

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**LÖSEMİLERDE ID-4 VE IKAROS GEN ANLATIMININ
NOTCH SİNYAL YOLAĞI İLE İLİŞKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

ORKUN GÜRBÜZ

**DANIŞMAN
PROF.DR.NEJAT DALAY**

**TEMEL ONKOLOJİ ANABİLİM DALI
DENEYSEL VE MOLEKÜLER ONKOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2011

TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı Dencysci ve Moleküler Onkoloji Programında Orkun GÜRBÜZ tarafından hazırlanan "Lösemilerde ID-4 ve Ikarson Gen Anlatımının Notch Sinyal Yoluyla İlişkisinin Araştırılması" başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

21 / 06 / 2011

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)

1. Prof. Dr. Nejat DALAY / İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü / Temel Onkoloji / Danışman
2. Prof. Dr. Nur BUYRU / İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi / Tıbbi Biyoloji
3. Prof. Dr. Meliha NALÇACI / İ.Ü. İstanbul Tıp Fakültesi / İç Hastalıkları
4. Prof. Dr. Canan ALATI / İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü / Klinik Onkoloji
5. Doç. Dr. Uğur GEZER / İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü / Temel Onkoloji

İmzası

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

ORKUN GÜRBÜZ

İTHAF

Eşim'e

TEŞEKKÜR

İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü Müdürü Prof.Dr. Erkan Topuz'a

Çalışmalarımda bana yön veren, tez danışmanım, değerli hocam Prof.Dr. Nejat Dalay'a

Prof.Dr. Vildan Yasasever'e

Prof.Dr. Hülya Özbek'e

Doç.Dr. Uğur Gezer'e

Prof.Dr.Meliha Nalçacı'ya

Prof.Dr.Nur Buyru'ya

Prof.Dr.Canan Alatlı'ya

Desteklerini esirgemeyen değerli meslektaşlarım; Dr. Semra Demokan, Dr. Mustafa Işın, Dr. Ebru Yörüker, MSc. Zübeyde Kayım, Demet Akdeniz, Nazlı Uçunoğlu, Müge Kovancılar, Buğra Tuncer, Tayfur Eren, Seda Kılıç, Özge Şükrüoğlu, Ufuk Mert, Emre Özgür, Mukaddes Avşar, Türkan Şen Feradoğlu, Harun Fırtına, Arzu Burnuva, Necmiye Koçak'a

Eşim Dt. Özge Gürbüz'e

Destekleri için aileme

teşekkür ederim

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 4226

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İV
İTHAF.....	V
TEŞEKKÜR.....	VI
İÇİNDEKİLER	Vİİ
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİ
ÖZET	Xİİ
ABSTRACT.....	Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. LÖSEMİLER	3
2.1.1. AKUT LÖSEMİLER	3
2.1.1.1. AML	4
2.1.1.2. ALL	5
2.1.2. KRONİK LÖSEMİLER.....	5
2.1.2.1. KML	5
2.1.2.2. KLL	7
2.2. Notch Sinyal Yolağı.....	8
2.2.1. ID-4 Geni ve Notch sinyal yolağı	11
2.2.2. İkaros Geni ve Notch Sinyal Yolağı	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	14
3.1. Gereç	14
3.1.1. Materyal	14
3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler	15
3.1.3. Kullanılan Cihazlar	15
3.1.4. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler.....	16
3.2. Yöntemler	17
3.2.1. Tam Kandan Lökosit İzolasyonu	17

3.2.2. Lökositlerden RNA izolasyonu.....	17
3.2.3. Agaroz Jelde RNA'ların Kontrolü	18
3.2.3.1. Agaroz Jelin Hazırlanması	18
3.2.3.2. Agaroz Jelde Örnekleri Yürütme İşlemi	19
3.2.4. RNA'dan cDNA Sentezi	19
3.2.5. Real-Time PCR	20
3.2.6. Elde Edilen Verilerin Değerlendirilmesi.....	22
4. BULGULAR.....	23
4.1. Gen ifadelerinin değerlendirilmesi	24
TARTIŞMA	34
KAYNAKLAR	37
FORMLAR	44
ETİK KURUL KARARI	47
PATENT HAKKI İZNİ	50
TELİF HAKKI İZNİ.....	51
ÖZGEÇMİŞ	52

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3-1 Hasta ve Kontrol Gruplarının Özellikleri.....	14
Tablo 3-2 Hastalık Gruplarına Göre Hastaların Dağılımları	14
Tablo 3-3 cDNA Sentezinin Gerçekleştirildiği Reaksiyon Koşulları.....	19
Tablo 3-4 Boyaların Dalga Boyları	21
Tablo 3-5 Real-Time PCR Koşulları	21
Tablo 4-1 Hasta Grubunda Araştırılan Genlere Ait Ct Değerleri.....	26
Tablo 4-2 Sağlıklı Kontrol Grubunda Genlere Ait Ct Değerleri	28
Tablo 4-3 Sağlıklı Kontrollerin Ortalama ve Standart Sapma Değerleri.....	29
Tablo 4-4 Hasta Grubunda $\Delta\Delta Ct$ Değerleri.....	30
Tablo 4-5 Gen İfadelerindeki Değişim Oranları.....	33

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1 9;22 Translokasyonu	6
Şekil 4-1 Standart Dilüsyonların Real-Time PCR Eğrileri.....	23
Şekil 4-2 Seri Dilüsyonlar Yardımıyla Elde Edilen Standart Eğri	24
Şekil 4-3 Hes1 Genine Ait Real-Time PCR Eğrileri	24
Şekil 4-4 Hey1 Genine Ait Real-Time PCR Eğrileri.....	25
Şekil 4-5 ID-4 Genine Ait Real-Time PCR Eğrileri.....	25
Şekil 4-6 Ikaros Genine Ait Real-Time PCR Eğrileri	25

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

KML: Kronik Miyeloid Lösemi

AML: Akut Miyeloid Lösemi

KLL: Kronik Lenfoid Lösemi

KLL: Kronik Lenfoid Lösemi

PCR: Polimeraz Chain Reaction

FAB: French American British

EBV: Epstein Barr Virüsü

HTLV: İnsan T-Lenfotropik Virüsü

MDS: Miyelodisplastik Sendrom

ÖZET

Gürbüz O. Lösemilerde ID-4 ve Ikaros Gen Anlatımının Notch Sinyal Yolağı İle İlişkisinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Temel Onkoloji ABD. Yüksek Lisans. İstanbul. 2011.

Kan hücrelerinin farklılaşmasında görev alan Notch sinyal yolağının hedef genleri olan Hes1 ve Hey1 ile bir tümör baskılayıcı gen olan Ikaros ve bu genlerin transkripsiyonunu düzenleyen ID-4 geninde oluşan değişiklikler lösemilerin oluşmasına neden olurlar. Hücrenin farklılaşması sırasında sonucu belirleyen Ikaros geni Notch sinyal yolağı ile denge halindedir. Ikaros geninin ifadesinin azalması Notch sinyal yolağının hedef genlerinin ifadesini arttırır. ID-4 geninin ifadesi azaldığında Hes1 ve Hey1 genlerinde ifade artışı görülür.

Bu çalışma, kan hücrelerinde farklılaşmayı düzenleyen Notch sinyal yolağının Ikaros ve ID-4 geni ile ilişkisinin araştırılması amacıyla yapılmıştır. Çalışmada, lösemi hücrelerindeki genlerin ifade düzeyleri Real-Time PCR yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Akut ve kronik lösemili toplam 110 hasta ile 32 sağlıklı kontrol değerlendirilmiştir.

Çalışma sonucunda, hastaların %100'ünde Hey1 geninin ifadesinde, %73'ünde ise Hes1 geninin ifadesinde artış görülmüştür. Hastaların % 84,6'sında ID-4 geninin ifadesinde %51,3'ünde ise Ikaros geninin ifadesinde azalma gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler : Lösemi, gen ifadesi, Ikaros, ID-4, Notch

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 4226

ABSTRACT

Gurbuz O. The Investigation Of Notch Signalling Pathway Relationship with ID-4 And Ikaros Genes In Leukemias. İstanbul University, Institute of Health Science, Basic Oncology Department Master Thesis. İstanbul (2011)

Changes in the expression patterns of the Hes1 and Hey1 genes, which are the target genes of the Notch signaling pathway, the tumor suppressor gene Ikaros, and ID-4, which is involved in the regulation of the genes, may lead to the development of leukemia. The Ikaros gene expression, which has a pivotal role in determining the fate of cells during differentiation, is in balance with the Notch signaling pathway. A decrease in Ikaros expression results in increased expression of the target genes of the Notch pathway. Likewise, a decrease in ID-4 expression leads to an increase in the Hes1 and Hey1 expression levels.

In the current study, the relationship between the Notch signaling pathway and the expression patterns of the Hes1, Hey1, Ikaros and ID-4 genes has been investigated. Expression levels were measured by Real-Time PCR. 110 patients with acute and chronic leukemias and 32 healthy controls were analysed.

Hey1 and Hes1 gene expression levels were significantly increased in the patients. Expression of ID-4 decreased in 84.6% of patients while Ikaros gene expression was decreased in 51.3% of the samples.

Key Words: Leukemia. Gene expression, Ikaros, ID-4, Notch

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 4226

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Lösemiler; gelişen genetik kusurlardan ötürü myeloid veya lenfoid kan hücrelerinin üretimi sırasında gelişimin belirli bir evrede duraklaması sonucunda ortaya çıkan, hücrelerin sınırsız proliferasyon özelliği kazandığı hastalıklardır.

ABD verilerine göre lösemiler tüm kanserlerin % 3'ü kadarını oluştururlar. Ülkemizde ise lösemiler, tüm kanserler arasında % 4.1 gibi bir oranda görülmektedir. Kadınlara göre erkeklerde daha sık görülürler. Kalıtsal genetik problemlerin yanı sıra kimyasalların ve radyasyon etkisi, çevresel faktörler gibi etkenler de lösemilerin gelişmesine neden olabilir. Hücre farklılaşmasında ve gelişmesindeki mekanizmalarda meydana gelen bozukluklar da lösemilerin oluşmasında rol oynar.

Lösemi hücrelerinde en sık görülen genetik değişiklikler; kromozomal translokasyonlar, tümör baskılayıcı genlerde oluşan mutasyonlar, farklılaşma sırasında genetik kusurlara bağlı olarak ortaya çıkan hücrelerarası sinyal bozuklukları ve hücre döngüsündeki bozukluklardır.

Hematopoietik hücre farklılaşması ve gelişimindeki önemli sinyal yollarından biri olan Notch sinyal yolağı kan hücrelerinin farklılaşmasını kontrol eder. Notch sinyal yolağı, Hey ve Hes gen ailesinden olan ve kan hücrelerinin farklılaşmasında görev alan Hes1 ile Hey1 genlerinin transkripsiyonunu düzenler. Ikaros ise kan hücrelerinin kaderini belirleyen önemli bir tümör baskılayıcı gendir. Notch sinyal yolağı ile etkileşerek, hücrenin farklılaşmasında ve hücre döngüsünde önemli rol oynar ve Notch sinyalinin ürünü olan Hes ve Hey genlerinin transkripsiyonunu dengede tutar. Kan hücrelerinde çok aktif olan ID-4 geni, transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasını kontrol eder. ID-4 ifadesinin azalması, transkripsiyona giden yolda Notch proteininin DNA'ya bağlanmasını sağladığından ID-4 gen ifadesinin azalması Notch sinyaline bağlı Hes1 ve Hey1 genlerinin transkripsiyonunun artmasına neden olur. Böylelikle Ikaros, ID-4 ve Notch proteinlerindeki ifade değişiklikleri hücre farklılaşmasını ve gelişimini etkiler.

Bu çalışma, Notch sinyal yolağının hedef genleri olan Hes1, Hey1, ID-4 ve Ikaros genlerinin lösemi hücrelerindeki ifade düzeylerini belirlemek ve lösemilerde bu genlerin arasındaki ilişkileri araştırmak amacı ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada, akut ve kronik lösemili hastaların periferik kan ve kemik iliği örnekleri, kontrol olarak ise sağlıklı bireylerin periferik kan örnekleri kullanılmıştır. Örneklerde; Hes1, Hey1, Ikaros ve ID-4 genlerinin ifade düzeyleri incelenerek, sağlıklı bireyler ile karşılaştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. LÖSEMİLER

Lösemilerin oluşma nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte ortaya çıkan genetik kusurlardan ötürü myeloid veya lenfoid hücrelerin üretimi sırasında gelişmenin belirli bir evrede duraklamasıyla hücrelerin sınırsız proliferasyon özelliği kazandığı hastalıklardır. Lösemiler, akut ve kronik olmak üzere iki ana alt gruba ayrılırlar [30].

2.1.1. AKUT LÖSEMİLER

Akut Lösemiler, hematopoetik sisteme ait olgunlaşmamış hücrelerin neoplastik proliferasyonu sonucunda ortaya çıkarlar [61]. Hücre olgunlaşması belirli bir aşamada durur ve hatalı bir klonal transformasyon oluşur. Lösemik hücrelerin kısa sürede kemik iliğinde çoğalması ile anemi, hemoraji ve enfeksiyon gibi semptom ve bulgular ortaya çıkar [35]. Akut lösemiler, kendi içlerinde AML (akut miyeloblastik lösemi) ve ALL (akut lenfoblastik lösemi) olmak üzere iki alt gruba ayrılır. FAB (Fransa, Amerika ve İngiltere’de bir grup uzman tarafından oluşturulmuş kemik iliğindeki blast hücre sayısının yüzde cinsinden değerine bağlı sınıflama) sınıflandırmasına göre AML kendi içinde sekiz farklı gruba ayrılır [4]. ALL ise immünolojik ve morfolojik olarak iki farklı şekilde sınıflandırılır. İmmünolojik olarak köken aldığı hücreye göre T ve B olarak adlandırılırken, morfolojik olarak L1, L2 ve L3 olarak sınıflandırılır [4,37].

