



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HEMATOLOJİK MALİGNİTELERDE GADD45 EPİGENETİK DİSREGÜLASYONU

ENİSE ÇAVUŞOĞLU
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK
ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Beyazıt Çırakoğlu
Dr. Can Erzik

İSTANBUL-2009

İçindekiler

Kısaltmalar.....	iv
Şekil Listesi.....	v
Tablo Listesi.....	vi
1. ÖZET:	1
2. SUMMARY	3
3. GİRİŞ VE AMAÇ:.....	4
4. GENEL BİLGİLER	7
4.1. Karsinogenez.....	7
4.2 Epigenetik	8
4.2.1 DNA Metilasyonu	8
4.2.2 Histon Modifikasyonları	10
4.3 Epigenetik ve Kanser İlişkisi	11
4.4 Metilasyonun Etkilediği Yolaklar	13
4.5 GADD45 Ailesi	14
4.6 Multipl Miyelom.....	16
4.6.1 Epidemiyoloji.....	16
4.6.2 Patogenez	17
4.7 Akut Myeloid Lösemi	18
4.8 Epidemiyoloji.....	18
5 GEREÇ VE YÖNTEM	19
Kullanılan gereçler ve solüsyonlar.....	19
5.1 Hücre Kültürü ve DAC muamelesi	20
5.2 Kandan Hücre İzolasyonu	23
5.3 DNA İzolasyonu	23
5.4 Bisülfıt Modifikasyonu	25

5.5	Metilasyon Spesifik PCR	27
5.6	İnvitro metillenmiş DNA	29
5.7	Agaroz Jel Elektorforezi	30
5.8	RNA İzolasyonu.....	30
5.9	Ters Transkripsyon	31
5.10	Real Time PCR	32
6	BULGULAR.....	36
6.1	DNA İzolasyonu Sonuçları	36
6.2	Hücre Soyları Metilasyon Durumları.....	36
6.3	Hasta Örnekleri MSP Sonuçları.....	37
6.4	DAC ile inkübasyon sonrası hücre soylarının metilasyon durumları	40
6.5	RT-PCR sonuçları	41
6.6	GADD45γ metilasyon durumu ve klinik parametreler	44
7	TARTIŞMA	45
8	KAYNAKLAR	49

Kısaltmalar

AML : Akut Miyeloid Lösemi

cDNA: Komplementer DNA

DAC: Decitabine

DAP : Death Associated Protein

DNMT: DNA Metil Transferaz

GADD45: Growth Arrest and DNA Damage Inducible 45

GAPDH: Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz

HDAC: Histon Deasetilaz

IVD : İn Vitro metillenmiş DNA

LOH: Loss of Heterozygosity

MBP: Metillenmiş DNA'ya Bağlanan Protein

MDS: Miyelodisplastik sendrom

MGUS : Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance

MM: Multiple Miyelom

MSP: Metilasyon Spesifik PZR

NFκB : Nuclear Factor kappa

Şekil Listesi

Şekil 1 DNMT aktivitesinde 5-metil sitozin oluşumu	9
Şekil 2 Mutasyonlar, LOH ya da promotor hipermetilasyonu ile tumor baskılayıcı genlerin sessizleştirilmesi..	12
Şekil 3 Normal hücrelerde ve tümör hücrelerinde DNA metilasyonu paterni	13
Şekil 4 Metillenmiş ve metillenmemiş DNA dizilerinde bisülfid uygulaması sonucu meydana gelen değişiklikler.....	25
Şekil 5 TaqMan Probe yöntemi	34
Şekil 6. Hücre serilerinin metilasyon durumları	37
Şekil 7. MM hasta örnekleri temsili MSP sonuçları.	38
Şekil 8 DAC inkübasyonu sonrası hücre serilerinin metilasyon durumları	41
Şekil 9. GADD45 γ 'nın tamamiyle metile durumda olduğu hücre serilerinde DAC inkübasyonu öncesi ve sonrası GADD45 γ ekspresyonu.....	42
Şekil 10. GADD45 γ 'nın parçalı metile ve metillenmemiş durumda olduğu hücre serilerinde DAC inkübasyonu öncesi ve sonrası GADD45 γ ekspresyonu.	43
Şekil 11 MM hastalarının sağ kalım süreleri ve GADD45 γ 'nın metilasyon durumu	44

