

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Fizyoloji Anabilim Dalı**

**HEMATOLOJİK KANSERLERDE TBX3 mRNA  
ve  
PROTEİN DÜZEYİNİN SAPTANMASI**

**Aysun YAŞAR**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Antalya, 2008**

**T.C.  
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
Fizyoloji Anabilim Dalı**

**HEMATOLOJİK KANSERLERDE TBX3 mRNA  
ve  
PROTEİN DÜZEYİNİN SAPTANMASI**

**Aysun YAŞAR**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. B. Uğur YAVUZER**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi  
Tarafından Desteklenmiştir (Proje No: 2006.02.0122.007)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

**Antalya, 2008**

**Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;**

Bu çalışma jürimiz tarafından Fizyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. ..../..../2008

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Uğur YAVUZER  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Fizyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Oğuz Kerim BAŞKURT  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Fizyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Gülsen ÖNER  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Fizyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. V. Nimet UYSAL  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Fizyoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Volkan HAZAR  
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D.  
Onkoloji/Hematoloji B.D.

ONAY: Bu tez Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ..../..../2008 tarih ve ..../.... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nurettin Oğuz  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

Hücre oluşumu, farklılaşması ve hücre ölümü gen ekspresyonunun düzenlenmesi ile gerçekleşmekte ve uygun zamanda, uygun genlerin gereği kadar ekspresyonu ile kontrol edilmektedir. DNA'ya bağlanarak gen ekspresyon düzeylerini kontrol eden transkripsiyon faktörleri, bu regülasyon mekanizmasında çok önemli rol oynarlar. Bu faktörlerin bir grubu da T-box transkripsiyon faktörleri ailesidir.

Birçok TBX geninin embriyonik gelişim esnasında görev yapmasına rağmen, *TBX2* ve *TBX3* genlerinin, meme, akciğer ve over kanserlerinde amplifiye olduğu ve protein düzeylerinin arttığı gösterilmiştir. Bunun yanısıra, Tbx2 ve Tbx3 proteinlerinin ekspresyonunun hücre yaşlanmasını bloke ettiği saptanmıştır. Tbx 2/3, hücre yaşlanmasını indükleyen ve kansere karşı koruyucu bir görev üstlenen Cdkn2a (p19<sup>ARF</sup>)/p53 ile Cdkn1a (p21<sup>Cip</sup>) ve p14 gibi Cdk (cyclin dependent kinase inhibitor) proteinlerini regüle eden gen promoter bölgelerine bağlanarak bu genlerin ekspresyonunu engellemekte veya fonksiyonlarını bozmaktadır. Bu durumda, Tbx2 ve Tbx3 proteinleri, hücre yaşlanmasını bloke ederek kanser oluşumuna neden olan faktörler olarak tanımlanabilir ve sadece meme, over ve akciğer kanserlerinde değil, bir çok başka kanser türünün gelişiminde de bu iki gen ürünü önemli rol oynayabilir. Nitekim, henüz yayınlanmamış verilerimize göre, Tbx2 protein düzeyleri, B hücre gelişiminin erken safhalarında çok yüksek, daha sonraki dönemlerde ise düşük olarak bulunmuştur.

Bu verilerden yola çıkarak, gerek fonksiyon gerekse yapı olarak Tbx2 proteinine çok benzeyen Tbx3'ün hematolojik kanserlerin oluşumunda rol oynayabileceği düşünülmüş ve akut/kronik lösemi, multiple myeloma ile Burkitt lenfomalı hastaların hem kemik iliği hem de periferik kanından izole edilen mononükleer hücrelerde Tbx3 mRNA düzeyleri (Reverse Transcription) RT-PCR yöntemi ile incelenerek, düzeyler sağlıklı kişilerden elde edilen değerlerle karşılaştırılmıştır.

Toplam 26 hasta ile 30 sağlıklı bireyin mononükleer hücrelerinden izole edilen mRNA'ların analizi sonucunda, Tbx3 mRNA düzeyinin hastalarda kontrollere göre daha yüksek olduğu saptanmıştır (p=0.001). Hem kan hem de kemik iliği örnekleri bulunan 10 hastada ise Tbx3 mRNA düzeyleri, kemik iliği ve periferik kan hücreleri arasında önemli bir fark göstermemiştir. Bu çalışmada ayrıca, Tbx3 mRNA düzeylerini ölçmek için farklı teknikler denenmiş ve en güvenilir sonuçlar TaqMan probu kullanılarak gerçekleştirilen eş-zamanlı niceliksel PZR ile elde edilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** T-box, Tbx3, hematolojik kanserler.

## ABSTRACT

Transcription factors are involved in a wide range of normal cellular regulatory processes such as constitutive, inducible, developmental or cell-type specific regulation. Since the absence or malfunctioning of a transcription factor during development may have fatal consequences and transcription deregulation is intimately involved in the oncogenic process, it is likely that many factors controlling cellular differentiation and development are also involved in cancer formation.

Tbx2 and Tbx3 are both transcription factors that belongs to the highly evolutionarily conserved T-box family of proteins. Like all the other members of T-box family of proteins, Tbx2/3 are also involved in development and are expressed in both limb buds and developing retina. In addition to this, some evidence points to a possible role for Tbx2 in cancer. Tbx 2 was found to be amplified in some types of cancer and it was also shown to repress the *ARF* gene expression, indicating that Tbx2 may play a role in cellular proliferation and therefore, cancer formation. In addition, both Tbx2 and Tbx3 were shown to be expressed in preB lymphocyte cell lines and the expression levels go down as the cells reach to a mature state. These findings indicate that both Tbx2 and Tbx3 are important in differentiation process and aberrations in their functions might lead to dedifferentiation and subsequently formation of cancer. Although in many solid tumours, the expression levels of Tbx3 has been found to be increased, the molecular mechanisms underlying the Tbx3 function remain to be elucidated as well as its state in hematological malignancies.

In this study, 26 patients with various hematological malignancies and 30 healthy individuals were analysed for Tbx3 mRNA levels in mononuclear cells obtained from the peripheral blood. We observed increased mRNA levels of Tbx3 in patients compared to healthy controls ( $p=0.001$ ). In 10 of the patients, of whom both the peripheral blood and bone marrow samples were present, Tbx3 mRNA levels did not exhibit a significant difference between the peripheral blood and bone marrow cells of the same patient. In addition, different methods were applied for detection of the Tbx3 mRNA levels and the most reliable results were obtained by real time quantitative PCR using TaqMan probes.

**Key words:** T-box, Tbx3, hematalogical malignancy.

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince desteğini, sonsuz sabrını ve deneyimlerini benden esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Uğur YAVUZER'e, Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine, Prof. Dr. Olcay YEĞİN'e, hasta grubumun oluşturulmasındaki yardımlarından dolayı Uzm. Dr. Vedat UYGUN'a, Prof. Dr. Volkan HAZAR ve Prof. Dr. Ayşen TİMURAĞAOĞLU'na, hasta ve kontrol grubunu oluşturan gönüllülere, verilerimin istatistiksel analizinde yardımlarından dolayı Araş. Gör. Anıl AKTAŞ'a tez çalışmalarım süresince desteklerini benden esirgemeyen Fizyoloji Anabilim Dalı'ndaki asistan arkadaşlarıma, Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde kaprislerimi çeken çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkürler.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
<b>ÖZET</b>	iv
<b>ABSTRACT</b>	v
<b>TEŞEKKÜR</b>	vi
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b>	vii
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b>	ix
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	xii
<b>TABLolar DİZİNİ</b>	xiii
<b>GİRİŞ</b>	1
<b>GENEL BİLGİLER</b>	
2.1.	Hücre Döngüsü ve Kontrol Noktaları 3
2.2.	Karsinogenezis 5
2.2.1.	Tümör baskılayıcı genler ve hücre yaşlanmasının baskılanması 6
2.2.1.1.	Retinoblastoma 6
2.2.1.2.	p53 7
2.2.2.	Onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu 10
2.2.3.	Apoptotik mekanizmanın inhibisyonu 10
2.3.	T-BOX Transkripsiyon Faktörleri 11
2.3.1.	Karakteristik Yapısal Özellikler 12
2.3.2.	İnsan Hastalıklarında T-box Genleri 12
2.4.	TBX3 13
2.5.	Hematolojik Kanserler 15
2.5.1.	Akut lenfositik lösemi (ALL) 16
2.5.2.	Akut myeloid lösemi (AML) 16
2.5.3.	Kronik lenfositik lösemi (KLL) 16
2.5.4.	Kronik myeloid lösemi (KML) 16
<b>HİPOTEZ</b>	17
<b>OLGULAR ve YÖNTEM</b>	
4.1.	Olgular 18
4.2.	Mononükleer Hücre İzolasyonu 18
4.3.	Hücre Kültürü 18
4.4.	Protein Ekstraksiyonu 19
4.5.	SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ve İmmünoBlot 19
4.6.	RNA İzolasyonu 19
4.7.	TBX3 mRNA Düzeyi 20
4.7.1.	Klasik PZR (end-point PCR) 20
4.7.2.	Eş-zamanlı niceliksel PZR (real-time quantitative PCR) 20
4.7.2.1.	SYBR Green I kullanılarak yapılan eş-zamanlı niceliksel PZR 20

4.7.2.2.	TaqMan Probları kullanılarak yapılan eş-zamanlı niceliksel PZR	21
4.8.	İstatistik	22
<b>BULGULAR</b>		
5.1.	Çalışma Grupları	23
5.2.	Klasik PZR ile TBX3 mRNA Düzeyinin Saptanması	23
5.3.	SYBR Green I ile eş-zamanlı niceliksel PZR kullanılarak Tbx3 mRNA düzeylerinin saptanması	25
5.4.	TaqMan problemleri ile eş-zamanlı niceliksel PZR kullanılarak Tbx3 mRNA düzeylerinin saptanması	29
5.5.	Tbx3 Protein Düzeyinin Saptanması	34
<b>TARTIŞMA</b>		35
<b>SONUÇLAR</b>		38
<b>KAYNAKLAR</b>		39
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>		44
<b>EKLER</b>		
Ek.1	TBX3 ve TBX3+2a için çoğaltılan bölge dizini.	
Ek.2	SYBR Green RT-PCR’da TBX3 için çoğaltılan bölge dizini.	
Ek.3	TaqMan RT-PCR’da TBX3 için çoğaltılan bölge dizini ve bu bölgeye özgül prob dizini.	
Ek.4	SYBR Green RT-PCR’da GAPDH için çoğaltılan bölge dizini.	
Ek.5	Çocuk hastaların klinik ve laboratuvar özellikleri ile Tbx3 mRNA’sı düzeyi ölçümlerinden elde edilen floresans değerleri.	
Ek.6	Yetişkin hastaların tanıları ve Tbx3 mRNA’sı düzeyi ölçümlerinden elde edilen floresans değerleri.	
Ek.7	Sağlıklı kontrollerin Tbx3 mRNA’sı düzeyi ölçümlerinden elde edilen floresans değerleri.	
Ek.8	Etik kurul kararı.	



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>A</b>	: Adenin
<b>ABL</b>	: Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene
<b>ACTH</b>	: Andrenokortikotropin Hormon
<b>AF4</b>	: ALL1 Fused Gene From Choromosome 4
<b>AF9</b>	: ALL1 Fused Gene From Choromosome 9
<b>ALL</b>	: Akut Lenfoblastik Lösemi
<b>AML</b>	: Akut Myeloid Lösemi
<b>AML1</b>	: Acute Myeloid Leukemia 1 Gene
<b>anti-TBX3</b>	: TBX3 antibody
<b>ARF</b>	: Alternate Reading Frame
<b>ASD</b>	: Atrial septal defect
<b>AT</b>	: Ataxia-Telangiectasia, ATM
<b>ATR</b>	: Ataxia-Telangiectasia and RAD3-Related
<b>BAX</b>	: Bcl-2-Associated X Protein
<b>Bcl-2</b>	: B-cell lymphoma 2
<b>BCR</b>	: Breakpoint Cluster Region
<b>BL</b>	: Burkitt Lymphoma
<b>bp</b>	: Base Pair
<b>Bub</b>	: Budding Uninhibited by Benzimidazoles
<b>C</b>	: Cytosine
<b>CBFB</b>	: Core-Binding Factor, Beta Subunit
<b>CDK</b>	: Cyclin-Dependent Kinase
<b>CDKI</b>	: Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor
<b>CDKN1A</b>	: Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A, CDK-Interacting Protein 1; CIP1 Wildtype p53-Activated Fragment 1; WAF1, p21
<b>CDKN2A</b>	: Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A, p16(INK4A), p14(ARF), p19(ARF)
<b>CFU-L</b>	: Colony-Forming Unit-Lymphoid
<b>CFU-GEMM</b>	: Colony-Forming Unit-Granulocyte-Erythrocyte- Megakaryocytemacrophage
<b>CPX</b>	: Cleft Palate X-Linked
<b>c-DNA</b>	: Complementary DNA
<b>DGS</b>	: DiGeorge Syndrome
<b>DMEM</b>	: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
<b>DNA</b>	: Deoxyribonucleic Acid
<b>dNTP</b>	: Deoxyribonucleotide Triphosphate
<b>DTT</b>	: Dithiothreitol
<b>E1A</b>	: Adenovirus 5 Early Region 1A
<b>E2F</b>	: Transcription Factors

<b>E2F-1</b>	: E2F Transcription Factor 1
<b>ECL</b>	: Enhanced Chemiluminescence
<b>EDTA</b>	: Etilendiamin Tetraasetikasit
<b>ETO</b>	: Core-Binding Factor, Alpha Subunit 2, Translocated to, 1; CBFA2T1
<b>E2A</b>	: Immunoglobulin Enhancer-Binding Factors E12/E47
<b>FBS</b>	: Fetal Bovine Serum
<b>G</b>	: Guanine
<b>GADD45</b>	: Growth Arrest and DNA Damage Inducible Gene
<b>GAPDH</b>	: Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
<b>HCC</b>	: Hepato Cellular Carcinoma
<b>HOS</b>	: Holt-Oram Syndrome
<b>HRP</b>	: Horse Radish Peroxidase
<b>IgG</b>	: Immunoglobulin G
<b>KLL</b>	: Kronik Lenfoblastik Lösemi
<b>KML</b>	: Kronik Myeloid Lösemi
<b>MAPK</b>	: Mitogen-Activated Protein Kinase
<b>MC3T3-E1</b>	: Fare osteoblast benzeri hücre hattı
<b>MDM2</b>	: Murine Double Minute
<b>MEF</b>	: Mouse Embriyonic Fibroblast
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	: Magnesium Chloride
<b>MLL</b>	: Myeloid/Lymphoid or Mixed Lineage Leukemia
<b>MM</b>	: Multiple Myeloma
<b>mRNA</b>	: Messenger Ribonucleic Acid
<b>MYC</b>	: Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene
<b>NaCl</b>	: Sodium chloride
<b>omb</b>	: Optomotor-Blind
<b>OMIM</b>	: Online Mendelian Inheritance in Man
<b>p53</b>	: Protein 53
<b>PBS</b>	: Phosphate Buffered Saline
<b>PBX1</b>	: Pre-B-Cell Leukemia Transcription Factor 1
<b>PML</b>	: Acute Promyelocytic Leukemia
<b>PZR</b>	: Polimeriz Zincir Reaksiyonu
<b>RARA</b>	: Retinoic Acid Receptor , Alpha
<b>RAS</b>	: Rat Sarcoma Viral Oncogene
<b>RB</b>	: Retinoblastoma
<b>rpm</b>	: Revolutions Per Minute
<b>RT-PCR</b>	: Real-Time Polymerase Chain Reaction
<b>SDS</b>	: Sodium Dodecyl Sulfate
<b>SPS</b>	: Small Patella syndrome
<b>T</b>	: Thymine
<b>TBE</b>	: Tris Boric acid Edta
<b>TBS-T</b>	: Tris-Buffered Saline-Tween
<b>T-box/TBX</b>	: T-box Protein Family
<b>TEL</b>	: Translocation, ETS, Leukemia
<b>TRP-1</b>	: Tyrosinase-Related Protein 1
<b>UMS</b>	: Ulnar-Mammary Syndrome
<b>UPL</b>	: Universal Probe Library

**Wnt** : Wingless-Type MMTV Integration Site family  
**VegT** : Transcription Factor

Gen isimleri büyük harf, bu genlerin kodladıkları proteinler ise küçük harflerle ifade edilmiştir.

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa No
2.1. Hücre döngüsü ve siklin/cdk kompleksleri	4
2.2. Hücre döngüsünün kontrol sistemi	5
2.3. G1/S kontrol noktası	7
2.4. p53 aktivasyonu ve inaktivasyonu	9
2.5. Tbx3 yolağı	14
5.1. Hepatosellülerkarsinoma hücre hatlarında TBX3 gen ekspresyonu	24
5.2. Bazı hasta ve kontrollerde GAPDH gen ekspresyonu	25
5.3. SYBR Green I çalışma mekanizması	26
5.4. Mahlawu hücre hattında Tbx3 mRNA ekspresyonu	26
5.5. SYBR Green I kullanarak eş-zamanlı PZR ile Tbx3 düzeylerinin saptanması	28
5.6. TaqMan probunun çalışma prensibi	29
5.7. TaqMan problemleri kullanılarak yapılan eş-zamanlı PZR ile Tbx3 düzeylerinin saptanması	30
5.8. Hasta ve Kontrol Gruplarında Tbx3 mRNA düzeyleri	31
5.9. ALL tanısı almış hastaların Tbx3 mRNA düzeyi	32
5.10. ALL ve AML hastalarındaki Tbx3 mRNA düzeyi	32
5.11. Periferik kan ve kemik iliği örneklerinde Tbx3 mRNA düzeyi	33

## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo</b>		<b>Sayfa No</b>
<b>2.1.</b>	Siklinler ve siklin bağımlı kinazlar	<b>4</b>
<b>2.2.</b>	T-box genleri ve ilişkili oldukları hastalıklar	<b>13</b>
<b>4.1.</b>	SYBR Green I ile kullanılan PZR koşulları	<b>21</b>
<b>4.2.</b>	TaqMan problemleri ile eş zamanlı niceliksel PZR koşulları	<b>22</b>
<b>5.1.</b>	Hastaların tanıları, hastaların ve kontrollerin yaşları ve cinsiyetleri	<b>23</b>
<b>5.2.</b>	Kemik iliği örnekleri çalışılan hastaların kan ve kemik iliklerindeki Tbx3 mRNA düzeyi ve blast hücre oranları	<b>34</b>

## GİRİŞ

Hücre oluşumu, farklılaşması ve hücre ölümü gen ekspresyonunun düzenlenmesi ile gerçekleşmekte ve uygun zamanda, uygun genlerin gereği kadar ekspresyonu ile kontrol edilmektedir. Gen ekspresyonunun çok sıkı bir şekilde kontrolü, hücrelerin ve sistemlerin düzenli çalışması için gereklidir. Gerek hücreye özgü gerekse her hücrede bulunan ama farklı kombinasyonlarda DNA'ya bağlanarak gen ekspresyon düzeylerini kontrol eden transkripsiyon faktörleri, bu regülasyon mekanizmasında çok önemli rol oynarlar.

Transkripsiyon faktörleri spesifik DNA dizinlerine doğrudan bağlanırlar. En az iki yapısal ve fonksiyonel bölge taşırlar: Dizine-özel DNA bağlanma bölgesi ve transkripsiyonu arttırıcı/baskılayıcı bölgesi. Aynı grupta bulunan transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanma bölgeleri birbirine benzemektedir <sup>1</sup>.

*Drosophila optomotor-blind (omb)* ve fare *Brachyury/T* geninin kodladığı proteinlerin amino ucunda yer alan DNA'ya bağlanma bölgesinin iki protein arasında benzerlik gösterdiği bulunmuştur. İncelemeler sonucunda yaklaşık 50 proteinde de benzer dizinler tespit edilmiştir. Bu bölge T-box ve bu proteinleri kodlayan genler de TBX gen ailesi olarak isimlendirilmiştir <sup>1</sup>.

T-box proteinleri spesifik organlarda veya hücre tiplerinde; döllenen yumurtadan organogenesise kadar <sup>2</sup> gelişimin birçok aşamasında, sinir sistemi, iskelet, böbrek, akciğerler, meme bezi ve kas gibi çeşitli dokularda eksprese olmaktadır. Normal gelişim için TBX genlerinin doğru yerde, doğru zamanda ve doğru seviyede eksprese olması gerekmektedir <sup>3</sup>. Yapılan analizlerde Tbx proteinlerinin hücre içerisinde çekirdekte yer aldığı gösterilmiştir <sup>1</sup>.

