

T.C
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Fizyoloji Anabilim Dalı

HEMATOLOJİK MALİGNİTELERDE MITF ve TBX3 PROTEİNLERİNİN ROLÜ

Durmuş BURGUCU

Doktora Tezi

Antalya-2014

T.C
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Fizyoloji Anabilim Dalı

HEMATOLOJİK MALİGNİTELERDE MITF ve TBX3 PROTEİNLERİNİN ROLÜ

Durmuş BURGUCU

Doktora Tezi

Tez Danışmanı
Prof.Dr.B.Uğur YAVUZER

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) Tarafından
Desteklenmiştir
(Proje No: SBAG 109S348)

‘‘Tezimden Kaynakça Gösterilerek Yararlanılabilir’’

Antalya-2014

Sağlık Bilimleri Enstitü Kurulu ve Akdeniz Üniversitesi Senato Kararı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 22/06/2000 ve 02/09 sayılı enstitü kurul kararı ve 23/05/2003 tarih ve 04/44 sayılı senato kararı gereğince "Sağlık Bilimleri Enstitülerinde lisans üstü eğitim gören doktora öğrencilerinin tez savunma sınavına girebilmeleri için, doktora bilim dalında SCI tarafından taranan dergilerde en az bir yurtdışı yayın yapması gerektiği" ilkesi gereğince yapılan yayın ve diğer yayınlar aşağıdadır.

1. Demir E., Akça H., Kaya B., **Burgucu D.**, Tokgün O., Turna F., Vales G., Creus A., Marcos R. Zinc oxide nanoparticles: genotoxicity, interactions with UV-light and cell-transforming potential, Journal of Hazardous Materials 2014,; 264(15): 420–429
2. A Göçmen AY., **Burgucu D.**, Karadogan İ., Timuragaoglu A., Gümüslü S., The Effect Of Trans-Resveratrol On Platelet-Neutrophil Complex Formation And Neutrophil Burst In Hypercholesterolemic Rats", Exp Clinical Cardiol 2013;18(2):e111-e114
3. Demir E., Turna F., **Burgucu D.**, Kılıç Z., Burunkaya E., Kesmez Ö., Yeşil Z., Akarsu M., Kaya B. Genotoxicity of Different Nano-Sizes and İons of silica Nanoparticles, Fresenius Environmental Bulltein Vol.22;No.10 (2013)
4. Demir E., **Burgucu D.**, Turna F., Aksakal S., Kaya B. Determination of TiO₂, ZrO₂ and Al₂O₃ nanoparticles on genotoxic responses in human peripheral blood lymphocytes and cultured embryonic kidney cells, Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, 76:1–13, 2013
5. **Burgucu D.**, Guney K, Sahinturk D, Ozbudak IH, Ozel D, Ozbilim G, Yavuzer U., Tbx3 Represses PTEN and is over-expressed in Head and Neck Squamous cell carcinoma, BMC Cancer 2012, 12:481 doi:10.1186/1471-2407-12-481
6. Göçmen AY, **Burgucu D.**, Gümüslü S.Effect of resveratrol on platelet activation in hypercholesterolemic rats:CD40-CD40L system as a potential target, Appl Physiol Nutr Metab. Volume: 36 Issue: 3 Pages: 323-330 Published: JUN 2011
7. Bozcuk H., Özdoğan M., Aykurt O,Topçuoğlu F., Ozturk OH , Ekinci E., Karadeniz A., **Burgucu D.**, Urtica maritima extract induces more cytotoxicity than standart chemotherapeutics in A549 non-small cell lung cancer cell line ,Turkish Journal of Medical Science Volume: 41 Issue: 1 Pages: 101-108 Published: FEB 2011
8. A Göçmen AY, **Burgucu D.**, Gümüslü S.,Increase In Platelet Reactive Oxygen Species And Serum Lysophosphatidic Acid And Lipid Peroxides In Hypercholesterolemic Rats, International Union of Biochemistry and Molecular Biology Volume: 61 Issue: 3 Pages: 372-372 Published: MAR 2009
9. Ozturk OH, Bozcuk H, **Burgucu D.**, Ekinci D, Ozdogan M,Akca S, Yildiz M. Cisplatin cytotoxicity is enhanced with Zoledronic acid in A549 lung cancer cell line: preliminary results of an in vitro study, Cell BiologyInternational Volume: 31 Issue: 9 Pages: 1069-1071 Published: SEP 2007

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Bu çalışma, jürimiz tarafından Fizyoloji programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir. 23 Haziran 2014

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

Üye : **Prof. Dr. Ümit Kemal ŞENTÜRK**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

Üye : **Prof. Dr. Filiz BASRALI**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

Üye : **Prof. Dr. İhsan KARADOĞAN**
Akdeniz Üniversitesi
Tıp Fakültesi
İç Hastalıkları Anabilim Dalı

Üye : **Prof. Dr. Neşe TUNCEL**
Eskişehir Osman Gazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Fizyoloji Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirtilen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve /sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İsmail ÜSTÜNEL

Enstitü Müdürü

ÖZET

Organ sistemlerinin oluşumu ve tüm yaşam boyunca fonksiyonlarını düzgün bir şekilde yerine getirebilmeleri, organları oluşturan hücrelerin sağlıklı olmalarına ve çevresel koşullara uyum sağlayacak şekilde yapılarını değiştirebilmelerine bağlıdır. Yani hücrelerin; oluşumu, özelleşmesi, metabolizmalarını çevresel koşullara uyarlayabilmeleri, çevresel uyarılara göre bir yanıt oluşturabilmeleri ve hatta ölümleri tamamen gen düzeyinde transkripsiyonel kontrol ile sağlanır. Gerekli genlerin uygun zamanda, yeterli miktarda ve sürede ifade bulabilmesi ise transkripsiyon faktörü denilen ve DNA'ya bağlanarak gen ifadesini düzenleyen bir grup protein tarafından gerçekleştirilir. Tbx3 ve MTF adlı proteinler de birer transkripsiyon faktörüdür ve embriyolojik gelişimde önemli görevler üstlenmişlerdir. Bu proteinler, hücre bölünmesinde görev alan bazı genlerin ifadesini düzenleyerek hücreleri bölünmeye ve dolayısıyla çoğalmaya yönlendirmektedir. Embriyolojik gelişim esnasında veya yetişkin hayatta hücre yenilenmesinde çok gerekli olan bu etki, fizyolojik kontrol mekanizmalarının işlevsiz kalması durumunda tehlikeli bir hale gelmekte ve kontrolsüz hücre çoğalması veya farklılaşmasına yol açarak kanser gelişimine neden olmaktadır. Nitekim birçok kanser türünde Tbx3 ve MTF düzeylerinin arttığı saptanmıştır.

Hematolojik kanserler köken aldıkları hücre tipine göre farklı mekanizmaları kullanarak gelişmektedir. Ama temel sorunun “kontrolsüz hücre çoğalması ve/veya farklılaşması” olduğu göz önüne alınırsa, doğrudan hücre döngüsünü etkileyebilen gen ürünlerinin ve kullandıkları mekanizmaların ortaya konulmasının gerek tanı evresinde gerekse tedavide önemli katkıları olabileceği de açıktır.

Bu çalışmada öncelikle, hücre döngüsüne pozitif etkileri olduğu bilinen Tbx3 ve MTF transkripsiyon faktörleri ile birçok kanser türünün gelişmesinde görev alan, ancak hücre döngüsünü dolaylı olarak durduran PTEN proteininin hematolojik kanserlerdeki etkileri incelenmiştir. Toplam 40 hastanın kemik iliğinden elde edilen hücrelerdeki *TBX3*, *MITF* ve *PTEN* gen ifadeleri hem mRNA, hem de protein düzeyinde incelenmiş ve normal kemik iliği hücreleri ile karşılaştırılmıştır. Hastalarda, *TBX3* ve *MITF* gen ifadelerinin artmasına karşılık, *PTEN* geni ifadesinin azaldığı saptanmıştır ($p < 0,05$). Bu ters ilişimin nedenlerini ortaya koymak amacıyla rekombinant DNA teknikleri kullanılarak PTEN promoter bölgesi genomik DNA'dan izole edilerek klonlanmış ve hücre kültürü ortamında transkripsiyonel aktivasyon deneyleri ile Tbx3 proteininin PTEN gen ifadesini baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca, PTEN geni üzerinde Tbx3 proteininin bağlandığı bölgenin DNA dizini de ortaya konmuştur. Son olarak; bir grup hastada “lösemi kök hücreleri” izole edilerek Tbx3 ve pTEN protein düzeyleri saptanmış ve normal kemik iliği kök hücreleri ile karşılaştırılmıştır. Lösemi kök hücrelerinde de Tbx3 protein düzeyi artarken PTEN düzeyinin düştüğü saptanmıştır.

Bu çalışma ile, hematopoezi denetleyen fizyolojik mekanizmaların bozulması sonucu gerek myeloid gerek lenfoid seriden köken alan hematolojik kanserlerin gelişiminde kullanılan ortak bir mekanizmanın varlığı ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca, Tbx3 proteininin lösemi kök hücrelerinin tanımlanmasında yeni bir belirteç olarak kullanılabilirliği de ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Tbx, PTEN, MTF, Hematolojik Kanserler, AML, KML, KLL

ABSTRACT

The development and maintenance of organ systems rely entirely on the presence of healthy and good functioning cells establishing the organs. The proliferation, differentiation, adaptation and responding to environmental cues and even death are all cellular mechanisms that are regulated via transcriptional control at the gene level. Transcription is the process of copying a part of the DNA template carrying the genetic code into messenger RNA and this cellular event is governed by a group of proteins called transcription factors, which are sequence specific DNA binding proteins. Tbx3 and MITF are both transcription factors involved in embryological development. Both of the proteins are capable of regulating expressions of some of the genes that play important roles in cell cycle and therefore can drive cells into proliferation. Although this is rather essential and useful during embryological development, it can be dangerous for the organism under conditions where physiological mechanisms malfunction. Actually, this forms the basis of cancer development, which essentially occurs as a consequence of uncontrolled cell proliferation and differentiation. In accordance with this, both Tbx3 and MITF have been demonstrated to be up-regulated in many forms of cancer. The mechanisms underlying haematological malignancies vary depending on the cell type they originate. However, because the main cellular event is “uncontrolled cell proliferation and differentiation”, it is obvious that identification of the genes and the mechanisms they employ in regulation of cell cycle will have an enormous effect both in diagnosis and treatment.

In this study, Tbx3 and MITF were analysed in order to reveal their potential roles in expression of PTEN, which is an important gene that has been demonstrated to be inactivated in many different types of cancer. For this purpose, cells obtained from bone marrow of 40 leukaemia patients were analysed for expressions of *TBX3*, *MITF* and *PTEN* genes both at mRNA and protein levels. It was demonstrated that the leukaemia patients had statistically significant increase in Tbx3 and MITF mRNA and protein levels, whereas *PTEN* gene expression was found to be significantly decreased ($p < 0,05$). In order to reveal the molecular mechanisms underlying this negative correlation, HeLa and HEK cell lines were transfected with a Tbx3 or MITF expressing plasmid and transcription assays were performed to demonstrate the effects of Tbx3 and MITF proteins on PTEN promoter activity. In addition, the endogenous PTEN mRNA and protein levels were determined in response to over-expressed Tbx3 protein. We demonstrated that not MITF but Tbx3 is capable of repressing the PTEN promoter activity, and cause reduction in endogenous PTEN mRNA, therefore protein levels. Furthermore, using EMSA assays the exact binding site of Tbx3 within the PTEN promoter was identified. Moreover it was shown that, with respect to the levels in normal bone marrow blast cells, Tbx3 protein level was increased, while PTEN protein level was decreased in “leukaemia stem cells” that were isolated from the bone marrows of a limited number of patients.

Thus, our data not only reveals a new mechanism that may be important in haematological cancer formation, but also suggests that Tbx3 can be used as a potential biomarker both in diagnosis and following up of treatment.

Key Words: Tbx, PTEN, MITF, haematological cancer, AML, CML, CLL

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince, her konuda gelişmeme sağladığı katkılar, tezimin yazılmasındaki yardımlar ve en önemlisi bağımsız bir araştırmacı olarak beni yetiştirdiği için danışman hocam sayın Prof.Dr.B.Uğur YAVUZER'e , Tezimin hasta gruplarının oluşturulmasında sağladıkları katkılar için Hematoloji BD öğretim üyelerimiz sayın Prof.Dr.Levent ÜNDAR, sayın Prof.Dr.İhsan KARADOĞAN ve sayın Yrd.Doç.Dr.Ozan SALİM hocalarıma, Tbx3 ekspresyon plasmidini sağlayan sayın Dr. Bileda Bilican'a (SMCM, Edinburgh, UK), MITF ve USF ekspresyon plasmidlerini sağlayan sayın Dr. Colin Goding'e (Ludwig Institute, Oxford, UK), Tezime sağladığı maddi destekten dolayı TÜBİTAK'a, Her zaman yanımda olan ve her koşulda sağladığı destekten dolayı sevgili eşim Gizem BURGUCU'ya

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım

Durmuş BURGUCU

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
GİRİŞ ve AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	6
2.1. Gen İfadesi	6
2.1.1. Transkripsiyon ve Düzenlenmesi	8
2.2. Hücre Döngüsü ve Kontrol Noktaları	10
2.3. Kanser Gelişim Mekanizmaları	13
2.3.1. Klonal Evrim Hipotezi	13
2.3.2. Kanser Kök Hücre Hipotezi	13
2.4. Tbx3 Transkripsiyon Faktörü	15
2.5. MITF (Microphthalmia-Associated Transcription Factor)	18
2.6. Hematolojik Maligniteler	21
2.6.1. Akut Lösemiler	21
2.6.2. Kronik Lösemiler	22
2.7. PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) Yapı ve Fonksiyonu	23
MATERYAL ve METHOD	26
3.1. Örneklerinin Toplanması	26
3.2. Mononükleer Hücre İzolasyonu	26
3.3. RNA Analizi	26
3.4. Rekombinant Plasmidlerin Hazırlanması ve Klonlama	28
3.4.1. Rekombinant çalışmalarda kullanılan bakteri suşları ve kültür koşulları	29
3.4.2. Genomik DNA izolasyonu	29
3.4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	30
3.4.4. PTEN promoterini taşıyan rekombinant plasmidlerin hazırlanması	31

3.4.5.	Ligasyon Ürünlerinin Bakterilere Aktarılması	31
3.4.6.	Rekombinant Bakteri Kolonilerin Seçimi	32
3.5.	Ökaryot Hücre Kültürü	32
3.6.	Ökaryot Hücrelere Rekombinant DNA Aktarımı (Transfeksiyon) ve Transkripsiyonel Aktivasyonunun Ölçümü	32
3.7.	Hücrelerden Total Protein İzolasyonu	33
3.8.	SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ve İmmünblot	33
3.9.	PTEN, Tbx3 ve MITF Protein Düzeylerinin Akış Sitometri Yöntemi ile Saptanması	33
3.10.	DNA/Protein Etkileşiminin İncelenmesi (Electrophoretic Mobility Shift Assay- EMSA)	34
3.10.1.	Hücre Çekirdeğinden Total Protein Saflaştırılması (Nükleer Protein)	35
3.10.2.	EMSA için sentetik DNA'ların hazırlanması ve işaretlenmesi	36
3.10.3.	EMSA'nın Yapılışı	36
3.10.4.	EMSA yarışmacı DNA ve antikor analizleri	37
3.11.	Jel Elektroforezi	37
3.11.1.	Agaroz Jel Elektroforezi	37
3.11.2.	Poliakrilamid Jel Elektroforezi	37
3.10.	İstatistik	37
BULGULAR		38
TARTIŞMA		60
SONUÇLAR		65
KAYNAKLAR		66
ÖZGEÇMİŞ		73
EKLER		74
Ek-1 Etik Kurul Onay Belgesi		

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ALL	:	Akut Lenfoblastik Lösemi
AML	:	Akut Myeloid Lösemi
anti-TBX3	:	TBX3 antibody
BRCA1	:	Breast Cancer Type 1 Susceptibility Protein
CDK	:	Cyclin-Dependent Kinase
CDKI	:	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor
CDKN1A	:	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A, CDK-Interacting Protein 1; CIP1 Wildtype p53-Activated Fragment 1; WAF1, P21
CDKN2A	:	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A, p16(INK4A), p14(ARF), p19(ARF)
CFA	:	Coloni Forming Assay
CFU-L	:	Colony-Forming Unit-Lymphoid
CFU-GEMM	:	Colony-Forming Unit-Granulocyte-Erythrocyte- Megakaryocytemacrophage
c-DNA	:	Complementary DNA
DMEM	:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	:	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	:	Deoxyribonucleotide Triphosphate
DTT	:	Dithiothreitol
ECL	:	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	:	Etilendiamin Tetraasetikasit
FBS	:	Fetal Bovine Serum
HLH/LZ	:	Helix–Loop–Helix/Leucine Zipper
HRP	:	Horse Radish Peroxidase
HKH	:	Hemopoetik Kök Hücre
IgG	:	Immunoglobulin G
İPS	:	İndüklenmiş Kök Hücre
KLL	:	Kronik Lenfoblastik Lösemi
KML	:	Kronik Myeloid Lösemi
LKH	:	Lösemik Kök Hücre
MAPK	:	Mitogen-Activated Protein Kinase
MFI	:	Ortalama Fluorosan Yoğunluğu
MNH	:	Mono Nükleer Hücrelerde
MDM2	:	Murine Double Minute
MgCl₂	:	Magnesium Chloride
MITF	:	Microphthalmia-Associated Transcription Factor
mRNA	:	Messenger Ribonucleic Acid
MYC	:	Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene
NaCl	:	Sodium chloride
p53	:	Protein 53
PBS	:	Phosphate Buffered Saline
PI3K	:	Fosfatidilinozitol-3-Kinaz
PIP2	:	Fosfotidilinozitol 4,5 bifosfat

PIP3	:	Fosfotidilinozitol 3,4,5 trifosfat
PTEN	:	Phosphatase and TENsin Homolog
PZR	:	Polimeriz Zincir Reaksiyonu
RB	:	Retinoblastoma
Rpm	:	Revolutions Per Minute
SDS	:	Sodium Dodecyl Sulfate
TBE	:	Tris Boric acid Edta
TBS-T	:	Tris-Buffered Saline-Tween
T-box/TBX	:	T-box Protein Family
UMS	:	Ulnar-Mammary Syndrome
UPL	:	Universal Probe Library
Wnt	:	Wingless-Type MMTV Integration Site family

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.1.	Gen İfadesi; DNA'dan Protein Oluşumuna Kadar Geçen Temel Basamaklar	7
2.2.	Bir Memeli Geni Temel Bileşenlerinin Şematik Görünümü	8
2.3.	Yapısal Transkripsiyon Faktörleri ve RNA Polimeraz II	9
2.4.	Hücre Döngüsünde Görev Alan Siklin-CDK Kompleksleri	11
2.5.	Normal kök hücre farklılaşması ve Kanser kök hücresi Hipotezi	14
2.6.	İnsan Tbx3 Proteini Şematik Gösterimi	16
2.7.	Tbx3 Etkisi	17
2.8.	Onkogen Hiyerarşisi Ve Öz-Yenileme Kapasitesinin Lösemi Patogenezindeki Rolü	20
2.9.	PTEN Proteininin Yapısı	23
2.10.	PTEN Tümör Baskılayıcısı PI3K/AKT Yolağının Negatif Regülatörüdür	24
3.1.	Bir plasmide DNA Klonlanması	29
3.2.	pGL3 Plasmid Haritası	32
3.3.	EMSA tekniği	36
4.1.	Kontrol Grubu Seçimi	40
4.2.	AML'de <i>TBX3</i> , <i>MITF</i> ve <i>PTEN</i> genlerinin ifadeleri	42
4.3.	KML'de <i>TBX3</i> , <i>MITF</i> ve <i>PTEN</i> genlerinin ifadeleri	44
4.4.	KLL'de <i>TBX3</i> , <i>MITF</i> ve <i>PTEN</i> genlerinin ifadeleri	45
4.5.	Hematolojik Kanserlerde Tbx3, MITF ve PTEN gen ifadeleri	46
4.6.	PTEN çekirdek promotör bölgesinin şematik çizimi	47
4.7.	Bu çalışmada kullanılan rekombinant DNA'ların şematik gösterimi	48

4.8.	Tbx3 ve MITF proteinlerinin PTEN promoteri transkripsiyonel aktivitesine etkileri	49
4.9.	PTEN promoter aktivitesinin Tbx3 proteini tarafından baskılanması	50
4.10.	PTEN promoter aktivitesinin Tbx3 tarafından doz bağımlı olarak baskılanması	51
4.11.	Tbx3 tarafından, indüklenmiş PTEN promotor aktivitesinin baskılanması	52
4.12.	Tbx3, hücre içi PTEN mRNA ve protein düzeylerini baskılaması	54
4.13.	Tbx3, PTEN promoterine özgül olarak bağlanması	57
4.14.	Tbx3 bağlanma bölgesi içermeyen PTEN promotorunun Tbx3 proteinine duyarsızlaşması	58
4.15.	Lösemik Kök Hücrelerde Tbx3 protein düzeyi artarken PTEN düzeyinin azalması	60

ÇİZELGELER DİZİNİ

Tablo		Sayfa
2.1.	Tbx2 ve Tbx3'ün farklı kanserlerdeki ifadesi	16
2.2.	AML, KML ve KLL'de Görülen Kromozomal Anomaliler ve Etkiledikleri Genler	23
3.1.	Taqman Probları İle Eş Zamanlı Niceliksel PZR Koşulları	28
3.2.	Lösemi Kök Hücre İmmünotiplenmesinde Kullanılan Antikorlar	35
4.1.	Hasta ve Kontrol gruplarının özellikleri	40

GİRİŞ ve AMAÇ

Canlının işlev gösteren en basit yapısal birimi hücredir ve hücre içerisinde gerçekleşen tüm olaylar doğrudan o hücrelerin oluşturduğu organlara, dolayısıyla da organ sistemlerine yansıtılmaktadır. Hücrenin işlevi ise DNA üzerinde bulunan genler tarafından düzenlenmektedir. En geniş tanımıyla canlı organizmaların nasıl çalıştığının incelendiği fizyoloji bilimi, son yıllarda genom alanında görülen gelişmeler nedeniyle sadece bazı iç ve dış uyarılara karşı genel olarak vücutta oluşan değişiklikleri değil, gen düzeyindeki değişiklikleri de incelemeye ve bu amaçla da moleküler biyoloji araçlarını kullanmaya başlamıştır (1).

Tek bir diploid hücreden gelişen insanoğlu yetişkin çağına ulaştığında 10^{13} adet hücre içermektedir ve tüm bu hücreler farklı yapı ile işleve sahip 200 değişik hücre türünden oluşmaktadır. Embriyolojik gelişimden yetişkin çağa dek uzanan bu fizyolojik süreç, hücre düzeyde; hücre döngüsü, hücre özelleşmesi (farklılaşma), hücre ölümü (apoptoz) ve hücre metabolizmasının düzenlenmesi olarak sıralanan hücresel temel fonksiyonlar tarafından gerçekleştirilir. Hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptoz sadece büyüme ve gelişimde rol oynamaz. Yaşam boyunca tüm vücut hücrelerinin yenilenmesi, dolayısıyla organ sistemlerinin kusursuz işlemesi, hücresel düzeyde bu temel fonksiyonların ardışık olarak ve beraberce çalışması ile gerçekleşir. Hematopoez bu olay için en güzel örneklerden birini oluşturmaktadır. Küçük bir hemopoetik kök hücre (HKH) topluluğundan kan sisteminin tüm hücrelerinin belirli bir hiyerarşik düzen içinde oluşmasına hematopoez adı verilmektedir. Yetişkin bir insanda kemik iliğinde bulunan HKH'lerden öncelikle progenitor hücreler gelişmekte ve bu hücrelerin farklılaşmaya devam etmeleri sonucunda da tamamen olgun kan hücreleri oluşmaktadır. Tüm bu sistemlerin sağlıklı olarak işlemesi fizyolojik kontrol mekanizmalarının düzenli çalışmasına bağlıdır. Fizyolojik kontrolün ortadan kalkması, hücrelerin kontrolsüzce çoğalmasına ve özelleşmiş olan hücrelerin yeniden özelleşmemiş hale dönüşmelerine neden olur. Patolojik olan bu durum "kanser" hastalığının genel tanımını oluşturmaktadır.

Kanser temel olarak "kontrolsüz hücre döngüsü ve hücrelerin aşırı çoğalması" olarak tanımlanabilir. Bu tanımdan yola çıkarak kanser oluşumunda görev alan gen ve kodladıkları proteinleri 3 ana grupta toplamak mümkündür. Bunlar; hücre bölünmesini indükleyen genler/proteinler (proto-onkogenler), hücre bölünmesini baskılayan genler/proteinler (tümör baskılayıcılar) ve hücre ölümünü (apoptozis) düzenleyen genler/proteinlerdir (2). Tanımdan da anlaşılacağı üzere kanserin gelişebilmesi için proto-onkogenlerin aşırı ve ektopik aktivasyonu, tümör baskılayıcı gen/proteinlerin işlevsiz kalmaları ve apoptotik mekanizmaların çalışmaması, dolayısıyla hücrelerin ölümden kaçarak devamlı bölünme yoluna girmeleri gerekmektedir. Ancak, kanser gelişimini açıklayan ve "klonal teori" olarak

adlandırılan bu durum kanserin oluşması için geçerli tek yol olsaydı kanserin çok seyrek görülen bir hastalık olması gerekirdi. Nitekim son yıllarda kanser gelişiminde çok önemli rol oynadığı saptanan erişkin kök hücreleri benzeri kanser kök hücrelerinin varlığının gösterilmesiyle birlikte kanser oluşumu “kök hücre teorisi” ile de açıklanmaya çalışılmaktadır. Farklılaşma özelliklerini yitirmiş veya geriye doğru farklılaşarak kök hücre özelliklerini kazanmış olan hücrelerin izolasyonu kan dokusundan kolaylıkla yapılabildiğinden bu konuya yönelik ilk bilgiler de hematolojik kanserler üzerinde yapılan çalışmalar ile elde edilmiştir (3).

Bir hücrenin temel fonksiyonlarının düzgün çalışması ancak gerekli genlerin uygun zamanda, yeterli miktar ve sürede ifadesi (ekspresyonu) ile gerçekleşebilir. DNA'daki bilginin RNA'ya aktarılması olarak tanımlanan transkripsiyon, gen ifadesinin ilk basamağıdır ve tüm hücrel temel fonksiyonları düzenleyen mekanizmalardan birini de “transkripsiyonel kontrol” oluşturmaktadır. Bu sürecin hücrenin gereksinimlerine uygun bir şekilde başlaması ve devam edebilmesi için transkripsiyon faktörleri olarak isimlendirilen birçok proteine ihtiyaç vardır. DNA'daki özgül dizilere doğrudan bağlanan ve transkripsiyonu arttırıcı veya baskılayıcı işlevi olan, en az iki karakteristik bölgesi bulunan proteinler transkripsiyon faktörleri olarak tanımlanmaktadır (4).

Transkripsiyon faktörlerinin büyük bir kısmı tüm hücrelerde her zaman bulunur. Diğerleri ise sadece hücreye özgül olarak bulunurlar. Bu durum, her hücrede aynı DNA olmasına rağmen yetişkin bir insanda neden yapı ve işlev olarak 200 farklı tip hücre bulunduğunu da açıklamaktadır. Çünkü iç ve dış ortamdaki gelen uyarılar sonucunda aktifleşen bazı genler hücrelerin özelleşmesine yol açan farklı proteinlerin yapılmasını sağlamaktadır. Yani bir organizmadaki her bir hücre aynı DNA'yı (genom) içermesine rağmen, farklı protein örüntüsüne (proteom) sahiptir. Bir diğer deyişle hücrelerin farklı kimlikleri, içerdikleri protein örüntüsüyle ilintilidir ve bu farklılığı sağlayan da transkripsiyonel kontrol mekanizmaları ve transkripsiyon faktörleridir.

Bu tezin araştırma konusunu oluşturan Tbx3 adlı protein de bir transkripsiyon faktörüdür. İnsanda 20'nin üzerinde proteinden oluşan Tbx-protein ailesinin üyeleri çoğunlukla hedef genlerinin ifadesini arttırıcı etki gösteren transkripsiyon faktörleridir. Ancak, Tbx3 ve Tbx2 adlı proteinler gen ifadesini baskılayıcı bir etki gösterirler. İnsanlarda *TBX3* heterozigot mutasyonları meme bezi hipoplazisi, anormal ekstremit gelişimi, çeşitli kalp ve genital organ anomalileriyle karakterize ulnar-mammary sendromuna(UMS) neden olmaktadır. *TBX3* geninin tamamen susturulması farelerde embriyolojik dönemde ölümle sonuçlanmaktadır. İnsanlarda *TBX3* geni yokluğu veya tamamen fonksiyon kaybı tanımlanmamıştır. Bu bulgu da Tbx3 proteininin yaşamsal önem taşıdığını ve yokluğunun yaşamla bağdaşmadığını düşündürmektedir.

Embriyolojik gelişim esnasındaki görevleri yanısıra *TBX3* geni ifadesinin meme, serviks, yumurtalık, pankreas, karaciğer ve deri kanserlerinde arttığı saptanmıştır (5-7). Bu bulgular, Tbx3'ün fizyolojik görevlerini yerine getirirken

hücre çoğalması ve farklılaşmasında rol oynayan proteinlerle ilişkisinin olabileceğini düşündürmüştür. Nitekim, Tbx3'ün *CDKN2a* (p19^{ARF}), *CDKN1a* (p21^{Cip}) ve p14 gibi hücre döngüsünün kontrolünde rol oynayan tümör baskılayıcı genlerin aktivitesini düzenlediği ve düzenleyici bölgelerine (promoter) bağlanarak bu genlerin ifadesini susturduğu anlaşılmıştır. Bu saptama, Tbx3 proteininin hücre bölünmesini indüklediğini, dolayısıyla *TBX3* geninin bir onkogen olabileceğini ve diğer tümör baskılayıcı genleri de hedef alabileceğini ortaya koymaktadır.

Hematopoezdeki fizyolojik kontrol mekanizmalarının çalışmaması sonucunda ortaya çıkan hematolojik kanserlerde etkin olan moleküler mekanizmaları ortaya çıkarmak üzere çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bunların sonucunda çoğu hücre döngüsü kontrol proteinlerini hedefleyen birçok genin veya kromozomal translokasyonlar sonucu ortaya çıkan ve fizyolojik olmayan kimerik gen ürünlerinin hematolojik kanser gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir. Grubumuz tarafından daha önce yapılan çalışmalarda da Tbx3 mRNA düzeylerinin hematolojik kanserli hastalardan elde edilen mono nükleer hücrelerde (MNH) normal MNH'lere göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Kısıtlı sayıda örnek kullanılarak gerçekleştirilen bu ön çalışma, hematolojik kanser gelişiminde potansiyel olarak Tbx3 proteininin görev alabileceğini düşündürmüştür. Ancak, örneklem sayısının artırılarak elde edilen ilk sonuçların doğrulanması ve daha da önemlisi Tbx3 mRNA düzeyinde saptanan artışın işlevselliğinin ve sonuçlarının ortaya çıkarılması gerekliliği okumakta olduğunuz “doktora tez” çalışmasının planlanmasına neden olmuştur.

Hematolojik kanserler, köken aldıkları hücre tipine göre farklı mekanizmalar yoluyla gelişir ve her bir tipinden farklı gen/gen ürünleri sorumludur. Ancak son yıllarda “kanser kök hücresi” varlığının saptanmasıyla hematolojik kanserlerin gelişim mekanizmalarını açıklamaya yönelik farklı bir bakış açısı oluşmaya başlamıştır. Nitekim hematolojik kanserler oldukça heterojen bir grup olmasına rağmen özellikle akut myeloid lösemi (AML) kök hücrelerinin immünofenotipik özellikleri büyük oranda belirlenmiş ve hücre yüzeyinde CD34+ CD38- CD123+ belirteçlerini taşıyan hücreler Lösemik Kök Hücre (LKH) olarak tanımlanmıştır. Fizyolojik koşullarda yetişkinde bulunan hemositoblast, yani sağlıklı hematopoetik kök hücre (HKH) ile lösemik kök hücre aynı özelliklere sahip değildir, çünkü protein örüntüleri farklıdır. Her iki hücre tipinden elde edilen tüm gen ve gen ürünleri mikroarray tekniği ile karşılaştırıldığında birçok gendeki farklılıkların yanı sıra LKH'de PTEN geni (Phosphatase and TENSin Homolog) ifadesinin belirgin olarak aşağıya çekildiği saptanmıştır (8-9). Üstelik hematopoetik kök hücrelerinde PTEN delesyonu oluşturulan fare modellerinde myeloproliferatif hastalıkları takiben AML (Akut Myeloblastik Lösemi) ve ALL (Akut Lenfoblastik Lösemi) olduğu görülmüştür. Bu bulgular, köken aldığı hücre ne olursa olsun hematolojik malignite gelişimindeki temel etkenin belki de PTEN proteini olabileceğini düşündürmektedir.

PTEN; hücre büyümesi, çoğalması ve sağ kalımında önemli görevler üstlenen ve bu nedenle de embriyonik gelişim ve kanser oluşumunda rol oynayan Fosfatidilinozitol-3-Kinaz (PI3K) sinyal yolağının negatif düzenleyicisidir. Yani PI3K yolağının etkilerini sonlandırarak hücre döngüsünü durduran bir tümör baskılayıcı proteindir. Bu özelliği nedeniyle de PTEN proteininin birçok kanser

türünde işlevini yitirmiş olduğu saptanmıştır. Ancak PTEN geni somatik mutasyonları çok nadir görülmektedir. Bu gözlem, PTEN fonksiyonlarındaki bozukluk veya azalmanın proteini kodlayan gendeki mutasyonlar nedeniyle değil, genin ekspresyonundaki azalmaya bağlı olarak geliştiğini düşündürmektedir.