Tablo Listesi

Tablo 1 Durie-Salmon evreleme sistemi.....	17
Tablo 2 Kullanılan gereçler	19
Tablo 3 Kullanılan tampon ve solüsyonlar	20
Tablo 4 Kullanılan Hematolojik Malignite Hücre Soyları, Besi Yeri ve FCS oranları	22
Tablo 5 Kandan hücre izolasyonunda kullanılan materyaller	23
Tablo 6. Bisülfid modifikasyonunda kullanılan materyaller	25
Tablo 7 MSP’de kullanılan Materyaller.....	27
Tablo 8 GADD45γ MSP primerleri	27
Tablo 9 Reaksiyon Başına PCR Bileşeni Miktarı	28
Tablo 10 IVD elde etmek için kullanılan materyaller	29
Tablo 11. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan Materyaller	30
Tablo 12 Ters transkripsiyonda kullanılan materyaller	31
Tablo 13 Ters Transkripsiyon Reaksiyon Bileşenleri.....	32
Tablo 14 RT-PCR’da kullanılan gereçler	32
Tablo 15 Primerler	32
Tablo 16 RT-PCR bileşeni.....	35
Tablo 17 RT-PCR bileşeni (GAPDH)	35
Tablo 18 MM hasta listesi ve metilasyon durumları.....	38

1. ÖZET:

GADD45 gen ailesi hücrede DNA hasarına cevap oluşturulması ve hücre bölünmesinin durdurulması süreçlerinde etkili olan, nükleer proteinler GADD45 α , β ve γ ' yı kodlar. Her üç GADD45 gen ailesi üyesi de MTK1 kinazı aktive ederek p38/c-jun-NH₂-kinaz aktivasyonunu ve apoptozu indüklemektedir. Yapılan çalışmalarda GADD45 γ 'nın tümör hücrelerinin koloni oluşturmalarını ve bölünmesini baskıladığı gösterilmiştir. Ayrıca birçok kanser türünde GADD45 γ 'nın metile durumda bulunduğu ve metilasyonun ekspresyonu baskıladığı gösterilmiştir. Yapılan çalışmanın amacı hematolojik malignitelerde GADD45 γ promotorunun metilasyon durumunun belirlenmesi ve metilasyonun ekspresyona etkisinin saptanmasıdır. Bunun için hemotolojik malignite hücre soylarından ve 117 akut miyeloid lösemi (AML), 94 multipl miyelom (MM) teşhisi konmuş hastadan alınan kan ve kemik iliği örneklerinden DNA izolasyonu yapılmıştır. Bisülfid modifikasyonunun ardından örneklerle metilasyon spesifik polimeraz zincir reaksiyonu (MSP) yapılmıştır. Non-Hodgkin lenfoma hücre serileri L-428 ve L-1236, Burkitt lenfoma hücre serisi Raji hücrelerinde GADD45 γ promotoru tamamiyle metillenmiş olduğu, AML hücre serileri GDM-1, HL-60, KG1a ve MM hücre serisi OPM-2 hücrelerinde ise kısmen metillenmiş olduğu görülmüştür. İncelenen AML hasta örneklerinde metilasyon saptanmazken 94 MM hasta örneğinden 8'inde metilasyon saptanmıştır. İstatistiksel hesaplamalar sonucunda metilasyon saptanan hastalarda ortalama kalsiyum düzeyinin metilasyon görülmeyenlere oranla daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca GADD45 γ 'nın metile durumda olduğu hastaların ortalama sağ kalım sürelerinin 13,7 ay, genin metillenmemiş olarak bulunduğu hastalarda ise bu sürenin 57,1 ay olduğu görülmüştür. Metilasyonun genin ekspresyonuna etkisinin belirlenmesi amacıyla hücre soyları DNA metiltransferaz (DNMT) inhibitörü DAC ile 96 saat boyunca inkübe edilmiş ve RT-PCR uygulanmıştır. GADD45 γ promotorunun tamamiyle metillenmiş durumda bulunduğu L-1236 hücrelerinde DAC uygulaması sonrası genin ekspresyonunda değişiklik olmazken, Raji, L-428, HL-60, KG1a, OPM-2 hücrelerinde DAC uygulaması sonrası genin ekspresyonunda

artış gözlemlenmiştir. Elde edilen bulgular hemotolojik malignitelerde GADD45 γ geninin tümör tipine bağlı olarak epigenetik mekanizmalarla sessizleştirilebileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: GADD45 gen ailesi, GADD45 gamma, epigenetik, DNA metilasyonu, hematolojik malinite