TBX genlerindeki mutasyonlar insanda çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. Örneğin *TBX1*'deki mutasyon Di George sendromuna, *TBX3* mutasyonları Ulnar-mammary sendromuna, *TBX5* mutasyonları Holt-Oram sendromuna, *TBX19* mutasyonları izole ACTH eksikliğine ve *TBX22* mutasyonları ise yarı damak oluşumuna neden olmaktadır <sup>4</sup>.

Birçok TBX geni embriyonik gelişim esnasında görev alırlar ve genelde transkripsiyonu arttırıcı olarak etki gösterirler. Ancak Tbx2 ve Tbx3, diğer tüm Tbx proteinlerinden farklı olarak birer transkripsiyon baskılayıcısıdır ve yine diğer T-box protein ailesi üyelerinden farklı olarak bazı tür kanserlerde (meme, akciğer ve over) ya gen loküslerinde amplifikasyon ya da protein düzeylerinde artış saptanmıştır <sup>5,6</sup>. *TBX2* ve *TBX3* gen ürünlerinin kanserli dokulardaki artışı ve baskıladıkları genler göz önüne alındığında her iki proteinin de kanser oluşumunda rol oynadığı ortaya çıkmaktadır. Zira Tbx2/3'ün baskıladığı genler, hücre döngüsünü durduran ve/veya hücreleri yaşlanmaya yönlendiren genlerdir. Her iki protein de Cdkn2a (p19<sup>ARF</sup>) ile

Cdkn1a (p21<sup>Cip</sup>) ve p14 gibi Cdk (cyclin dependent kinase inhibitor) proteinlerini kodlayan genlerin promoter bölgelerine bağlanarak bu genlerin ekspresyonunu baskılamaktadırlar<sup>5, 7, 8</sup>. Tümör baskılayıcı proteinler ve CDKI'nın yanısıra, Tbx2 proteininin melanositlerde farklılaşma markerı olarak bilinen *TRP-1* promoterına da bağlanarak *TRP-1* gen ekspresyonunu bloke ettiği gösterilmiştir<sup>9</sup>. Tbx2/3 proteinlerinin melanositlerdeki etkileri sadece hücre farklılaşması üzerine değildir. Melanoma hücre hatlarında yapılan çalışmalarda Tbx2 proteininin hücre yaşlanmasını baskıladığı, dolayısıyla hücreleri bölünmeye yönlendirdiği gösterilmiştir<sup>10,11</sup>.

Kanserin oluşumunda etkin olan mekanizmalar dört grupta toplanabilir. Bunlar; proto-onkogenlerin kontrolsüz aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonlarını yapamaması, apoptozis mekanizmasının çalışmaması ve son yıllarda ortaya konulduğu üzere, hücre yaşlanmasının baskılanmasıdır. Bu durumda, Tbx2 ve Tbx3 proteinleri, hücre yaşlanmasını bloke ederek kanser oluşumuna neden olan faktörler olarak tanımlanabilir ve belki de birçok kanser türünün gelişiminde de rol oynayabilirler. İlginç olarak, henüz yayınlanmamış verilere göre Tbx2 protein düzeyi, B hücre gelişiminin ilk safhalarında yüksek iken, hücreler farklılaşarak olgun hale geldikçe düşmeye başlamaktadır (B. Bilican ve U. Yavuzer, yayınlanmamış veri). Yani B hücrelerinin fizyolojik gelişimi esnasında Tbx2 proteinin düzeyleri de düşmektedir.

Bu bulgu, fizyolojik yolun bozulması ve temel olarak farklılaşmış hücrelerin yeniden farklılaşmamış hale dönüşmeleri (dedifferentiation) ile karakterize olan kanser hastalığında da Tbx2 ve ona çok benzeyen Tbx3 mRNA ve protein düzeylerinin artabileceğini düşündürmüştür. Bu nedenle de bu çalışmada, TBX3 gen ürününün hematolojik kanserlerdeki olası rolü incelenmiştir. Bu amaçla, akut ve kronik lösemi, multiple myeloma ile Burkitt lenfomalı hastaların hem kemik iliği hem de periferik kanından izole edilen mononükleer hücrelerde Tbx3 mRNA düzeyleri saptanmış ve sağlıklı kişilerle karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada ayrıca, Tbx3 mRNA düzeylerini ölçmek için farklı teknikler denenmiş ve en güvenilir sonuçlar TaqMan probu kullanılarak gerçekleştirilen eş-zamanlı niceliksel PZR ile elde edilmiştir.

## GENEL BİLGİLER

### 2.1. Hücre Döngüsü ve Kontrol Noktaları

Hücre döngüsü; çoğalmak üzere uyarılmış bir hücrede gerçekleşen, bir dizi geçici biyokimyasal aktivite ve morfolojik değişikliklerin görüldüğü bir süreçtir ve bu sürecin sonunda, morfolojisi ve genetiği aynı olan iki hücre oluşur. Hücre döngüsünün 4 evresi bulunmaktadır. İlk hazırlık evresi (Gap1-G1), hücrenin bölünmeye hazırlandığı dönemdir ve DNA replikasyonu için gereken tüm ögeler sentezlenerek hücre kütlesi büyür. İkinci evre sentez (S) evresi olarak adlandırılır ve DNA kopyalanarak iki katına çıkartılır. Sentez evresini ikinci hazırlık evresi (Gap2-G2) izler ve bu dönemde de hücrenin bölünmesi için gereken son hazırlıklar yapılır. Son evre mitoz (M) evresidir ve hücre ikiye bölünerek tamamen anne hücreye benzeyen iki hücre oluşur. Ökaryotik hücrelerde, bir evreden diğerine geçiş ile bir evrede tamamlanması gereken olaylar bitmeden diğer evreye geçişin engellenmesi “hücre döngüsü kontrol sistemi” tarafından gerçekleştirilir. Bu kontrol sistemi bir grup proteinden oluşur ve bu proteinlerin regülasyonu tamamen hücre dışından gelen sinyallere bağlıdır. Bu sinyaller, hücre yüzeyi veya hücre içi reseptörlere bağlanarak ligand-reseptör tipine göre farklılıklar gösteren bir sinyal ileti yolağını etkin hale getirir ve “hücre döngüsü kontrol sistemini” aktifleştirerek hücreyi bölünmeye sevk eder veya kontrol sistemini bloke ederek hücre döngüsünü durdurur. Dolayısıyla, “hücre döngüsü kontrol sistemi” dokulardaki hücre sayısının regülasyonunda temel görevi üstlenmektedir. Bu regülasyonun bozulması halinde yersiz ve zamansız hücre kayıpları olabileceği gibi, sistemin aşırı çalışması durumunda da kontrolsüz hücre çoğalması gerçekleşmektedir.

Hücre döngüsü kontrol sisteminde başlıca 4 grup protein görev almaktadır. Bunlardan ilk 3 gruptakiler “hücre döngüsü çekirdek kontrol sistemi” proteinleri olarak kabul edilirken, son gruptakiler dış sinyallere göre çekirdek kontrol sistemindeki proteinlerin aktivitesini düzenleyen “kontrol noktası-checkpoint” proteinleri olarak adlandırılırlar:

1. siklinler (A, B, D1, D2, D3 ve E)
2. siklin-bağımlı serin/treonin protein kinazlar (CDK: CDK1, CDK2, CDK4, CDK5, CDK6 ve CDK7)
3. siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKI: p15, p18, CDKN2A/p19, CDKN1A/p21 ve p27)
4. Hücre döngüsü kontrol noktalarında görev alan proteinler (p53, Rb, Bub, AT, ATR, v.b)

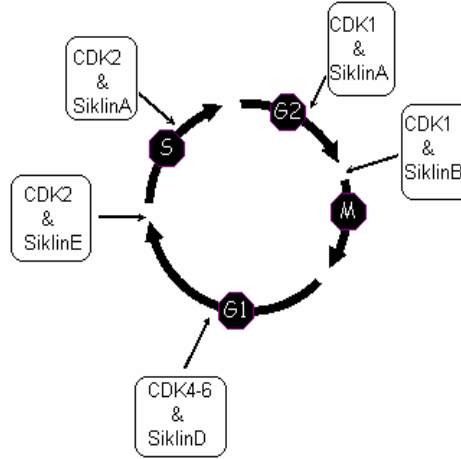
Bu proteinlerden siklinler, adlarından da belli olduğu üzere, siklik olarak sentezlenir ve yıkılırlar. Hücre döngüsünün her bir evresinde ayrı bir siklin proteini görev almaktadır. Cdk ve CdkI proteinleri ise transkripsiyonel olarak regüle edilmeseler bile (bu proteinlerin düzeyi hücre döngüsünün her evresinde aynıdır) bağlandıkları siklin proteinine göre aktiviteleri ve hedef proteinleri değişir. O



nedenle, bir CDK proteini birden fazla siklin ile bağlanabilir ama her bir siklin/CDK kompleksi farklı aktivite ve özellikte kinaz oluşturacağından etkileri de farklı olmaktadır (Tablo 2.1, Şekil 2.1). Aynı şekilde, Cdk proteinleri de birden fazla Cdk proteinine bağlanabilir ve böylece Cdk proteinlerinin siklinlerle bağlanmasını engelleyerek aktif kinaz oluşumunu önlemiş olurlar.

**Tablo 2.1.** Siklinler ve siklin bağımlı kinazlar.

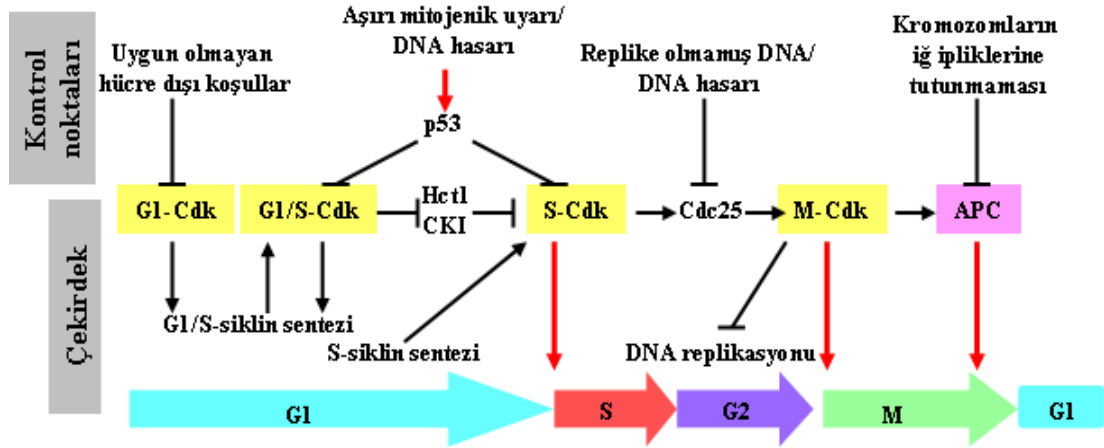
	<b>Siklin</b>	<b>Etkileştiği cdk</b>
G1 siklin	SiklinD	Cdk4 ve Cdk6
G1 siklin	SiklinE	Cdk2
S-G2 siklin	SiklinA	Cdk2 ve Cdk1
M siklin	SiklinB	Cdk1



**Şekil 2.1. Hücre döngüsü ve siklin/cdk kompleksleri:** SiklinD başlama siklini olarak adlandırılır ve büyüme faktörleri veya mitojenlere yanıt olarak eksprese edilir. Cdk4 ve Cdk6'yı regüle eder. Mitojenler ortamdan uzaklaştırıldığında ise hızla yıkılır. Siklin E, G1/S fazlarının sınırında geçici olarak sentez edilir ve hücre S fazına girdiği anda hızla yıkılır. Cdk2'yi düzenler. Siklin A ve B mitotik siklinlerdir. Siklin A, S fazı boyunca sentez edilir ve anafaz sırasında da yıkılır. Cdk2 ve Cdk1 ile kompleks yapar. Siklin B ise S fazının geç döneminde sentez edilir ve Cdk1 ile etkileşime girer. Siklin B'nin anafazda yıkılmasıyla birlikte hücre mitozdan çıkar ve G1'e tekrar geri döner.

Hücre döngüsünün hatasız tamamlanabilmesi ve bir evre sona ermeden diğerinin başlamaması hücre döngüsü içinde yer alan bazı kontrol noktaları tarafından sağlanmaktadır. İlk kontrol noktası geç G1 fazında, S fazına girmeden öncedir. Bu aşamada hücre, DNA replikasyonu için gereken bütün moleküllerini

hazırlamış ve hücre kütleini arttırmış haldedir. DNA'da da herhangi bir hasar bulunmamalı ve eğer bir hasar varsa, sentez evresine geçmeden bu hasarın tamir edilmesi gerekmektedir. Bu anlamda G1 kontrol noktasının en önemli proteini p53'tür. Bir transkripsiyon faktörü olan p53, Cdk proteinlerini yapan genleri etkin hale getirerek, hücre döngüsünün durmasına neden olur. İkinci kontrol noktası ise hücreler mitoz fazına girmeden hemen öncedir (G2-kontrol noktası). Bu noktada da replikasyonu yapılmış olan DNA'nın bütünlüğü ve mutasyon içerip içermediği kontrol edilmekte ve bir hasar varsa hücre döngüsü durdurularak DNA'nın tamiri sağlanmaktadır. Üçüncü kontrol noktası M (mitoz) evresinde bulunmaktadır. Burada görev alan proteinlerin en önemli görevi, kromozomların tümünün metafaz plağına tam ve doğru düzlemde yerleştiğini kontrol etmektir. Böylece bölünme anında kromozomların yavru hücrelere geçerken tam ve doğru sayıda geçmeleri sağlanmış olur. Bu kontrol noktalarında görev alan proteinlerin fonksiyonlarının bozulması halinde hücre döngüsünde de aksaklıklar oluşur ve bu durum kendini kromozom anomalilerine bağlı hastalıklardan kansere kadar yayılan geniş bir hastalık yelpazesi ile gösterir<sup>12</sup>.



**Şekil 2.2. Hücre döngüsünün kontrol sistemi:** Hücre döngüsü kontrol sisteminin merkezi çeşitli siklin-Cdk komplekslerinden oluşur. Her bir kompleksin aktivitesi çeşitli kontrol noktası inhibitörlerinden etkilenmektedir. Hücre dışı koşullar, hücre hasarı ve tamamlanmamış hücre döngüsü bu inhibitörlere örnek verilebilir. Bu mekanizmalar erken embriyonik hücreler gibi bazı hücre tiplerinde yoktur.

## 2.2. Karsinogenezis

Normal hücrelerin, homeostatik geribildirim mekanizmalara olan yanıtının kontrolden çıkıp, kontrolsüz ve spontan olarak büyüeyebilen ve komşu dokulara invazyon yapabilen hücre şekillerine dönüşmelerine "karsinogenezis" denir.

Normal bir hücre bölünerek çoğalır, farklılaşır, yaşlanır ve apoptozise uğrar. Fakat tümör hücreleri, yaşlanma ve apoptozise girebilme yetilerini yitirdiklerinden sürekli bölünerek çoğalırlar. Sonuç olarak dokuda, hücre sayısının artışına bağlı olarak "tümör" adı verilen bir kitle oluşur. Tümörler, malign (kötü huylu) ve benign (iyi huylu) olmak üzere ikiye ayrılır. Malign tümörler; agresif (hücre çoğalması belirli sınırlar içinde değildir), invaziv (malign tümörü oluşturan hücreler çevre

dokulara da yayılır) ve metastatik (tümörü oluşturan hücreler uzak organları da tutabilir) olmaları nedeniyle benign tümörlerden farklıdır. Malign tümörleri oluşturan hücrelerin kendilerine özgü özellikleri vardır;

**Klonal orijin:** Çoğu kanser hücresi tek bir anormal hücreden oluşur. Bu klonlar ya bir dokunun birden fazla hücresinin karsinojene maruz kalması gibi saha hasarı sonucu ya da bazı genlerdeki kalıtsal hasarlar sonucu oluşurlar<sup>12</sup>.

**Ölümsüzlük:** Çoğu normal hücrenin bölünme sayısı sınırlı olmasına karşın kanser hücreleri sınırsız sayıda bölünüp aşırı miktarda hücre oluştururlar. Ölümsüzlük mekanizmalarından biri de kromozom uçları olan telomerlerin kısalmasındadır. İnsan telomerleri kromozomların uçlarında yerleşmiş TTAGGG dizi tekrarlarından oluşan spesifik dizinlerdir. Çoğu normal hücre tipinde, hücreler farklılaşırken telomeraz programlı bir şekilde gittikçe azalır. Bu mekanizma, hücre ömrünü belirleyen bir saat gibidir. Bu sayede telomerler hızla kısalır ve sonuçta hücre ölümü gerçekleşir. Ancak kanser hücresinde telomeraz aktivitesi nedeniyle kısalan telomerlerin hemen hegzamerik yapılarla tamamlandığı görülür. Sonuçta, telomerlerin uzunluğu sabit kalır ve hücre sınırsız sayıda çoğalır. Bu da hücreyi ölümsüz kılar<sup>12, 13</sup>.

**Kontakt inhibisyonun ve substratuma tutunarak büyüme özelliklerinin kaybı:** Kültür ortamında büyüyen normal hücreler substratuma yapışamazlarsa bölünemezler. Çoğalıp üzerinde büyüdükleri tüm yüzeyi tek tabaka halinde doldurduklarında da bölünme özelliklerini kaybederler. Hatta besiyerleri bölünmeleri için gerekli tüm büyüme faktörleri ve diğer besin elemanlarını içerse bile bölünmezler. Kanser hücreleri ise, yarı katı bir besiyerinde substratuma yapışmaya gerek duymadan bağımsız olarak bölünmeye, büyümeye devam edebilirler<sup>12</sup>.

Kanser hücresinin aşırı bölünmesinin nedenleri üç ana başlık altında incelenebilir:

- Tümör baskılayıcı genler ve hücre yaşlanmasının baskılanması
- Onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu
- Apoptotik mekanizmanın baskılanması

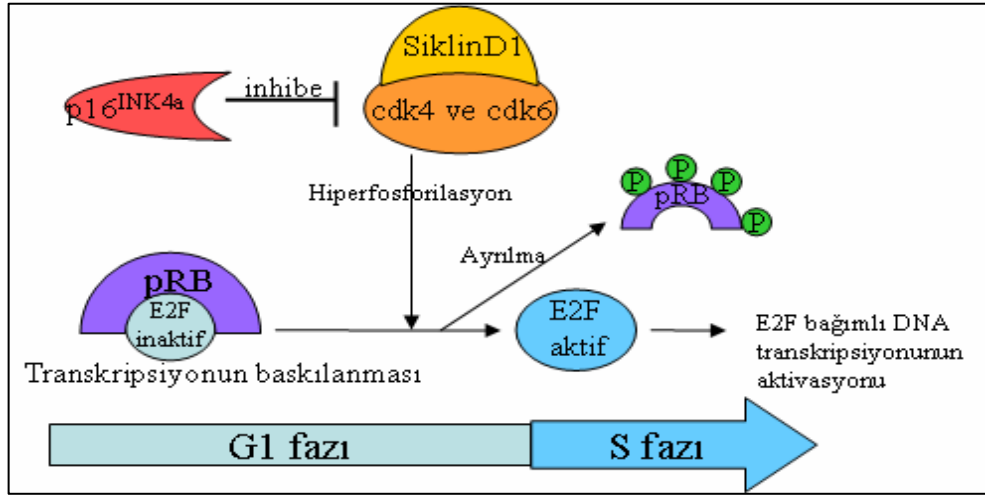
### **2.2.1. Tümör baskılayıcı genler ve hücre yaşlanmasının baskılanması**

Bu genler hücre döngüsünün baskılanmasından sorumlu genlerdir. Bozuklukları halinde organizma genetik olarak anormal hücreleri yok edemediğinden kanser gelişir. Resesif genlerdir; yani bu genlerin çalışmaması nedeniyle oluşmuş bir malign hücre normal hücre ile hibridleştirildiğinde normalleşir. En iyi bilinenleri retinoblastoma (Rb) ve p53'dür.