Hematolojik malignitelerde de PTEN geni somatik mutasyonlarının görülmemesi, buna karşılık PTEN ifadesinin olmadığı durumlarda AML ve ALL gelişiyor olması ve ön verilerimize göre her iki grup hasta mononükleer hücrelerinde Tbx3 ifadesinin artmış olması, PTEN geni transkripsiyonunda Tbx3'ün rol oynayabileceğini düşündürmüştür. Nitekim grubumuz tarafından PTEN geni promoter bölgesinde transkripsiyon faktör bağlanma bölgeleri incelenirken, Tbx3'ün olasılıkla bağlanabileceği DNA dizinlerinin varlığı saptanmıştır. İlginç olarak bu dizinlere çok yakın olarak yerleşmiş MITF (microphthalmia-associated transcription factor) adlı bir diğer transkripsiyon faktörü olası bağlanma bölgesinin varlığı da saptanmıştır. MITF her ne kadar hücre döngüsünü etkileyerek esas olarak melanositlerin gelişimi ve pigment oluşumunda önemli rol oynayan bir transkripsiyon faktörü olsa da MITF mutasyonlarının birçok hematopoetik hücrenin disfonksiyonuna sebep olduğu da bilinmektedir. Bu nedenden ötürü hematolojik kanserlerde Tbx3 proteinin fonksiyonunu incelerken beraberinde MITF düzeylerini ve her iki transkripsiyon faktörünün PTEN gen ifadesine etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada bu amaca yönelik olarak aşağıda maddeler halinde belirtilen yaklaşımlar uygulanmıştır:

1. Akut ve kronik lösemi hastalarının kemik iliğinden izole edilen mono nükleer hücrelerde ve lösemik kök hücrelerde (CD34+ CD38- CD123+ belirteçlerini taşıyan AML kök hücreleri) Tbx3, MITF ve PTEN mRNA ve protein düzeyleri saptanmış ve aralarındaki olası ilişki incelenmiştir.
2. Gen mühendisliği teknikleri kullanılarak PTEN geni promoter bölgesi klonlanmış, Tbx3 ve MITF proteinlerinin PTEN geni ekspresyon düzeylerine etkisi hücre kültürü ortamında transkripsiyonel aktivasyon deneyleri ile incelenmiştir.
3. Klonlanmış PTEN geni üzerinde rekombinant DNA teknolojisi uygulanarak çeşitli mutasyonlar oluşturulmuş ve Tbx3 ile MITF transkripsiyon faktörlerinin gen ifadesine katkıda buldukları bölgeler yine transkripsiyonel aktivasyon deneyleriyle saptanmıştır.
4. Tbx3 proteininin PTEN geni üzerindeki bağlanma bölgesinde gereksinim duyduğu nükleotidlerin belirlenmesi ve Tbx3'ün doğrudan bu dizinlere bağlanabildiğinin gösterilmesi amacıyla *in vitro* DNA-protein bağlanma (EMSA) deneyleri uygulanmış ve Tbx3'ün PTEN geni promoter bölgesindeki bağlanma bölgesi de tam olarak açığa çıkarılmıştır.

Hücre çoğalması ve farklılaşması gibi hücresel olayların fizyolojik ve patolojik boyutları arasında çok ince bir çizgi bulunmaktadır. Fizyolojik koşullardaki embriyolojik veya erişkin kök hücreler ile patolojik kanser hücresi benzer davranışlara sahiptir ve kök hücre farklılaşmasında rol oynayan gen/proteinler çoğu

kez kanser gelişiminde de görev almaktadırlar. Bu nedenle, hücre döngüsü ve farklılaşmasında görev alan moleküler yolların ortaya çıkarılması sadece fizyolojik süreçlerin anlaşılmasında değil, çağımızın en önemli ölüm nedenlerinden biri olan kanserin oluş mekanizmalarının da açığa çıkarılması açısından önem taşımaktadır.

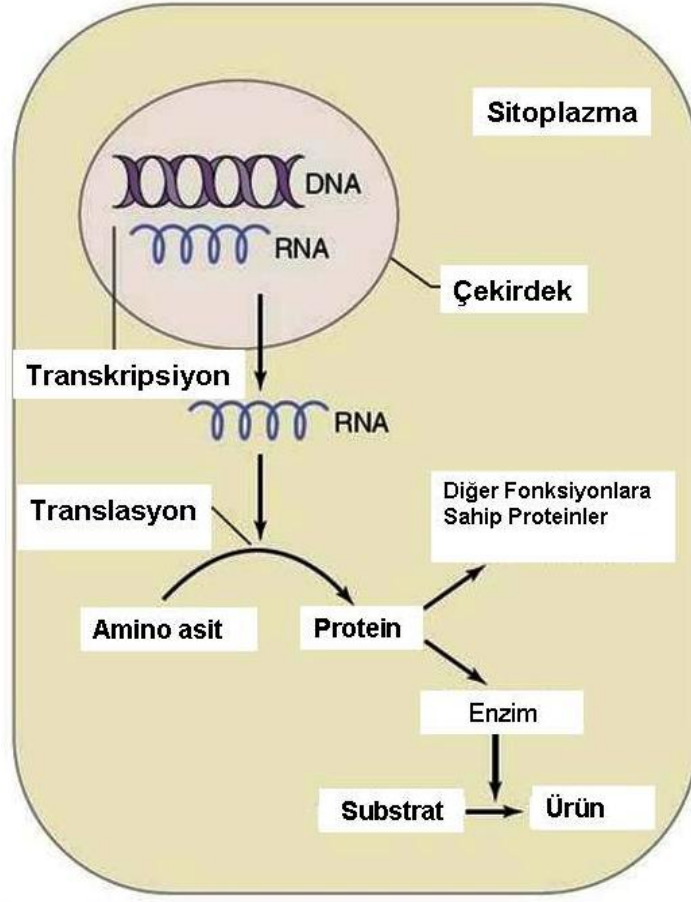
GENEL BİLGİLER

Fertilize bir yumurta hücresinden birçok fonksiyonu bir arada yürütebilen bir canlı organizmanın oluşabilmesi veya yetişkin bir insanda tüm yaşam boyunca gözlenen hücre yenilenmesi veya hematopoez gibi fizyolojik olayların temelinde hücre bölünmesi ve farklılaşması (özelleşmesi) bulunmaktadır. Sistemlerin sağlıklı çalışabilmeleri için hücresel düzeyde; bölünme ve farklılaşmanın iç veya dış çevreden gelen sinyaller doğrultusunda düzenlenmesi, dolayısıyla hücre sağ kalımı, çoğalması veya özelleşmesi için gerekli mekanizmaların doğru zamanda ve uygun süre ile etkinleşmeleri gerekmektedir. Tüm bu olaylar ise gen düzeyinde kontrol edilir. Algılanan uyarılara göre genlerdeki bilginin önce RNA'ya aktarılması (transkripsiyon) daha sonra da RNA'daki bilgi doğrultusunda protein sentezinin (translasyon) gerçekleştirilmesi ile gen ifadesi sağlanmış olur. Proteinler hemen kullanıldığı gibi hücre içerisinde paketlenerek kullanım anına dek saklanabilirler. Hücrenin tüm temel fonksiyonlarının düzenlenmesinde gen ifadesinin kontrolü o nedenle çok önemlidir.

2.1. Gen İfadesi

Gen ifadesinin birinci basamağı, DNA'nın kalıp zincirindeki bilginin transkripsiyon işlemi ile eşlenik RNA'ya aktarılmasıdır. Sentezlenen bu RNA haberci molekül olarak işlev gördüğü için mRNA (Messenger RNA) olarak adlandırılır. mRNA daha sonra hücre çekirdeğinden sitoplazmaya geçer ve ribozomlara bağlanarak DNA'dan alınan bilgi doğrultusunda amino asitlerin ardışık olarak dizilmesini, dolayısıyla protein sentezinin gerçekleşmesini sağlar (Şekil 2.1). Proteinlerin birincil, ikincil ve fonksiyonel üçüncül yapılara dönüştürülmeleri sitoplazmadaki enzimatik reaksiyonlar ile gerçekleştirilir. Böylece proteinlerin katlanmaları ve modifikasyonları (fosforilasyon, misterilizasyon, glikasyon v.b) ile proteinin etkinliği de düzenlenmiş olur.

Anlaşılabacağı gibi gen ifadesinin kontrolü başlıca 4 evrede düzenlenebilmektedir: mRNA sentezinin yapıldığı "transkripsiyon" evresi, mRNA'da çeşitli modifikasyonların yapılarak RNA'ların olgunlaştırıldığı "transkripsiyon sonrası" evre, sitoplazmada protein sentezinin gerçekleştiği "translasyon evresi" ve fosforilasyon gibi kimyasal değişikliklerle protein etkinliğinin düzenlendiği "translasyon sonrası" evre. Bu 4 evrenin herhangi birinde oluşabilecek bir aksama, fonksiyonel proteini mutlaka etkilemektedir.



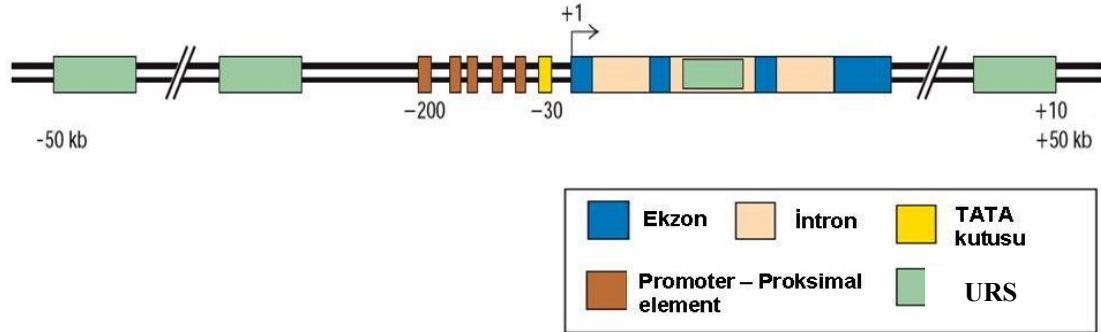
Şekil 2.1. Gen İfadesi: DNA'dan Protein Oluşumuna Kadar Geçen Temel Basamaklar. (Şekil: Vander, Human Physiology, 2003 sayfa: 93)

Hücrelerin özelleşmeleri ve işlevlerini yerine getirebilmelerinin temelinde gen ifadesinin farklı şekillerdeki düzenlenmesi bulunmaktadır. Örneğin pankreas hücreleri retinal pigment yapamazlar, benzer şekilde retina hücreleri de insülin üretemezler. Bunun nedeni, farklı hücrelerde farklı grup proteinlerin bulunması, dolayısıyla her bir farklı hücrede farklı genlerin etkin olmasıdır. Şu halde, aynı DNA'ya sahip tüm somatik hücrelerde her bir farklı hücre tipi için değişik bir gen takımının etkinleştirilmesi nasıl sağlanmaktadır? Bu düzenleme, hücresel seviyede, gerekli olmayan genetik bilginin ortadan kaldırılması ile başarılmaz. Bunun yerine, genomun özgül kısımlarını etkin hale geçiren, diğer genleri baskılayan mekanizmalar gelişmiştir. Seçilen özgül bir gen bölgesinin etkinleştirilmesi (aktivasyonu) ve baskılanması (represyonu) organizmadaki hassas bir dengeyi gösterir. Bir genin kendisi yapısal olarak normal olsa bile, yanlış zamanda, yanlış hücre tipinde ya da anormal miktarda ifade olması sağlıklı bir fenotipe ya da organizmanın ölümüne neden olabilir. Gen ifadesi her ne kadar 4 evrede kontrol ediliyor olsa da en önemli basamak transkripsiyondur ve genlerin çoğu transkripsiyon düzeyinde düzenlenirler (10).

2.1.1. Transkripsiyon ve Düzenlenmesi

Transkripsiyon, bir DNA kalıbından RNA moleküllerinin sentezlenme işlemidir. Hücre içinde bilgi akışı işleminin ilk basamağı olduğu için transkripsiyonun önemi çok büyüktür. Bütün hücrelerde genetik fonksiyonun düzenli işleyebilmesinin temeli özgül DNA bölgelerinin RNA polimeraz enzimi tarafından tanınmasına dayanır. Ökaryotlarda değişik tip genlerin transkripsiyonunu gerçekleştiren üç tip RNA polimeraz bulunur. Tüm mRNA'ların transkripsiyonundan sorumlu olan protein ise RNA polimeraz II dir.

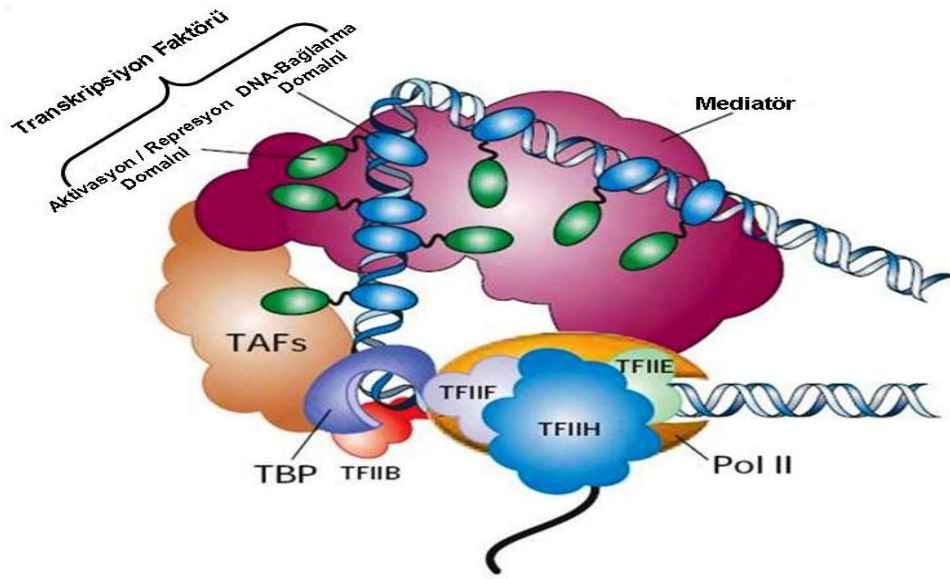
Ökaryotik genlerin yapısında, transkripsiyonu düzenleyen ve gene özel proteinlerin bağlandığı düzenleyici bölgeler (URS) ile tüm genlerin transkripsiyonunda görev alan genel amaçlı proteinlerin bağlandığı promotor bölgeleri olmak üzere iki bölge bulunmaktadır. Promotorlar, RNA polimerazın DNA üzerine getirilebilmesi için tanıma noktası olarak görev yapan nükleotid dizileri içermektedir (Şekil 2.2). Promotorlar'dan sonra mRNA dizilerine kopyalanacak olan kısım bulunmaktadır. Şekil 2.2'de ok ile gösterilmiş bölge, transkripsiyonun başlangıç noktasıdır ve burada yerleşmiş olan nükleotid "0" noktası olarak kabul edilir. Gen üzerinde nükleotidlerin numaralandırılması "0" noktasına göre yapılır ve gerek sağa, gerek sola doğru giderek artan sayılarla ifade edilirler. Transkripsiyonun başlangıç noktasından sağa doğru uzanan, yani mRNA'ya kopyalanacak bölgeyi içeren kısımda yerleşmiş nükleotidler "+" ile, "0" noktasından sola doğru uzanan ve promoter bölgeleri ile URS'leri içeren bölgedeki nükleotidler ise "-" ile belirtilirler. URS'ler "0" noktasının hem sağında hem de solunda, çok uzak bölgelerde bile yerleşmiş olabilirler.



Şekil 2.2. Bir Memeli Geni Temel Bileşenlerinin Şematik Görünümü. (Şekil: Lodish, Molecular Cell Biology, 2007, sayfa: 458)

RNA polimeraz II doğrudan DNA'ya bağlanamadığı için, transkripsiyonun başlayabilmesi; öncelikle genel etkili proteinlerin, yani genel transkripsiyon faktörlerinin promotor bölgesine belli bir hiyerarşik düzen içerisinde yerleşmelerine ve RNA polimerazın promotoru tanıması için bir platform oluşturmalarına bağlıdır. Bu yapının oluşması için TFIID kompleksi kendi alt birimi olan TBP aracılığı ile TATA kutusuna bağlanır. TFIID, TBP ve TAF (TATA Asosiyel Faktörleri) adı verilen alt protein gruplarından oluşur. TBP ve TFIID transkripsiyon faktörlerinin diğer birimleri yaklaşık 20 baz çiftlik bir DNA bölgesine bağlanır. Bu aşama, taahhüt (commitment) basamağı olarak adlandırılır. TFIID'nin bağlanmasıyla DNA'da ortaya çıkan yapısal değişiklikler sonucu TFIIA ve TFIIB gibi ilave faktörler de

promotor üzerine bağlanırlar. Daha sonra RNA polimeraz II ve TFIIF transkripsiyon faktörleri ile bunları takiben TFIIE, TFIIH ve TFIID adlı proteinler başlangıç kompleksine katılırlar. Son basamak; promotor temizlenmesi (promoter clearance) adı verilen, RNA polimerazın TATA kutusunu terk ettiği ve transkripsiyonun “0” noktasından sağa doğru ilerlemeye başladığı basamaktır. Promotor bölgesi ve bu bölgeye bağlanan genel transkripsiyon faktörleri genin sadece bazal düzeyde transkripsiyonunu sağlarlar. Bir genin hücreye özgül olarak ve yeterli miktarda transkripsiyonu ise URS'lere bağlanan özgül transkripsiyon faktörleri denilen proteinler aracılığı ile sağlanır. Bu proteinler genlerin ne zaman ve nerede ifade olacağını ve transkripsiyon hızını kontrol ederler. URS'lere bağlanan transkripsiyon faktörleri, transkripsiyon etkinliğini arttırabildikleri gibi (aktivatör proteinler) baskılayıcı etki de gösterebilirler (represör proteinler) (10).



Şekil 2.3. Yapısal Transkripsiyon Faktörleri ve RNA Polimeraz II: RNA polimeraz II ve TFIID kompleksi hücrede bazal transkripsiyondan sorumludur. Bu yapısal transkripsiyon faktörleri dışında en az iki fonksiyonel bölge içeren ve transkripsiyonu düzenlenmesinden sorumlu hücreye özgü transkripsiyon faktörleri bulunmaktadır. DNA dizisinde özgül bağlanma bölgesine bağlanan hücreye özgü transkripsiyon faktörleri ilgili genlerin ifadesini kontrol eder. (Şekil: Lodish, Molecular Cell Biology, 2007, sayfa: 478)

Transkripsiyon faktörlerinin; DNA'ya bağlandıkları özgül bir DNA-bağlanma protein bölgesi ile aktivasyon veya baskılamadan sorumlu protein bölgesi olmak üzere en az iki işlevsel bölgesi bulunmaktadır (Şekil 2.3). Dolayısıyla, özgül DNA-bağlanma protein bölgesi ile DNA üzerinde sadece o proteine özgül dizinlere bağlanırlar ve promotor bölgesindeki genel transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girerek aktivasyon/represyon protein bölgeleri ile de transkripsiyonun artmasına veya baskılanmasına neden olurlar.

Transkripsiyonel düzenlenme, fizyolojik koşullarda organizmada bulunan tüm çekirdekli hücrelerde dış ortamdan gelen uyarılar ile transkripsiyon faktörlerinin uyumlu bir şekilde çalışmasıyla gerçekleşmektedir. Organizmayı oluşturan

hücrelerin türü ve sayısının kontrolü, çevresel uyarılar doğrultusunda transkripsiyonel düzenlenme ile sağlanmaktadır. Özellikle hücrelerin bölünüp çoğalmasının kontrolünden sorumlu olan hücre döngüsü kontrol mekanizmasında görevli gen ve gen ürünlerinin transkripsiyonel düzeyde kontrolü yaşamsal öneme sahiptir.

2.2. Hücre Döngüsü ve Kontrol Noktaları

Birçok hücre, bölünme ve bölünmeme arasında sürekli bir ardışık özellik göstermektedir. Bir bölünmenin tamamlanmasından bir sonraki bölünmeye kadar geçen olaylar, hücre döngüsünü oluşturur. Unutulmaması gereken önemli bir nokta, bölünme ve farklılaşmanın (özelleşme) aynı anda gerçekleşmediğidir. Hücrenin farklılaşabilmesi için hücre döngüsünden çıkması gerekmektedir. Tamamen farklılaşmış hücrelerde fizyolojik koşullarda hücre bölünmesi görülmez.

Hücre döngüsü 4 evreden oluşmaktadır. Birinci hazırlık evresi (Gap1-G1), hücrenin bölünmeye hazırlandığı dönemdir. Bu evrede DNA'nın iki katına çıkarılması (replikasyon) için gereken tüm öğeler ile hücre içi organeller sentezlenir ve hücre kütlesi büyür. İkinci evre sentez (S) evresi olarak adlandırılır ve DNA kopyalanarak iki katına çıkartılır. Üçüncü evre, ikinci hazırlık evresidir (Gap2- G2). Bu evrede ise hücrenin bölünmesi için gereken son hazırlıklar yapılır. Son evre mitoz (M) evresidir, hücre ikiye bölünerek morfolojik ve genetik olarak birbirinin aynısı iki hücre meydana gelir. Simetrik bölünme olarak adlandırılan bu bölünme dışında bir de asimetrik bölünme bulunmaktadır. Asimetrik bölünmede oluşan yavru hücreler birbirlerinden farklıdır ve farklı proteoma sahiptir. Aşağıda anlatılacak olan kök hücrelerin "kendini yenileme" özelliği, asimetrik bölünmeye en güzel örnektir. Bu tip bölünme; ortaya çıkan iki yavru hücreden birinin "özelleşmeye yönlenecek hücre" diğerinin ise "kök hücre" özellikleri taşıyor olmasını gerektirir ve yavru hücrelerin farklı protein içeriklerine sahip olduklarının, dolayısıyla aslında iki farklı hücre olduklarının göstergesidir.

Hücre döngüsünün evreleri çok düzenli işlemek zorundadır. Bir evre tamamlanmadan diğerinin başlamaması veya sistemin tek bir yönde (G1-S-G2-M) ilerlemesi, yani geriye dönülerek evrelerin tekrarlanmaması gerekmektedir. Bunların yanı sıra, hücre döngüsü sırasında DNA'ya herhangi bir zarar gelmemeli ve DNA hatasız bir şekilde kopyalanarak yavru hücrelere aktarılmalıdır. Hücreler, sadece ne zaman bölüneceklerini değil, aynı zamanda döngünün hangi evresinde olduklarını da bilmek zorundadırlar. İşte tüm bu kontrollü düzen "hücre döngüsü merkez proteinleri" ile "hücre döngüsü kontrol proteinleri" tarafından sağlanır. Bu proteinlerin yapımı veya fonksiyonelliği ise gen ifadesinin kontrolü ile sağlanmaktadır.

I- Hücre döngüsü merkez proteinleri.

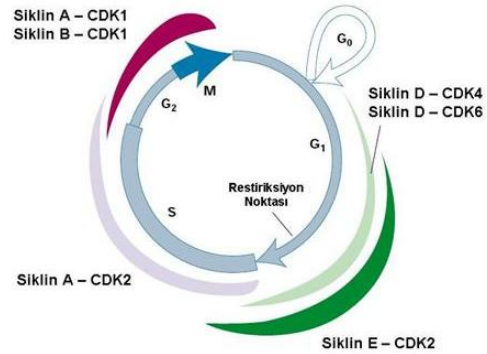
Hücre döngüsü merkez proteinleri 3 ana grupta toplanmaktadır: **Siklinler** (A, B, D1, D2, D3, E), **siklin-bağımlı serin/treonin protein kinazlar** (CDK: CDK1, CDK2, CDK4, CDK5, CDK6, CDK7) ve **siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri** (CDKI: p15, p18, CDKN2A/p19, CDKN1A/p21 ve p27).

Siklinler; hücre döngüsü süresince gerektiği zaman sentezlenen ve ardından görevini tamamladığında hızla parçalanmış bir protein ailesidir. Dolayısıyla, gerek embriyolojik gelişimde gerek hücre yenilenmesi gibi fizyolojik durumlarda çevresel uyarı olarak ortamda bulunan “Büyüme Faktörleri (Growth Factors)” temel olarak siklin proteinlerinin sentezlenmesini sağlayacak genleri etkinleştiren transkripsiyon faktörlerini aktifleştirmektedirler. **Siklin-bağımlı kinazlar** ise hücre döngüsü düzenleyici proteinleridir ve kinaz aktiviteleri sadece siklinlere bağlandıklarında etkinleşir. Bir CDK proteini birden fazla siklin ile bağlanabilir ama hücre döngüsünün her bir evresinde sadece o evreye özgül siklin-CDK kompleksi oluşur (Şekil 2.4). **CDKI proteinleri**, siklin/CDK yapılarının negatif düzenleyicisidir ve CDK proteinlerine bağlanarak siklinlerle etkileşimlerini, dolayısıyla kinaz aktivitesinin oluşmasını engellerler. CDKI proteinleri de birden fazla CDK proteinine bağlanabilirler (11).

a)

Siklin-CDK Kompleksi	Siklin	Birleştiği CDK
G ₁ -Cdk	siklin D (D1, D2, D3)	Cdk4 Cdk6
G ₁ /S-Cdk	siklin E	Cdk2
S-Cdk	siklin A	Cdk2
M-Cdk	siklin B	Cdk1

b)



Şekil 2.4. Hücre Döngüsünde Görev Alan Siklin-CDK Kompleksleri: **a.** Hücre döngüsünün her bir evresine özgül siklinler ve birleşerek kinaz aktivitesini oluşturdukları CDK partnerleri. **b.** Hücre döngüsü sırasında CDK proteinleri sabit miktarda bulunurken, her bir siklinin kendine özgü evrede yapımı artar, CDK ile kompleks oluşur, hedef proteinlerini fosforlayarak bir sonraki evrenin başlayabilmesine olanak sağlarlar. Evre sonunda siklin proteinleri CDK'dan ayrılır ve yıkılır. Her bir evredeki siklin/CDK kompleksi miktarları çizgi kalınlıklarına göre simgelenmiştir. (Şekil: Lodish, Molecular Cell Biology, 2007, sayfa: 883)

II- Hücre döngüsü kontrol proteinleri

p53, Retinoblastoma (Rb), Ataksi Telenjiyektazi (AT) ve Ataksi Telenjiyektazi Benzeri (ATR), v.b. proteinler, hücre döngüsünün belirli kontrol noktalarında (check-point) etkindirler. Hücre döngüsünde başlıca 3 ana kontrol noktası bulunmaktadır. Bunlar; G1 evresi bitiminde S evresine geçmeden hemen önceki bölgede etkin olan G1-kontrol noktası, G2 evresi sonunda etkin olan G2-kontrol noktası ve M fazının metafaz evresinde etkin olan M-kontrol noktalarıdır.

G1-kontrol noktasında görevli proteinlerin başlıca görevleri; hücrenin kütlesini ve DNA'da herhangi bir hasarın bulunup bulunmadığını denetlemektir. Böylece hücre bir sonraki S evresine, ancak yeterli kütleye ulaşmış ve DNA'sında herhangi bir hasar bulunmuyorsa geçebilir. Aksi halde sorunlar giderilene dek hücre döngüsü durdurulur. G1-kontrol noktasının en önemli proteini p53'tür ve bir transkripsiyon faktörü olduğundan hücre döngüsünü durduran bazı CDKI genlerinin transkripsiyonunu arttırarak etkin hale geçmelerini sağlar. Herhangi bir sorunun olmaması durumunda, hücreler "S" fazına geçiş yaparlar. Bu olay temel olarak; G1 fazında görevli siklin/CDK komplekslerinin S fazı siklinlerini kodlayan genleri etkinleştirilmesine bağlıdır. Aktivitesi artan S fazı siklin/CDK kompleksi (siklin A/CDK2), DNA replikasyonunun yapılmasını sağlar. Ancak DNA kopyalanmasının tekrarlanmaması için S fazı sonunda siklin A, CDK1 ile birleşir ve replikasyonda görev alan Cdc6 ve Mcm gibi proteinleri fosforlayarak DNA replikasyonunun tekrarlanmasını engeller. Bu kompleks, G2 fazı boyunca ve M fazının başlangıcında aktif olarak görev yapar (Şekil 2.4).

G2-kontrol noktası, mitoz evresine girmeden hemen önce etkindir. Bu noktada görevli proteinler ise kopyalanmış DNA'nın bütünlüğünü ve mutasyon içerip içermediğini denetlerler. Herhangi bir sorun varsa, hücre döngüsü durdurularak DNA tamirinin yapılması sağlanır.

Mitoz evresinin metafaz bölümünde, yani kromozomların iğ iplikçiklerine yerleşerek metafaz plağı denilen yapıyı oluşturdukları zaman etkin olan 3. kontrol noktası ise M-kontrol noktası olarak adlandırılır. Bu bölgede görevli proteinler de kromozomların tümünün metafaz plağına yapışmasını ve doğru düzlemde bulunmalarını denetlerler (12).

Görüldüğü gibi hücre döngüsünde görev alan bazı proteinler hücreleri bölünmeye götürürken, bazıları da aksine bölünmeyi durdurmaktadırlar. Sağlıklı hücrelerde bu iki grup proteinin dengede çalışması gerekmektedir. Hücre bölünmesini durduran proteinleri kodlayan genlere tümör-baskılayıcı genler denilmektedir. Hücrenin bölünebilmesi için bu genlerin etkin olmaması gerekir. Eğer bu genler kalıcı olarak yok edilirse ya da transkripsiyonları baskılanırsa, hücre bölünmesinin kontrolünü sağlayamayacakları için hücre kontrolsüz bir biçimde bölünüp çoğalmaya başlar.

Hücreyi bölünmeye götüren proteinleri kodlayan genler ise proto-onkogenler olarak adlandırılır. Eğer bu genlerin ifadesi kontrol edilmezse sürekli aktif olacakları için hücreyi devamlı olarak bölünmeye teşvik ederler. Bu genler aşırı ya da ektopik aktivasyon sonucu fizyolojik görevlerinin dışına çıkarak birer onkogen olarak işlev görmeye başlarlar ve tümör oluşumuna öncülük ederler. Proto-onkogenlerin onkogenlere dönüşümünde; nokta mutasyonları, kromozomal translokasyonlar ve transkripsiyonel kontrolün bozulmasına bağlı olarak gelişen aşırı gen ifadesi rol oynamaktadır.

Anlaşılabacağı üzere, tamamen fizyolojik olan hücre bölünmesi ve özelleşmesi gibi olayları kontrol eden mekanizmaların bozulması, kontrolsüz hücre çoğalması ve hücre özelleşmesinin ters yönde işlemesine yol açmaktadır. Bu durum, kanser gelişiminin temelini de oluşturmaktadır.

2.3. Kanser Gelişim Mekanizmaları

Genel olarak kanser hücrelerinin tümör oluşturma kapasitesi iki hipotez ile açıklanmaktadır: Klonal evrim hipotezi (13) ve kanser kök hücresi hipotezi (14).

2.3.1. Klonal Evrim Hipotezi

Klonal evrim hipotezine göre, kanser tek bir hücreden kaynaklanır ve olumsuz çevre koşulları ile risk faktörlerinin bu hücreye etkileriyle genom bütünlüğü bozulur. Bu durum, genetik mutasyonlarda artışa ve epigenetik değişikliklere neden olarak hücre bölünmesini kontrol eden faktörlerin fonksiyonlarını yitirmelerine ve kontrolsüz hücre bölünmesinin başlamasına neden olur. Bu hipoteze göre kanserin oluşabilmesi için proto-onkogenlerin ve/veya tümör baskılayıcıların ardışık olarak mutasyona uğramaları ve fonksiyonlarında bozulmaların olması gerekmektedir.

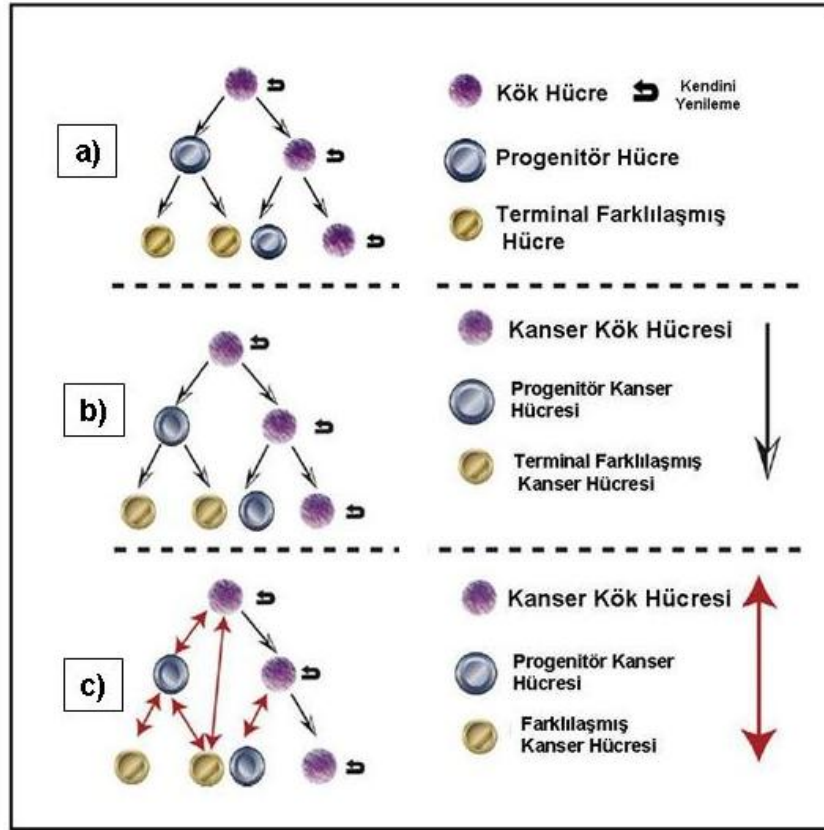
Normal koşullarda hücre döngüsü kontrol basamaklarında hücrenin sağlıklı büyüme ve bölünme süreçlerinde olup olmadığı kontrol edilir. Burada özellikle siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri (CDKI) ve tümör baskılayıcı proteinler önemli rol alır. p53, PTEN gibi tümör baskılayıcıların fonksiyonunu yapamaması ve p27, p14, p21 gibi CDKI'lerin yokluğu ya da fonksiyon kaybı tümör oluşumu ve kanser gelişimini uyarmaktadır. Tümör baskılayıcı genlerin fonksiyon kaybı yanı sıra aynı hücrede proto-onkogenlerin aktivasyonu da gereklidir. Hücre bölünmesini uyaran "büyüme faktörleri" gibi mitojenlerin, bunların bağlan+

dıkları reseptörlerin veya hücre içinde kullandıkları yolakların fizyolojik kontrol dışına çıkarak otonomi kazanmaları ve negatif denetleyicilere duyarsızlaşması, bölünme sinyallerinin devamlı hale gelmesine neden olacaktır. Bu durumda, hatalı DNA taşıyor olsa da bölünmeye devam edecek olan hücreler sağlıklı olmayan ve sürekli bölünme eğiliminde olan hücreleri oluşturacaktır.