2. SUMMARY

Epigenetic dysregulation of GADD45 in hematologic malignancies

GADD45 gene family encodes the nuclear proteins, GADD45 α , β and γ , which response to damage in DNA in a cell and stopping cell proliferation. It has been shown from the research conducted in recent years that GADD45 γ suppresses the colony formation and proliferation of tumor cells. The purpose of this study is to determine the methylation state of GADD45 γ promoter in hemotologic malignities and the effect of methylation on expression. Therefore, DNA isolation is performed on blood and bone marrow samples of 117 acute myeloid leukemia (AML), and 94 multiple myelom (MM) patients and hematologic malignency cell lines . After the bisulfide modification of DNA, methylation specific polymerase chain reaction (MSP) has been performed on the samples. It has been found that, in Hodgkin lymphoma cell lines L-428 and L-1236 and Burkitt lymphoma cell lines Raji, GADD45 γ promoter was fully methylated. However in AML cell lines GDM-1, HL-60, KG1a and MM cell lines OPM-2 , GADD45 γ promoter has been found to be partially methylated. No methylation was found in AML patient samples whereas 8 of of 94 MM patient samples show promoter methylation. The survival time of the patients with methylated GADD45 γ is 13.7 months, whereas the survival time of the patients with unmethylated GADD45 γ is 57.1 months. In order to understand the effect of methylation on the gene expression, the cell lines were treated with DNA methyltransferase inhibitor (DAC) for 96 hours and then real-time polymerase-chain reaction (RT-PCR) was performed. In L-1236 cells where GADD45 γ promoter was fully methylated, there has been no change in gene expression after DAC treatment whereas in Raji, L-428, HL-60, KG1a and OPM-2 cells, an increase in gene expression has been observed after DAC treatment,. The findings of this study indicate that in hemotologic malignancies, GADD45 γ gene may be silenced in epigenetic mechanisms according to the type of tumor.

Key Words: GADD45 gene family, GADD45 gamma, Epigenetic, DNA methylation, heamatological malignancy

3. GİRİŞ VE AMAÇ:

Günümüzde epigenetik terimi DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmaksızın gen ekspresyonunda meydana gelen kalıtlabilir değişiklikler olarak tanımlanmaktadır. Memelilerde görülen başlıca epigenetik değişiklik, CpG dinüklotidlerini oluşturan sitozin bazlarının 5' karbon pozisyonuna metil (CH_3) grubunun eklenmesiyle meydana gelen DNA metilasyonudur ve bu reaksiyon DNA metiltransferaz enzimleri tarafından katalizlenir. CpG dinüklotidlerinin genomdaki dağılımı çeşitlilik gösterir. Örneğin, CpG tekrarlarının sık görüldüğü bölgeler CpG adacıkları olarak adlandırılır ve bu adacıklar memeli genomundaki genlerin yaklaşık olarak yarısının promotor bölgelerine yakın konumda bulunurlar [1]. CpG adacıkları normalde metillenmemiştir ve bu durum kromatinin transkripsiyona elverişli durumda bulunmasına ve transkripsiyon faktörlerinin promotora bağlanarak genin ifade edilmesine olanak sağlar [2]. CpG ikilileri CpG adacıkları dışında heterokromatin bölgelerde ve metillenmiş olarak bulunur. Normal hücrelerdeki bu metilasyon paterni fazla miktardaki kodlama yapmayan DNA bölgelerinin transkripsiyonel olarak inert durumda kalmasında sağlar [3, 4]. DNA metilasyonu memelilerde embriyonik gelişim, transkripsiyon, X kromozomu inaktivasyonu, kromozom stabilitesi, kromatin yapısı ve genomik imprinting gibi önemli hücresel olayların düzenlenmesinde etkilidir. Bu önemli hücresel işlevleri nedeniyle DNA metilasyonunda meydana gelen değişiklikler birçok hastalıkla ilişkili bulunmuştur. Bu hastalıklardan en önemlilerinden biri kanserdir. Kanserli hücrelerin genom genelindeki metilasyon düzeyinde azalma gözlenir. 5'metilsitozindeki bu azalma temel olarak intronlarda ve kodlama yapmayan diğer DNA bölgelerindeki metilasyon kaybından kaynaklanır. Azalan metilasyonun transpozonları aktive ederek, kromozom stabilitesini ve imprintingi etkileyerek karsinogeneze katkıda bulunduğu düşünülmektedir [5]. Öte yandan birçok kanser türünde promotor bölgelerin yakınında bulunan CpG adacıklarında artmış metilasyon gözlemlenmiştir. Tümör baskılayıcı genlerin promotor bölgelerinde de gözlemlenen bu metilasyon artışı genin transkripsiyonunu engellediği için karsinogeneze önemli gen sessizleştirme mekanizmaları arasında sayılır [3, 4, 6].

