL-60 hücreleri; HLA-A1/8, B17 antijenlerini taşır. Yüzeylerinde immünoglobulin, Epstein barr virüs (EBV) ile ilişki kuran antijenleri taşımamaktadır. HL-60 hücrelerinin %5'i eritrositlerle ilişki kuran antikor (EA) veya antikor ve komplementeri (EAC) ile kaplıdır. İn vitro ortamda HL-60 hücrelerinin koloni uyarım faktörü (CSF) ile koloni oluşturması sağlanabilmektedir. HL-60 hücreleri CSF yokluğunda %3,5 oranında promiyelosit kolonilerini oluşturma özelliğindedir. Ortama CSF eklenmesiyle beraber 2-3 kat oranında koloni sayısı artmaktadır. HL-60 hücrelerinde yapılan

araştırmalarda CSF'nin homojen hücre populasyonu oluşumunu sağladığı gösterilmiştir. %1 dimetil sülfoksit (DMSO) ile muame edildiğinde promyelositik evrede olan hücreler granülosit evreye farklılaşır. Forbal estere (PMA, TPA) maruz kaldıklarında monositoid karakterine dönüşerek azurofilik granüllerini kaybederler ve pseudopodia görünümde selebriform çekirdeğine sahip gibi görünürler. HL-60 hücreleri fagositik aktivite gösterir ve kemotatik uyarıma cevap verir (Collins 1987). Kromozom analizlerinde kopya sayısında artış veya amplifikasyonları gösteren bir aberasyon olan HSR (Homologously Staining Region) kromozomunun varlığı bildirilmemiştir. Transfeksiyon için uygun özelliktedirler (Anonim 2014h).

2.5.2. K-562 Hücre Hattı (Kronik myeloid lösemi hattı)

K-562 hücre hattı, 1975 yılında Lozzio tarafından *blast* krizinde olan kronik myeloid lösemi hastası 53 yaşındaki bir kadının kemik iliğinden kurulmuştur. K-562 hücre hattı; glikoforince zengin, 20µm çapında, hemin varlığında fetal ve embriyonik hemoglobin üretebilen, farklılaşmamış *blast* hücrelerinden oluşmaktadır. K-562 *blastları* multipotansiyel özellikte olup spontan olarak progenitör eritrositik, granülositik ve monositik serilere farklılaşabilmektedir. Lenfoblast morfolojisi gösteren K-562 hücreleri; granülsüz bazofilik sitoplazmaya, bir veya daha fazla belirgin çekirdeğe sahiptir. K-562 hücrelerinin kültür ortamında iki katına çıkma süreleri 12 saattir. K-562 hücrelerinin granülosit ve monositlerin pozitif reaksiyon verdiği sitokimyasal maddeler ile pozitif reaksiyon vermedikleri ve peroksidaz, Sudan siyahı B, ASD kloroasetat esteraz boyaları ile boyanmadıkları belirlenmiştir. Histokimyasal boyalarla boyandığında K-562 hücrelerinin esteraz lipidler için ve asit boyalar ile bayandığında fosfataz için pozitif olduğu gözlenmiştir. K-562 hücrelerinin %90'ı Fc reseptörüne sahiptir ve bu reseptörü ifade eden hücreler EA rozet formunda bulunmaktadır. Bu hücreler koloni uyaran faktöre cevap vermemektedir. K-562 hücre membran glikoproteinleri eritrositlerle benzer özelliklere sahiptir. Bu hücrelerce sentezlenen glikoporin A sadece insan eritrositlerinde bulunmaktadır. K-562 hücre hatlarında; -13, -17, +7, +9 kromozomal anomolileri görülmektedir (Koeffler ve Golde 1980). Hücre populasyonu; farklılaşmamış hücreler ve granülosit serileri ile karakterize edilen K-562 hücreleri transfeksiyon için uygun deneysel model özelliği taşımaktadır. Kronik miyeloid lösemisinin hücresel belirteçlerinden biri olan Philadelphia kromozomu, hücrelerin granülositik serilerinde bulunmaktadır. Ayrıca K-562 hücreleri EBNA taşımamaktadır (Anonim 2014i).

2.5.3. Daudi Hücre Hattı (Burkitt lenfoma hücre hattı)

Daudi hücre hattı; 16 yaşında, siyahi, burkitt lenfoma hastası olan bir erkek bireyin periferal kanından elde edilmiştir. B lenfoblast hücre tipi özelliğine ve lenfoblastik morfolojik yapıya sahiptir. Transfeksiyon için uygun yapıdadırlar. Hücrelerin yaklaşık %66'sında karyotipin diploid olduğu belirlenmiştir. Epstein-barr virüs taşıyan bu hücreler EBNA, VCA ve yüzey immünoglobulini ekspresse etmekte ancak β 2-mikroglobulin taşımamaktadırlar (Anonim 2014g).

2.5.4. Jurkat Hücre Hattı (T hücre lösemi hücre hattı)

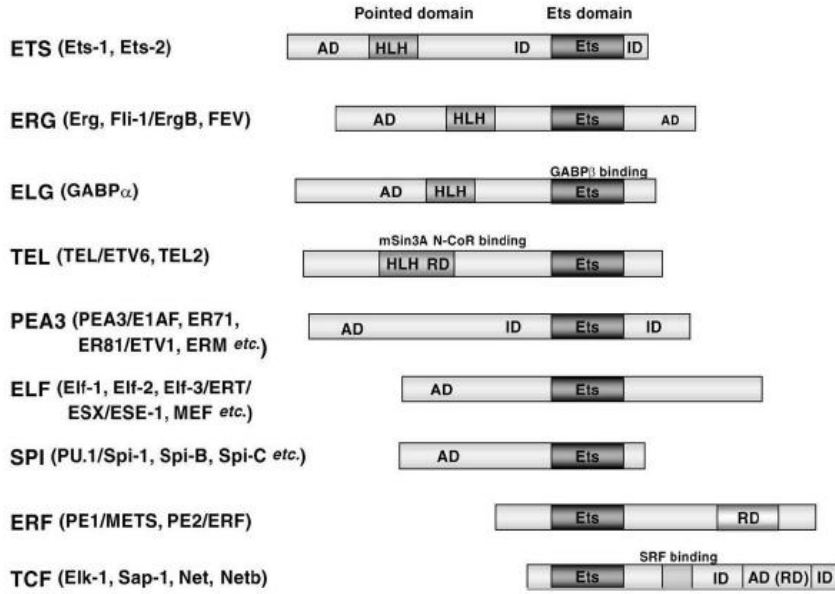
Jurkat hücre hattı; akut T hücre lösemisi 14 yaşındaki erkek bir bireyin periferal kanından elde edilmiştir. Hücreler lenfoblastik morfolojiye sahiptir ve T lenfosit hücre tipindedir. Hücrelerin %5,3' ü pseudodiploiddir ve kromozom sayısının 46 olduğu belirlenmiştir. Jurkat hücreleri genellikle normal karyotipe sahiptir. Ancak -2, -18, del(2)(p21p23), del(18)(p11.2) gibi anomoliler nadir olarak görülmektedir (Anonim 2014j).

Bugüne kadar birçok çalışmada HL-60, Jurkat, K-562 ve Daudi hücre hatları kullanılarak bu hücre hatlarının temsil ettiği lösemi tiplerinin moleküler tanısı, prognozu veya tedavisi ile ilişkilendirilebilecek genler araştırılmıştır. Biz çalışmamızda ELK-1 transkripsiyon faktörünü kodlayan *ELK-1* geni ve bu transkripsiyon faktörünün olası hedeflerinin bu dört hücre hattında gen ekspresyonlarının değişip değişmediğini araştırdık.

2.6. ETS (E-twenty-six) Transkripsiyon Faktör Ailesi

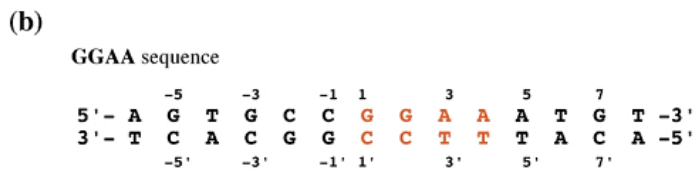
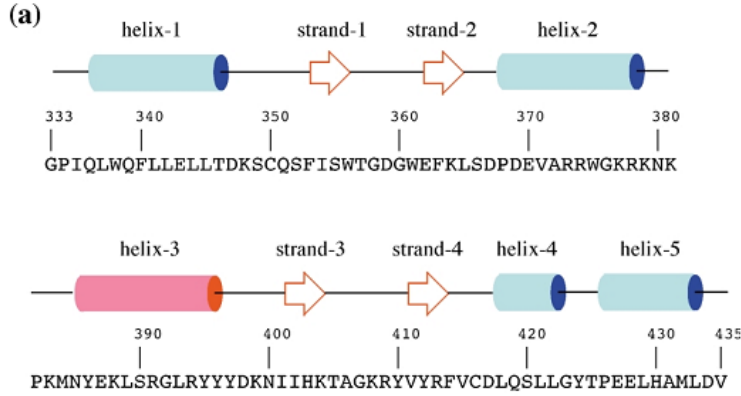
Transkripsiyon faktörleri, genlerin transkripsiyonunu düzenlemek için DNA üzerinde belli bir diziyeye bağlanabilen proteinlerdir. Bunlar, diziyeye özgün DNA bağlanma proteini olarak da adlandırılmaktadır (Karim ve ark. 1990). DNA'nın regüle edilecek bölgelerine tutunup onunla doğrudan ilişki kuran bu faktörler, RNA polimerazın bu promotor bölgelerini tanıyıp onlara tutunmasını sağlamakta ve o bölgedeki genlerin transkripsiyonunda bir aktivatör veya baskılayıcı olarak görev almaktadır (Roeder 1996).

ETS (E-twenty-six) transkripsiyon faktör ailesinin 12 alt ailesi ve 29 üyesi bulunmaktadır. ETS ailesi üyesi proteinleri ve domain yapıları Şekil 2.7.'de gösterilmiştir. Ailenin üyeleri; hücre farklılaşması, hücre döngüsünün kontrolü, hücre göçü, hücre çoğalması, apoptoz ve anjiyogenezin düzenlenmesinde görev almaktadır (Oikawa ve Yamada 2003).



Şekil 2.3. ETS Transkripsiyon faktör ailesinin alt sınıfları. (Oikawa ve Yamada, 2003)

ETS transkripsiyon faktörleri GGA(A/T) motifi içeren hedef gen promotorundaki dizilere heliks dönüşüm heliks yapısı ile bağlanır.



Şekil 2.4. ETS Transkripsiyon faktör ailesinin bütün alt üyeleri hedef gen promotorundaki aynı dizilere bağlanmaktadır (Obika ve ark. 2003)

2.7. TCF (Ternari Kompleks Faktör) Ailesi

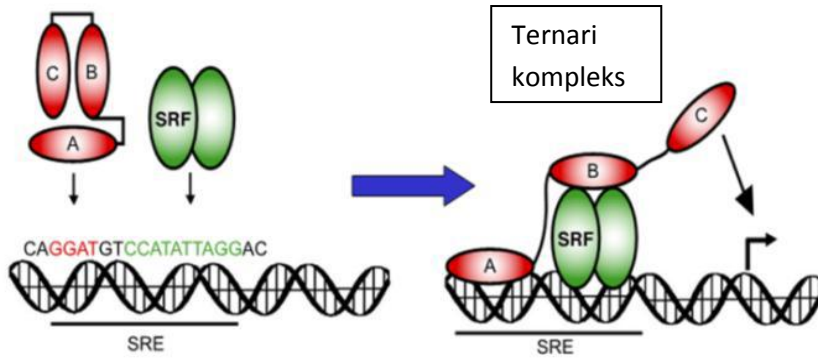
Ternari Kompleks Faktör (TCF) ailesi ETS ailesi üyelerinden en fazla çalışılan alt sınıftır. TCF ilk olarak serviks kanser hücre hattı HeLa hücrelerinde Serum Cevap Faktör (SRF) ile birlikte *c-fos* promotoruna bağlandığı bulunmuştur. Bu proteinin molekül ağırlığının 62 kDa olmasından dolayı p62 olarak da adlandırılmıştır. Ardından homologu olan ELK-1 tanımlanmış, daha sonra bu iki proteinin diğer homologları SAP-1 ve Net/SAP2 belirlenmiştir (Sharrocks 2002).

TCF; A, B, C ve D olmak üzere dört farklı domen içermektedir. ETS domain lokalizasyonu olarak adlandırılan A domeni, proteinin N terminalinde bulunmakta olup üzerinde yaklaşık 85 aminoasitten oluşan korunmuş bir bölge içerir (Mo ve ark. 2000, Besnard ve ark. 2011). Bu domain winged helix turn helix motifi ile DNA'ya bağlanmayı sağlar ve nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) ile nükleer eksport sinyalini (NES) taşımaktadır. B domeni SRF ile etkileşime girerek ternari kompleks oluşumunu sağlar. Transaktivasyon domeni olan C domeni proteinin C terminalinde bulunur ve MAPK yolağı tarafından fosforile edildiğinde TCF aktif hale gelmektedir. C domeni içerisinde bulunan DEF bölgesi de ERK (Ekstrasellular Sinyal Düzenleyici Kinaz)'in MAPK ile etkileşime girmesini sağlamaktadır (Buchwalter ve ark. 2004). Ökaryotlarda MAP kinazlar eş zamanlı olarak birçok yolağı aktive ederek hücre çoğalması ve farklılaşmasını düzenlemektedir. MAP kinazların 5 tane alt sınıfı tanımlanmıştır. Bunlardan ERK, JNK ve p38 en iyi bilinenleridir. ERK, sinyal iletimi öncelikli olmak üzere hücre proliferasyonu, sağ kalımı ve farklılaşmasına yol açarken, JNK ve p38 MAP kinaz yolları genellikle inflamasyon ve hücre ölümüne neden olmaktadır. ERK gibi JNK ve p38 MAP kinazlar da çekirdeğe geçebilmekte ve gen ekspresyonunu düzenleyen transkripsiyon faktörlerini fosforlayabilmektedirler. ERK; büyüme faktörleri ve mitojenler tarafından, JNK ve p38 ise sitokinler ve stres uyarımı ile aktif hale gelmektedir (Sharrocks 2002).

2.8. *ELK-1* Geni

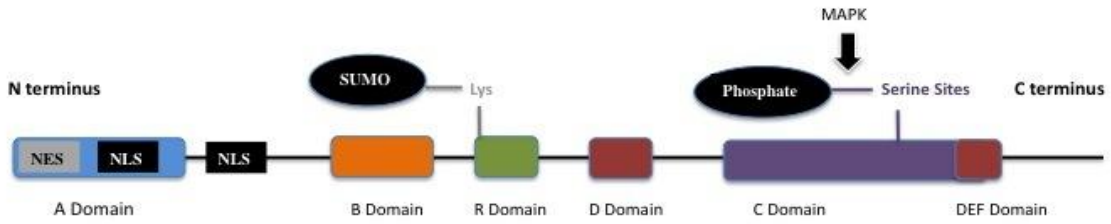
Doku özgüllüğü göstermeyen bir transkripsiyon faktörü olan ELK-1 proteini ETS onkogen süper ailesinin bir üyesidir (Cohen-Armon 2007). Kromozomal lokalizasyonu Xp11.2 olan *ELK-1* geni ilk defa 1989'da tanımlanmış olup 15084 baz çifti uzunluğundadır. ELK-1 proteininin fosforilasyon ve sumoilasyon olmak üzere iki post transkripsiyonel modifikasyon geçirdiği belirlenmiştir. Bu iki modifikasyon ELK-1'in hem aktivatör hem baskılayıcı fonksiyon kazanmasında rol oynamaktadır (Yang ve ark. 2003). ELK-1 serum ve

büyüme faktörlerine yanıt oluşturan Erken Cevap Geni (IEG) transkripsiyonunu sağlamaktadır. Tanımlanmış yaklaşık 40 hücrel IEG bulunmaktadır ve bunlar arasında en iyi karakterize edilmiş olanlar c-fos, c-myc, ve c-jun'dur (Eilers ve Menezes 2005, Schmeier ve ark. 2009). ELK-1 proteininin aktif hale gelmesi için fosforillenmesi gerekmektedir. ELK-1, C domeni üzerinde bulun serin 383 ve serin 389 bakıyelerinin MAPK tarafından fosforillenmesi sonucucu aktif hale geçer. Daha sonra Serum Cevap Elementi (SRE) olarak adlandırılan DNA dizisinin GGA/T bölgesine ETS bağlanma domeni (A domeni) bağlanır ve Serum Cevap Faktör (SRF) ile hedef genin promotorunda ternari (üçlü) protein kompleksini oluşturur (Schmeier ve ark. 2009). ELK-1'in aktivasyonu sonucu ELK-1 hedef gen promotoruna bağlanarak genin transkripsiyonunu sağlamaktadır (Yang ve ark. 2003). Hedef gen promotorunda ternari kompleks oluşumu Şekil 2.5.'te verilmiştir.