2.3.2. Kanser Kök Hücresi Hipotezi

Kanser kök hücreleri; kendini yenileme kapasitesi olan, tümör tipine ve oluşma koşullarına bağlı olarak progenitör kanser hücresi özellikleri taşıyan pluripotent hücrelerdir. Kanser hücreleri arasında çok küçük sayıdaki bir hücre topluluğunun proliferasyon ve klonal çoğalma özelliği gösterdiği, gerek *in vivo* (15) gerek *in vitro* deneylerle saptanmış (16) ve varlıkları uzun yıllardır bilinmektedir. Farklı özellikleri nedeniyle koloni oluşturma kapasitesine sahip olan bu küçük hücre topluluğunun aslında kök hücre özellikleri taşıdığı saptanması ise son yıllardaki çalışmalarla gösterilmiş ve "kanseri kök hücresi" tanımı bilimsel literatüre girmiştir. Kanser kök hücreleri; normal kök hücrelerin kendini yenileme kapasitesini düzenleyen genlerinin mutasyonu veya epigenetik mekanizmalarla işlevlerinin bozulması sonucunda gelişebileceği gibi (17), tamamen özelleşmiş hücrelerin

yeniden kök hücre özelliği kazanacak şekilde geriye farklılaşması ile de gelişebilmektedir (18) (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. Normal kök hücre farklılaşması ve Kanser kök hücre hipotezi: **a.** Normal pluripotent hücrenin asimetrik bölünerek kendini yenilemesi ve farklılaşması. **b.** Kanser kök hücresinin projenitör ve olgun kanser hücrelerine farklılaşması. **c.** Projenitör ve olgun kanser hücrelerinin geriye farklılaşarak kendini yenileme özelliği kazanması. (Şekil: O'Connor, ML ve ark. Cancer Lett. 2014 Mar 28;344(2):180-7)

Hem olgun somatik hem de pluripotent kök hücrelerin büyüme ve bölünmeleri her ne kadar aynı hücre döngüsü kontrol proteinleri tarafından yönlendirilse de, kök hücrelerin farklılaşma kapasitelerinin de korunuyor olması nedeniyle her iki hücre tipi arasında farklı transkripsiyon faktörleri etkin olmaktadır. Bir diğer deyişle, kök hücre bölünmesi ve farklılaşmasında görevli transkripsiyon faktörlerinin etkinlikleri, hücrenin özelleşme derecesi arttıkça azalmakta ve özelleşmesini tamamlamış hücrede tamamen kaybolmaktadır. Tam da bu nedenle, embriyolojik gelişim sırasında önemli rol oynayan bazı transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerin ifadesi yetişkin bireylerdeki sağlıklı hücrelerde tamamen baskılanmış durumdadır. Ancak, kanser hücrelerinin bir özelliğinin de geriye doğru farklılaşarak kök hücre fenotipine yaklaşması olduğu hatırlanırsa, neden yetişkin bireydeki sağlıklı hücrelerde ifade bulunmayan bazı gen ürünlerinin kanser hücrelerinde ifadesinin arttığı da anlaşılabilir. Yani embriyolojik veya pluripotent kök hücre ile kanser hücreleri arasında hücre bölünmesini düzenleyen transkripsiyon faktörleri açısından çok büyük benzerlikler bulunmaktadır.

Nitekim bu tezin çalışma konusu olan Tbx3 ve MITF adlı transkripsiyon faktörlerinin her ikisi de hücre döngüsünün gerçekleşmesini sağlayan proteinleri kodlayan genlerin aktivitelerini düzenlemekte ve embriyolojik gelişim sırasında önemli görevler üstlenmektedirler. Yetişkinlerde, *TBX3* geni ifadesi hiç bir sağlıklı hücrede bulunmaz iken, *MITF* geni bazı hematolojik hücreler dışında sadece melanoblastlarda ifade bulmaktadır. Ancak, birçok farklı kanser hücresinde her iki transkripsiyon faktörünü kodlayan genlerin ifadesinin arttığı görülmektedir.

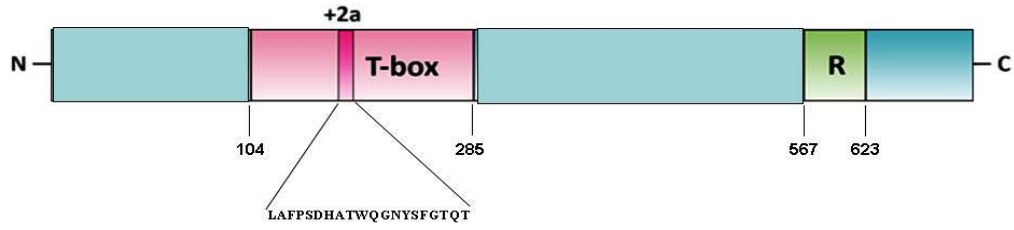
2.4. Tbx3 Transkripsiyon Faktörü

TBX gen ailesi embriyonik gelişimde kritik rol alan T-box faktörlerini kodlar. Bu gen ailesinin ilk üyesi *Brachyury (T)*'nin heterozigot mutasyonu sonucu farede kuyruk uzunluğu ve sakral vertabranın etkilendiği 1927 yılında tespit edilmiştir. 1990 yılında fare *T* geninin klonlanması, daha sonra *Drosophila melanogaster*'de bu gen ile belirgin homoloji gösteren *omb* geninin tanımlanması ve sonrasında yapılan çalışmalar bu gen ailesinin filogenetik olarak DNA bağlanma bölgesi korunmuş 20'den fazla üyesi olduğunu ortaya çıkarmıştır (19).

T-box proteinleri yaklaşık 180 amino asitlik T-box bağlanma bölgeleri ile DNA üzerindeki özgül dizilerine bağlanır. Bu DNA dizini, her bir T-box proteini için [TTT(G/C)ACACCTAGGTGTGAAA] şeklinde varyasyonlar gösterse de çekirdek dizin sabittir ve "GGTGTGA " nükleotidlerinden oluşur. Promotor ve düzenleyici bölgelerinde bu dizini içeren genlerin ifadesi, T-box proteinlerinin katkısıyla gerçekleşmektedir.

TBX gen ailesi; T, *TBX1*, *TBX2*, *TBX6* ve *TBR1* olmak üzere filogenetik olarak 5 alt ailede toplanmıştır. *TBX2* alt ailesi ise, *TBX2*, *TBX3*, *TBX4* ve *TBX5* genlerini içerir(20).

İnsan *TBX3* geni, 12. kromozomun uzun kolunda 24. bölgede (12q24) yer alır (21). Bu gen yedi ekzondan oluşmakta ve 723 aa. lik Tbx3 proteinini kodlamaktadır (22). Diğer T-box proteinlerinden farklı olarak Tbx3 ve Tbx2 hedef genlerinin transkripsiyonlarını baskılamaktadırlar. Tbx3'ün, DNA bağlanma bölgesinde fazladan 20 aminoasit içeren ikinci bir formu daha bulunmaktadır ve Tbx3+2a olarak adlandırılmıştır. Tbx3+2a izoformunun DNA bağlanma bölgesine etkin bağlanmadığı ileri sürülmüşse de, daha sonra yapılan çalışmalarla her iki izoform arasında fonksiyon veya DNA'ya bağlanma etkinliği açısından bir fark olmadığı ortaya konulmuştur (23). Tbx3'ün DNA'ya bağlanma bölgesi (T-box) proteinin amino-ucunda 105–285. aminoasitler arasında, transkripsiyonu baskılayan bölgesi (R) ise karboksil-ucunda 567. ile 623. aminoasitler arasında yerleşmiştir. Tbx3 proteini ayrıca 292. ve 297. aminoasitler arasında bulunan bir nükleer lokalizasyon sinyali taşımaktadır (5, 24) (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. İnsan Tbx3 Proteinini Şematik Gösterimi.

TBX3 geni ifadesi, embriyolojik gelişim esnasında blastosist iç hücre kitlesi oluşumundan itibaren başlar ve organogenez aşamasında; sinir sistemi, iskelet, göz, kalp, böbrek, akciğer, pankreas ve meme dokusu oluşumları sırasında da devam eder (25).

Farede *Tbx3* geninin homozigot mutasyonları embriyonik dönemde ölümle sonuçlanmaktadır. İnsanlarda bu genin homozigot mutasyonları tanımlanmamış olmakla birlikte heterozigot mutasyonlar, otozomal dominant bir hastalık olan UMS'ye (Ulnar Mammary Syndrome) neden olmaktadır. UMS; meme hipoplazisi, apokrin bez eksikliği veya disfonksiyonu, diş, saç ve cinsel organ hasarı ile ön ekstremitte tomurcuğunun posterior elementlerinin duplikasyonu veya eksikliği ile karakterize bir tablodur (20).

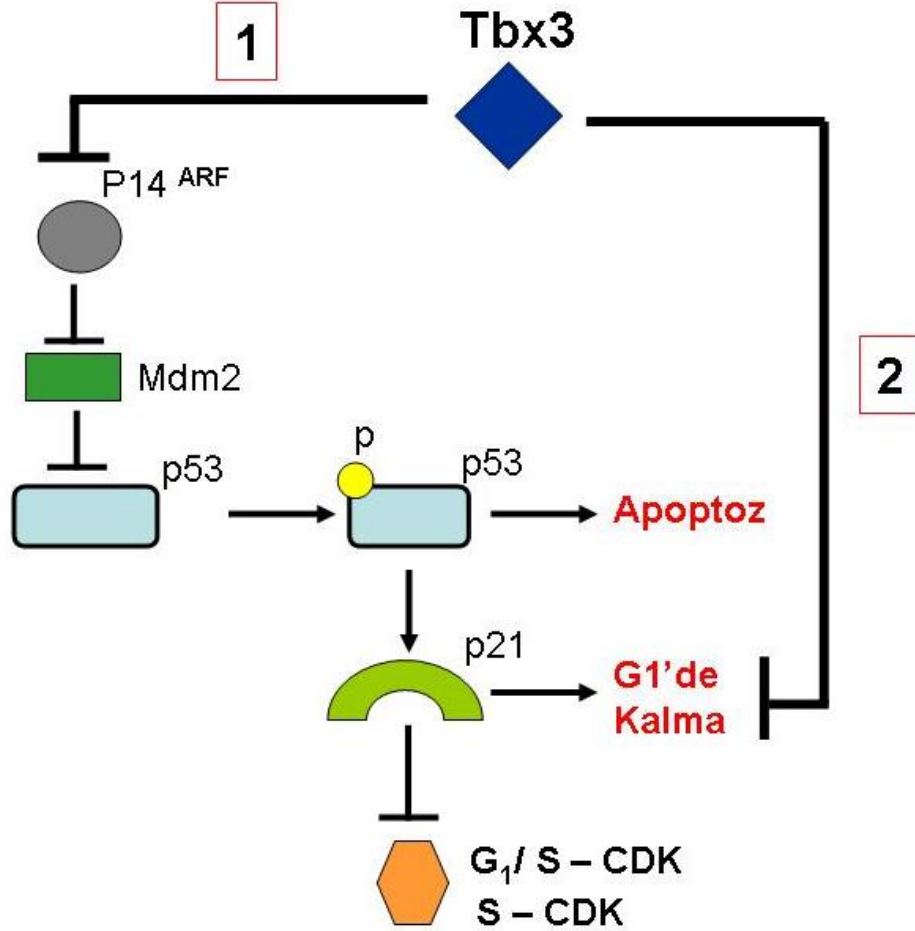
Embriyolojik gelişim sürecindeki önemli rollerinin yanı sıra, *TBX3* ve *TBX2* gen ifadelerinin birçok kanser türünde hem mRNA hem de protein düzeyinde arttığı saptanmıştır (Tablo 2.1.). Bunlar, Tbx2/3 proteinlerinin hücre döngüsü kontrolünde rol oynayabileceklerini gösteren öncül verilerdir.

Tablo 2.1. Tbx2 ve Tbx3'ün farklı kanserlerdeki ifadesi (20).

	Kanser Tipi	Tümör Örneklerinde Yüksek Ekspresyon Oranı
Tbx2	Meme	%50- %80
	Pankreas	%50- %60
	Deri (melanoma)	%63
Tbx3	Meme	%70-90
	Over	%69
	Pankreas	-
	Deri (melanoma)	%57
	Karaciğer	%79-%87
	Servikal	-

Nitekim Tbx2/3 proteinlerinin hedef genleri arasında hücre döngüsünü durdurucu etkiye sahip CDKI proteinlerini kodlayan bazı genlerin bulunduğu saptanmıştır. CDKI grubunda bulunan p21 ve p19ARF proteinlerini kodlayan genlerin promoter bölgelerinde T-box dizinlerinin varlığı saptanmış ve Tbx3 proteinin bu dizinlere bağlanarak p21 ve p19 gen ifadelerini baskıladığı gösterilmiştir (26). Hücre döngüsünü durdurucu etkiye sahip p19 proteinin Tbx3 tarafından baskılanması, dolaylı yoldan p53 adlı bir diğer durdurucu kontrol proteininin de

etkinleşmesini engellemektedir (Şekil 2.7.). Böylece Tbx3, doğrudan veya dolaylı yollarla hücre döngüsünü durdurma yetisine sahip proteinleri bloke ederek hücreleri bölünmeye doğru yönlendirmektedir.



Şekil 2.7. Tbx3 etkisi: Sağlıklı olarak bölünmekte olan bir hücrede p53 adlı protein, Mdm2 proteini tarafından baskılanmaktadır. G1 kontrol noktasında görevli olan p53, sadece hücrede bir tehlike sinyali ya da DNA hasarı olduğunda etkinleşmektedir. DNA hasarı olduğunda hücre içinde P14^{ARF} aktifleşerek Mdm2 proteinine bağlanmakta, dolayısıyla p53 proteini serbest hale geçmektedir. Bir transkripsiyon faktörü olan p53, hücre döngüsünü durdurucu p21 geni promoterine bağlanarak p21 geninin ifadesini arttırmakta ve hücre döngüsü G1 fazında durdurulmaktadır. Bir kanser hücresinde ise, Tbx3 doğrudan p14^{ARF} promoterine bağlanarak gen ifadesini baskılamakta, dolayısıyla Mdm2 baskısından kurtulamayan p53 etkin olamamakta, yani hücre döngüsünü durduramamaktadır. Böylece DNA hasarına rağmen hücre S fazına geçebilmekte ve bölünerek hasarlı DNA'yı yavru hücelere aktarmaktadır. Fizyolojik kontrol mekanizmalarının iflasi sonucunda da hasarlı DNA ile bölünen hücrelerin sayısı giderek artmaktadır.

Hücre döngüsünü etkileyerek hücreleri bölünmeye yönlendiren Tbx3 proteininin kanser hücrelerindeki artışı, *TBX3* geninin bir onkogen olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim yakın zamandaki çalışmalar, Tbx3'ün kök hücrelerin kendi kendini yenilemesini ve farklılaşmasını sağlayan Wnt yolağı ile de ilişkili olduğunu göstermektedir. Beta-catenin'in aşırı ekspresyonu Tbx3 transkripsiyonunu aktive etmektedir. Ayrıca *TBX3* geni susturulmuş hücrelerde beta-catenin aracılı hücre sağ-kalımı etkilenmektedir (7). Tüm bunlara ek olarak, Tbx3 ile çok benzeşen Tbx2 proteininin embriyonik dönemde hücre migrasyonunun düzenlenmesinde Wnt yolağı ile birlikte çalıştığı da saptanmıştır. Bununla birlikte Tbx2/3 proteinleri ile Wnt yolağı ilişkisinin kanser oluşumundaki rolleri henüz bilinmemektedir. Ancak, *TBX3* geni ifadesinin gerek embriyonik kök hücrelerde gerekse indüklenmiş pluripotent kök hücrelerde (iPS) bulunduğu saptanmıştır. Yani Tbx3 pluripotensi ile ilişkili olabilecek bir faktördür. Hematopoetik kök hücreler ile hematolojik kanserler, pluripotensi ve kendini yenileme özelliğinin moleküler mekanizmalarının anlaşılabilmesi için elverişli bir model oluşturmaktadırlar.

2.5. MITF (Microphthalmia-Associated Transcription Factor)

MITF geni 3. kromozomun 3p14.2 bölgesinde yerleşmiş, bHLH/LZ (basic helix-loop-helix/leucine zipper) yapısında bir transkripsiyon faktörünü kodlayan bir genidir. MITF transkripsiyon faktörünün özgül DNA bağlanma dizini M-Box olarak isimlendirilen "AGTCATGTG" dizini olarak tanımlanmıştır (27). MITF geni taşımayan farelerde nöral-krest kaynaklı melanosit gelişimi ve pigment oluşumu bozulmakta, ayrıca işitme kaybı görülmektedir. MITF mutasyonu insanlarda; işitme kaybı, deri, saç ve gözde pigment eksikliği ile karakterize olan Waardenburg sendromuna yol açmaktadır (28).

MITF geni başlıca melanosit, osteoklast, mast hücresi, makrofaj, NK hücreleri, B hücreleri ve kalpte ifade edilmektedir. Farelerde çok sayıda *MITF* mutasyonları tanımlanmıştır. MITF, melanosit gelişiminde bir sağ-kalım faktörü olarak görev yapar (29) ve pigment üretiminden sorumlu genlerin ifadesini düzenleyerek melanoblast farklılaşmasında rol oynar (30). Dolayısıyla, *MITF* geni mutasyonları temel olarak melanosit gelişimi ve pigment oluşumunda bozukluklara yol açmaktadır. Ancak, MITF mutasyonlarının pigment hücreleri yanı sıra mast ve NK hücreleri gibi hematopoetik kökenli hücrelerde de yapısal ve fonksiyonel hasarlara neden olduğu saptanmıştır (31).

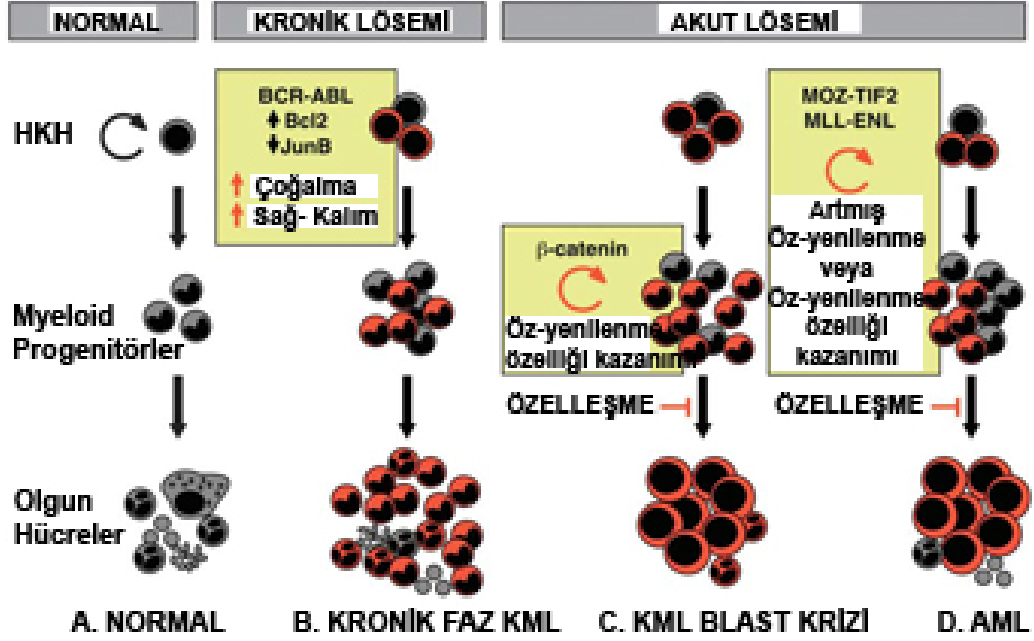
MITF'in kanser oluşumunda, özellikle malign melanomdaki rolü oldukça karmaşıktır. MITF; *CDKN1A* ve *CDKN2A* genlerinin kodladığı siklin-bağımlı kinaz inhibitörleri p21^{Lip1} ve p16^{INK4a}'nın ifadesini arttırarak hücre bölünmesini baskılamaktadır (32). Ayrıca, MITF'in ektopik ekspresyonunun BRAF-aracılı melanosit proliferasyonuna zıt yönde etki ettiği gösterilmiştir (33). Bununla birlikte MITF, soy-bağımlı onkogen olarak da tanımlanmıştır. Melanomların 1/6'sında değişken düzeylerde arttığı bulunmuştur(34).

Melanoma hücre hatlarında yapılan *in vitro* çalışmalarda; MITF geninin kısa süreli susturulmasının hücre döngüsünü G1' de durdurduğu (35), uzun süreli

susturulmasının ise p53 ifadesini arttırdığı ve hücre yaşlanmasını indüklediği saptanmıştır (36). Tüm bu verilerin karşıtı sonuçları içeren çalışmalar da bulunmaktadır. MITF'in CDK1'lerden p27^{Kip1} 'in ifadesi baskılayarak hücre bölünmesini indüklediği ve Tbx2 ifadesini arttırdığı gösterilmiştir (37). Sonuç olarak bilimsel veriler, MITF proteininin hem hücre döngüsünü durdurucu hem de indükleyici etkilerinin olduğunu göstermektedir.

MITF'in pro ve anti-proliferatif etkileri, "Reostad Modeli" ile açıklanmıştır. Bu modele göre düşük MITF aktivitesi, aynı kök hücrelere olduğu gibi, hücrelerin G1 noktasında duraklamasına ve invazyon özelliklerinin artmasına neden olurken yüksek MITF aktivitesi, hücrelerin bölünmesine ve özelleşmesine neden olmaktadır (38). Yani hücreler, MITF' in farklı seviyelerde ifade edilmesi ile ya kök hücre özelliği kazanmakta ya da kanser hücrelerine benzemektedirler. Bu saptamalar, MITF'in hem kanser gelişiminde görev alan yolaklar ile hem de pluripotensinin sağlanmasında görevli yolaklar ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Bir sonraki bölümde açıklanacağı üzere hematolojik maligniteler, kronik ve akut olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Kontrolsüz hücre döngüsü sonucunda aşırı çoğalan, özelleşmesini tamamlayamamış hücreler topluluğu daha çok kronik lösemilerde görülmektedir. Akut lösemiler ise genellikle, hematolojik kök hücrelerinin kendini yenileme ve olgunlaşma/farklılaşma özelliklerinde sapmalar olması nedeniyle gelişmektedir (Şekil 2.8). MITF'in ifade düzeyine göre kontrolsüz çoğalan veya kök hücre özelliğinde olan hücrelerin oluşması, kronik veya akut lösemi gelişiminde farklı MITF düzeylerinin etkin olabileceğini akla getirmektedir.



Şekil 2.8. Onkogen Hiyerarşisi Ve Öz-Yenileme Kapasitesinin Lösemi

Patogenezindeki Rolü: A. Normal myelogenezde, yalnızca hematopoetik kök hücreler (HKH) öz-yenilenme kapasitesine sahiptir ve belli bir hiyerarşik düzen içerisinde önce myeloid progenitörlere farklılaşırlar, daha sonra ise özelleşmelerini tamamlayarak olgun hücreleri oluştururlar. B. KML’de lösemi tablosu oturmadan önce kromozomal translokasyon ile BCR-ABL kimerik yapısının oluşması; HKH ve myeloid progenitör hücrelerde *Bcl2* gen ifadesinin artmasına, *JunB* ifadesinin ise azalmasına, dolayısıyla her iki hücre tipinde kontrolsüz hücre bölünmesine ve artmış sağ-kalıma neden olmaktadır. Hücreler bu bozukluğa rağmen özelleşmeye de devam ederler ve bu hücre topluluklarında farklılaşmasını tamamlamış olgun hücreler de bulunur. C. ve D. KML’nin blast krizi evreleri ve AML gibi akut hastalıklarda ise; HKH’lerinde öz-yenilenme kapasitesinde bir artış görülür. Ayrıca, myeloid progenitör hücreler normal koşullarda sahip olmadıkları “öz-yenilenme” kapasitesini kazanırlar. MOZ-TIF2 veya MLL- ENL gibi translokasyon ürünleri ile β-catenin aktivitesinin artışı, öz-yenilenme kapasitesinin HKH’larda artmasına ve myeloid progenitör hücrelerde ise kazanılmasına neden olmaktadır. Bunların yanı sıra özelleşmenin baskılanması, HKH veya myeloid progenitörlerin birikmesine ve olgunlaşmamış blast hücrelerinin çokluğu ile karakterize olan AML gelişimine neden

2.6. Hematolojik Maligniteler

Hematopoetik hücrelerin yapımı embriyogenez ile birlikte başlar ve fetal karaciğer, timus ve kemik iliğinde fetal hayat boyunca devam eder. Doğumdan sonra ve tüm yaşam boyunca kan hücrelerinin yapımından sorumlu olan organ ise kemik iliğidir.

Kan hücrelerinin üretilme süreci, normal koşullarda ve fizyolojik uyarılara uygun yanıtların verilmekte olduğu reaktif durumlarda, oldukça karmaşık olsa da bir düzen içinde kemik iliğinde ve timusta belli mikro anatomik çevrelerde gerçekleşmekte ve bu hücreler, olgun morfolojiye sahip işlevsel hücreler olarak çevre kanına geçmektedirler.

Buna karşılık, bu süreçteki bir hücreden kaynaklanan bir sapma olarak gerçekleşen malign hücrelerin üretilme süreci ise belli kurallara bağlı kalsa da mikro çevrede az ya da çok değişikliklere neden olmakta ve üretilen hücreler morfolojik ve fonksiyonel olarak normal dışı bazı özellikler göstermektedirler. Kötü huylu ve normal dışı özellikler gösteren bu hücreler bağışıklık sistemine karşı çoğalıp hematolojik malignite/kanser gelişimine sebep olurlar. Hastalığın ortaya çıkış ve ilerleme hızına bağlı olarak hematolojik maligniteler "akut" ve "kronik" olmak üzere ikiye ayrılır.

Akut lösemiler farklılaşma ve olgunlaşma özelliğini kaybetmiş hematopoetik kök hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile karakterize bir hastalık grubudur. Kötü huylu hücreler (blastlar veya olgunlaşmamış öncül hücreler) kemik iliğine aşırı miktarda infiltrate olarak normal hematopoiezi baskırlar ve sonuçta sağlıklı normal kan hücrelerinden sayıca daha fazla hale gelirler. Bu anormal hücreler diğer organlara da yayılarak, organın fonksiyonlarını yapamaz hale getirebilirler.

Kronik lösemiler 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.

2.6.1 Akut Lösemiler

Normal hematopoetik kök hücreler, karmaşık ve sıkıca denetlenen süreçler sonucunda olgun kan hücrelerini oluşturan poliklonal hücrelerdir. Akut lösemi ise normal denetimden kaçan ve bu nedenle farklılaşamayan monoklonal öncül hücrelerin kemik iliğinde, kanda ve diğer dokularda çoğaldığı malign bir hastalıktır.

Akut lösemiler kontrolsüz çoğalan hücrelerin kökenine göre öncelikle lenfoid (ALL) ve myeloid (AML) olarak iki ana gruba ayrılmaktadırlar. Ancak; immünohistokimya, akış sitometrisi veya moleküler genetik yöntemleri kullanılarak immünojenetik ve genetik özelliklerine göre veya sitokimyasal boyamalar yoluyla morfolojik özelliklerine göre de birçok alt sınıfa ayrılmaktadırlar.

Akut lösemilerin erişkinlerdeki sıklığı 2-4/ 100.000 civarında olup ilerleyen yaşla birlikte görülme sıklığında artış olmakta ve 65 yaş üzerindeki nüfusta sıklık 13/100.000'e ulaşmaktadır. Erişkinlerde akut lösemilerin %70-80'i AML, %15-20'si ise ALL'dir.

2.6.2 Kronik Lösemiler

Kronik lösemilerin de köken aldıkları hücre tipine göre myeloid veya lenfoid olmak üzere iki tipi bulunmaktadır. Lenfoid seriden kaynaklanan kronik lösemiler, lösemiye neden olan hücre klonunun ait olduğu hücre dizisine (B veya T lenfosit), olgunlaşma düzeyine, morfolojik ve diğer özelliklerine göre farklı alt gruplarda incelenir.

Kronik lenfoid lösemi (KLL) yaşam süresi uzun, fonksiyonel olarak yetersiz lenfositlerin kan, kemik iliği, lenf düğümleri, dalak ve diğer lenfatik organ ve dokularda birikiminden oluşan bir hastalıktır. KLL hücreleri klonal olarak çoğalan olgun görünümlü küçük lenfositlerdir ve olguların % 95'inden fazlası B lenfosit karakterleri taşırlar. Hastalık genel olarak yavaş seyirli olmakla birlikte klinik olarak homojen bir davranış modeli sergilemezler. KLL batı ülkelerinde en sık görülen lösemi tipidir ve tüm lösemiler içindeki oranı % 20-30 civarındadır.

Kronik myeloid lösemi (KML), granüositlerin aşırı yapımı ile ortaya çıkan, lökositöz ve splenomegali ile seyreden, kronik, klonal bir hematopoetik kök hücre hastalığıdır. Olguların %95 ve daha fazlasında, hastalık patogenezinde önemli rolü açıklanmış olan Philadelphia kromozom anomalisi saptanır. Kanda artan granüositik serinin özellikle nötrofil grubundan olmakla birlikte eozinofil ve bazofillerde de sayısal artışlar söz konusu olabilir. Toplumdaki görülme sıklığı 1-2/100.000. Tanı anındaki ortalama yaş 45-50 dir (39-40).

Alt tipleri de göz önüne alınacak olursa onlarca farklı lösemi tipi bulunmaktadır. Buna bağlı olarak da neredeyse her bir lösemi tipinin oluşumunda etkin olan farklı moleküler yolların varlığı gösterilmiştir. Lösemi gelişiminde etkin olduğu saptanan tüm gen ürünleri, temel olarak hücre döngüsü, farklılaşma ve apoptoz mekanizmalarında görev almaktadırlar. Yani hematolojik kanserlerin gelişimi de genel kanser oluşum mekanizmalarına benzemektedir. Proto-onkogenlerin aşırı aktivasyonu yanı sıra tümör baskılayıcı genlerin işlevsizliği ve apoptoz mekanizmalarının çalışmaması nedeniyle hasarlı hücrelerin ölmeyerek çoğalması, lökomogenezde etken olmaktadır. Tüm bu işlev bozuklukları ise DNA düzeyindeki mutasyonlar, kromozomal translokasyonlar veya epigenetik değişiklikler sonucu gen ifadelerindeki sapmalar nedeniyle oluşmaktadır (41).

Kromozomal translokasyonlar; bir transkripsiyon faktörü ya da tirozin kinaz yapısındaki reseptörü kodlayan bir genin başka bir genomik dizi ile füzyon yapmasına veya transkripsiyon kontrolünde rol oynayan genlerin, güçlü promotör ya da düzenleyici bölgelerinin yanına taşınmasına yol açmaktadırlar. Bunun sonucu olarak oluşan yeni genin ürünü, onkogenik özellikler gösteren bir kimerik protein

olarak işlev görmekte ve malign transformasyonu tetiklemektedir. Tablo2.2.'de hematolojik kanserler arasından seçilmiş ve çalışmamızda incelediğimiz AML, KML ve KLL'de görülen bazı kromozomal anomaliler ile etkiledikleri genler listelenmiştir (39).

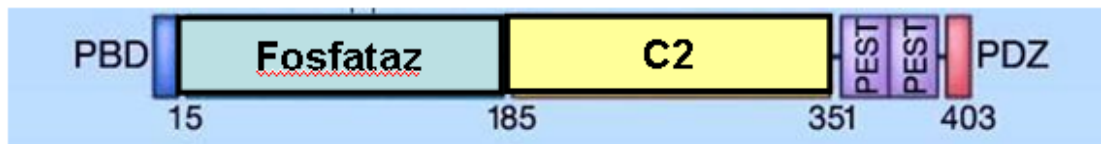
Tablo 2.2. AML, KML ve KLL'de Görülen Kromozomal Anomaliler ve Etkiledikleri Genler.
(t: translokasyon, inv: inversiyon, q: kromozomun uzun kolu, p: kromozomun kısa kolu.
İlk parantez içerisinde etkilenen kromozom numaraları, ikinci parantez içinde ise anomali lokalizasyonları belirtilmiştir.)

Hastalık	Kromozomal anomali	Aktive edilen gen
AML	t(8;21)(q22; q22)	<i>AML1-ETO</i>
	inv(16)(p13;q22) / t(16;16)(p13;q22)	<i>MVH11-CBFβ</i>
	t(15;17)(q22;q21)	<i>PML-RARα</i>
	t(11;17)(q23;q21)	<i>PLZF-RARα</i>
	t(5;17)(q32;q21)	<i>NPM-RARα</i>
	t(16;21)(p11;q22)	<i>FUS-ERG</i>
KML	t(12;22)(p13;q11)	<i>TEL(ETV6)-MNI</i>
B- KLL	t(9;22)	<i>BCR-ABL</i>
	t(14;19)(q32;q13)	<i>BCL3</i>

Her ne kadar Tablo 2.2'de belirtilmiş olan gen ürünleri hücre çoğalmasını indükleyen onkogenik proteinler olsalar da, tümör baskılayıcıların işlevsizliği de hematolojik kanser oluşumunda sık görülen bir durumdur. Bir tümör baskılayıcı gen olan *PTEN* (Phosphatase and Tensin Homolog) ürününün birçok kanser türünde olduğu gibi hematolojik kanserlerde de işlevini yitirmiş olduğu bilinmektedir. Özellikle "lösemik kök hücre"lerin proliferasyonu ve sağ-kalımında görev alan PI3K (Fosfatidil İnozitol 3 Kinaz) yolağının baskılayıcısı olan PTEN proteini, HKH'lerin kendini yenileme özelliklerinin korunmasında görev almaktadır. Dolayısıyla, PTEN işlevsiz kılındığında HKH'ler kaybolmakta ve lösemi kök hücrelerinin kendini yenileme potansiyeli artarak lökomogenezde de artış gözlenmektedir (42).