Metilasyon profili çalışmaları kanserle ilişkili bulunan tüm yolların bu mekanizmadan etkilenebileceğini ve genlerdeki artan metilasyonun malign hücrelerin kaynaklandığı dokuya bağlı olarak farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur [2, 3]. Belirli genlerin tümöre özgü değişen metilasyon paterninin kanserin tanı, prognoz ve tedavisinde kullanılabilecek potansiyel klinik uygulamaları olduğu düşünülmektedir [7]. DNA metilasyon markerları kanserin sınıflandırılması ve saptanmasında kullanılabilir. Yapılan son çalışmalar bazı genlerin metilasyon durumlarının kolorektal, akciğer ve prostat kanserlerinde prognozla yakın ilişkili olduğunu göstermiştir.

Genetik bozuklukların tersine epigenetik değişikliklerin metilasyonun ve histon asetilasyonunun farmakolojik ajanlar aracılığı ile inhibe edilmesi durumunda geri döndürülebilir olduğu için kanser tedavisinde umut vaat etmektedir [8]. DNA metilaz inhibitörleri, desitabin ve MG98 gibi ajanlar klinik olarak deneme aşamasındadır.

GADD45 (growth arrest and DNA damage inducible) gen ailesi yapısal olarak homoloji (55–57%) gösteren ve çevresel ya da fizyolojik stres tarafından indüklenen GADD45 α , GADD45 β ve GADD45 γ nükleer proteinlerini kodlar [8]. GADD45 proteinleri PCNA, p21, cdc/siklin B1 ve p38 gibi hücre döngüsünün regülasyonunu sağlayan bir çok proteinle etkileşime girerek hücre döngüsü, DNA tamiri, hücre sağkalımı, senesens ve apoptos gibi birçok süreçte etkili olurlar [9].

Farklı birçok hücre türüyle yapılan çalışmalar GADD45 protein ailesinin DNA hasarı durumunda G2/M kontrol noktasında rolü olduğunu göstermiştir. İnsan fibroblast hücrelerine GADD45 α ekspresyon vektörü mikroenjeksiyonu sonucu hücrelerin G2/M kontrol noktasını geçemediği görülmüştür GADD45 α p53 bağımlı olarak hücrelerin G2/M kontrol noktasını geçememelerini sağlar ve cdc2 kinazı inhibe eder [10].

GADD45 ailesinin iki elemanı GADD45 α ve γ kanser hücrelerinde apoptoz süreciyle ilişkilidir. Adı geçen proteinlerin NFkB tarafından baskılanması kanser hücrelerinin sağ kalımı için gereklidir. NFkB'nin inhibisyonunun GADD45 α ve γ

ekspresyon artışına bağlı olarak kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği ve tümör büyümesini baskıladığı gösterilmiştir [11].

NFkB aracılı baskılanma dışında, bazı kanser türlerinde artan metilasyon da GADD45 protein ailesi üyelerinin ekspresyonunun azalmasında etkilidir. Örneğin meme kanserinde sağlıklı meme epiteli ile karşılaştırıldığında tümör dokusunda GADD45α ekspresyonunda azalma gözlemlenmiş ve bu durum promotorda meydana gelen metilasyon artışıyla ilişkili bulunmuştur. Hipofiz adenomlarında GADD45γ sessizleştirilmesine hastaların 67%'sinde metilasyonun neden olduğu ve hipofiz tümörü hücre soyu olan AtT20 hücrelerinin DNMT inhibitörleri ile inkübasyonu sonucu GADD45γ ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir [12].

Tümör baskılayıcı genlerin artan metilasyonla ilişkili baskılanması hematolojik neoplazilerin tüm majör alt gruplarında gösterilmiştir. Örneğin, non-Hodgkin lenfomada DAP (death associated protein kinase) ve p57 [13], multiple miyelomada p16INK4a ve SOCS-1 (suppressor of cytokine signaling 1), akut lenfositik lösemide E-cadherin, p73 ve MGMT (O6 methylguanine Methyltransferase), akut miyeloid lösemide p15INK4b, E-cadherine RARβ2 (retinoic receptor β2) ve CRBP1 (cellular retinol-binding protein 1), kronik miyeloid lösemide p15INK4b ve abl metillenmiş bulunan genlerden bazılarıdır [14, 15].