#### **2.2.1.1. Retinoblastoma**

RB ilk bulunan tümör süpresör genidir. 13q14'de lokalize olup hücreler farklılaşmada çok önemli bir role sahiptir. Rb hücre döngüsünün istirahat fazında E2F transkripsiyon faktörüne bağlanır. E2F Rb'ya bağlı olduğu sürece S fazını tetikleyecek genleri aktive edemez. DNA'da hasar yok ise Rb, G1'in sonunda siklinD/cdk4-6 kompleksleri tarafından fosforile edilir. Rb fosforile olunca E2F'den

ayrılır ve serbestleşen E2F, S fazı için gerekli olan genlerin promotörüne bağlanarak bu genlerin ekspresyonunu sağlar ve böylece S fazı başlamış olur. Dolayısıyla, S fazına geçiş için kilit mekanizma Rb'nin siklin/Cdk4–6 tarafından fosforlanmasıdır. Siklin/Cdk4–6 kompleksinin oluşmaması veya Cdk proteinlerinin aktif olarak Cdk proteinleri (p16, p21, p27) tarafından inhibe edilmesi, Rb'nin fosforilasyonunu engelleyeceğinden E2F transkripsiyon faktörü serbestleşemeyecek ve S fazına geçiş gerçekleşmeyecektir. Yani bu noktada sadece Rb proteini değil, Cdk proteinleri de tümör baskılayıcı olarak çalışmaktadırlar ve bu proteinleri kodlayan genlerdeki fonksiyonel bir mutasyon, tümör baskılayıcıların çalışmamasına ve hücrenin kontrolsüz çoğalmasına neden olacaktır<sup>14-16</sup>.



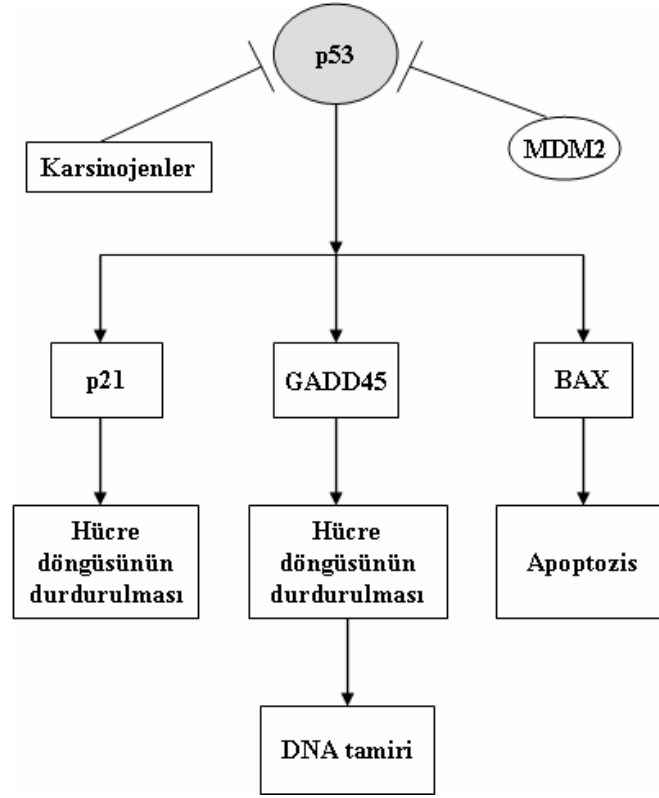
**Şekil 2.3. G1/S kontrol noktası:** Rb E2F'e bağlı olduğu sürece döngü G1'den S'e ilerleyemez. Rb, siklinD-cdk4/6 kompleksi tarafından fosforile edildiğinde, E2F serbest kalır ve S fazı başlar. p16 ise siklin/cdk kompleksini inhibe ederek, döngünün G1 fazında kalmasını gerçekleştirir.

### 2.2.1.2. p53

17p13 lokusunda yerleşmiş olan p53, tümör baskılayıcı görevi olan bir transkripsiyon faktörüdür. DNA hasarı ya da hipoksi veya ribonükleotid yokluğu gibi hücre stresler, hücre içinde p53 miktarının artmasına neden olur. Artan p53, genomun stabilizasyonunu sağlamak için G1 fazında hücre döngüsünün durmasına ve hasarlı DNA bölgesine DNA tamir proteinlerinin yönlendirilmesine neden olur. Böylece, hasarlı DNA, "S" evresine girmeden tamir edilir. Eğer hasar, tamir sınırlarının dışındaysa, yine p53 proteininin etkisiyle başlayan olaylar zinciri sonucunda hücre ölümü (apoptozis) gerçekleşir. Yani genom bütünlüğünü korumak için hücre içi miktarı artan p53; hücre döngüsünün G1 fazında durdurulması, hücre büyümesinin sonlandırılması ve programlı hücre ölümünde rol alır<sup>17-19</sup>. Bu işlevlerini yerine getirirken de p21, MDM2, BAX ve GADD45 gibi genlerin ekspresyonlarını arttırmaktadır. Böylece Bax proteinlerinin yapılması ile apoptozis, p21 ve Gadd45 proteinlerinin yapımı ile de hücre döngüsünün durdurulması sağlanmış olur (Şekil 2.4). Mdm2, p53'e bağlanarak proteini inaktif bir şekilde tutmakta ve degradasyona yönlendirmektedir. Bu nedenle, tehlike sinyali almayan

hücrelerde p53 düzeyleri son derece düşük olarak tutulmaktadır <sup>7</sup>. p53'ün *MDM2* promoterına bağlanarak kendini inhibe edecek proteinin yapımına neden olması ise bir negatif geri-besleme yöntemidir. Hücre fonksiyonları için çok önemli görevler üstlenen tüm proteinlerde olduğu gibi p53 aktivasyonu da fosforilasyon, asetilasyon, degradasyon gibi bir çok kompleks posttranskripsiyonel mekanizmalar ile düzenlenmektedir <sup>20</sup>. Tüm bunlardan anlaşılacağı üzere, p53 fonksiyonlarının bozulması veya hiç yapılamaması sonucunda hücre döngüsünün G1-kontrol noktası çalışmayacağından hasarlı bile olsa hücre, DNA replikasyonuna girecek ve hasarlı genomik bilginin yavru hücrelere geçmesine neden olacaktır. Preneoplastik ve neoplastik hücrelerin klonal olarak gelişiminde de bu temel mekanizma rol oynar <sup>14, 21, 22</sup> ve birçok farklı kanser türünde p53 gen mutasyonlarının bulunması bu proteinin tümör oluşumunun baskılanmasındaki önemli rolünü desteklemektedir <sup>7</sup>.

DNA hasarı olumsuz çevre koşulları (zehirli gazlar, radyasyon vb) yanı sıra, esas olarak hücrenin fizyolojik metabolizması nedeniyle açığa çıkan serbest oksijen radikalleri tarafından oluşturulmaktadır. Dolayısıyla, p53 tarafından hücre döngüsünün durdurulması ve DNA tamiri yapıldıktan sonra döngünün tekrar başlaması bölünen hücrelerin rutin bir özelliğidir. Ancak yine p53 proteini etkisi ile gerçekleşen bir başka fizyolojik hücre mekanizması olan "hücre yaşlanması"nda durum biraz daha farklıdır. Yaşlı hücrede de aktif olarak bölünme durdurulur, ancak bu durum kalıcıdır. Yani hücrenin fizyolojik koşullarda tekrar hücre döngüsüne başlaması olanaksızdır. Hücre yaşlanmasını indükleyen faktörler tam olarak bilinmese de, kısaca ARF-mdm2-p53 yolu olarak adlandırılan olaylar zincirinin hücre yaşlanmasını düzenlediği deneysel olarak gösterilmiştir <sup>23</sup>.



**Şekil 2.4. p53 aktivasyonu ve inaktivasyonu:** DNA hasarı sonucu aktif olan p53 bir takım proteinleri de aktifleştirir. Bunlardan p21 genomik stabiliteyi sağlarken, Gadd45 hücre döngüsünü durdurarak DNA tamiri için hücreye zaman sağlar. Eğer hasar tamir edilemeyecek kadar fazla ise Bax hücreyi apoptozise götürür. p53 aynı zamanda mdm2'yi de regüle eder. Mdm2 p53 ile etkileşerek onu ya degrade eder ya da aktivitesini inhibe eder.

Çeşitli onkogenlerin aşırı ekspresyonu veya mitojenik sinyallerle, p19<sup>ARF</sup> (insanda CDKN2A/p14<sup>ARF</sup>) ekspresyonu uyarılır. Yaşlanmanın uyarılması için bu gereklidir ve Cdkn2a'dan yoksun hücreler in vitro olarak sürekli hayattadırlar<sup>24</sup>. Arf proteini p53'ü ve onun hedef genlerinin ekspresyonunu durduran mdm2'ye bağlanır ve böylece p53'ün ubiquitin yolağı ile yıkılması önlediğinden, p53 hücre içinde birikmeye başlar ve aktifleşir<sup>25, 26</sup>. Yabancıl tip p53 içeren hücrelerde p19<sup>ARF</sup> ekspresyonu, hücre döngüsünün durmasına ve hücrenin yaşlanmasına neden olmakta iken, p53'ten yoksun hücrelerde bu etki görülmemektedir.<sup>24</sup>

p19ARF-mdm2-p53 yolağı primer hücreleri onkogenik dönüşüme karşı korumada gerekli bir yolaktır. *c-myc*, adenovirüs *E1A*, *E2F-1* ve *ras*<sup>V12</sup> gibi onkogenlerin aktivasyonu ile uyarılan anormal mitojenik sinyal p19<sup>ARF</sup> seviyesinin artmasını, dolayısıyla p53'ün aktivasyonunu sağlamaktadır<sup>27-30</sup>. Embriyonik hücrelerde bu yolak p53 bağımlı ya da bağımsız hücre döngüsünün durdurulmasını uyardığı gibi p53 bağımlı yaşlanma veya apoptozisi de uymaktadır. ARF inhibisyonu veya ekspresyonunun aşağı çekilmesi (downregulation) yaşlanmanın ve apoptozisin olmaması, sürekli bir çoğalma ve ölümsüzlükle sonuçlanmaktadır. Bu olay onkogenik dönüşümün bir göstergesi olarak görev yapmaktadır<sup>31</sup>.

### 2.2.2. Onkogenlerin mutasyonel aktivasyonu

Genel olarak hücre büyümesinin düzenlenmesinde görev alan proteinler, kontrolsüz hücre çoğalmasını sağlayıcı potansiyele sahip olmaları nedeniyle proto-onkogen olarak adlandırılırlar. Proto-onkogenleri kodlayan DNA bölgelerindeki bazı mutasyonlar veya proto-onkogenlerin transkripsiyon sonrası modifikasyonlarında oluşabilecek değişiklikler, bu proteinlerin devamlı şekilde aktif halde kalmalarına neden olabilir. İşte, mutasyonel olarak devamlı aktif hale geçen bu proteinlere onkoprotein, mutant ürünleri kodlayan gen bölgelerine de onkogen adı verilmektedir. Proto-onkogen ürünleri, ya doğrudan ya da dolaylı olarak hücre döngüsü kontrol sisteminde görev alan genlerin (siklinler, CDK'lar gibi) ekspresyonunu artırır ve hücreyi bölünmeye yönlendirirler. Örneğin ras proteini, MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) yolağının aktifleşmesine neden olur ve hücre içinde bir dizi fosforilasyon olayını başlatarak, başta siklin D olmak üzere birçok siklin molekülünün transkripsiyonunu artıran faktörleri aktif hale geçirmiş olur. *RAS* genindeki bir nokta mutasyonu, üretilen ras proteinin devamlı aktif halde kalmasına ve MAPK yolağının susturulamamasına neden olmaktadır. Birçok kanser türünde *RAS* geni aktivasyon mutasyonları gösterilmiştir<sup>14</sup>. Bir diğer önemli proto-onkogen ise *MYC*'tir. Myc proteini, aralarında siklin ve CDK genleri de dahil, bir çok genin ekspresyonunu arttıran bir transkripsiyon faktörüdür. Yani ras proteinin aksine etkisini doğrudan DNA'ya bağlanarak göstermektedir. Birçok kanser türünde *MYC* gen loküsünün amplifiye olduğu, dolayısıyla fazlaca Myc proteini üretildiği gösterilmiştir<sup>32</sup>.

Kanserde kromozomal anomaliler oluşmakta ve özellikle translokasyonlar sıklıkla görülmektedir. Translokasyonların en önemli özelliği, kopan bir kromozom parçasınının bir başka kromozoma yapışmasıyla kopan parçada bulunan genlerin bir başka promotere kontrolüne girmesidir. Böylece fizyolojik koşullarda üretilmeyen bir protein yapılmış olur ki bazen bu proteinler de onkoprotein özelliğindedir. Örneğin KML, ALL ve AML gibi lösemilerde görülen Philadelphia kromozomu denilen translokasyonda, 22. kromozomun bir parçası koparak 9. kromozoma yapışır [t(9:22)(q34;q11)]. Normalde 22. kromozomda olan *BCR* geni de böylece 9. kromozomdaki *ABL* geni promoterinin etkisi altına girer. Bu yeni promoterin etkisiyle normal hücrelerde yapılmayan bcr/abl proteini yapılır ki bu devamlı aktif halde kalan bir tirozin kinazdır ve hücre döngüsü proteinlerini devamlı aktif halde tutar. Bunun yanısıra, DNA tamirinde görev alan proteinleri de baskıladığından genomik stabilite bozulur ve "blast krizi" denilen olay oluşur. Yani bu tür lösemilerdeki kontrolsüz hücre çoğalmasının nedeni, kromozom translokasyonu yoluyla bir onkoprotein yapılmış olmasıdır.

### 2.2.3. Apoptotik mekanizmanın inhibisyonu

Apoptozis, programlı hücre ölümüdür ve genelde DNA hasarının tamir edilemeyecek boyutlarda olması sonucunda aktif olan ve böylece genomik bütünlüğün korunmasına yol açan bir savunma mekanizmasıdır. Hücre içinde apoptoza neden olan ve engelleyen proteinler bulunmaktadır ve bunlar dış sinyallerin etkisiyle bir denge içinde çalışırlar. Apoptoz mekanizmasının engellenmesi, hücrenin hasarlı DNA'ya rağmen bölünmeye devam etmesine neden olacağı için kanserin gelişmesinde de önemli bir mekanizmadır. Bu nedenle de apoptozu baskılayıcı

proteinleri kodlayan genler de onkogen olarak kabul edilir. Örneğin bir anti-apoptotik protein olan Bcl-2, normal hücre ölümünü yavaşlatarak aşırı hücre birikmesine yol açmaktadır. Bu görevini de bir apoptotik protein olan Bax'a bağlanarak ve böylece Bax'ın mitokondriye yönelip sitokrom C salgılanmasını ve kaspaz kaskadının başlatılmasını engelleyerek gerçekleştirir. DNA hasarlı bile olsa, Bcl-2'nin aşırı ve kontrolsüz şekilde devamlı aktif olması, hücrelerin ölümünü önleyeceğinden Bcl-2 de bir onkoprotein olarak kabul edilmektedir<sup>12</sup>.

### 2.3. T-BOX Transkripsiyon Faktörleri

DNA'dan RNA yapımı olan transkripsiyon, DNA üzerindeki farklı bölgelere bağlanan proteinlerin eşgüdüm içerisinde çalışmalarıyla gerçekleşmektedir. Bir gen başlıca 3 bölgeden oluşmaktadır; RNA'ya kopyalanacak bölge, kopyalama işlemi görev alacak proteinlerin DNA üzerine belli bir sıra ve düzen içerisinde yerleştikleri bölge (promoter bölgesi) ve promoter bölgesine bağlanan proteinlerin aktivitesini düzenleyen bölge (Regulatory region- düzenleyici bölge). Promoter bölgesi ve bu bölgeye bağlanan proteinler, mRNA yapan tüm gen loküslerinde büyük oranda aynıdır. O nedenle bu bölgeye bağlanan proteinlere "Genel Transkripsiyon Faktörleri" denilir. Bir genin ne zaman, ne kadar ve ne süreyle mRNA yapacağı ise düzenleyici bölgeye bağlanan proteinler, yani düzenleyici transkripsiyon faktörleri, tarafından kontrol edilir. Dolayısıyla düzenleyici transkripsiyon faktörleri her bir gen için özgündür ve hücreden hücreye de fark gösterirler. DNA'da bulunan genetik bilginin tüm hücrelerde aynı olmasına rağmen, hücrelerin birbirinden farklı olması ve farklı dokuları oluşturabilmelerinin nedeni de budur. Düzenleyici transkripsiyon faktörleri ilgili DNA bölgesine bağlandıklarında, promoter bölgesine bağlanan proteinlerle etkileşime girmekte ve böylece mRNA yapımını kontrol etmektedirler. Bu durumda, düzenleyici proteinlerin mRNA yapımını arttırıcı veya baskılayıcı etkileri olabilir ki, ilk gruptaki proteinlere arttırıcı, diğer gruptakilere ise baskılayıcı transkripsiyon faktörleri denmektedir (transcriptional activators and repressors).

Bu bilgilerden de anlaşılacağı üzere transkripsiyon faktörleri, hücre farklılaşması ve embriyolojik gelişimde en önemli rolü oynarlar. Şu ana kadar tanımlanan yüzlerce transkripsiyon faktörü arasında T-box proteinleri de bulunmaktadır ve bu aileye ait proteinler özellikle erken embriyolojik gelişimde önemli fonksiyonlar üstlenirler<sup>3</sup>. T-box geninin prototipi olan *Brachyury/T* geni ilk defa farede belirlenmiştir<sup>33, 34</sup>. Notokord ve kuyruk çıkıntısında eksprese olmakta<sup>34</sup> ve posterior, aksial ile paraksial mezoderm oluşması için gerekmektedir<sup>3</sup>. *Brachyury/T*'deki homozigot mutasyonlar erken embriyonik ölümlere, heterozigot olanlar ise farelerde kuyruksuzluğa neden olmaktadır<sup>33, 35</sup>. *Brachyury*; balık, köpek, kurbağa ve fareler gibi omurgalılar arasında yüksek oranda DNA dizilim ve mRNA ekspresyon benzerliği göstermekte ve fonksiyonel olarak ortak özellikler sergilemektedir<sup>3, 36-38</sup>. T-box genlerinin bazıları ise sadece belli türlere özgündür. Bunlar arasında *VegT* geni sayılabilir. Bu bir T-box geni olup, *Xenopus*'un endoderm oluşumu için gereklidir. Bu genin homologuna fare ve insanlarda rastlanmamıştır<sup>1</sup>.

*Brachury*'nin kodladığı proteinin amino-ucundaki DNA bağlanma bölgesinde 50'den fazla protein arasında yüksek oranda dizilim benzerliği söz konusudur. Benzerlik gösteren bu bölgeye T-box, bu bölgeye sahip genlere ise T-box gen ailesi



denmektedir <sup>3, 36-39</sup>. T-box genlerinin, DNA bağlanma bölgelerindeki homolojileri iyi korunmuştur.

T-box genleri çok sayıda ekzon içermekte olup, oldukça geniş bir bölgeye yayılmış en az beş ekzon tarafından kodlanmaktadır. Örneğin insan TBX5 geni 12. kromozom üzerindeki 53 kilobazlık bir alana yayılmış olup, 8 ekzon içermektedir <sup>1</sup>. Diğer gen ailelerinde olduğu gibi, T-box genlerinin intron-ekzon sınırları evrim süreci boyunca korunmuştur, ancak intron uzunlukları türler arasında farklılıklar göstermektedir <sup>40</sup>. Pek çok T-box geni tek bir mRNA kodlamakta ve alternatif ekzon birleşimi (alternative splicing) çok seyrek görülmektedir <sup>1</sup>.

### 2.3.1. Karakteristik Yapısal Özellikleri

T-box proteinlerinin 50–78 kDa büyüklüğünde oldukları ve tüm transkripsiyon faktörlerinde olduğu gibi, özgün DNA dizinine bağlandıkları T-box bölgesi (DNA-binding domain) ile transkripsiyonu düzenledikleri bölgeler (activation/repression domain) olmak üzere en az iki yapısal ve fonksiyonel bölgeden oluştuğu saptanmıştır <sup>3, 38</sup>. Bu bölgelerin birbirlerine göre pozisyonları, ailenin farklı üyelerinde değişkenlik göstermekle birlikte, genel olarak amino asit dizilimi açısından büyük oranda benzerlik sergilemektedirler <sup>1, 40</sup>.

Birer transkripsiyon faktörü olmaları nedeniyle tüm T-box proteinleri, protein yapılarının ilk 229 amino asitlik kısmında bulunan ve T-box bağlanma bölgesi olarak adlandırılan protein bölgesi yoluyla DNA üzerindeki özgün dizinlere bağlanırlar <sup>3, 38, 39, 41</sup>. Bu DNA dizini, her bir T-box proteini için bazı varyasyonlar gösterse de çekirdek dizini sabittir ve “TCACACCT” nükleotidlerinden oluşur. Düzenleyici bölgelerinde bu dizini içeren genlerin ekspresyonu, T-box proteinlerinin katkısıyla gerçekleşmektedir.