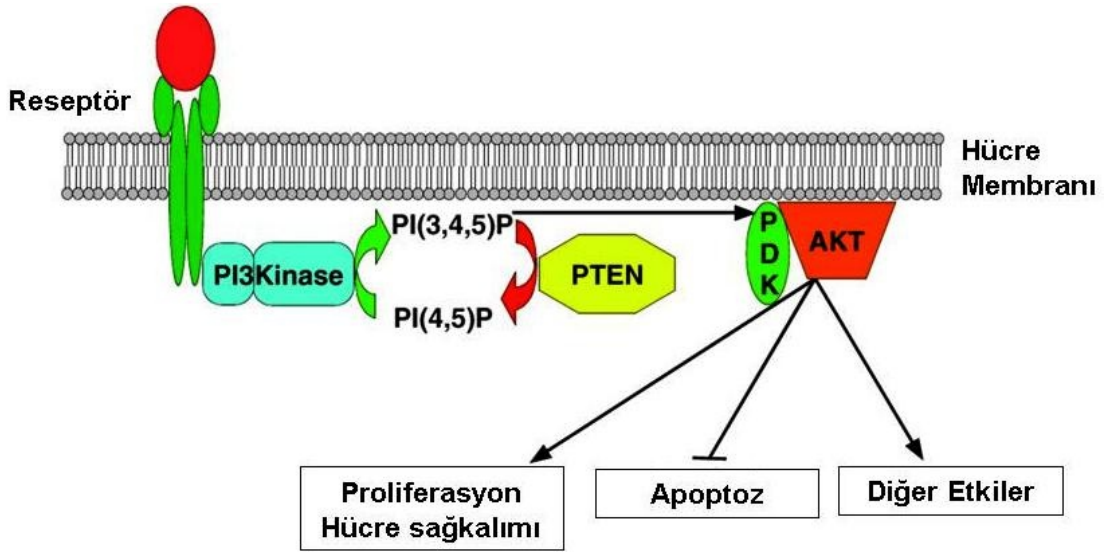
2.7. PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog)

PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog), geni 10. kromozomun 10q23.3 bölgesinde yerleşmiş olan bir gendir. İnsanda 403 amino asitlik PTEN proteinini kodlar. Proteinin fosfataz ve C2 olmak üzere iki fonksiyonel bölümü bulunmaktadır (Şekil 2.9.).



Şekil 2.9. PTEN Proteininin Yapısı.

PTEN ilk çalışmalarda; serin, treonin, ve tirozin amino asitlerinde fosfataz aktivitesi gösteren, öz-fosfataz etkinliği olan bir protein fosfataz olarak tanımlanmıştır (43-44). Kısa bir süre sonra PTEN'in membran lipidlerinden PIP3'ü (Fosfotidilinozitol 3,4,5 trifosfat) PIP2'ye (Fosfotidilinozitol 4,5 bifosfat) dönüştürerek başta PKB/AKT olmak üzere PIP3 bağımlı proto-onkogenik kinazların aktivitelerini baskılayan bir fosfataz olarak fonksiyon gösterdiği tanımlanmıştır (45) (46) (Şekil 2.10). Tüm normal dokularda yapısal olarak bulunan *PTEN* gen ifadesi; transkripsiyon, transkripsiyon sonrası evre, protein-protein etkileşimi ve translyasyon sonrası evrelerde düzenlenmektedir. Ayrıca, PTEN proteininin hücre içi yerleşiminin değiştirilmesi de etkinliğinin kontrolünde önemli rol oynamaktadır (47).



Şekil 2.10. PTEN Tümör Baskılayıcısı, PI3K/AKT Yolağının Negatif Düzenleyicisidir. Uygun ligant- reseptör bağlantısından sonra PI3K aktifleşir, PIP2'yi fosforlayarak PIP3 oluşumunu sağlar. Oluşan PIP3 AKT yolağının en önemli kinazı olan PDK1'yi aktifleştirir. Aktifleşen PDK1 AKT'ı fosforlar ve aktifleştirir. AKT, proliferasyon ve sağkalımı indüklerken, apoptozu baskılamakta, böylece hücreleri çoğalmaya yönlendirmektedir. (Şekil: Planchon, SM ve ark. J Cell Sci. 2008 Feb 1;121 (Pt 3):249-53)

Birçok kanser türünde PI3K/ AKT yolağı aşırı düzeyde aktif halde bulunmaktadır. PIP3 tarafından etkinleştirilen AKT, hücre içerisinde birçok hedefi olan ve hücreleri proliferasyona yönlendiren bir kinazdır. Hücre döngüsüne olan etkisi Chk1 proteini yoluyla ve hücre döngüsü kontrol noktasında görevli olan Chk1'in sitoplazmadan hücre çekirdeğine geçerek döngüyü ilerletmesini sağlamaktadır. AKT, hücre döngüsü dışında, özellikle hücre metabolizmasında görevli proteinlerin etkinliğini de düzenlemekte ve apoptozu baskılayabilmesi nedeniyle hücre sağ-kalımını arttırmaktadır. Bu nedenle de tüm kanserleşmiş hücrelerde aktif durumdadır; hücrelerin ölmeden, kontrolsüzce çoğalmalarını ve hızlı büyüme/bölünmeye olanak sağlayacak hızlı metabolizmanın oluşturulmasını sağlar. PTEN, yolağın başında PIP3'ün PIP2'ye dönüşmesini sağlayarak AKT kinazın da etkisini baskılar. Hücre döngüsüne olan baskılayıcı etkisi ise yine Chk1 yoluyla olmaktadır. PTEN'in işlevsiz olduğu durumlarda çok miktarda DNA çift iplik hasarı ve genomik düzensizlik gözlenmiştir (48). PTEN geni susturulmuş hayvanların

hücrelerinde ise spontan DNA çift iplik hasarlarının oluştuğu ve bu durumun kanser gelişimi ile ilişkili olduğu bulunmuştur. PTEN fonksiyon kaybı özellikle sentromer hasarına ve kromozomal translokasyonlara yol açmaktadır (49). Hematopoez açısından bakılacak olursa, PTEN geninin susturulmasının HKH'lerin kaybolmasına neden olduğu ve bu hayvanlarda ileri dönemlerde akut myeloblastik ve lenfoblastik lösemilerin (AML ve ALL) geliştiği gözlenmiştir (50). Dolayısıyla, PTEN işlevsizliğinin hematopoetik kök hücrelerde henüz hücre soyları farklılaşması başlamadan etkin olduğu ortaya çıkmaktadır. PI3K aktivasyonunun özellikle "lösemik kök hücre"lerde artmış olduğu hatırlanırsa, bu yolağın negatif düzenleyicisi olan PTEN'in de bir lösemi engelleyicisi olduğu anlaşılmaktadır.

HİPOTEZ

Tbx3 ve MITF transkripsiyon faktörleri embriyolojik gelişimde görev alırlar ve hücre döngüsünü etkileyerek hücreleri çoğalmaya yönlendirmeleri nedeniyle kanser oluşumunda da rol oynamaktadırlar. Tüm kanserlerde aktif olduğu bilinen PI3K yolağının baskılayıcısı olan PTEN proteini ise hücre bölünmesini dolaylı olarak baskılamakta ve birçok kanser türünde fonksiyonunu yitirmiş olarak bulunmaktadır. Hematolojik kanserlerde de PTEN'in işlevsiz olduğu ve PTEN geni susturulmuş hayvanlarda AML ve ALL geliştiği bilinmektedir.

Grubumuzun yaptığı öncül çalışmalarda; az sayıdaki bir grup hematolojik kanserli hastaların kan ve kemik iliği örneklerinden elde edilen mononükleer hücrelerde, sağlıklı kişilerin hücrelerine göre Tbx3 mRNA düzeylerinin artmış olduğu saptanmıştır. Hematolojik kanserlerde PTEN ile ilgili bilinenler dikkate alınarak PTEN geni promotör bölgesi incelendiğinde ise bu genin düzenleyici bölgelerinde Tbx3 ve MITF transkripsiyon faktörleri için olası bağlanma dizinlerinin varlığı saptanmıştır.

Bu bilgiler ışığında bu tez çalışmasında; Tbx3 ve MITF proteinlerinin PTEN geni ifadesine etkilerinin olup olmadığının incelenmesi ve PTEN geni ifadesinin Tbx3 ve MITF tarafından düzenlenmesi halinde hematolojik kanserlerde PTEN mRNA ve protein düzeylerinde ne gibi değişikliklerin olabileceğinin araştırılması planlanmıştır. Bunların yanı sıra, Tbx3 proteininin kök hücrelerde pluripotensi kapasitesine olan etkileri göz önüne alınarak, lösemik kök hücrelerde Tbx3 ve PTEN protein düzeylerinin saptanması amaçlanmıştır. Bu amaçlara göre aşağıda belirtilen hipotez oluşturulmuştur.

"Hematolojik kanserlerde *TBX3* ve *MITF* genlerinin ifadeleri hem mRNA hem de protein düzeyinde artarken, PTEN geni ifadesi azalır. Bu azalışın nedeni; Tbx3 ve MITF transkripsiyon faktörlerinin PTEN geni promotör bölgesine bağlanarak PTEN mRNA yapımını baskılamaları, dolayısıyla PTEN protein sentezini azaltmalarıdır. Tbx3 proteini kök hücrelerin pluripotensi kapasitesini de etkilediği için lösemik kök hücrelerde de Tbx3 proteini artarken PTEN protein düzeyi azalmıştır."

MATERYAL ve METHOD

3.1. Örneklerinin Toplanması

Çalışmaya, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları A.D. Hematoloji Polikliniği ile Özel Andeva Hastanesi Hematoloji Kliniğine başvuran, akut ve kronik lösemi ön tanısı alan ve çalışmaya katılmayı kabul eden 40 hasta dâhil edilmiştir. Kontrol grubunu ise; herhangi bir sağlık sorunu bulunmayan yaş ve cinsiyet uyumlu gönüllü 20 birey ile farklı sebeplerden dolayı kemik iliği aspirasyonu yapılmış fakat herhangi bir hematolojik maligniteye rastlanmamış ve normal kemik iliği hücresel dağılım ve morfolojisi gösteren 10 birey oluşturmuştur. Helsinki Bildirgesi Kuralları gereği bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'na sunulmuş ve gerekli izinler alınmıştır (Karar no: 09.04.2012/53). Çalışmaya katılmayı kabul eden bireylere “aydınlatılmış onam form”u klinisyen hekim tarafından okunmuş ve bireylerin çalışmaya katılmayı kabul ettiklerine dair imzaları alınmıştır. Toplam 40 hasta ve kontrol grubunu oluşturan 10 bireyden tanı amaçlı alınmış olan kemik iliği ile sağlıklı gönüllülerden alınan venöz kan örneklerinden 3 ml’lik bir kısmı laboratuvarımıza ulaştırılmıştır. Kemik iliği ve kan örneklerinden mononükleer hücreler ayrıştırılarak RNA izolasyonu ve akış sitometrisi analizleri için kullanılmıştır.

3.2. Mononükleer Hücre İzolasyonu

EDTA’lı tüpe alınmış olan 3 ml kemik iliği aspirasyon materyali veya venöz kan, eşit miktarda steril PBS ile sulandırılmış ve 3 ml histopaque 1077 (Sigma-087K6200) üzerine yavaşça eklenmiştir. Daha sonra örnekler 1100 rpm’de 30 dakika santrifüj edilmiş ve dansite gradiyentiyle mononükleer hücreler ayrıştırılmıştır. Temiz bir tüpe alınan mononükleer hücreler 2 kez PBS ile yıkanmıştır. Elde edilen hücrelerin yarısı RNA stabilitesini korumak için RNAlater (QIAGEN GmbH, USA, 76106) solüsyonunda sulandırılarak kullanım anına kadar -20°C ’de saklanmıştır. Geri kalan hücrelerde ise bekletilmeden immün fenotipleme uygulanmıştır.

3.3. RNA Analizi

Örnekler, Qiashredder (Qiagen GmbH, Kat. No: 79654) kullanılarak homojenize edilmiş ve RNeasy Mini Kit (Qiagen GmbH, Kat No: 74124) yardımıyla dokulardan total RNA izole edilmiş ve RNA miktarı spektrofotometrik yöntemle saptanmıştır. Daha sonra 1µg RNA, Transcriptor High Fidelity cDNA kiti (Roche GmbH, Kat No: 508195500) kullanılarak ters transkripsiyon (reverse transcription) ile cDNA’ya dönüştürülmüştür. Gerçek zamanlı niceliksel PZR için LightCycler 1.5 (ROCHE) kullanılmıştır. Tbx3 (GenBank no:NM_005996.3), PTEN (GenBank No: NM_000314.4), MITF (GenBank No: NM_198177.1) ve insan β -aktin (GenBank No: (NM_001101.3) primerleri, Universal ProbeLibrary (UPL)Assay Design Center

(www.roche-applied-science.com) kullanılarak tasarlanmıştır. İnsan β -aktin geni, PZR sırasında örnekler arasındaki değişiklikleri standardize etmek amacıyla iç kontrol olarak kullanılmıştır. Tbx3, PTEN, MITF ve insan β -aktin mRNA'larının ölçümü hidroliz (TaqMan) problemleri ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla; UPL'den alınan Prob 47 (Roche GmbH, Kat no: 04688074001), Prob 48 (Roche GmbH, Kat no: 04688082001), Prob 57 Roche GmbH, Kat no:04688546001) ve Prob 64 (Roche GmbH, Kat no: 04688635001) kullanılmıştır. Her bir cDNA, TaqMan Master Mix kullanılarak (Roche GmbH, Kat No: 04735536001) PZR ile çoğaltılmıştır (Tablo 3.1).

Gerçek Zamanlı Niceliksel PZR için Kullanılan Primer Setleri, tasarlandıkları GenBank dizin numaraları, dizin üzerinde yerleşikleri baz çiftleri ve elde edilen PZR boyu uzunlukları aşağıda belirtilmiştir:

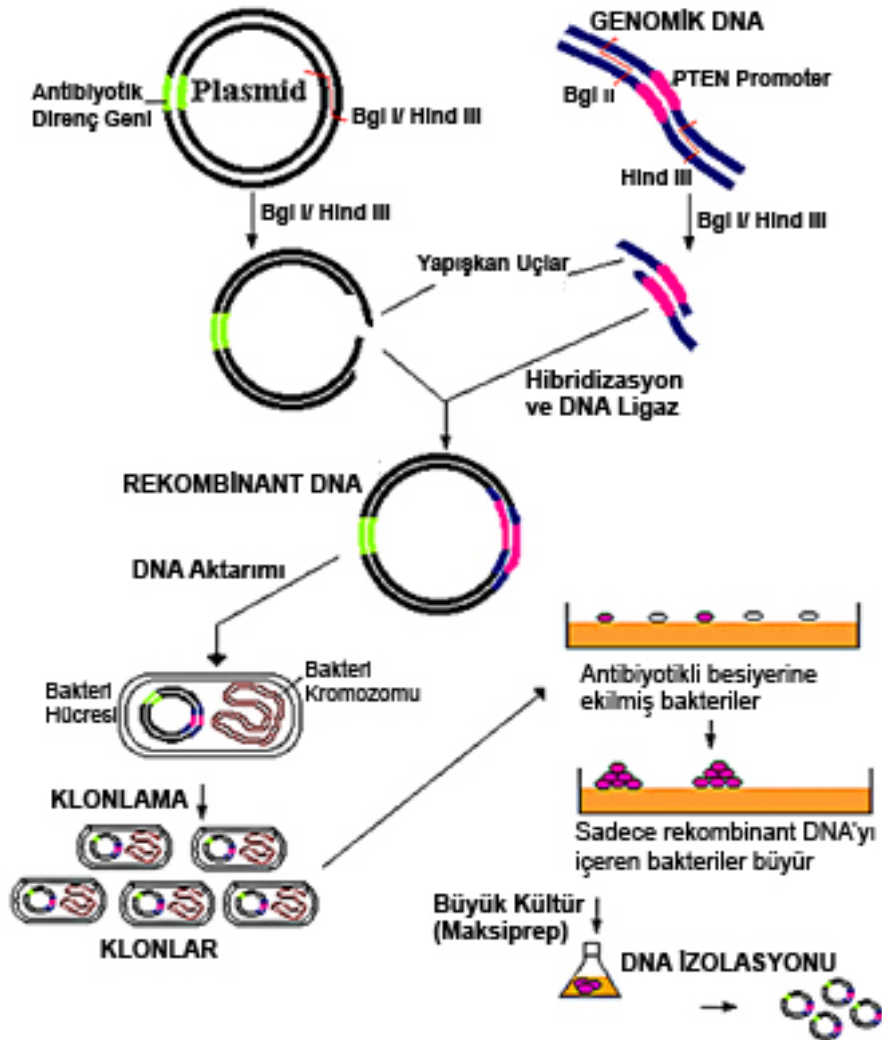
NM_198177.1	MITF	Yerleşim
Sol Primer: 5'CAT GCC ATG CTC CTT TGAA		27-45
Sağ Primer: 5'GGA GCT TAT CGG AGG CTT G		102-84
PZR boyu:76 bç		
NM_005996.3	Tbx3	
Sol Primer: 5'AAA AAT AGA CAA CAA CCC TTT TGC		1780-1803
Sağ Primer: 5'ACT GCA GGG TGA GCT GTT TT		1865-1846
PCR:86 bç		
NM_000314.4	PTEN	
Sol Primer: 5'GGG GAA GTA AGG ACC AGA GAC		1497-1517
Sağ Primer: 5'TCC AGA TGA TTC TTT AAC AGG TAGC)		1591-1567
PCR:95 bç		
NM_001101.3	İnsan beta-aktin	
Sol Primer: 5'CCA ACC GCG AGA AGA TGA		425-442
Sağ Primer: 5'CCA GAG GCG TAC AGG GATAG		521-502
PCR:97 bç		

Tablo 3.1. Taqman Problemleri İle Eş Zamanlı Niceliksel PZR Koşulları.

Program	Sıcaklık	Süre	Döngü	Ölçüm Modu	Analiz Modu
PZR Başlangıç Aktivasyonu	95°C	10 dk	1	Yok	Yok
PZR Döngüsü	95°C	10sn	45	Yok	Kuantifikasyon
	55°C	30sn		Yok	
	72°C	1sn		Tek	
Soğuma	40°C	30sn	1	Yok	Yok

3.4. Rekombinant Plasmidlerin Hazırlanması ve Klonlama

Klonlama işleminin nasıl gerçekleştirildiği Şekil 3.1.'de gösterilmiştir. Sağlıklı kişilerin venöz kanından elde edilen mononükleer hücrelerden genomik DNA izledikten sonra tarafımızca tasarlanan primerler kullanılarak PTEN geni promoter bölgesi genomik DNA'dan PZR ile elde edilmiştir. Daha sonra PZR ürünleri özel enzimlerle kesilmiş bir plasmide DNA ligaz yardımıyla yapıştırılmış, oluşan rekombinant DNA molekülleri bir *E.Coli* bakteri suşuna aktarılmış ve bakteriler antibiyotik içeren bir besi yerine ekilerek büyümeye bırakılmıştır. Bu besi yerinde, rekombinant plasmidte bulunan antibiyotik direnç geni nedeniyle sadece plasmidi taşıyan bakteri kolonileri büyüebilmektedir. Bu şekilde seçilen koloniler daha büyük kültür ortamlarında büyütülerek daha fazla rekombinant DNA üretilmiştir.



Şekil 3.1. Bir plasmide DNA Klonlanması. Genomik DNA'dan PZR ile elde edilen PTEN promoter bölgeleri pGL3 adlı plasmide konularak rekombinant DNA ürünleri çoğaltılmıştır.

3.4.1. Rekombinant çalışmalarda kullanılan bakteri suşları ve kültür koşulları

Genel olarak rekombinant plasmidlerin klonlanması amacıyla bir E.Coli suşu olan MC1061 {*hsdR,mcrB,araD139 D(araABC -leu)7679D lacZ74, galU, galK, rpsL thl*} kullanılmıştır. Gliserol içinde -70°C de saklanan bakteri suşlarından küçük bir miktar alınıp sıvı besi yerine ekilerek çoğaltılmıştır. Bakteri suşlarının büyütülmesi için LB sıvı besi yeri (1 litre için:10g Baktotripton, 5g maya ekstratı, 10g NaCl) kullanılmıştır. Katı besiyeri hazırlanırken ise LB'nin içerisine %1,5 oranında bakto-agar eklenmiş, otoklav ile sterilize edildikten sonra ise petri kutularına dökülerek katı besi yeri plakları hazırlanmıştır. Gerek sıvı gerek katı besi yerlerinde seleksiyon amacıyla 50µg/ml oranında ampisilin kullanılmıştır.

Bakterilerin transformasyona hazır hale getirilmeleri amacıyla; gliserol içinde -70°C de saklanan bakterilerden steril koşullarda küçük bir miktar sürüntü alınarak 10 ml sıvı LB besi yerine ekilmiş ve 37°C'de çalkalayarak gece boyunca büyütülmüşlerdir (başlangıç kültürü). Ertesi gün, başlangıç kültürü kullanılarak spektrofotometri ile ölçülen OD₆₀₀ deki absorbansı 0,2-0,3 olacak şekilde 50 ml sıvı besi yerine ekim yapılmış ve yine çalkalayarak 37°C'de OD₆₀₀ deki absorbansı 0,6 oluncaya dek büyütülmüştür. Daha sonra bakteriler, 4°C'de 3000 rpm hızla 10 dakika santrifüjlenerek çöktürülmüş ve 50ml hacim içerisinde 100mM CaCl₂ solüsyonunda, buz üzerinde 1 saat bekletilmişlerdir. Daha sonra yine aynı şekilde santrifüjlenerek çöktürülen bakteriler, 1ml soğutulmuş 100mM'lık CaCl₂ solüsyonu ile sulandırılarak kullanım anına kadar buz üzerinde bekletilmişlerdir.

3.4.2. Genomik DNA izolasyonu

Genomik DNA, sağlıklı gönüllülerinin venöz kanından MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I 03 003 990 001 kiti kullanılarak tam otomatik MagNA Pure LC cihazı ile elde edilmiştir. Üretici firmanın kullanım kılavuzuna uygun olarak; öncelikle eritrositler parçalanarak ortamdan uzaklaştırılmış, geriye kalan mononükleer hücrelerden ise protein ve RNA uzaklaştırılarak DNA ayrıştırılmıştır. Kurutulan ve toz halindeki DNA, 50µl miktarında 1x TE (10mM Tris.HCl, 1mM EDTA, pH:8.0) ile sulandırılmış ve solüsyondaki DNA'nın 260 nm dalga boyundaki absorbansı spektrofotometri ile ölçülmüştür. Solüsyondaki DNA miktarı aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Konsantrasyon (mg/ml)} = \frac{A_{260} \times E \times \text{sulandırma katsayısı}}{1000}$$

E= 260 nm'deki sabit absorpsiyon değeri:

Çift zincirli DNA için	E= 50 mgml ⁻¹ cm ⁻¹
RNA ve tek zincir DNA için	E= 40 mgml ⁻¹ cm ⁻¹
Tek zincirli oligonükleotidler için	E= 20 mgml ⁻¹ cm ⁻¹

Solüsyondaki DNA ve RNA'ların saflık derecesi A260/A280 oranı ile saptanmıştır. DNA için 1.8:1 ve RNA için 2:1 oranlarından daha düşük olan oranlar protein kontaminasyonu olabileceğinden, böyle örneklerin saflaştırılması tekrarlanmıştır.

3.4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

T.aquaticus'tan elde edilen ısıya dayanıklı DNA polimerazlar(FINNZYMES F-552L) kullanılarak bir çift oligonükleotid primer arasında kalan DNA bölgesinin termal cihazlarda periyodik döngüler ile çoğaltılması işlemine polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) denilmektedir. Bu çalışmada uygulanan PZR'ları genel olarak şu maddeleri içermektedir: Her bir primerden 10'ar pmol, 10-100ng genomik DNA, her biri 200 mM olacak şekilde dNTP, 1x tampon solüsyon, 2,5U Taq polimeraz ve reaksiyon hacmini 20 veya 50µl'ye tamamlayacak kadar ddH₂O. Reaksiyon tüpleri ısı döngü cihazına (Techne TC-312) yerleştirildikten sonra; 5 dk 95°C de denaturasyon yapılmış, daha sonra 95°C de 30 sn, 54°C-60°C de 45 sn ve 72°C de 45 sn olacak şekilde 35 döngü uygulanarak hedef DNA bölgeleri çoğaltılmışlardır. Ürünlerin kalitesi ve uzunlukları jel elektroforezi ile incelenmiş ve DNA'lar jelde iken etidyum bromür ile boyanarak görünür hale getirilmişler ve jel görüntüleme cihazında (Biometra BioDocAnalyze) analiz edilmişlerdir.

3.4.4. PTEN promoterini taşıyan rekombinant plasmidlerin hazırlanması

Tam-boy PTEN promoter bölgesinin (GenBank No: AF067844.1) -1895 ile +400.baz çiftleri arasında kalan bölge (TB-PTEN) PZR kullanılarak genomik DNA'dan çoğaltılmıştır. Bu amaçla kullanılan sol ve sağ primerler aşağıda belirtilmiştir:

Sol Primer: 5'-agacagatctGTGGGG TGCGGGGTAGGAGT

Sağ Primer: 5'-agacaagcttGACGAAGAGGAGGCGAGA

PTEN promoterinin -1477 ile -710. pozisyonları arasında kalan (CP-PTEN) ve "Esas (core) Promoter" bölgesini içeren kısım ise yine genomik DNA kullanılarak PZR ile izole edilmiştir. Bu amaçla kullanılan primer dizinleri aşağıdadır:

Sol Primer: 5'- agacagatctGGCTTGCTCTTAGGGTAG

Sağ Primer: 5'-gcgtaagcttCGTGAACACATAGCCGT

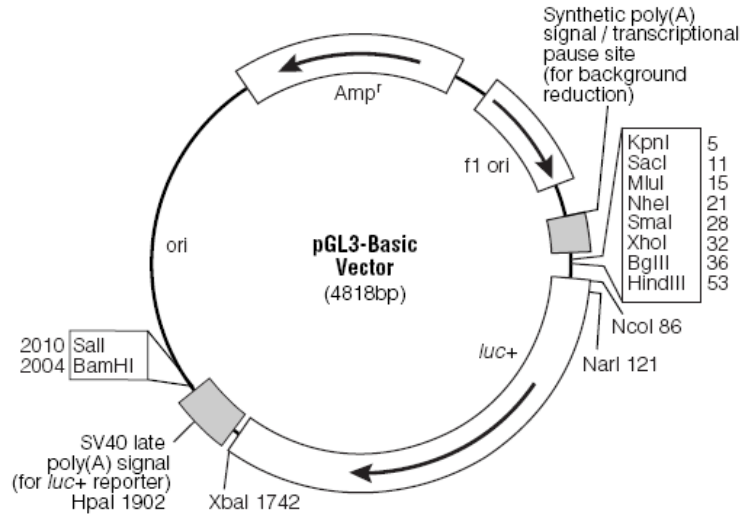
Olası Tbx3 bağlanma bölgesi delesyona uğratılmış olan ve PTEN promoterinin -1345 ile -710. pozisyonları arasında kalan bölge de genomik DNA'dan PZR ile izole edilmiş ve Del.Mut.CP-PTEN olarak adlandırılmıştır. Bu amaçla kullanılan primer dizinleri aşağıdadır:

Sol Primer: 5'- agacagatctCCAGTTCCCAAGCGCCAG

Sağ Primer: 5'-gcgtaagcttCGTGAACACATAGCCGT

Her üç primer setinde de küçük harflerle belirtilen nükleotidler klonlamanın yapılabilmesi için yerleştirilmiştir. Kalın, küçük ve altı çizili nükleotidler sırasıyla *Bgl II* (agatct) ve *Hind III*(aagctt) restriksiyon enzimi tanıma bölgeleridir. TB-PTEN, CP-PTEN ve Del.Mut.CP-PTEN genomik DNA'dan PZR ile izole edildikten sonra en az 4 saat süreyle 37°C'de 3'er ünite *Bgl II* (Fermentas-4411) ve *Hind III* (Fermentas-2831) enzimleri kullanılarak kesilmişlerdir.

Bu çalışmada klonlama amacıyla kullanılan plasmidin adı pGL3.1'dir (Şekil 3.2.). pGL3.1 plasmidi de PZR ürünleri ile paralel olarak aynı enzimler ile kesilmiş ve lineer hale getirilmiştir. Daha sonra her bir PTEN promoter PZR ürünü (20'şer ng) ve lineer plasmid (60 ng); 2 U T4 ligaz(Fermentas-36273), 10 nM ATP ve 1x tampon solüsyon içeren 15µl'lik reaksiyonlar halinde 22°C'de 2 saat bekletilmişler ve transformasyona hazırlanmış MC1061 bakteri suşuna (bkz. 3.4.1) aktarılmışlardır.



Şekil 3.2. pGL3 Plasmid Haritası.

3.4.5. Ligasyon Ürünlerinin Bakterilere Aktarılması.

pGL3.1 ile DNA ligaz yardımıyla birleştirilmiş olan PTEN promoter PZR ürünlerinin bulunduğu ligasyon reaksiyonundan 7,5µl alınarak transformasyona hazır hale getirilmiş 100µl bakteri suşuna eklenmiştir. Reaksiyon tüpleri buz üstünde 30dk bekletilmiş ve daha sonra 90 sn süreyle 42°C'de ısı şoku uygulanmıştır. Isı şoku sonrası 800µl LB sıvı besi yeri eklenmiş ve 37°C'de çalkayarak 1 saat bekletilmişlerdir. İnkübasyon sonunda tüpler 30 sn süreyle 10,000 rpm'de santrifuj edilerek çöktürülmüş ve üzerlerine 100µl sıvı LB besiyeri eklenerek 50µg/ml ampisilin içeren katı LB selektif besi yerine yayılmış, kurutulmuş ve petriyeler 37°C de 14 saat bekletilerek rekombinant kolonilerin büyütülmesi sağlanmıştır.

3.4.6. Rekombinant Bakteri Kolonilerin Seçimi

Büyüyen bakteri kolonilerinden plasmid DNA'sının izolasyonu, hücrelerin NaOH/SDS ile parçalanmaları ve hücresel atıkların potasyum asetat ile çöktürülmesi esasına dayanan "alkalen-lizis" yoluyla gerçekleştirilmiştir. Katı besi yerinden 10-20 arası koloni tek tek toplanmış ve her biri 5ml hacimli antibiyotikli sıvı LB besi yerine alınmışlardır. Bakteri klonları bütün gece çalkalanarak 37°C'de büyütülmüşler ve ertesi gün 90sn süreyle 14,000 rpm hızında santrifüjlenerek çöktürülmüşlerdir. Daha sonra bakteri peleti 100µl solüsyon I (50mM glukoz, 25mM Tris Cl pH 8.0, 10mM EDTA), 200µl solüsyon II (200 mM NaOH, % 1 SDS) ve 150µl solüsyon III (3 M Potasyum Asetat, % 11,5 Glasiyal Asetik Asit) eklenerek vorteks ile karıştırılmıştır. Takiben, 500µl fenol:kloroform karışımı eklenerek tekrar karıştırılmış ve 5 dakika süreyle 14,000 rpm hızla santrifüjlenerek fazlar ayrılmıştır. Üstteki faz temiz bir tüpe alınarak 1ml soğuk etanol eklenmiş ve 14,000 rpm'de 30 dakika süreyle santrifüjlenerek DNA çöktürülmüştür. DNA peleti %70'lik etanol ile yıkanarak tuzdan arındırılmış ve pellet kurutulduktan sonra 20µl 1xTE içerisinde sulandırılmıştır. Bu solüsyondan 5µl alınarak *Bgl II* ve *Hind III* enzimleri ile kesilmiş ve ürünler jel elektroforezinde ayrıştırılarak görüntülenmişlerdir. Böylece PTEN promoter PZR ürünlerini içeren koloniler seçilerek daha büyük kültür ortamlarına alınmış ve fazla miktarda DNA üretimi yapılmıştır.

Bu çalışmada kullanılan Tbx3 ekspresyon plasmidi Dr. Bileda Bilican (SMCM, Edinburgh, UK), MITF ve USF ekspresyon plasmidleri ise Dr. Colin Goding (Ludwig Institute, Oxford, UK) tarafından sağlanmıştır.

3.5. Ökaryot Hücre Kültürü

HeLa (insan serviks kanseri) ve HEK (insan embriyonik böbrek) hücreleri 37°C de 5% CO₂ 'li ortamda, %10 fetal dana serumu ve %1 penisilin/streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besi yerinde, kültür kabının %70'ini kaplayana dek büyütülmüşlerdir. Daha sonra besi yeri boşaltılmış ve ortama tripsin/EDTA eklenerek hücrelerin kültür kabından ayrılması sağlanmıştır. Tripsin solüsyonundaki hücrelerin üzerine 10ml besi yeri eklenmiş, 5 dk süreyle 3,000 rpm hızda santrifüjlenerek hücreler çöktürülmüş ve taze besi yeri konularak yeni kültür kaplarına ekilmişlerdir. Hücre kültüründe Nunc ve Greiner marka plastik malzemeler kullanılmıştır. Besi yeri(Gibco -1292554), serum(Gibco-41A0525K) ve antibiyotikler (Gibco-1219997) Gibco'dan alınmıştır.

3.6. Ökaryot Hücelere Rekombinant DNA Aktarımı (Transfeksiyon) ve Transkripsiyonel Aktivasyonunun Ölçümü.