Şekil 2.5. SRE dizisi üzerinde oluşan ternari kompleksi (Buchwalter ve ark. 2004).

ELK-1 proteininin aktivitesinin düzenlenmesinde sumoilasyon fonksiyon görmektedir. Sumoilasyon ELK-1 aktivitesini baskılayan bir modifikasyondur ve proteinin dört domainden biri olan R domainin içerisindeki lizin bakiyelerinde gerçekleşmektedir (Yang ve ark. 2002). Bu modifikasyon ubiquitinlenme gibi proteinlerin degradasyonu ile ilişkili değildir, sadece proteinlerin yapısında değişikliğe neden olmaktadır. SUMO tarafından gerçekleştirilen bu modifikasyon proteinlerin çekirdeğe lokalizasyonunu etkileyebilmekte ve transkripsiyon faktörünün baskılanması sonucu gen ekspresyonunu negatif yönde düzenleyebilmektedir (Hardeland ve ark. 2002, Gill 2004). ELK-1 proteinin domen yapısı, fosforilasyon ve sumoilasyon bölgeleri Şekil 2.6’da verilmiştir.



Şekil 2.6. ELK-1 Proteinin yapısı (Anonim 2014b)

2.9. ELK-1 Transkripsiyon Faktörünün Hedefindeki Diğer Genler

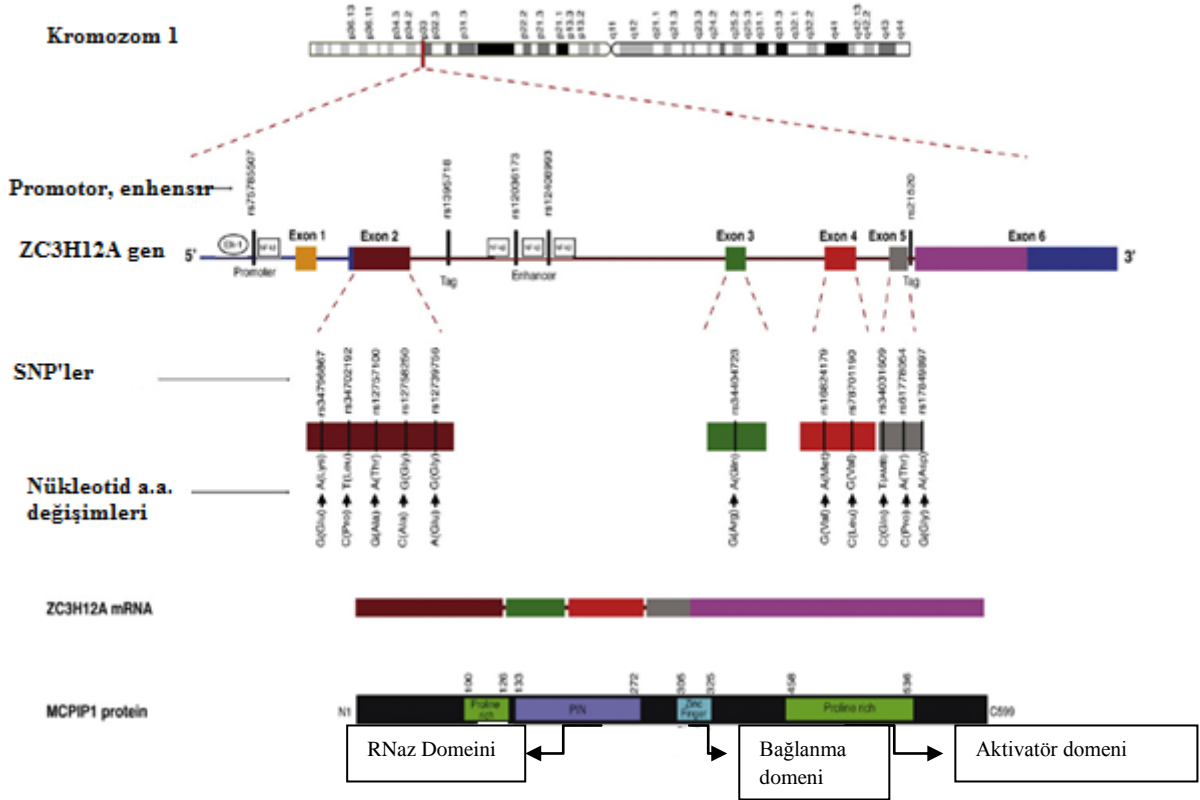
2.9.1. SRF (Serum Cevap Faktörü) Geni

Kromozomal lokalizasyonu 6p21.1 olan *SRF* geni ilk kez 1984 yılında tanımlanmıştır. Genin kodlağı SRF proteini; MADS (MCM1, Agomous, Deficiens, SRF) box transkripsiyon faktör süper ailesinin bir üyesidir (Shore ve Sharrocks 1995). 10607 bp uzunluğunda olup 7 ekzon bölgesi içermektedir. 1984 yılında yapılan çalışma sonucunda hücre kültüründe durağan fazda bulunan hücrelere serum eklenmesi ile c-fos gen transkripsiyonunda hızlı bir uyarılma olduğu bulunmuştur. İlerleyen yıllarda c-fos'un promotorunda 300 bp uzunluğunda bir dizi tanımlanmıştır. Bu dizi A/T'ce zengin olup tekrar dizileri içermektedir. Bu diziye Serum Cevap Elementi (SRE), SRE'ye bağlanarak gen ekspresyonunu kontrol eden proteine de Serum Cevap Faktörü (SRF) isimleri verilmiştir. SRF proteini 508 aminoasit içerir ve 67 kDa ağırlığındadır. Yapılan çalışmalar sonucunda SRF'nin SRE dizine bağlanması sonucunda IEG'lerin aktivasyonunu düzenleyerek, hücre siklusunun düzenlenmesi, apoptozis, hücre büyümesi ve farklılaşması, embriyonun gelişmesi, kasların büyümesi gibi birçok hücreyel olayda görev aldığı bulunmuştur. SRF, SRE dizinin aktivasyonunu Ras-Raf-MAPK-ERK yolağı üzerinden sağlamaktadır. SRF'nin düzenlenmesi hem hücreyel sinyal transdüksiyon yolakları ile hem de diğer transkripsiyon faktörleri (ELK-1, Ap1 vb) ile etkileşime girmesi sonucu gerçekleşmektedir (Chai ve Tarnawski 2002).

2.9.2. ZC3H12A/MCPIP1

Çinko parmak model genleri olarak bilinen bir gen grubunun üyesi olan *ZC3H12A* [Zinc finger CCCH domen içeren protein 12A]; geni MCPIP ailesinin 4 üyesini kodlamaktadır. Bu ailenin üyesi olan proteinler; timus, dalak, akciğer, bağırsak ve adipoz dokusu gibi makrofaj ile ilişkisi bulunan organlarda bulunmaktadır. *ZC3H12A*; 9860 baz uzunluğunda olup 6 ekzon bölgesi içerir ve 61 tane tek nükleotid polimorfizmi tanımlanmıştır. *ZC3H12A* geninin kodladığı MCPIP1 proteini, 599 amino asite sahip olup 65,8 kDa ağırlığındadır. MCPIP1, 2 tane proline zengin aktivasyon domeni içerir. Ayrıca nükleer lokalizasyon sinyal dizisi ve RNA'ya bağlanmak için 3 sistein ve 1 histidinden oluşan tek çinko parmak domeni taşır (Şekil 2.7.). MCPIP1 transkripsiyon faktörü olarak görev almasının yanı sıra RNaz olarakta işlev görmektedir (Kasza ve ark. 2010). *ZC3H12A* mutasyonları; immünoglobülin üreten plazma hücreleri ve granuloma yapısı ile karakterize edilen birçok otoimmün hastalıkta tanımlanmıştır. Bir kronik otoimmün hastalık olan Sjögren sendromu olgularında yapılan mikroarray analizleri apoptozda işlev gören bir grup genin

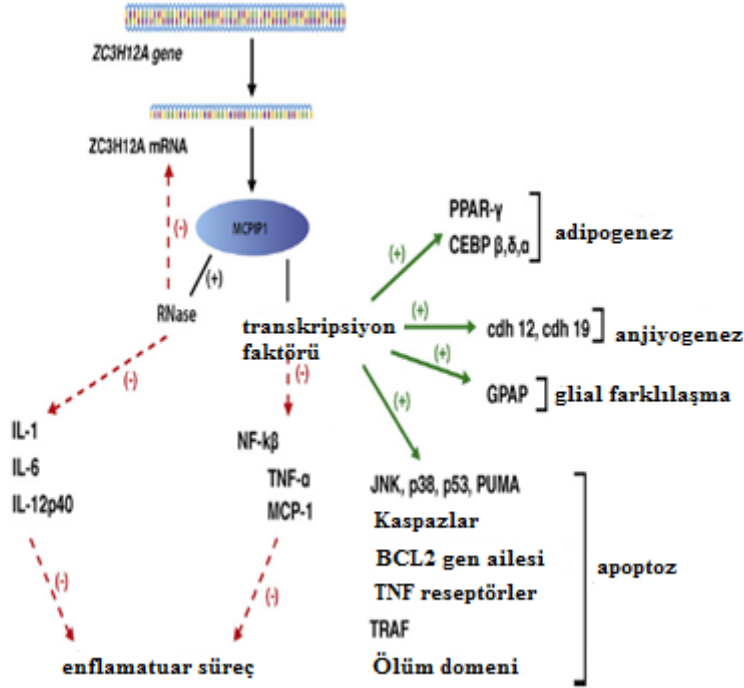
hastalığın ortaya çıkması ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu genlerden bir tanesi *ZC3H12A*'nın düzenlenmesinde görev almaktadır (Cifuentes ve ark. 2010).



Şekil 2.7. *ZC3H12A* geninin lokalizasyonu ve MCP1P-1 proteini (Cifuentes ve ark. 2010)

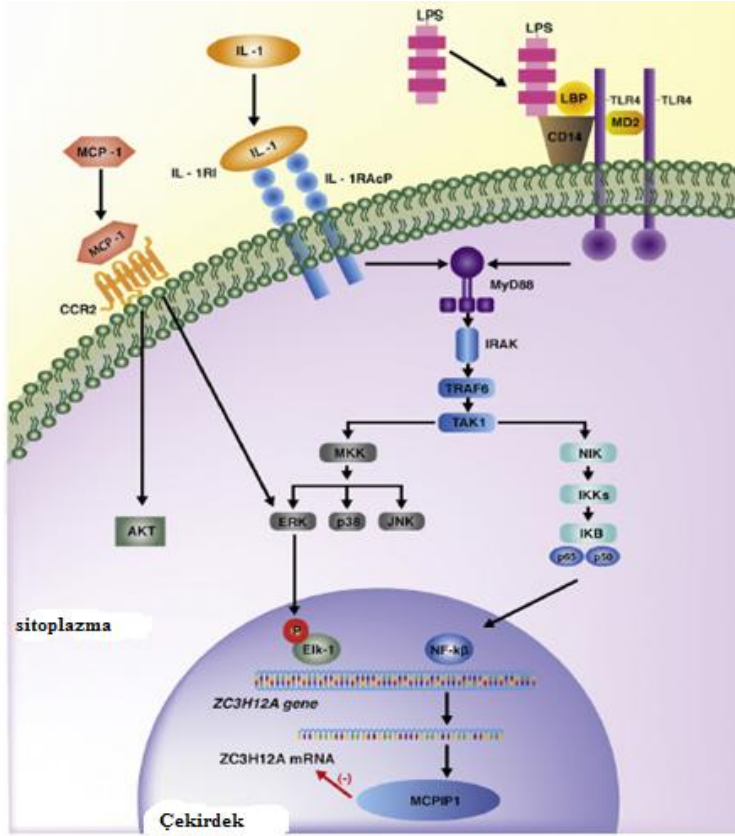
MCPIP1 eksprese olduğunda sitokin IL-6 ve IL-6p40 mRNA'larının stabilizasyonunu bozarak inflamasyonu negatif yönde düzenler. Bu transkriptler 3'-UTR (çevrilmeyen bölgeler) bölgesinde 30 nükleotitlik korunmuş bir domene sahiptir. Bununla beraber MCPIP-1 inflamatuvar süreçte yer alan Tümör Nekroz Faktörü alfa (TNF α) ve MCP-1 gibi moleküllerin yarı ömürlerini RNA transkriptleri üzerinden etkilememektedir. MCPIP1; TNF α ve MCP-1 genlerinde lipopolisakkarid (LPS) indükleyen promotörün inhibisyonunu sağlayarak transkripsiyon faktörü olarak fonksiyon görmektedir. MCPIP1 bu fonksiyonunu NF κ B yolağını aktive ederek sağlamaktadır (Şekil 2.8.). Diğer taraftan MCPIP1 apoptoziste yer alan çeşitli genlerin ekspresyonunu indüklemektedir (Şekil 2.8.). MCPIP-1'in aktivasyonu; c-Jun N-terminal kinaz (JNK), p38, p53'ü ayrıca p53 tarafından düzenlenen PUMA (Apoptozun p53 yukarı düzenleyici modülatörü)'nin aktivasyonuna aracılık etmektedir. MCPIP-1 ekspresyonu ayrıca; sitoplazmada bulunan NADPH oksidaz alt ünitesi olan phox47'nin hücre membranına translokasyonunu ve reaktif oksijen türleri (ROS), endoplazmik retikulum (ER) stres markırları olan Isı Şoku Proteini 40 (HSP40), Protein Disülfid İzomeraz (PDI), Guanin Nükleotid Saran Protein 78 (GRP78) ve inozitol bağımlı 1 α (IRE1 α) enziminin üretimini indükler. MCPIP-1 kaspaz 12 ve kaspaz 2 aktif formunun oluşumunu da indüklemektedir. Kaspaz 2/12 ve IRE1 α -JNK/p38-p53-PUMA yolağı aracılığıyla otofaji ve apoptoz meydana gelmektedir (Cifuentes ve ark. 2010).

MCPIP1'in adipogenezi indüklediğine dair kanıtlar da bulunmaktadır. MCPIP1; CCAAT / Enhansır bağlayıcı proteinlerin (C/EBP β , C/EBP δ , C/EBP α) ekspresyonunu sağlamaktadır. Ayrıca, MCPIP1'in indüklenmesi C / EBP ailesinde bulunan transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunuda sağlamaktadır. MCPIP ayrıca anjiyogenezde de fonksiyonu olduğu düşünülmektedir. Ancak buradaki fonksiyonu tam olarak açıklanamamıştır (Cifuentes ve ark. 2010).



Şekil 2.8. MCP1 aktivasyonu (Cifuentes ve ark. 2010)

MCP-1; *ZC3H12A* genini uyararak transkripsiyonun indüklenmesini gerçekleştirir. Böylece mononükleer hücrelerde MCP-1'e karşı cevap olarak ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz (ERK) ve serin/threonin spesifik protein kinaz (Akt) aktivasyonu gerçekleşir. LPS ve IL-1 β gibi diğer proinflamatuar moleküller tarafından *ZC3H12A*'nın ekspresyonunu indüklemektedir. IL-1 β ; *ZC3H12A*'yı NF κ B ve mitojen aktif protein kinaz (MAPkinaze) yolları ile düzenlenmektedir (Kasza 2013). IL-1 β muamelesi ile erken cevap geni (IEG) ekspresyon düzenleyicisi olarak bilinen ELK-1, ERK MAPkinaz yolağı üzerinden fosforillenerek aktif hale gelmektedir. MCP1 sinyal yolağı Şekil 2.9.'da gösterilmiştir. *ZC3H12A* gen promotörü; -70,+60 bölgesi arasında bulunan 136 bç uzunluğunda bir alanı kapsamaktadır ve bu alanda ETS bağlanma bölgesi (CAGGAA) ile CA ρ G kutusu bulunmaktadır. CA ρ G kutusuna (CCATATAAAGG) serum cevap faktörü (SRF) bağlanırken, ETS bölgesine fosforillenen ELK-1 bağlanır. Böylece TCF oluşturularak transkripsiyon başlatılır.