Akut lösemiler tüm kanserlerin %3 kadarını oluştururlar. AML insidansı, yüzbinde 2,4 , ALL insidansı ise yüzbinde 1,3 kadardır [4]. ABD’de yılda yaklaşık olarak 4000 kişi ALL’ye, 9000 kişi ise AML’ye yakalanmaktadır. Akut lösemilerin insidansı tüm dünyada yaklaşık olarak aynıdır. Son 30 yılda akut lösemilerin insidansında belirgin bir değişim olmamasına rağmen, ALL’de hafif artış, AML’de ise hafif bir düşüş bildirilmektedir. ALL insidansı 10 yaş altı ve 70 yaş üstünde daha yüksek, AML’ de ortalama tanı yaşı ise 65’tir [43,59].

Akut lösemilerin birçoğunda hastalığın nedeni bilinmemektedir. Genel olarak akut lösemilerin tek bir hücrede oluşan genetik değişikliklerin sonucu olarak başladığı kabul edilir. Hastalık; kromozomal veya hücre sinyal iletimi ile hücre döngüsünü kontrol eden mekanizmalardaki bozukluklar sonucunda primer olarak ya da geçmişlerinde prelösemik hastalığa sahip bireylerde, radyoterapi ve kemoterapi görenlerde sekonder olarak ortaya çıkabilir [27,37].

Akut lösemilerde, butadien ve toluen gibi çözücülerin de hastalığa neden olduğu bilinmektedir. Benzene ve radyasyona maruz kalan kişilerde de AML'nin ortaya çıkma riski çok yüksektir [15,26].

Akut lösemiler ile ilişkili diğer bir faktör de virüslerdir. HTLV-1 lösemilere neden olan bir RNA retrovirüstür. Öte yandan bir DNA virüsü olan Epstein Barr Virüsü (EBV) “myc” onkogen aktivasyonuna yol açarak lenfoid proliferasyonu arttırdığından EBV'nin, B hücreli lösemiler ile HIV ile ilişkili lösemilerde rolü olduğu düşünülmektedir [47]. Yine lösemi hastalarında bulunan MLV (Fare Lösemi Virüsü) virüsünün kapsid proteininin kromozomlara entegre olarak hücre döngüsünü etkilediği düşünülmektedir [63]. Bu sonuçlar lösemilerin bir bölümünün virüsler ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

2.1.1.1. AML

AML'nin sebebi tam olarak bilinmemekle birlikte birçok hastada kromozom anomalileri mevcuttur. AML hücreleri kronik lösemilerin aksine sınırlı mutasyon yeteneğine sahip hücrelerdir [4]. AML hücrelerinde, farklılaşmayı düzenleyen mekanizmaların bozulmasıyla hücrelerin gelişimi erken dönemde bloke olmuştur. Bu hücrelerde apoptozun inhibisyonu ile proliferasyon artışına hücre içi değişiklikler eşlik eder. Bu hastalarda en sık; t(8;21), t(15;17) ve t(11;17) gibi translokasyonlar görülür. İnversiyon 16 gibi yapısal bozukluklar genel farklılaşmayı ve apoptozu engeller [60].

2.1.1.2. ALL

ALL de, AML gibi değişik biyolojik alt yapılar içeren karmaşık bir hastalıktır [17]. ALL'nin oluşumunda AML'de olduğu gibi gen füzyonu ile sonuçlanan bazı translokasyonlar ile mutasyonlar önemli rol oynar. ALL'de en fazla görülen translokasyonlar t(1;19), t(9;22) ve t(4;14)'dür. p15, p16 ve p53 tümör baskılayıcı genlerindeki nokta mutasyonları da ALL'ye neden olabilir.

Akut lösemilerde, bulgular ve semptomlar hastadan hastaya farklılıklar gösterebilir. Yorgunluk, halsizlik, ateş, kilo kaybı, kemik ağrısı ve kanamalar hastaların karşılaştığı ilk semptomlardır. Hastaların fiziksel muayenelerinde solukluk, cilt altı kanama odakları ve lenfadenopatiler saptanır. Tanı genelde, hikaye, periferik kan yayması ve kemik iliği biyopsisi ile konur. Anemi ve trombositopeni en sık laboratuvar bulgularıdır. Lökosit sayısı normal, düşük ya da yüksek olabilir. Histokimyasal ve immünofenotipik incelemenin yanı sıra; hastanın biyokimyasal verileri, ultrason ve akciğer grafileri hastalığın seyrinde önemli kriterlerdir [17,47].

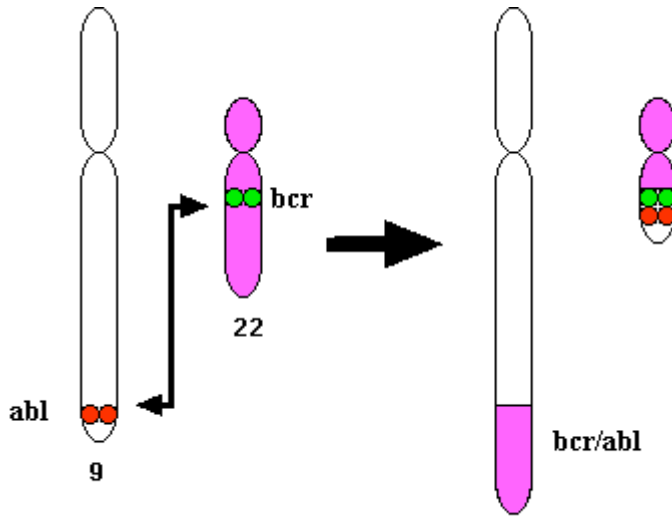
2.1.2. KRONİK LÖSEMİLER

Kronik lösemiler, akut lösemilere göre daha olgun hücrelerin proliferasyonu ile gelişen hastalıklardır. Kronik lösemilerde, KML (kronik myeloblastik lösemi) ile KLL (kronik lenfoblastik lösemi) hastalığın en sık görülen iki alt tipidir [51].

2.1.2.1. KML

KML yetişkin lösemilerinin % 20'si kadarını oluşturur ve en fazla 3. ve 4. dekatta ortaya çıkar. KML 9. ve 22. kromozomlar arasında değişim ile ortaya çıkan bir translokasyon sonucunda gelişen, hematopoetik hücrelerin malin hastalığıdır [6]. Translokasyon sonucunda 22. kromozomda yer alan BCR (breakpoint cluster region) geni ile 9. kromozomda yer alan ABL (Abelson murine leukemia virus) genlerinin birleşmesiyle Bcr-Abl füzyon geni ve bu genin ürünü olan p210 proteini ortaya çıkar

(Şekil 2-1). Bu protein, yüksek tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. Bcr-Abl füzyonunun ardından hücrede üç işlevsel değişiklik meydana gelir. Bunlar; Abl proteininin aşırı aktif bir tirozin kinaz haline gelmesi, proteinin DNA'ya bağlanma afinitesinin azalması ve Abl'nin hücre iskeletindeki aktin mikroflamentlerine bağlanma yeteneğinin artmasıdır. Sonuç olarak, hücreler negatif yöndeki düzenleyici sinyallerden etkilenmeyerek kontrolsüz çoğalırlar [6,35].



Şekil 2-1 9;22 Translokasyonu

KML'nin nedeni henüz tam olarak bilinmemektedir. Ancak radyasyon ile KML arasında bir ilişkiye işaret eden veriler mevcuttur. Japonya'ya atılan atom bombasının ardından KML insidansında artış görülmesi KML'nin radyasyon ile ilişkisini desteklemektedir [9,10].

Hastalığın, klinik seyrinde başlıca 3 faz gözlenir. Bunlar; kronik faz, akselere faz ve blast krizidir. Hastalar kronik fazda sessiz bir seyir gösterir. Hatta bu dönemde hastalara tesadüfen teşhis konulabilir. Bazı hastalar ise, yorgunluk, halsizlik, kilo kaybı ve splenomegaliye bağlı sol üst kadranda ağrısı ile başvururlar. KML'de kronik fazdan blastik faza geçişte birçok faktör rol oynayabilir. En önemli faktörlerden birinin kromozomal dengesizlik olduğu düşünülmektedir. Bu devrede p53 ve RB gibi tümör

baskılayıcı genlerin işlevinde bozulma ve myc ve ras gibi onkogenlerin aktivitesinde değişiklikler görülebilir [6].

KML hastalarının çoğunun fiziksel muayenesinde splenomegali ve hepatomegali mevcuttur. Bununla birlikte lenfadenopati nadir görülür. Laboratuvar incelemelerinde lökositoz dikkati çeker. Çoğunlukla lökositler $100000/\text{mm}^3$ 'ün üzerindedir. Trombositopeniye sık rastlanır. Geç evrelerde ise bazofili nedeniyle histamin üretimi artarak ishal ve kızarma atakları ortaya çıkar. Tanı sırasında kemik iliği biyopsi örneklerinde miyeloid ve megakaryositer seride belirgin artış görülür [22,60]. Hastalığın akselere fazında anemi gelişir. Trombositler düşer ve blastik hücreler miyeloid, lenfoid, eritroid veya farklılaşmamış hücrelere dönüşürler. Hastaların ortalama yaşam süreleri yeni nesil tedaviler sayesinde son dönemlerde oldukça uzamıştır [9,20].

2.1.2.2. KLL

KLL batı ülkelerinde en sık görülen lösemidir. Tüm yetişkin lösemilerinin % 30 kadarını oluşturur. ABD'de yılda ortalama 8000 yeni vakaya tanı konmaktadır. Kadın erkek oranı 1.7/1 civarındadır ve beyaz ırkta daha sık görülür. KLL , Asya ülkelerinde çok az rastlanılan bir lösemi türüdür. Ortalama görülme yaşı 70'dir [25,27,34].

KLL bir B-hücre hastalığıdır. Hastalarının kemik iliği ve periferik kanlarında fonksiyonları bozulmuş lenfosit miktarı çok fazladır. KLL'de lenfositler genel olarak gelişmiş görünümde bulunurlar [30,51].

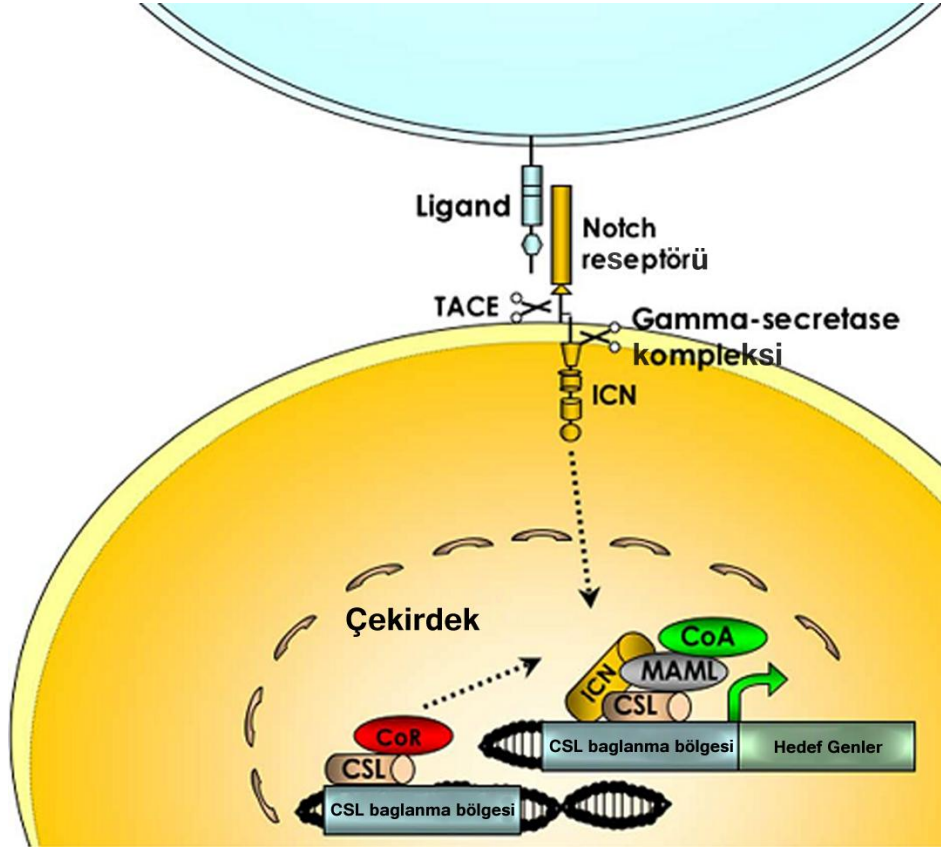
KLL'nin nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte bazı ailelerde sık görülmesi hereditör genetik faktörlerin etkili olduğunu düşündürmektedir [1,39]. Hastalarda en sık fiziksel muayene bulgusu lenfadenopatilerdir. KLL hastalarında enfeksiyonlar da sık görülür [12,26]. KLL hücreleri, hastalığın seyri esnasında biyolojik değişim ve dönüşümlere uğrayabilir. ALL'ye ya da Multiple Myeloma dönüşerek hastalığın seyrini daha da kötüleştirebilirler [25]. Hastalarda Trizomi 12 ve bazı kromozomal delesyonlar da görülmektedir [21,41].

2.2. Notch Sinyal Yolağı

Notch sinyal yolağı ilk olarak *Drosophila*'nın sinir hücrelerinde tanımlanmıştır [57]. Kan hücrelerinde Notch sinyal yolağının malin transformasyon ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [48]. Notch, komşu hücreler ile iletişim kurarak hücrelerin farklılaşmasında rol oynayan zargeçen bir proteindir. Embriyonel ve prenatal dönemde, çevre hücreler ile etkileşimi sağlayarak hematopoetik hücrelerin farklılaşmasını kontrol eder [57]. Akut lösemilerde Notch genlerinin ifadesinde artış görülür. Notch sinyal yolağında görev alan proteinlerin hücrenin farklılaşmasında görevli diğer proteinleri etkilediği bilinmektedir [56].

Memelilerde Notch sinyal yolağının 4 tipi vardır [16,57]. Notch1 *Drosophila*'daki Notch'un homoloğu olan ve insanda en işlevsel ve yaygın olarak bulunan sinyal yolağıdır [57]. Notch sinyal yolağı hücrelerin kaderinin belirlenmesinde, proliferasyonunda ve farklılaşmasında düzenleyici rol oynar [31,45,57]. Notch, hücre tipine göre farklılaşmayı engelleyebildiği gibi uyarabilir de. Notch sinyal yolağı WNT, PTEN/AKT, FGF, BMP ve Hedgehog yolakları ile etkileşim kurarak kök hücrelerin farklılaşmasını, embriyogenezi ve homeostazı etkiler [31,45].