Rekombinant plasmid DNA'larının hücelere aktarımından önce hücreler, 96-kuyucuklu hücre kültürü petrilere alınarak 14 saat boyunca yapışmaları için bekletilmişlerdir. Rekombinant DNA aktarımı amacıyla FuGene HD (Roche, Kat no: 04709691001) kullanılmış ve işlemler üretici firmanın kullanım kılavuzuna göre gerçekleştirilmiştir. Her bir kuyucuğa 0.5µg miktarında PTEN rekombinant plasmidleri konulurken (Şekil 4.5), 0,1 ila 1.0µg arasında değişen miktarlarda Tbx3,

USF ve MITF ekspresyon plasmidleri eklenmiştir. DNA aktarımından sonra hücreler 5% CO₂ 'li ortamda 48 saat tutulmuş ve daha sonra tripsin ile kültür kabından ayrıştırılarak One-Glo Luciferase Assay System (Promega, Kat no:E6110) ile hücre lizatları hazırlanmıştır. Lizatlar, Luminoskan Ascent (ThermoScientific) adlı luminometrede analiz edilmişlerdir.

3.7. Hücrelerden Total Protein İzolasyonu

Transfeksiyon sonrasında HEK ve HeLa hücrelerinde Tbx3 protein düzeyi, immunoblot yöntemi ile de saptanmıştır. 4x10⁶ hücreye 100µl 1xSDS (%2 SDS, 100 mM DTT, 60 mM Tris pH 6.8, %0.01 bromophenol blue) eklenerek 3 dakika vortekslenildikten sonra 95⁰C'de 10 dk kaynatılmış ve örnekler, 4⁰C'de 14,000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüj edilerek hücre membranları çöktürülmüştür. Total proteinleri içeren süpernatant kullanım anına kadar -20⁰C'de saklanmıştır.

3.8. SDS-Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SDS-PAGE) ve İmmünblot

Proteinlerin ayrıştırılması için %10'luk poliakrilamid jel kullanılmıştır. Moleküler ağırlık standardı (Invitrogen, US, LC5725) örneklerle birlikte kuyucuklara yüklenerek 10 mA akım ile 1,5 saat süreyle elektrofrez yapılmıştır. Elektrofrez sonrası, jelde moleküler ağırlığına göre ayrılmış olan proteinler, nitroselüloz 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'er dakika olmak üzere 4 kez TBS-T solüsyonu (%0,1 Tween 20, 10 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl) ile yıkanmıştır. Primer antikor (Abcam ab89220) olarak 5 µg/ml anti-Tbx3 kullanıldı ve antikor ile membran, 2 saat süreyle oda ısısında inkübe edildi. Primer antikor inkübasyonu sonrasında membranlar, yine 1 saat boyunca TBS-T ile devamlı çalkalanarak yıkanmıştır. İşaretlemek için, 1:1000 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 kemilüminesans oluşturulmuştur. Daha sonra membran, radyografik filme konularak görüntüleme gerçekleştirilmiştir.

3.9. PTEN, Tbx3 ve MITF Protein Düzeylerinin Akış Sitometri Yöntemi ile Saptanması:

İzole edilen mononükleer hücrelerde CD45 aralığı ile (gate) blast populasyonu belirlendikten sonra her üç protein de farklı işaretlenmiş olan anti-PTEN (PE), Anti-Tbx3 (DyLight 488) ve Anti-MITF (DyLight 550) antikorları ile işaretlenmiştir. Daha sonra tüm blast topluluğunda ortalama floresans yoğunluğu (MFI) değerlendirilmiştir. Aşağıdaki tabloda belirtildiği gibi, Tbx3 ifadesi AML lösemi kök hücrelerinde ayrıca incelendi.

Tablo 3.2. Lösemi Kök Hücresi İmmünofenotiplenmesinde Kullanılan Antikorlar

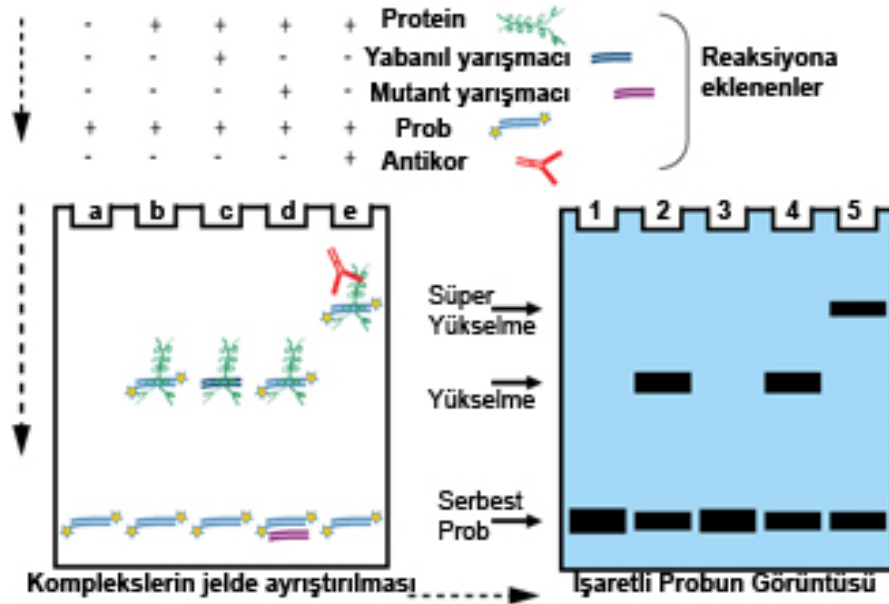
Örnek Tüpü	İzotipik kontrol
CD34 PE-Cy5	IgG1-DyLight488
CD38 PE-Cy7	IgG1- PE-Cy7
Anti-TBX3 + DyLight 488 goat anti-mouse	IgG1-APC
CD123 APC	IgG1-DyLight 550

Flow sitometrik analizler BD FACS CANTO II cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.10. DNA/Protein Etkileşiminin İncelenmesi (Electrophoretic Mobility Shift Assay- EMSA)

DNA negatif elektrik yüküne sahip olduğu için elektrik akımı uygulanabilen bir jelin içerisinde “+” yöne doğru yürütülebilmektedir. Bu özelliği nedeniyle de farklı uzunlukta veya kütleli ağırlıkta olan DNA zincirlerinin birbirlerinden ayrılması sağlanabilir. Bu esasa göre; dikey olarak yürütülen bir elektroforez sırasında, küçük DNA parçaları jelin alt kısmında yerleşirken, büyük olanlar jelin daha üst kısımlarına yerleşirler. EMSA tekniği de temel olarak bu prensibe dayanmaktadır. **Şekil 3.3**'de tipik bir EMSA deneyi gösterilmiştir. Sol taraftaki panel, deney sırasında olan olayları simgelemektedir, sağ taraftaki panel ise bu olayların jel görüntüsüne yansımaları göstermektedir. İncelenecek DNA parçası (en az 40 bp uzunluğunda ve incelenen protein için olası bağlanma bölgesini içeren) sentetik olarak hazırlanır ve uçları biyotin ile işaretlenir. Bu işaretleme sayesinde ortama substrat (streptavidin) konulduğunda DNA parçasının görünür hale gelmesi sağlanmış olur. **Şekil 3.3**'de görüldüğü gibi yıldız ile gösterilmiş işaretli DNA jele yüklenip elektroforez yapılırsa (a), jelin alt kısmına dek yürümektedir (sol panel 1.sıra). Ancak, işaretli DNA incelenen protein ile birleştirilerek jele yüklenirse ve şayet adı geçen protein bu DNA parçasına bağlanıyorsa, protein ve DNA birlikteliği daha büyük bir kütle yapacağından bu yapı jelin üst kısımlarında kalacak (b) ve DNA da işaretli olduğundan gözlenebilecektir (sol panel 2. sıra). Bu duruma “yükselme” denilmektedir. Bu DNA-protein bağlanmasının özgül olduğunun gösterilmesi ve bağlanma için gerekli baz çiftlerinin saptanması ise ortama konulan “yarışmacı DNA parçaları” ile sağlanır. Bu amaçla, yine sentetik olarak hazırlanmış ve işaretli DNA probunun benzeri olan bir DNA parçası kullanılır, ama işaretlenmez (yabanıl tip yarışmacı DNA, şekilde yıldızsız olarak betimlenmiştir). İşaretsiz yabanıl tip DNA ortama bolca konulduğunda protein bu DNA'ya da bağlanacak (c) ama DNA işaretsiz olduğundan jelde görülmeyecektir (sol panel 3. sıra). Sentetik olarak

hazırlanan ve olası bağlanma bölgesinde mutasyonlar yapılmış DNA parçaları da işaretli yarışmacı olarak kullanılabilir (mutant yarışmacı DNA). Şayet protein mutasyon taşıyan DNA'ya bağlanmıyor ise ortamdaki proteinin tümü işaretli proba bağlanacak (d) ve yine jelde görüntü elde edilecektir (sol panel 4. sıra). Mutant yarışmacı DNA'larda istenilen nükleotid mutasyona uğratılabilir ve böylece protein bağlanması için gereken tüm baz çiftleri de açığa çıkarılmış olur. Son olarak; şayet deneylerde saf protein kullanılmıyorsa, örneğin bizim deneylerimizde olduğu gibi total nükleer protein kullanılıyorsa, bağlanan proteinin de incelenen protein olduğunu göstermek için DNA-protein kompleksine proteine özgül antikor da eklenir (e). Protein ve antikor arasında bağlanma olursa kütle daha büyüyeceğinden dolayı bu kompleks jelde daha yüksek bir konuma yerleşir (sol panel 5.sıra). Böylece hem bir proteinin DNA'ya bağlandığı bölgedeki baz çiftleri ortaya konulmuş hem de bağlantının özgüllüğü ispatlanmış olur. Bu son duruma ise "süper yükselme" denilmektedir.



Şekil 3.3. EMSA tekniği: DNA-protein etkileşimlerini ve bağlantı için gerekli baz çifti gereksinimlerini inceleyen tekniğin şematik gösterimi.

3.10.1. Hücre Çekirdeğinden Total Protein Saflaştırılması (Nükleer Protein)

Tbx3 ifadesinin yeterince yüksek olabilmesi için HEK hücrelerine yukarıda anlatıldığı şekilde bir Tbx3 ekspresyon plasmidi aktarılmış ve hücreler 48 saat % 5 CO₂ 'li ortamda büyütüldükten sonra tripsin ile kültür kabından ayrıştırılmıştır. PBS ile yıkanan hücreler daha sonra 3,000 rpm hızda 10 dakika santrifüjlenerek çöktürülmüşlerdir. Çöken hücre hacminin 5 katı hacimde dilüsyon solüsyonu eklenmiş (10mM Tris.HCl pH:7,5, 10mM NaCl, 2mM MgCl₂, 0,5 % IGEPAL, proteaz inhibitör tablet) ve 10 dakika süreyle karıştırarak buz üzerinde beklenmiştir. Daha sonra 10,000 rpm'de santrifüjlenen örneklerden süpernatant atılmış ve pellet (nükleer yapıları içeren) 100µl ekstraksiyon solüsyonu (20mM Hepses pH:7,9,

420mM NaCl, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM EDTA, %25 gliserol ve 0,5mM DTT) ile sulandırılarak buz üzerinde 30 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 10,000 rpm'de 10 dakika süreyle santrifüjlenerek süpernatant alınmış ve küçük miktarlarda tüplere konularak kullanım anına kadar -70°C'de saklanmıştır.

3.10.2. EMSA için sentetik DNA'ların hazırlanması ve işaretlenmesi

Tbx3'ün proteininin PTEN promoter bölgesine bağlanıp bağlanmadığını belirlemek için aşağıdaki sentetik oligonükleotid dizileri tasarlanmıştır. Her bir çift birbirine komplementer olacak şekilde tasarlanan bu oligonükleotidlerde Tbx3'ün olası bağlanma bölgeleri kalın harflerle gösterilmiştir. Tasarlanan mutasyonlar ise Mut1 ve DM1'de küçük harflerle gösterilmiştir.

YT 1: 5'- TGG ATGT**GGGTGCTTGTGTA**ACCAGTTC**CCCAAGCGCCAG**-3'
YT 2: 5'- CTGGCGCTTGGGGAACTGGTTACACAAGCACCCACATCCA-3'

Mut 1: 5'- TGGATGT**GGGTGCTTGTcgAc**CCAGTTC**CCCAAGCGCCAG**-3'
Mut 2: 5'- CTGGCGCTTGGGGAACTGGG**TCGACAAGCACCCACATCCA**-3'

DM 1: 5' – TGGATGT**GtGt**CTT**GTcgAc**CCAGTTC**CCCAAGCGCCAG**
DM 2: 5'- CTGGCGCTTGGGGAACTGGG**TCGACAAGAACACACATCCA**

YT1 ve YT2 oligonükleotidlerinin 3'- uçları "Biotin 3' End Labeling Kit" (Thermo Scientific/Pierce, Ürün Kodu: 89818) kullanılarak kullanım kılavuzu doğrultusundaki uygulamalarla işaretlenmiştir. Daha sonra hem işaretli hem de işaretli olmayan YT1/YT2 ile işaretli olmayan Mut1/Mut2 ve DM1/DM2 oligonükleotidleri 95°C'de 2 dk, 65°C'de 10 dk, 37°C'de 10 dk ve son olarak da 24°C'de 10 dk tutularak birbirlerine hibridize olmaları sağlanmış ve böylece her biri çift zincirli DNA haline getirilmişlerdir. İşaretlenmiş ve hibridize edilmiş çift zincirli YT1/YT2 EMSA'da prob olarak kullanılmıştır. İşaretli olmayan YT1/YT2, Mut1/Mut2 ve DM1/DM2 ise yarışmacı DNA'lar olarak kullanılmışlardır.

3.10.3. EMSA'nın Yapılışı

Temel olarak; bir tampon solüsyon içerisinde poly(dIdC. dIdC) ve nükleer protein (1µg) karıştırılarak oda ısısında 5 dakika beklenilmiş ve daha sonra DNA probu (2µg) eklenerek 15 dakika daha oda ısısında tutulmuştur. Reaksiyonlar, %8'lik poliakrilamid jele (%8 akrilamid:bis akrilamid 40:1, 0.5 TBE, % 0.09 APS ve %0.0006 TEMED) yüklenmiş 200 V'da 2 saat süreyle dikey elektroforez yapılmıştır. Daha sonra pozitif yüklü bir membrana western blot yöntemine benzer şekilde aktarılan DNA/protein kompleksleri ultra viyole ışını ile sabitlendikten sonra LightShift Chemiluminescent EMSA Kit (Thermo Scientific/Pierce, Ürün Kodu: 20148) kullanılarak ışınma oluşturulmuş ve radyografik film ile görüntülenmiştir.

3.10.4. EMSA yarışmacı DNA ve antikor analizleri

DNA/protein etkileşiminin özgülüğünü ve proteinin bağlanması için gerekli nükleotidlerin belirlenmesi amacıyla yarışmacı DNA'lar kullanılmıştır. Kullanılan prob miktarının 10, 250 ve 500 molar katında işaretlenmemiş DNA parçaları (YT1/YT2, Mut1/Mut2 ve DM1/DM2) nükleer protein ile 10 dakika süreyle inkübe edilmiş ve daha sonra reaksiyonlara işaretli prob eklenerek 15 dakika daha oda ısısında beklenmiştir. Deney daha sonra yukarıda anlatıldığı şekilde devam ettirilmiştir.

Nükleer protein ve spesifik antikor oda ısısında 5 dakika süreyle bekletilmiş, daha sonra nükleer protein ve antikor kompleksi DNA probu ile birleştirilerek jelle yüklenmiş ve deney yukarıda anlatıldığı şekilde sürdürülmüştür.

3.11. Jel Elektroforezi

3.11.1. Agaroz Jel Elektroforezi

İstenilen miktardaki agaroz (ağırlık/hacim) 1x TBE (100mM Tris.Borat, 1 mM EDTA, pH:8.3) içerisinde mikrodalgada eritilmiş ve yatay veya dikey jel kalıplarına dökülerek DNA veya RNA'ların konulacağı kuyucukları içeren taraklar takılarak donmaya bırakılmıştır. Örnekler, 1:5 miktarında boya karışımı (%8 deiyonize formamid, 1x TBE ve bromofenol mavisi) eklendikten sonra jelle yüklenmiş ve 1x TBE tampon solüsyonunda oda ısısında, 100 V'ta yürütülmüşlerdir. Elektroforez sonrası jeller %0.001 oranında etidyum bromür içeren 1x TBE solüsyonunda boyanmış ve U.V. ışığında görüntülenmiştir.

3.11.2. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Poliakrilamid jeller %6 ile %10'luk olacak şekilde 0,5x TBE tamponu içerisinde %40'luk stok akrilamid jel solüsyonundan hazırlanmıştır (%38 akrilamid, %2 bisakrilamid). Polimerizasyon; %10'luk APS (amonyum per sülfat-SIGMA) ve TEMED (SIGMA) solüsyonlarının, sırasıyla 1/100 hacim ve 1/1250 hacim miktarında olacak şekilde eklenmesiyle sağlanmıştır. Elektroforez, dikey tanklarda 200-250 V'da yapılmıştır.

3.12. İstatistik

Değişkenler ortalama \pm standart sapma şeklinde ifade edilmiştir. Gruplar arasındaki farkların istatistiksel anlamlılığı 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. PTEN mRNA seviyesi ile artan Tbx3 dozlarının karşılaştırılmasında Spearman's kolerasyon testi kullanılmıştır. İn-vitro Transkripsiyon testlerinin değerlendirilmesinde Mann-Whitney testi kullanılmıştır. Analizler SPSS 18.0 programı ile yapılmıştır.

BULGULAR

Grubumuz tarafından gerçekleştirilen önceki çalışmalarda, embriyonik gelişimde görev alan bir transkripsiyon faktörünü kodlayan *TBX3* geni ifadesinin hematolojik kanserli hastaların venöz kan örnekleri ve kemik iliklerinden elde edilen mononükleer hücrelerde kontrol hücrelere göre yüksek olduğu saptanmıştır (51). Hematopoez ve dolayısıyla hematopoetik kanserlerin gelişiminde rol oynayan çok sayıda moleküler mekanizma belirlenmiştir. Bunların arasında ilginç bir bulgu göze çarpmaktadır; *PTEN* geni susturulmuş farelerde AML ve ALL gelişimi görülmektedir (50). Tek bir genin yokluğunun hem myeloid hem de lenfoid serisi hücrelerden köken alan lösemi tiplerine dönüşebilmesi, bu genin hematopoezin üst basamaklarında, yani hücreSEL özelleşmenin henüz başlangıcındaki bir evrede görev aldığını göstermektedir. Hematolojik kanserlerdeki artmış *TBX3* geni ifadesine ait bulgumuz ile özelleşmemiş hücre ve kanser hücresi benzerlikleri, *PTEN* geni etkinliğinin düzenlenmesinde *TBX3* geni ürününün rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Nitekim incelemelerimizde *PTEN* geni promoter bölgesinde Tbx3 proteinin olasılıkla bağlanabileceği DNA dizinlerinin varlığı saptanmıştır. Aynı promoter bölgesinde, Tbx3 proteini yanı sıra, hematopoetik hücre fonksiyonlarını düzenlediği bilinen MITF adlı transkripsiyon faktörünün de olası bağlanma dizinlerinin bulunduğu görülmüştür. Dolayısıyla *PTEN* geni ifadesini kontrol etmek amacıyla MITF ve Tbx3 proteinlerinin bu dizinlere bağlanıp bağlanmadığını ve *PTEN* geni aktivitesine herhangi bir etkilerinin olup olmadığını araştırmadan önce, bu üç genin hematolojik kanserlerdeki ifadelerinin saptanması ve aralarındaki ilişkinin gözlemlenmesi planlanmıştır.

4.1. Çalışma Grupları

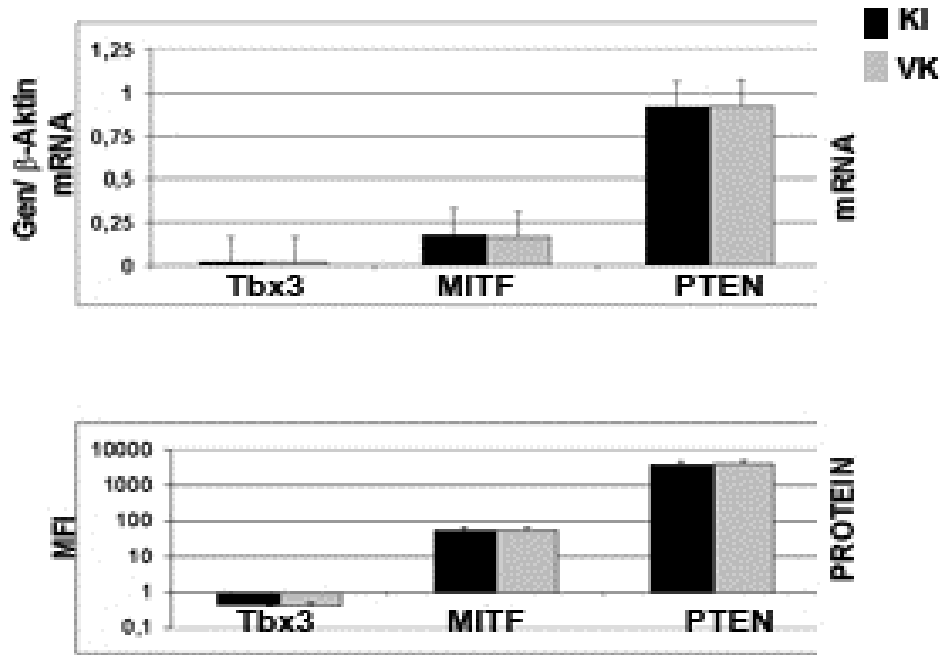
Bu çalışmada kullanılan kemik iliği örnekleri; çalışmaya katılmayı kabul eden, hematolojik malignite tanısı almış olan 40 hasta ile klinik tanı amacıyla kemik iliği aspirasyonu yapılmış fakat kemik iliğinde herhangi bir maligniteye rastlanılmamış 10 bireyden elde edilmiştir. Bu grupların yanı sıra hasta grubuna yaş ve cinsiyet açısından uyumlu 20 sağlıklı gönüllü de venöz kan örnekleri vererek çalışmaya katılmayı kabul etmişlerdir (**Tablo 4.1.**).

Toplam 40 bireyden oluşan hasta grubu; Akut Myeloid Lösemi (AML), Kronik Myeloid Lösemi (KML) ve Kronik Lenfositik Lösemi (KLL) olarak 3 ayrı grup halinde incelenmiştir. Kontrol grubunu oluşturabilmek amacıyla; sağlıklı gönüllülerden (n=20) alınan venöz kan örneklerinden izole edilen mononükleer hücreler ile klinik tanı amacıyla kemik iliği aspirasyonu yapılmış fakat kemik iliğinde herhangi bir maligniteye rastlanılmamış 10 bireyden elde edilen kemik iliği hücreleri her üç genin mRNA ve protein düzeyleri açısından karşılaştırılmıştır. Tbx3, *PTEN* ve MITF mRNA'ları ve protein düzeyleri arasında her iki grup arasında

istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.1.). Bu durumda hasta grubundan elde edilen örneklerle karşılaştırmaya daha uygun olduğu düşünüldüğü için tanı amaçlı aspirasyon yapılan ancak malignite bulgusuna rastlanmamış olan kemik iliği örnekleri “normal kemik iliği” olarak değerlendirilmiş ve tüm deneylerimizde kontrol grubu ($n=10$) olarak kullanılmıştır.

Tablo 4.1. Hasta ve Kontrol gruplarının özellikleri

	CİNSİYET		YAŞ (Ort)	TANI		
	E	K		AML	KML	KLL
HASTA	27 (%67,5)	13 (% 32,5)	53,2	13 (%32,5)	9 (%22,5)	18 (%45)
KONTROL (Kemik İliği)	5 (%50)	5 (%50)	48,6	-	-	-
KONTROL (Venöz Kan)	12 (%60)	8 (%40)	36,6	-	-	-



Şekil 4.1. Kontrol Grubu Seçimi: Tanı amacıyla kemik iliği aspirasyonu yapılan ancak herhangi bir malignite bulgusuna rastlanmayan kişilerden ($n=10$) alınan kemik iliğinden ve sağlıklı gönüllülerin ($n=20$) venöz kanından izole edilen mononükleer hücrelerde Tbx3, MITF ve PTEN mRNA (üst panel) ile protein (alt panel) düzeyleri saptanmıştır. İki grup arasında her 3 gen için de mRNA ve protein düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. KI: Kemik İliği, VK: Venöz Kan, MFI: Ortalama Floresans Yoğunluğu.

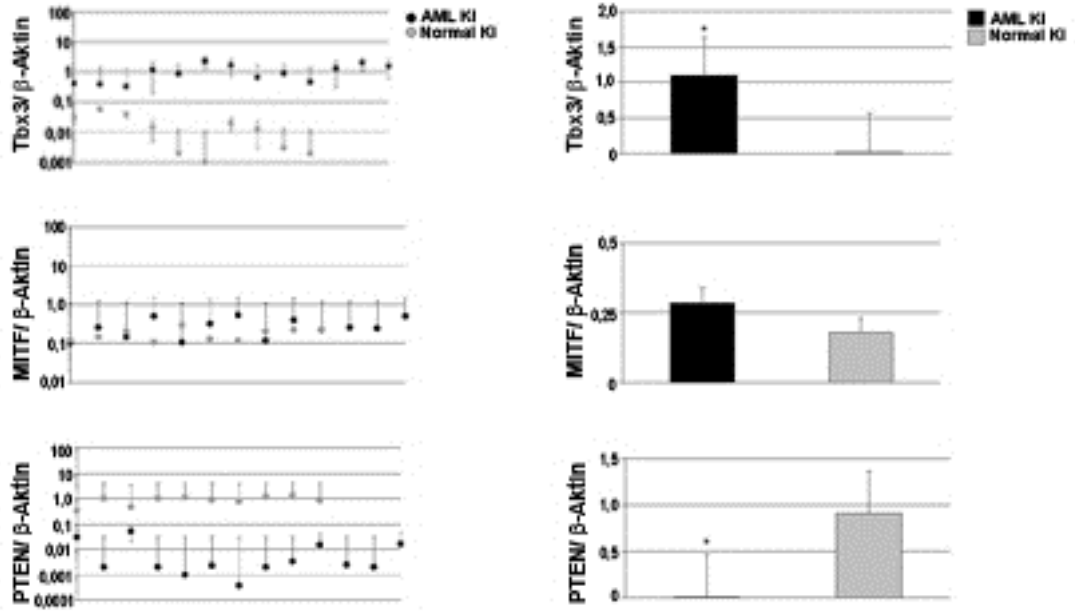
4.2. Akut Myeloid Lösemide (AML) *TBX3*, *MITF* ve *PTEN* Genlerinin İfade Düzeyleri.

Çalışmaya katılmayı kabul eden hastalarımızın %32,5'ini oluşturan AML grubunda; hematolojik malignite gelişiminde rol oynayabileceğini düşündüğümüz *TBX3*, *PTEN* ve *MITF* genlerinin ifadeleri öncelikle mRNA düzeyinde ölçülmüştür. Bu amaçla gerek hasta gerek kontrol grubundan elde edilen kemik iliği örneklerinden mononükleer hücreler izole edilmiş ve bu hücrelerden RNA elde edilmiştir. Daha sonra “Gerçek Zamanlı Niceliksel PZR” (Real Time Quantitative PCR, qPCR) yöntemi kullanılarak adı geçen 3 gen ürünü yanı sıra β -Aktin mRNA düzeyleri de ölçülmüş ve her bir sonuç β -Aktin düzeyleri ile oranlanarak sunulmuştur. **Şekil 4.2.(A)** da görüldüğü gibi AML grubu hastalarda *Tbx3* mRNA'sının normal kemik iliğinden elde edilen hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış olduğu saptanırken ($p=0.001$), *MITF* mRNA düzeyleri hasta ve normal kemik iliği hücreleri arasında bir fark sergilememiştir ($p=0.06$). Buna karşılık *PTEN* mRNA düzeyinin hasta bireylerin kemik iliği hücrelerinde normal kemik iliği hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı saptanmıştır ($p=0.001$).

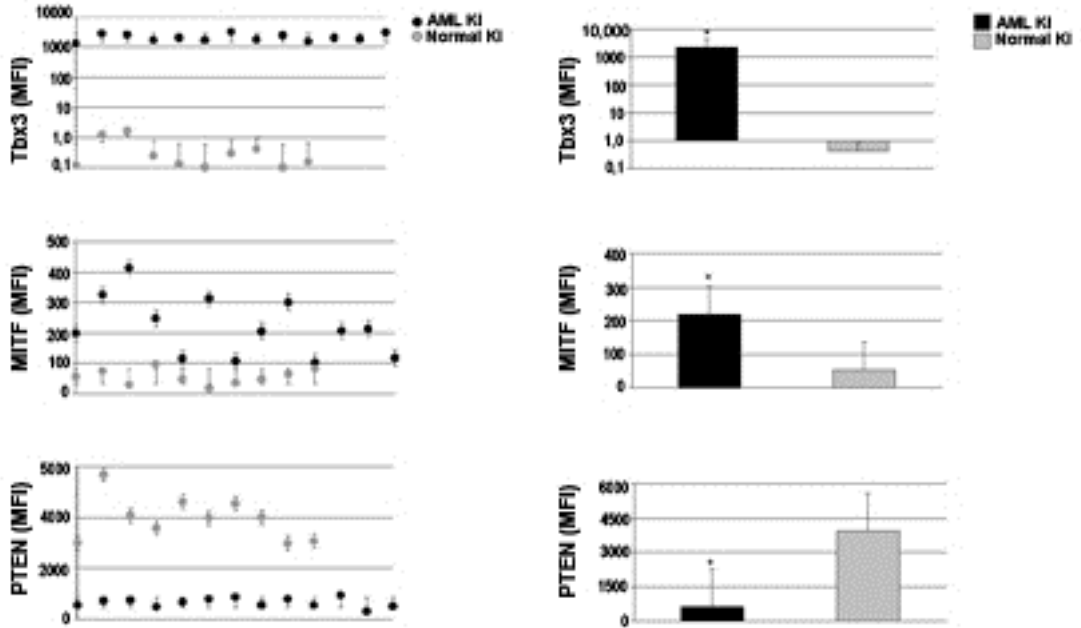
TBX3, *MITF* ve *PTEN* geni ifadeleri protein düzeyinde de incelenmiştir (**Şekil 4.2- B**). Bu amaçla hasta ve kontrol grubundan alınan kemik iliği örneklerinden izole edilen mononükleer hücreler, her bir proteine özgül monoklonal antikolar kullanılarak akış sitometri (Flow Cytometry) yöntemiyle incelenmiş ve ortalama floresans yoğunluğu (MFI) ölçülmüştür. mRNA düzeyleri ile uyumlu olacak şekilde, *Tbx3* protein düzeylerinin hasta grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış, *PTEN* protein düzeylerinin ise azalma gösterdiği saptanmıştır ($p=0.001$). AML hücrelerindeki *MITF* protein düzeyinin ise kontrol hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış olduğu görülmüştür ($p=0.02$).

Sonuç olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, AML grubu hastalarda mRNA ve protein düzeyinde *TBX3* geni ifadesinin artarken *PTEN* geni ifadesinin azaldığı saptanmıştır. *MITF* geni ifadesinin ise mRNA düzeyinde hasta ve kontrol grupları arasında herhangi bir fark göstermediği, ancak protein düzeyinde AML hastalarında artış sergilediği gözlemlenmiştir.

A. AML'de mRNA DÜZEYLERİ



B. AML'de PROTEİN DÜZEYLERİ



Şekil 4.2. AML'de *TBX3*, *MITF* ve *PTEN* genlerinin ifadeleri: Sonuçlar sol tarafta birey bazında, sağ tarafta ise ortalamaların alındığı sütun grafikler şeklinde sunulmuştur. **A. mRNA düzeyleri:** Hidroliz problemleri ile "Gerçek Zamanlı Niceliksel PZR" yapılmış ve sonuçlar her bir gen için β -Aktin düzeylerine oranlanarak verilmiştir. **B. Protein düzeyleri:** Akış sitometrisi ile her bir proteine özgül monoklonal antikorlar kullanılarak saptanmış, sonuçlar Ortalama Floresans Yoğunluğu (MFI) olarak verilmiştir. AML: Akut Myeloid Lösemi, KI: Kemik İliği.

4.3. Kronik Myeloid Lösemide (KML) *TBX3*, *MITF* ve *PTEN* Genlerinin İfade Düzeyleri.

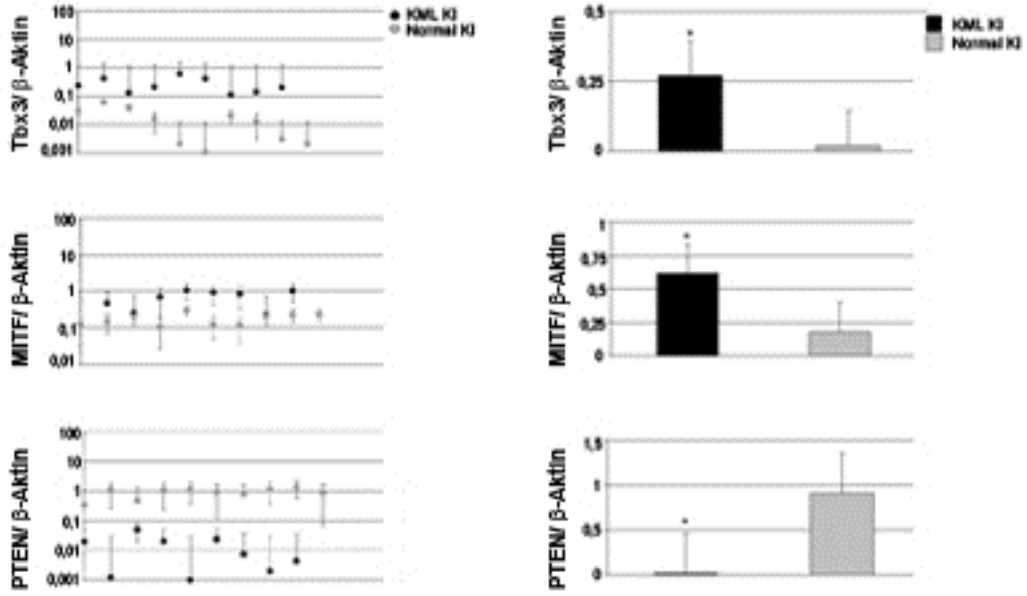
Hastalarımızın %22,5'ini oluşturan KML grubunda da her 3 genin ifadesi bir önceki bölümde anlatıldığı şekilde hem mRNA hem de protein düzeyinde saptanmıştır. **Şekil 4.3**'te görüleceği gibi *Tbx3* ve *MITF* mRNA (her ikisi için de $p=0.02$) ile protein düzeyleri (sırasıyla $p=0.001$ ve 0.02) KML hastalarından elde edilen hücrelerde kontrol grubundan elde edilen mononükleer hücrelere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış olarak saptanmıştır. Buna karşılık *PTEN* düzeyleri ise hasta grubunda kontrole göre hem mRNA ($p=0.001$) hem de protein ($p=0.01$) düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı oranda azalmış olarak bulunmuştur.