T-box proteinleri spesifik organlarda veya hücre tiplerinde; döllenen yumurtadan organogenesise kadar gelişimin birçok aşamasında, sinir sistemi, iskelet, böbrek, akciğerler, meme bezi ve kas gibi çeşitli dokularda eksprese olmakta ve hücre çekirdeğinde bulunmaktadırlar <sup>3</sup>.

Omurgalılarda en az 22 farklı T-box geni saptanmıştır <sup>38</sup>.

### 2.3.2. İnsan Hastalıklarında T-box Genleri

İnsanda bilinen TBX genlerinin bir çoğu gelişim esnasındaki rollerinin yanı sıra, çeşitli hastalıklar ile ilişkilendirilmiştir. Bu hastalıklar, tablo halinde aşağıda belirtilmiştir <sup>42-49</sup>.

**Tablo 2.2.** T-box genleri ve ilişkili oldukları hastalıklar.

Gen	Lokus	Aktivatör/ Represör	Hastalık	Referans
TBX1	22q11.2	Aktivatör	DiGeorge sendromu (DGS; 188400)	49
TBX2	17q23	Represör	Hücreleri ölümsüzleştirerek tümör oluşumunda yer alır	45
TBX3	12q24.1	Represör	Ulnar-Mammary sendromu (UMS; 181450)	42
TBX4	17q21-q22	Aktivatör	Small Patella sendromu (SPS; 147891)	43
TBX5	12q24.1	Aktivatör	Holt-Oram sendromu (HOS; 142900)	48
TBX19	1q23-q24	Aktivatör	ACTH Eksikliği (201400)	47
TBX20	7p15-p14	Aktivatör	Atrial septal defect 4 (ASD4; 611363)	46
TBX22	Xq12-q21	Aktivatör	X'e bağlı yarık damak ve dil yapışıklığı (CPX; 303400)	44

Tüm Tbx proteinleri arasında Tbx2 ve Tbx3 diğerlerinden birer transkripsiyonel baskılayıcı olarak ayrılırlar<sup>7, 9, 45, 50</sup>. Bu iki faktörü daha da ilginç kılan özellikleri ise kanser oluşumu ile yakından ilişkili olmalarıdır. TBX2 geni, over karsinomalarında değişkenlik<sup>51</sup>; meme kanserlerinin %20'sinde amplifikasyon göstermektedir<sup>52</sup>. Meme kanserlerinde immortalize edici genlerin araştırıldığı bir çalışmada TBX2'nin p53 tümör baskılayıcı yolağını, *CDKN2A* (*p19<sup>ARF</sup>*) promotorunu baskılayarak etkilediğini göstermiştir ki, bu TBX2'nin kanserdeki rolünü vurgulamaktadır<sup>45</sup>.

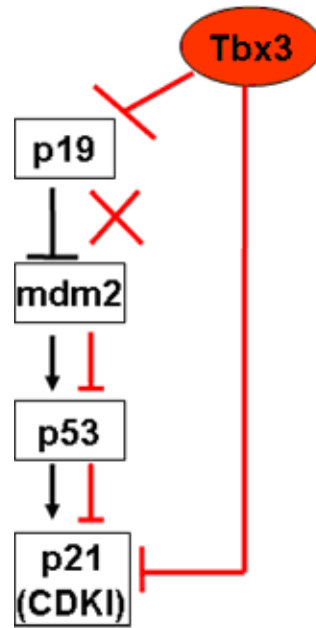
#### 2.4. TBX3

İnsan *TBX3* geni, 12. kromozomun uzun kolunda 24. bölgede (12q24) yer alır<sup>31</sup>. Bu gen yedi ekzondan oluşmakta ve 723 aa. lik bir proteini kodlamaktadır<sup>50</sup>. Proteinin amino-ucu DNA bağlanma domainini, karboksil-ucu ise baskılayıcı domainini içerir<sup>5</sup>. Proteinin T-box domaini 105–285. aminoasitler, baskılayıcı domaini 567–623. aminoasitler ve nükleer lokalizasyon sinyali ise 292–297. aminoasitler arasındadır<sup>5, 8, 53</sup>.

*TBX3* gelişimin birçok aşamasında, adrenal bez, kalp, böbrek, karaciğer, akciğer, plasenta, prostat, tükürük bezi, iskelet kası, dalak, testis, trakea, uterus, kolon, ince barsak, over ve meme gibi çeşitli dokularda ekspres olmaktadır<sup>5, 50</sup>.

*TBX3*'deki heterozigot mutasyonlar otozomal dominant bir hastalık olan UMS'ye (Ulnar Mammary Syndrome) neden olup; meme hipoplazisi, apokrin bez eksikliği veya disfonksiyonu, diş, saç ve cinsel organ hasarı ile ön ekstremitelerdeki tomurcuğunun posterior elementlerinin duplikasyonu ve eksikliği ile karakterizedir<sup>42</sup>.

Tbx3 ve gerek yapı gerekse fonksiyon olarak çok benzeyen Tbx2'nin, fibroblast ve melanoma hücrelerinde doğrudan p19ARF ve p21 adlı CDKI proteinlerini kodlayan genlerin promoter bölgelerine bağlanarak bu genlerin ekspresyonunu baskıladıkları saptanmıştır<sup>7, 45</sup>. Cdkn2a (p19<sup>ARF</sup>); hücre içinde mdm2'ye bağlanarak p53 düzeyinin artmasını, artan ve aktif hale geçen p53 ise başta *CDKN1A* (p21) olmak üzere hücre döngüsünün durdurulmasında görev alan genlerin ekspresyonunu arttırmaktadır. Bu yolağın başındaki molekülün Tbx2 ve 3 proteinleri etkisiyle baskılanması halinde doğal olarak döngüyü durduran CdkI proteinleri yapılamayacak ve hücreler aşırı çoğalmaya yöneleceklerdir (Şekil 3.5). Nitekim, bu hücrelerde de Tbx2 ve 3 etkisiyle aşırı çoğalmanın yanısıra özellikle hücre yaşlanmasının baskılandığı deneysel olarak gösterilmiştir<sup>10,11</sup>.



**Şekil 2.5. Tbx3 yolağı:** Normal bir hücrede herhangi bir şekilde DNA'da hasar oluştuğu zaman, p19<sup>ARF</sup> tümör baskılayıcı proteini aktifleşerek mdm2'ye bağlanır. Böylece mdm2'nin p53'e bağlanarak onu inaktifleştirmesine engel olur. Aktifleşen p53 ise bir siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan p21'i uyararak, hücre döngüsünün DNA'daki hasar tamir edilene kadar G1 fazında kalmasını sağlar. Ama TBX3'ün aşırı ekspresyonu söz konusu olduğunda durum değişir. Tbx3, *CDKN2A* (p19<sup>ARF</sup>) promoter bölgesine bağlanarak ekspresyonunu baskılar. p19 olmayınca serbest kalan mdm2 p53'e bağlanır ve onu inaktifleştirir. İnaktif olan p53'de p21'i uyaramayacağı için hücre, DNA'sındaki hasar tamir edilmeden G1'den S fazına geçer ve sürekli bölünüp çoğalır. TBX3 p21 üzerindeki etkisini böyle dolaylı bir şekilde yapabilirken aynı zamanda *CDKN1A* (p21<sup>Cip</sup>) promoter bölgesine doğrudan bağlanıp, ekspresyonunu baskılayarak da yapabilmektedir.

Tbx2/3 proteinleri, etkilerini dolaylı olarak p19ARF/mdm2/p53 yolağını, direkt olarak ise p21 ekspresyonunu baskılayarak göstermesine rağmen, fonksiyonel p53'ü bulunmayan hücrelerde de Tbx2/3 etkisiyle siklin D1 düzeylerinde bir artış saptanmıştır. Bu gözlemin altında yatan mekanizmalar henüz bilinmemekle birlikte, Tbx2 ve 3 proteinlerinin mdm2/p53 yolağından bağımsız olarak da etkilerini gösterebildikleri düşünülmektedir<sup>54</sup>.

Tbx3 mRNA'sının oluşumu sırasında farklı birleşme (alternative splicing) ile oluşan iki izoformu tespit edilmiştir<sup>50</sup>. Bunlardan Tbx3+2a (GenBank accession no: NM\_016569), insan fibroblastlarının kültür ortamında yaşlandırılmış formunda ve bebek beyni cDNA kütüphanesinde tanımlanmıştır. Tbx3+2a, Tbx3'ün DNA bağlanma bölgesinin ortasında fazladan 20 aminoasit taşımaktadır. Bu yapısal farklılık hücre içinde gen regülasyonunda farklı fonksiyonu olabileceğini göstermektedir. İnsan ve fare dokularıyla yapılan çalışmada, Tbx3 ve Tbx3+2a ekspresyon oranı dokudan dokuya ve türden türe farklılık göstermektedir. Bu nedenle, alternatif birleşmenin dokuya ve türe özgün olduğu yargısına varılmaktadır. Tbx3 ve Tbx3+2a retrovirüs ile MEF hücrelerine verildiğinde Tbx3'ün yaşlanmayı önleyip ölümsüzlüğe neden olduğu, Tbx3+2a'nın ise yaşlanmayı sağladığı ve kontrol hücrelerine göre bu hücrelerin yavaş geliştiği gösterilmiştir. Bu çalışmaya göre; DNA bağlanma bölgelerindeki farklılıktan dolayı TBX3+2a'nın tüm Tbx proteinlerinin bağlandığı DNA dizinine bağlanamadığı, dolayısıyla bu proteinin farklı bir dizini hedefleyebileceği hipotezi desteklenmektedir<sup>5,50</sup>.

Kanser hücrelerindeki ekspresyon çalışmalarında ise, pelvis ve meme kanseri olmayan 28 hastanın %30'unda Tbx3 zayıf ekspresyon gösterirken, 1. evredeki over kanseri hastalarının hepsinde ve meme kanseri hastalarının %80'inde Tbx3 tespit edilmiştir<sup>6</sup>. Yirmi sekiz adet meme kanseri hücre hattıyla yapılan başka bir çalışmada %25'inden fazlasında Tbx3 ve Tbx3+2a'nın aşırı ekspresyonu gözlenmiştir<sup>5</sup>. *TBX3*'ün lokalize olduğu 12q24 bölgesinin amplifikasyonu B hücre non-Hodgkins lenfoma, meme ve mesaneyi içeren çeşitli tümör tiplerinde bulunmuştur<sup>55-57</sup>.

Aynı zamanda Tbx3 osteoblast çoğalmasının önemli bir düzenleyicisidir. Fare osteoblast benzeri hücre hattına (MC3T3-E1) verilen büyüme hormonu ile Tbx3 miktarının arttığı gösterilmiştir<sup>58</sup>.

## 2.5. Hematolojik Kanserler

Kan hücrelerinin özellikle de lökositlerin normalin üzerinde çoğalması ile kendini gösteren bir kanser türüdür. Hastalığın gelişmesi ve ilerlemesindeki hız ile köken aldığı kan hücresine göre gruplandırılırlar.

Hastalığın ortaya çıkış ve ilerleme hızına bağlı olarak "akut" ve "kronik" olmak üzere ikiye ayrılır. Akut lösemiler olgunlaşma ve farklılaşma özelliğini yitirmiş hematopoietik öncü hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile karakterize bir hastalık grubudur. Habis hücreler (blastlar veya az farklılaşmış öncül hücreler) kemik iliğini doldurmak suretiyle normal hematopoiezi baskırlar ve sonuçta sağlıklı-normal kan hücrelerinden sayıca daha fazla hale gelmektedirler. Bu anormal hücreler diğer organlara da yayılarak, organı fonksiyonlarını yapamaz hale getirebilirler. Kronik lösemi ise görünüşte olgun ancak normal olgun kan hücrelerinin yaptıklarını yapamayan kan hücrelerinin aşırı üretimi ile karakterizedir. Hücre sayısındaki artış ve hastalığın ilerleme hızı akut lösemiye göre daha yavaştır<sup>59</sup>.

Hematopoietik kök hücrenin farklılaşmaya başladığı ilk basamakla ilişkili olarak kökene göre sınıflandırma yapılır. Kök hücre CFU-L (lenfoid koloni yapan

ünite)'ye farklılaşırsa lenfoid; CFU-GEMM (granülosit, eritrosit, megakaryosit, makrofaj koloni yapan ünite)'ye farklılaşırsa myeloid dizi oluşur. Böylece CFU-L'den köken alan malignitelere lenfoid, CFU-GEMM'den kaynaklanana da myeloid adı verilir .

### **2.5.1. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)**

Normalde lenfosit adı verilen olgun kan hücresi tipine dönüşmesi gereken lenfoblast isimli olgunlaşmamış kan hücrelerinin artması ile karakterizedir. Bu lenfoblastların sayıları artar ve genelde lenf düğümlerinde birikerek lenfadenopatiye neden olurlar. ALL, çocukluk çağında en sık görülen malignitedir ve çocukluk çağı akut lösemilerin yaklaşık %85' de, daha nadir olarak erişkinlerde de görülür (yaklaşık %15) <sup>59</sup>.

### **2.5.2. Akut Myeloid Lösemi (AML)**

Myeloblast adı verilen ve normal kan hücrelerine dönüşmesi gereken olgunlaşmamış kan hücrelerinin üretimi ile karakterizedir. Olgunlaşmamış bu hücreler kemik iliğinde çok yüksek sayılara ulaşırlar ve normal kan hücrelerinin üretimini azaltırlar. Sonuçta anemi (kansızlık-kırmızı kan hücresi üretiminde azalma) ve sık enfeksiyona yakalanma (beyaz kan hücresi üretiminde azalma) durumu ortaya çıkabilir. AML her yaşta görülebilmekle beraber temelde ileri yaş erişkin hastalığıdır. İnsidans yaşla beraber giderek artar. Erişkinlerde akut lösemilerin %85'i, çocukluk çağı lösemilerin ise %15'i AML'dir.

Kronik lösemiler farklılaşma ve olgunlaşma kusuru olmaksızın proliferasyon bozukluğu gösteren hematopoietik kök hücre hastalıklarıdır. Artmış hücre sayıları ön planda olgun hücrelerden oluşmaktadır <sup>59</sup>.

### **2.5.3. Kronik Lenfositik Lösemi (KLL)**

Olgun görünüşe sahip lenfositlerin kemik iliğinde aşırı üretimi ile kendini gösterir. Bu anormal hücreler tam olarak olgunlaşmış normal lenfositler gibi görülürler, ancak normal lenfositler gibi vücudumuzu enfeksiyonlara karşı koruyamazlar. KLL'de, kanser hücreleri kemik iliğinde, kanda ve lenf nodlarında bulunurlar ve lenfadenopati oluştururlar. KLL tüm lösemilerin %30'unu oluşturur. 30 yaşın altında nadiren görülürler, ancak görülme sıklığı yaşla birlikte artar ve en sık olarak 60–70 yaş arasında gözlenir <sup>59</sup>.

### **2.5.4. Kronik Myeloid Lösemi (KML)**

Olgun görünüşlü ancak fonksiyon kaybı bulunan myeloid hücrelerin (lökositler gibi) aşırı üretimi ile kendini gösterir. Bu aşırı üretim hiç normal hücre kalmayana kadar devam eder. KML yetişkinlerde gözlenen lösemilerin %20–30'unu meydana getirir ve 25–60 yaşları arasında gözlenir <sup>59</sup>.

## HİPOTEZ

Tbx2 ve Tbx3 proteinlerinin hücre bölünmesini indükleyici yollarda görev aldıkları ve deneysel olarak her iki proteinin de hücre yaşlanmasını baskılayarak hücreleri bölünmeye yönlendirdikleri bilinmektedir. Ayrıca, kültür ortamındaki B-lenfositlerde her iki proteinin de ekspresyonunun hücreler farklılaştıkça azaldığı gözlemlenmiştir. Bu ön verilerden yola çıkarak, hematolojik malignitelerde hastalığın tipine ve seyrine bağlı olarak Tbx3 protein ve mRNA düzeylerinin sağlıklı kişilerdeki düzeylere göre farklılık gösterebileceği öngörülmüştür. Bu tez çalışması, aşağıda belirtilen sorulara yanıt bulmak amacıyla başlatılmıştır:

1. Genel olarak hematolojik malignitelerde Tbx3 mRNA ve protein düzeyleri sağlıklı bireylere göre fark gösteriyor mu?
2. Hangi tip hematolojik malignitelerde Tbx3 mRNA ve protein düzeylerinde farklılıklar oluşmaktadır?
3. Tbx3 mRNA ve protein düzeyleri hastalığın tipi ve gidişatının takibinde bir belirteç olarak kullanılabilir mi?

## OLGULAR ve YÖNTEM

### 4.1. Olgular

Çalışmaya Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları A.D. Hematoloji Polikliniği ile Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D. Hematoloji-Onkoloji Polikliniğine başvuran akut, kronik lösemi, multipl myeloma ve burkit lenfoma ön tanısı alan ve çalışmaya katılmayı kabul eden 23 hasta dahil edilmiştir. Bu çalışma için gerekli Etik Kurul izni B.30.2.AKD.0.01.00.00/Etik/186 sayılı rapor ile alınmış ve erişkin hastaların kendilerinden, çocuk hastaların ise ebeveynlerinden imzalı onam formları alındıktan sonra kan örnekleri temin edilmiştir. Çalışmaya katılan 23 hastanın 8'inde kemik iliği örnekleri de incelenmiştir. Kemik iliği örnekleri için tanı veya tedaviyi takip amaçlı yapılan ponksiyonlardan klinik testler için gerekli miktarın dışında kalan kısım kullanılmıştır. Dolayısıyla ponksiyon yapılmayan veya ponksiyon materyalinin gerekli klinik testler için kullanılmasının ardından yeterli miktarda materyal kalmayan hastaların kemik iliği örnekleri çalışmaya dahil edilmemiştir. Kontrol grubu, çalışmaya katılmayı kabul eden ve herhangi bir sağlık sorunu bulunmayan hastane çalışanlarından oluşturulmuştur (n=30). Her ne kadar çocuk hastalar için yaş grubu uyumlu sağlıklı çocuklardan kan örneği alınması planlanmışsa da ebeveynlerin gönüllü olmaması ve çocuklarından kan örneği alınmasına izin vermemeleri nedeniyle kontrol grubuna sağlıklı çocuklar dahil edilememiştir.

### 4.2. Mononükleer Hücre İzolasyonu

EDTA'lı tüpe alınmış olan 4 ml periferik kan, eşit miktarda steril PBS ile sulandırılmış ve 3 ml histopaque 1077 üzerine yavaşça eklenmiştir. Daha sonra örnekler 1000 rpm'de 30 dakika santrifüj edilmiş ve dansite gradyentiyle mononükleer hücreler ayrıştırılmıştır. Temiz bir tüpe alınan mononükleer hücreler 3 kez PBS ile yıkanmış ve hücre solüsyonundan alınan örnek Beckman Counter kan sayım cihazında sayılarak mililitredeki hücre sayısı saptanmıştır. Yaklaşık  $4 \times 10^6$  hücre protein ekstraksiyonu için ayrılmış, geri kalan hücreler ise RNA stabilitesini korumak için RNAlater (QIAGEN GmbH, USA, 76106) solüsyonunda sulandırılarak kullanım anına kadar  $-20^{\circ}\text{C}$ ' de saklanmıştır.

### 4.3. Hücre Kültürü

Çalışmalarda pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere hepatosellüler karsinoma hücre hatlarından Tbx3 mRNA'sı izole edilmiştir. Bu amaçla Huh7, Mahlawu, SNU 475, SNU 182, SNU 423, SNU 3877, SkHepI ve Hep3B hepatosellüler karsinoma hücre hatları kullanılmıştır. Hücreler; %10 FBS (fetal bovine serum, Invitrogen, USA, 10108–165), %1 penisilin/streptomisin (Invitrogen, USA, 15140–122) ve %1 Fungizone (Invitrogen, USA, 15290–018) içeren Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM-Invitrogen, USA, 31966) besi yerinde 75

cm<sup>2</sup>'lik hücre kültürü flasklarına ekilmiş ve %10 CO<sub>2</sub>'li ortamda 37<sup>0</sup>C inkübatörde büyütülmüştür. Düzenli olarak 3 gün aralıklarla Trypsin-EDTA (Invitrogen, USA, 25300–054) yöntemiyle pasajlanan hücreler, yeterli yoğunluğa ulaşıncaya flasklardan alınmış, santrifügasyonla çöktürülerek yıkanmış ve RNAlater (QIAGEN GmbH, USA, 76106) solüsyonu içinde sulandırılarak kullanım anına kadar –20<sup>0</sup>C de saklanmışlardır.