Tümör baskılayıcı gen promotorlarıyla ilişkili CpG adacıklarında metilasyonun artışının hemen tüm majör hematolojik malignitelerde görüldüğü bilinmekte ve bu değişikliğin olasılıkla erken dönemde meydana geldiği düşünülmektedir .

Yapılan çalışmada belirli hemotolojik malignitelerde GADD45γ geninin metilasyon durumunun ve metilasyonun genin ekspresyonuna etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Karsinogenez

Kanser uzun yıllar boyunca çok basamaklı, genetik bir hastalık olarak tanımlanmıştır. Kanser, gen fonksiyonunda meydana gelen kalıtlılabilir değişimlerin birikimiyle, normal hücrelerin büyüme avantajı sağlamış malign türevlerine dönüşmesiyle gelişir. Gen mutasyonları, delesyonlar, amplifikasyonlar ve translokasyonlar gibi DNA dizisinde değişikliklere neden olan genetik bozukluklar onkogenlerin aktivasyonu, tümör baskılayıcı genlerin baskılanması ya da işlevini kaybetmiş kimerik proteinlerin oluşması yoluyla hücre bölünmesi ve hücre homeostazı düzenleyen mekanizmalarda bozulmalara sebep olur. Onkogenler ve tümör baskılayıcı genler hücre proliferasyonunun kontrolünde etkisi olan proteinler kodlarlar ve bu genlerde meydana gelen mutasyonlar kanser oluşumuna neden olur.

Kanser hücrelerinin tümör oluşumu sürecinde edindiği ve hücreye bölünme avantajı sağlayarak malign büyümeyi destekleyen altı özellik vardır. Bunlar; hücrenin kendi büyüme sinyalini üretebilme, büyümeyi baskılayıcı sinyallere duyarsızlaşma, apoptoza direnç geliştirme, doku invazyonu, sınırsız bölünme potansiyeli ve sürekli olarak anjiyogenezin sağlanmasıdır. Hücre fizyolojisinde, kansere karşı savunma mekanizmalarında meydana gelen bu bozulmaların hemen hemen her tümör tipi için ortak olduğu fakat meydana geliş sıralarının aynı ve farklı tümör tipleri arasında çeşitlilik gösterdiği düşünülmektedir [16].

Yapılan çalışmalar genetik bozuklukların yanısıra epigenetik bozuklukların da kanserin patogenezinde etkili olduğunu göstermiştir. DNA dizisinde değişiklik meydana getirmeksizin gen ekspresyonunun kontrolünde etkili başlıca epigenetik bozukluklar değişen DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarıdır.

4.2 Epigenetik

Epigenetik DNA 'nın primer nükleotid dizisindeki değişimlerden bağımsız olarak gen ekspresyonunda meydana gelen kalıtlabilir değişimler olarak tanımlanmaktadır.

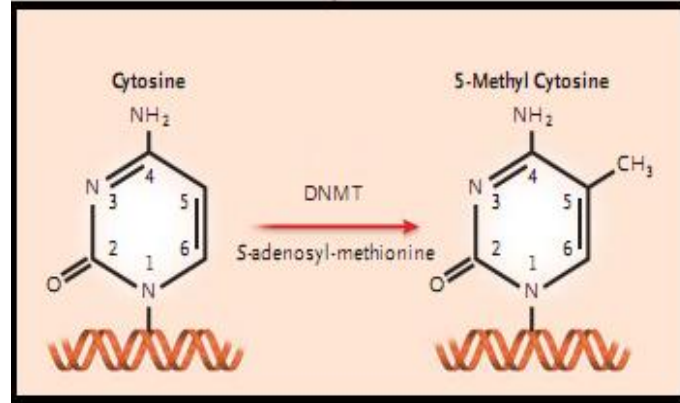
Embriyonik gelişim sürecinin kontrolünde genetik mekanizmaların yanı sıra epigenetik mekanizmalar da büyük önem taşır. Memelilerde başlıca görülen epigenetik mekanizmalardan olan DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları kromatin yapısına etki ederek embriyogenez ve gametogenez sırasında genomun yeniden programlanmasında ve dokuya özgü gen ekspresyonun sağlanmasında önemli rol oynar.