KML hastalığının oluşmasında önemli bir mekanizma olan (9:22) translokasyonu, *BCR* ve *ABL* genlerini bir araya getirerek fizyolojik koşullarda bulunmayan Bcr-Abl kimerik proteinin yapımına neden olmaktadır. Bu kimerik protein de hücre döngüsünü indükleyen bazı proteinlerin aktivitesini düzenleyen bir kinaz olduğu için hücre çoğalması artarak lösemi gelişmektedir (52). Philadelphia kromozomu olarak da adlandırılan bu kromozom çalışmaya katılan 9 hastanın 6'sında pozitif olarak bildirilmiştir. Ancak, t(9:22) negatif ve pozitif hastalar arasında *Tbx3* veya *MITF* mRNA düzeyleri arasında herhangi bir fark saptanmamıştır.

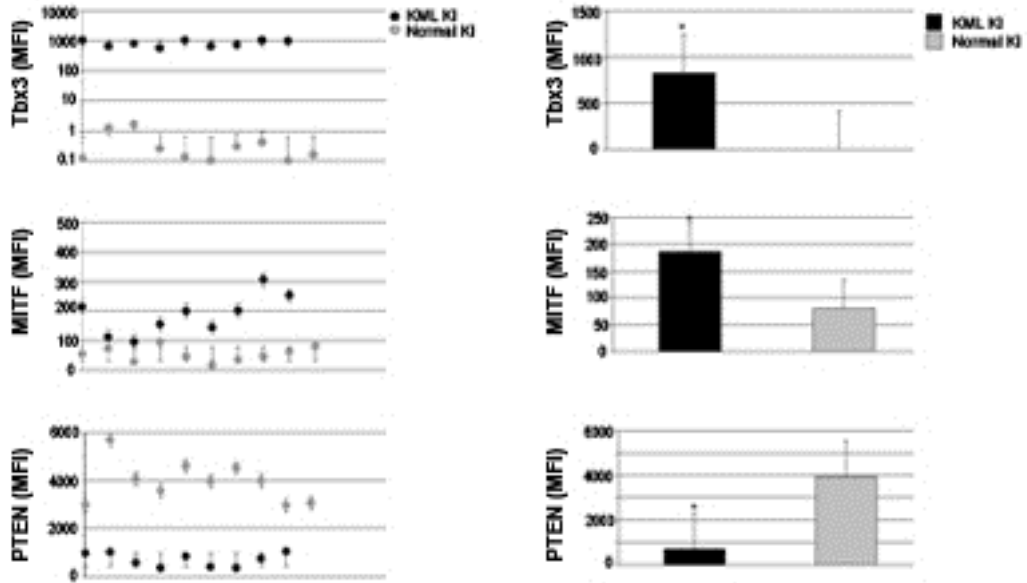
4.4. Kronik Lenfoid Lösemide (KLL) *TBX3*, *MITF* ve *PTEN* Genlerinin İfade Düzeyleri.

KLL grubu hastalarımızın %45'ini oluşturmaktadır. Ancak 5 hastadan elde edilen kemik iliği örneklerinden mononükleer hücre ayrıştırılması başarısız olduğundan bu gruptaki 18 hastanın 13'ünde incelemeler yapılabilmmiştir. Bu grupta da *Tbx3* ve *MITF* mRNA ile protein düzeyleri hastalardan elde edilen hücrelerde kontrol grubu hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış olarak saptanmıştır (her iki genin mRNA'sı için $p=0.03$, protein için sırasıyla $p=0.002$ ve 0.02). Buna karşılık *PTEN* mRNA ve protein düzeyleri hastalardan elde edilen hücrelerde kontrol hücrelerine göre anlamlı derecede azalmıştır ($p=0.002$). Her üç genin mRNA ve protein düzeyindeki ifadeleri **Şekil 4.4.**'te gösterilmiştir.

A. KML'de mRNA DÜZEYLERİ

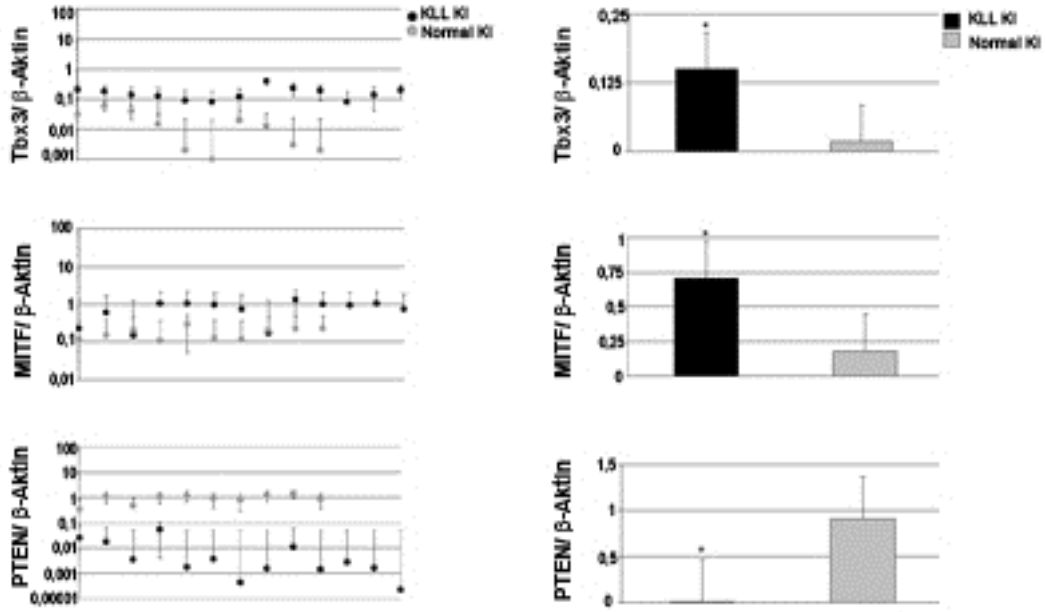


B. KML'de PROTEİN DÜZEYLERİ

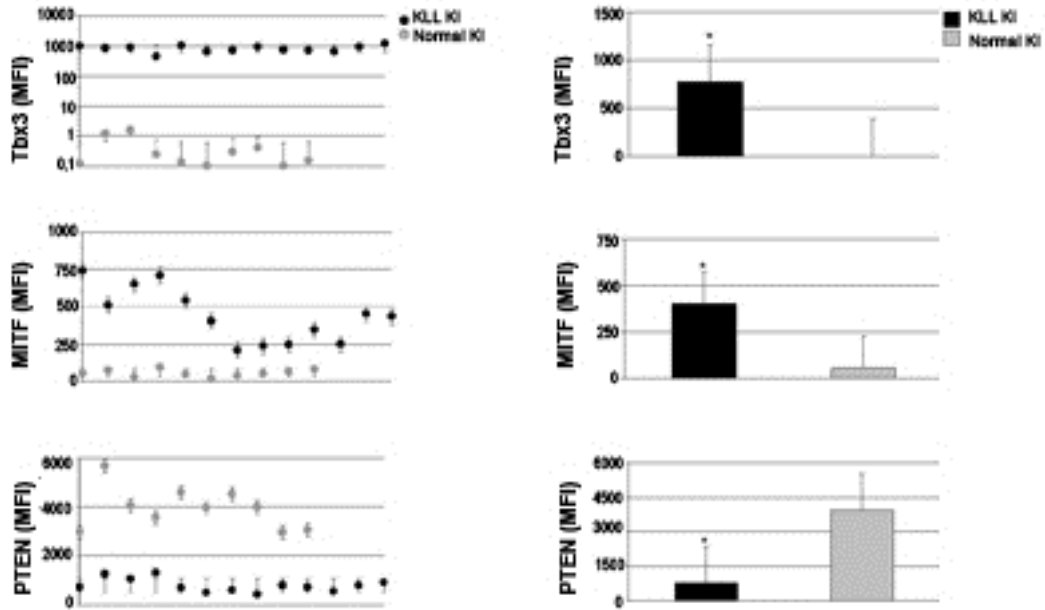


Şekil 4.3. KML'de *TBX3*, *MITF* ve *PTEN* genlerinin ifadeleri: Sonuçlar sol tarafta birey bazında, sağ tarafta ise ortalamaların alındığı sütun grafikler şeklinde sunulmuştur. **A. mRNA düzeyleri:** Hidroliz problemleri ile "Gerçek Zamanlı Niceliksel PZR" yapılmış ve sonuçlar her bir gen için β-Aktin düzeylerine oranlanarak verilmiştir. **B. Protein düzeyleri:** Akış sitometrisi ile her bir proteine özgül monoklonal antikorlar kullanılarak saptanmış, sonuçlar Ortalama Floresans Yoğunluğu (MFI) olarak verilmiştir. p < 0.05 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. KML: Kronik Myeloid Lösemi, KI: Kemik İliği.

A. KLL'de mRNA DÜZEYLERİ



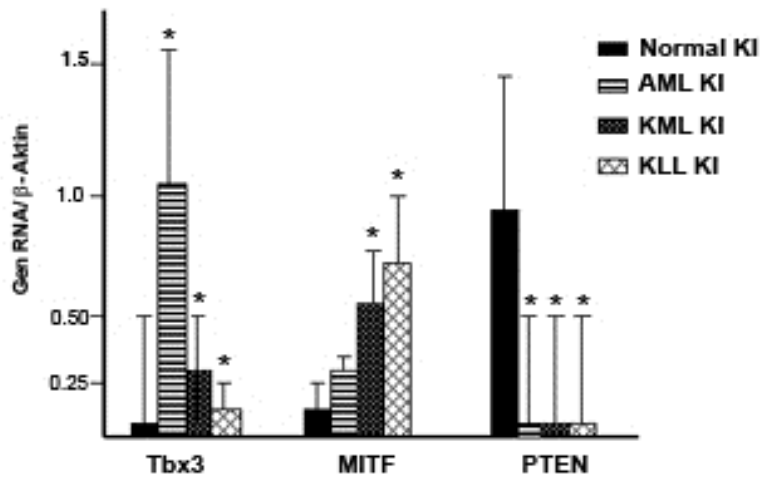
B. KLL'de PROTEİN DÜZEYLERİ



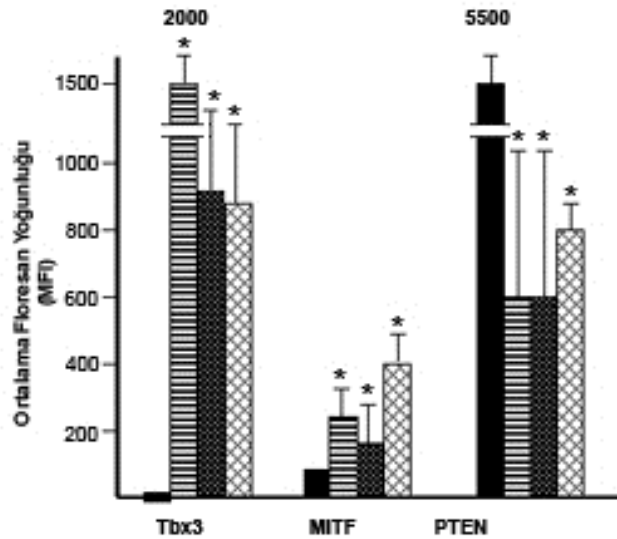
Şekil 4.4. KLL'de *TBX3*, *MITF* ve *PTEN* genlerinin ifadeleri: Sonuçlar sol tarafta birey bazında, sağ tarafta ise ortalamaların alındığı sütun grafikler şeklinde sunulmuştur. **A. mRNA düzeyleri:** Hidroliz problemleri ile "Gerçek Zamanlı Niceliksel PZR" yapılmış ve sonuçlar her bir gen için β -Aktin düzeylerine oranlanarak verilmiştir. **B. Protein düzeyleri:** Akış sitometrisi ile her bir proteine özgül monoklonal antikorlar kullanılarak saptanmış, sonuçlar Ortalama Floresans Yoğunluğu (MFI) olarak verilmiştir. $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. KLL: Kronik Lenfositik Lösemi, KI: Kemik İliği.

Sonuç olarak; AML, KML ve KLL tanısı almış olan hastaların kemik iliğinden elde edilen mononükleer hücrelerde normal kemik iliği hücrelerine göre Tbx3 ve MITF protein düzeyleri artarken, PTEN protein düzeyinin azaldığı saptanmıştır. Aynı bulgular mRNA düzeyinde de gözlemlenmiştir (**Şekil 4.5.**). MITF mRNA'sının AML grubu hastalarda kontrole göre bir fark göstermediği görülmüş olsa da protein düzeyindeki belirgin farklılık, hematolojik kanserlerin bir kısmında Tbx3 ve MITF gen ürünlerinin birlikte çalıştıklarının göstergesi olabilir. Bu iki genin ifadesinin artmasına karşılık PTEN geni ifadesinin azalması, hematolojik kanserlerin gelişiminden sorumlu önemli bir mekanizmanın ipuçlarını oluşturabileceğinden bu 3 gen ürünü arasındaki olası ilişkilerin daha detaylı olarak incelenmesine karar verilmiştir.

A. RNA DÜZEYLERİ



B. PROTEİN DÜZEYLERİ



Şekil 4.5. Hematolojik Kanserlerde Tbx3, MITF ve PTEN gen ifadeleri: **A.** AML, KML ve KLL hastalarının kemik iliğinden elde edilen hücrelerdeki Tbx3, MITF ve PTEN mRNA düzeyleri. Tbx3 mRNA'sı tüm lösemi tiplerinde kontrole göre belirgin olarak artmış ($p < 0.05$), PTEN mRNA'sı ise azalmıştır ($p < 0.002$). MITF mRNA'sı ise KML ve KLL'de kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmıştır ($p < 0.05$). **B.** AML, KML ve KLL hastaları kemik iliği hücrelerinde Tbx3, MITF ve PTEN protein düzeyleri. Her 3 lösemi tipinde de Tbx3 ve MITF protein düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış olarak saptanırken, PTEN protein düzeyi azalmış olarak bulunmuştur ($p < 0.05$).

4.5.1. PTEN geni promoter bölgesini incelemek için gerekli olan rekombinant DNA yapılarının hazırlanmaları.

Hasta örneklerinden edindiğimiz sonuçlara göre MITF ve Tbx3 düzeylerinin artışına karşılık PTEN geni hem mRNA hem de protein düzeyinde azalmaktadır. PTEN geni somatik mutasyonlarının çok seyrek görüldüğü dikkate alındığında bu durumun olası nedenleri arasında ilk sırada PTEN geninin transkripsiyonel olarak baskılanması akla gelmektedir. Yani PTEN geni promoter bölgesine bağlanan MITF ve/veya Tbx3 gibi transkripsiyon faktörleri PTEN geni aktivasyonunu baskılayarak düşük düzeyde PTEN mRNA'sının yapımına neden olabilirler.

PTEN geni promoter bölgesinin şematik çizimi Şekil 4.6.'da verilmiştir. PTEN promoter [GenBank: AF067844.1] bölgesini inceleyen çalışmalar, translasyon başlama noktası (ATG) öncesinde 1030 baz çifti (bç) uzunluğunda bir "lider dizin" in varlığını ortaya koymuştur. Birinci ekzonun başlangıcı "0" olarak kabul edilerek yapılan numaralandırmaya göre -1345 ve -745 bç arasında kalan bölge "Çekirdek Promoter" (CP) olarak adlandırılmıştır(53). Bu bölge USF, Sp1, EGR1 gibi transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgelerini içermektedir ve PTEN geninin maksimum aktivitesinden sorumludur (54-56)

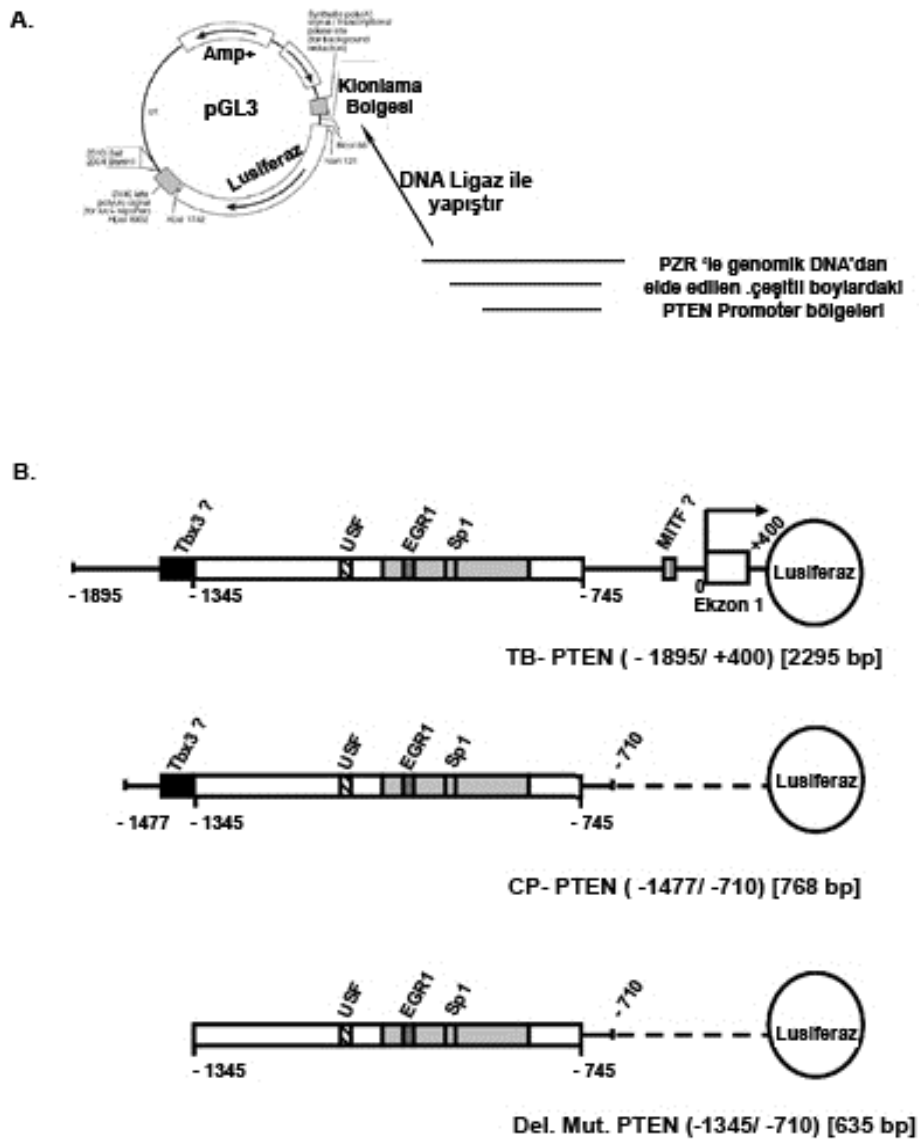


Şekil 4.6. PTEN çekirdek promoter bölgesinin şematik çizimi. Transkripsiyonun başlangıç noktası okla gösterilmiştir. Ekzonun başlangıcı "0" olarak kabul edilmiş ve DNA baz numaraları bu noktadan sola doğru "-" ile sağa doğru ise "+" ile gösterilmiştir. Bilinen transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri (USF, EGR1, Sp1, p53) gösterilmiştir. LS: Lider sekans, ATG: Translasyon başlangıcı.

İncelemelerimizde, Tbx3 proteininin PTEN promoter bölgesindeki olası bağlanma dizinlerinin -1361 ile -1347 numaralı baz çiftleri arasında olduğunu, MITF proteini olası bağlanma dizinlerinin ise -353 ile -347. baz çiftleri arasında bulunduğu gözlemlenmiştir. Bu durumda her iki proteinin de PTEN geni aktivitesine etkilerini inceleyebilmek için PTEN promoter'i bu bölgeleri de içerecek şekilde genomik DNA'dan izole edilmiş ve klonlanmıştır.

Bu çalışmada kullanılan plasmid pGL3'tür ve ampisilin'e karşı direnç geni ile lusifereraz enzimini kodlayan DNA içermektedir. Bu plasmid bir memeli hücrelerine sokulduğunda, hücre içinde bulunan transkripsiyon faktörleri bazal düzeyde lusiferaz enziminin yapımını sağlamakta ve salınan lusiferaz da ortama konulan substratını etkileyerek ışımaya neden olmaktadır. Işıma ise lüminometre cihazı ile ölçülmektedir. Ancak lusiferazın üretilme oranı, dolayısıyla ortaya çıkan ışımaya miktarı, tamamen plasmidin klonlama bölgesine (Şekil 4.7-A) yerleştirilen promoter bölgelerinin gücüne bağlıdır. Yani plasmide yerleştirilen promoter bölgesi ne denli güçlüyse hücre içerisinde de o oranda fazla lusiferaz üretilerek daha güçlü ışımaya elde

edilecektir. Şekil 4.7-A kısmında genomik DNA'dan elde edilen PTEN promoter bölgelerinin pGL3'e yerleştirilmesi şematik olarak gösterilmiştir. Şekil 4.7-B de ise hazırlanan PTEN promoter bölgeleri gösterilmiştir. Tam boy PTEN promoteri (TB-PTEN) olarak adlandırılan yapı, -1895. bç ile +400. bç arasındaki bölgeyi içermekte ve 2295 bç uzunluğundadır. TB-PTEN hem Tbx3 hem de MITF olası bağlanma bölgelerini içermektedir. Yine genomik DNA'dan PZR ile elde edilen Çekirdek PTEN Promoteri (CP-PTEN) ise -1475. bç ile -710.bç arasındaki 768 baz çiftlik bölgeyi kapsamaktadır. CP-PTEN'de MITF olası bağlanma bölgesi bulunmamaktadır. Üçüncü PTEN promoter DNA'sı (Del. Mut. PTEN) ise MITF ve Tbx3 olası bağlanma bölgelerini içermeyecek şekilde -1345.bç ve -710.bç arasında kalan 635 bç uzunluğundaki bölgeden oluşmaktadır.

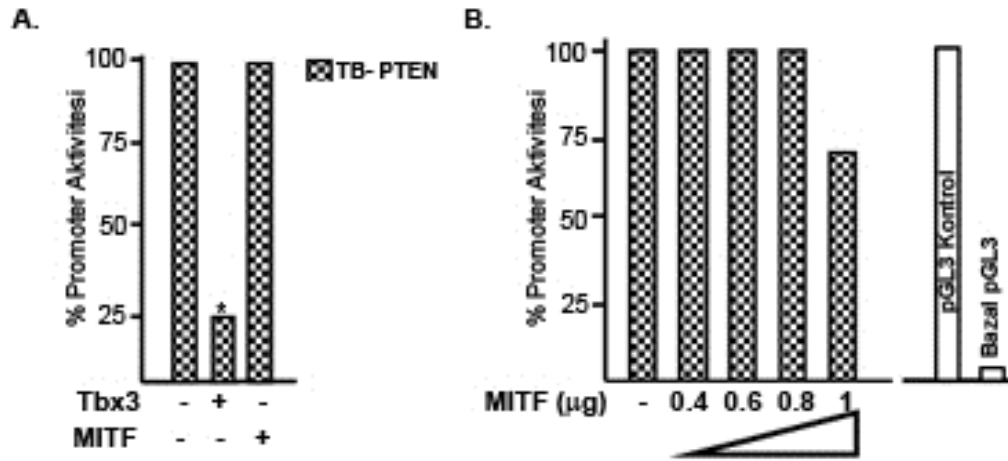


Şekil 4.7. Bu çalışmada kullanılan rekombinant DNA'ların şematik gösterimi: **A.** Genomik DNA'dan PZR ile çoğaltılan PTEN promoter bölgeleri pGL3 adlı lüsisferaz ekspresyon plasmidi içerisine yerleştirilmiştir. **B.** pGL3 içerisine yerleştirilen PTEN promoter bölgelerinin şematik gösterimi. Tbx3 ve MITF olası bağlanma bölgeleri belirtilmiştir. Her bir ürün için başlama ve bitiş noktaları ile uzunlukları baz çifti (bp) olarak verilmiştir.

4.6. Tbx3 ve MITF'nin PTEN geni aktivitesine etkileri

Tbx3 ve MITF'in PTEN geni aktivitesine olan etkilerini ortaya koyabilmek amacıyla, kültür ortamında büyütülen HeLa (insan serviks kanseri) hücrelerine her iki proteinin de olası bağlanma bölgelerini içeren TB-PTEN promoter plasmidi ile birlikte MITF veya Tbx3 proteini yapımını sağlayan ekspresyon plasmidleri aktarılmıştır. Bu çalışmalarda HeLa hücre hattının seçilmesinin nedeni, bu hücrelerin transfeksiyon (yabancı DNA aktarımı) işlemine çok uygun olmaları, ayrıca düşük düzeyde endojen Tbx3 ve PTEN proteini içermeleri nedeniyledir.

İki günlük bir inkübasyon dönemi sonucunda hücreler toplanarak lüminometre cihazında ışınım miktarı, yani lüsiferaz aktivitesi ölçülmüştür. **Şekil 4.8- A'** da görüldüğü gibi Tbx3 proteini TB-PTEN promoterinin aktivitesini 4-kat baskılarken, MITF'in herhangi bir etkisi saptanmamıştır. Bu durumun teknik bir hata nedeniyle oluşup oluşmadığının ortaya konulabilmesi için HeLa hücrelerine TB-PTEN reporter plasmidi ile birlikte artan miktarlarda MITF proteini ekspresyon plasmidi eklenmiş ve yine lüsiferaz aktivitesi ölçülmüştür. **Şekil 4.8- B** bölümünde görüldüğü gibi MITF ekspresyon plasmidi miktarı 1 µg düzeyine ulaştığında TB-PTEN promoter aktivitesinde de yaklaşık 1,5-kat azalma olmuştur. Ancak bu azalma anlamlı olarak bulunmamıştır. Bu sonuçlara göre; PTEN promoteri transkripsiyon aktivitesinin Tbx3 proteini tarafından şiddetle baskılandığı, ancak MITF proteininin transkripsiyonel aktiviteye herhangi bir etkisinin bulunmadığı saptanmıştır.

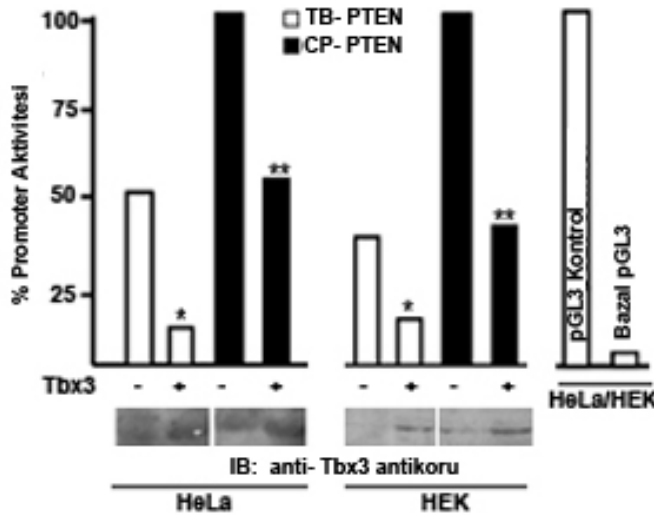


Şekil 4.8. Tbx3 ve MITF proteinlerinin PTEN promoteri transkripsiyonel aktivitesine etkileri: **A.** HeLa hücrelerine TB-PTEN reporter plasmidi ile birlikte Tbx3 (1µg) veya MITF (0,5µg) ekspresyon plasmidleri aktarılmış ve lüsiferaz aktivitesi ölçülmüştür. Sonuçlar “% Promoter Aktivitesi” olarak ifade edilmiştir. **B.** HeLa hücrelerine TB-PTEN ile birlikte artan miktarlarda MITF ekspresyon plasmidi aktarılmıştır. pGL3K pozitif, Bazal pGL3 ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

4.6.1. PTEN promoter aktivitesinin Tbx3 proteini tarafından baskılanması.

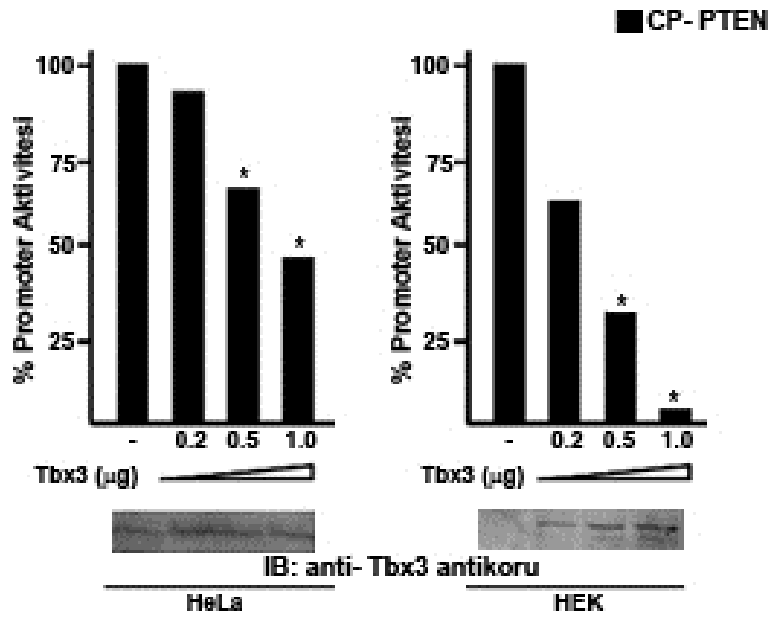
MITF proteininin PTEN promoteri aktivitesine doğrudan bir etkisinin görülemediği üzerine çalışmalarımız Tbx3 proteinine yoğunlaştırılmıştır. Bu amaçla TB-PTEN yanı sıra, MITF proteini bağlanma bölgesi içermeyen CP-PTEN plasmidi de incelenmiştir. Ayrıca, saptanan baskılamanın hücreye özgül olmayıp genel bir görüngü olduğunu ispatlayabilmek için de HeLa hücreleri ile birlikte yine düşük düzeyde endojen Tbx3 bulunan HEK (insan embriyonik böbrek) hücreleri de kullanılmıştır.

Yani, TB-PTEN ve CP-PTEN reporter plasmidleri Tbx3 ekspres eden ve etmeyen plasmidlerle birlikte HeLa ve HEK hücrelerine aktarılarak lüsiferaz aktivitesi ölçülmüş ve böylece PTEN promoter aktiviteleri saptanmıştır. Her iki hücre hattında da, CP-PTEN aktivitesinin TB-PTEN aktivitesinden 2-kat daha güçlü olduğu saptanmıştır (Şekil 4.9). Daha da önemlisi, Şekil 4.9’da görüldüğü gibi Tbx3, TB-PTEN aktivitesinde 2,5 kat, CP-PTEN aktivitesinde ise 2 kat azalmaya neden olmuştur. Görülen baskılamanın Tbx3 proteini artışı ile orantılı olduğu yapılan immün blotlarda gösterilmiştir. Şekil 4.9’da sütun grafiklerin alt kısmında görüldüğü gibi lüsiferaz aktivitesi için toplanan hücrelerin bir kısmına anti-Tbx3 antikorunu kullanılarak immün blotlama uygulanmıştır. Her iki hücre hattında da Tbx3 içermeyen plasmid varlığında beklendiği gibi Tbx3 proteini çok düşük düzeyde bulunmuştur (Sütunlar 1 ve 3). Tbx3 ekspres eden plasmid eklendiğinde ise (sütunlar 2 ve 4) Tbx3 protein düzeyinin belirgin olarak arttığı görülmektedir. Ortamda Tbx3 proteini bulunmazken TB-PTEN promoter aktivitesinin CP-PTEN aktivitesinden düşük olması, TB-PTEN promoterinin Tbx3 dışında başka negatif etkili faktörlerin etkisi altında olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, bundan sonraki aşamalarda sadece CP-PTEN promoteri incelenerek Tbx3’ün bazal ve indüklenmiş promoter aktivitesine etkileri araştırılmıştır.



Şekil 4.9. PTEN promoter aktivitesinin Tbx3 proteini tarafından baskılanması: TB-PTEN ve CP-PTEN plasmidleri Tbx3 ekspres eden ve etmeyen plasmidlerle birlikte HeLa ve HEK hücrelerine aktarılmış ve 2 gün sonra lüsiferaz aktivitesi ölçülerek PTEN promoter etkinliği saptanmıştır. Sonuçlar “% Promoter Aktivitesi” olarak sunulmuştur. Tbx3 proteininin ekspres edildiğini gösterebilmek amacıyla anti-Tbx3 antikorunu kullanılarak immunoblot yapılmıştır. pGL3K pozitif, Bazal pGL3 plasmidi ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

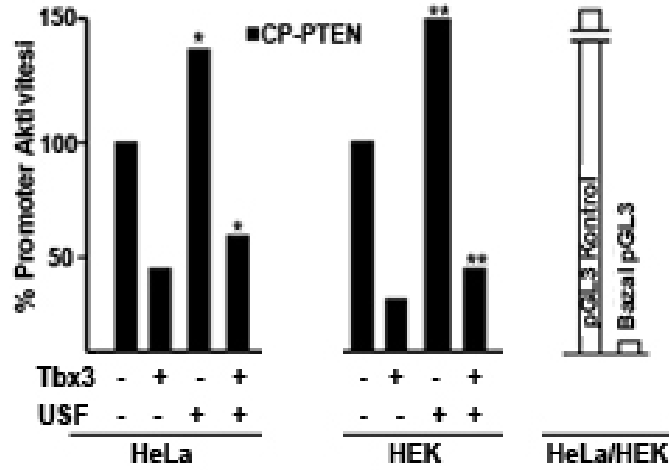
PTEN promoter aktivitesinin Tbx3 tarafından baskılanmasının özgüllüğünü kanıtlayabilmek amacıyla HeLa ve HEK hücrelerine CP-PTEN promoter plasmidi ile birlikte artan miktarlarda Tbx3 eksprese eden plasmid aktarılmış ve promoter aktivitesi ölçülmüştür (**Şekil 4.10.**). Şekilde sütun grafiklerin altında görülen immün blotlardan da anlaşılacağı gibi ve beklendiği üzere; her iki hücre hattında da artan miktarlarda eklenen Tbx3 plasmidi, Tbx3 proteinin de giderek artmasına neden olmuştur. Ayrıca bazal CP-PTEN promoter aktivitesi, 0,5 ve 1 µg miktarlarında Tbx3 eksprese eden plasmid varlığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ve giderek artan şekilde baskılanmıştır ($p < 0.05$). Yani, PTEN promoter aktivitesinin Tbx3 proteini tarafında baskılanması doza bağımlıdır ve baskılamının özgüllüğünü gösteren delillerden birini oluşturmaktadır.