#### 4.4. Protein Ekstraksiyonu

Mononükleer hücrelerde Tbx3 protein düzeyi, immunoblot yöntemi ile saptanmaya çalışılmıştır. 4x10<sup>6</sup> hücreye 100µl 1xSDS (%2 SDS, 100 mM DTT, 60 mM Tris pH 6.8, %0.01 bromophenol blue) eklenip 3 dakika vorteksledikten sonra 95<sup>0</sup>C'de 10 dk kaynatılmıştır. Örnekler, 4<sup>0</sup>C'de 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek hücre membranları çöktürülmüş ve total protein içeren süpernatant protein elektroforezi işlemine kadar -20<sup>0</sup>C'de muhafaza edilmiştir.

#### 4.5. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ve İmmünoblot

Proteinlerin ayrıştırılması için %10'luk poliakrilamid jel kullanılmış ve moleküler ağırlık standardı (Invitrogen, US, LC5725) örneklerle birlikte kuyucuklara yüklenerek 10 mA akım ile 1,5 saat süreyle elektroforez yapılmıştır. Elektroforez sonrası, jelde moleküler ağırlığına göre ayrılmış olan proteinler, nitrosellüloz membrana (Schleicher-Schuell, Dassel, Minnesota, USA, 401191) ıslak transfer yöntemi ile 120 dakika süresince 60 V akım uygulanarak aktarılmıştır (Bio-RAD, USA, 165–3301). Transfer sonrası membranlar, % 5'lik süt tozunda 1 saat bloke edilmiş ve daha sonra her biri 15 dk olmak üzere 4 kez TBS-T solüsyonu (%0,1 Tween 20, 10 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl) ile yıkanmıştır. Primer antikor (Santa Cruz, California, USA, sc–17871) olarak 1:200 dilüsyonda hazırlanmış anti-Tbx3 kullanılmış ve antikorla membran, 16 saat süreyle 4<sup>0</sup>C'de inkübe edilmiştir. Primer antikor inkübasyonu sonrasında membranlar, yine 1 saat boyunca TBS-T ile devamlı çalkalanarak yıkanmıştır. İşaretleme için, 1:5000 oranında TBS-T solüsyonunda sulandırılmış HRP-konjuge IgG kullanılmış ve membranlarla 1 saat oda ısısında çalkalanarak inkübe edilmiştir. Sekonder antikor uygulaması sonrasında membranlar tekrar 1 saat süresince çalkalanarak yıkanmış ve ECL (Amersham Biosciences, UK, RPN2132) uygulanarak kemiluminisans oluşturulmuştur. Daha sonra membran, radyografik filme konularak görüntüleme gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak, hücrelerde sabit ekspresyonu olan aktin proteinine özgü antikor (AbCam, UK, ab3280) 1:1000 oranında kullanılmıştır.

#### 4.6. RNA İzolasyonu

RNA stabilizasyon sıvısında (RNAlater) –20<sup>0</sup>C de saklanmış olan örnekler, buzda eritildikten sonra RNAlater'ı uzaklaştırmak için 4<sup>0</sup>C'de 4000 rpm'de, 20 dakika santrifüj edilmiştir. mRNA izolasyonu, MagNa Pure LC mRNA izolasyon kitinin (ROCHE, Germany, 03 004 015 001) kullanım kılavuzunda önerildiği şekilde MagNa Pure cihazında (ROCHE, Germany, 03 322 025) gerçekleştirilmiş ve RNA miktarı spektrofotometrik olarak saptanmıştır.



#### 4.7. TBX3 mRNA Düzeyi

Hepatoselüler karsinoma kökenli hücre hatları ile hasta ve kontrollerin mononükleer hücrelerinden elde edilen mRNA, AMV reverse transkriptaz (ROCHE Germany, 10 109 118 001) ve oligoDT varlığında 42<sup>0</sup>C de 1 saat süreyle inkübe edilmiş ve cDNA'ya dönüştürülmüştür. Elde edilen cDNA daha sonra klasik (end-point PCR) ve eş-zamanlı niceliksel PZR (real-time PCR) kullanılarak çoğaltılmış ve Tbx3 mRNA düzeyleri incelenmiştir.

##### 4.7.1. Klasik PZR (end-point PCR)

Bu amaçla, aşağıda dizinleri ve lokalizasyonları belirtilen oligonükleotidler kullanılarak ilgili gen bölgeleri polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılmıştır. Her PZR için; 2 µl cDNA, 0.3 µM sağ ve sol primerler, 200 µM dNTP, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> ve 1.24 U Taq polimeraz kullanılmış ve reaksiyonlar ısı döngü cihazına (Techne, UK, TC-312) yerleştirilmiştir. Isı döngü programı 95<sup>0</sup>C'de 5 dk süreyle denatürasyonu takiben 95<sup>0</sup>C'de 30 sn, 60<sup>0</sup>C'de 45 sn, 72<sup>0</sup>C'de 60 sn'den oluşan 40 döngü olacak şekilde ayarlanmıştır. PZR döngülerinin tamamlanmasından sonra, ürünler %2'lik agaroz jele yüklenmiş ve 60mA'de 1 saat elektroforez yapıldıktan sonra %0.1 oranında etidyum bromür içeren TBE (89 mM Tris, 89 mM Borik asit, 2 mM EDTA) içerisinde boyanarak DNA görünür hale getirilmiştir. Etidyum bromür ile boyanmış örnekler jel görüntüleme cihazında (Vilber Lourmat, France, CN-115) uv lambasında incelenmiş ve görüntüler kaydedilmiştir.

İnsan TBX3 mRNA'sına özgü primerler: (GenBank no: NM\_016569) Lokalizasyon

Sol primer: 5'-CCGCTACTGGGGAACAGTGG 3200-3219

Sağ primer: 5'-CTCATCAGAGGTCCCATTCTCC 7767-7746

Bu primerler, Tbx3'ün her iki izoformunu da tanıyacak şekilde tasarlanmıştır. Tbx3+2a ürünü 443 bp, Tbx3 ürünü ise 385 bp büyüklüğündedir.

İnsan GAPDH mRNA'sına özgü primerler: (GenBank no: XR\_018317) Lokalizasyon

Sol primer: 5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG 672-690

Sağ primer: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA 978-959

PZR ürünü 307bp büyüklüğündedir.

##### 4.7.2. Eş-zamanlı niceliksel PZR (real-time quantitative PCR)

Bu amaçla hem SYBR Green I hem de daha özgün bir yöntem olan TaqMan problemleri kullanılmıştır.

###### 4.7.2.1. SYBR Green I kullanılarak yapılan eş-zamanlı niceliksel PZR

Yukarıda anlatılan şekilde elde edilen cDNA'lar, DNA master SYBR Green I kiti (ROCHE, Germany, 03 515 869 001) ile LightCycler 2.0 cihazında (ROCHE, Germany, 03603962001) incelenmişlerdir. Kısaca, aşağıda dizinleri ve lokalizasyonları belirtilmiş olan primerler 0.3 µM konsantrasyonda olacak şekilde ayarlanmış ve 1 µl cDNA eklenerek kit içindeki master miks ile üretici firmanın önerdiği miktarda karıştırılarak toplam 20 µl hacimde reaksiyon hazırlanmıştır. Her

bir örnek için, ikişer adet Tbx3'e özgü primerler ile ikişer adet GAPDH'a özgü primerler kullanılarak toplam 4 reaksiyon kurulmuştur. Hazırlanmış olan reaksiyonlar LightCycler kapillerlerine alınmış ve cihaza yerleştirildikten sonra tablo 4.1'de belirtilen koşullar programlanmıştır. Ürünlerin özgünlüğü erime eğrisi analizi (melting curve analysis) yanısıra klasik elektroforez ile PZR ürünlerinin boyların saptanması ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, LightCycler 2.0 yazılım ile değerlendirilmiş ve değerler, her bir örnek için GAPDH mRNA düzeylerine göre normalize edilerek verilmiştir.

İnsan TBX3 mRNA'sına özgü Primerler: (GenBank no: NM\_016569) Lokalizasyon

Sol primer: 5'-CCGAAGAGAAAAAAGAAAACAGC 1890–1913  
Sağ primer: 5'-GGGACATAAATCTTTGTGGTTCGAT 2074–2050  
PZR ürünü 184bp büyüklüğündedir.

İnsan GAPDH mRNA'sına özgü primerlerin dizinleri bir önceki bölümde belirtilmiştir.

**Tablo 4.1.** SYBR Green I ile kullanılan PZR koşulları.

Program	Sıcaklık	Süre	Ramp Rate (°C/sn)	Döngü	Acquisition modu	Analiz modu
<b>Başlangıç aktivasyonu</b>	95°C	10dk	20	1	Yok	Yok
<b>PZR döngüsü</b>	95°C	10sn	20	45	Yok	Kuantifikasyon
	56°C	5sn	20		Yok	
	72°C	8sn	20		Tek	
<b>Erime Eğrisi (Melting Curve)</b>	95°C	0	20	1	Yok	Erime eğrisi
	65°C	15sn	20		Yok	
	90°C	0	0.1		Sürekli	
<b>Soğutma</b>	40°C	30sn	20	1	Yok	Yok

#### 4.7.2.2. TaqMan Probları kullanılarak yapılan eş-zamanlı niceliksel PZR

Bu amaçla, aşağıda dizinleri ve lokalizasyonları belirtilen primer-prob seti kullanılmış ve LightCycler TaqMan Master kiti (ROCHE, Germany, 04 535 286 001) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda reaksiyon hazırlanmıştır. Bu analizde reaksiyonlar toplam 20 µl hacimde hazırlanmış ve 5 µl cDNA için 0.3 µM primer ile 0.08 µM probe önerilen miktardaki master miks ile karıştırılmıştır. Reaksiyon kapillerleri LightCycler cihazına yerleştirildikten sonra tablo 4.2'de görülen koşullar programlanmış ve sonuçlar LightCycler yazılım ile analiz edilmiştir.

İnsan TBX3 mRNA'sına özgü primerleri: (GenBank no: NM\_016569) Lokalizasyon

Sol primer: 5'-AAAAATAGACAACAACCCTTTTGC 1840–1863  
Sağ Primer: 5'-TGCAGGGTGAGCTGTTTTC 1923–1905  
PZR ürünü 84 bp büyüklüğündedir.

Tbx3'e özgü prob (Universal ProbeLibrary probe: #47, kat. no: 04688074001)

5'-ACACTGGA 1878–1885

**Tablo 4.2.** TaqMan problemleri ile eş zamanlı niceliksel PZR koşulları.

Program	Sıcaklık	Süre	Döngü	Acquisition Mod	Analiz Modu
<b>PZR Başlangıç Aktivasyonu</b>	95°C	15dk	1	Yok	Yok
<b>PZR Döngüsü</b>	95°C	10sn	45	Yok	Kuantifikasyon
	52°C	30sn		Yok	
	72°C	1sn		Tek	
<b>Soğuma</b>	40°C	30sn	1	Yok	Yok

#### 4.8. İstatistik

Değişkenler ortalama±standart sapma şeklinde ifade edilmiştir. Gruplar arasındaki farkların istatistiksel önemliliği için Mann-Whitney U Testi ve Student's *t* Testi yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda gruplar arasında istatistiksel olarak önemli fark tespit edilen değişkenler için  $p < 0.05$  kabul edilmiştir. Kritik nokta (eşik değeri) ROC eğrisi analizi ile belirlenmiştir. 2.8 bulunan eşik değerinin üstündekiler yüksek, altındakiler ise düşük değer olarak yorumlanmıştır.

## BULGULAR

### 5.1 Çalışma Grupları

Çalışmaya, 30 sağlıklı birey ile 23 hasta katılmıştır. Literatürde Tbx3 mRNA ve protein düzeylerinin hangi tür hematolojik malignitelerde değişiklik gösterdiğine ait bir yayın bulunmadığından, ilk basamak için, tanısı dikkate alınmaksızın çalışmaya katılmayı kabul eden tüm hastalar değerlendirmeye alınmıştır. Hastaların 12 tanesi çocuk, 11 tanesi ise erişkin yaş grubundadır. Çocuk hastaların tümü akut lenfositik lösemi (ALL) tanısı almış iken erişkin hastaların tanıları; akut myeloid lösemi (AML, n=6), kronik lenfositik lösemi (KLL, n=3), Burkitt Lenfoma (BL, n=1) ve multiple myeloma (MM, n=1) olarak dağılım göstermiştir. Hastaların yaş, cins ve klinik tanılarına göre dağılımları tablo 5.1’de verilmiştir.

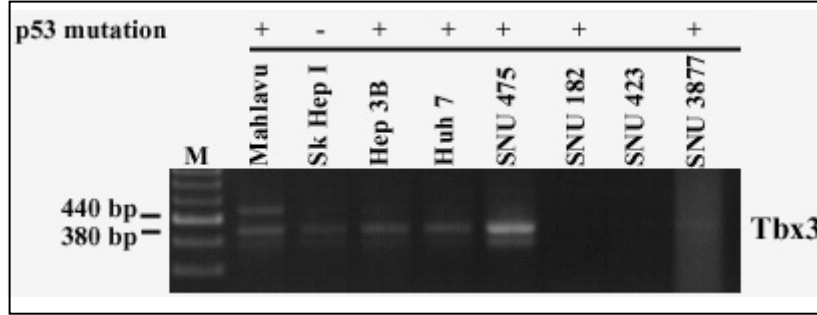
**Tablo 5.1.** Hastaların tanıları, hastaların ve kontrollerin yaşları ve cinsiyetleri (hasta n=23; kontrol n=30).

	Cinsiyet		Yaş ort.	Tanı				
	Erkek	Kadın		ALL	AML	KLL	BL	MM
<b>Çocuk Hasta n=12</b>	6 (%26.08)	6 (%26.08)	4	12 (%52.17)	-	-	-	-
<b>Yetişkin Hasta n=11</b>	7 (%30.43)	4 (%17.4)	50.1	-	6 (%26.09)	3 (%13.04)	1 (%4.35)	1 (%4.35)
<b>Kontrol n=30</b>	14 (% 46.7)	16 (% 53.3)	33.29	-	-	-	-	-

### 5.2. Klasik PZR ile TBX3 mRNA Düzeyinin Saptanması

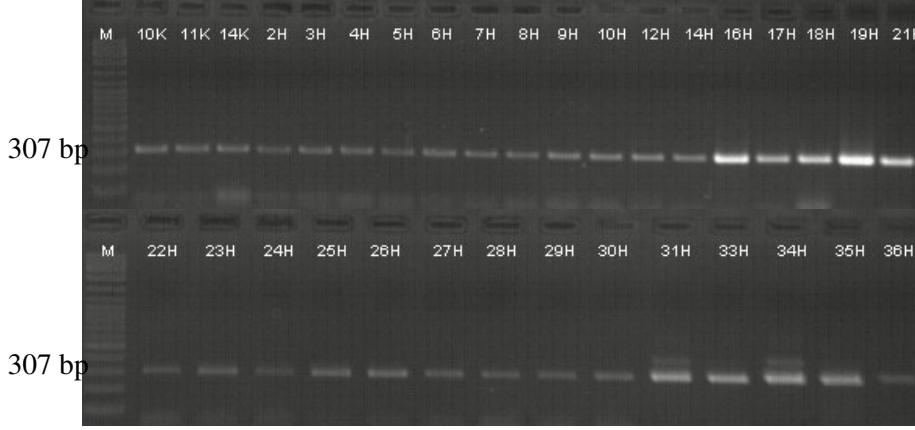
Ekspresyon çalışmalarında, özellikle de incelenen genin ekspresyonunun olup olmadığının bilinmediği dokularda çalışılırken, gerek PZR koşullarının optimize edilmesi, gerekse ekspresyon düzeyine bir referans oluşturulması açısından reaksiyonlara bir pozitif kontrol eklenmesi gerekmektedir. Tbx3’ün erişkin dokularında eksprese olduğu, ancak düzeyinin dokular arasında farklılıklar gösterdiği bilinmektedir<sup>5, 50</sup>. Laboratuvarımızda A.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi desteği ile yürütülen bir diğer proje kapsamında (2004.01.0200.003) Tbx3 ekspresyonunun insan karaciğer dokusunda fazlaca bulunduğu saptanmıştır. Bunun üzerine bir dizi karaciğer kanseri (HCC) hücre hattında Tbx3 ekspresyon düzeyleri incelenerek deneylerimiz için bir pozitif kontrol oluşturulması amaçlanmıştır. Sekiz adet HCC hücre hattından elde edilen cDNA, Tbx’ün her iki izoformunu da tanıyacak şekilde tasarlanmış primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılmış ve PZR ürünleri, agaroz jel elektroforezi sonrası görüntülenmiştir (Şekil 5.1). Görüldüğü gibi, beş hücre hattında Tbx3’ün her iki izoformunun da varlığı saptanmış ancak ekspresyon düzeylerinin SNU 475 ve Mahlawu hücre hatlarında diğerlerine göre

daha kuvvetli olduğu saptanmıştır. Bu deney ile hem ideal PZR koşulları (döngü ısıları ve primer/cDNA konsantrasyonları) oluşturulmuş hem de bu iki hücre hattının Tbx3 mRNA ekspresyon çalışmalarında pozitif kontrol olarak kullanılabilceği ortaya konmuştur.



**Şekil 5.1. Hepatosellülerkarsinoma hücre hatlarında *TBX3* gen ekspresyonu:** Mahlavu, Hep3B, Huh7, SNU475, Snu182 ve SNU 3877 (p53 yabamı); SkHepI (p53 yok) ve SNU423 (p53 durumu bilinmiyor) hepatoselüler karsinoma hücrelerinden izole edilen mRNA'lar AMV reverse transkriptaz ile cDNA'ya dönüştürülmüş ve *TBX3*'ün her iki izoformunu da tanıyacak primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılmıştır. PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde ayrıştırılmış ve *TBX3*+2a'ya ait 443 bp ile *TBX3*'e ait 383 bp uzunluğundaki ürünler etidyum bromür ile boyandıktan sonra görüntülenmiştir.

HCC hücre hatlarında, *TBX3* ve aynı şekilde *GAPDH* primerleri ile cDNA'larının çoğaltılması için gerekli deney koşullarının optimize edilmesinden sonra, çalışmaya dahil edilen hasta ve sağlıklı bireylerin periferik kan mononükleer hücrelerinden RNA izole edilmiş ve cDNA'ya dönüştürülmüştür. Elde edilen cDNA'ların kalite ve miktar kontrolü, *GAPDH*'ye özgü primerler kullanılarak gerçekleştirilen PZR ile yapılmıştır (Şekil 5.2). Görüldüğü gibi *GAPDH*'ye özgü primerler kullanılarak yapılan reaksiyonlarda beklenen büyüklükte, tek ve temiz bir band gözlenmiştir. Bu deney, olgulardan RNA izolasyonu ve cDNA oluşturulmasının başarılı ve cDNA kalitesinin iyi olduğunun göstergesidir. Ancak aynı cDNA'lar, *Tbx3*'e özgü primerler kullanılarak çoğaltıldığında, hiçbir ürün elde edilememiştir. Bu deneyler sırasında kullanılan PZR koşullarında *Tbx3* pozitif kontrolünün çalışmış olması, teknik bir hatanın veya uyumsuzluğun olmadığına işaret etmektedir. Dolayısıyla bu negatif sonucun, insan kanından elde edilen hücrelerde *Tbx3* düzeylerinin çok düşük olmasından kaynaklanabileceği düşünülmüş ve daha hassas ve niceliksel olan yöntemler kullanılarak hasta ve kontrol gruplarının incelenmesine karar verilmiştir.