4.2.1 DNA Metilasyonu

Ökaryotlardaki DNA metilasyonu CpG ikililerinde bulunan sitozin halkasının 5' karbon ucuna metil grubunun eklenmesiyle meydana gelen DNA'nın kovalent modifikasyonudur. S-adenosil-metiyoninin metil verici olarak katıldığı reaksiyon DNA metiltransferaz (DNMT) enzimleri tarafından katalizlenir [3]. Evrim sürecinde genomdaki CpG ikililerinin sayısında azalma meydana gelmiş ve yüksek ökaryotik canlılarda bu oran beklenenin %5 - %10'una kadar düşmüştür. Metillenmiş sitozin moleküllerinin deaminasyona uğrayarak timin moleküllerine onarılması nedeniyle DNA metilasyonunun bu süreçteki rolü büyüktür.

Genomdaki CpG ikililerinin %70-80'i DNA'nın eksprese edilmeyen bölgelerinde bulunur [17]. Bu bölgeler inaktif kromatin yapıları nedeniyle metillenmemiş DNA bölgelerine oranla daha geç replike olurlar.

DNA metilasyonun etkili olduğu inaktif kromatin yapısı transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını engelleyerek satellit ve parazit DNA dizileri gibi tekrarlayan genomik bölgelerin, DNA'ya entegre olmuş viral genomların ve transpozonların eksprese edilmesini engellemektedir [3].



Şekil 1 DNMT aktivitesinde 5-metil sitozin oluşumu

CpG ikililerinin bir kısmı genomun genelinden farklı olarak CpG bakımından zengin, CpG adacıkları olarak adlandırılan bölgelerde bulunurlar. CpG adacıkları en az 500 baz çifti uzunluğunda G+C içeriği $> \% 55$ ve görülen CpG/beklenen CpG oranı 0,65 olan DNA bölgeleridir [18]. Çoğunlukla promotor bölgelerde konumlanmışlardır ve genlerimizin yaklaşık olarak yarısı CG adacı taşıyan promotörlere sahiptir. Promotörle ilişkili CG adacıkları çoğunlukla metillenmemiş olarak bulunur. İstisna olarak, normal dokuda genetik materyalin anne ya da babadan kalıtılmış olmasına bağlı olarak genin yalnız bir allelinin eksprese edildiği imprinted genlerde ve kadınlarda inaktif X kromozomunda bulunan genlerde CG adacıkları tamamiyle metillenmiş olarak bulunur [19] [3].

CG adacıklarındaki metilasyonun dokuya özgü genlerin, eksprese edilmemesi gereken hücre tiplerinde sessizleştirilmesini sağlayan mekanizmalardan olabileceği varsayılmaktadır. Fakat metilasyonun dokuya özgü gen sessizleştirilmesi sürecinde, belirli transkripsiyon faktörlerinin olmaması nedeniyle ortaya çıkan ikincil bir mekanizma mı yoksa itici güç mü olduğu kesinlik kazanmamıştır.

4.2.2 Histon Modifikasyonları

DNA'nın paketlenmesinde görevli olan histon proteinleri H2A, H2B, H3 ve H4 olmak üzere dört çeşittir. 146 bp uzunluğundaki DNA ipliğinin histon proteinlerinin oluşturduğu yapı etrafında iki kez dolanmasıyla nükleozomlar oluşur. DNA ile ilişkileri nedeniyle histon proteinleri transkripsiyon, replikasyon, rekombinasyon ve DNA tamir mekanizmalarında önemli role sahiptir [20]. Nükleozom yüzeyindeki amino terminal histon kuyruklarının geçirdiği post-translasyonel modifikasyonlar kromatin yapısını etkileyerek genlerin transkripsiyonel kontrolünde rol oynarlar [21]. Üzerinde en çok çalışılmış olanlar histon asetilasyonunda değişiklikler ve H3 Lizin 9 metilasyonudur. Sitozin metilasyonu ile birlikte histon modifikasyonları heterokromatinin sıkıca paketlenmesinde ve ökromatin bölgelerdeki genlerin transkripsiyonel olarak sessizleştirilmesinde etkili epigenetik mekanizmaları oluştururlar.

Histonlardaki asetilasyon değişiklikleri histon deasetilaz (HDAC) ve histon asetiltransferaz (HAT) enzimleri tarafından katalizlenir. Histonlardaki lizinlerin asetilasyonu genel olarak transkripsiyonel aktivasyonla, deasetilasyonu ise kromatinin yoğunlaşması ve transkripsiyonel olarak baskılanması ile ilişkilendirilmektedir [22].