Hücre-hücre etkileşimlerinde; bir hücrede Notch reseptörü, diğer hücrede ise Notch ligandı bulunur (Şekil 2-2). Notch ligandları Delta-like1, Delta-like3, Delta-like4, Jagged1 ve Jagged2 olarak adlandırılır [46]. Bu ligandlardan biri Notch'un hücre dışındaki bölgesine bağlandığında, heterodimerizasyon bölgesi γ -sekrataz tarafından kesilir ve proteinin hücre içi bölgesi (ICN) ayrılarak sitoplazmadan çekirdeğe geçer [35,46]. ICN çekirdekte transkripsiyon faktörü CSL'ye bağlanır ve korepresör ile yer değiştirerek CoA'ları (MAML) uyarır. Uyarı tamamlandıktan sonra Notch sinyal yolağının hedef genleri olan Hey ve Hes ailesindeki genlerin transkripsiyonu başlatılmış olur [46,57].(Şekil 2-2)



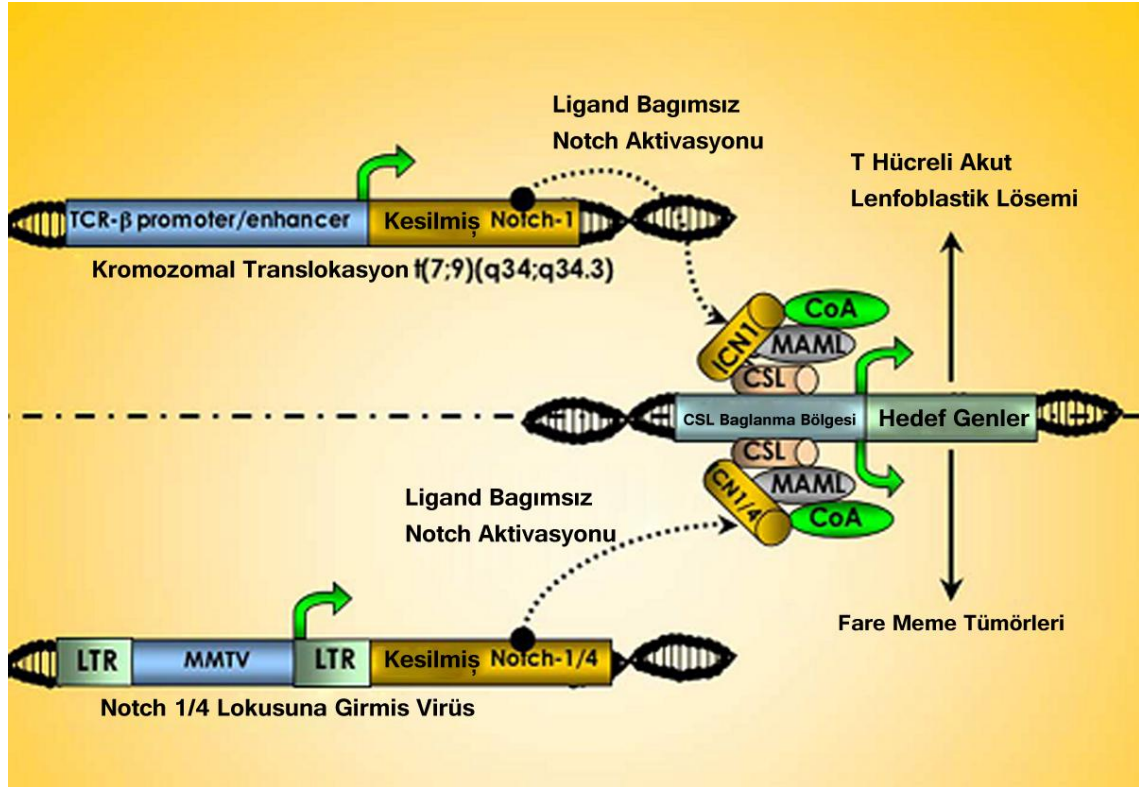
Şekil 2-2 Notch Sinyal Yolağı

Hes ailesinin bir üyesi olan Hes1, özellikle farklılaşmamış kök hücrelerde ifade edilir. Hey ailesinin üyesi olan Hey1 ise hücre farklılaşması, hücre proliferasyonu ve doku gelişimi sırasında ifade edilir [57]. Notch'a bağımlı olarak aktifleşen Hes1 ve Hey1 özellikle hücre döngüsünde G1 ve S safhalarını etkiler, bu işlevi SiklinD1 üzerine etki ederek gerçekleştirirler. SiklinD1, CDK4 ve CDK6'nın alt birimlerinin düzenleyicisidir. Siklinlerin aşırı gen ifadesi G1 ve S faz geçişlerinde kan hücrelerinin farklılaşması üzerinde etkilidir. CDK4 kinaz aktivasyonu ve SiklinD1'in proteazom tarafından yıkımının azalması normal hücre döngüsünde önemlidir. Aşırı SiklinD1 gen anlatımının olduğu lösemilerde hücre döngüsü G1 fazında duraklar. Ayrıca Notch aktivasyonu sonucunda SiklinA ve SiklinB'lerin hücre döngüsü üzerindeki etkileri azalır [6,15,12]. Artan Hes1 ve Hey1 transkripsiyonu p53 düzeyi ve bu yolla tümör baskılayıcı etkiyi artırarak apoptoz üzerinde önemli etki gösterir [46,56].

Hes1 proteini, hematolojik malinitelerde, gastrik tümörlerde, pankreas tümörlerinde ve kolorektal tümörlerde ifade edilir [11,46]. Birçok hematolojik

malinitede Notch aktivasyonu ile Hey1 geninin ifadesinde artış ve buna bağlı olarak Hes1 geninin aktivasyonu görülür. Bu yolağın öncül fonksiyonu Hes1 proteini üzerinden bHLH (helix-loop-helix) faktörlerinin farklılaşmasını baskılayarak hücreleri olgunlaşmamış aşamada dengede tutmaktır. Böylece Hey1 ve Hes1 genleri Notch sinyal yolağı üzerinden kan hücrelerinin farklılaşmasını durdururlar [49,56].

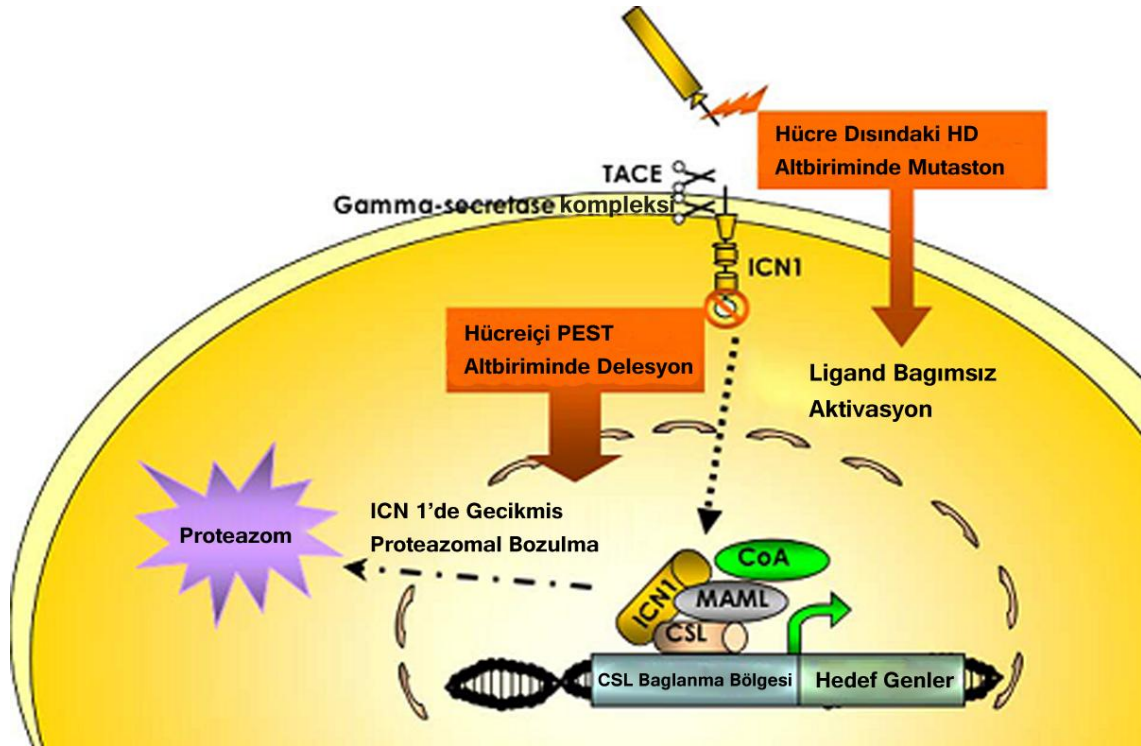
Hematolojik malinitelerde t(7;9) translokasyonu sonucunda ortaya çıkan kusurlu Notch proteini ligand bağlanmasına ihtiyaç duymadan sürekli aktif durumunu koruyarak Hey1 ve Hes1 genlerinin transkripsiyonunu devam ettirebilir [21,50]. Ayrıca, latent virüs enfeksiyonları sonucunda da virüs Notch sinyal yolağının gen lokusuna girerek ligand varlığından bağımsız olarak sinyali devam ettirir [18,19,57] (Şekil 2-3).



Şekil 2-3 Kromozomal Translokasyonlar ve Viral Enfeksiyon Sonrası Ligand Yokluğunda Aktifleşen Notch Sinyal Yolağı

Ancak ALL’de Notch genini kapsayan translokasyonlar ender görülür. Buna karşılık hastaların %55 kadarında Notch proteininin hücre dışı dimerizasyon veya C-ucu bölgelerinde mutasyonlar bulunur. ALL hastalarında Notch proteinindeki mutasyon

sonucunda heterodimerizasyon (HD) bölgesinde oluşan değişiklikler bu bölgenin ligand yokluğunda kırılmasına neden olarak Hes1 ve Hey1 genlerinin transkripsiyonunu uyarır. Intraselüler Notch alt birimi (ICN) ligand olmaksızın sürekli salınır. Proteinin C-ucunda bulunan Prolin, glutamik asit, serin ve tironin aminoasitlerinden oluşan peptid dizisi 'PEST' proteazom ile proteinlerin yıkımı için çalışır ve Notch sinyalinin transkripsiyon kompleksleri olan CSL, ICN ve MAML proteinlerinin stabilizasyonunu sağlar [2,44]. Bu bölgede gerçekleşen mutasyonlar genellikle erken sonlanma kodonları oluşmasına veya çerçeve kaymasına neden olarak C-ucundaki önemli dizilerin kaybı ile sonuçlanır. Bu durumda ICN'nin proteazomal yıkımı engellenir, yarı ömrü uzar ve Notch sinyalinin hedef genleri olan Hes1 ve Hey1 genlerinin transkripsiyonu sürekli uyarılır [56,57]. (Şekil 2-4).



Şekil 2-4 Sinyal Bağımsız Notch Sinyal Yolağı

2.2.1. ID-4 Geni ve Notch sinyal yolağı

ID gen ailesinin dört üyesi bulunur. Bunlar; ID-1, ID-2, ID-3 ve ID-4'tür [7,40]. ID-4 proteinleri dominant negatif etki gösteren transkripsiyon inhibitörleridir. ID-4

geninin kodladığı sarmal-ilmek-sarmal yapıdaki protein transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasını engeller [60,61]. Kolorektal kanserler, gastrik kanserler ve pankreas tümörlerinde ID-1 ve ID-2 gen ifadesinde artış görülür. Birçok kanser türünde, ID-3 gen ifadesinde de artış veya azalma bildirilmiştir [32,38,61].

Yapılan çalışmalar; ID-4 geninin promoter bölgesindeki metilasyonlar sonucunda lösemilerde genin ifadesinin azaldığını göstermektedir [61]. Bu durum ID-4'ün bir tümör baskılayıcı gen olabileceğine işaret etmektedir [32]. ID-4 geninde metilasyon bulunan hastalarda AML ve ALL'nin daha hızlı yayıldığı ve yaşam sürelerinin kısaldığı görülmüştür. ID-4 gen ifadesindeki değişimler daha önce de belirtildiği gibi Notch sinyal yolağının daha fazla aktifleşmesine ve bunun sonucunda da Hes1 ve Hey1 genlerinin transkripsiyonunun artmasına neden olmaktadır [32,61]. ID-4 geninin aşırı ifadesi, Notch sinyal yolağının ligandı olan Jagged1'i uyarak Hes1 ve Hey1 transkripsiyonunu arttırmaktadır. Bu bulgular ID-4 geninin, farklılaşma, hücre döngüsü ve lösemilerde önemli işlevleri olduğuna işaret etmektedir [14,32,52].

2.2.2. Ikaros Geni ve Notch Sinyal Yolağı

Ikaros geni, Kruppel transkripsiyon faktörleri ailesinin üyesi olan bir çinko parmak proteini kodlar [5,53,63]. Proteinin N ucu DNA'ya bağlanmak, C ucu ise proteinin dimerizasyonu ve stabilitesi açısından önem taşır. Plöripotent hematopoietik kök hücrelerin kaderini belirleyen Ikaros, normal hematopoetik hücrelerin gelişimi için önemli bir çekirdek proteinidir ve lenfositlerin farklılaşması ve özelleşmesinde önemli rol oynar [5,28]. Proteinin DNA bağlanma bölgesinde bir mutasyon oluştuğunda lenfosit gelişimi durur [3,13].

Ikaros gen ifadesi ile Notch sinyal yolağı sürekli etkileşim ve denge halinde bulunur [13,40]. Ikaros, transkripsiyonel bir baskılayıcı gibi davranarak, özellikle Notch sinyal yolağının hedef geni Hes1'i baskılar [18,19]. Ikaros geninde gerçekleşen delesyonlar Notch sinyal yolağının etkinleşmesine neden olur. Eğer, herhangi bir etkiyle Ikaros düzeyi artar ise Notch sinyal yolağı ligand varlığından bağımsız olarak engellenebilir, ya da Ikaros düzeyi azaldığında Notch sinyal yolağı aktifleşebilir [24,37].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Materyal

Tez çalışmamızda, 2009-2010 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı'na ve Onkoloji Enstitüsü'ne başvuran lösemi hastalarının (yaş = $36 \pm 9,3$) periferik kan ve kemik iliği örnekleri kullanılmıştır. Kontrol grubu olarak yaş ve cinsiyet bakımından hasta grubuna uygun olarak seçilen 32 bireyin (yaş = $32 \pm 5,8$) periferik kanları değerlendirilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarının özellikleri Tablo 3-1'de gösterilmiştir.