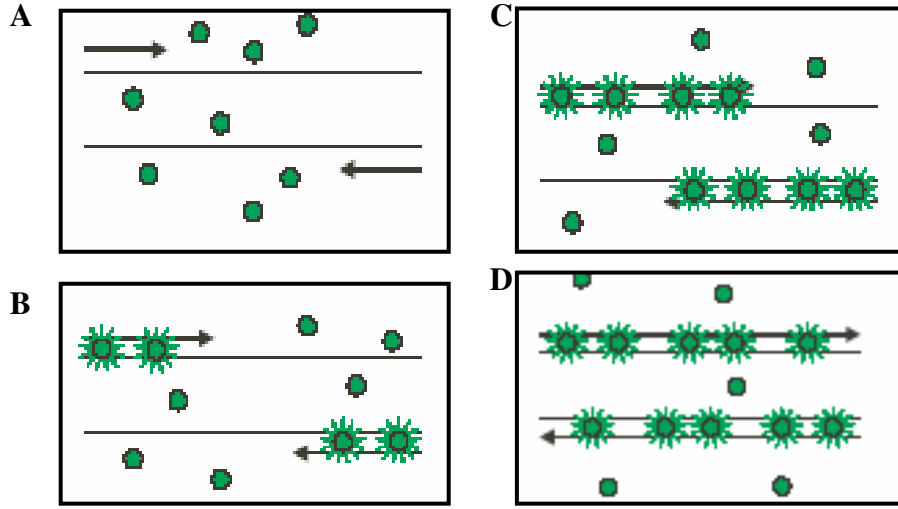


**Şekil 5.2. Bazı hasta ve kontrollerde GAPDH gen ekspresyonu:** Hasta ve kontrollerin kan ve/veya kemik iliklerinden elde edilen mRNA, AMV reverse transkriptaz ile cDNA'ya dönüştürülmüş ve GAPDH'a özgü primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılmıştır.

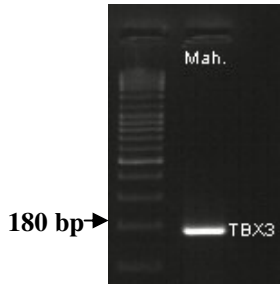
### 5.3. SYBR Green I ile eş-zamanlı niceliksel PZR kullanılarak Tbx3 mRNA düzeylerinin saptanması

DNA çift zincir yapısına bağlanan ve floresans veren boyalar, eşzamanlı PZR teknolojisinde sıklıkla kullanılmakta ve bilgisayar ortamında reaksiyonun gidişatı adım adım izlenmektedir. Eş-zamanlı PZR'nin klasik PZR den en önemli farkı ise ürünlerin doygunluğa ulaşılan en son noktada değil (örneğin 40 döngü sonrası), başlangıçtan itibaren izlenebilmesidir. Bu durum özellikle mRNA ekspresyon çalışmalarında önem kazanır. Zira başlangıç materyalinin örnekler arasında farklı olması (örneğin Tbx3 mRNA düzeyinin bir örnekte çok yüksek, diğer örnekte ise çok düşük olması gibi) ancak eş zamanlı PZR ile ortaya konulabilir. SYBR Green I floresans boyasının PZR de işleyiş biçimi şekil 5.3'de gösterilmiştir. Görüldüğü gibi ortamda bulunan floresans boya, çift zincir halinde olduğu takdirde ortamdaki her DNA molekülüne yapışmaktadır. Ortamdaki DNA molekül sayısı arttıkça, bağlanan boya miktarında artacağından floresan ölçümlerinde de yükselme görülmektedir. Yani eş zamanlı niceliksel PZR reaksiyonlarında ne kadar fazla ürün varsa o kadar yüksek floresans değeri elde edilmektedir.

Uygulamasının kolay olması ve diğer niceliksel PZR yöntemlerine göre daha ucuz olması nedeniyle olgularımızdaki Tbx3 ve GAPDH düzeylerinin öncelikle bu yöntem ile saptanmasına karar verilmiş ve bu amaçla Tbx3 mRNA'sına özgü ancak daha önce kullanılan primerlerden farklı bir set primer daha tasarlanmıştır. Bunun nedeni, SYBR Green I ile niceliksel PZR uygulamalarında en verimli sonucun en fazla 200 bp uzunluğundaki ürünlerden alınmasıdır. Bu primer setinin PZR koşullarının optimizasyonu yine pozitif cDNA (Mahlawu/SNU 475 karaciğer kanseri hücre hatları) kullanılarak yapılmıştır. Şekil 5.4 (Mahlawu PZR) görüldüğü gibi 180 bp büyüklüğündeki Tbx3 cDNA'sı Mahlawu hücre hatlarında net bir şekilde ortaya konulmuştur.



**Şekil 5.3. SYBR Green I çalışma mekanizması:** A. PZR döngüsü sırasında denatürasyon fazında DNA iplikçikleri ayrılır. B. Eşleşme fazında primerler (oklarla gösterilmiştir) DNA'ya yapışır. C-D. Uzama fazında ise DNA'nın kopyası çıkartılarak yeni bir zincir oluşturulur. Ortamda bulunan SYBR Green I floresan boyası, her çift zincirli DNA molekülüne yapışma eğilimindedir ve DNA molekül sayısı arttıkça flouresan yayılımı da artar.



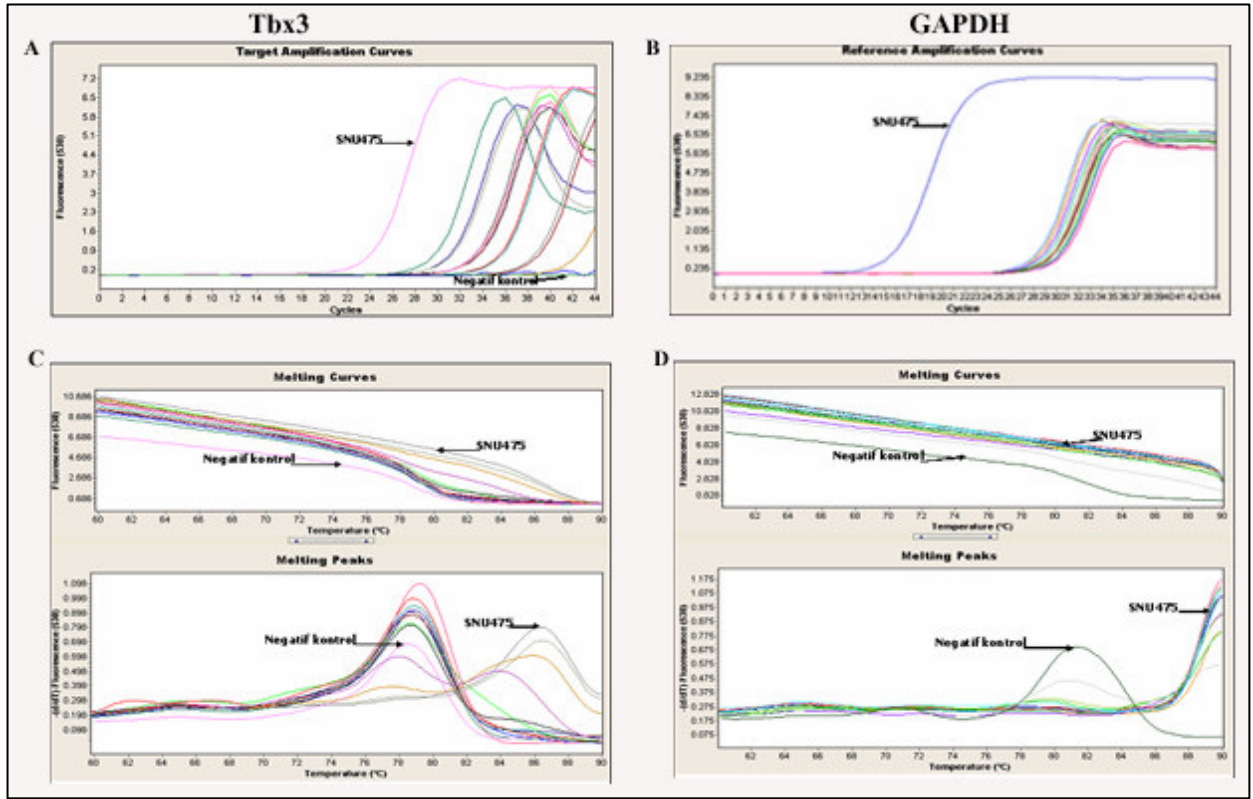
**Şekil 5.4. Mahlawu hücre hattında Tbx3 mRNA ekspresyonu:** SYBR Green I ile niceliksel PZR uygulamalarında kullanılması planlanan primer seti kullanılarak Mahlawu hücrelerinden elde edilen cDNA çoğaltılmış ve bu primer seti için uygun PZR koşulları optimize edilmiştir.

Daha sonra SYBR Green I kullanılarak hasta ve sağlıklı bireylerin periferik kanından elde edilen cDNA'lar ile Tbx3 ve GAPDH mRNA'sı ekspresyon düzeylerine bakılmıştır. Şekil 5.5'da görüldüğü gibi olguların amplifikasyon eğrileri 26. döngüden itibaren başlarken, pozitif kontrol olarak kullanılan SNU 475 HCC hücre hatlarından elde edilen cDNA'nın Tbx3 amplifikasyonu 20. döngüde (şekil 5.5.A), GAPDH amplifikasyonu ise 12. döngüde başlamaktadır (şekil 5.5.B). Bu durum, pozitif kontrol için kullanılan başlangıç cDNA miktarının olguların mononükleer hücrelerinden elde edilen cDNA miktarlarından daha fazla olduğunun göstergesidir. Pozitif kontrolde her iki amplifikasyonun başarılı olması ise kullanılan şartların ve ısı programlarının uygunluğunu ispatlamaktadır. Hasta ve kontrol örnekleri incelendiğinde; Tbx3 düzeylerinin oldukça düşük olmakla birlikte (en erken 26. döngüde amplifikasyon başlamaktadır), izlenebilir boyutlarda olduğu ancak düzeylerin örnekler arasında farklılıklar gösterdiği anlaşılmaktadır (Şekil 5.5.A). Bu farklılığın doğrudan Tbx3 düzeyleri ile ilgili olduğu, yani kullanılan cDNA miktarının örnekten örneğe farklılık göstermediğinin ispatı ise GAPDH mRNA düzeyleri ile sağlanmıştır (Şekil 5.5.B). Görüleceği üzere, pozitif kontrol hariç tüm örneklerin GAPDH amplifikasyonuna bağlı floresans ölçümü 26. döngü sırasında oluşmaya başlamıştır ki bu da reaksiyon başlangıcında ortama konulan cDNA miktarının tüm olgu örneklerinde eşit olduğunun göstergesidir. Böylece, Tbx3 ekspresyonunun gerek sağlıklı bireylerde gerekse hastalarda düşük düzeyde de olsa bulunduğu ve bireyler arasında farklılıklar gösterdiği saptanmıştır. Olgularda ancak eş-zamanlı PZR kullanılarak Tbx3 düzeylerinin saptanabilmesi ve floresans miktarı verilerine göre yapılan niceliksel hesaplamalarda değerlerin düşük olarak bulunması, klasik PZR ile herhangi bir sonuç alınamamasını da açıklamaktadır.

Deneme amaçlı yapılan bu ilk çalışmada, 3 sağlıklı birey ve 13 hasta cDNA'sı incelenmiştir. Ancak bu deneyin erime eğrisi (melting curve analysis) analizlerinde özellikle Tbx3 amplifikasyonunda (Şekil 5.5.C), iki adet pik oluştuğu saptanmıştır. Erime eğrisi analizi; reaksiyon sonunda yapılan bir ısı programı ile ortamda bulunan DNA moleküllerinin boyuna, dizinlerine ve GC içeriklerine göre gruplandırılmalarını sağlamaktadır. DNA iplikçikleri, ortam ısısı arttıkça birbirinden ayrılır, dolayısıyla sadece çift zincirli DNA'ya bağlanabilen SYBR Green I boyasının yaydığı floresans da iplikler ayrıldıkça azalır. Şekil 5.5.C ve D'de üst kısımda örneklerin floresans değerlerinin ısı artımına paralel olarak azaldığı görülmektedir. Bu çizelgenin birinci negatif türevinin alınmasıyla oluşturulan çizelge ise her bir örnek için oluşan erimeyi pik tarzında göstermektedir (melting peaks). Bu analizde her bir DNA'nın uzunluğu ve dizin içeriği farklı olduğundan farklı pikler oluşacaktır. Nitekim GAPDH erime analizi tablosu incelendiğinde (Şekil 5.5.D), negatif kontrol hariç tüm örneklerin aynı noktada ve tek bir pik verdiği görülmektedir. Bu da reaksiyon içindeki tüm ürünlerin özgün ve GAPDH'a ait olduğunun göstergesidir. Negatif kontrol olarak kullanılan örnekte ortama sadece primerler konmuş, cDNA konmamıştır. Dolayısıyla farklı noktadaki erime piki de GAPDH'a ait değil, primer dimer oluşumuna bağlıdır. GAPDH eğrilerindeki düzgülüğe karşın, Tbx3 örneklerinin iki pik oluşturduğu gözlenmektedir. Bu durum, elde edilen PZR ürünüde Tbx3 yanısıra özgün olmayan ürünlerin de bulunduğunu göstermektedir. Dolayısıyla A şikkında gözlenmiş olan floresans değerlerinin, özgün olan ve olmayan tüm ürünlerden kaynaklandığı anlaşılmaktadır. Reaksiyon koşulları ve MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonu değiştirilerek defalarca tekrarlanan deneyler sonrasında bile



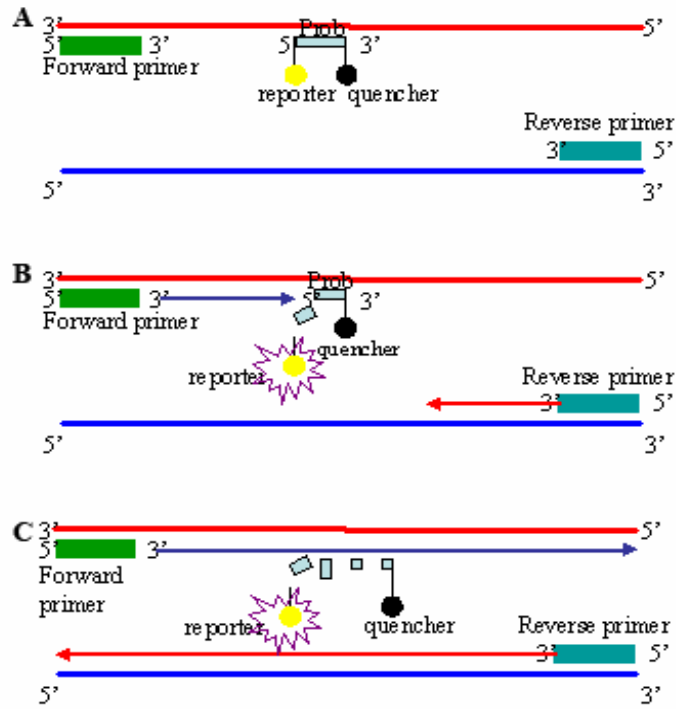
özgün olmayan PZR ürünlerinin oluşumu engellenememiştir. Bu şartlar altında elde edilen floresans değerlerin doğrudan Tbx3 düzeyini yansıtamayacağı düşünülerek başka bir yöntemle eş-zamanlı PZR uygulaması yapılmasına karar verilmiştir.



**Şekil 5.5.** SYBR Green I kullanarak eş-zamanlı PZR ile Tbx3 düzeylerinin saptanması: **A.** Tbx3 mRNA'sına özgü primerler kullanılarak yapılan amplifikasyon çıktısı. **B.** GAPDH mRNA'sına özgü primerler kullanılarak yapılan amplifikasyon çıktısı. **C.** Tbx3 amplifikasyon ürünlerinin erime analizi. **D.** GAPDH amplifikasyon ürünlerinin erime analizi.

#### 5.4. TaqMan probaları ile eş-zamanlı niceliksel PZR kullanılarak Tbx3 mRNA düzeylerinin saptanması

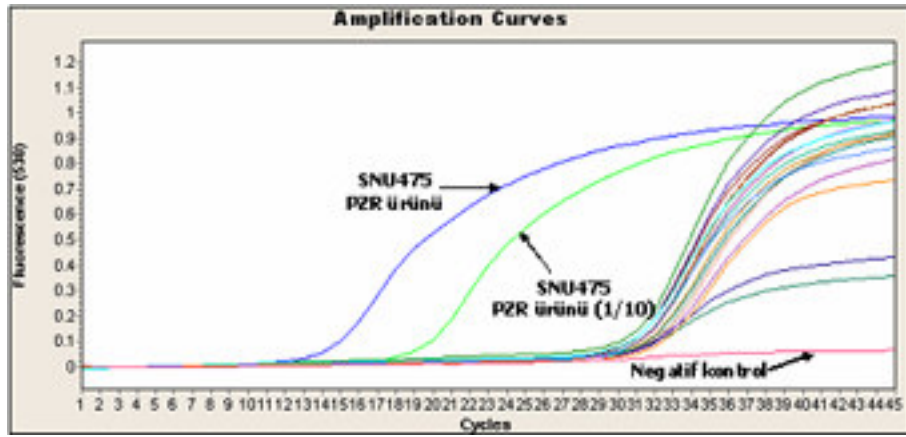
TaqMan probaları ile yapılan eş-zamanlı PZR’de de floresans boya kullanılmakta ancak SYBR Green I de olduğu gibi boya doğrudan reaksiyon içine konulmamaktadır. Bu yöntemde, sağ ve sol yönde ilerlemeyi sağlayacak bir çift primer seti yanısıra prob olarak adlandırılan ve sadece 8–9 nükleotitten oluşan özel primerler kullanılmaktadır. Floresans boya da probun sentezlenmesi sırasında üzerine yerleştirilir (reporter) ve sadece DNA’daki özgün bölgesine bağlandığı zaman ışımaya vermesi için de probun diğer ucuna ışımaya oluşumunu engelleyecek bir başka kimyasal yapı konulur (quencher). Şekil 5.6’de izlenebileceği gibi, reaksiyon sırasında DNA denatürasyonunu takiben eşleşme fazında hem primerler hem de prob DNA üzerindeki özgün bölgelerine bağlanırlar, bu esnada prob herhangi bir ışımaya vermemektedir. PZR reaksiyonunun uzama fazında primerlerden başlayarak yeni DNA iplikçığının oluşmasıyla birlikte prob da yerinden sökülür ve engelleyici yapıdan uzaklaştığı için ışımaya vermeye başlar. Yani burada ışımaya ancak özgün ürün amplifiye olursa gerçekleşmektedir.



Şekil 5.6. TaqMan probunun çalışma prensibi: **A**. Primerler ve prob tek zincirli DNA'ya bağlanır. **B**. Karşıt zincir sentezlenir ve Taq DNA polimerazın 5' nükleaz aktivitesi ile bildirici boya yerinden çıkartılır ve floresans vermeye başlar. **C**. Prob parçalanarak hedef DNA'dan ayrılır (Roche Molecular Biochemicals Technical Note'tan alıntı yapılmıştır).

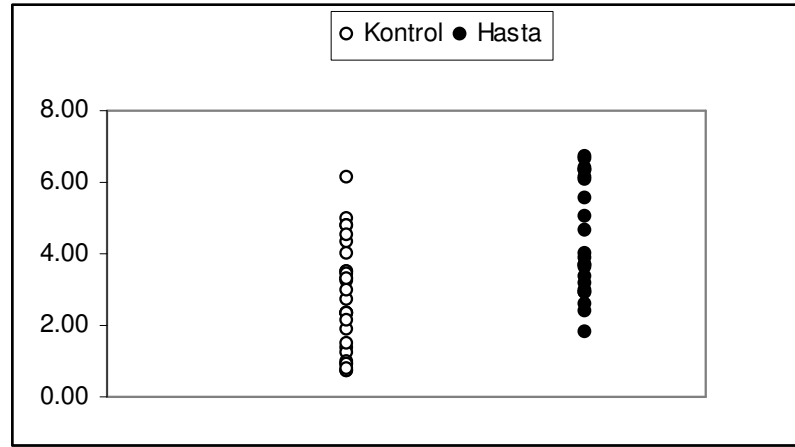
Bu yöntem ile olgularımızın Tbx3 mRNA düzeyleri incelendiğinde, pozitif kontrollere göre mononükleer hücre cDNA'larının daha düşük düzeyde Tbx3 içerdiği (amplifikasyon ancak 22–23. döngülerde başlamıştır) ancak eğrilerin son derece düzgün olduğu saptanmıştır (Şekil 5.7). Bu yöntemde özgün olmayan bir ürün amplifiye edilemeyeceğinden, eğrilerin Tbx3 amplifikasyonuna bağlı olarak oluştuğuna karar verilmiş ve floresans nicelik değerleri hesaplanarak sonuçlar grafik haline getirilmiştir.

SYBR Green I deneylerinde kullanılan cDNA'lar burada da aynı miktarda kullanıldığından, örnekler arasında cDNA miktarı açısından bir fark olmayacağı düşünülerek GAPDH ekspresyonu ayrıca incelenmemiştir.