Lizin asetilasyonu histon proteinlerinin yükünü nötralize ederek DNA iskeleti ile histonlar arasındaki etkileşimi azaltır. Bunun yanı sıra asetillenmiş histon kuyrukları nükleozom biçimlendirici proteinlerle etkileşime girerek kromatinin şekillenmesini sağlar [23].

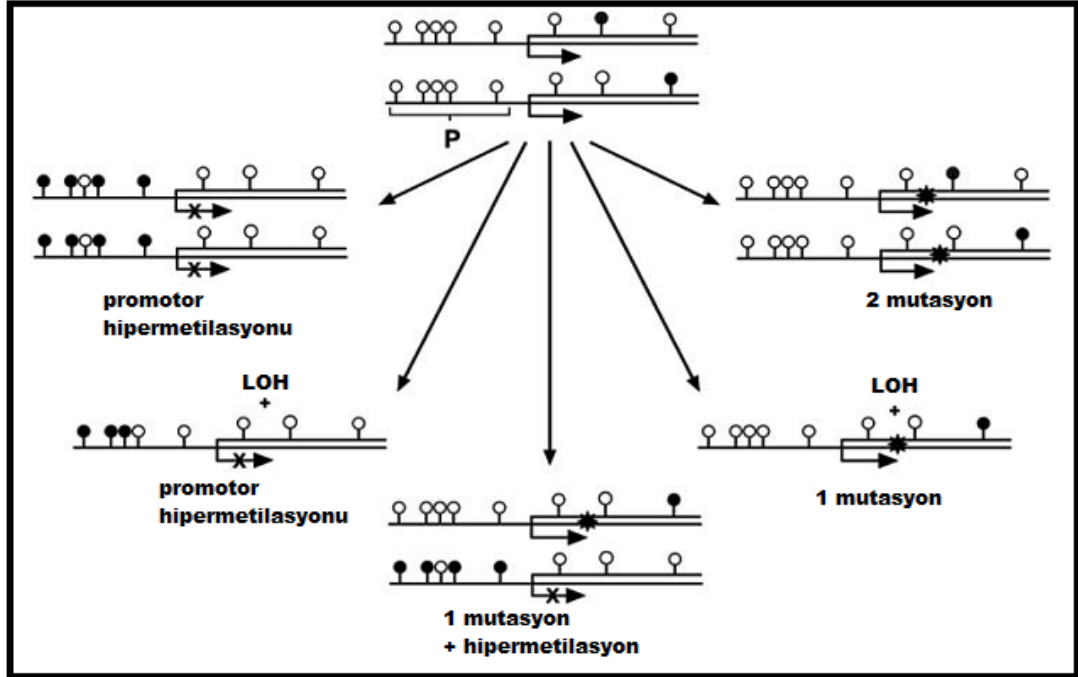
Histonlarda metilasyon histon metiltransferaz enzimleri tarafından kontrol edilir. Lizin ya da arjinin amino asitlerinden hangisinde ve hangi pozisyonda görüldüğüne bağlı olarak fonksiyonu farklılık gösterir. Örneğin H3K4 metilasyonu transkripsiyonel aktivasyonla, H3K9 ya da H4K20 metilasyonu ise transkripsiyonel baskılanma ile ilişkilidir. Metillenmiş H3K9 kromodomain Chd1 ile kompleks oluşturarak kromatinin aktif hale geçmesini sağlayan proteinlerin bir araya gelmesini sağlar. Metillenmiş H3K9 ve H3K27 ise HP1 ve polycomb proteinlerini çeker ve kromatinin yoğunlaşarak transkripsiyonun baskılanmasına neden olur [23].

4.3 Epigenetik ve Kanser İlişkisi

Kanser uzun yıllar boyunca genetik bir hastalık olarak tanımlanmıştır. Fakat yapılan çalışmalar genetik bozukluklar gibi epigenetik bozuklukların da tümör baskılayıcı genlerin baskılanması, onkogenlerin aktivasyonu ve kromozom anomalilerine yol açarak karsinogeneizde etkili olduğunu göstermiştir.