Tablo 3-1 Hasta ve Kontrol Gruplarının Özellikleri

Cinsiyet	Hasta n %	Kontrol n %	Hasta Yaş Ort. Ort. SD	Sağlıklı Yaş Ort. Ort. SD
Kadın	46 (%41,1)	19 (%63,4)	40,9 ($\pm 21,2$)	29,3 ($\pm 12,3$)
Erkek	66 (%58,9)	11 (%36,6)	34,8 ($\pm 24,1$)	32,4 ($\pm 8,1$)

Hastaların, hastalık gruplarına göre dağılımları Tablo 3-2'de verilmiştir.

Tablo 3-2 Hastalık Gruplarına Göre Hastaların Dağılımları

	KML n %	AML n %	ALL n %	KLL n %
Hasta Sayısı	37 (% 33)	23 (% 20,5)	31 (% 27,7)	21 (% 18,8)
Hastaların Yaş Ort.	45,6 ($\pm 17,4$)	43,5 ($\pm 19,6$)	14 ($\pm 14,4$)	58,8 ($\pm 11,9$)

Çalışmada, kan ve kemik iliğinden mononükleer hücreler elde edilmiş, bu hücrelerden RNA ayrıştırılarak RNA'lardan cDNA sentezlenmiş ve Ikaros ve ID-4 genleri ile Notch sinyal yolağının hedef genleri olan Hes1 ve Hey1 genlerinin ifade düzeyleri hastalar ile sağlıklı bireyler arasında karşılaştırılmıştır.

İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilen çalışma, 13.05.2009 tarih ve 05 sayılı Etik Kurul kararı ile uygun görülmüştür.

3.1.2. Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Biocoll Ayrıştırma Çözeltilisi [BIOCHROM]

Etilen-diamin-tetraasetikasit (EDTA), β -Merkaptoetanol, Tris(hidroksimetil aminometan), Borik Asit [MERCK]

Etidyum Bromür (EtBr)

Bromfenol Mavisi (BFB) [SIGMA]

High Pure RNA İzolasyon Kiti [ROCHE]

Revertaid First Strand cDNA Sentez Kiti [FERMENTAS]

Primer 200 Mer [RFT]

Lightcycler UPL Real-Time PCR Problemleri [ROCHE]

Lightcycler 480 Master Prob Karışımı [ROCHE]

Lightcycler 480 Multiwell Plak [ROCHE]

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

Real-time PCR Light Cycler 480 [ROCHE]

Thermal Cycler TC 412 [TECHNE]

Santrifüjler [HERAUS, HETTICH, JOUAN]

Mikropipetler [FINNPIPETTE]

Yatay elektroforez tankları ve jel dökme sistemleri [BRL]

Distile Su Cihazı [MILLIPORE]

Vortex [SNIJDERS]

3.1.4. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

10X PBS Tampon Çözeltisi (1 litre)

- 80 gr NaCl
- 2 gr KCl
- 11,5 gr Na₂HPO₄
- 2 gr KH₂PO₄

10X BFB Yükleme Tamponu (2ml)

- %1 SDS
- 5mg Bromfenol Mavisi
- 2ml Gliserol

10X TEB (Tris-EDTA-Borik Asit) Tampon Çözeltisi (1 litre)

- 0.88 M Borik Asit
- 5M Tris
- 0.02 EDTA (pH :8.00)

Etidyum Bromür: (10mg/ml)

3.2. Yöntemler

3.2.1. Tam Kandan Lökosit İzolasyonu

- ❖ EDTA'lı tüpe alınan yaklaşık 10 ml kan 1/1 oranında %0.9'luk NaCl ile dilue edilir.
- ❖ 2 ml Ficoll üzerine yavaş bir şekilde eklenir.
- ❖ 1970 RPM'de 30 dk. Santrifuj
- ❖ Santrifuj sonunda orta fazda eritrosit ve diğer hücreler, süpernatantta ise serum kısmı kalacaktır. İkisinin arasında kalan beyaz kısımdan lökositler pasteur pipet ile toplanarak temiz tüpe alınır.
- ❖ 1970 RPM'de 10 dk. Santrifuj
- ❖ Süpernatant dökülerek pellet üzerine 4 ml PBS eklenerek pipetlenir
- ❖ Cryo tüplere 1'er ml dağıtılır
- ❖ 1970 RPM'de 1 dk. Santrifuj
- ❖ Süpernatant dökülür.
- ❖ Elde edilen hücreler -80°'de saklanır.

3.2.2. Lökositlerden RNA izolasyonu

- ❖ Lökositlerin üzerine 350 µl RA1 (lysis) tamponu ve 3,5 µl β- Merkaptoetanol konur, vortekslenir
- ❖ Kapaksız 2 ml tüplere pembe spin filtre yerleştirilir ve karışım spin filtreye aktarılır
- ❖ 11000 G'de 1 dk. Santrifuj
- ❖ Pellet üzerine 350 µl etanol eklenir ve vortekslenir
- ❖ Mavi spin filtreli yeni tüpe aktarılır

- ❖ 11000 g'de 30 sn. Santrifuj
- ❖ Spin filtrenin altı boşaltılır ve üzerine 350 µl MDB eklenir
- ❖ 11000 g'de 1 dk. Santrifuj
- ❖ 10 µl enzim ve 90 µl rDNAse filtreye eklenerek 15 dk. inkübe edilir
- ❖ Üzerine 200 µl RA2 eklenir
- ❖ 11000 g'de 30 sn. Santrifuj
- ❖ Tüp boşaltılır ve üzerine 600 µl RA3 tamponu eklenir
- ❖ 11000 g'de 30 sn. Santrifuj
- ❖ Tüp boşaltılır ve üzerine 250 µl RA3 eklenir
- ❖ 11000 g'de 30 sn. Santrifuj
- ❖ Spin filtre temiz 1,5 ml'lik tüpe alınarak üzerine 60 µl dH₂O eklenir
- ❖ 11000 G'de 1 dk. Santrifuj
- ❖ RNA elde edilir.

3.2.3. Agaroz Jelde RNA'ların Kontrolü

3.2.3.1. Agaroz Jelin Hazırlanması

- ❖ 100 ml jel için 1,5 gr agaroz tartıldı.
- ❖ 100 ml 0.5XTEB ile karıştırılarak kaynatıldı.
- ❖ Homojen hale gelen karışıma 5 µl EtBr eklenerek jel küvetine döküldü ve kuyuları oluşturacak tarak üzerine takıldı.
- ❖ Jel donduğunda kullanıma hazır.

3.2.3.2. Agaroz Jelde Örnekleri Yürütme İşlemi

Elde edilen RNA'lerden 6-7 μ l örnek 0.5 μ l BFB eklenerek jel üzerinde bulunan kuyucuklara yüklendi 150 volt potansiyel farkı uygulanarak 3 cm kadar yürütüldü, UV ışık altında görüntülendi.

3.2.4. RNA'dan cDNA Sentezi

Tablo 3-3 cDNA Sentezinin Gerçekleştirildiği Reaksiyon Koşulları

Döngü Sayısı	Sıcaklık (C ⁰)	Süre
1	95	10 dk.
45	95	10 sn.
	60	30 sn.
	72	1 sn.
1	40	30sn

0,5 μ l'lik PCR tüplerine 5 μ l RNA, 1 μ l Random Hexamer ve 6 μ l dH₂O eklenerek pipetlendi ve termal döngü cihazında ilk döngü bitiminde buza alınarak üzerine 5X Reaksiyon tamponu, 1 μ l RiboLock RNase inhibitör, 10 mM dNTP ve 200 U/ μ l RevertAid M-MuLV Reverse Transkriptaz eklenerek tekrar döngü cihazına kondu ve program devam ettirildi.

3.2.5. Kullanılan primer dizileri

Hes1 Geni:

F- 5'-GAAGCACCTCCGGAACCT-3'

R- 5'-GTCACCTAGTTCATGCACTC-3'

Hey1 Geni:

F- 5'-CGAGCTGGACGAGACCAT-3'

R- 5'-GAGCCGAACTCAAGTTTCCA-3'

ID-4 Geni:

F- 5'-TTGGCCTGGCTCTTAATTTG-3'

R- 5'-TGCAATCATGCAAGACCACT-3'

Ikaros Geni:

F- 5'-CCTTCCGGGCACACTGTA-3'

R- 5'-TCTCTCTGATCCTATCTTGCACA-3'

3.2.5. Real-Time PCR

Deneyler LightCycler 480 Real Time PCR sistemi ile gerçekleştirildi. Deneylerde referans gen olarak β -Aktin geni kullanıldı. Reaksiyon karışımına hem referans, hem de araştırdığımız genin primerleri birlikte yüklenerek çoğaltıldı.

Referans gen için işaretleyici olarak FAM, hedef genler için ise HEX/Yellow555 floresan boyaları kullanıldı. Boyaların; eksitasyon ve emisyon dalga boyları Tablo 3-4'te verilmiştir.

Tablo 3-4 Boyaların Dalga Boyları

	Eksitasyon (nm)	Emisyon (nm)
FAM	465	510
HEX/Yellow555	533	580

Real-Time PCR reaksiyonu aşağıda belirtilen koşullarda gerçekleştirildi.

Real-Time PCR Karışımı (20 µl)

- ❖ 10 µl Master Mix
- ❖ 0,4 µl UPL Probe
- ❖ 0,4 µl Actin Probe
- ❖ 0,5 µl F Primer
- ❖ 0,5 µl R Primer
- ❖ 0,5 µl Actin Primer
- ❖ 3 µl cDNA
- ❖ 4,7 µl dH₂O

Tablo 3-5 Real-Time PCR Koşulları

Döngü Sayısı	Sıcaklık (C ⁰)	Süre
1	95	10 dk.
45	95	10 sn.
	60	30 sn.
	72	1 sn.
1	40	30sn

3.2.6. Elde Edilen Verilerin Değerlendirilmesi

Hasta gruplarında her genin ifade düzeyinin nasıl değiştiğini incelemek için örneklerdeki ilgili gen ifadelerinin değerlendirilmesinde $\Delta\Delta Ct$ yöntemi kullanıldı. PCR reaksiyonunda her örneğe ait üstel fazlı çoğalmanın başladığı döngü saptanarak ilgili örnekler için CT (cycle threshold) değerleri hesaplandı.

Her örneğin ΔCt değeri aşağıdaki formülle belirlendi :

$$\Delta Ct = Ct (\text{hedef gen}) - Ct (\text{referans gen})$$

Örneklerin ΔCt değerleri hesaplandıktan sonra $\Delta\Delta Ct$ farkları aşağıdaki şekilde bulundu :

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{hasta}) - \Delta Ct (\text{sağlıklı})$$

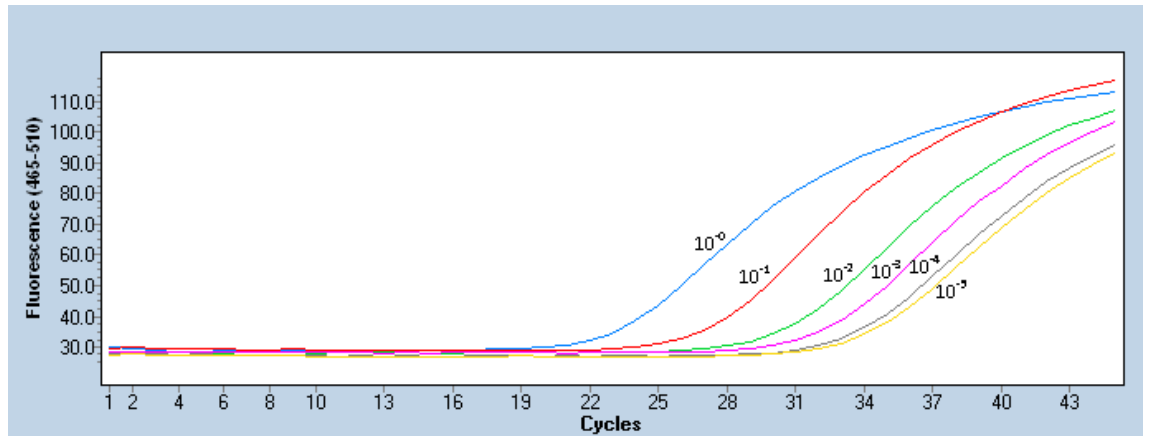
4. BULGULAR

Çalışmamızda 2009-2010 yıllarında İ.Ü. Tıp Fakültesi ve İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü'ne başvuran lösemili 112 hastadan alınan periferik kan ve kemik iliği örnekleri kullanıldı. Kontrol grubu olarak, yaş ve cinsiyet bakımından hastalara uygun olarak seçilmiş, sağlıklı 30 bireyin periferik kanları değerlendirildi.

Hastaların periferik kan ve kemik iliği örneklerinden RNA elde edildi. Çalışmamızda kullanılan RNA örnekleri önce % 1.5 agaroz jel elektroforezi ile değerlendirildi.

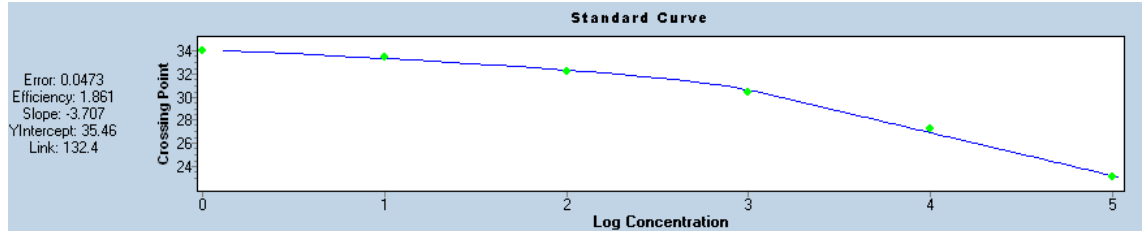
Çalışmada, lösemilerde Notch sinyal yolağının hedef genleri olan Hey1 ve Hes1 ile Ikaros ve ID-4 genlerinin ifade düzeyleri Real-Time PCR yöntemiyle incelendi. Bunun için her hastaya ait RNA örneklerinden hazırlanan cDNA'lar incelenmek istenen hedef genlere uygun primerler yardımıyla Real-Time PCR sisteminde çoğaltıldı. Referans gen olarak β -aktin geni kullanıldı.