Şekil 5.7. TaqMan problemleri kullanılarak yapılan eş-zamanlı PZR ile Tbx3 düzeylerinin saptanması: SNU 475 HCC hücre hattı cDNAsı pozitif kontrol olarak iki farklı dilüsyonda kullanılmıştır. Negatif kontrolde ise sadece primer-prob seti reaksiyona konulmuş, cDNA eklenmemiştir.

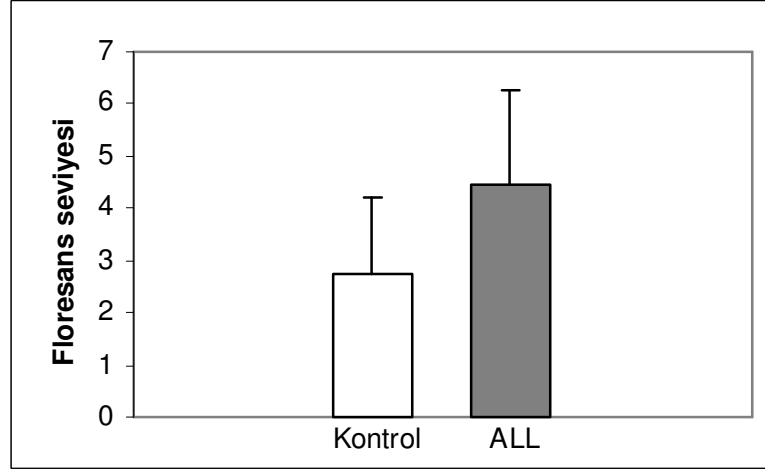
Hasta ve sağlıklı bireylerin TBX3 düzeylerini gösteren floresans değerlere göre bir grafik çizildiğinde hastaların çoğunda sağlıklı bireylere göre bir artış olduğu görülmüştür ( $p=0.001$ ; şekil 5.8).



**Şekil 5.8. Hasta ve Kontrol Gruplarında Tbx3 mRNA düzeyleri:** TaqMan problemleri kullanılarak yapılan eş-zamanlı niceliksel PZR uygulamasında elde edilen floresans değerlere göre oluşturulmuştur (p=0.001; hasta n=23; kontrol n=30)

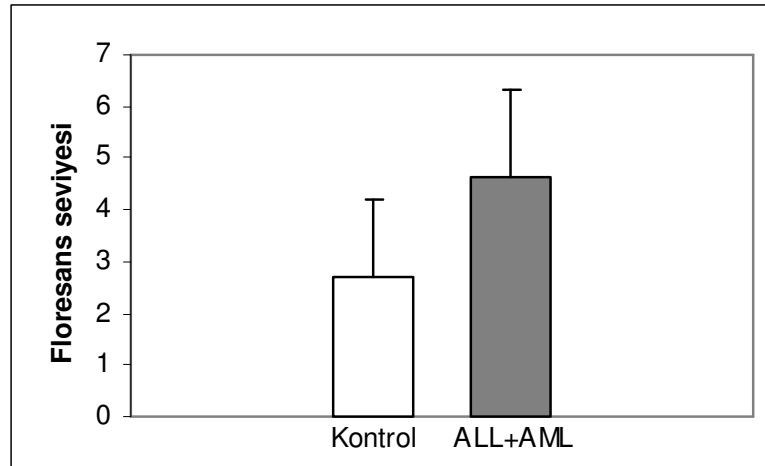
Ancak gerek sağlıklı bireylerde gerekse hastalardaki Tbx3 değerlerinin kişiler arasında büyük oranda varyasyon gösterdiği de saptanmıştır. Hasta kişilerdeki bu farklı değerler, klinik tanıya veya hastalığın evresine bağlı olarak gelişebileceğinden çalışmaya katılan kişilerin klinik ve laboratuvar özellikleri ile Tbx3 mRNA'sı düzeyi ölçümlerinden elde edilen floresans değerler karşılaştırılmıştır (Ek 5 ve 6). Ancak klinik tanıya bağlı olarak Tbx3 değerlerinde belirgin bir değişim saptanmamıştır.

Tablo 5.1'de de belirtildiği gibi, çalışmaya katılan 23 hastanın 12 tanesi çocuk olup hepsi de ALL tanısı almıştır ve bu grup tüm hastaların %52.17'sini oluşturmaktadır. Bunu, %26.09 ile AML tanısı almış olan hastalar takip etmektedir (n=6). ALL hastalarının, TaqMan problemleri ile yapılan niceliksel PZR sonrası elde edilen floresans değerlerinin ortalaması alınarak ( $4.47 \pm 1.79$ ), kontrollerden elde edilen değerler ile ( $2.72 \pm 1.49$ ) karşılaştırılması sonucunda ALL hastalarının Tbx3 düzeylerinin kontrollere göre artmış olduğu bulunmuştur (p=0.002, şekil 5.9).



**Şekil 5.9. ALL tanısı almış hastaların Tbx3 mRNA düzeyi:** ALL hastaları ve sağlıklı kontrollerin TaqMan probları ile yapılan niceliksel PZR sonucunda elde edilen floresans değerlerinin ortalaması alınmış ve ALL hastalarında ( $4.47 \pm 1.79$ ) kontrollere göre ( $2.72 \pm 1.49$ ) daha yüksek düzeyde Tbx3 bulunduğu saptanmıştır ( $p=0.002$ ; ALL n=12; kontrol n=30).

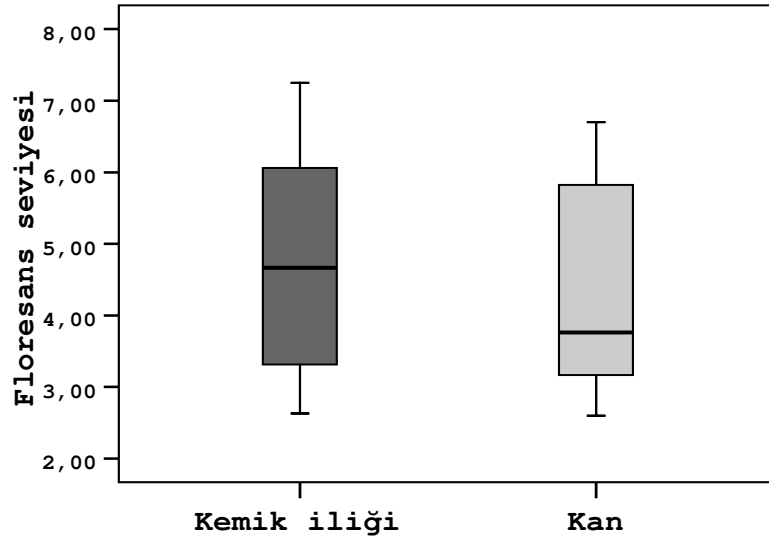
AML tanısı almış hastaların sayısı düşük olduğundan istatistiksel analiz yapılamamıştır. Hematolojik maligniteler genel anlamda köken aldıkları hücre tipine ve hastalığın gidişatına göre sınıflandırıldıklarından akut lösemiler ile sağlıklı bireyler arasında Tbx3 mRNA düzeyi açısından fark olup olmadığı da incelenmiştir. Tüm ALL ve AML tanısı almış hastaların floresans değerleri ortalamaları ( $4.62 \pm 1.69$ ), sağlıklı bireylerin ortalamaları ile karşılaştırılınca, istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmuştur ( $p=0.001$ , şekil 5.10).



**Şekil 5.10. ALL ve AML hastalarındaki Tbx3 mRNA düzeyi:** Ortalamalar esas alındığında, ALL ve AML ( $4.62 \pm 1.69$ ) hastalarında kontrole ( $2.72 \pm 1.49$ ) göre daha yüksek düzeyde TBX3 mRNA'sı saptanmıştır ( $p=0.001$ ; ALL ve AML n=18; kontrol n=30).

ALL ve AML dışında tanı almış olan hastaların sayıları istatistiksel değerlendirme yapabilecek sınıırın altında olması nedeniyle (3 adet KLL ve 1'er adet Burkitt lenfoma ve multiple myeloma tanısı almış hastalar) karşılaştırma yapılmamıştır.

Olgular ve yöntem bölümünde belirtildiği gibi hastaların 8 tanesinin periferik kan örnekleri yanısıra kemik iliği örneklerinden de Tbx3 mRNA düzeyleri çalışılmıştır. Kan ve kemik iliği örneklerinde Tbx3 düzeyleri açısından istatistiksel olarak önemli bir fark saptanmamıştır (Şekil 5.11).



**Şekil 5.11. Periferik kan ve kemik iliği örneklerinde Tbx3 mRNA düzeyi:**

TaqMan problemleri kullanılarak yapılan niceliksel PZR sonucunda elde edilen floresans değerlerinin ortalaması alınıp karşılaştırıldığında periferik kan mononükleer hücre Tbx3 değerleri ( $4.35 \pm 1.54$ ) ile kemik iliği hücreleri Tbx3 değerleri ( $4.75 \pm 1.66$ ) arasında önemli bir fark saptanmamıştır ( $p=0.636$ ; kan ve kemik iliği  $n=8$ ).

Kemik iliği örnekleri çalışılan hastaların hem kan hem de kemik iliklerindeki blast hücre oranları verilmiştir (Tablo 5.2). Örnek sayısı az olmasına karşın, periferik kandaki blast hücre oranının çoğunlukla %20'den fazla olduğu görülmektedir.

**Tablo 5.2.** Kemik iliği örnekleri çalışılan hastaların kan ve kemik iliklerindeki Tbx3 mRNA düzeyi ve blast hücre oranları (n=8).

	Kan		Kemik iliği	
	Fluoresans seviyesi	Blast hücre oranı (%)	Fluoresans seviyesi	Blast hücre oranı (%)
<b>NK</b>	3.68	-	3.43	-
<b>HY</b>	2.60	80	5.42	-
<b>DKG</b>	3.33	10	4.43	100
<b>MŞ</b>	3.84	60	2.63	80
<b>FA</b>	6.70	96	6.70	80
<b>ÖC</b>	5.55	60	7.25	80
<b>FK</b>	6.10	40	4.90	80
<b>ZY</b>	3.00	26	3.20	80

### 5.5 Tbx3 Protein Düzeyinin Saptanması

Tbx3 mRNA düzeyindeki değişiklikleri protein düzeyinde de inceleyebilmek amacıyla gerek karaciğer kanseri hücre hatlarından gerekse olguların mononükleer hücrelerinden total protein izolasyonu yapılmış ve anti-Tbx3 antikoruna ile immunoblot uygulanmıştır. Ancak, anti-aktin antikoruna ile yapılan immunoblottarda aktin proteininin görüntülenmesine rağmen Tbx3 proteini hiçbir koşulda görüntülenememiştir. Anti-aktin ile elde edilen sonuçlar, protein izolasyonu ve SDS-PAGE ile ayırıştırma işlemlerinde herhangi bir teknik sorun olmadığını göstermektedir. Farklı sürelerde ve konsantrasyonlarda defalarca uygulanan anti-Tbx3 antikoruna ile sonuç alınamaması ise, satın alınan antikoruna belki de uygun koşullarda sevk edilmediğinden bozulmuş olmasına bağlanmıştır. Proje kapsamında kullanılan paranın yeterli olmaması nedeniyle ikinci bir antikor satın alınamamıştır.

## TARTIŞMA

Embriyolojik gelişim esnasında özellikle üst ekstremitte ve bazı salgı bezlerinin gelişiminde rol oynayan Tbx3, erişkin dokularda da eksprese edilmekte ancak erişkin hücrelerdeki fizyolojik fonksiyonları bilinmemektedir. Bugüne kadar, Tbx3'ün erişkin dokulardaki ekspresyonu sadece kanser oluşumu ile ilintilendirilmiş<sup>5, 6, 55-57</sup> ve deneysel olarak, hücre döngüsünü durduran proteinleri baskılayarak, hücre yaşlanmasını engellediği ve hücreleri aşırı bölünmeye yönlendirdiği gösterilmiştir<sup>7, 10, 11, 45</sup>.

B lenfosit hücre hatlarıyla kültür ortamında yapılan çalışmalarda; Tbx3 ve Tbx2 düzeylerinin olgun olmayan hücrelerde yüksek olduğu, fakat hücreler olgunlaştıkça her iki protein düzeyinin giderek azaldığı saptanmıştır (B.Bilican ve U. Yavuzer, yayınlanmamış veriler). Bu nedenle de hematolojik malignitelerde Tbx3'ün rol alabileceği düşünülmüş ve işlevinin moleküler mekanizmasını ortaya çıkaracak deneylere bir başlangıç olmak üzere, öncelikle bu tür hastalıklarda Tbx3 düzeylerinde bir değişim olup olmadığının araştırılmasına karar verilmiştir.

Çalışmamıza 12'si çocuk olmak üzere toplam 23 hasta katılmıştır. Tbx3 mRNA düzeylerinin hangi tür hematolojik malignitelerde değişeceği öngörülemediğinden başlangıçta belli bir gruba ağırlık verilmemiştir. Ancak çocuk hastaların tümünün ALL tanısı almış olması nedeniyle karşılaştırma temel olarak bu grup maligniteler için yapılmış ve Tbx3 düzeylerinin sağlıklı bireylere göre önemli derecede arttığı saptanmıştır (p=0.002). Ancak, kontrol grubunu oluşturan sağlıklı bireyler erişkin kişilerden oluşmaktadır. Sağlıklı çocukların ebeveynleri çalışmaya katılmayı kabul etmediklerinden yaşa uyumlu bir kontrol grubu oluşturulamamıştır. Literatürde her ne kadar erişkin hücrelerdeki Tbx3 düzeylerinin yaşa bağlı olarak değiştiğine dair bir bilgi bulunmasa da, kontrol grubunun bu anlamda ideal şartları yerine getirmediği açıktır. Erişkin hasta grubu ise 11 kişiden oluşmuştur. Klinik tanılarına göre gruplandırıldıklarında, her bir gruba düşen hasta sayısı istatistiksel bir değerlendirme yapılabilecek sınırın altında kaldığından değerlendirme yapılamamıştır. Ancak gerek çocuk gerekse erişkin hastaların periferik kan mononükleer hücrelerindeki Tbx3 düzeyi ölçümlerinden elde edilen floresans değerlere bakıldığında (Ek 5 ve 6), 3 kişi hariç hastaların tümünde değerlerin ROC eğrisi analizi sonucunda elde edilen 2.80'den yüksek olduğu görülmektedir. Bu da Tbx3'ün, belki de klinik tanı farkı gözetmeksizin, tüm hematolojik kanserlerde artabileceğini göstermektedir. Ancak bu konu ile ilgili olarak kesin sonuca varmak için hasta serilerinin artırılması ve daha güvenilir istatistiksel karşılaştırmalar yapılması gerekmektedir. Sağlıklı bireylerdeki Tbx3 düzeylerinin kişiler arasında büyük farklılıklar göstermesi ve 10 kişide de güvenli sınır olan 2,80 değerinin üzerinde bulunmasının nedenleri ise henüz anlaşılamamıştır.

Hematolojik malignite etyopatogeneğinde, homolog olmayan kromozomlar arasında oluşan translokasyonlar en önemli yeri tutmaktadırlar. Bunun yanı sıra



translokasyona neden olan proteinleri kodlayan genler ve bir çok genin ekspresyonunu kromatin yapısını değiştirerek (asetilasyon, metilasyon gibi olaylar ile) düzenleyen gen ürünleri de lösemi gelişimine neden olmaktadır. Translokasyona neden olan olaylar zinciri tam olarak bilinmese de lösemide görülen kromozomal translokasyonlarının [t(4;11), t(9;11), t(8;21), inv(16), t(15;17), t(12;21), t(1;19) ve t(9;22) dahil olmak üzere] genomik kırılma bölgeleri klonlanmış ve MLL, AF4, AF9, AML1, ETO, CBFβ, MYH11, PML, RARA, TEL, E2A, PBX1, BCR ile ABL gibi genlerin bu bölgelerde lokalize oldukları saptanmıştır<sup>60</sup>. Dolayısıyla, her bir tip lösemide farklı gen ürünleri rol oynamaktadır ve tümör baskılayıcıların inhibe edilmesi yanısıra, yeni onkogenlerin oluşması veya proto-onkogenlerin durdurulamayan aktivasyonu ortaya çıkabilmektedir. Translokasyon bölgelerinin rastgele bir dağılım göstermemesinin nedeni, yapısal olarak bu bölgelerin kırılmalara karşı dirençsiz olmalarından kaynaklanmaktadır<sup>61</sup>. Bunun üzerine bir de DNA tamir mekanizmalarındaki eksiklikler eklenince, kırık bölgeler tamir edilememekte ve istenmeyen gen ürünlerinin oluşmasına neden olan translokasyonlar meydana gelmektedir. Bu nedenle lösemilerin gelişiminde sadece yukarıda bahsedilen genler değil, DNA tamirinde rol oynayan genler (ATM, ATR gibi) ve DNA metilasyonu ve asetilasyonunu regüle eden genler de etkin olmaktadır<sup>62</sup>.

Tbx3'ün regülasyonu hakkında çok detaylı bilgi olmamasına rağmen, retinoik asid reseptörü (B. Bilican, yayınlanmamış veriler) ve b-catenin'in Tbx3 promoterine bağlanarak Tbx3 ekspresyonunu arttırdığı bilinmektedir<sup>63</sup>. B-catenin, Wnt sinyal yolağında görev alan bir transkripsiyon faktörüdür ve ilginç olarak bu yolak bazı tip lösemilerin gelişiminde de etken rol oynamaktadır. Lösemi etyopatogenezinde rol oynayan çok sayıda farklı gen ve sinyal yolağının hangilerinin Tbx3 regülasyonunda görev aldığı henüz bilinmese de bu yolaklardan bazılarının Tbx3 düzeylerini arttırıcı etkisi olabileceğini düşünmek çok da gerçek dışı bir yaklaşım değildir.

Her ne kadar hasta sayımız çok kuvvetli çıkarımlar yapmak için yeterli değilse de, Tbx3 düzeylerinin klinik tanı farkı gözetmeksizin tüm hastalarda yüksek olarak bulunması, belki de tüm farklı genlerin ve farklı yolakların ortak hedefi olmasındandır. Bu da, Tbx3'ün lösemilerin erken tanısında veya tedaviye yanıtlarının takibinde önemli bir belirteç olarak kullanılmasını sağlayabilir. Bu noktada, mevcut hastaların takibi sırasında Tbx3 düzeylerinin de incelenmesinin faydalı olduğu görüşündeyiz. Böylece tanı anındaki Tbx3 düzeyi ile tedavi sonrasındaki düzeylerin karşılaştırılmasıyla daha sağlıklı bir sonuca ulaşılabileceğine inanıyoruz.

Tbx3 düzeyinin periferik kan veya kemik iliğinden elde edilen mononükleer hücreler arasında fark göstermemesi, Tbx3 düzeyleri ölçümünde periferik kan örneği kullanımının yeterli olacağını göstermektedir. Ancak, bu noktadaki belirleyici etken periferik kandaki blast hücre yüzdesidir. Toplam 8 hastanın periferik kan ve kemik iliği örneklerinin karşılaştırılması sonucunda periferik kandaki blast hücre oranının en az %20 olduğu hallerde Tbx3 mRNA'sı hem kan hem de kemik iliğinde saptanmıştır. Çalışmaya katılan hastalar arasında kemik iliği tutulumu olup da periferik kanda blast hücresi hiç olmayan hasta bulunmamaktadır. Bu nedenle Tbx3 mRNA düzeylerinin periferik kandan saptanabilmesi için gereken en düşük blast hücre yüzdesi henüz bilinmemektedir.