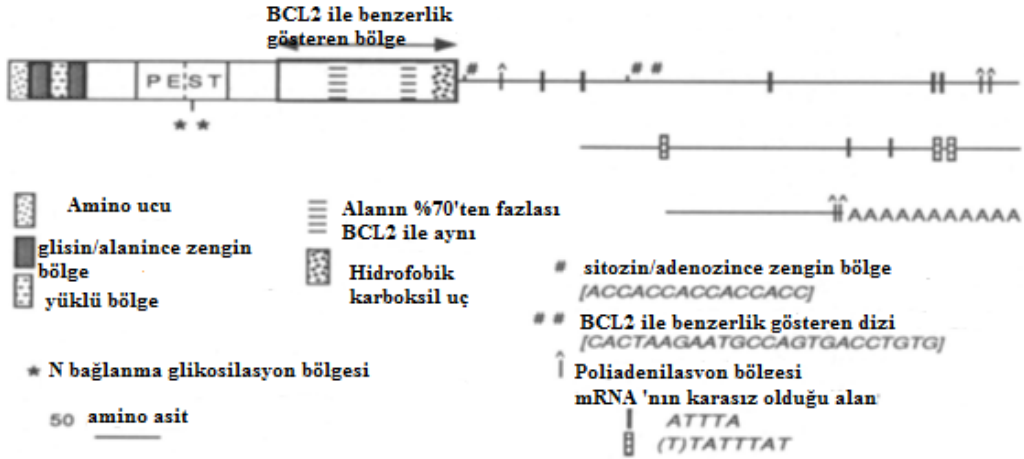


Şekil 2.9. MCP-1 sinyali yolu (Cifuentes ve ark. 2010)

2.9.3 MCL1 (Myeloid hücre lösemisi-1) Gen Bölgesi

Antiapoptotik BCL2 (B hücre lenfoma 2) gen ailesinin bir üyesi *MCL1* genidir. Kromozomal lokalizasyonu 1q21'dir ve 5188 baz çifti uzunluğundadır (Craig ve ark. 1994, Anonim 2014f). Kozopos ve arkadaşları 1993'te insan myeloid lösemi hücre hattı ML-1'in hücre farklılaşması esnasında *MCL1* geninin ekspresyonunda hızlı bir artışın olduğunu ortaya koymuşlardır (Craig ve ark. 1994). *MCL1* geninin hücre farklılaşması ve apoptozu indükleyici uyarılara (myelomonositik büyüme faktörü, granulosit/makrofaj koloni uyarma faktörü (GM-CSF)) karşı cevap olarak ekspresyonunda artış olduğu gözlenmiştir (Townsend ve ark. 1999). İlerleyen yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda *MCL1* geninin myeloid lösemi hücre hatlarında (HL-60, THP-1, U-937, K562) farklılaşmanın indüklenmesinde görev aldığı bulunmuştur (Townsend ve ark. 1999). BCL2 geni; programlı hücre ölümünü inhibe eder, hücre proliferasyonundan çok hücre canlılığını teşvik etmektedir. Bu özellikleri *MCL1* geni ile paralellik göstermekle beraber hücre proliferasyonunda birbirine zıt düşmektedir (Kozopos ve ark. 1993). MCL1 proteini BCL2 ile yüksek homoloji göstermektedir. MCL1 protein en uç karboksil terminalinde 20 hidrofobik aminoasit rezidüsü yer almaktadır (Şekil 2.10.). MCL1

proteininin amino terminal kısmında birbirini takip eden dört farklı bölge mevcuttur. Birincisi; glisin/alanin'ce zengin bir bölge bu bölgeyi takip eden aminoasitlerce zengin bölge arkasından bir PEST dizisi ve bu dizinin peşinde 4 çift arjinin bulunmaktadır. Prolin(P), glutamik asit (E), serin (S), threonin (T)'ce zengin olan PEST dizisi BCL2 proteininin yapısında da yer almaktadır.



Şekil 2.10. MCL1 ile BCL2 arasındaki dizi benzerliği (Kozopas ve ark. 1993)

MCL1 geninin ekspresyonundaki artış için ERK'in aktivasyonu gereklidir. ERK fosforilasyonunun artışının engellenmesi sonucunda *MCL1* geninin ekspresyonu azalarak hücre apoptoza gider. ERK aracılı yolağın yukarısında bulunan bileşenler yolağın protein kinaz C (PKC) ile uyarımı sonucu belirlenmişlerdir. PKC endojen aktivatörleri üreten fosfolipaz C tübuline bağlanan proteinler tarafından aktif hale getirilir. Mikrotübüllerin parçalanması sonucunda PKC uyarılarak ERK fosforilasyonu sağlanır ve *MCL1* geninin ekspresyonunda artış olur. Sonuç olarak; *MCL1*'in düzenlenmesinde ERK yolağının, BCL2 ailesinin düzenlenmesinde MAPK ve protein kinazların görev aldığı açıklanmıştır.

Ökaryotik transkripsiyon faktörleri DNA bağlanma domenlerine göre sınıflandırılırlar. Birçok durumda DNA bağlanma domeni yapı üyeleri, DNA bağlanma özgünlüğü için sınırlı bir imkan sağlar. Bu sebepten bu ailenin üyeleri DNA üzerinde aynı yerlere bağlanır. ETS domen transkripsiyon faktörlerinin her biri GGAA/T motifine bağlanır. *MCL1* geni üzerinde 162 bp uzunluğundaki dizi, SRF, ELK1 için bağlanma bölgesidir (Boros ve ark. 2009). Joanna Boros ve arkadaşları tarafından yapılan araştırma sonucunda *MCL1* geninin SRF ile ilişkili olduğu ve ELK-1-SRF kompleksinin hedef genlerinden birisi olduğu bulunmuştur (Boros ve ark. 2009).

2.9.4. *CEBPβ* Gen Bölgesi

İlk olarak Steve McKnight tarafından bulunan C/EBP (CCAAT bağlanma proteinleri)'nin tanımlanmış 6 tane izotipi (C/EBP- α , - β , - γ , - δ , - ϵ , ve - ζ) bulunmaktadır (Johnson ve McKnight 1989). C/EBP'lerin üzerinde bulunan DNA bağlanma ve dimerizasyon domeni bazik lösin fermuar (basic-leucine zipper, bZIP) motifi modeline sahiptir (Agre ve ark. 1989, Landschulz ve ark. 1989). Üyelerin hepsinin karboksil ucunda bZIP domen bölgesinin varlığı kanıtlanmıştır (Akira ve ark. 1990, Descombes ve ark. 1990). *CEBPβ* geni 20. kromozom üzerinde (q12-q13.1) lokalize olmuştur ve CREB süper ailesi üyesi CEBP β (CCAAT bağlanma proteini β) transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır (Jenkinsen ve ark. 1995). CEBP β enerji metabolizması, myelomonositik hücrelerin farklılaşması, yağ depolanması, hematopoez, immün cevap, antibakteriyel savunma ve dişi üreme döngüsü gibi birçok biyolojik süreçte fonksiyon göstermektedir (Ramji ve Foka 2002, Akasaka ve ark. 2007, Gade ve ark. 2008).

Yapılan çalışmalarda CEBP β 'nin Akut Promiyelositik Lösemi (APL) hücre farklılaşmasında kritik rol oynadığını göstermiştir (Zhang ve ark. 2010, Yu ve ark. 2013). Myeloid ve lenfoid lökomogenezin baskılanmasında rol oynayan CEBP β proteini MAPK

yolağında ELK-1 ile ilişkiye giren aday bir proteindir (Akasaka ve ark. 2007, Gade ve ark. 2008).

2.9.5. BCL10 (B-Hücre Lenfoma/Lösemi 10) Gen Bölgesi

Kromozomal lokalizasyonu 1p22.3 olan BCL10, mukoza ilişkili lenfoid doku (MALT lenfoma) lenfomasında t(1;14)(p22;q32) ile ilişkilendirilen antiapoptotik düzenleyici bir moleküldür. *BCL10* geni 233 aminoasit uzunluğunda ve 26.252 dalton ağırlığında olan BCL10 proteini kodlamaktadır. Bu proteinin 13 ile 101. aminoasit bakiyeleri arasında kaspaz domeni bulunur (CARD). Bu domende apoptotik düzenleyici moleküller bulunmaktadır. CARD domeninin N terminalinde bulunan bölge hematopoietik spesifik membran ilişkili guanilat kinaz protein Carma1 bulunmaktadır. Carma1, C terminalinden bulunan serin134, 136, 138, 141 ve 144 bakiyelerinin fosforlanması sonucunda NFκB yolağının aktivasyonu sağlanmaktadır (Huang 2010). NFκB yolağıyla hücrenin apoptoza uğramasında fonksiyon gören *BCL-10* geni ELK-1 transkripsiyon faktörünün hedef genleri arasında sayılabilir (Boros ve ark. 2009, Yu ve ark. 2013).

2.10. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Hedef DNA parçasının veya RNA'nın oligonükleotit (20-30nt) primerler tarafından yönlendirilerek *in vitro* şartlarda kopyalanmasına dayanan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ilk olarak Kary Mullis ve ark. (1986) tarafından tanımlanmıştır. Bu yöntem basitçe üç aşamadan oluşur:

- Hedef parçanın denatürasyonu,
- Primerlerin DNA üzerinde kendilerine özgü bölgelerine bağlanması,
- Yeni DNA zincirlerinin sentezi.

Polimeraz zincir reaksiyonunun ilk aşamasında hedef DNA yüksek sıcaklıklarda (95-100°C) denatüre edilmektedir. Denatürasyon aşamasından sonra ortam kullanılan primerlere özgü bağlanma sıcaklıklarına düşürülmekte ve oligonükleotit primerler kendilerine özgü bölgelere bağlanmaktadır. Son aşamada *Taq* DNA polimeraz uygun tampon, uygun sıcaklık ve dört çeşit dNTP (deoksiniükleotid trifosfat) varlığında primerleri 5' ucundan 3' ucuna doğru uzatmaya başlar. Her döngü sonucunda ilgili DNA bölgesi iki katına çıkmaktadır (Schochetman ve ark. 1988).

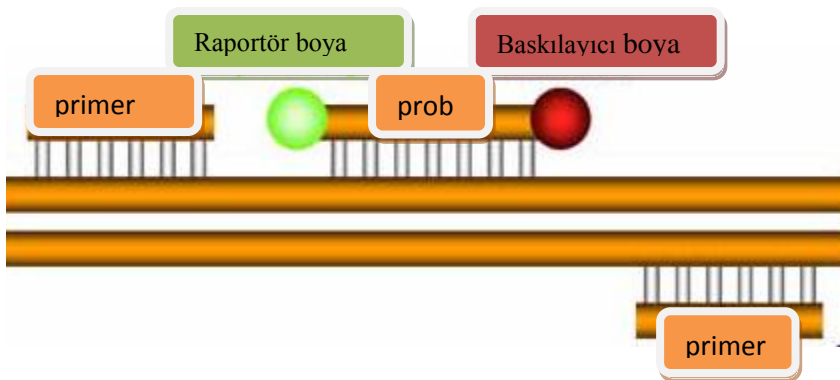
2.11. Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR)

Ters transkriptaz PZR reaksiyonu; hücrelerden elde edilen RNA moleküllerinin ters transkriptaz enzimi ile tamamlayıcı DNA (cDNA)'ya çevrildiği bir yöntemdir. cDNA'ya dönüşüm mRNA üzerinden gerçekleşmektedir. mRNA'lar intron bölgeleri taşımadığından bu yöntem sayesinde gen ekspresyonunun analizi yapılır. Bu PCR çeşidinden verimli sonuç alabilmek için elimizdeki RNA miktarı fazla olmalıdır (Mulhart 2007). Bir RT-PZR farklı kaynaklı ters transkriptaz enzimleri mevcuttur. Örneğin; Avian myeloblastosis virus (AMV-RT)'den elde edilen ters transkriptaz enzimi; DNA ekzonükleaz ve RNaz aktivitesi gösterir. 42°C' de optimal çalışma gösterir. Moloney mürin lösemi virüsü (MMLV-RT) kökenli ters transkriptaz enzimi RNA bağımlı DNA polimeraz aktivitesi gösterir. Optimum 37-42°C arasında çalışır. Bir ters transkriptaz PZR reaksiyonunda; ters transkriptaz enzimi, oligodNTP'ler ve/veya rastgele olan primerler, ters transkriptaz tamponu ve dH₂O bileşenleri bulunmaktadır. oligodNTP; RNA moleküllerinin içinden sadece mRNA moleküllerini seçmek için; mRNA'ların 3' uçlarında bulunan poli A kuyruklarından yararlanır. Ters transkriptaz enzimi RNA'yı kalıp olarak kullanarak DNA sentezler. Böylece RNA ve DNA hibridi oluşur. RNaz-H bu hibridi parçalayarak RNA'ya tamamlayıcı cDNA sentez edilmesini sağlamaktadır. Reaksiyona katılan oligodNTP'ler, 16-20 baz uzunluğunda timidin bazlarını taşırlar. Timidin bazları mRNA'nın poli A kuyruğuna bağlanır. Böylece cDNA reaksiyonu doğru bir şekilde başlaması amaçlanmaktadır. Rastgele olan primerler ise mRNA'nın 3' ucundan bağlanmaya başlar. Ters transkriptaz enzimi kullanılarak 1,2 kb'lık cDNA elde edilir. Fakat mRNA'nın uzunluğu 10 kb' den fazladır. Bu nedenle 6-8 baz uzunluğundaki rastgele primerler kullanılarak mRNA üzerinden cDNA'ya dönüşüm kesintisiz olarak gerçekleşir. Ters transkriptaz enzimi; RNaz-H ve endonükleaz alt birimlerini içermektedir. Reaksiyona katılan dH₂O; in vivo ortam şartları ile in vitro ortam şartları arasındaki farkı dengelemek için kullanılmaktadır. Ters transkriptaz reaksiyon tamponu Mg⁺², Tris HCL ve KCL içermektedir. Mg⁺² rastgele primerlerin mRNA dizisi üzerine bağlanmasını sağlamaktadır. Enzimin kofaktörü olarak görev sağlamaktadır. Tris-HCl; ortamın pH'sını dengelemekte ve reaksiyonun pH'sı 20°C'de 6.8 ile 7.8 arasında kalmasını sağlamaktadır. KCl; primerlerin bağlanmasını kolaylaştırmaktadır (Mulhardt 2007).

2.12. Gerçek Zamanlı Kantitatif Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Gerçek zamanlı ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu; PZR reaksiyonunun her döngüsü sırasında oluşan amplifikasyon ürünü miktarını belirlemek için kullanılan bir yöntemdir (Bustin ve ark. 2005). Gerçek zamanlı PZR sistemin temelini floresan raportör moleküllerinin ışınımlarının tespiti ve miktarının belirlenmesi (kantifikasyon) oluşturur. Kantitatif gerçek zamanlı PZR yöntemi, genomik DNA kopya sayısını, tek nükleotid polimorfizmlerini, DNA metilasyon durumunu ve viral genom varlığının belirlenmesi için kullanılabilir. Genel kullanım alanı ise mRNA düzeylerinin belirlenmesi üzerinden gen ifadesinin saptanması veya gen ifadelerini birbirleri ile karşılaştırma yapılmasıdır (Bustin 2000, Bustin ve ark. 2005).

Gen ifadesinin belirlenmesi için öncelikle örneklerden elde edilen mRNA moleküllerinin ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu ile cDNA molekülüne dönüşümü gerçekleştirilir. Floresan kaynağı olarak primerlere bağlı ya da onlardan bağımsız floresan işaretleyiciler kullanılır. En sık kullanılanlar arasında hidroliz problemleri, hibridizasyon problemleri, TaqMan® problemleri, Molecular Beacon® problemleri ve SYBR® Green I boyası bulunmaktadır. Yaptığımız çalışmada Taq- Man prob sistemi ile çalışan bir kit kullanılmıştır. Taq-Man® prob sistemi; primer çifti ile sınırlanan bölge içerisinde kalan bir hedef diziyeye bağlanacak şekilde tasarlanmaktadır. Probu; 5' ucunda raportör florokrom (örneğin; 6-karboksifloresan veya FAM) ve 3' ucunda baskılayıcı boya (örneğin; 6 – karboksi – tetrametil rhodomin veya TAMRA) bulunmaktadır. (Şekil 2.11.).