Öncelikle deneylerin verimini belirlemek için cDNA örneklerinden seri dilüsyonlar hazırlanarak PCR ile çoğaltıldı.



Şekil 4-1 Standart Dilüsyonların Real-Time PCR Eğrileri

Dilüsyon eğrilerinden elde edilen veriler kullanılarak çizilen standart eğriden Real Time PCR yönteminin verimi 1.86 olarak hesaplandı ve bu değer istenilen deneysel kriterleri sağladığı görülerek genlerin değerlendirilmesine geçildi.

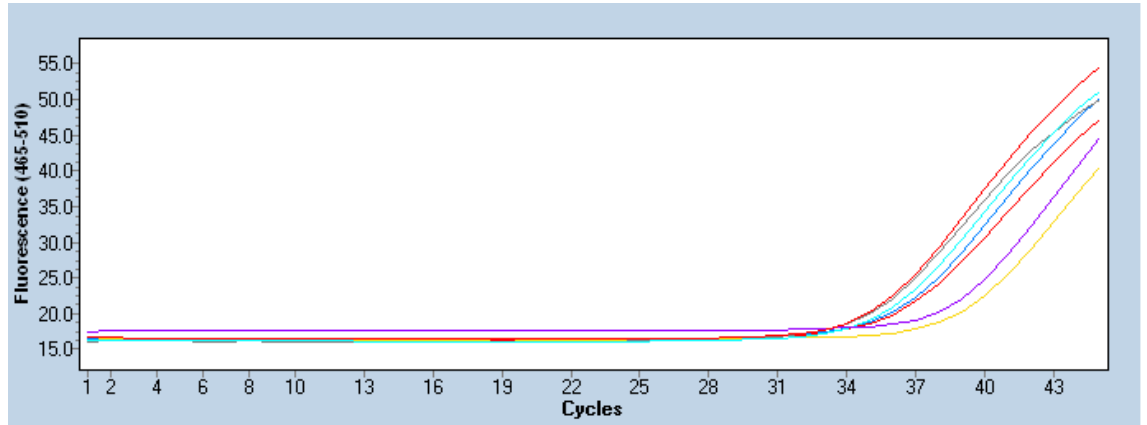


Şekil 4-2 Seri Dilüsyonlar Yardımıyla Elde Edilen Standart Eğri

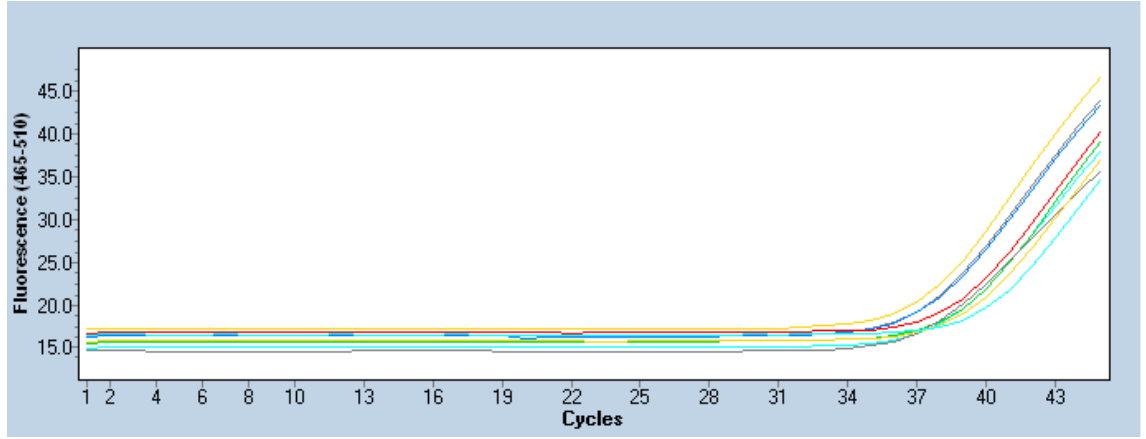
4.1. Gen ifadelerinin değerlendirilmesi

Çalışmamızda tüm hastalardan RNA elde edildi. 37 KML hastasının 5'inde, 23 AML hastasının 3'ünde, 31 ALL hastasının 2'sinde ve 21 KLL hastasının 1'inde Real-Time PCR reaksiyonu ile örnekler çoğaltılamadı. Böylece çalışmada toplam 101 hasta değerlendirmeye alındı.

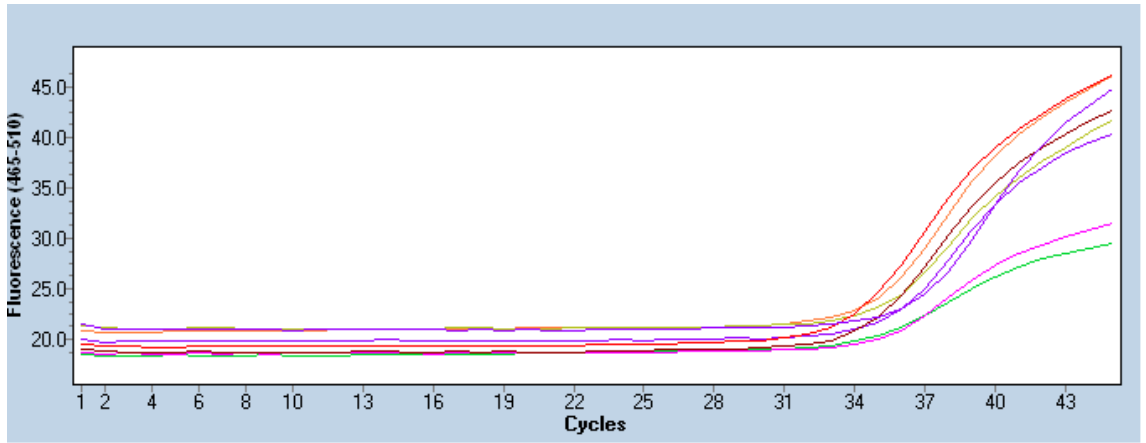
Her örnek için araştırılan genlerin ve referans genin çoğalmasını belirleyen Ct değerleri bulundu. Bu değerler Tablo 4-1 ve Tablo 4-2'de verilmektedir.



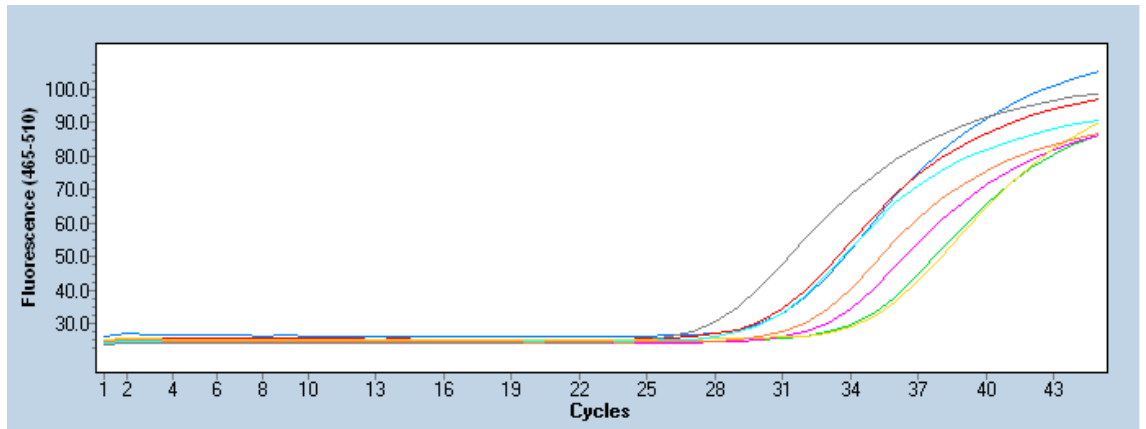
Şekil 4-3 Hes1 Genine Ait Real-Time PCR Eğrileri



Şekil 4-4 Hey1 Genine Ait Real-Time PCR Eğrileri



Şekil 4-5 ID-4 Genine Ait Real-Time PCR Eğrileri



Şekil 4-6 Ikaros Genine Ait Real-Time PCR Eğrileri

Tablo 4-1 Hasta Grubunda Araştırılan Genlere Ait Ct Değerleri

Gen	hes1 hedef	referans	hey1 hedef	Referans	id-4 Hedef	referans	İkaros Hedef	referans	hastalık
1	32,95	24,87	38,9	25,84	32,84	22,59	28,39	25,78	kml
2	32,96	24,04	38,04	23,94	29,43	21,76	27,68	24,7	kml
3		23,91		24,24	30,28	21,87	31,17	23,4	aml
4		28,58		27,5	34,73	26,15	30,08	27,78	kml
5	31,79	21,28	34,63	20,21	23,58	18,66	24,99	21,09	kml
6	35,93	26,36	34,42	25,79	29,41	24,52	32,21	26,51	kml
7	39,55	34,84		34,44	33,46	31,68	36,07	34,16	kml
8	32,96	25,36	35,51	23,88	29,57	23,68	27,55	24,32	kml
9	35,64	25,01		23,4	31,09	22,68	28,86	24,43	kml
10	35,28	26,94		26,52	25,07	22,51	29,86	27,59	all
11	35,84	26,77		25,59	21,48	23,81	31,35	26,49	all
12	34,3	23,13	39,79	22,46	31,91	22,52	29,98	32,92	aml
13	32,72	20,88	34,55	19,92	31,57	18,82	23,88	19,96	all
14	32,37	21,15	35,87	20,91	27,94	19,88	23,25	20,85	kml
15	34,13	20,36	35,55	18,75	26,28	18,05	25,22	18,88	kml
16	38,95	23,91	36,83	22,85	32,45	21,7	28,72	23,3	kml
17	35,31	23,11	35,14	22,55	30,71	21,97	28,55	22,65	kml
18	30,88	23,82	36,19	22,13	32,98	21,69	25,54	22,69	kml
19	32,86	21,93		20,98	30,64	19,9	24,65	20,92	kml
20		21,97	37,29	21	27,29	19,87	27,4	21,62	kml
21	33,32	22,22	34,88	20,98	31,16	19,45	24,85	21,91	kml
22	32,4	21,5	33,63	19,73		18,59	24,96	20,79	kml
23	37,96	26,6	35,84	24,76	32,59	24,08	30,47	26,43	kml
24	35,5	24,65	37,52	22,93	32,56	23,17	31,65	24,59	aml
25	34,89	23,26	35,61	22,01	25,74	20,49	25,45	22,89	kml
26	32,67	22,13	34,11	21,1	32,2	20,97	24,93	21,46	kml
27	33,84	18,67	33,94	17,87	29,52	16,46	24,17	18,02	all
28	31,82	21,53	33,66	20,21	26,95	20,65	24,98	20,73	kml
29	36,94	25,72	37,36	24,96	30,94	22,99	28,79	24,63	kml
30	38,8	21,6		20,81	32,95	19,44	26,27	20,47	kml
31	31,95	26,37	34,92	25,44	31,78	24,09	29,79	25,56	kml
32	32,21	21,15	34,38	19,73	32,38	19,25	24,26	20,09	kml
33	32,21	20,27	33,31	19,39	25,92	17,3	23,48	19,18	kml
34	33,75	22,82	35,48	21,16	31,66	21,35	26,43	22,14	kml
35	34,66	21,71		19,15	32,9	19,25	25,87	20,43	kml
36	34,34	22,94		22,86	33,93	21,47	25,87	21,83	kml
37	32,47	20,58	38,76	20	32,73	19,4	25,47	20,16	aml
38	34,88	22,47	35,35	21,74	34,84	21,28	26,55	21,86	aml

39	33,99	22,73	36,2	20,67	32,77	20,66	25,28	21,49	kml
40	31,62	20,23	32,51	18,73	31,26	18,9	23,37	19,53	kml
41					33,55	37,75	38,84		kml
42	31,6	16,4	33,91	14,99	20,4	14,96	22,5	15,42	kml
43	34,48	25,09	34,45	23,84	31,82	24,8	29,33	24	kml
44	32,67	22,49	33,98	21,99	30,35	20,86	26,36	21,77	kml
45	31,67	18,5	33,27	17,46		15,9	22,47	17,59	kml
46	29,7	19,26	33,11	18,43	31,88	17,49	22,33	18,05	all
47	37,39	29,38		28,13	29,9	27,09	29,43	27,77	all
48	32,57	22,89	34,89	20,57	30,16	19,6	25,14	21,82	all
50	38,49	27,72		26,92	32,93	24,58	28,43	26,56	all
51	35,62	27,41		26,89	34,41	25,98	29,81	26,56	all
52	31,98	22,57	37,69	21,91	29,85	20,63	24,72	20,95	all
53	38,35	30,2		29,31	33,05	27,78	32,63	29,12	all
54	37,98	29,69	25,82	20,88		28,13	32,33	28,79	all
55	35,59	24,04	36,94	22,84	30,61	22,66	25,62	23,44	all
56	33,62	23,67	33,47	23,66	28,44	21,27	27,56	23,12	all
57	33,74	21,59	32,22	21,21	29,81	21,19	25,31	21,55	aml
58	35,31	24,66	30,57	24,2	28,79	22,2	26,3	23,46	all
59	32,42	25,15	34,15	23,66	28,3	22,66	28,43	23,98	all
60	35,4	25,06	36,45	24,2	28,69	22,88	27,83	24,67	all
61	30,54	16,48	33,15	16,43	22,7	15,87	22,72	16,22	kml
62	32,11	22,31	33,86	22,22	29,44	20,8	26,18	32,04	all
63	29,43	21,32	29,64	19,99	32,11	21,5	24,25	20,23	all
64	34,98	24,71	35,31	23,49	31,3	22,88	26,17	23,95	all
65	34,89	25,69	35,72	24,31	34,7	24,79	30,41	25,56	all
66	32,17	24,66	35,26	23,96	32,58	23,82	27,36	24,12	all
67	37,21	29,06		27,3	27,44	25,52	30,71	27,77	all
68		27,36		26,76	30,5	26,8	29,2	27,29	all
69	32,02	22,97	31,98	20,31	22,55	20,71	25,77	22,65	all
70	34,48	24,35	35,29	23,72	31,24	23,23	27,84	23,93	all
71	36,56	30,91	37,23	29,63	30,29	28,91	34,83	29,93	all
72	33,65	22,13	35,27	20,9	32,22	20,74	26,03	21,67	all
73	34,51	20,34	34,61	19,44		18,3	25,29	19,4	all
74	31,29	20,85	34,44	20,32	28,8	19,58	24,5	19,84	all
75	34,27	28,18	33,55	27,78	27,74	26,75	28,54	27,77	aml
76	30,55	21,48	35,94	20,56	24,25	19,47	25,67	20,68	aml
77					33,64				aml
78	36,7		32,91	30,9	22,62		29,12	37,82	aml
79	37,44	25,99	37,38	24,89	29,35	23,81	29,5	25,25	aml
80	34,37	23,26	34,21	21,54	30,91	21,13	27,16	22,6	aml
81	34,56	23,96		22,61	33,9	22,64	27,81	23,58	aml
82		28,83		26,93	30,42	27	32,09	28,44	aml
83	36,67	26,86	35,42	25,03	28,98	24,72	28,92	26,14	aml
84	33,71	25,5	32,49	24,47	28,85	21,68	28,35	24,87	aml