Bu çalışma sırasında, ekspresyon analizlerinde klasik PZR tekniğinin kullanılmasının kısıtlayıcı yönleri hakkında da deneyim kazanılmıştır. Bir gen ürününün çok düşük düzeylerde ekspresyonu halinde veya farklı örneklerde farklı düzeylerde ekspresyonu olması durumunda klasik PZR yöntemi ile her zaman güvenilir sonuç almak mümkün değildir. Nitekim bizim çalışmamız sırasında da çok yüksek Tbx3 düzeyi bulunan birkaç hasta dışında ekspresyon düzeyini göstermemiz ve miktar yönünden kontrol grubu ile karşılaştırmamız başarısız olmuştur. Eş-zamanlı niceliksel PZR uygulamalarında da kullanılan tekniğin seçimi önem kazanmaktadır. Çoğu ekspresyon analizlerinde ucuz ve uygulamanın kolay olması nedeniyle ilk tercih olarak kullanılan SYBR Green I tekniği çoğu kez başarılı sonuçlar verse de, dikkatle değerlendirilmesi gereken bir tekniktir. SYBR Green I boyasının seçici olmayan bir şekilde ortamda bulunan tüm çift zincirli DNA moleküllerine bağlanabilmesi, özgün ürün yanısıra özgün olmayan PZR ürünleri (primerlerin genom üzerinde başka bölgelere zayıf da olsa yapışıp, başka ürünlerin çoğaltılmasına neden olmaları) ve primer dimerlerinin de floresans ışığa yapmasına ve görüntü kirliliğine neden olabilmektedir. Bu nedenle eş-zamanlı niceliksel PZR uygulamalarında, bu çalışmamızda kullandığımız gibi TaqMan problemleri veya hibridizasyon problemlerinin kullanılması sadece özgün ürünün ölçülmesine olanak sağladığı için daha güvenilir olarak kabul edilmektedir. Ancak prob kullanımının pahalı bir yöntem olduğu da unutulmamalıdır. Özellikle geniş kapsamlı çalışmalarda veya çalışmaların tarama yöntemine dönüştürülmesi gerektiğinde test maliyetinin olabildiğince düşük olması gerekliliği dikkate alınmalıdır.

Sonuç olarak bu çalışma ile, Tbx3'ün hematolojik kanserlerde düzeylerinin artmış olduğu gösterilmiş ve bu artışın nedenlerinin açıklanmasına yönelik fonksiyonel çalışmalar için önemli ipuçları elde edilmiştir. Gelecekteki çalışmalarımızda, hasta sayısının artırılması ve mevcut hastaların takibi sırasında Tbx3 düzeylerinin de incelenmesi ile daha güvenilir bir sonuca ulaşılacağını düşünmekteyiz.

## SONUÇLAR

1. ALL tanısı almış hastalarda TBX3 mRNA düzeyi, sağlıklı kontrollere göre istatistiksel olarak önemli düzeyde yüksek bulunmuştur.
2. TBX3 mRNA düzeyleri hastaların periferik kan mononükleer hücreleri ve kemik iliği hücrelerinde fark göstermemektedir.
3. ROC eğrisi analizine göre, 3 hasta hariç, çalışmaya katılan ve farklı klinik tanısı olan tüm hematolojik malignite hastalarında Tbx3 mRNA düzeyi sağlıklı bireylerin ortalamasından yüksek olarak bulunmuştur.
4. Tbx3 mRNA düzeyleri, sağlıklı bireyler arasında farklılık göstermektedir.

## KAYNAKLAR

1. Wilson, V. & Conlon, F. L. The T-box family. *Genome Biol* 3, REVIEWS3008 (2002).
2. Papaioannou, V. E. & Silver, L. M. The T-box gene family. *Bioessays* 20, 9-19 (1998).
3. Smith, J. T-box genes: what they do and how they do it. *Trends Genet* 15, 154-8 (1999).
4. Packham, E. A. & Brook, J. D. T-box genes in human disorders. *Hum Mol Genet* 12 Spec No 1, R37-44 (2003).
5. Fan, W., Huang, X., Chen, C., Gray, J. & Huang, T. TBX3 and its isoform TBX3+2a are functionally distinctive in inhibition of senescence and are overexpressed in a subset of breast cancer cell lines. *Cancer Res* 64, 5132-9 (2004).
6. Lomnytska, M., Dubrovskaya, A., Hellman, U., Volodko, N. & Souchelnytskyi, S. Increased expression of cSHMT, Tbx3 and utrophin in plasma of ovarian and breast cancer patients. *Int J Cancer* 118, 412-21 (2006).
7. Brummelkamp, T. R. et al. TBX-3, the gene mutated in Ulnar-Mammary Syndrome, is a negative regulator of p19ARF and inhibits senescence. *J Biol Chem* 277, 6567-72 (2002).
8. Carlson, H., Ota, S., Song, Y., Chen, Y. & Hurlin, P. J. Tbx3 impinges on the p53 pathway to suppress apoptosis, facilitate cell transformation and block myogenic differentiation. *Oncogene* 21, 3827-35 (2002).
9. Carreira, S., Dexter, T. J., Yavuzer, U., Easty, D. J. & Goding, C. R. Brachyury-related transcription factor Tbx2 and repression of the melanocyte-specific TRP-1 promoter. *Mol Cell Biol* 18, 5099-108 (1998).
10. Prince, S., Carreira, S., Vance, K. W., Abrahams, A. & Goding, C. R. Tbx2 directly represses the expression of the p21(WAF1) cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cancer Res* 64, 1669-74 (2004).
11. Vance, K. W., Carreira, S., Brosch, G. & Goding, C. R. Tbx2 is overexpressed and plays an important role in maintaining proliferation and suppression of senescence in melanomas. *Cancer Res* 65, 2260-8 (2005).
12. [www.stoma-seite.de/SiklusApoptozisKanser.pdf](http://www.stoma-seite.de/SiklusApoptozisKanser.pdf).

13. Köktürk, N., Kırıçoğlu, C. E., Öztürk C. Akciğer Kanseri Moleküler Biyolojisi. *Solunum* 5, 127-138 (2003).
14. Fong, K. M. & Minna, J. D. Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Clin Chest Med* 23, 83-101 (2002).
15. Groeger, A. M. et al. Advances in the understanding of lung cancer. *Anticancer Res* 17, 2519-22 (1997).
16. Levin, W. J. et al. Tumor suppressor and immediate early transcription factor genes in non-small cell lung cancer. *Chest* 106, 372S-376S (1994).
17. Devereux, T. R., Taylor, J. A. & Barrett, J. C. Molecular mechanisms of lung cancer. Interaction of environmental and genetic factors. Giles F. Filley Lecture. *Chest* 109, 14S-19S (1996).
18. Levine, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323-31 (1997).
19. Heasley LE, J. G. I. e., Marcel Dekker Inc. ;. Signal transduction abnormalities in lung cancer (ed. Kane MA, B. P.) (New York, 1998).
20. Appella, E. & Anderson, C. W. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem* 268, 2764-72 (2001).
21. Spivack, S. D., Fasco, M. J., Walker, V. E. & Kaminsky, L. S. The molecular epidemiology of lung cancer. *Crit Rev Toxicol* 27, 319-65 (1997).
22. Hussain, S. P. & Harris, C. C. Molecular epidemiology and carcinogenesis: endogenous and exogenous carcinogens. *Mutat Res* 462, 311-22 (2000).
23. Lowe, S. W. & Sherr, C. J. Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles. *Curr Opin Genet Dev* 13, 77-83 (2003).
24. Kamijo, T. et al. Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* 91, 649-59 (1997).
25. Pomerantz, J. et al. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 92, 713-23 (1998).
26. Zhang, Y., Xiong, Y. & Yarbrough, W. G. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* 92, 725-34 (1998).
27. Bates, S. et al. p14ARF links the tumour suppressors RB and p53. *Nature* 395, 124-5 (1998).
28. de Stanchina, E. et al. E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor. *Genes Dev* 12, 2434-42 (1998).

29. Palmero, I., Pantoja, C. & Serrano, M. p19ARF links the tumour suppressor p53 to Ras. *Nature* 395, 125-6 (1998).
30. Zindy, F. et al. Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev* 12, 2424-33 (1998).
31. Rowley, M., Grothey, E. & Couch, F. J. The role of Tbx2 and Tbx3 in mammary development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9, 109-18 (2004).
32. Roth, J. A. Molecular events in lung cancer. *Lung Cancer* 10 (Suppl 1), 3s-15s (1994).
33. Herrmann, B. G., Labeit, S., Poustka, A., King, T. R. & Lehrach, H. Cloning of the T gene required in mesoderm formation in the mouse. *Nature* 343, 617-22 (1990).
34. Wilkinson, D. G., Bhatt, S. & Herrmann, B. G. Expression pattern of the mouse T gene and its role in mesoderm formation. *Nature* 343, 657-9 (1990).
35. Gluecksohn-Schoenheimer, S. The Development of Normal and Homozygous Brachy (T/T) Mouse Embryos in the Extraembryonic Coelom of the Chick. *Proc Natl Acad Sci U S A* 30, 134-40 (1944).
36. Haworth, K. et al. Canine homolog of the T-box transcription factor T; failure of the protein to bind to its DNA target leads to a short-tail phenotype. *Mamm Genome* 12, 212-8 (2001).
37. Herrmann, B. G. & Kispert, A. The T genes in embryogenesis. *Trends Genet* 10, 280-6 (1994).
38. Papaioannou, V. E. T-box genes in development: from hydra to humans. *Int Rev Cytol* 207, 1-70 (2001).
39. Kispert, A. & Herrmann, B. G. The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein. *Embo J* 12, 3211-20 (1993).
40. Wattler, S., Russ, A., Evans, M. & Nehls, M. A combined analysis of genomic and primary protein structure defines the phylogenetic relationship of new members of the T-box family. *Genomics* 48, 24-33 (1998).
41. Conlon, F. L., Fairclough, L., Price, B. M., Casey, E. S. & Smith, J. C. Determinants of T box protein specificity. *Development* 128, 3749-58 (2001).
42. Bamshad, M. et al. Mutations in human TBX3 alter limb, apocrine and genital development in ulnar-mammary syndrome. *Nat Genet* 16, 311-5 (1997).

43. Bongers, E. M. et al. The small patella syndrome: description of five cases from three families and examination of possible allelism with familial patella aplasia-hypoplasia and nail-patella syndrome. *J Med Genet* 38, 209-14 (2001).
44. Braybrook, C. et al. The T-box transcription factor gene TBX22 is mutated in X-linked cleft palate and ankyloglossia. *Nat Genet* 29, 179-83 (2001).
45. Jacobs, J. J. et al. Senescence bypass screen identifies TBX2, which represses Cdkn2a (p19(ARF)) and is amplified in a subset of human breast cancers. *Nat Genet* 26, 291-9 (2000).
46. Kirk, E. P. et al. Mutations in cardiac T-box factor gene TBX20 are associated with diverse cardiac pathologies, including defects of septation and valvulogenesis and cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 81, 280-91 (2007).
47. Lamolet, B. et al. A pituitary cell-restricted T box factor, Tpit, activates POMC transcription in cooperation with Pitx homeoproteins. *Cell* 104, 849-59 (2001).
48. Li, Q. Y. et al. Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat Genet* 15, 21-9 (1997).
49. Lindsay, E. A. et al. Tbx1 haploinsufficiency in the DiGeorge syndrome region causes aortic arch defects in mice. *Nature* 410, 97-101 (2001).
50. Bamshad, M. et al. The spectrum of mutations in TBX3: Genotype/Phenotype relationship in ulnar-mammary syndrome. *Am J Hum Genet* 64, 1550-62 (1999).
51. Campbell, C., Goodrich, K., Casey, G. & Beatty, B. Cloning and mapping of a human gene (TBX2) sharing a highly conserved protein motif with the *Drosophila omb* gene. *Genomics* 28, 255-60 (1995).
52. Barlund, M. et al. Multiple genes at 17q23 undergo amplification and overexpression in breast cancer. *Cancer Res* 60, 5340-4 (2000).
53. Carlson, H., Ota, S., Campbell, C. E. & Hurlin, P. J. A dominant repression domain in Tbx3 mediates transcriptional repression and cell immortalization: relevance to mutations in Tbx3 that cause ulnar-mammary syndrome. *Hum Mol Genet* 10, 2403-13 (2001).
54. Platonova, N. et al. TBX3, the gene mutated in ulnar-mammary syndrome, promotes growth of mammary epithelial cells via repression of p19ARF, independently of p53. *Cell Tissue Res* 328, 301-16 (2007).
55. Wessendorf, S. et al. Hidden gene amplifications in aggressive B-cell non-Hodgkin lymphomas detected by microarray-based comparative genomic hybridization. *Oncogene* 22, 1425-9 (2003).

56. Aubele, M. et al. Chromosomal imbalances are associated with metastasis-free survival in breast cancer patients. *Anal Cell Pathol* 24, 77-87 (2002).
57. Koo, S. H. et al. Detection of genetic alterations in bladder tumors by comparative genomic hybridization and cytogenetic analysis. *Cancer Genet Cytogenet* 110, 87-93 (1999).
58. Govoni, K. E. et al. Whole genome microarray analysis of growth hormone-induced gene expression in bone: T-box3, a novel transcription factor, regulates osteoblast proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291, E128-36 (2006).
59. Kern, W. F. *PDQ Hematoloji* (ed. Ferhanoğlu, B.) (2005).
60. Zhang, Y. & Rowley, J. D. Chromatin structural elements and chromosomal translocations in leukemia. *DNA Repair (Amst)* 5, 1282-97 (2006).
61. Gollin, S. M. Mechanisms leading to nonrandom, nonhomologous chromosomal translocations in leukemia. *Semin Cancer Biol* 17, 74-9 (2007).
62. Zhou, B. B. & Elledge, S. J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408, 433-9 (2000).
63. Renard, C. A. et al. Tbx3 is a downstream target of the Wnt/beta-catenin pathway and a critical mediator of beta-catenin survival functions in liver cancer. *Cancer Res* 67, 901-10 (2007).



## ÖZGEÇMİŞ

21.05.1980 tarihinde Kayseri’ de doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Kayseri’de tamamladı. 2003 yılında Erciyes Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nden mezun olarak lisans eğitimini tamamladı. Aynı yıl Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Öğretmenliği Tezsiz Yüksek Lisansı’na başlayarak bu eğitimini 2005 Ocak ayında bitirdi. 2004–2005 eğitim öğretim yılının bahar döneminde Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Yüksek Lisans programına başladı. Halen bu bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. Yabancı dili İngilizcedir.

# **EKLER**

## TBX3 ve TBX3+2a İÇİN ÇOĞALTILAN BÖLGE DİZİNİ

GenBank acc No: NM\_016569

3181 gtacattcac ccggacagcc **ccgctactgg ggaacagtgg** atgtccaaag tcgtcacttt

3241 ccacaaactg aaactcacca acaacatttc agacaaacat ggatttgtaa gtttcattgc

4141 agtactgaat cattttgtaa attaaaatgc atgttttct ctatcttta agactttggc

4201 ctteccaagt gatcacgcta cgtggcaggg gaattatagt ttggtactc aggtaggcta

4501 cctgcccctg cagactatat tgaactccat gcacaaatac cagccccggg tccacattgt

4561 aagagccaat gacatcttga aactccctta tagtacattt cggacatact tgtccccga

4621 aactgaattc atcgtgtga ctgcatacca gaatgataag gtaaactcaa ggggctttcc

6481 tctgtcttgc ttgtgtctct tccaatagat aaccagttta aaaatagaca acaacccttt

6541 tgcaaaaggt ttccgggaca ctggaaatgg ccgaagagaa aaaaggtgag ttgaaacaat

7681 ggcttctgcc acagaaaaca gctcacctg cagtccatga ggggtgttga tgaagacac

7741 aaaa**ggaga atgggacctc tgatgag**tcc tccagtgaac aagcagcttt caactgcttc

PZR ürünleri 380 ve 440 bp büyüklüğündedir.

## EK 2

### SYBR GREEN RT-PCR'DA TBX3 İÇİN ÇOĞALTILAN BÖLGE DİZİNİ

GenBank acc No: NM\_016569

1861 tgcaaaaggt ttccgggaca ctggaaatgg **ccgaagagaa aaaagaaaac agtcaccct**

1921 gcagtccatg aggtgtttg atgaaagaca caaaaaggag aatgggacct ctgatgagtc

1981 ctccagtgaa caagcagctt tcaactgctt cgcccaggct ttttctccag ccgectccac

2041 tgtagggaca **tgaacctca aagatttatg tcccagcgag** ggtgagagcg acgccgagge

PZR ürünü 184bp büyüklüğündedir.

EK 3

TAQMAN RT-PCR'DA TBX3 İÇİN ÇOĞALTILAN BÖLGE DİZİNİ VE  
BU BÖLGEYE ÖZGÜL **PROB** DİZİNİ

GenBank acc No: NM\_016569

1801 cgctgtgact gcataccaga atgataagat aaccagtt**aaaatagaca acaacccttt**

1861 **tgcaaaaggt ttccgggaca ctgga**aatgg ccgaagagaa aaaagaaaac **agtcacacct**

1921 **gcag**tccatg aggggtttg atgaaagaca caaaaaggag aatgggacct ctgatgagtc

PZR ürünü 84 bp büyüklüğündedir.

**SYBR GREEN RT-PCR'DA GAPDH İÇİN ÇOĞALTILAN BÖLGE DİZİNİ**

GenBank acc No: XR\_018317

661 catccctgag **ctgaacggga agctcactgg** catggccttc catgccccca ctgccaatgt  
721 gtcagtggtg gacctgacct gctgtctgga aaacctgcc aatatgaca acatcaagaa  
781 ggtggtgaag caggcgttga aggccccct caagggcac ctgggctaaa ctgagcacca  
841 ggtggtctcc tccgattca acagtgacac cccctctcc accttcaatg ctggggctgg  
901 cattgccctc aacgacct ttgtcaaget catttctgg tatgacaatg aattggcta  
961 **cagcaacagg gtggtgga**acc tcatgcccc catggcctcc aaggagtggg actcctggac

PZR ürünü 307bp büyüklüğündedir.

**ÇOCUK HASTALARIN KLİNİK ve LABORATUVAR ÖZELLİKLERİ İLE TBX3 mRNA DÜZEYİ ÖLÇÜMLERİNDEN  
ELDE EDİLEN FLORESANS DEĞERLERİ**

No	Hasta	Tam	Fluo. sev.	Tipi	Risk	Yüzey Belirteçleri	Sitogenetik tanı	Remisyon	Yaşam süresi
5	BB	ALL	2.41	x	x	x	x	x	x
6	DKG	ALL	3.33	CALLA +	standart	CD19, 10, 22; TdT	x	idame kemoterapi	yaşıyor
7	MŞ	ALL	3.84	preB	ortarisk	CD19, 10, 20, 22; DR; sitIgM	11q23*	idame kemoterapi	yaşıyor
15	FA	ALL	6.70	CALLA +	standart	CD19, 10, 22; TdT	trizomi9*	idame kemoterapi	yaşıyor
16	ÖC	ALL	5.55	proB	ortarisk	CD19, 22; TdT; DR	x	idame kemoterapi	yaşıyor
17	OM	ALL	6.40	CALLA +	ortarisk	CD19, 10, 20; DR; TdT	x	idame kemoterapi	yaşıyor
21	AY	ALL	5.03	proB	ortarisk	CD19, 50, 54; DR	x	idame kemoterapi	yaşıyor
22	CY	ALL	6.63	CALLA +	standart	CD19, 10; DR	x	idame kemoterapi	yaşıyor
23	FK	ALL	6.10	proT	ortarisk	CD7, sitCD3	x	idame kemoterapi	yaşıyor
24	ZY	ALL	3.00	preB	standart	CD19, 10, 22; DR; sitIgM	x	idame kemoterapi	yaşıyor
25	AY	ALL	1.80	CALLA +	ortarisk	CD19, 10, 22	Down send.	idame kemoterapi	yaşıyor
26	FT	ALL	2.90	proB	ortarisk	CD19, 22; DR	x	x	x

\*İndüksiyon kemoterapi sonrası normale döndü.

**YETİŞKİN HASTALARIN TANILARI ve TBX3 mRNA DÜZEYİ  
ÖLÇÜMLERİNDEN ELDE EDİLEN FLORESANS DEĞERLERİ**

<b>No</b>	<b>Hasta</b>	<b>Tanı</b>	<b>Fluo. sev.</b>
1	NK	MM	3.68
3	HY	AML	2.60
4	NO	KLL	2.88
8	SK	KLL	4.02
9	GD	BL	3.68
11	OB	AML	3.60
12	HB	KLL	3.14
13	OK	AML	4.63
18	KT	AML	6.33
19	KÖ	AML	6.03
20	AA	AML	6.30



**SAĞLIKLI KONTROLLERİN Tbx3 mRNA'sı DÜZEYİ ÖLÇÜMLERİNDEN  
ELDE EDİLEN FLORESANS DEĞERLERİ**

<b>Kontrol</b>	<b>Fluoresans seviyesi</b>
1k	1.35
2k	1.89
3k	1.21
4k	0.95
5k	0.71
6k	0.87
7k	0.72
8k	0.88
9k	0.80
10k	2.30
11k	3.50
12k	2.30
13k	2.30
14k	2.70
15k	3.30
16k	2.30
17k	6.10
18k	5.00
19k	4.80
20k	3.50
21k	4.30
22k	3.20
23k	1.50
24k	3.40
25k	4.80
26k	4.00
27k	2.10
28k	4.50
29k	3.00
30k	3.30