Şekil 2.11. Taq-Man® prob sistemi

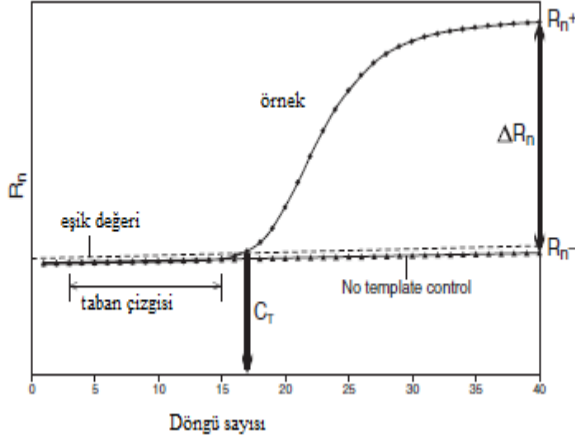
Sinyal artışı PZR ürün artışıyla doğru orantılıdır. Her bir PZR döngüsündeki floresan ışınımının kaydedilmesi ile başlangıçtan itibaren üssel fazda ürün artışına hangi noktada ulaşıldığı, eş zamanlı izlenir. PZR ürünlerinin DNA virüslerine karşı korumak için urasil-DNA glikozilaz kullanılır. Reaksiyona eklenen deoksiribonükleotit trifosfat (dNTP) karışımında deoksitimidin trifosfat (dTTP) yerine deoksiuridin trifosfat (dUTP) olmalıdır. Urasil-DNA glikozilaz enzimi reaksiyona eklendiğinde, dUTP nükleotidini içeren her türlü olası PZR ürününü sindirerek ürünlerinin tekrar amplifiye olmasını önlenmektedir.

Güvenilir kantitatif gerçek zamanlı PZR metodunda oluşan deneysel varyasyonlara göre bir korelasyon gerekmektedir. Konsantrasyon veya hacim değişiklikleri nedeniyle oluşan floresan dalgalanmalarına karşı raportör boya ROX pasif boyası ile normalize edilir. Raportör boyanın yoğunluğunun ROX pasif referans boyasının yoğunluğuna bölümü ile elde edilen sonuç R_n^+ 'yi verir. R_n^+ ; Reaksiyona giren tüm komponentlerin floresan emisyonu. R_n^- ; Negatif kontrolün (pasif boya) ve reaksiyona girmeyen örneklerin floresan emisyonu. ΔR_n ; PZR'da meydana gelen sinyal büyüklüğünü göstermektedir ve ΔR_n aşağıdaki şekilde hesaplanır;

$$\Delta R_n = R_n^+ - R_n^-$$

Hedef genin ekspresyonu çeşitli şartlar altında ekspresyonu değişmediği bilinen bir referans gene (housekeeping gen) göre normalize edilmelidir. İlgilenilen genin ekspresyon düzeyi, referans gen olarak kullanılan housekeeping genin ekspresyon düzeyine oranlanır. Böylece izole edilen RNA miktarı ve bu örneklerden sentezlenen cDNA miktarlarından kaynaklanabilecek örnekler arası başlangıç farklılıkları ve deneysel hatalar normalize edilir.

Ters transkriptaz PZR'da normalizasyon için kullanılan diğer parametreler ise şöyledir; taban çizgisi, gerçek zamanlı PZR'da PZR reaksiyonunun 3 ile 15 siklusları arasında meydana gelen az miktardaki ışımadan oluşur. Kullanıcının analizlerine veya amplifikasyon alanlarına göre her bir reaksiyon için ampirik olarak belirlenir. Taban çizgisi, eşik döngüsünü (Ct) doğru bir şekilde tespit edilmesini sağlar. Gerçek zamanlı PZR reaksiyonunda taban çizgisi sinyali üzerinden istatistiksel olarak önemli ilk artışın olduğu nokta eşik değeri olurken bu artışın gözlemlendiği döngü eşik döngü sayısını vermektedir (Şekil 2.13.).



Şekil 2.13. Gerçek zamanlı PZR Amplifikasyon eğrisi; C_t = eşik değeri, C_q = eşik değerinin tekabül ettiği siklus

Veriler değerlendirilirken ilk olarak; ilgilenilen genin ekspresyon miktarından referans gen örneğinin ekspresyon miktarı çıkarılacak ΔC_t değeri elde edilir. Kat farkı ise $2^{\Delta C_t}$ ile hesaplanır. Örnek kalitesini ve reaksiyon etkinliği farklılıklarını da kontrol etmek için bu metot yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle $2^{-\Delta \Delta C_t}$ yöntemi kullanılır.

Burada;

$$\Delta C_t \text{ örnek} - \Delta C_t \text{ referans gen} = \Delta \Delta C_t$$

$$C_t \text{ hedef gen} - C_t \text{ normal gen} = \Delta C_t \text{ örnek}$$

$$C_t \text{ referans gen} - C_t \text{ normal gen} = \Delta C_t \text{ referans}$$

Primer dizaynı; güvenilir kantitatif gerçek zamanlı PZR sonuçları elde edebilmek için dikkat edilmesi gereken en önemli aşamalardan birisidir. Gerçek zamanlı PZR primerleri dizayn edilirken ampikon uzunluğu yaklaşık 50-150 bp olmalıdır. Daha uzun ampikon ürünleri amplifikasyonu etkilemektedir. Genellikle primerler 18-24 nükleotid uzunluğunda olmalıdır. Bu uzunluk bağlanma sıcaklığında kolaylıkla bağlanmanın gerçekleşmesini sağlamaktadır. Primerler standart PZR kurallarına göre dizayn edilmelidir. Primerler hedef dizi için spesifik olmalı ve ikincil yapı içermemelidir. Primer çiftleri erime sıcaklığından 5°C eksikliğine göre ayarlanır ve yaklaşık %50 oranında GC içerirler. Primerlerin 3' ucunun daha kolay bağlanmasını sağlamak için GC bazlarının içeriğinin fazla olması istenir. Primerler kendi arasında olası tamamlayıcılığı yani hibridizasyonu önlemek için primer çifti dizi analizi yapılır. Final konsantrasyonunda 200 nM bulunan her bir primer birçok reaksiyon için etkili miktardır.

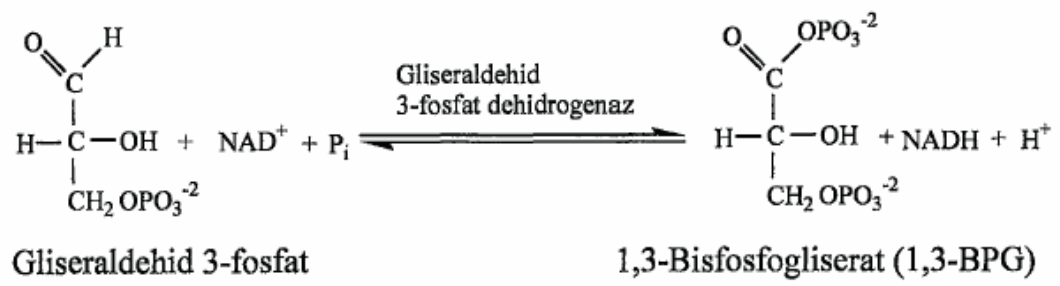
2.13. *Housekeeping* Genlerin Gerçek Zamanlı PZR Çalışmalarındaki Önemi

PZR metodunun varyantı olan kantitatif gerçek zamanlı PZR yöntemi DNA'daki spesifik bölgenin kantifikasyonunu sağlar. Bu teknik belirli bir hücre tipinde mRNA seviyesinin değerlendirilmesi açısından oldukça başarılıdır. Kantitatif gerçek zamanlı PZR uygulamalarında pipetajdan, ters transkriptaz için kullanılan enzim etkinliğinden, cDNA sentezi etkinliğinden, iç kontroller ve farklı deneysel örneklerden kaynaklanan hataların önüne geçmek için normalizasyon gerçekleştirilir (Lima Rebouças ve ark. 2013). Normalizasyon işlemi; farklı dokulardaki gen ekspresyon seviyesinin sabit olduğu bilinen referans bir *housekeeping* gene karşı ilgilenilen hücre veya doku tipinde meydana gelen gen ekspresyon seviyesinin oranlanması ile gerçekleştirilir. Yani ilgilenilen hedefte meydana gelen ekspresyon oranından kullandığımız referans *housekeeping* genin ekspresyon seviyesinin oranı çıkartılarak hesaplama yapılır. *Housekeeping* gen, ekspresyon seviyesinin belirlenmesinde oldukça büyük bir önem taşımaktadır. Çalışmada seçilen *housekeeping* genin farklı dokulardaki ekspresyon seviyesi ne kadar az değişkenlik göstererek sabit kalırsa ilgilenilen genin ekspresyon seviyesinin belirlenmesi o kadar doğru olacaktır.

2.13.1. GAPDH (Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz)

Bir hücrenin; metabolizma, hücre yapısı, gen transkripsiyonu ve homeostazis gibi çeşitli biyokimyasal ve temel işlevsel fonksiyonlarında görev olan, farklı doku ve hücre tiplerinde ekspresyon seviyeleri değişmeyen genlere *housekeeping* genler denir. Ayrıca bu genler hücrenin endojen düzenleyici genleri olarakta bilinmektedir (Zainuddin ve ark. 2010). Literatürde; GAPDH (Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz), β -aktin, ribozomal proteinleri kodlayan protein (RPL) ubikitin (UBQ), β -tubulin, 18S ribozomal protein (18S rRNA) ve fosfoglisarat kinaz (PGK) en iyi bilinen *housekeeping* genlerdir (Lima Rebouças ve ark. 2013). Yaptığımız çalışmada bir *housekeeping* gen olan GAPDH endojen kontrol, referans gen olarak kullanılmıştır.

GAPDH; yaklaşık 37 kDa ağırlığında bir enzimdir. Replikasyon, DNA onarımı, glikoliz ve transkripsiyonun düzenlenmesinde görev almaktadır (Meyer-Siegler ve ark. 1991). Glikoliz, glikozun enzimlerle pirüvik asite (pirüvat) kadar yıkılması olayıdır. Bütün canlılarda glikoliz basamakları aynı şekilde gerçekleşmektedir. Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz (GAPDH), glikolizin ara basamaklarında gliseraldehit-3-fosfattan iki molekül 1,3-bisfosfoglisarat oluşumunu katalizleyen NAD bağımlı bir dehidrojenazdır (Şekil 2.14.). Glikolizin 6. basamağını katalizlediği bu olayda glikozu kırarak enerji (ATP) ve karbon moleküllerini ortaya çıkarır.



Şekil 2.14. Gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Biyogüvenlik kabini (class II), Nüve, Türkiye
Buzdolabı, Profilo, Türkiye
CO₂ etüv, Thermo, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)
Çalkalayıcılı su banyosu, Nüve, Türkiye
Derin dondurucu -20⁰C, Vestel, Türkiye
Distile su cihazı, GFL, Almanya
Gerçek zamanlı PZR sistemi, Applied biosystems fast 7500, ABD
Isısal döngüleme cihazı, Techne TC5000, İngiltere
İnvert mikroskop, Olympus, Almanya
Kırık buz makinasi, Fiocchetti, İtalya
Mini mikrosantrifüj, Cleaver, Güney Kore
Neubauer lamı, Marienfeld, Almanya
Otoklav, Hirayama, Japonya
Otomatik pipet seti, Axygen axypet, Kanada
Soğutmalı santrifüj, Nüve, Türkiye
Vorteks, WiseMix, Kore

3.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

Amfoterisin B, Multicell, Kanada
Etanol, Sigma, ABD
Fetal Sığır Serum (FBS), Multicell, Kanada
L-glutamin, Multicell, Kanada
Penisilin/Streptomisin, Sigma, ABD
RPMI 1640, Sigma, ABD
Tripan mavisi, Fluka, ABD

3.1.3. Kullanılan kitler

3.1.3.1. Hücreden RNA izolasyon kiti (Ambion Pure Link, ABD)

Kit içerisinde bulunan yıkama solüsyonu II içerisinde 60 ml %100 EtOH ilavesi, lizis solüsyonu içerisinde %1 β -merkaptoetanol (β -ME) ilavesi ile kullanıma hazır hale getirildi. Solüsyon içerisindeki yıkama solüsyonu 1 olduğu gibi kullanıldı.

3.1.3.2. Kandan RNA izolasyon kiti (Qiagen, Almanya)

Kitin içerisinde;

- Solüsyon EL (eritrosit lizis solüsyonu)
- Solüsyon RLT (lizis solüsyonu)
- Solüsyon RW1 (yıkama solüsyonu)
- Solüsyon RPE (yıkama solüsyonu)

bulunmaktadır.

Kit içerisinde ki 11 ml solüsyon RPE içerisinde 44 ml %100 EtOH ilavesi, 23 ml solüsyon RLT içerisinde 230 μ l β -ME ilavesi ile kullanıma hazır hale getirildi.

3.1.3.3. cDNA reverse transkripsiyon kiti (Applied Biosystems, ABD)

Kit içerisinde;

- ✓ 10x Ters transkriptaz solüsyonu 1 ml
- ✓ Ters transkriptaz enzimi 100 μ l
- ✓ dNTP 100 mM
- ✓ 10x Random primer 1 ml

bulunmaktadır.

3.1.3.4. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyon kiti (Applied Biosystems, ABD)

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu kiti içerisinde;

2x Taq-Man gen ekspresyon master karışımı

- AmpliTaq Gold DNA polimeraz
- Urasil-DNA glikozilaz
- dNTP
- ROX pasif referans
- Optimize edilmiş tampon bileşenleri

20x Taq-Man gen ekspresyon tayin kiti

- İki tane işaretli primer (1x primer final konsantrasyonu 900 nM ve 20x stok primer konsantrasyonu 18 μ M).

- Bir tane FAMTM boya ile işaretlenmiş Taq-Man prob MGB (1x final konsantrasyonu 250 nM, stok konsantrasyonu 5µM).
- Taq-Man gen ekspresyon assayleri 1tane 6-VIC[®] boyası ile işaretlenmiş Taq-Man MGB prob içerirler (1x final konsantrasyonu 250 nM, 20x stok konsantrasyonu 5µM'dır).bulunmaktadır.

Her bir gen bölgesi için 4331182 katalog numarasına sahip ticari Taq-Man gen ekspresyon kiti alındı. MCPIP gen bölgesi için Hs00962356_m1, GAPDH gen bölgesi için Hs00166169_m1, MCL-1 gen bölgesi için Hs01050896_m1, ELK-1 bölgesi için Hs00901847_m1, BCL-10 gen bölgesi için Hs00961847_m1, CEBPB gen bölgesi için Hs00270923_s1 ve SRF gen bölgesi için Hs00182371_m1 kodlu ürünler kullanılmıştır. Reaksiyon için gerekli olan bileşenler ve miktarları Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Bir reaksiyon için gereken bileşenler ve miktarları

PCR Reaksiyon karışım bileşenleri	Miktar (µl)
20x Taq-Man [®] gen ekspresyon tayin kiti	1
2x Taq-Man gen ekspresyon master karışımı	10
cDNA	2
dH ₂ O	7
Toplam	20

3.1.4. Kullanılan Besiyeri

3.1.4.1. RPMI 1640 (Sigma, ABD)

% 10 fetal sığır serum

% 1 L-glutamin

100 µg/ml Penisilin – streptomisin

100 µg/ml Amfoterisin B

500 ml steril RPMI 1640 içerisine 50 ml FBS, 5 ml L-Glutamin, 5 ml Penisilin-streptomisin ve 5 ml amfoterisin B ilave edilerek kullanıma hazır hale getirildi (Cherng ve ark. 1996).

3.1.5. Kullanılan Solüsyonlar

3.1.5.1. %70 Etanol

70 ml etanol 100ml'ye dH₂O ile tamamlanır.