85		33,53		31,53	31,83	29,79	34,61	33,24	aml
86	38,24	23,09	40,37	22,47	25,86	20,68	28,27	23,16	aml
87				39,19	35,51	36,28		39,84	aml
88	32,93	30,41			21,41	22,35	27,44	32,82	aml
89		34,19		31,16	29,93	29,09	36,45	32,64	aml
90	35,47	32,27		30,86	27,28	28,63	33,51	32,48	aml
91	33,3	26,41	34,84	25,25	25,53	21,11	29,7	24,96	aml
92	38,92	19,83	27,38	20,21	13,31	19,48	22,19	20,28	kll
93	30,79	17,98	32,27	19	28,36	19,01	20,48	19,3	kll
94	32,45	17,77	33,2	18,77	28,67	18,88	19,53	18,59	kll
95	30,55	19,96	13,27	17,91	18,4	18,47	18,35	17,68	kll
96	30,67	16,71	16,28	18,58	18,99	17,33	19,5	17,83	kll
97	29,57	19,8	35,94	21,34		20,99	27,1	21,7	kll
98	32,33	17,01	31,97	18,35		17,31	19,25	17,85	kll
99	31,93	19,54	35,6	20,21	35,6	19,74	22,76	20,2	kll
100	31,54	20,31	35,39	21,08		20,93	24,77	21,85	kll
101	26,55	16,4	28,27	17,6		17,75	18,85	17,27	kll
102	26,62	17,73		18,23	23,68	18,37	19,51	18,63	kll
103	25,84	17,63	21	17,29	24,58	16,8	18,69	17,2	kll
104	26,19	19,36	30,17	19,63	35,76	19,24	20,4	19,99	kll
105	25,34	18,3	27,14	18,81	25,99	18,44	21,43	18,99	kll
106	27,29	19,12	32,5	20,54	31,09	19,48	21,52	20,22	kll
107	33,91	21,3		21,93		21,43	24,39	22,38	kll
108	32,79	18,19	13,15	18,82	12,03	18,63	21,45	19,28	kll
109	34,55	21,06	36,47	20,82	32,62	20,61	23,51	21,32	kll
110	28,02	17,88	24,69	17,56	29,88	19,45	19,45	18,98	kll
111	30,55	17,03	30,28	17,37	32,91	16,4	18,83	16,97	kll

Tablo 4-2 Sağlıklı Kontrol Grubunda Genlere Ait Ct Değerleri

Gen	hes1 hedef	referans	hey1 hedef	Referans	id-4 Hedef	referans	ikaros Hedef	referans	hastalık
ko1	25,52	18,22	33,69	19,09	31,9	18,97	20,52	18,36	kontrol
ko2	26,37	17,85	34,59	18,56	33,51	17,99	19,67	17,21	kontrol
ko3	26,4	38,17	35,1	19,31	30,88	18,34	19,83	17,91	kontrol
ko4	26,86	19,57	35,31	20,77	32,47	20,4	22,51	19,36	kontrol
ko5	12,36	18,31	33,16	19,36	31,39	18,91	20,17	17,99	kontrol
ko6	24,97	17,8	34,91	18,87	28,05	17,32	19,65	16,97	kontrol
ko7	28,19	18,86	35,95	19,97	31,35	18,88	21,21	19,06	kontrol
ko8	30,48	19,63	36,99	20,54	33,49	19,97	22,77	19,41	kontrol
ko9	26,49	17,73	32,81	18,83	30,88	19,96	20,05	17,45	kontrol

ko10	27,75	18,57	34,87	19,39	31,75	18,8	20,78	18,52	kontrol
ko11	26,68	17,55	34,42	18,76	26,15	16,84	19,58	17,04	kontrol
ko12	24,3	17,55	35,29	19,67	32,13	18,52	20,64	18,22	kontrol
ko13	27,46	18,98	34,89	19,78	33,72	19,53	21,18	18,88	kontrol
ko14	29,9	18,54	36,02	19,99	32,71	19,29	20,68	18,43	kontrol
ko15	28,95	22,12	34,06	22,76	28,26	22,18	24,96	21,91	kontrol
ko16	28,42	17,83	33,54	18,65	29,66	17,94	19,6	17,34	kontrol
ko17	36,6	28,81		28,69	29,5	28,86	31,62	28,2	kontrol
ko18	28,25	21,14	32,69	21,09	28,73	22,2	23,65	20,25	kontrol
ko19	33,49	26,16	38,25	27,1	30,21	26,71	29,7	26,4	kontrol
ko20	27,7	23,53	35,64	23,7	25,2	23,65	26,52	23,67	kontrol
ko21	26,87	20,67	31,7	21,39	23,26	20,65	23,59	20,61	kontrol
ko22	28,78	23,05	34,89	23,78	25,97	22,34	25,65	22,37	kontrol
ko23	30,26	20,95	36,7	22	31,77	21,39	23,55	20,45	kontrol
ko24	26,84	16,81	32,35	18,13		17	20,34	16,77	kontrol
ko25	29,22	19,41	35,03	20,46	34,19	20,02	21,94	19,08	kontrol
ko26	28,4	18,77	35,74	18,34	34,76	19,26	21,93	19,05	kontrol
ko27	26,46	16,68	30,19	16,76	31,33	17,35	19,44	16,68	kontrol

Ct değerleri elde edilen her örnek için hedef gen ile referans gen arasındaki farklar hesaplanarak Δ Ct değerleri bulundu. Daha sonra sağlıklı grupta her gene ait ortalama Δ Ct değerleri hesaplandı. Her örnek için elde edilen Δ Ct değerinden sağlıklı gruba ait ortalama Δ Ct değerinin çıkartılmasıyla ilgili örneğe ait $\Delta\Delta$ Ct değeri bulundu (Tablo 4-4). Ortalama değerden bir standart sapmadan daha fazla farklılık gösteren genlerin ifadeleri artmış veya azalmış olarak değerlendirildi. Sağlıklı kontrollere ait ortalamalar ve standart sapmalara ait veriler tablo 4-3 gösterilmektedir.

Tablo 4-3 Sağlıklı Kontrollerin Ortalama ve Standart Sapma Değerleri

Sağlıklı	Ort. $\pm$ SD
Hes1	-4.57 $\pm$ 2,21
Hey1	-1,85 $\pm$ 1,26
ID-4	4,16 $\pm$ 3,55
Ikaros	1,23 $\pm$ 0,65

Tablo 4-4 Hasta Grubunda $\Delta\Delta\text{Ct}$ Değerleri

Gen	Hes1	Hey1	ID-4	lkaros
1	-1,02	0,92	0,13	0,13
2	-1,86	-0,12	2,71	-0,24
3			1,97	-5,03
4			1,8	0,44
5	-3,45	-0,44	5,46	-1,16
6	-2,51	5,35	5,49	-2,96
7			8,6	0,83
8	-0,54	2,35	4,49	-0,49
9	-3,57		1,97	-1,69
10	-1,28		7,82	0,47
11	-2,01		12,71	-2,12
12	-4,11	-3,35	0,99	5,68
13	-4,78	-0,65	-2,37	-1,18
14	-4,16	-0,98	2,32	0,34
15	-6,71	-2,82	2,15	-3,6
16	-7,98	0	-0,37	-2,68
17	-5,14	1,39	1,64	-3,16
18	0	-0,08	-0,91	-0,11
19	-3,87		-0,36	-0,99
20		-2,31	2,96	-3,04
21	-4,04	0,08	-1,33	-0,2
22	-3,84	0,08		-1,43
23	-4,3	2,9	1,87	-1,3
24	-3,79	-0,61	0,99	-4,32
25	-4,57	0,38	5,13	0,18
26	-3,48	0,97	-0,85	-0,73
27	-8,11	-2,09	-2,68	-3,41
28	-3,23	0,53	4,08	-1,51
29	-4,16	1,58	2,43	-1,42
30	-10,14		-3,13	-3,06
31		4,5	2,69	-1,49
32	-4	-0,67	-2,75	-1,43
33	-4,88	0,06	1,76	-1,56
34	-3,87	-0,34	0,07	-1,55
35	-5,89		-3,27	-2,7
36	-4,34		-2,08	-1,3
37	-4,83	-4,78	-2,95	-2,57

38	-5,35	0,37	-3,18	-1,95
39	-4,2	-1,55	-1,73	-1,05
40	-4,33	0,2	-1,98	-1,1
41	7,06		14,58	
42	-8,14	-4,94	4,94	-4,34
43	-2,33	3,37	3,36	-2,59
44	-3,12	1,99	0,89	-1,85
45	-6,11	-1,83		-2,14
46	-3,38	-0,7	-4,01	-1,54
47	-0,95		7,57	1,08
48	-2,62	-0,34	-0,18	-0,58
50	-3,71		2,03	0,87
51	-1,15		1,95	-0,51
52	-2,35	-1,8	1,16	-1,03
53	-1,09		5,11	-0,77
54	-1,23	9,04		-0,8
55	-4,49	-0,12	2,43	0,56
56	-2,89	4,17	3,21	-1,7
57	-5,09	2,97	1,76	-1,02
58	-3,59	7,61	3,79	-0,1
59	-0,21	3,49	4,74	-1,71
60	-3,28	1,73	4,57	-0,42
61	-7	-2,74	3,55	-3,76
62	-2,74	2,34	1,74	8,6
63	-1,05	4,33	-0,23	-1,28
64	-3,21	2,16	1,96	0,52
65	-2,14	2,57	0,47	-2,11
66	-0,45	2,68	1,62	-0,5
67	-1,09	41,28	8,46	-0,2
68		13,98	6,68	0,83
69	-1,99	2,31	8,54	-0,38
70	-3,07	2,41	2,37	-1,17
71	1,41	6,38	9	-2,16
72	-4,46	-0,39	-1,1	-1,62
73	-7,11	-1,19		-3,15
74	-3,38	-0,14	1,16	-1,92
75		8,21	9,39	1,97
76	-2,01	-1,4	5,6	-2,25
77			-23,26	
78		11,97	-12,24	11,44
79	-4,39	1,49	4,84	-1,51
80	-4,05	1,31	0,6	-1,82
81	-3,54	13,98	-0,88	-1,49
82		13,98	6,96	-0,91
83	-2,75	3,59	6,12	-0,04

84	-1,15	5,96	3,21	-0,74
85			8,34	1,37
86	-8,09	-3,92	5,2	-2,37
87			11,15	
88			11,32	8,12
89			9,54	-1,07
90			11,73	1,71
91	0,17	4,39	5,96	-2
92	-12,03	6,81	16,55	0,83
93	-5,75	0,71	1,03	1,56
94	-7,62	-0,45	0,59	1,8
95	-3,53	18,62	10,45	2,07
96	-6,9	16,28	8,72	1,07
97	-2,71	-0,62	31,37	-2,66
98	-8,26	0,36	27,69	1,34
99	-5,33	-1,41	-5,48	0,18
100	-4,17	-0,33	31,31	-0,18
101	-3,09	3,31	28,13	1,16
102	-1,83		5,07	1,86
103	-1,15	10,27	2,6	1,25
104		3,44	-6,14	2,33
105		5,65	2,83	0,3
106	-1,11	2,02	-1,23	1,44
107	-5,55			0,73
108	-7,54	19,65	16,98	0,57
109	-6,43	-1,67	-1,63	0,55
110	-3,08	6,85	-0,05	2,27
111	-6,46	1,07	-6,13	0,88

Sonuç olarak her hasta grubunda araştırılan genlerin ifadesinde gözlenen değişikliklerin görülme oranı belirlendi. Sonuçlar Tablo 4-5'te gösterilmiştir.

Tablo 4-5 Gen İfadelerindeki Değişim Oranları

Hastalar	KML	AML	ALL	KLL
N	32	20	29	20
Hes1	% 100 ↑	% 100 ↑	% 100 ↑	% 100 ↑
Hey1	% 84,4 ↑	% 100 ↑	% 55,2 ↑	% 52,4↑
ID-4	% 81,2 ↓	% 80 ↓	% 96,5 ↓	% 81 ↓
Ikaros	% 53.1 ↓	% 80 ↑	% 51,7 ↑	% 76 ↑

Veriler toplu olarak değerlendirildiğinde, Hes1 gen ifadesinin bütün hasta gruplarında ve tüm hastalarda arttığı görüldü.

KML’li hasta grubunda Hey1 gen ifadesinin 27 hastada (%84.4) arttığı, 5 hastada ise (%16,6) azaldığı gözlemlendi. KML’li hastalarda ID-4 gen ifadesi hastaların %81,2 sinde azalırken Ikaros gen ifadesinin 17 hastada azaldığı, 15 hastada ise arttığı belirlendi

AML hastalarına ait örneklerin tümünde Hes1 ve Hey1 genlerinin ifadesinin artmış olduğu, ID-4 gen ifadesinin hastaların %80 inde azaldığı, buna karşılık Ikaros gen ifadesinin hastaların % 80 inde arttığı gözlemlendi.