Şekil 4.10. PTEN promoter aktivitesinin Tbx3 tarafından doz bağımlı olarak baskılanması: CP-PTEN plasmidi ile birlikte artan miktarlarda Tbx3 eksprese eden plasmid ve Tbx3 içermeyen plasmid (-) HeLa ve HEK hücrelerine aktarılmış, 2 gün sonra promoter aktivitesi ölçülmüştür. Sonuçlar “% promoter aktivitesi” olarak sunulmuştur. Her bir sonuç için ortamdaki Tbx3 protein miktarı immün blot ile gösterilmiştir. Artan miktarlardaki Tbx3 eksprese eden plasmide orantılı olarak hücre içinde Tbx3 protein miktarının arttığı görülmektedir.

USF adlı transkripsiyon faktörünün PTEN geni promoter bölgesine bağlanarak (Şekil 4.7) promoter aktivitesini arttırdığı bilinmektedir (54). Genomik DNA'dan izole ederek hazırlanmış olduğumuz PTEN promoter rekombinant plasmidleri her ne kadar DNA dizi analizi (DNA sequencing) ile kontrol edilmiş olsa da kullanmakta olduğumuz promoter DNA'larının tüm özellikleri taşıdığını ve fonksiyonel olduğunu ispatlamak gerekmektedir. Bu amaçla CP-PTEN plasmidi USF eksprese eden bir plasmid ile birlikte yine her iki hücre hattına aktarılmış ve promoter aktiviteleri ölçülmüştür. **Şekil 4.11.**'de gösterildiği gibi, hem HeLa hem de HEK hücrelerinde USF (sütun 3), CP-PTEN aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırmıştır ($p<0,05$). Tbx3 ise USF ile indüklenmiş transkripsiyon aktivitesini 3-kat şiddetle ve istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($p<0,05$) baskılamıştır (sütun 4).

Özetle; Tbx3 proteininin hem bazal (CP-PTEN) hem de indüklenmiş (CP-PTEN + USF) PTEN promoter aktivitesini farklı iki hücre hattında da baskıladığı (Şekil 4.11) ve bu baskılama şiddetinin ortamdaki Tbx3 miktarına bağlı olarak arttığı (Şekil 4.10) saptanmıştır. Tüm bu bulgular, PTEN promoter aktivitesinin Tbx3 tarafından baskılanmasının özgülüğünü göstermektedir.



Şekil 4.11. Tbx3 tarafından , indüklenmiş PTEN promoter aktivitesinin baskılanması. CP-PTEN plasmidi USF ve/veya Tbx3 eksprese eden plasmidlerle birlikte HeLa ve HEK hücrelerine aktarılmış, lusiferaz aktivitesi ölçülmüştür. Sonuçlar “% Promoter Aktivitesi” olarak sunulmuştur. USF, CP-PTEN aktivitesini 1,5-kat arttırırken, Tbx3'ün indüklenmiş promoter aktivitesini 3-kat baskıladığı saptanmıştır ($p<0,05$). pGL3K pozitif ve Bazal pGL3 negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

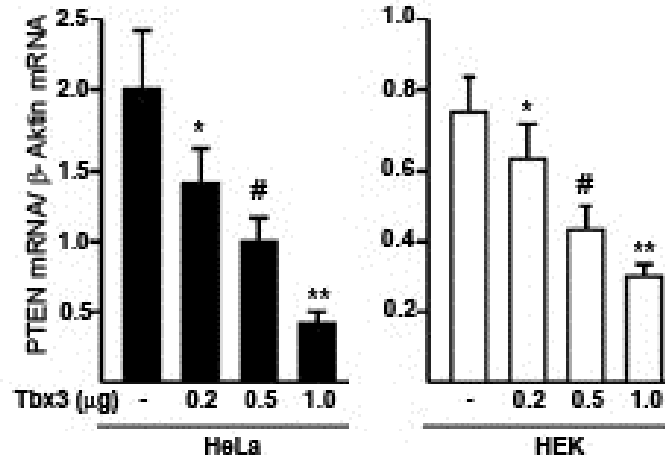
4.6.2. Artan miktarlardaki Tbx3'ün hücre içi PTEN mRNA ve protein düzeylerini azaltıcı etkisi.

Daha önce de belirtildiği gibi transkripsiyonun baskılanması, o gene ait mRNA'nın az miktarda veya hiç yapılamamasına yol açmaktadır. Yukarıdaki deneylerle Tbx3 proteininin PTEN promoter aktivitesini baskıladığı gösterilmiş olsa da bu baskılanmanın PTEN mRNA ve protein düzeylerine etkisi bilinmemektedir. Bu konuya açıklık getirmek amacıyla, HeLa ve HEK hücre hatlarına değişik miktarlarda (0,20- 0,50 ve 1,00 µg) Tbx3 eksprese eden plasmid aktarılmış ve hücreler iki gün süreyle büyütülmeye devam edilmiştir. Daha sonra Tbx3 ekspresyon plasmidi aktarılan ve aktarılmamış hücrelerden RNA izole edilerek PTEN mRNA düzeyleri hidroliz problemleri kullanılarak niceliksel olarak saptanmıştır. **Şekil 4.12-A**'da görüldüğü gibi artan miktarlardaki Tbx3 ekspresyon plasmidi, her iki hücre hattında da hücre içi PTEN mRNA düzeylerinde giderek azalmaya yol açmıştır. Spearman'ın Korelasyon testi, hücrelere aktarılan Tbx3 ekspresyon plasmid miktarı ile hücre içi PTEN mRNA miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde negatif bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur ($r = -0,858$ and $p < 0.05$).

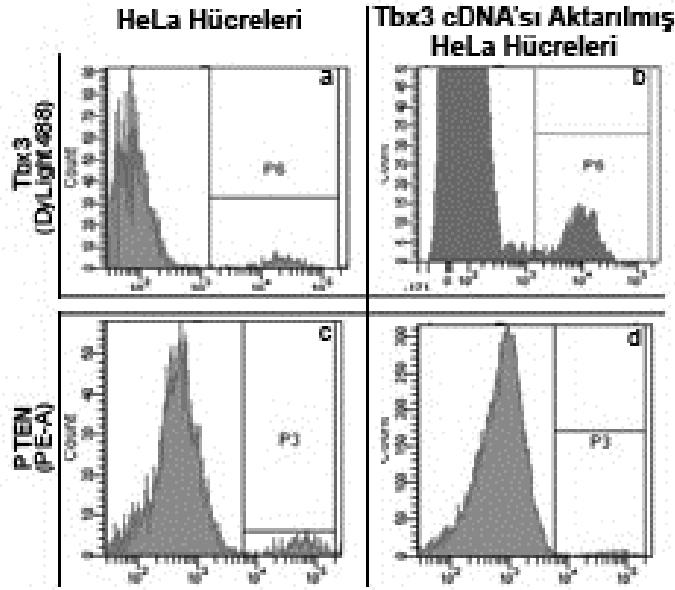
HeLa ve HEK hücreleri Tbx3 proteinini çok düşük düzeylerde içermektedirler. Hücrelere aktarılmış olan Tbx3 ekspresyon plasmidinin hücre içerisinde Tbx3 proteini yapımını sağladığını daha önceki deneylerimizde immün blotlama yöntemi ile göstermiştik (Şekiller 4.9 ve 4.10). Tbx3 ekspresyon plasmidini taşıyan, dolayısıyla Tbx3 proteini içeren hücre gruplarındaki PTEN protein düzeyini saptayabilmek için ise akış sitometri tekniği kullanılmıştır. Bu amaçla Tbx3 ve PTEN proteinlerine özgül ve farklı işaretlenmiş (sırasıyla Dylight 488 ve PE) antikolar kullanılarak, aynı hücre grubunda her iki proteinin düzeyleri saptanmıştır. **Şekil 4.12-B**'de **a** ve **b** panellerinin "x eksenini" ile kesiştiği bölgeler karşılaştırılırsa, plasmid DNA aktarımı yapılmamış hücrelerde Tbx3 protein düzeyinin çok düşük olduğu, buna karşılık Tbx3 ekspresyon plasmidi (1µg) aktarılan hücrelerde Tbx3 protein düzeyinin arttığı görülmektedir. Bu sonuç, hem daha önceki bölümlerde sunulmuş olan immün blot sonuçlarımızı desteklemekte, hem de aktarmış olduğumuz Tbx3 ekspresyon plasmidinin hücre içinde Tbx3 proteini yaptırabildiğini göstermektedir. Seçilmiş olan bu hücre gruplarında PTEN protein düzeyleri ise Şekil 4.12-B'nin **c** ve **d** panellerinde gösterilmektedir (panellerin "x-ekseni ile kesiştiği bölgeler). Görüldüğü gibi, Tbx3 ekspresyon plasmidinin aktarılmadığı hücrelerde düşük düzeyde de olsa ifade bulan PTEN protein miktarı (c), Tbx3 ekspresyon plasmidinin aktarılmasıyla birlikte belirgin olarak azalmaktadır (d). Diğer bir söylemle, Tbx3 proteininin artmış olduğu hücrelerde (b), PTEN protein miktarı da azalmaktadır (d).

Sonuç olarak; Tbx3 eksprese eden bir plasmidin hücrelere aktarılması, beklenildiği gibi hücre içinde Tbx3 protein yapımına neden olmakta ve artmış düzeydeki Tbx3 proteini de hücre içinde PTEN geni ifadesini hem mRNA hem de protein düzeyinde baskılamaktadır.

A. Hücreiçi PTEN mRNA Düzeyleri



B. Hücreiçi PTEN ve Tbx3 Protein Düzeyleri



Şekil 4.12. Tbx3, hücre içi PTEN mRNA ve protein düzeylerini baskılaması: **A.** HeLa ve HEK hücrelerine farklı miktarlarda Tbx3 ekspresyon plasmidi aktarılmış ve 48 saat sonra hücrelerden RNA izole edilerek hücre içi PTEN mRNA düzeyleri hidroliz problemleri kullanılarak gerçek zamanlı niceliksel PZR ile saptanmıştır. **B.** Tbx3 ekspresyon plasmidi (1 µg) aktarılmış ve aktarılmamış HeLa hücrelerinde Tbx3 ve PTEN protein düzeyleri, anti-Tbx3 (DyLight 488 işaretli) ve anti-PTEN (PE-A işaretli) antikorları kullanılarak akış sitometrisinde belirlenmiştir.

4.6.3. Tbx3 proteininin PTEN promoterine bağlanma bölgesinin tanımlanması.

Bu aşamaya kadar yapılan deneyler ile Tbx3 proteinin PTEN promoter aktivitesini özgül bir şekilde baskıladığı ve bu baskılama nedeniyle de hücre içi PTEN mRNA ve dolayısıyla protein düzeylerinde azalma olduğu gösterilmiştir. Ancak, hatırlanacağı gibi bu noktaları ispatlamak için kullanılan rekombinant DNA'lar 2295 bç (TB-PTEN) veya 768 bç (CP-PTEN) uzunluğundaki yapılardır (Şekil 4.8). Her ne kadar her iki DNA yapısı üzerinde de olası bir Tbx3 bağlanma dizini bulunuyor olsa da, Tbx3'ün baskılayıcı fonksiyonunu bu olası bölgeye bağlanarak yerine getirip getirmediği belli değildir. Bu konuyu açıklığa kavuşturmak üzere DNA-protein etkileşimlerini gösteren bir teknik olan EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) kullanılmıştır.

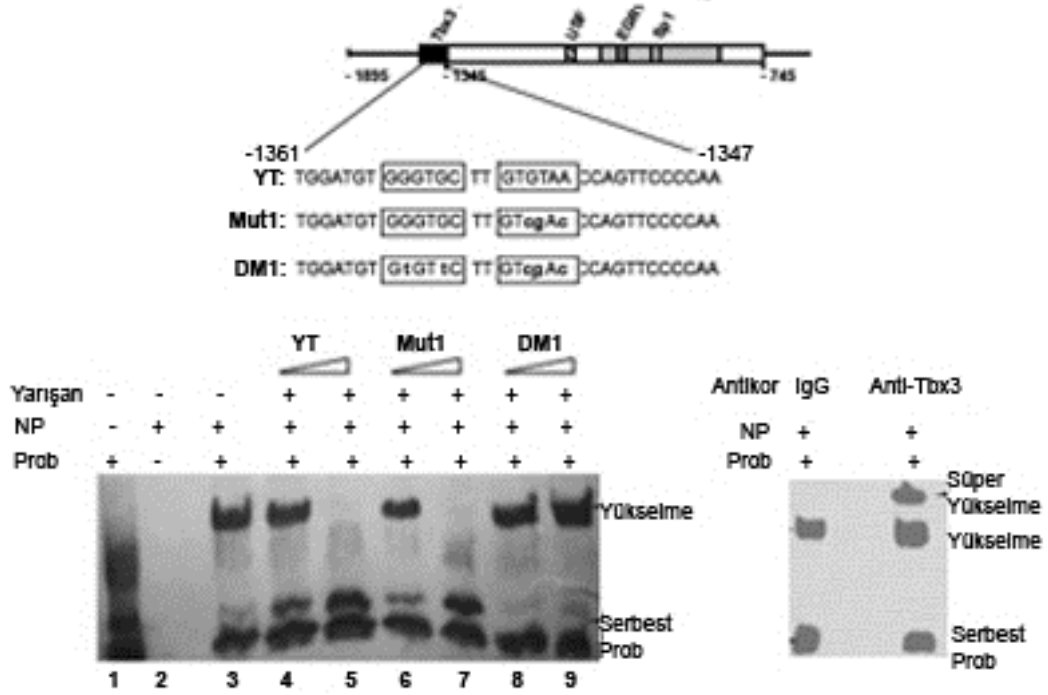
Tbx3'ün PTEN promoterinde saptadığımız olası bağlanma bölgesi -1361.bç ile -1347.bç arasında bulunmaktadır. Tbx proteinleri temel olarak "GTGTGA" dizinine bağlanmakta ancak her bir Tbx proteininin farklı nükleotid tercihleri bulunmaktadır. PTEN promoterinde de iki baz çifti ile ayrılmış, GGGTGC ve GTGTAA bazlarından oluşan, yarım T-bölgesine benzer iki adet DNA bölgesi bulunmaktadır. Bu bölgenin CP-PTEN üzerindeki lokalizasyonu ile olası T-bölgeleri dikdörtgen içerisinde Şekil 4.13.'de gösterilmiştir. Tbx3'ün bu bölgeye bağlanıp bağlanmadığının gösterilebilmesi için iki yarım T-bölgesini de içerecek şekilde 40 bç uzunluğundaki sentetik DNA zinciri sentezlenmiş ve iki ucu biyotin ile işaretlenmiştir. DNA zincirinin dizini şekil üzerinde gösterilmiştir (YT). Tbx3 ekspresyon plasmidi aktarılmış, dolayısıyla Tbx3 proteinini fazlaca içeren HEK hücrelerinden ise total nükleer protein saflaştırılması yapılmıştır (NP). DNA probunun ve nükleer proteinin tek başlarına jelde yürütülmesi, Şekil 4.13'deki jel görüntüsünün 1. ve 2. sıralarında görülmektedir. DNA probu ve nükleer protein birlikte inkübe edilip jele yüklendiklerinde ise serbest proba göre bir "yükselme" oluşmuştur (3. sıra). Ancak, işaretli DNA probu ve nükleer protein ile birlikte ortama "yabanıl tip işaretli yarışmacı DNA"sının artan miktarlarda eklenmesi ile 3. sırada görülen "yükselme"nin kaybolduğu saptanmıştır (4 ve 5.sıralar). Bu bulgular, nükleer protein içerisinde bulunan herhangi bir proteinin, prob olarak kullandığımız 40bç uzunluğundaki DNA'ya bağlandığını göstermektedir.

Proteinin bağlandığı nükleotidleri belirlemek amacıyla ise iki adet işaretli "mutant yarışmacı DNA" hazırlanmıştır. Mut 1 olarak adlandırılan ilk "mutant yarışmacı DNA"sında ilk yarım T bölgesi olduğu gibi bırakılırken ikinci T bölgesi mutasyona uğratılmıştır (GTGTAA dizinleri GTcgAc'ye dönüştürülmüştür) (Şekil 4.13). Fakat artan miktarlarda Mut 1'in DNA probu ve nükleer protein kompleksine eklenmesiyle "yükselme" bantının yine kaybolduğu saptanmıştır (6. ve 7. sıralar). Bu sonuç, ikinci T-bölgesinin mutant olmasına rağmen bir nükleer proteinin buraya bağlanabildiğini, dolayısıyla ikinci T-bölgesinin DNA-protein bağlantısı için gerekli olmadığını göstermektedir. Diğer mutant ise DM1 olarak adlandırılmıştır ve sentetik DNA'da her iki T-bölgesi de mutasyona uğratılmıştır (yabanıl tipteki GGGTGC ile GTGTAA yerine GtGTtC ile GTcgAc). Artan miktarlarda DM1'in DNA probu ve nükleer protein kompleksine eklenmesiyle ise "yükselme" bantının kaybolmadığı görülmüştür (8. ve 9. sıralar). Bu sonuç ise nükleer proteinlerden birinin PTEN

promoteri üzerinde -1361. bç'den başlayan GGGTGC dizinine bağlandığını göstermektedir.

PTEN promoterindeki GGGTGC dizinine bağlanan nükleer proteinin Tbx3 olup olmadığını gösterebilmek amacıyla ise DNA probu ve nükleer protein kompleksi, anti IgG veya anti-Tbx3 antikoruna ile inkübe edilmiş ve elektroforez ile ayrıştırılmıştır. Şekil 14.13 sol panelde görüldüğü gibi, DNA probu ve nükleer proteinlerin oluşturduğu "yükselme" bantı, anti-IgG varlığında herhangi bir değişiklik göstermez iken, anti-Tbx3 antikoruna "yükselme" bantının daha da yükselerek "süper yükselme" oluşturmasına neden olmuştur.

Sonuç olarak bu deney serisiyle; Tbx3 proteininin PTEN promoterinde -1361.bç bölgesinde bulunan ve GGGTGC dizinlerinden oluşan birinci T-bölgesine özgül olarak bağlandığı ispatlanmıştır.



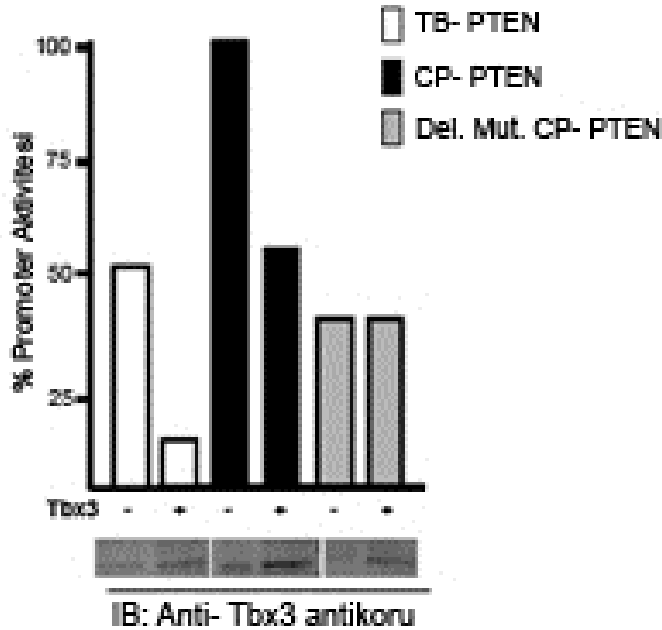
Şekil 4.13. Tbx3, PTEN promoterine özgül olarak bağlanması: Üst tarafta PTEN promoterinin şematik çizimi ve olası Tbx3 bağlanma bölgesi gösterilmiştir (siyah alan). EMSA için hazırlanan sentetik DNA parçalarının dizinleri verilmiş ve -1361 ile -1347. bç leri arasında yerleşmiş olan iki adet T-bölgesi dikdörtgen içine alınarak gösterilmiştir. T-bölgelerinde oluşturulan mutasyonlar küçük harfler ile simgelenmiştir. Yabanıl tip DNA (YT) biotin ile işaretlenerek prob olarak, **işaretlenmeden** ise “YT yarışmacı DNA” olarak kullanılmıştır. İkinci T-bölgesinde mutasyon taşıyan Mut1 ve her iki T-bölgesinde mutasyon taşıyan DM1 DNA parçaları ise **işaretleme yapılmadan** “mutant yarışmacı DNA” olarak kullanılmışlardır. Kompleksler dikey elektroforez ile jelde ayrıştırılmış, nitroselüloz kağıda aktarılmış ve streptavidin içeren tampon solüsyon ile inkübe edilerek görünür hale getirilmişlerdir. Sol taraftaki EMSA görüntüsünde, nükleer bir proteinin birinci T-bölgesindeki GGGTGC nükleotidlere bağlandığı gösterilmektedir. Sağdaki EMSA görüntüsünde ise anti-Tbx3 antikorunun “süper yükselme” oluşturduğu ve dolayısıyla bu dizinlere bağlanan nükleer

4.6.4. Tbx3, PTEN promoterinde bulunan T-bölgesine bağlanarak promoter aktivitesini baskılamaktadır.

EMSA deneyleri ile PTEN promoter bölgesinde -1367. ve -1362.bç leri arasında yerleşmiş olan GGGTGC DNA dizininin Tbx3 proteini için bağlanma bölgesi olduğu saptandıktan sonra bu bölgenin fonksiyonelliği de araştırılmıştır.

Bu amaçla; şekil 4.7’de şematik olarak gösterilmiş olan ve Tbx3 bölgesinin delesyona uğratıldığı Del. Mut. CP-PTEN rekombinant DNA’sı hazırlanmış ve diğer PTEN promoter DNA’ları (TB-PTEN ve CP-PTEN) ile Tbx3 eksprese eden veya boş plazmidlerle birlikte HEK hücrelerine aktarılmıştır. İki gün sonrasında ise hücreler toplanarak hem PTEN promoter aktiviteleri saptanmış, hem de immün blotlar yapılarak Tbx3 cDNA’sı aktarılmış ve aktarılmamış hücrelerdeki Tbx3 protein düzeyleri saptanmıştır. **Şekil 4.14.**’deki immün blotlarda gösterildiği gibi Tbx3 eksprese eden plazmidin aktarıldığı hücrelerde Tbx3 protein düzeyi belirgin olarak artmıştır. Tbx3 proteini ise beklendiği ve defalarca gösterildiği gibi hem TB-PTEN, hem de CP-PTEN promoter aktivitelerini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde baskılamıştır ($p < 0,05$). Tbx3 bağlanma bölgesi içermeyen Del. Mut. CP-PTEN aktivitesinde ise ortamda Tbx3 proteini bulunmasına rağmen (immün blot-son panel) herhangi bir baskılanma gözlenmemiştir.

Bu sonuçlar, Tbx3’ün bağlandığı T-bölgesinin fonksiyonel olduğunu ve doğrudan PTEN promoter aktivitesini etkilediğini göstermektedir.



Şekil 4.14. Tbx3 bağlanma bölgesi içermeyen PTEN promotorunun Tbx3 proteinine duyarısızlaşması: TB-PTEN, CP-PTEN ve Del.Mut. CP-PTEN; Tbx3 cDNAsı içermeyen (-) veya içeren (+) plazmidlerle birlikte HEK hücrelerine aktarılmış ve 48 saat sonra lüsiferaz aktivitesi ölçülerek promoter aktiviteleri saptanmıştır. Sonuçlar “%” olarak sunulmuştur. Tbx3 ekspresyon plazmidinin (+) aktarıldığı hücrelerde Tbx3 protein miktarının arttığı immün blot ile gösterilmiştir. Tbx3 bağlanma bölgesini içermeyen Del.Mut. CP-PTEN aktivitesi, hücrelerde Tbx3 protein bulunmasına rağmen baskılanmamış. PTEN promotoru Tbx3 proteinine duvarsız kalmıştır.

4.6.5. Lösemi Kök Hücrelerinde Tbx3 ve PTEN protein düzeyleri.

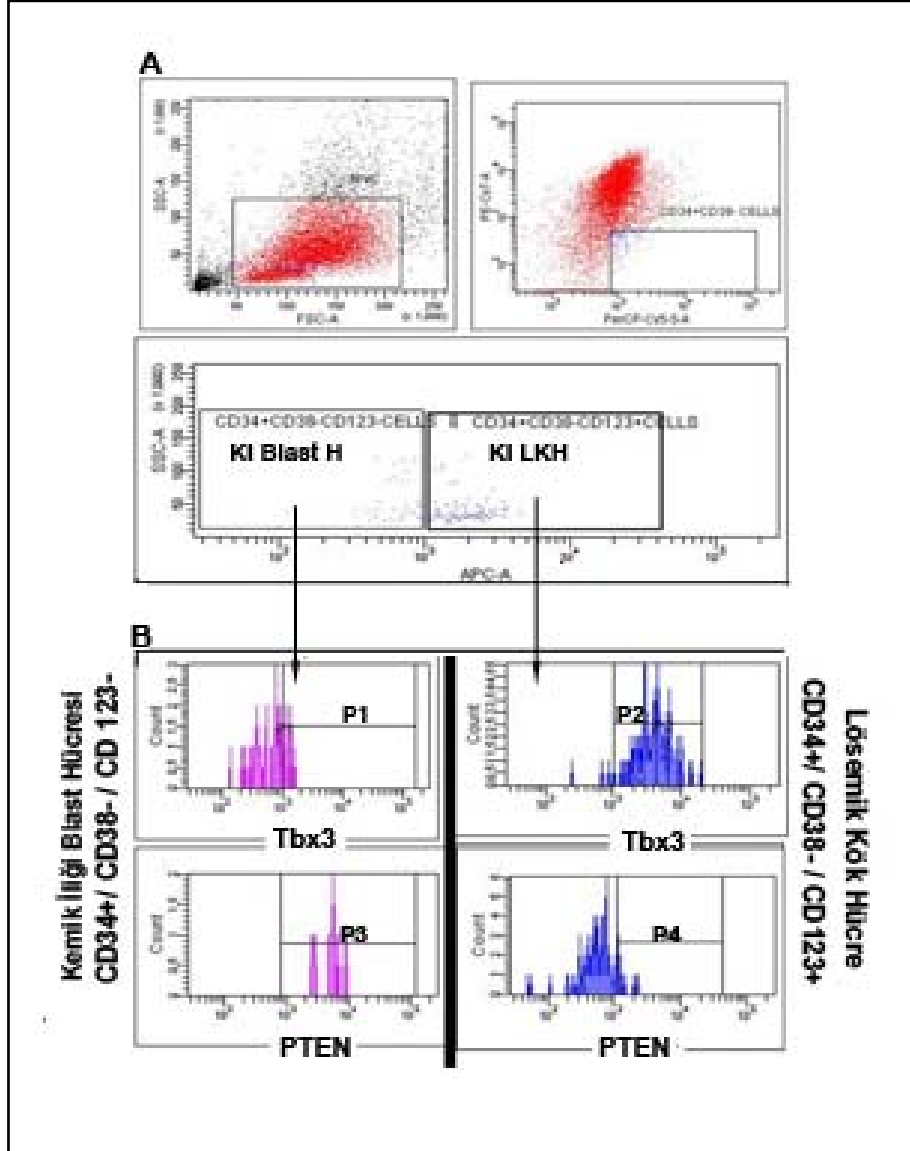
Bu doktora çalışmasında; hematolojik kanserli hastalardan alınan kemik iliği hücrelerinde hem mRNA hem de protein düzeyinde *TBX3* geni ifadesinin artarken *PTEN* geni ifadesinin azalmasının altında yatan moleküler mekanizmanın açığa çıkarılmış olması, kanser gelişiminde bu mekanizmanın öneminin de araştırılmasına neden olmuştur.

Hematolojik kanserlerin gelişimini açıklayan teorilerden biri de “Lösemik Kök Hücre”lerin (LKH) varlığının saptanmasıyla ortaya çıkmıştır. Normal kemik iliği kök hücrelerinden farklı olan bu hücreler, AML hastalarında saptanmış ve CD34+CD38-CD123+ belirteçlerini taşıyan hücre topluluğu olarak tanımlanmıştır (3)

Bu özelliklere sahip hücreler, çalışmamıza katılan ve yeni tanı konulmuş AML hastalarının sadece 5’inde saptanabilmiştir. Kemik iliği örneklerindeki tüm blast hücreleri ile “CD34+CD38-CD123+” lösemik kök hücreler akış sitometrisi ile ayrıştırılmış ve bu iki hücre grubundaki Tbx3 ve PTEN protein düzeyleri her iki proteine özgül, ancak farklı işaretlenmiş antikorlar kullanılarak saptanmıştır. **Şekil 4.15.**’de; kemik iliği blast hücreleri (CD34+CD38-**CD123-**) ile lösemik kök hücrelerin (CD34+CD38-**CD123+**) akış sitometrisinde ayrıştırılmaları (**A**) ve her bir hücre topluluğundaki Tbx3 ve PTEN protein düzeyleri (**B**) görülmektedir.

Tbx3 protein düzeyinin kemik iliği blast hücrelerine oranla LKH’lerinde belirgin olarak yüksek ($p<0,05$) (**Şekil 4.15** –B paneli P1 ve P2), buna karşılık PTEN protein düzeyinin LKH’lerinde belirgin olarak düşük olduğu saptanmıştır (**Şekil 4.15** –B paneli P1 ve P2).

Her ne kadar örneklem sayısı az olsa da bu sonuç, hematolojik kanser gelişiminde Tbx3 proteininin bir tümör baskılayıcı olan PTEN ifadesini susturarak kontrolsüz hücre çoğalmasına ve/veya farklılaşmasına yol açabileceğini göstermektedir. Daha da önemlisi, Tbx3 proteinin lösemik kök hücre tanımlanmasında bir belirteç olarak kullanılabileceğini de düşündürmektedir.



Şekil 4.15. Lösemik Kök Hücrelerde Tbx3 protein düzeyi artarken PTEN düzeyinin azalması: **A.** AML tanısı almış 5 hastanın kemik iliğinden normal blast hücreler (CD34+ /CD38- /CD 123-) ile lösemik kök hücreler (CD34+ /CD38- /CD 123+) akış sitometrisi ile ayrıştırılmıştır. **B.** Her iki hücre topluluğunda da anti-Tbx3 (DyLight488 işaretli) ve anti-PTEN (PE-A işaretli) antikorlar kullanılarak Tbx3 ve PTEN protein düzeyleri saptanmıştır. Tbx3 proteini lösemik kök hücrelerde (**P2**) normal blast hücrelere göre (**P1**) belirgin olarak artmıştır ($p<0,05$). PTEN proteininin ise blast hücrelerinde yüksek (**P3**), lösemi kök hücresinde ise düşük (**P4**) olduğu görülmüştür. KI: Kemik iliği, Blast H: Blast hücrelerin tümü, LKH: Lösemi Kök Hücresi

TARTIŞMA

Hücrelerin bölünerek çoğalmaları ve özelleşmeleri; embriyolojik gelişim ile yaşam boyunca görülen hücre yenilenmesi gibi fizyolojik olayların temelini oluşturmaktadır. Moleküler biyoloji tekniklerinin gelişmesi sayesinde hücre bölünmesi ve özelleşmesini düzenleyen genler ile sinyal yolları ortaya çıkarılmış ve ilginç olarak aynı yolak ve genlerin kanser gelişiminde de rol oynadıkları saptanmıştır. Bu çalışmamızda incelediğimiz Tbx3 ve MITF transkripsiyon faktörleri de hücre döngüsünü durduran proteinleri kodlayan genleri baskılayarak hücreleri aşırı bölünmeye yönlendirmeleri nedeniyle embriyolojik gelişimde olumlu etki göstermelerine rağmen, kanser hücresi gelişiminde de rol oynamaktadırlar. Özellikle *TBX3* geni ifadesinin birçok kanser türünde artmış olduğu (5-7), ve Tbx3'ün sadece kanser hücresi gelişiminde değil, metastazında da rol oynadığı gösterilmiştir (57-58). Kanser tedavisindeki başarı oranının büyük oranda primer kanser hücrelerinin yayılma kapasitesine bağlı olduğu düşünülürse, Tbx3'ün kanser gelişimi ve kanser hücreleri yayılımındaki rolü daha da önem kazanmaktadır.

Tbx3'ün kanser oluşumu ve gelişiminde kullandığı moleküler mekanizmaların bazıları belirlenmiştir (7, 21, 23-24, 59-60). Fakat kanser oluşumu, gelişimi ve kanser hücresi metabolizmasının düzenlenmesinde etkin olan PI3K/PTEN/AKT yolağının Tbx3 tarafından kontrolü ilk kez bu doktora çalışması ile ortaya konulmuştur (61). PI3K/PTEN/AKT yolağının merkezinde yer alan AKT kinaz; protein sentezi, apoptoz ve hücre metabolizmasını düzenleyerek hücre sağ kalımını arttırmaktadır. AKT kinazın etkinliği PI3K'in aktif olmasına veya PTEN aktivitesinin azalmasına bağlıdır. Bu nedenle de kanser hücrelerinde, p53 proteininden sonra en çok PTEN'in etkinliğinde değişimler gözlenmektedir. Fakat birçok solid kanser türünde PTEN geni ifadesinin azalmış olduğu gösterilmiş olsa da, DNA düzeyindeki mutasyonlar sadece glioblastoma multiforma ve endometriyal kanserlerde saptanmış, diğer kanser türlerinde PTEN ifadesi azalmış olsa da, PTEN geni DNA mutasyonlarına rastlanmamıştır (62). Bu gözlemler, PTEN geni ifadesi azalmasının transkripsiyon evresinde, yani mRNA sentezi sırasında gerçekleşebileceğini düşündürmektedir.