3.2. Yöntemler

3.2.1 Hücre Kültürü

Kronik myeloid lösemi hücreleri olan K-562 hücre hattı, T hücre lösemi hücreleri olan Jurkat hücre hattı, Burkitt lenfoma hücreleri olan Daudi hücre hattı, akut myeloid lösemi hücre hattı olan HL-60 hücre hattı Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Mehtap Kılıç Eren'den temin edildi. Hücreler 25 cm² yüzey alanına sahip T-25 hücre kültürü kaplarında 5 ml RPMI 1640 içerisinde kültüre edildiler. Hücreler rutin olarak haftada bir kez pasajlandı. Pasajlama işleminde hücrelerimiz süspande hücre olduğu için flask içeriği steril 15 ml'lik santrifü tüpü içerisine aktarıldı. Santrifüj tüpü içerisine alınan hücreler oda sıcaklığında 1100 rpm hızda 5 dakika çöktürülerek pellet 2 ml besiyerinde süspande edildi ve içerisinde 5ml RPMI 1640 besiyeri bulunan yeni flask içerisine aktarıldı.

3.2.2. Hücre Sayımı

RNA izolasyonunu gerçekleştirmeden önce hücrelerin sayımı yapıldı. K-562, Jurkat, Daudi, HL-60 hücrelerinin bulunduğu flaskların içeriği 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı. Santrifüj tüpleri 1100 rpm hızda 5 dakika oda sıcaklığında santrifüj ile çöktürülerek pellet 2 ml besiyerinde süspande edildi. Süspande edilen hücrelerden 100'er µl alınarak steril

eppendorfa aktarıldı ve üzerlerine 100 µl tripan mavisi eklenerek pipetaj yapılarak karıştırıldı. Karışımdan 10 µl neubauer lamına alınarak hücre sayımı gerçekleştirildi. Her bir hücre hattı için bu işlem yapıldı ve RNA izolasyonuna 5.3×10^6 hücre sayısına sahip hücreler ile başlandı.

3.2.3. Hücreden RNA İzolasyonu (Pure Link, Ambion Kit)

Hücreden RNA izolasyonuna 5.3×10^6 hücre ile başlandı.

- 1) Flask içersinde süspande halde bulunan hücreler 15 ml steril santrifüj tüpüne aktarılarak +4 °C 2000 g hızda 5 dakika santrifüj ile çöktürüldü. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı.
- 2) β -merkaptolanol içeren lizis solüsyonundan 0,6 ml eklenerek hücre pelleti dağılana kadar vortekslendi.
- 3) Hücre debrisisi maksimum hızda 2 dakika santrifüj ile çöktürüldü.
- 4) Süpernatant yeni steril eppendorf tüpe aktarılarak üzerine süpernatant miktarı kadar %70 EtOH eklendi ve vortekslendi.
- 5) 700 µl örnek içersinde filtreli kolonun bulunan koleksiyon tüpüne aktarıldı.
- 6) 12000 g hızda 15 saniye oda sıcaklığında santrifüj ile çöktürüldü.
- 7) Koleksiyon tüpünde biriken süzüntü döküldü.
- 8) 6. ve 7. basamaklar tekrar edildi.
- 9) Filtreli kolon üzerine yıkama solüsyonu I eklenerek 12000 g hızda 15 saniye oda sıcaklığında santrifüj ile çöktürüldü.
- 10) Filtreli kolon yeni steril eppendorf tüpüne yerleştirildi.
- 11) 500 µl EtOH eklenmiş yıkama solüsyonu II filtreli kolon üzerine ilave edilerek 12000 g hızda 15 saniye oda sıcaklığında santrifüj edilerek çöktürüldü.
- 12) Santrifüj sonrasında eppendorfta biriken dökelti boşaltarak filtreli kolon aynı eppendorfa tekrar yerleştirildi.
- 13) Eppendorf tüp 12000 g hızda 1-2 dakika oda sıcaklığında boş olarak santrifüj edilerek süzüntünün tamamı uzaklaştırıldı.
- 14) Filtreli kolon yeni steril eppendorf tüpe yerleştirildi.
- 15) Filtreli kolon üzerine 50 µl dH₂O eklenerek oda sıcaklığında 12000 g de 2 dakika santrifüj ile çöktürüldü.
- 16) Filtreli kolon uzaklaştırıldı.
- 17) Eppendorf tüpte 50 µl miktarında total RNA izolasyonu elde edildi.

3.2.4. Kandan RNA İzolasyonu (Qiagen RNA izolasyon kiti, Almanya)

Sağlıklı 23 bireyden alınan 5'er ml kan örneğinden gerçekleştirildi. Bireylerden alınan kan örnekleri pıhtılaşmayı önlemek için K₃EDTA içeren tüplere alındı.

Kullandığımız protokol basamakları oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

- 1) 1 ml kan örneği 15 ml'lik santrifüj tüpüne alınarak üzerine 5 ml solüsyon EL eklendi ve tüp alt üst edilerek karıştırıldı.
- 2) 15 dakika santrifüj tüpü buz içerisinde inkübe edildi. Bu zaman içerisinde tüp 1 kez vorteks ile karıştırılarak tekrar buza gömüldü.
- 3) Daha sonra tüp 10 dakika +4 °C'de 1200 rpm hızda santrifüj ile çöktürülerek süpernatant uzaklaştırıldı (pellet kısmı lökositleri içermektedir).
- 4) Tüpte ki pelletin üzerine 2 ml EL solüsyonu eklenerek 1200 rpm hızda +4°C 'de 10 dakika santrifüj ile çöktürüldü ve süpernatant uzaklaştırıldı.
- 5) Tüpteki pellet üzerine 600µl RLT solüsyonu eklenerek tüp içeriği vorteks ile karıştırıldı.
- 6) Tüpte oluşan lizat koleksiyon tüpüne yerleştirilmiş (mor renk ile işaretlenmiş) filtreli kolon üzerine aktarıldı ve 2 dakika maksimum hızda oda sıcaklığında santrifüj ile çöktürüldü.
- 7) Santrifüj sonrası oluşan lizatın içerisine 600 µl %70 EtOH eklenerek pipetaj işlemi ile karıştırıldı.
- 8) Oluşan bu karışım yeni koleksiyon tüpü içerisinde bulunan (beyaz renk ile işaretlenmiş) filtreli kolon üzerine aktararak 15 saniye 10000 rpm hızda oda sıcaklığında santrifüj edildi.
- 9) Santrifüj sonrasında filtreli tüp yeni koleksiyon tüpünün içerisine yerleştirilerek üzerine 700 µl RW1 solüsyonu eklendi ve 15 saniye oda sıcaklığında 10000 rpm hızda santrifüj edilerek çöktürüldü.
- 10) Koleksiyon tüpü içerisindeki süzüntü boşaltılarak filtreli kolon içerisine tekrar yerleştirildi.
- 11) Filtreli kolon üzerine 500 µl solüsyon RPE eklenerek 15 saniye oda sıcaklığında 10000 rpm hızda santrifüj ile çöktürüldü.
- 12) Filtreli kolonun üzerine tekrar 500 µl RPE solüsyonu eklenerek 14000 rpm hızda oda sıcaklığında 3 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü.
- 13) Koleksiyon tüpündeki süzüntüsü boşaltılarak tekrar filtreli tüp üzerine yerleştirildi.

- 14) Filtreli tüp üzerine hiçbir solüsyon eklemesi yapılmadan 14800 rpm hızda oda sıcaklığında 1dakika santrifüj edildi.
- 15) Filtreli kolon 1.5 ml steril eppendorf içine yerleştirilerek üzerine 50 µl RNaz içermeyen sudan eklendi ve 10000 rpm hızda oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edildi.

İşlem basamakları her bir kan örneği için ayrı ayrı uygulandı.

3.2.5. Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Applied Biosystems, ABD)

Ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu; hücre hatları ve sağlıklı bireylerin kanlarından elde edilen RNA örnekleri kullanılarak gerçekleştirildi.

Kullanılan kimyasallar -20°C 'den alındı. Taq DNA polimeraz -20°C'de sıvı halde bulunmaktadır. Taq DNA polimerazın yapısı sıcaklıktan etkilendiği için karışıma ekleneceği zaman -20°C' den alındı ve ekleme yapılır yapılmaz geri kaldırıldı. Diğer PZR bileşenleri oda koşullarında eritildi. Daha sonra vortekslenip kısa süreliğine santrifüj edildi. Karışımı oluşturma işlemleri buz içerisine yerleştirilen steril eppendorf tüpte gerçekleştirildi. Master karışımı oluşturan bileşenlerin miktarı Çizelge 3.2.'te gösterilmiştir. Karışımı oluştururken steril eppendorfun içine öncelikle dH₂O eklendi. Daha sonra miktarı çok olandan az olan bileşene göre karışıma eklendi. Karışıma en son Taq DNA polimeraz eklendi. Böylelikle primerlerle olası etkileşimi engellenmiş oldu. Dört tane steril eppendorf içerisine 20'şer µl karışımdan konularak üzerlerine 20'şer µl kalıp RNA'lerden eklendi. İşlem bittikten sonra eppendorf tüpler kısa süreliğine vorteksle karıştırılarak santrifüj edildi ve örnekler ısısal döngü cihazına yerleştirildi. Örnekler ısısal döngü cihazında Çizelge 3.3.'de gösterilen sıcaklık ve sürelerle tabii tutuldu.

Çizelge 3.2. cDNA reaksiyonu bileşenleri ve miktarları

Reaksiyon içeriği	Miktar (µl)
10x RT tampon	16
25x dNTP karışımı(100mM)	6.4
10x RT random primerler	16
MultiScribe ters transkriptaz	8
dH ₂ O	33.6
Toplam	80

Çizelge 3.3. Isısal döngü cihazının süre ve sıcaklıkları

	1.Basamak	2.Basamak	3.Basamak	4.Basamak
Sıcaklık(°C)	25	37	85	4
Zaman	10 dakika	120 dakika	5 dakika	∞

3.2.6. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Applied Biosystems, ABD)







































































Çalışma iki tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Sağlıklı bireylerden elde edilen cDNA örnekleri çalışmanın kontrol grubu için kullanıldı. Sağlıklı bireylerin cDNA örneklerinden 2'şer µl alınarak buza gömülü steril bir eppendorf tüp içerisine eklendi. Böylece sağlıklı bireylerin cDNA örneklerinden bir havuz oluşturdu. Buz üzerinde bulunan cDNA örnekleri havuza eklenir eklenmez buza tekrar geri gömüldü. Her bir gen bölgesine özgül kit kullanılarak çizelge 3.4.'te gösterilen reaksiyon karışımı oluşturuldu.

Çizelge 3.4. Gerçek zamanlı-PZR bileşenleri ve miktarları

Reaksiyon içeriği	Miktar (µl)
cDNA	20
Master karışım	100
Gen özgül Assay	10
dH ₂ O	70
Toplam	200

Öncelikle master karışım, gen spesifik kit, dH₂O steril bir eppendorf tüp içerisinde çizelge 3.3'te gösterilen miktarlarda konularak bir karışım oluşturuldu. Bu karışımdan 18'er µl 96 kuyucuklu mikroplaklara yerleştirilerek üzerlerine ilgili cDNA örneklerinden 2'şer µl eklendi. Kontrol grubu için oluşturduğumuz havuzda bulunan cDNA örnekleri kullanıldı. Karışımın ve cDNA örneklerinin mikroplakalara yerleşimi çizelge 3.5.'te gösterildi. Plakanın üzeri optik kaplayıcı ile kaplanarak maksimum hızda oda sıcaklığında 30 saniye santrifüj edilerek mikroplaka içeriklerinin çökmesi sağlandı. Plaka Applied Biosystems Fast 7500 gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu cihazının içine yerleştirilerek. Uygun PZR koşullarında çalışıldı (Çizelge 3.6.)

Çizelge 3.5. Mikroplakalara örnek yerleşimi

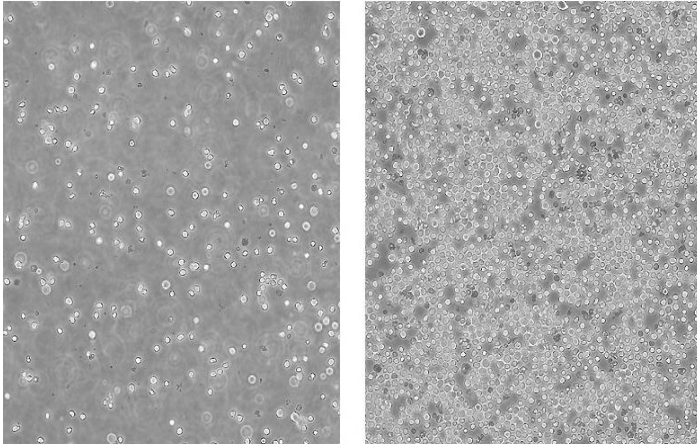
İlgili gen bölgesi	cDNA örnekleri									
	Kontrol	Kontrol	K562	K562	Jurkat	Jurkat	Daudi	Daudi	HL60	HL60
GAPDH										
ZC3H12A										
MCL1										
ELK1										
BCL10										
CREBP										
SRF										

Çizelge 3.6. Gerçek zamanlı PZR reaksiyon sıcaklık ve süreleri

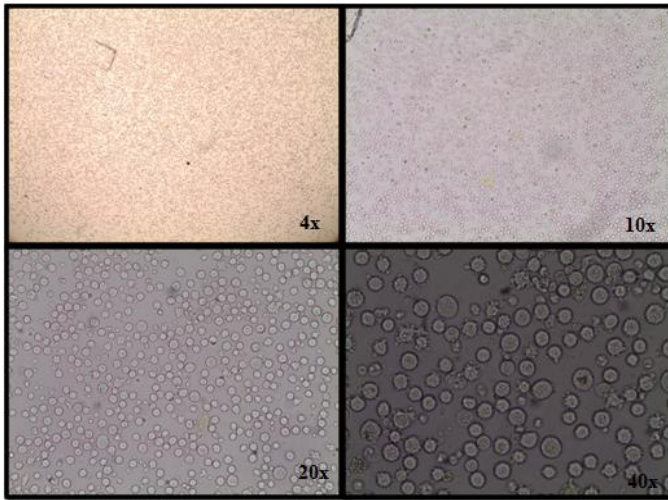
Basamak	UDG İnkübasyonu	AmpliTaqGold, UP Enzim Aktivasyonu	PZR	
			40 Döngü	
			Denatürasyon	Bağlanma
Zaman	2 dakika	10 dakika	15 saniye	1 dakika
Sıcaklık (°C)	50	95	95	60

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

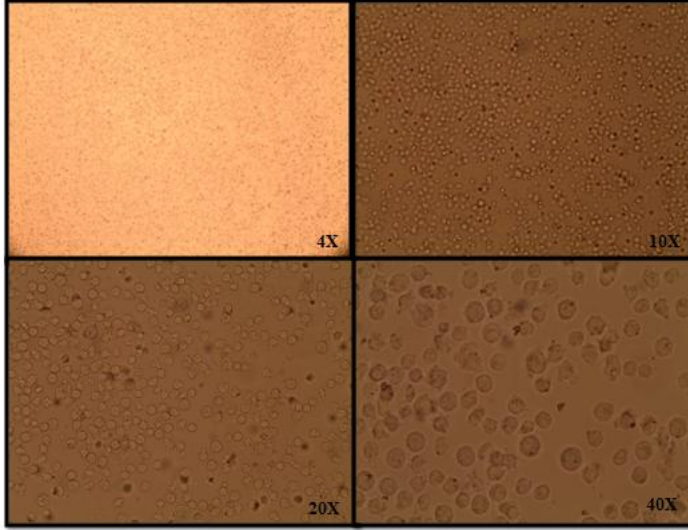
Çalışma grubu; insan myeloid hücre hattı HL-60, insan kronik myeloid lösemi hücre hattı K-562, Burkitt lenfoma hücre hattı Daudi ve T hücre lösemi hücre hattı Jurkat hücrelerinden, kontrol grubu sağlıklı 23 bireyden oluşmaktadır. Hücre hatlarından kültür kurulmuş ve 5.3×10^6 sayıda hücre elde edilinceye kadar kültür devam ettirilmiştir. HL-60, K-562, Daudi ve Jurkat hücrelerinin invert mikroskop görüntüleri sırasıyla Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3. ve Şekil 4.4'te gösterilmiştir.