ALL’li hastalara ait incelenen 29 örneğin hepsinde Hes1 gen ifadesinin arttığı, Hey 1 ifadesinin ise hastaların % 55 inde arttığı görüldü. ID-4 gen ifadesinin hastaların % 96 sında, Ikaros gen ifadesinin ise hastaların % 48 inde azaldığı belirlendi.

KLL hastalarına ait örneklerin de hepsinde Hes1 gen ifadesinin arttığı, Hey1 gen ifadesinin ise hastaların yarısında arttığı görüldü. Bu grupta ID-4 gen ifadesi hastaların % 81 inde azalırken Ikaros gen ifadesinin hastaların % 76 sında arttığı görüldü.

TARTIŞMA

Lösemiler, dünya üzerinde tüm kanserlerin % 3 kadarını oluştur ve çocukluk çağı kanserleri arasında % 36'lık görülme oranıyla en sık karşılaşılan kanserdir [33,34,54]. Lösemilerde prognoz hastadan hastaya değişen bir kriter olmasının yanı sıra, akut lösemilerin prognozu daha kötüdür. Akut lösemiler yaşamın ilk dekadlarında fazla görülürken kronik lösemiler ile beşinci ve altıncı dekatta ve erkeklerde daha fazla karşılaşılmaktadır [3,47,55,60].

Lösemilerin nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte; kalıtsal faktörler, genetik mutasyonlar, radyasyon ve kimyasallar gibi bir çok etkenin hücre farklılaşmasını ve gelişimini etkileyerek lösemilere neden olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Ayrıca akraba evliliklerinde ve Down sendromlularda da lösemiye yatkınlığın arttığı bilinmektedir [17,58,60].

Notch sinyal yolağı, çevre hücreler ile iletişim kurarak kan hücrelerinin farklılaşmasında görev yapan en önemli sinyal yolaklarından biridir. Notch sinyal yolağının hedefi olan Hey1 ve Hes1 genleri hücre döngüsünün, özellikle de G1 ve S fazlarının önemli düzenleyicisidir [57]. Ikaros geni çekirdekte yer alır ve Notch sinyal yolağı ile denge halinde bulunarak hücre farklılaşmasını düzenler [5,53]. ID-4 geni ise transkripsiyon faktörlerinin DNA'ya bağlanmasını engelleyerek farklılaşmanın ve gelişmenin kontrolünü sağlar [61].

Lösemi hastalarının kan ve kemik iliği örnekleri ile yaptığımız çalışmamızda, hastalarda ID-4 ve Ikaros genleri ile Notch sinyal yolağının hedef molekülleri arasındaki ilişki araştırılmıştır. İncelenen hastalarda Notch sinyal yolağının hedef genleri olan Hes1 geninin ifadesinde % 100 artış görülürken, Hey1 geninin ifadesinde ise %73 artış görülmüştür.

İsveç'te yapılan çalışmalarda, ALL hastalarında Notch sinyal yolağının hedef genlerinden olan Hes1'in anlatımının hastaların % 56'sında arttığı bildirilmiştir [57]. Fransa'da yapılan benzer bir çalışmada ise ALL hastalarında Notch sinyal yolağının hücre dışı ligandı olan Jagged molekülünde meydana gelen mutasyonlar saptanmış ve bu hastaların hücrelerinde Notch sinyal yolağının kontrolsüz olarak aşırı aktivasyonu

sonucunda hedef genler olan Hes ve Hey genlerinin ifadesinde de artış görülmüştür [31]. ABD’de yapılan bir çalışmada ise çocukluk çağı lösemi hastalarında Hey1 ve Hes1 genlerinin ifadesinde % 57’lik bir artış görülürken, lösemili yetişkin hastaların % 64’ünde Hey1, % 86’sında ise Hes1 geninin ifadesinde artış bildirilmiştir [35]. Hastalarımızın hepsinde Hes1 gen ifadesinde artış gözlenmesi bu son çalışmada bildirilen oran ile uyum göstermektedir. Hey-1 geninde gözlediğimiz artış oranı da her üç çalışmada bildirilen değerler ile uyum içindedir. Yine ABD’de yapılan çalışmada Kannas S. ve arkadaşları ALL hastalarında Hes1 geninin ifadesinde artış görmüşlerdir [36].

İnsanda ve farelerde kronik lösemilerde ID-4 geninin ifadesinin azaldığı bildirilmektedir [14,64]. Çalışmamızda ID-4 gen ifadesinin kronik ve akut lösemili hastaların % 84,6’sında azaldığı görülmüştür. Bu bulgu MDS’li hastalar ile yapılan ve bu hastalara ait kan örneklerinin % 70’inde ID-4 geninin metilasyon ile susturulduğunu bildiren bir çalışma ile uyumludur [61]. ID-4 metilasyonu görülen hastaların % 86’sında daha sonra lösemi oluşmuştur. Lösemiye dönüşen MDS hastalarında ID-4 geninin yüksek oranda metile olması bu hastalarda ID-4 geninin hastalığın gelişimi için bir belirteç olabileceğini düşündürmüştür [61,62]. Kore’de gerçekleştirilen bir çalışmada da kronik lösemiden akut lösemiye dönüşen ve t(8;21) translokasyonu bulunan akut lösemili hastalarda ID-4 geninde % 65,2 oranında yüksek metilasyon bildirilmektedir [60]. Çalışma kapsamında hastalarımızda ID-4 geninin metilasyonu araştırılmamıştır. Hastalarımızın çok büyük bölümünde ID-4 geninin ifadesinin azalması bizim hastalarımızda da gen ifadelerinin metilasyon ile baskılandığını düşündürmektedir. Hastalarımızın çok büyük bir bölümünde ID-4 gen ifadesinin azalması ve buna karşılık Hes1 gen ifadesinin bütün hastalarda artması ID-4 geninin Notch sinyal yolağı üzerinde etkili olduğu görüşünü desteklemektedir. Aynı ilişkiye MDS’li hastalarda da işaret edilmiştir.

Çalışmamızda da Ikaros gen ifadesinin lösemili hastaların % 51,3’ünde azaldığı görülmüştür. Lösemilerde Ikaros geni ile yapılan çalışmalarda farklı veriler elde edilmesine karşın yakın zamanda Fransa’da yapılan bir çalışmada bulgularımızla uyumlu olarak lösemili hastalarda Ikaros geninin ifadesinin % 60 oranında azaldığı bildirilmiştir [53].

Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda, timusta T-hücre gelişimi sırasında Notch sinyal yolağının hedef geni olan Hes1'in Ikaros geninin ürünü tarafından dengede tutulduğu bildirilmiştir [13]. Fareler ve T-hücre lösemi hücre hatlarında yapılan çalışmalarda Ikaros'un Hes1 üzerindeki baskılayıcı etkisi gösterilmiştir [37,40]. Bulgularımız aynı etkinin lösemi hastaları için de geçerli olduğunu göstermektedir.

Literatürde lösemilerde Ikaros ve Notch sinyal yolağına ait çalışmalara sık rastlanmasına karşın ID-4 geni ile ilişkili çok az sayıda çalışma vardır. Lösemilerde; Ikaros, ID-4 ve Notch sinyal yolakları arasındaki ilişkilerin birlikte incelendiği net bir çalışma bulunmamaktadır. Sonuçlarımız literatürle uyumlu şekilde, lösemilerde Notch sinyal yolağı ile ID-4 ve Ikaros gen ifadelerinin birbirlerine bağlı olarak değiştiğini göstermektedir.

Notch sinyal yolağında oluşan bozukluklar sonucunda etkilenen genlerden ID-4 ve Ikaros'un ifadesinin prelösemik hastaların tanısında belirteç olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir. Bulgularımızın aynı hasta grubuyla ilgili genlerin metilasyonlarının da değerlendirilmesiyle genişletilmesi planlanmaktadır. Tümör baskılayıcı Ikaros genindeki değişikliklerin ise hastalığın prognozu için değerlendirilmesi araştırmaya değer bir konudur. Notch sinyal yolağı ile ilgili yapılacak çalışmalar ve bu yolak ile etkileşen diğer hücre içi mekanizmalarında incelenmesi yerinde olacaktır. Bulgularımızın daha geniş ve farklı hasta gruplarıyla değerlendirilerek doğrulanması gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Abrisqueta P, Pereira A, Rozman C. Improving survival in patients with chronic lymphocytic leukemia (1980–2008): the Hospital Clinic of Barcelona experience. *Blood* 2009; 114: 2044–2050
2. Aktaş S, Zadeoğlulari Z, Erçetin P, Olgun N. The effect of differentiating and apoptotic agents on notch signalling pathway in hepatoblastoma. *Hepatogastroenterol* 2010; 7: 891-898
3. Bellavi D, Mecarozzi M, Campase AF, Grazioli P. Notch and ikaros not only converging players in T-cell leukemia. *Cell Cycle* 2007; 22: 2730-2734
4. Bellavi D, Mecarozzi M, Campase AF, Grazioli P. Notch3 and the Notch3-upregulated RNA-binding protein HuD regulate ikaros alternative splicing. *EMBO J* 2007; 26: 1670-1680
5. Bennett J, Catovsky D, Daniel M. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia (AML-M0). *Br J Haematol* 1991; 78: 325-329
6. Branford S, Hughes TP. Mutational analysis in chronic myeloid leukemia: when and what to do? *Curr Opin Hematol* 2011; 99: 101-109
7. Brown G, Hughes PJ, Michell RH, Ceredig R. The versatility of haematopoietic stem cells: implications for leukaemia. *Crit Rev Clin Lab Sc* 2010; 47: 171-180
8. Borducchi DM, Oliveira JS, Bordin JO, Kerbaux J. HTLV-I infection among relatives of patients with adult T-cell leukemia/lymphoma in Brazil: analysis of infection transmission. *Leuk Lymphoma* 1998; 31: 411-416
9. Burchert A, Neubauer A. Chronic myeloid leukemia : Diagnostics, therapy and future strategy. *Internist (Berl)* 2011; 52: 283-288
10. Cahri S, Winandy S. In developing thymocytes Ikaros regulates Notch target gene expression *Immunol* 2008; 181: 6265-6274

11. Calabretta B, Salomoni P. Inhibition of autophagy: a new strategy to enhance sensitivity of chronic myeloid leukemia stem cells to tyrosine kinase inhibitors. *Leuk Lymphoma* 2011; 1; 54-59
12. Caporaso N, Goldin L, Plass C. Chronic lymphocytic leukaemia genetics overview. *Br J Haematol* 2007; 139: 630–634
13. Catovsky D, Richards S, Matutes E. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet* 2007; 370: 230–239
14. Chen SS, Claus R, Lucas DM, Yu L, Qian J, Ruppert AS, West DA, Williams KE, Johnson AJ, Sablitzky F, Plass C, Byrd JC. Silencing of the inhibitor of DNA binding protein 4 (ID4) contributes to the pathogenesis of mouse and human CLL. *Blood* 2010; 116: 192-199
15. Crowther-Swanepoel D, Broderick P, Ma Y. Fine-scale mapping of the 6p25.3 chronic lymphocytic leukaemia susceptibility locus. *Hum Mol Genet* 2010; 19: 1840–1845
16. Dahan S, Rabinowitz KM, Martin AP, Berin MC, Unkeless JC, Mayer L. Notch-1 signaling regulates intestinal epithelial barrier function, through interaction with CD4(+) T Cells, in mice and humans. *Gastroenterol* 2010; 10: 57-63
17. Davis E, Jacoby P, de Klerk NH, Cole C, Milne E. Western Australian children with acute lymphoblastic leukemia are taller at diagnosis than unaffected children of the same age and sex. *Pediatr Blood Cancer* 2011; 10: 1002-1009
18. Dolcetti R, Carbone A. Epstein-Barr virus infection and chronic lymphocytic leukemia: a possible progression factor? *Infect Agent Cancer* 2010; 5: 22-27
19. Dumortier A, Jeannet R, Kistetter P, Notch ac Kleinmann E. tivation is an early and critical event during T-cell leukemogenesis in Ikaros-deficient mice. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 209-220

20. Eichhorst BF, Busch R, Hopfinger G. Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006; 107: 885–891
21. Fais F, Bruno S, Ghiotto F. Role of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia: where do we stand? *Ital J Anat Embryol* 2010; 115: 79-84
22. Flinn IW, Neuberg DS, Grever MR. Phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide compared with fludarabine for patients with previously untreated chronic lymphocytic leukemia: US Intergroup Trial E2997. *J Clin Oncol* 2007; 25: 793–798
23. Frappier L. Viral disruption of promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies by hijacking host PML regulators. *Virulence* 2011; 2: 23-28
24. Gasperowicz M, Otto. The Notch signaling pathway in the development of the mouse placenta. *Placenta* 2008; 29: 651-659
25. Gilliland DG, Griffin JD: The roles of FLT-3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood* 2002; 100: 1532-1542
26. Gribben JG. How I treat CLL up front. *Blood* 2010; 115: 187–197
27. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008; 111: 5446–5456
28. Hallek M, Fingerle-Rowson G, Fink A-M. First-Line Treatment with Fludarabine (F), Cyclophosphamide (C), and Rituximab (R) (FCR) Improves Overall Survival (OS) in Previously Untreated Patients (pts) with Advanced Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL): Results of a Randomized Phase III Trial On Behalf of An International Group of Investigators and the German CLL Study Group. *Blood* 2009; 114: 535– 539
29. Heather D, VanGuilder, Kent E. Vrana, Willard M. Freeman. Twenty-five years of quantitative PCR for expression analysis. *BioTechniques* 2008;; 44: 619-626