PTEN geni maksimum promotor aktivitesi; -1345. ve -745. bç'leri arasında yerleşmiş ve "esas promotor" olarak adlandırılan DNA bölgesi tarafından düzenlenmektedir (53). PTEN promotor bölgesinde yapılan birçok çalışma, transkripsiyon başlangıç noktasının ("0" noktası) solunda ve sağında yerleşmiş olan negatif (baskılayıcı) düzenleyici bölgelerin varlığını ortaya koymuştur (53-54, 63). Ancak bu yayınların esas inceleme konuları dışında kaldığından, PTEN promotor'unda bulunan negatif düzenleyici bölgeler veya bunlara bağlanan transkripsiyon faktörleri tanımlanmamıştır. Yine ilk kez bu doktora çalışması ile Tbx3 transkripsiyon faktörünün PTEN promotor aktivitesini baskıladığı (Şekil 4.8), hücre kültürü ortamında hem HeLa hem de HEK hücreleri kullanılarak gösterilmiştir

(61). Ayrıca, PTEN promotör aktivitesinin USF adlı proteine yanıt olarak beklendiği üzere artış göstermesine rağmen, Tbx3'ün indüklenmiş olan promotör aktivitesini de şiddetle baskıladığı saptanmıştır (Şekil 4.11). İndüklenmiş promotör aktivitesinin baskılanması; USF ve Tbx3 transkripsiyon faktörlerinin aynı anda PTEN promotörüne bağlanmaları ve Tbx3'ün promotör aktivitesini baskılayıcı etkisinin USF'in arttırıcı etkisine baskın olması nedeniyle gerçekleşebileceği gibi Tbx3 proteininin USF proteinini baskılaması sonucunda da gerçekleşmiş olabilir. Bu iki olasılık arasından hangisinin geçerli olduğunun açığa çıkarılması, bu çalışmanın amacı dışında kaldığından irdelenmemiştir. Bu verilerin yanı sıra; artan miktarlardaki Tbx3 proteininin PTEN promotör aktivitesini doza bağımlı şekilde baskılayabilmesi (Şekil 4.10) ve hücre içi PTEN mRNA ile protein düzeylerinde azalmaya neden olması (Şekil 4.12), Tbx3'ün tek başına baskılama görevini yapabildiğini, bu baskılamanın özgül olduğunu ve hücre içinde (*in vivo*) de gerçekleşebileceğini göstermektedir.

Bu çalışmadaki bir diğer yeni bulgu ise; Tbx3'ün PTEN geni promotöründeki özel bir dizine bağlanarak PTEN transkripsiyonunu baskıladığının ilk kez gösterilmesidir. PTEN promotör bölgesinde -1361. ve -1347. bp'leri arasında iki olası Tbx bağlanma bölgesi bulunmaktadır (Şekil 4.13). Yapılan DNA/protein etkileşim analizleri ile Tbx3'ün GGGTGC dizinlerinden oluşan ilk bölgeye özgül olarak bağlandığı saptanmıştır. İkinci bölgenin ise Tbx3 bağlanmasına herhangi bir etkisi olmamıştır. Tbx3'ün bu bölgeye bağlanarak PTEN transkripsiyonunu baskıladığı ise bu bölgenin ortadan kaldırılmasıyla oluşturulan "Del. Mut CP-PTEN" DNA'sında Tbx3 varlığında herhangi bir baskılamanın olmaması ile ispatlanmıştır (Şekil 4.14). *In vitro* koşullarda kesin bir şekilde PTEN promotörüne bağlandığı gösterilen Tbx3, *in vivo* koşullarda da PTEN promotörüne bağlanmakta mıdır? Bu sorunun yanıtı, hücre içi kromozom DNA'sının immünolojik yöntemlerle ayrıştırılması ve kromatin içerisindeki DNA bölgesinin incelenmesi, yani "kromatin immüno-presipitasyon" yöntemi ile gösterilebilir. Öncül verilerimiz, Tbx3'ün *in vivo* olarak da PTEN genini hedeflediği yönündedir. Ancak, kesin sonuca ulaşmak için daha detaylı incelemeler gerekmektedir.

Bu çalışma kapsamında incelediğimiz diğer transkripsiyon faktörü MITF'in ise hücre kültürü ortamında PTEN promotör aktivitesine herhangi bir etkisi olmamıştır (Şekil 4.8). Bir proteinin gen ifadesine etkisi, doğrudan o genin promotör bölgesine bağlanarak düzenlenebileceği gibi diğer transkripsiyon faktörleri ile veya promotör bölgesindeki kromatin yapısında bulunan proteinler ile bağlanarak dolaylı olarak da düzenlenebilir (12). Nitekim henüz yayınlanmamış olan ve bazı projelerimizde birlikte çalıştığımız grubun araştırmalarında, MITF mRNA'sının siRNA tekniği ile susturulması sonucunda PTEN mRNA düzeylerinin arttığı gözlenmiştir (C.R. Goding, Ludwig Institute, UK). Yani MITF, PTEN gen ifadesini baskılayabilmektedir, ancak bu etkisini doğrudan promotör üzerinden değil (Şekil 4.8), henüz bilinmeyen mekanizmalarla dolaylı yollardan göstermektedir. Özetle; bu çalışma kapsamında hücre kültürü ortamında yapılan çalışmalar, PTEN geni promotör aktivitesinin Tbx3 proteini tarafından doğrudan, MITF tarafından ise dolaylı olarak baskılandığını ispatlamıştır.

Tbx3 ve MITF'in PTEN geni ifadesini azaltarak hücreleri bölünmeye götüreceği hipotezimizi ispatlayabilmek amacıyla bir grup hematolojik kanser türü model olarak kullanılmıştır. Hemositoblastın (hematopoetik kök hücre) kendini yenileme ve farklılaşma yeteneği sayesinde kan dokusunu oluşturan tüm olgun hücrelerin yaşam boyunca üretilmesi olayı olan hematopez, çevresel uyaranlar ve gen ifadesini belirleyen transkripsiyonel ağın uyumlu bir şekilde işlediği dinamik bir süreçtir (64). DNA düzeyindeki mutasyonlar, translokasyonlar sonucu farklı genlerin bir araya gelmesi veya epigenetik değişiklikler bu fizyolojik süreci aksatmakta ve kontrolsüz proto-onkogen aktivasyonuna ve/veya tümör baskılayıcı genlerin etkisiz hale gelmelerine neden olmaktadır. Lökositlerde bu tür hataların olması sonucunda ise aşırı lökosit çoğalması görülmekte ve genelde "lösemi" olarak adlandırılan bir grup hematolojik kanserin gelişimine neden olmaktadır. Köken aldıkları (myeloid ve lenfoid) ve içerdikleri özelleşmiş/özeleşmesini tamamlamamış hücre tiplerine göre (kronik ve akut) sınıflandırılan lösemilerin gelişiminde çok sayıda farklı yolak etkindir (65-66). PI3K yolağının öncelikle AML olmak üzere bazı lösemi tiplerinde aşırı aktivasyon gösterdiği bilinmektedir. Bu yolağın baskılayıcısı olan PTEN ise lösemi gelişimini engelleyen bir faktör olarak tanımlanmaktadır. Çünkü PTEN geni susturulmuş farelerde uzun dönemde hemositoblastlar kaybolduğundan hematopoez bozulmakta ve bu hayvanlarda AML ve ALL gelişmektedir. PTEN yokluğunun hem myeloid hem de lenfoid seri hücreleri etkilemesi, PTEN'in hemositoblast farklılaşmasının erken evrelerinde etken olabileceğini düşündürdüğü için önem taşımaktadır (50). Bu çalışmada incelenen AML, KML ve KLL hastalarının kemik iliklerinden elde edilen mono nükleer hücrelerde normal hücrelere göre; *TBX3* gen ifadesinin hem mRNA hem de protein düzeylerinde arttığı, *MITF* gen ifadesinin ise sadece KML ve KLL hücrelerinde arttığı saptanmıştır. Tüm hasta gruplarında *PTEN* geni ifadesinin ise azaldığı görülmüştür (Şekiller: 4.2, 4.3, 4.4 ve tüm sonuçların özetlendiği 4.5). Hücre kültürü ortamında elde edilen verilerimiz dikkate alındığında bu bulgular; Tbx3 ve MITF'in ekspresyonlarının artarak PTEN transkripsiyonunu baskıladığını, dolayısıyla PTEN'in hem mRNA hem de protein düzeylerinin azalmasına neden olduğunu düşündürmektedir. Ancak, lösemili hastaların kemik iliği hücrelerinde de bu mekanizmanın geçerli olduğunu kesin olarak söylemek olanaksızdır. Bu noktanın açıklığa kavuşturulması, şu anda elimizde bulunmayan bazı teknik olanakları kullanarak daha detaylı incelemeler yapılmasını gerektirmektedir.

İstatistiksel olarak anlamlı bulunamamış olsa da *MITF* geni ifadesinin KML ve KLL'de artarken AML'de artmamış olması ilginçtir. Yüksek MITF aktivitesi olan hücrelerin bölünme ve farklılaşmaya yönlendiği, buna karşılık düşük MITF aktiviteli hücrelerin "kök hücre" benzeri özellikler kazandığı hatırlanacak olursa (38), lösemilerin akut veya kronik özellikler kazanmalarında MITF düzeyinin rolü olabileceği akla gelmektedir. Daha geniş hasta serilerinde bu noktanın tekrar değerlendirilmesi önem taşımaktadır. Sonuç olarak bu bulgular ek incelemeler gerektiriyor olsa da; bazı hematolojik kanserlerde *TBX3* ve *MITF* gen ifadelerinin arttığını, buna karşılık *PTEN* geni ifadesinin azaldığını ilk kez gösteriyor olması nedeniyle önem taşımaktadır.

Lösemi hastalarından elde edilen blast hücrelerinin sadece çok küçük bir kısmının *in vivo* koşullarda proliferasyon yapabilmesi veya *in vitro* olarak koloni

oluşturabilmesi nedeniyle, uzun yıllar boyunca, lösemiler de dâhil olmak üzere tüm kanserlerin büyüme potansiyelleri açısından heterojen olduklarına inanılmıştır. İlk kez AML hastalarının blast hücreleri arasından izole edilen, kök hücre özellikleri taşıyan, ancak sağlıklı hematopoetik kök hücreden farklı olduğu saptanan hücrelerin varlığının gösterilmesi “lösemik kök hücre” kavramının da oluşmasına neden olmuştur (67). Daha sonraki yıllarda; ALL, multipl myeloma, meme, santral sinir sistemi, kolorektal ve pankreas kanserlerinde de kanser başlatıcı hücrelerin varlığı saptanmış ve kanser gelişiminde “kanseri kök hücresi” teorisi oluşmuştur (68-72). Kanserlerin; fizyolojik kök hücrelerden farklı yapıdaki kanser kök hücrelerinden gelişebilecek olması ile ilgili teori, Tbx3’ün bazı özellikleri açısından önem taşımaktadır. Tbx3’ün gerek embriyonik kök hücrelerde (ES) gerek indüklenmiş pluripotent kök hücrelerde (iPS) pluripotent özelliklerin korunmasında rol oynadığı ve *Nanog*, *Oct4* ile *Klf4* gibi transkripsiyon faktörlerine benzer etkiler gösterdiği saptanmıştır (73-76). Tbx3’ün pluripotensinin korunmasındaki rolü, birçok kanser türünde görülen artmış ifadesi ile de uyumludur. İlginç olarak, normal hematopoetik kök hücre ve lösemi kök hücrelerinde (LKH) aktif olan genlerin mikroarray yöntemi ile karşılaştırılması sonucunda PTEN geni ifadesinin LKH’larda belirgin olarak azaldığı gösterilmiştir (8-9). Bu saptamalar ve tüm bu doktora çalışması sırasında elde ettiğimiz veriler, Tbx3’ün lösemik kök hücrelerde ifadesinin artabileceğini düşündürmüştür. Nitekim az sayıda da olsa AML hastaları kemik iliği blast hücreleri arasından lösemik kök hücreler akış sitometrisi yöntemiyle ayrıştırılmış ve Tbx3 protein düzeylerinin diğer blast hücrelerine göre belirgin olarak arttığı saptanmıştır. Buna paralel olarak PTEN protein düzeyi ise azalma sergilemiştir (Şekil 4.15). Lösemik kök hücrelerin elde edildiği hasta sayısının çok az (n=5) olmasına rağmen bu bulgu; LKH’lerde Tbx3 ifadesinin arttığının ilk kez gösteriliyor olması ve Tbx3’ün LKH’lerinin tanımlanmasında bir belirteç olarak kullanılabileceği potansiyelini içermesi nedeniyle önem taşımaktadır.

Tbx3’ün gerek kök hücrelerde pluripotensi özelliğinin korunmasındaki rolü gerek hücre döngüsünde görevli bazı genlerin ifadelerinin düzenlenmesindeki rolleri nedeniyle kanser hücresi oluşumundaki önemi açıktır. Bu çalışmada elde edilen bulgular ışığında, şayet *in vivo* koşullarda da PTEN genini baskılıyorsa, bu görevlerini yerine getirirken kullandığı moleküler mekanizmalardan biri daha ortaya çıkarılmış olacaktır. Ancak, PTEN ifadesinin Tbx3 tarafından düzenlenmesinin bir başka potansiyel önemi daha bulunmaktadır: Kanser hücrelerinin köken aldıkları dokudan kan veya lenf damarları yoluyla veya komşu dokulara doğrudan atlayarak yayılması, yani metastaz.

Primer kanser hücrelerinin uzak organlara yayılması “epitelden mezenkime geçiş” (epithelial-to-mesenchymal transition –EMT-) olarak adlandırılan bir mekanizma ile gerçekleşmektedir (77). Baş-boyun skuamöz hücre kanseri (BBSHK) hücre hatlarında yapılan bir çalışma, EMT özellikleri gösteren hücrelerde *TBX3* geni ifadesinin belirgin olarak arttığını göstermiştir (78). Tbx3’ün, BBSHK metastazı yanı sıra serviks, meme ve melanoma metastazlarında da rol oynadığı bilinmektedir (58, 78-80). Kanserlerin büyük bir bölümünde en önemli ölüm nedeni metastazlardır. Aslında metastatik süreç kanser hücresi için çok zordur. Çünkü hücrenin bulunduğu ortamdan kopması veya göç edebilmek için şekil değiştirmesi, apoptotik

mekanizmaları harekete geçirmektedir. Dolayısıyla, kanser hücrelerinin yaşamlarını sürdürebilmek için apoptoza direnç göstermeleri gerekmektedir (81). Yani kanserin tam anlamıyla gelişebilmesi için apoptotik mekanizmaların iflas etmiş olması gerekmektedir. Apotoza direnmeleri kanser hücrelerinin sağ-kalımını arttırsa da göç ettikleri metastatik bölgelerde tümör büyümesinin geçici bir süre durmasına neden olur (sessiz kanser hücresi) (82). Anoikiz; hücrenin bulunduğu ortamdan kopması sonucu gelişen apoptozu tarif etmektedir. İlginç olarak PTEN anoikizde de görev almaktadır (83). Üstelik PTEN ifadesinin susturulduğu meme epitel hücrelerinde “büyüme faktörleri”nden bağımsız bir hücre çoğalmasının olduğu ve bu hücrelerin anoikize dirençli oldukları da gösterilerek PTEN’in doğrudan anoikize olan etkileri ortaya konmuştur (84). EMT benzeri özellikler gösteren ve artmış Tbx3 proteini içeren BBSHK hücrelerinin de anoikize dirençli oldukları saptanmıştır (78). BBSHK’lı hastaların kanserli dokularında hem mRNA hem de protein düzeyinde *TBX3* geni ifadesinin artarken, *PTEN* geni ifadesinin azaldığının gösterilmesi (61), Tbx3’ün PTEN’i baskılayarak, kanser hücrelerinde gözlenen anoikize direncin oluşmasında görev aldığını düşündürmektedir. Tbx3’ün PTEN’i baskılaması *in vivo* koşullarda da geçerli olduğu takdirde Tbx3’ün kanser hücrelerindeki artışı PTEN’i baskılayarak metastatik kapasitenin artmasına ve apoptoza direnç geliştirilmesine neden olabilir. Böylece kanser hücrelerinin sağ-kalımı artarak, uzak organlara göç edebilmelerine olanak sağlanıyor olabilir.

SONUÇLAR

Bilimsel literatürde bulunmayan ve bu doktora çalışması ile ilk kez gösterilen sonuçlar aşağıda sıralanmıştır:

1. *TBX3* gen ifadesi AML, KML ve KLL hastalarının, *MITF* gen ifadesi ise KML ve KLL hastalarının kemik iliği örneklerinde hem mRNA hem de protein düzeyinde artmıştır.
2. AML, KML ve KLL hastalarının kemik iliği örneklerinde PTEN geni ifadesi hem mRNA hem de protein düzeyinde azalmıştır.
3. Tbx3, doğrudan promotör bölgesine bağlanarak PTEN geni ifadesini baskılar ve PI3K/PTEN/AKT yolağının düzenleyicisi olarak görev yapar.
4. MITF, PTEN geni ifadesini henüz bilinmeyen mekanizmalarla dolaylı olarak baskılamaktadır.
5. Lösemi Kök Hücrelerinde Tbx3 protein düzeyleri artarken, PTEN protein düzeylerinin azaldığı saptanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Arthur J. Vander JHS, Dorothy S. Luciano Human Physiology: The Mechanism of Body Function. Eighth Edition ed2003.
2. Harvey Lodish AB, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Matthew P. Scott, Anthony Bretscher, Hidde Ploegh, Paul Matsudaira Molecular Cell Biology six th Edition ed2007.
3. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997 Jul;3(7):730-7.
4. Brivanlou AH, Darnell JE, Jr. Signal transduction and the control of gene expression. *Science.* 2002 Feb 1;295(5556):813-8.
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.* 2004 Aug 1;64(15):5132-9.
6. Lomnytska M, Dubrovska 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.* 2006 Jan 15;118(2):412-21.
7. Renard CA, Labalette C, Armengol C, Cougot D, Wei Y, Cairo S, 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.* 2007 Feb 1;67(3):901-10.
8. Chen Y, Li D, Li S. The Alox5 gene is a novel therapeutic target in cancer stem cells of chronic myeloid leukemia. *Cell Cycle.* 2009 Nov 1;8(21):3488-92.
9. Peng C, Chen Y, Yang Z, Zhang H, Osterby L, Rosmarin AG, et al. PTEN is a tumor suppressor in CML stem cells and BCR-ABL-induced leukemias in mice. *Blood.* 2010 Jan 21;115(3):626-35.
10. William S. Klug MRC, Charlotte A. Spencer. *Concepts of Genetics* Eighth Edition ed2005.
11. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 2003 Jun;36(3):131-49.
12. Alberts B JA, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell.* 4th edition. 2002.

13. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976 Oct 1;194(4260):23-8.
14. O'Connor ML, Xiang D, Shigdar S, Macdonald J, Li Y, Wang T, et al. Cancer stem cells: A contentious hypothesis now moving forward. *Cancer Lett*. 2014 Mar 28;344(2):180-7.
15. Bruce WR, Van Der Gaag H. A Quantitative Assay for the Number of Murine Lymphoma Cells Capable of Proliferation in Vivo. *Nature*. 1963 Jul 6;199:79-80.
16. Park CH, Bergsagel DE, McCulloch EA. Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay. *J Natl Cancer Inst*. 1971 Feb;46(2):411-22.
17. Smalley M, Ashworth A. Stem cells and breast cancer: A field in transit. *Nat Rev Cancer*. 2003 Nov;3(11):832-44.
18. Cozzio A, Passegue E, Ayton PM, Karsunky H, Cleary ML, Weissman IL. Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes & development*. 2003 Dec 15;17(24):3029-35.
19. Kispert A, Hermann BG. The Brachyury gene encodes a novel DNA binding protein. *The EMBO journal*. 1993 Dec;12(12):4898-9.
20. Lu J, Li XP, Dong Q, Kung HF, He ML. TBX2 and TBX3: the special value for anticancer drug targets. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Dec;1806(2):268-74.
21. Rowley M, Grothey E, Couch FJ. The role of Tbx2 and Tbx3 in mammary development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2004 Apr;9(2):109-18.
22. Bamshad M, Le T, Watkins WS, Dixon ME, Kramer BE, Roeder AD, et al. The spectrum of mutations in TBX3: Genotype/Phenotype relationship in ulnar-mammary syndrome. *Am J Hum Genet*. 1999 Jun;64(6):1550-62.
23. Hoogaars WM, Barnett P, Rodriguez M, Clout DE, Moorman AF, Goding CR, et al. TBX3 and its splice variant TBX3 + exon 2a are functionally similar. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2008 Jun;21(3):379-87.
24. Carlson H, Ota S, Song Y, Chen Y, Hurlin PJ. Tbx3 impinges on the p53 pathway to suppress apoptosis, facilitate cell transformation and block myogenic differentiation. *Oncogene*. 2002 May 30;21(24):3827-35.

25. Chapman DL, Garvey N, Hancock S, Alexiou M, Agulnik SI, Gibson-Brown JJ, et al. Expression of the T-box family genes, Tbx1-Tbx5, during early mouse development. *Dev Dyn*. 1996 Aug;206(4):379-90.
26. Prince S, Carreira S, Vance KW, Abrahams A, Goding CR. Tbx2 directly represses the expression of the p21(WAF1) cyclin-dependent kinase inhibitor. *Cancer Res*. 2004 Mar 1;64(5):1669-74.
27. Lowings P, Yavuzer U, Goding CR. Positive and negative elements regulate a melanocyte-specific promoter. *Mol Cell Biol*. 1992 Aug;12(8):3653-62.
28. Goding CR. Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage. *Genes & development*. 2000 Jul 15;14(14):1712-28.
29. Hodgkinson CA, Moore KJ, Nakayama A, Steingrimsson E, Copeland NG, Jenkins NA, et al. Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell*. 1993 Jul 30;74(2):395-404.
30. Steingrimsson E, Copeland NG, Jenkins NA. Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network. *Annu Rev Genet*. 2004;38:365-411.
31. Steingrimsson E, Moore KJ, Lamoreux ML, Ferre-D'Amare AR, Burley SK, Zimring DC, et al. Molecular basis of mouse microphthalmia (mi) mutations helps explain their developmental and phenotypic consequences. *Nat Genet*. 1994 Nov;8(3):256-63.
32. Carreira S, Goodall J, Aksan I, La Rocca SA, Galibert MD, Denat L, et al. Mitf cooperates with Rb1 and activates p21Cip1 expression to regulate cell cycle progression. *Nature*. 2005 Feb 17;433(7027):764-9.
33. Wellbrock C, Marais R. Elevated expression of MITF counteracts B-RAF-stimulated melanocyte and melanoma cell proliferation. *J Cell Biol*. 2005 Aug 29;170(5):703-8.
34. Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, et al. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature*. 2005 Jul 7;436(7047):117-22.
35. Carreira S, Goodall J, Denat L, Rodriguez M, Nuciforo P, Hoek KS, et al. Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes & development*. 2006 Dec 15;20(24):3426-39.
36. Giuliano S, Cheli Y, Ohanna M, Bonet C, Beuret L, Bille K, et al. Microphthalmia-associated transcription factor controls the DNA damage

- response and a lineage-specific senescence program in melanomas. *Cancer Res.* 2010 May 1;70(9):3813-22.
37. Carreira S, Liu B, Goding CR. The gene encoding the T-box factor Tbx2 is a target for the microphthalmia-associated transcription factor in melanocytes. *J Biol Chem.* 2000 Jul 21;275(29):21920-7.
 38. Hoek KS, Goding CR. Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010 Dec;23(6):746-59.
 39. KERN WF. PDQ Hematoloji2005.
 40. NCCN.<http://www.nccn.org/default.aspx>.
 41. Friedman AD. Normal and malignant hematopoiesis. *Oncogene.* [Comparative Study]. 2007 Oct 15;26(47):6686.
 42. Zhang J, Grindley JC, Yin T, Jayasinghe S, He XC, Ross JT, et al. PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention. *Nature.* 2006 May 25;441(7092):518-22.
 43. Myers MP, Stolarov JP, Eng C, Li J, Wang SI, Wigler MH, et al. P-TEN, the tumor suppressor from human chromosome 10q23, is a dual-specificity phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Aug 19;94(17):9052-7.
 44. Raftopoulou M, Etienne-Manneville S, Self A, Nicholls S, Hall A. Regulation of cell migration by the C2 domain of the tumor suppressor PTEN. *Science.* 2004 Feb 20;303(5661):1179-81.
 45. Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem.* 1998 May 29;273(22):13375-8.
 46. Planchon SM, Waite KA, Eng C. The nuclear affairs of PTEN. *J Cell Sci.* 2008 Feb 1;121(Pt 3):249-53.
 47. Zhang S, Yu D. PI(3)king apart PTEN's role in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2010 Sep 1;16(17):4325-30.
 48. Puc J, Keniry M, Li HS, Pandita TK, Choudhury AD, Memeo L, et al. Lack of PTEN sequesters CHK1 and initiates genetic instability. *Cancer Cell.* 2005 Feb;7(2):193-204.
 49. Shen WH, Balajee AS, Wang J, Wu H, Eng C, Pandolfi PP, et al. Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell.* 2007 Jan 12;128(1):157-70.

50. Yilmaz OH, Valdez R, Theisen BK, Guo W, Ferguson DO, Wu H, et al. Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature*. 2006 May 25;441(7092):475-82.
51. Yaşar A. Hematolojik Kanserlerde TBX3 mRNA ve Protein Düzeyinin Saptanması Yüksek Lisans Tezi 2008.
52. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med*. 1996 May;2(5):561-6.
53. Sheng X, Koul D, Liu JL, Liu TJ, Yung WK. Promoter analysis of tumor suppressor gene PTEN: identification of minimum promoter region. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002 Mar 29;292(2):422-6.
54. Pezzolesi MG, Zbuk KM, Waite KA, Eng C. Comparative genomic and functional analyses reveal a novel cis-acting PTEN regulatory element as a highly conserved functional E-box motif deleted in Cowden syndrome. *Hum Mol Genet*. 2007 May 1;16(9):1058-71.
55. Virolle T, Adamson ED, Baron V, Birle D, Mercola D, Mustelin T, et al. The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signalling. *Nat Cell Biol*. 2001 Dec;3(12):1124-8.
56. Whelan JT, Forbes SL, Bertrand FE. CBF-1 (RBP-J kappa) binds to the PTEN promoter and regulates PTEN gene expression. *Cell Cycle*. 2007 Jan 1;6(1):80-4.
57. Hansel DE, Rahman A, House M, Ashfaq R, Berg K, Yeo CJ, et al. Met proto-oncogene and insulin-like growth factor binding protein 3 overexpression correlates with metastatic ability in well-differentiated pancreatic endocrine neoplasms. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004 Sep 15;10(18 Pt 1):6152-8.
58. Lyng H, Brovig RS, Svendsrud DH, Holm R, Kaalhus O, Knutstad K, et al. Gene expressions and copy numbers associated with metastatic phenotypes of uterine cervical cancer. *BMC Genomics*. 2006;7:268.
59. Brummelkamp TR, Kortlever RM, Lingbeek M, Trettel F, MacDonald ME, van Lohuizen M, et al. TBX-3, the gene mutated in Ulnar-Mammary Syndrome, is a negative regulator of p19ARF and inhibits senescence. *J Biol Chem*. 2002 Feb 22;277(8):6567-72.
60. Carlson H, Ota S, Campbell CE, Hurlin PJ. 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*. 2001 Oct 1;10(21):2403-13.

61. Burgucu D, Guney K, Sahinturk D, Ozbudak IH, Ozel D, Ozbilim G, et al. Tbx3 represses PTEN and is over-expressed in head and neck squamous cell carcinoma. *BMC cancer*. 2012;12:481.
62. Eng C. PTEN: one gene, many syndromes. *Hum Mutat*. 2003 Sep;22(3):183-98.
63. Stambolic V, MacPherson D, Sas D, Lin Y, Snow B, Jang Y, et al. Regulation of PTEN transcription by p53. *Mol Cell*. 2001 Aug;8(2):317-25.
64. Iwasaki H, Akashi K. Hematopoietic developmental pathways: on cellular basis. *Oncogene*. 2007 Oct 15;26(47):6687-96.
65. Jamieson CH, Weissman IL, Passegue E. Chronic versus acute myelogenous leukemia: a question of self-renewal. *Cancer Cell*. 2004 Dec;6(6):531-3.
66. Krause DS, Van Etten RA. Right on target: eradicating leukemic stem cells. *Trends Mol Med*. 2007 Nov;13(11):470-81.
67. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994 Feb 17;367(6464):645-8.
68. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 1;100(7):3983-8.
69. Castor A, Nilsson L, Astrand-Grundstrom I, Buitenhuis M, Ramirez C, Anderson K, et al. Distinct patterns of hematopoietic stem cell involvement in acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med*. 2005 Jun;11(6):630-7.
70. Matsui W, Huff CA, Wang Q, Malehorn MT, Barber J, Tanhehco Y, et al. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood*. 2004 Mar 15;103(6):2332-6.
71. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*. 2007 Jan 4;445(7123):106-10.
72. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. 2003 Sep 15;63(18):5821-8.
73. Han J, Yuan P, Yang H, Zhang J, Soh BS, Li P, et al. Tbx3 improves the germ-line competency of induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2010 Feb 25;463(7284):1096-100.

74. Ivanova N, Dobrin R, Lu R, Kotenko I, Levorse J, DeCoste C, et al. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature*. 2006 Aug 3;442(7102):533-8.
75. Lu R, Yang A, Jin Y. Dual functions of T-box 3 (Tbx3) in the control of self-renewal and extraembryonic endoderm differentiation in mouse embryonic stem cells. *J Biol Chem*. 2011 Mar 11;286(10):8425-36.
76. Niwa H, Ogawa K, Shimosato D, Adachi K. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature*. 2009 Jul 2;460(7251):118-22.
77. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. 2011 Mar 25;331(6024):1559-64.
78. Humtsoe JO, Koya E, Pham E, Aramoto T, Zuo J, Ishikawa T, et al. Transcriptional profiling identifies upregulated genes following induction of epithelial-mesenchymal transition in squamous carcinoma cells. *Exp Cell Res*. 2012 Feb 15;318(4):379-90.
79. Mowla S, Pinnock R, Leaner VD, Goding CR, Prince S. PMA-induced up-regulation of TBX3 is mediated by AP-1 and contributes to breast cancer cell migration. *Biochem J*. 2011 Jan 1;433(1):145-53.
80. Rodriguez M, Aladowicz E, Lanfrancone L, Goding CR. Tbx3 represses E-cadherin expression and enhances melanoma invasiveness. *Cancer Res*. 2008 Oct 1;68(19):7872-81.
81. Martin SS, Vuori K. Regulation of Bcl-2 proteins during anoikis and amorphosis. *Biochim Biophys Acta*. 2004 Jul 5;1692(2-3):145-57.
82. Riethdorf S, Wikman H, Pantel K. Review: Biological relevance of disseminated tumor cells in cancer patients. *Int J Cancer*. 2008 Nov 1;123(9):1991-2006.
83. Yamada KM, Araki M. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *J Cell Sci*. 2001 Jul;114(Pt 13):2375-82.
84. Vitolo MI, Weiss MB, Szmackinski M, Tahir K, Waldman T, Park BH, et al. Deletion of PTEN promotes tumorigenic signaling, resistance to anoikis, and altered response to chemotherapeutic agents in human mammary epithelial cells. *Cancer Res*. 2009 Nov 1;69(21):8275-83.

ÖZGEÇMİŞ

11.06.1979 tarihinde Sivas’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Sivas’da tamamladı. 2000 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Tıbbi Laboratuvar bölümünden mezun oldu. 2000-2005 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Merkezinde çalıştı. 2004 yılında Akdeniz Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünden mezun oldu. 2007 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İç Hastalıkları Anabilim Dalı İmmünohematoloji yüksek lisans programından mezun oldu. 2008 yılında aynı enstitüye bağlı Fizyoloji doktora programına başladı, halen aynı enstitüde araştırma görevlisi olarak çalışmalarına devam etmektedir.

EKLER

1.Ü.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: B.30.2.AKD.0.20.05.06/
Konu:

09/04/2012

KARAR

Kurulun Adı, Adresi : Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu,
Dumlupınar Bulvarı Kampüs
07070/ANTALYA

Toplantı Tarihi ve Karar No : 09.04.2012/53

Araştırmanın tam adı : "Hematolojik Malignitelerde MITF ve Tbx3
Proteinlerinin Rolü"

Sorumlu araştırmacının ismi : Prof.Dr. Bahriye YAVUZER

Sorumlu Araştırmacı Prof.Dr. Bahriye YAVUZER tarafından yürütülecek olan "Hematolojik Malignitelerde MITF ve Tbx3 Proteinlerinin Rolü" adlı çalışmanın yapılmasında etik açıdan sakınca olmadığı kararı alınmıştır.

Araştırmacıya çalışmalarında başarılar dileriz.

Prof.Dr. Ata Nevzat YALÇIN
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

Prof.Dr. Ata Nevzat YALÇIN
Başkan

Doç.Dr. Sebahat ÖZDEM
Başkan Yardımcısı

Yrd.Doç.Dr. Hafize ÖZTÜRK TÜRKMEN
Raportör

Prof.Dr. Mustafa AKÇAKUŞ
Üye

Uzm.Dr. İbrahim ASLAN
Üye (Görevli)

Prof.Dr. Yıldırım ÇETE
Üye (İzinli)

Prof.Dr. Levent DÖNMEZ
Üye

Prof.Dr. Ömer GEÇİCİ
Üye

Prof.Dr. İlhan GÖLBAŞI
Üye

Yrd.Doç.Dr. Ömer Halil ÇOLAK
Üye

Doç.Dr. Selahattin KUMRU
Üye (İzinli)

Prof.Dr. Çağlar ÖGÜTMAN
Üye

Kim.Müh. Mağhar SOYKAM
Üye

Prof.Dr. Ümit Kemal ŞENTÜRK
Üye

Prof.Dr. Zafer ZEYTİN
Üye(Şehir dışında)