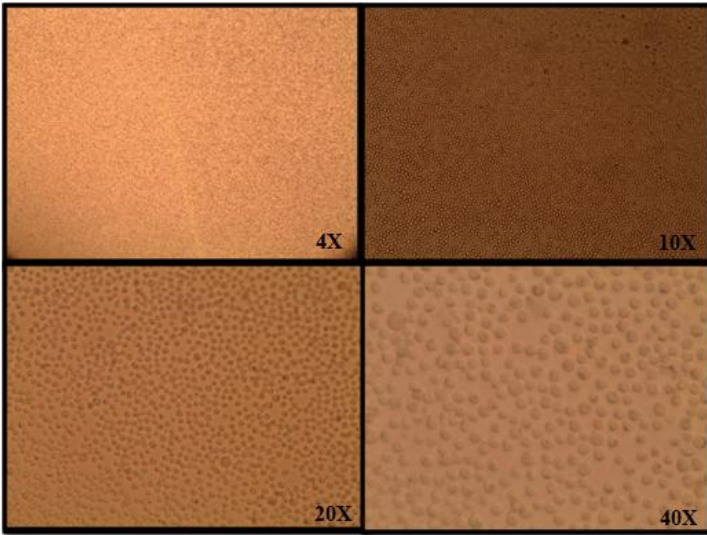
Şekil 4.1. HL-60 hücre hattının mikroskobik görüntüsü



Şekil 4.2. K-562 hücre hattının mikroskobik görüntüsü



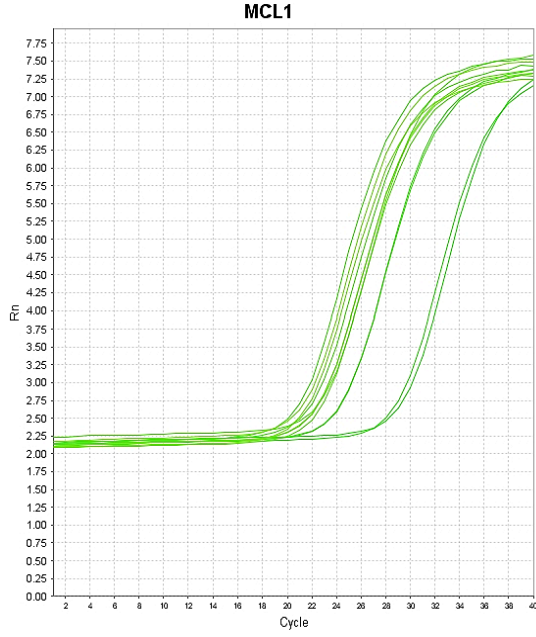
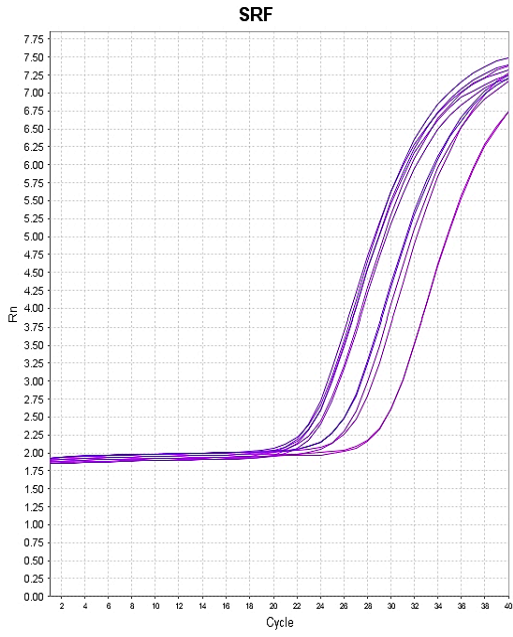
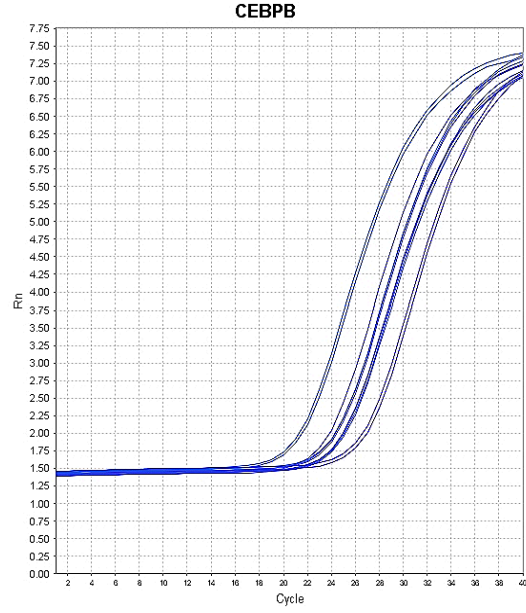
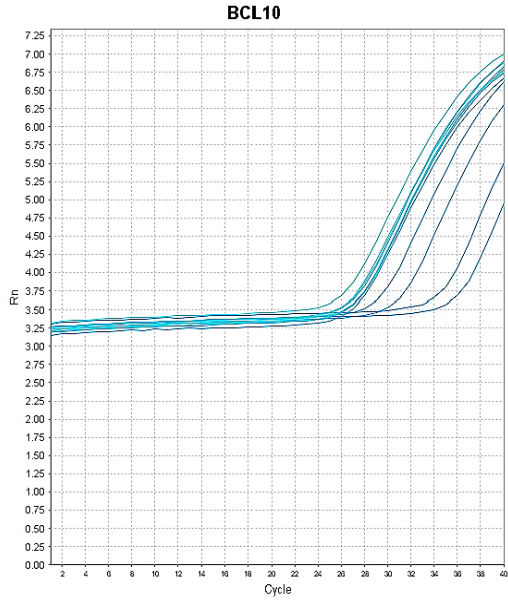
Şekil 4.3. Daudi hücre hattının mikroskopik görüntüsü



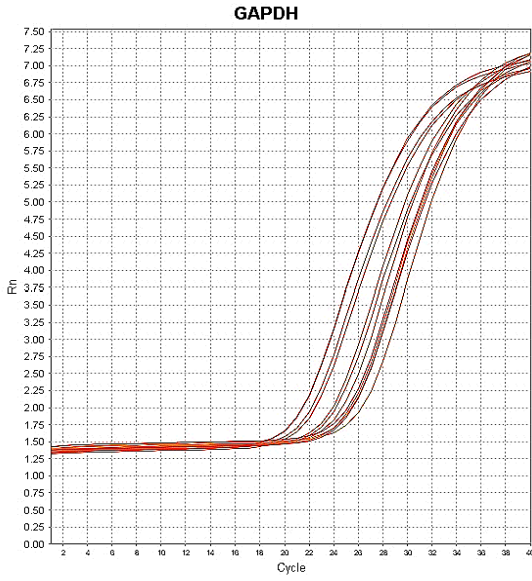
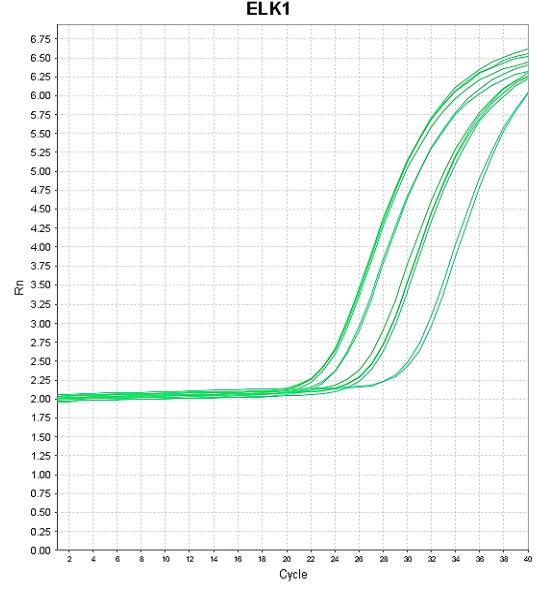
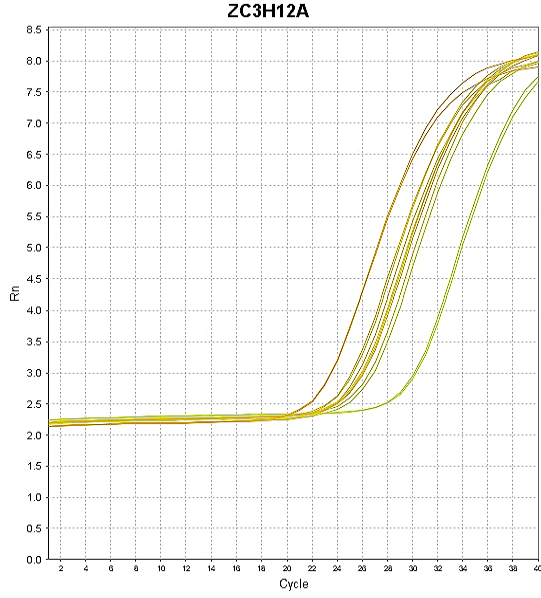
Şekil 4.4. Jurkat hücre hattının mikroskopik görüntüsü

Çalışma ve kontrol grubunda *GAPDH*, *ZC3H12A*, *MCL1*, *ELK1*, *BCL10*, *CEBPB* ve *SRF* genlerine özgül primer ve probalar kullanılarak yapılan bölüm 2.13.'te açıklanan gerçek zamanlı PZR yöntemi ile gen ifadelerindeki değişim araştırılmıştır. Her bir gen bölgesine ait amplifikasyon eğrileri elde edilmiş ve Ct değerleri belirlenmiştir. *BCL10*, *CEBPB*, *SRF* ve *MCL1* gen bölgelerine ait amplifikasyon eğrileri Çizelge 4.1.'de, *ZC3H12A*, *ELK1* ve *GAPDH* gen bölgelerine ait amplifikasyon eğrileri ise çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. BCL10, CEBPB, SRF, MCL1 gen bölgelerine ait amplifikasyon eğrileri x: döngü sayısı, y: Rn değeri



Çizelge 4.2. ZC3H12A, ELK1, GAPDH gen bölgelerine ait amplifikasyon eğrileri x: döngü sayısı, y:Rn değeri



Gerçek zamanlı PZR çalışması sonucunda elde edilen Ct değerleri Çizelge 4.1’de verilmiştir. Çalışma iki tekrarlı olarak yapılmış ve Ct değerlerinin ortalaması çizelge 4.2’de verilmiştir. Ct değerlerinin ortalaması kontrol grubunda *GAPDH* gen bölgesi için 23,935, *ZC3H12A* gen bölgesi için 22,345, *MCL1* gen bölgesi için 20,19, *ELK1* gen bölgesi için 25,82, *BCL1* gen bölgesi için 26,285, *CEBPB* gen bölgesi için 20,05 ve *SRF* gen bölgesi için 24,765 olduğu belirlenmiştir. K-562 hücre hattında Ct değerlerinin ortalaması *GAPDH* gen bölgesi için 19,8, *ZC3H12A* gen bölgesi için 24,105, *MCL1* gen bölgesi için 21,145, *ELK-1* gen bölgesi için 22,32, *BCL1* gen bölgesi için 22,94, *CEBPB* gen bölgesi için 22,94 ve *SRF* gen bölgesi için 22,195 olduğu belirlenmiştir. Jurkat hücre hattında Ct değerlerinin ortalaması *GAPDH* gen bölgesi için 20,675, *ZC3H12A* gen bölgesi için 23,3, *MCL1* gen bölgesi için 21,47, *ELK-1* gen bölgesi için 22,305, *BCL1* gen bölgesi için 27,015, *CEBPB* gen bölgesi için 23,625 ve *SRF* gen bölgesi için 21,875 olduğu belirlenmiştir. Daudi hücre hattında Ct değerlerinin ortalaması *GAPDH* gen bölgesi için 12,475, *ZC3H12A* gen bölgesi için 23,66, *MCL1* gen bölgesi için 20,19, *ELK1* gen bölgesi için 23,34, *BCL1* gen bölgesi için 26,965, *CEBPB* gen bölgesi için 23,4 ve *SRF* gen bölgesi için 22,73 olduğu belirlenmiştir. HL-60 hücre hattında Ct değerlerinin ortalaması *GAPDH* gen bölgesi için 23,57, *ZC3H12A* gen bölgesi için 24,725, *MCL1* gen bölgesi için 22,99, *ELK1* gen bölgesi için 26,21, *BCL10* gen bölgesi için 29,92, *CEBPB* gen bölgesi için 22,635 ve *SRF* gen bölgesi için olduğu 25,54 belirlenmiştir.

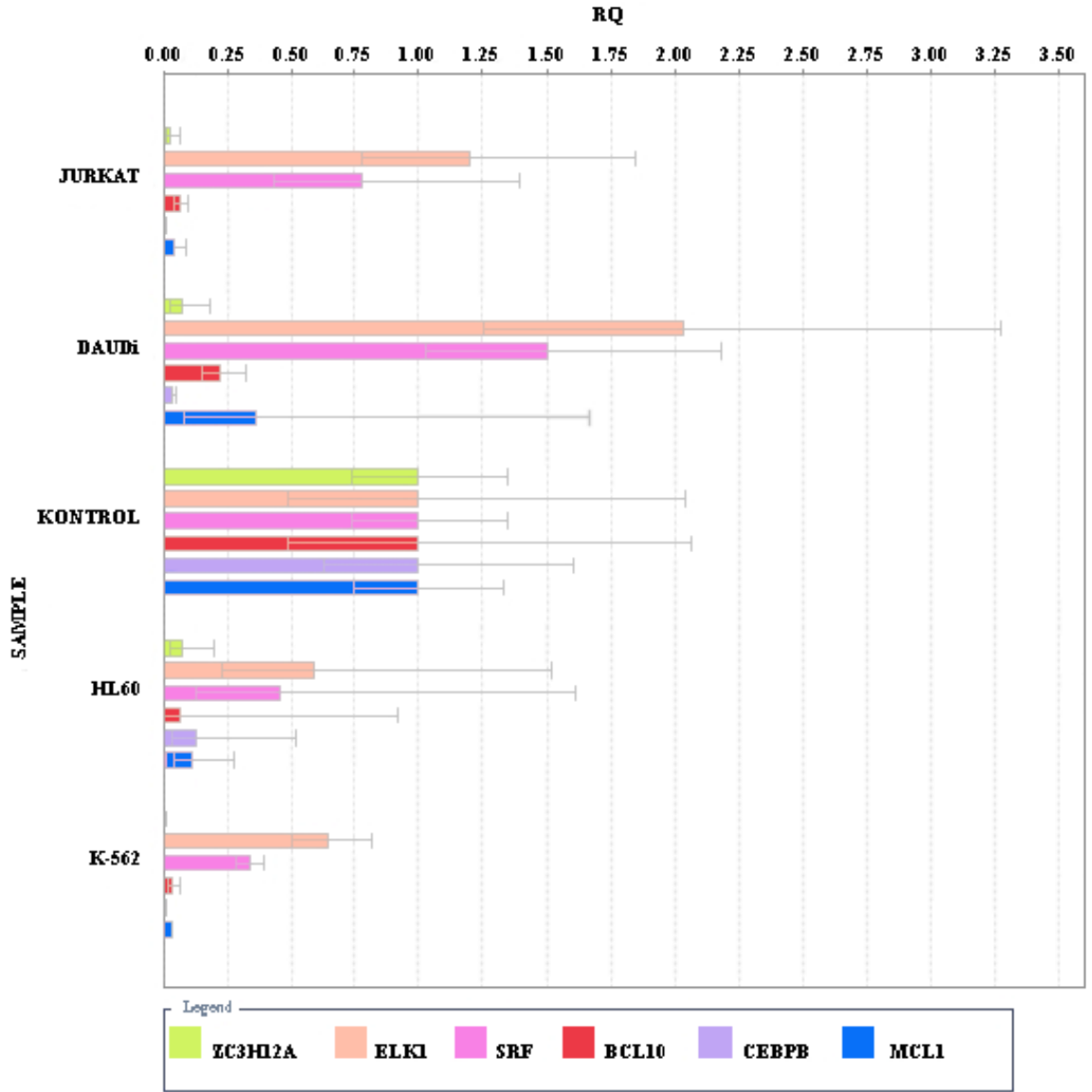
Çizelge 4.3. Kontrol grubu ve hücre hatlarına ait Ct değerleri