30. Hilditch L, Matadeen R, Goldstone DC. Ordered assembly of murine leukemia virus capsid protein on lipid nanotubes directs specific binding by the restriction factor, Fv1. *Proc Natl Acad Sci* 2011; 3: 501-509
31. Houlston RS, Catovsky D, Yuille MR. Genetic susceptibility to chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2002; 16: 1008-1012
32. Jarriault S, Brou C, Logeat F. Signalling downstream of activated mammalian Notch. *Nature* 1995; 377: 355-402
33. Jean HM, Jin X, Lee JS, Oh SY. Inhibitor of differentiation 4 drives brain tumor-initiating cell genesis through cyclin E and Notch Signaling. *Genes Develop* 2008; 22: 2028-2033
34. Jemal A, Murray T, Samuels A: Cancer statistics 2003. *CA Cancer J Clin* 2003; 53: 5-9
35. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 10-30
36. Jon C, Stephen C, Warren S. Notch signaling in T-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma and other haematological malignancies. *J Pathol* 2010; 223: 262-273
37. Kannan S, Fang W, Song G, Mullighan CG, Hammitt R, McMurray J, Zweidler-McKay PA. Notch/HES1-mediated PARP1 activation: a cell-type specific mechanism for tumor suppression. *Blood* 2011; 117: 2891-2900
38. Katherin KL, Chari S, Winandy S. Ikaros directly represses the notch target gene *hes1* in a leukemia T-cell line. *J Biol Chem* 2008; 20: 1074-1081
39. Keating MJ, O'Brien S, Albitar M. Early results of a chemoimmunotherapy regimen of fludarabine, cyclophosphamide, and rituximab as initial therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2005; 23: 4079-4088
40. Kishi Y, Kami M, Oki Y, Hamaki T, Kanda Y, Machida U, Miyakoshi S, Ueyama J, Morinaga S, Muto Y. Successful bone marrow transplantation for

- adult T-cell leukemia from a donor with oligoclonal proliferation of T-cells infected with human T-cell lymphotropic virus. *Leuk Lymphoma* 2001; 42: 819-822
41. Kleinmann E, Geiner Lelay AS, Sellars M. Ikaros represses the transcriptional response to Notch signaling in T-cell development. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 7465-7475
 42. Lan Q, Au WY, Chanock S, Tse J, Wong KF, Shen M, Siu LP, Yuenger J, Yeager M, Hosgood HD 3rd, Purdue MP, Liang R, Rothman N. Genetic susceptibility for chronic lymphocytic leukemia among Chinese in Hong Kong. *Eur J Haematol* 2010; 85: 492-495
 43. Linet MS, Schubauer-Berigan MK, Weisenburger DD. Chronic lymphocytic leukaemia: an overview of aetiology in light of recent developments in classification and pathogenesis. *Br J Haematol* 2007; 139: 672-686
 44. Loh ML. Childhood myelodysplastic syndrome: focus on the approach to diagnosis and treatment of juvenile myelomonocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010; 2010: 357-362
 45. Lopez-Nieva P, Santos J, Fernandes-Piqueras J. Defective expression of Notch1 and Notch2 in connection to alterations of c-Myc and Ikaros in γ -radiation-induced mouse thymic lymphomas. *Carcinogenesis* 2004; 25: 1299-1304
 46. Masuko K, Masaru K. Integrative genomic analyses on HES/HEY family: Notch-independent Hes1, Hes3 transcription in undifferentiated ES cells, and Notch-dependent Hes1, Hes5, Hey1, Hey2, HeyL transcription in fetal tissues, adult tissues, or cancer. *Int J Oncol* 2007; 31: 461-466
 47. Mullighan CG. New strategies in acute lymphoblastic leukemia: translating advances in genomics into clinical practice. *Clin Cancer Res* 2011; 18: 233-239
 48. Nagel S, Venturini L, Meyer C. Multiple mechanisms induce ectopic expression of LYL1 in subsets of T-ALL cell lines. *Leukemia Res* 2010; 34: 521-528

49. O'Brien S, delGiglio A, Keating M. Advances in the biology and treatment of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1995; 85: 30-36
50. Pancewicz J, Taylor JM, Datta A, Baydoun HH, Waldmann TA, Hermine O, Nicot C. Notch signaling contributes to proliferation and tumor formation of human T-cell leukemia virus type 1-associated adult T-cell leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 16619-16624
51. Papathanasiou P, Attema JL, Karsunky H. Self-renewal of the long-term reconstituting subset of hematopoietic stem cells is regulated by Ikaros. *Stem Cells* 2007; 27: 3082-3092
52. Qu F, Zhao CH, Diao YQ, Zhu XL, Chen J, Li M, Liu CP, Jiang L, Jin J. Methylation of Id4 gene and inhibitive effect of arsenic trioxide on it in Raji cells. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2010; 31: 821-825
53. Rebello A, Schmitt S. Ikaros, aiolos and helios: transcription regulators and lymphoid malignancies. *Immunol Cell Biol* 2003; 81: 171-175
54. Roberts KG, Mullighan CG. How new advances in genetic analysis are influencing the understanding and treatment of childhood acute leukemia. *Curr Opin Pediatr* 2011; 23: 34-40
55. Sathiyamoorthy S, Shad A, Ozdemirli M. Acute promyelocytic leukemia following chemotherapy for EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer* 2011; 56: 850-852
56. Shawn P, Tsaiwei O, Koji H, Martin K. Notch signaling proteins Hes1 and Hey1 bind N-box domains in the Col2a1 enhancer site to repress chondrogenesis. *Arthritis Rheum* 2008; 58: 2754-2763
57. Söhlund I, Mantepoulas C, Stockhausen MT, Axelson H. The Notch pathway in cancer: Differentiation gone awry. *Eur J Cancer* 2005; 41: 2620-2629
58. Stilgenbauer S, Zenz T. Understanding and managing ultra high-risk chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program* 2010; 201: 481-488

59. Stratil A, Horák P, Filkuková J, Van Poucke M, Bartenschlager H, Peelman LJ, Geldermann H. Partial genomic structure, mutation analysis and mapping of the porcine inhibitor of DNA binding genes ID1, ID2, ID3 and ID4. *Anim Genet* 2010; 41: 558-569
60. Uhm KU, Lee ES, Lee YM, Park JS, Kim SJ, Kim DS. Differential methylation pattern of ID4, SFRP1 and SHP1 between acute myeloid leukemia and chronic myeloid leukemia *J Korean Med Sci* 2009; 24: 493-497
61. Voutel A, Tournier-Lasser E. Notch signaling pathway and human diseases. *Cell Develop Biol* 1998; 9: 619-625
62. Wang H, Wang XQ, Xu XP, Lin GW. ID4 methylation predicts high risk of leukemic transformation in patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia Res* 2010; 34: 598-604
63. Yu F, Li J, Chen H, Fu J, Ray S, Huang S, Zheng H, Ai W. Kruppel-like factor 4 (KLF4) is required for maintenance of breast cancer stem cells and for cell migration and invasion. *Oncogene* 2011; 30: 12-19
64. Zenz T, Mertens D, Küppers R, Döhner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2010; 10: 37-50

FORMLAR

GÖNÜLLÜ BİLGİLENDİRME VE ONAY FORMU

ÇALIŞMANIN ADI:

LÖSEMİLERDE ID-4 ve IKAROS GEN ANLATIMININ NOTCH SİNYAL YOLAĞI ile İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

ÇALIŞMANIN AMACI:

Kan hücrelerinde farklılaşmanın kontrolü lösemi oluşumunda en önemli basamaklardandır. Ikaros geni hücreyi farklılaşmaya götürürken, ID-4 geni ise farklılaşmayı engeller. Notch sinyal yolağı ise daha çok hayvanlarda araştırılmış olan ve hücre farklılaşmasında rol oynayan bir yoldur. Çalışmamızın amacı kronik ve akut lösemi hastalarında bu iki geni ve Notch sinyal yolağı ile olan ilişkisini araştırmaktır.

ÇALIŞMANIN İÇERİĞİ:

Çalışma, akut ve kronik lösemili hastalarda yapılacaktır. Yaklaşık hasta sayımız 100 olacaktır. Kan hücrelerinin farklılaşmasını sağlayan ve farklılaşmayı engelleyen genlerden olan Ikaros ve ID-4 gen anlatımları ile hücreleri farklılaşmaya teşvik eden Notch sinyal yolağının bu genler ile ilişkisi araştırılacaktır. Araştırma, hastaların kan hücrelerinden elde edilen RNA ile real-time PCR yöntemi kullanılarak yapılacaktır.

ÇALIŞMANIN BAŞLAMA TARİHİ VE SÜRESİ:

Çalışmanın Haziran 2009'da başlaması ve 1 yıl sürmesi öngörülmektedir.

ACIKLAMALAR:

Bu çalışmaya gönüllü olmaya karar vererseniz bu gönüllü bilgilendirilmiş onay formunu imzalamanız gerekecektir. Sadece kendi rızanız ile hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın, doktor kontrolünde alınacak kan ve doku örneğiniz ile bilimsel çalışmaya katılmış olacaksınız. Sizden ayrıca araştırmaya yardımcı olacak bazı kişisel bilgileriniz (yaş,

meslek, sigara kullanımı vs.) istenebilir. Etik kurullar inceleme amacıyla medikal kayıtlardaki medikal kişisel bilgilerinize ve bu çalışmadan elde edilen bilgilere erişebilirler. Medikal bilgilerinize erişim çalışma için toplanan bilgilerle sınırlı olacaktır.

Bu çalışmanın sonuçları bilimsel toplantılarda veya yayınlarda sunulabilir, ancak bu sunumlarda kimliğiniz açıklanmayacaktır. Ayrıca sizden araştırmayla ilgili olarak herhangi bir maddi talepte bulunulmayacak ve size de herhangi bir ücret ödenmeyecektir. Ayrıca bu araştırmaya karar verdiğiniz takdirde ileriye dönük olarak hastalığınız hakkında elde edilecek bilgilerle bilim dünyasına konuyla ilgili olarak önemli derecede katkı sağlayacağınız kesindir. Gönüllü olmaya karar verdiğiniz ve bu bilgilendirilmiş gönüllü onay ve rıza formunu imzaladığınız taktirde yukarıda yazılanları okuyup kabul ettiğinizi ve hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın ailenizin bilgisi dahilinde sadece kendi rızanız ile karar verdiğinizi onaylamış olacaksınız.

Herhangi bir soru yada sorunuz olduğu taktirde ilgili araştırmacı Orkun Gürbüz'e 0212 414 24 34 / 34188 no'lu telefondan ulaşabilirsiniz.

GÖNÜLLÜ ONAY FORMU

Gönüllüye (hastaya) araştırmadan önce verilmesi gereken bilgiler tarafıma sözlü ve yazılı olarak aktarıldı. Bu koşullarda söz konusu çalışmaya kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Çalışma için alınan materyalimin ilerideki çalışmalarda da kullanılmasını

EVET ☐ kabul ediyorum.

HAYIR ☐ kabul etmiyorum.

Hastanın:

Adı Soyadı:

Telefonu:

Adresi:

İmza:

Açıklamaları Yapan Doktorun:

Adı Soyadı:

İmza:

Tanıklık Eden Görevlinin:

Adı Soyadı:

İmza:

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI
Yerel Etik Kurulu



Sayı : 1882

Tarih : 18/06/2009

Konu : Prof.Dr. Nejat DALAY hk,

Sayın Prof.Dr. Nejat DALAY
Onkoloji Enstitüsü
Öğretim Üyesi
İlgili : 20.03.2009 tarihli 70/931 sayılı yazınız

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Yüksek Lisans Öğrencisi Moleküler Biyolog Orkun GÜRBÜZ'ün yürüteceği 2009/1484 dosya numaralı "Lösemilerde ID-4 ve IKAROS Gen anlatımının Notch Sinyal Yolu ile ilişkisinin araştırılması" başlıklı tez çalışması Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmesi şartı ile kurulumuzun 13.05.2009 tarihli 05 sayılı toplantısında onaylanmış olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinize saygılarımla rica ederim.


Prof.Dr. Güher SARUHAN DİRESKENELİ
İstanbul Tıp Fakültesi
Dekan Yardımcısı ve
Etik Kurul Başkanı

Eki: Tutanak



**İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI**

Toplantı Tarihi : 13/05/2009

Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Etik Kurul Toplantı Salonu

Toplantı Sayısı : 5

Sorumlu araştırmacılığını Üniversitemiz Onkoloji Enstitüsü Öğretim Üyesi Prof.Dr. Nejat DALAY'ın üstlendiği ve Yüksek Lisans Öğrencisi Moleküler Biyolog Orkun GÜRBÜZ'ün yürüteceği 2009/1484 protokol numaralı "Lösemilerde ID-4 ve IKAROS Gen anlatımının Notch Sinyal Yolağı İlişkinin Araştırılması" başlıklı tez çalışması kurumumuzda incelendi.

Etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklendiği takdirde uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

Prof.Dr. Güher SARUHAN DİRESKENELİ

Etik Kurul Başkanı (Dekan Yardımcısı)

Prof.Dr. A.Yağız ÜRESİN

Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Prof.Dr. Ahmet GÜL

İç Hast. A.D, Romatoloji Bilim Dalı

Prof.Dr. Berrin UMMAN

Kardiyoloji A.D.

Prof.Dr. Kamil PEMBEÇİ

Anesteziyoloji A.D.

Prof.Dr. Sevinç EMRE

Çocuk Sağ. Ve Hast. A.D

Prof.Dr. Nuran YILDIRIM

Deontoloji ve Tıp Tarihi A.D.

Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN

Nöroloji A.D.

Prof.Dr. Pinar SAİP

I.Ü. Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. Ümit TÜRKOĞLU (T.Katılmadı)

Biokimya A.D

Prof.Dr. Neşe ÇOLAK

İç Hast.A.D. End. Ve Metabolizma Hast. B.D.

Prof.Dr. Nurhan ENGİNAR

Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Fatma Ceyda DÖNMEZER

Sivil Toplum Örgütü Üyesi

Av. Dilek TEMİZ ÖZBEK

Hukukçu

Prof.Dr. Y. Sümer YAMANER (T.Katılmadı)

Genel Cerrahi A.D.

PATENT HAKKI İZİNİ

TELİF HAKKI İZNİ

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Orkun	Soyadı	Gürbüz
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	03.01.1984
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	45514343212
Email	orkun.gurbuz@hotmail.com	Tel	(505) 667 52 31

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	H.Ü. Fen-Edb. Fak. Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2007
Lise	Bayrampaşa Anadolu Lisesi	2002

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	Orta	Orta	53.75	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	66	67	65
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