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Kontrol GAPDH Ct:23.84	Kontrol GAPDH Ct:24.03	K-562 GAPDH Ct:19.76	K-562 GAPDH Ct:19.84	Jurkat GAPDH Ct:20.54	Jurkat GAPDH Ct:20.81	Daudi GAPDH Ct:22.6	Daudi GAPDH Ct:22.35	HL-60 GAPDH Ct:23.26	HL-60 GAPDH Ct:23.88
Kontrol ZC3H12A Ct:21.37	Kontrol ZC3H12A Ct:23.32	K-562 ZC3H12A Ct:24.14	K-562 ZC3H12A Ct:24.07	Jurkat ZC3H12A Ct:23.03	Jurkat ZC3H12A Ct:23.57	Daudi ZC3H12A Ct:23.39	Daudi ZC3H12A Ct:23.93	HL-60 ZC3H12A Ct:24.63	HL-60 ZC3H12A Ct:24.82
Kontrol MCL1 Ct:20.19	Kontrol MCL1 Ct:20.19	K-562 MCL1 Ct:21.12	K-562 MCL1 Ct:21.17	Jurkat MCL1 Ct:21.29	Jurkat MCL1 Ct:21.65	Daudi MCL1 Ct:20.68	Daudi MCL1 Ct:19.7	HL-60 MCL1 Ct:22.98	HL-60 MCL1 Ct:23
Kontrol ELK1 Ct:25.6	Kontrol ELK1 Ct:26.04	K-562 ELK1 Ct:22.25	K-562 ELK1 Ct:22.39	Jurkat ELK1 Ct:22.25	Jurkat ELK1 Ct:22.36	Daudi ELK1 Ct:23.44	Daudi ELK1 Ct:23.24	HL-60 ELK1 Ct:26.27	HL-60 ELK1 Ct:26.15
Kontrol BCL10 Ct:26.06	Kontrol BCL10 Ct:26.51	K-562 BCL10 Ct:22.92	K-562 BCL10 Ct:22.96	Jurkat BCL10 Ct:27.08	Jurkat BCL10 Ct:26.95	Daudi BCL10 Ct:26.94	Daudi BCL10 Ct:26.99	HL-60 BCL10 Ct:30.77	HL-60 BCL10 Ct:29.07
Kontrol CEBPB Ct:19.93	Kontrol CEBPB Ct:20.17	K-562 CEBPB Ct:22.92	K-562 CEBPB Ct:22.96	Jurkat CEBPB Ct:23.64	Jurkat CEBPB Ct:23.61	Daudi CEBPB Ct:23.44	Daudi CEBPB Ct:23.36	HL-60 CEBPB Ct:22.29	HL-60 CEBPB Ct:22.98
Kontrol SRF Ct:24.79	Kontrol SRF Ct:24.74	K-562 SRF Ct:22.16	K-562 SRF Ct:22.23	Jurkat SRF Ct:21.73	Jurkat SRF Ct:22.02	Daudi SRF Ct:22.72	Daudi SRF Ct:22.74	HL-60 SRF Ct:25.25	HL-60 SRF Ct:25.83

Çizelge 4.4. Kontrol grubu ve hücre hatlarından elde edilen ortalama Ct değerleri

Örnek	GAPDH	ZC3H12A	MCL1	ELK1	BCL10	CEBPB	SRF
Kontrol Ct Ortalama	23,935	22,345	20,19	25,82	26,285	20,05	24,765
K-562 Ct Ortalama	19,8	24,105	21,145	22,32	22,94	22,94	22,195
Jurkat Ct Ortalama	20,675	23,3	21,47	22,305	27,015	23,625	21,875
Daudi Ct Ortalama	12,475	23,66	20,19	23,34	26,965	23,4	22,73
HL-60 Ct Ortalama	23,57	24,725	22,99	26,21	29,92	22,635	25,54

Elde edilen ortalama Ct değerlerine göre *GAPDH* geni endojen kontrol ve kontrol grubu da kalibratör olarak kullanılarak rölatif kantifikasyon (Relative Quantification: RQ) yapılmıştır. RQ değerleri endojen gen ifadesine göre kontrol grubu ve hücre hatları arasındaki gen ifade farkını kat olarak vermektedir. Elde edilen RQ değerleri Şekil 4.1. ve Çizelge 4.5'de verilmiştir. Daudi hücre hattında *ELK-1* gen ifadesi 2,0285 kat ve *SRF* gen ifadesi 1,4951 kat artmıştır. Jurkat hücre hattında ise sadece *ELK-1* gen ifadesi 1,1965 kat artmıştır. Diğer hücre hatlarında *ELK-1* veya hedefi olabilecek genlerin ifadesinde değişim belirlenmemiştir. *ELK-1* artışı saptanan her iki hücre hattında lenfoblastik özellikteki hücrelerdir. Myeloblastik özellikteki K-562 ve HL-60 hücrelerinde *ELK-1* düzeyinde değişim saptanmamıştır.



Şekil 4.5. Kontrol grubu ve hücre hatlarında elde edilen RQ değerleri bar grafiği

Çizelge 4.5. Kontrol grubu ve hücre hatlarında elde edilen RQ değerleri

Örnek	GAPDH	ZC3H12A	MCL1	ELK1	BCL10	CEBPB	SRF
Kontrol RQ	1	1	1	1	1	1	1
K-562 RQ	1	0,0084	0,0295	0,6441	0,0343	0,0077	0,3375
Jurkat RQ	1	0,027	0,0432	1,1965	0,0631	0,0088	0,7754
Daudi RQ	1	0,0734	0,3654	2,0285	0,2251	0,0357	1,4951
HL-60 RQ	1	0,0749	0,1118	0,5934	0,0625	0,1296	0,4546

Daudi hücre hattında ELK-1 transkripsiyon faktörü ile beraber ternari komplekste yer alan SRF proteininde gen ifadesi düzeyinde artış gözlenmiştir. Jurkat hücre hattında ise *SRF* geni ELK-1 artışından etkilenmemiştir. Her iki hücre hattında da ELK-1 transkripsiyon faktörü için aday olan *ZC3H12A*, *MCL1*, *BCL10* veya *CEBPB* genlerinin ifadesinde değişime rastlanmamıştır.

ZC3H12A gen promotorunda SRF'nin bağlandığı CARG kutusu ve ELK-1'in bağlandığı ETS domeni daha önce yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir. Ayrıca ifadesinin ELK-1 tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (Cifuentes ve ark. 2010) . Ancak yaptığımız çalışmada Daudi ve Jurkat hücrelerinde artan ELK-1'in *ZC3H12A* gen ifadesinde değişime neden olmadığı gözlenmiştir.

Joanna Boros ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmada *MCL1* geninin SRF ile ilişkili olduğu ve ELK-1-SRF kompleksinin hedef genlerinden birisi olduğu bulunmuştur (Boros ve ark. 2009). Ancak araştırmacıların aksine bizim çalışmamızda Daudi ve Jurkat hücrelerinde artan ELK-1'in *MCL1* gen ifadesinde değişime neden olmadığı belirlenmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Transkripsiyon faktörleri, genlerin transkripsiyonunu düzenlemek için DNA üzerinde belli bir diziyeye bağlanabilen proteinlerdir (Karim ve ark. 1990). ELK-1; ETS (E-twenty-six) onkogen süper ailesinin bir üyesidir (Anonim 2014e). ELK-1 proteini doku özgüllüğü göstermeyen bir transkripsiyon faktörüdür (Cohen-Armon 2007). ETS (E-twenty-six) transkripsiyon faktör ailesi hücre farklılaşması, hücre döngüsünün kontrolü, hücre göçü, hücre çoğalması, apoptoz ve anjiyogenezin düzenlenmesinde görev almaktadır (Oikawa ve Yamada 2003). ETS Transkripsiyon faktör ailesinin bütün alt üyeleri GGA(A/T) motifi içeren DNA dizilerine dönüşüm heliks dönüşüm yapısı ile bağlanır (Graves ve J.M. 1998). Ternari Kompleks Faktör (TCF) ailesi ETS ailesi üyelerinden en fazla çalışılan alt sınıftır ve bu alt sınıfın tanımlanmış üyeleri Serum Cevap Faktör (SRF), ELK1, SAP-1 ve Net/SAP2'dir (Sharrocks 2002). ELK-1, MAPK tarafından fosforillenerek aktif hale geçmekte ve daha sonra Serum Cevap Element (SRE) olarak adlandırılan DNA dizisinin GGA/T bölgesine ETS bağlanma domeni ile bağlanarak SRF ile hedef genin promotöründe ternari (üçlü) protein kompleksini oluşturmaktadır (Schmeier ve ark. 2009). ELK-1 serum ve büyüme faktörlerine yanıt oluşturan Immediate Early Genlerin (IEG) transkripsiyonunu sağlamaktadır (Eilers ve Menezes 2005, Schmeier ve ark. 2009). ELK-1'in IEG dışındaki farklı hedef genlerinin belirlenmesi birçok çalışma için araştırma konusu olmaktadır. Ancak yaptığımız literatür taramasında ELK-1 aşırı ekspresyonu ile hematolojik malignansiler arasında ilişki bildiren bir yayına rastlanmamıştır. Yaptığımız çalışmada hematolojik malignansilerin araştırılmasında model olarak sıklıkla kullanılan; HL-60, Jurkat, Daudi ve K-562 lösemi hücre hatlarında ELK-1'in gen ekspresyonundaki değişimler belirlenmiştir. Ayrıca ELK-1'in lökomogenezdeki rolünün aydınlatılabilmesi için ELK-1 için hedef olabilecek beş genin (*BCL10*, *CEBPβ*, *MCL1*, *ZC3H12A*, *SRF*) ekspresyon düzeyleri de araştırılmıştır.

Daudi hücre hattında *ELK-1* gen ifadesi 2,0285 kat ve SRF gen ifadesi 1,4951 kat artmıştır. Jurkat hücre hattında ise sadece *ELK-1* gen ifadesi 1,1965 kat artmıştır. Diğer hücre hatlarında *ELK-1* veya hedefi olabilecek genlerin ifadesinde değişim belirlenmemiştir. *ELK-1* artışı saptanan her iki hücre hattında lenfoblastik özellikteki hücrelerdir. Myeloblastik özellikteki K-562 ve HL-60 hücrelerinde *ELK-1* düzeyinde değişim saptanmamıştır. MADS box transkripsiyon faktör süper ailesinin bir üyesi SRF; ELK-1 ile beraber IEG transkripsiyonunun indüklenmesinde fonksiyon görmektedir (Shore ve Sharrocks 1995). Çalışmamızda Daudi hücre hattında ELK-1 transkripsiyon faktörü ile beraber ternari komplekste yer alan SRF proteininde gen ifadesi düzeyinde artış gözlenmiştir. Jurkat hücre

hattında ise SRF geni ELK-1 artışından etkilenmemiştir. Her iki hücre hattında da ELK-1 transkripsiyon faktörü için aday olan *ZC3H12A*, *MCL1*, *BCL10* veya *CEBPβ* genlerinin ifadesinde değişime rastlanmamıştır. *ZC3H12A* gen promotorunda SRF'nin bağlandığı CARG kutusu ve ELK-1'in bağlandığı ETS domaini daha önce yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir. Ayrıca ifadesinin ELK-1 tarafından düzenlendiği gösterilmiştir (Cifuentes 2010). Ancak yaptığımız çalışmada Daudi ve Jurkat hücrelerinde artan ELK-1'in *ZC3H12A* gen ifadesinde değişime neden olmadığı gözlenmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarda MCL-1'in hücre farklılaşması ve apoptozu indükleyici uyarılara (myelomonositik büyüme faktörü, granulosit/makrofaj koloni uyarma faktörü(GM-CSF)) karşı cevap olarak ekspresyonunda artış olduğu gözlenmiştir (Townsend 1999). Ayrıca MCL1'in myeloid lösemi hücre hatlarının (HL-60, THP-1, U-937, K562) farklılaşmasının indüklenmesinde görev aldığı bulunmuştur (Townsend 1999). Joanna Boros ve arkadaşları tarafından yapılan araştırmada *MCL1* geninin SRF ile ilişkili olduğu ve ELK-1- SRF kompleksinin hedef genlerinden birisi olduğu bulunmuştur (Boros ve ark. 2009). Ancak araştırmacıların aksine bizim çalışmamızda Daudi ve Jurkat hücrelerinde artan ELK-1'in *MCL1* gen ifadesinde değişime neden olmadığı belirlenmiştir.

CREB süper ailesi üyesi CEBPβ (CCAAT bağlanma proteini β) (Jenkinsen ve ark. 1995) enerji metabolizması, myelomonositik hücrelerin farklılaşması, yağ depolanması, hematopoez, immün cevap, antibakteriyel savunma ve dişi üreme döngüsü gibi birçok biyolojik süreçte fonksiyon gösteren bir transkripsiyon faktörüdür (Ramji ve Foka 2002, Akasaka ve ark. 2007, Gade ve ark. 2008). Yapılan çalışmalarda CEBPβ'nin Akut Promiyelositik Lösemi hücre farklılaşmasında kritik rol oynadığını göstermiştir (Zhang ve ark. 2010, Yu ve ark. 2013). Myeloid ve lenfoid lökomogenezin baskılanmasında rol oynayan CEBPβ proteini MAPK yolağında ELK-1 ile ilişkiye giren aday bir protein olduğu ileri sürülmüştür (Akasaka ve ark. 2007, Gade ve ark. 2008). Ancak yaptığımız çalışmada ELK-1 transkripsiyonunun yüksek olduğu Daudi ve Jurkat hücrelerinde CEBPβ ifadesinin değişmediği belirlenmiştir.

Çalışma kapsamında mRNA ekspresyon düzeyleri belirlenen *BCL10*, *CEBPβ*, *MCL1*, *ZC3H12A*, *SRF* genlerinin protein düzeyinde değişimine veya proteinlerin fosforilasyon durumlarına bakılmamıştır. Ayrıca bu hücre hatlarında ELK-1 aşırı ekspresyonu sağlandığında veya tamamen susturulduğunda ortaya çıkabilecek değişimler değerlendirilmemiştir. Bu sorular daha sonraki çalışmalar için öneri niteliğindedir.

6. KAYNAKLAR

- Afonina I, Zivarts M, Kutuyavin I, Lukhtanov E, Gamper H, Meyer RB (1997). Efficient priming of PCR with short oligonucleotides conjugated to a minor groove binder. *Nucleic Acids Res*, 25:2657-2660.
- Agre P, Johnson P, McKnight S (1989). Cognate DNA Binding Specificity Retained After Leucine Zipper Exchange Between GCN4 and 119 C/EBP. *Science*, 246(4932):922-926.
- Akasaka T, Balasas T, Russell LJ, Sugimoto KJ, Majid A, Walewska R, Karran EL, Brown DG, Cain K, Harder L, Gesk S, Martin-Subero JI, Atherton MG, Bruggemann M, Calasanz MJ, Davies T, Haas OA, Hagemeijer A, Kempinski H, Lessard M, Lillington DM, Moore S, Nguyen-Khac F, Radford-Weiss I, Schoch C, Struski S, Talley P, Welham MJ, Worley H, Strefford JC, Harrison CJ, Siebert R, Dyer MJ (2007). Five members of the CEBP transcription factor family are targeted by recurrent IGH translocations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). *Blood*, 109:3451-3461.
- Akira S, Isshiki H, Sugita T, Tanabe O, Kinoshita S, Nishio Y, Nakajima T, Hirano T, Kishimoto T (1990). A Nuclear Factor for IL-6 Expression (NF-IL6) is a Member of a C/EBP family. *EMBO J*, 9(6):1897-1906.
- Anonim <http://www.meb.uni-bonn.de/cancer.gov/Media/CDR0000533336.jpg>. Erişim Tarihi: 7.1. 2015
- Anonim (2013) http://en.wikipedia.org/wiki/Förster_coupling. Erişim Tarih: 5.12. 2013
- Anonim (2014a) <http://en.wikipedia.org/wiki/Blood>. Erişim Tarihi: 20.10 2014
- Anonim (2014b). <http://en.wikipedia.org/wiki/ELK1>. Erişim Tarihi: 19.10.2014
- Anonim (2014c) http://en.wikipedia.org/wiki/Gamma/delta_T_cells. Erişim Tarihi: 12.09.2014
- Anonim (2014d) http://en.wikipedia.org/wiki/Hematopoietic_stem_cell. Erişim Tarihi: 15.12. 2014
- Anonim (2014e) <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ELK1>. Erişim Tarihi: 9.12. 2014
- Anonim (2014f) <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MCL1>. Erişim Tarihi: 15.12. 2013
- Anonim (2014g) <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-213.aspx#generalinformation>. Erişim Tarihi: 05.06. 2014
- Anonim (2014h) <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-240.aspx#generalinformation>. Erişim Tarihi: 05.06. 2014
- Anonim (2014i) <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CCL-243.aspx>. Erişim Tarihi: 05.06. 2014
- Anonim (2014j) <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/CRL-2899.aspx#characteristics>. Erişim Tarihi: 05.06. 2014
- Anonim (2015) <http://en.wikipedia.org/wiki/Blood>. Erişim Tarihi: 05.01.2015

Anonim (2014k) https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_041280.pdf.
Erişim Tarihi: 05.09.2014

Berkarda B (2003). Kan Hastalıkları. İÜ Basın ve Yayınevi Müdürlüğü, 1-5. İstanbul

Besnard A, Bouveyron N, Kappes V, Pascoli V, Pagès C, Heck N, Vanhoutte P, Caboche J (2011). Alterations of molecular and behavioral responses to cocaine by selective inhibition of Elk-1 phosphorylation. *J Neurosci*, 31(40):14296-14307.

Beyaz F (2004). B Lenfositlerin Gelişimi, Fonksiyonları ve Histokimyasal Özellikleri. *Erciyes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*.67-72. Kayseri

Blom B, Spits H (2006). Development of human lymphoid cells. *Annu Rev Immunol*, 24:287-320.

Bloomfield C, Lindquist L, Arthur D (1981). Chromosomal abnormalities in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res*:4838-4843.

Boros J, O'Donnell A, Donaldson IJ, Kasza A, Zeef L, Sharrocks AD (2009). Overlapping promoter targeting by Elk-1 and other divergent ETS-domain transcription factor family members. *Nucleic Acids Res*, 37:7368-7380.

Buchwalter G, Gross C, Wasylyk B (2004). Ets ternary complex transcription factors. *Gene*, 324:1-14.

Bustin S (2000). Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25(2):169-193.

Bustin S, Benes V, Nolan T, Pfaffl M (2005). Quantitative real time RT-PCR a perspective. *J Mol Endocrinol*, 34(3):567-601.

Calasanz M, Cigudosa J (2008). Molecular cytogenetics in translational oncology: when chromosomes meet genomics. *Clin Transl Oncol*, 10(1):20-29.

Chai J, Tarnawski A (2002). Serum Response Factor: Discovery, Biochemistry, Biological roles and implication for Tissue injury healing. *Journal of physiology and pharmacology*, 53(2):147-157.

Cherng JY, van de Wetering P, Talsma H, Crommelin DJ, Hennink WE (1996). Effect of size and serum proteins on transfection efficiency of poly ((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-plasmid nanoparticles. *Pharm Res*, 13:1038-1042.

Cifuentes RA, Cruz-Tapias P, Rojas-Villarraga A, Anaya JM (2010). ZC3H12A (MCPIP1): molecular characteristics and clinical implications. *Clin Chim Acta*, 411:1862-1868.

Cohen-Armon M (2007). PARP-1 activation in the ERK signaling pathway. *Trends Pharmacol Sci*, 28(11):556-560.

Collins S (1987). The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation and cellular oncogene expression. *Blood*, 70:1233-1244.

Craig RW, Jabs EW, Zhou P, Kozopas KM, Hawkins AL, Rochelle JM, Seldin MF, Griffin CA (1994). Human and mouse chromosomal mapping of the myeloid cell leukemia-1 gene: MCL1 maps to human chromosome 1q21, a region that is frequently altered in preneoplastic and neoplastic disease. *Genomics*, 23:457-463.

De Alvaro C, Nieto-Vazquez I, Rojas JM, Lorenzo M (2008). Nuclear exclusion of forkhead box O and Elk1 and activation of nuclear factor-kappaB are required for C2C12-RasV12C40 myoblast differentiation. *Endocrinology*, 149:793-801.

- Descombes P, Chojkier M, Lichtsteiner S, Falvey E, Schibler U (1990). LAP, a Novel Member of the C/EBP Gene Family, Encodes a Liver-enriched Transcriptional Activator Protein. *genes Dev*, 4(9):1541-1551.
- Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Dohner K, Bentz M, Lichter P (2000). Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 343:1910-1916.
- Drexler H, Matsuo A, MacLeod R (2000). Continuous hematopoietic cell lines as model systems for leukemia-lymphoma research. *Leuk Res*, 24(11):881-911.
- Eilers PHC, Menezes RX (2005). Quantile smoothing of array CGH data. *Bioinformatics*:1146–1153.
- Fernández K, Alarcón P (2013). Development of the Hematopoietic System and Disorders of Hematopoiesis that Present During Infancy and Early Childhood Elsevier, 60(6):1273–1289.
- Gade P, Roy SK, Li H, Nallar SC, Kalvakolanu DV (2008). Critical role for transcription factor C/EBP-beta in regulating the expression of death-associated protein kinase 1. *Mol Cell Biol*, 28:2528-2548.
- Ghanem H, Tank N, Tabbara IA (2012). Prognostic implications of genetic aberrations in acute myelogenous leukemia with normal cytogenetics. *Am J Hematol*, 87:69-77.
- Gill G (2004). SUMO and ubiquitin in the nucleus: different functions, similar mechanisms? *Genes Dev*, 18(17):2046-2059.
- Graves BJ, J.M. P (1998). Specificity within the Ets family of transcription factors. *AdvCancer Research*, 75:1-55.
- Gregorj C, Maria R (2007). ERK1/2 phosphorylation is an independent predictor of complete remission in newly diagnosed adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 109(12):5473-5476.
- Grimwade B (2001). The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2001 Sep;14(3):497-529.
- Hao D, Gao P, Liu P, Zhao J, Wang Y, Yang W, Lu Y, Shi T, Zhang X (2011). AC3-33, a novel secretory protein, inhibits Elk1 transcriptional activity via ERK pathway. *Mol Biol Rep*, 38:1375-1382.
- Hardeland U, Steinacher R, Jiricny J, Schar P (2002). Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover. *EMBO J*, 21:1456-1464.
- Huang J (2010). BCL10 as a new candidate gene for immune response in pigs: cloning, expression and association analysis. *International Journal of Immunogenetics*, 37(2):103-111.
- Jenkinsen NC, Gilbert DJ, Cho BC, Strobel MC, Williams SC, Copeland NG, Johnson PF (1995). Mouse chromosomal location of the CCAAT/enhancer binding proteins C/EBP-beta (Cebpb), C/EBP-delta (Cebpd), and CRP1 (Cebpe). *Genomics*, 28:333-336.
- Jin Q, Liu G, Domeier PP, Ding W, Mulder KM (2013). Decreased tumor progression and invasion by a novel anti-cell motility target for human colorectal carcinoma cells. *PLoS One*, 8:e66439.

- Johnson PF, McKnight SL (1989). Eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Annu Rev Biochem*, 58:799-839.
- Karim F, Urness L, Thummel C (1990). The ETS-domain: a new DNA-binding motif that recognizes a purine-rich core DNA sequence. *Genes Dev*, 4(9):451-453.
- Kasza A (2013). Signal-dependent Elk-1 target genes involved in transcript processing and cell migration. *Biochim Biophys Acta*, 1829(10):1026-1033.
- Kasza A, Wyrzykowska P, Horwacik I, Tymoszek P, Mizgalska D, Palmer K, Rokita H, Sharrocks A, Jura J (2010). Transcription factors Elk-1 and SRF are engaged in IL1-dependent regulation of ZC3H12A expression. *BMC Mol Biol*, 11:14.
- Kearney L, Horsley SW (2005). Molecular cytogenetics in haematological malignancy: current technology and future prospects. *Chromosoma*, 114:286-294.
- Koeffler HP, Golde DW (1980). Human myeloid leukemia cell lines: a review. *Blood*, 56:344-350.
- Kozopas KM, Yang T, Buchan HL, Zhou P, Craig RW (1993). MCL1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90:3516-3520.
- Kutluk T (2010). Çocukluk Çağı Kanserlerinin Epidemiyolojisi. <http://www.ukdk.org/pdf/kitap/11.pdf>. Erişim Tarihi: 4.12.2014
- Kutyavin IV, Lukhtanov EA, Gamper HB, Meyer RB (1997). Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: base composition and backbone effects on hybridization. *Nucleic Acids Res*, 25:3718-3723.
- Landschulz WH, Johnson P, SL. M (1989). The DNA Binding Domain of the Rat Liver Nuclear Protein C/EBP is Bipartite. *Science*, 243:1681-1688.
- Lima Rebouças E, Nascimento Costa I JJ, Passos I MJ, Sousa Passos I JR (2013). Real Time PCR and Importance of Housekeeping Genes for Normalization and Quantification of mRNA Expression in Different Tissues BRAZILIAN ARCHIVES OF BIOLOGY AND TECHNOLOGY AN INTERNATIONAL JOURNAL, 56.
- McCormick F (2011). Cancer therapy based on oncogene addiction. *J Surg Oncol*, 103:464-467.
- Meyer-Siegler K, Mauro D, Seal G, Wurzer J (1991). A human nuclear uracil DNA glycosylase is the 37-kDa subunit of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88(19).
- Mo Y, Vaessen B, Johnston K, Marmorstein R (2000). Structure of the elk-1-DNA complex reveals how DNA-distal residues affect ETS domain recognition of DNA. *Nat Struct Biol*, *Nat Struct Biol*. 2000 Apr;7(4):
- Mulhardt C (2007). *Molecular Biology and Genomics*. Elsevier. No.170s USA.
- Mullighan C (2010). Genetic variation and the risk of acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*, 34(10):1269-1270.

- Ng MH, Ng RK, Kong CT, Jin DY, Chan LC (2010). Activation of Ras-dependent Elk-1 activity by MLL-AF4 family fusion oncoproteins. *Exp Hematol*, 38:481-488.
- Obika S, Reddy SY, Bruice TC (2003). Sequence specific DNA binding of Ets-1 transcription factor: molecular dynamics study on the Ets domain--DNA complexes. *J Mol Biol*, 331:345-359.
- Oikawa T, Yamada T (2003). Molecular biology of the Ets family of transcription factors. *Gene*, 303:11-34.
- Özbey Ü (2006). Kronik myeloid lösemili hastalarda kromozomal anomalilerin belirlenmesi için sitogenetik ve fish tekniği uygulamaları. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*. 20(6) 383-389.
- Ramji DP, Foka P (2002). CCAAT/ enhancer binding proteins:structure, function and regulation. *Biochem J*:561-575.
- Rodriguez-Berriguete G, Fraile B, de Bethencourt FR, Prieto-Folgado A, Bartolome N, Nunez C, Prati B, Martinez-Onsurbe P, Olmedilla G, Paniagua R, Royuela M (2010). Role of IAPs in prostate cancer progression: immunohistochemical study in normal and pathological (benign hyperplastic, prostatic intraepithelial neoplasia and cancer) human prostate. *BMC Cancer*, 10:18.
- Roeder GD (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biol. Sci.* 21, 327-335.
- Schmeier S, MacPherson CR, Essack M, Kaur M, Schaefer U, Suzuki H, Hayashizaki Y, Bajic VB (2009). Deciphering the transcriptional circuitry of microRNA genes expressed during human monocytic differentiation. *BMC Genomics*, 10:595.
- Schmitt JM, Abell E, Wagner A, Davare MA (2010). ERK activation and cell growth require CaM kinases in MCF-7 breast cancer cells. *Mol Cell Biochem*, 335:155-171.
- Schochetman G, Ou CY, Jones WK (1988). Polymerase chain reaction. *J Infect Dis*, 158:1154-1157.
- Sharrocks AD (2002). Complexities in ETS-domain transcription factor function and regulation: lessons from the TCF (ternary complex factor) subfamily. The Colworth Medal Lecture. *Biochem Soc Trans*, 30:1-9.
- Shore P, Sharrocks AD (1995). The MADS-box family of transcription factors. *Eur J Biochem*, 229:1-13.
- Shukla AA JM, Chauhan SS. s. *FEBS J.* (2010). Ets-1/Elk-1 is a critical mediator of dipeptidyl-peptidase III transcription in human glioblastoma cells. *FEBS J*, 277(8):1861-1875.
- Spits H (2002). Development of alphabeta T cells in the human thymus. *Nat Rev Immunol*, 2:270-272.
- Sugiura R, Satoh R, Ishiwata S, Umeda N, Kita A (2011). Role of RNA-Binding Proteins in MAPK Signal Transduction Pathway. *J Signal Transduct*, 2011:109746.
- Totoń E (2011). Protein kinase Cε as a cancer marker and target for anticancer therapy. *Pharmacol Rep*, 63(1):19-29.
- Townsend KJ (1999). Regulation of MCL1 through a Serum Response Factor/Elk-1-mediated Mechanism Links Expression of a Viability-promoting Member of the BCL2 Family to the Induction of Hematopoietic Cell Differentiation. *J Biol Chem*.

- Townsend KJ, Zhou P, Qian L, Bieszczad CK, Lowrey CH, Yen A, Craig RW (1999). Regulation of MCL1 through a serum response factor/Elk-1-mediated mechanism links expression of a viability-promoting member of the BCL2 family to the induction of hematopoietic cell differentiation. *J Biol Chem*, 274:1801-1813.
- Tuncer, M. (2009-2015). T.C. Sağlık Bakanlığı Kanserle Savaş Dairesi Başkanlığı Ulusal Kanser Programı.
- Turgeon M L (1999) *Clinical Hematology*, Lippincott Williams & Wilkins, No:189 Philadelphia
- Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD (2002). The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, 100:2292-2302.
- Yang SH, Bumpass DC, Perkins ND, Sharrocks AD (2002). The ETS domain transcription factor Elk-1 contains a novel class of repression domain. *Mol Cell Biol*, 22:5036-5046.
- Yang SH, Jaffray E, Hay RT, Sharrocks AD (2003). Dynamic interplay of the SUMO and ERK pathways in regulating Elk-1 transcriptional activity. *Mol Cell*, 12:63-74.
- Yasar D, Karadogan I, Alanoglu G, Akkaya B, Luleci G, Salim O, Timuragaoglu A, Toruner GA, Berker-Karauzum S (2010). Array comparative genomic hybridization analysis of adult acute leukemia patients. *Cancer Genet Cytogenet*, 197:122-129.
- Yin CC, Medeiros LJ, Bueso-Ramos CE (2010). Recent advances in the diagnosis and classification of myeloid neoplasms--comments on the 2008 WHO classification. *Int J Lab Hematol*, 32:461-476.
- Yu L, Zhang YD, Zhou J, Yao DM, Li X (2013). Identification of target genes of transcription factor CEBPB in acute promyelocytic leukemia cells induced by all-trans retinoic acid. *Asian Pac J Trop Med*, 6:473-480.
- Zainuddin A, Chua K, Rahim N, Makpol S (2010). Effect of experimental treatment on GAPDH mRNA expression as a housekeeping gene in human diploid fibroblasts. *BMC Mol Biol*.
- Zhang K, Li J, Meng W, Xing H, Yang Y (2010). C/EBPbeta and CHOP participate in tanshinone IIA-induced differentiation and apoptosis of acute promyelocytic leukemia cells in vitro. *Int J Hematol*, 92:571-578.
- Zhang R, Wang J, Ma S, Huang Z, Zhang G (2011). Requirement of Osteopontin in the migration and protection against Taxol-induced apoptosis via the ATX-LPA axis in SGC7901 cells. *BMC Cell Biol*, 12:11.

ÖZGEÇMİŞ

Hande Akalan; 01.01.1988 tarihinde TEKİRDAĞ İlinde doğdu. İlköğrenimini Muratlı Atatürk İlköğretim Okulunda, orta öğrenimini Muratlı Talatpaşa İlköğretim Okulunda, lise öğreniminin Tekirdağ Tuğlacılar Lisesinde (YDA) tamamladı. 2007 yılında girdiği Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden 2011 yılında Biyolog ünvanıyla mezun oldu. 2012 yılından günümüze Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.