Kanserde tanımlanan ilk epigenetik değişikliklerden birisi normal dokuyla karşılaştırıldığında tümörlü dokularda görülen hipometilasyon olmuştur. Hipometilasyon çoğunlukla intronlarda ve tekrarlayan DNA bölgelerinde görülür. Kromozomal dengenin bozulmasına, transpozonların aktive olarak transkripsiyona uğramasına ya da genomda farklı yerlere yerleşmesine ve de imprinting'in kaybedilmesine neden olarak karsinogeneizde etkili olduğu düşünülmektedir [5]. Ayrıca hipometilasyon DNA'yı mitotik rekombinasyonlara daha yatkın hale getirerek delesyon ve translokasyonların görülme sıklığını arttırabilir. Sentromerik DNA dizilerinde azalan metilasyon insan tümörlerinde sık rastlanan bir olaydır ve anöploidilere sebep olduğu düşünülmektedir [24].

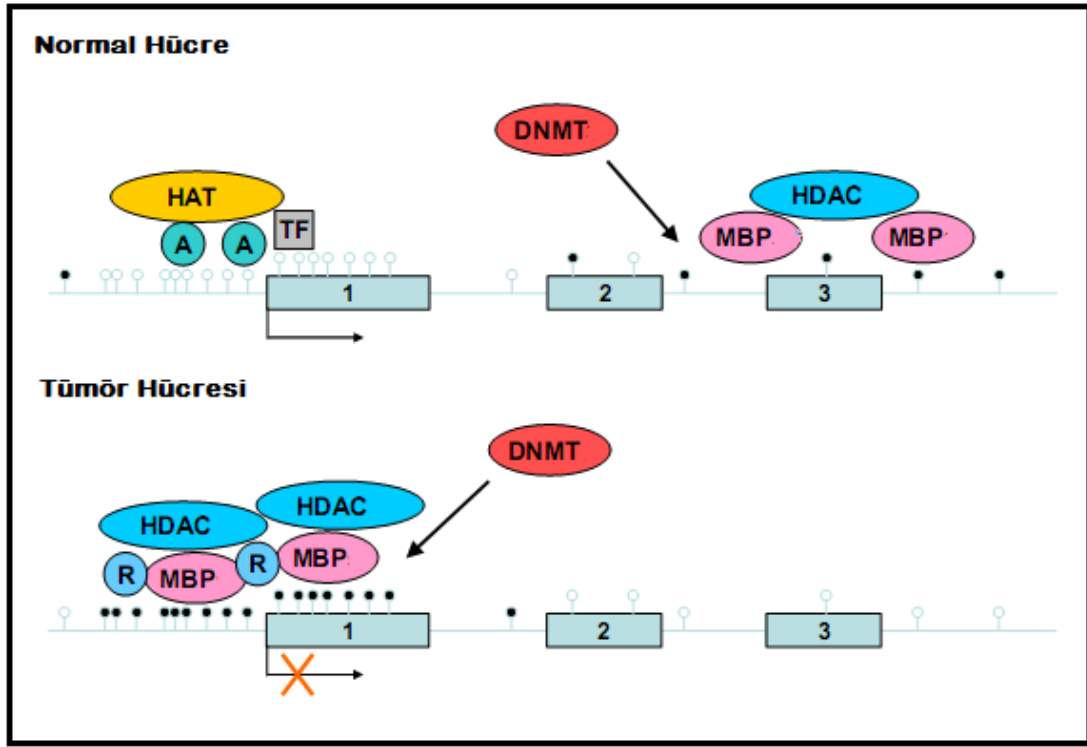
Promotor bölgelerde bulunan CpG adacıklarında metilasyon artışı neoplazmlarda en iyi tanımlanmış epigenetik değişimlerdendir ve hemen hemen tüm tümör çeşitlerinde görülmektedir. CpG adacıklarındaki metilasyon mutasyonlara alternatif olarak tümör baskılayıcı genlerin transkripsiyonel olarak sessizleştirilmesinde etkili bir diğer mekanizmadır. Knudson'un two hit hipotezine göre tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonlarını yitirmeleri için her iki kopyalarının da kaybedilmesi gereklidir. Promotor metilasyonu da nokta mutasyonları ve delesyonlar gibi tümör baskılayıcı genlerin iki kopyasını da kaybetmesine yol açan mekanizmalardandır. Buna göre germ line ya da somatik mutasyonlarla genin bir kopyasının kaybedilmesi ilk vuruşu oluşturur. İkinci vuruş çoğunlukla geni kodlayan bölgenin somatik olarak kaybedilmesi ya da LOH ile gerçekleşir. Promotor metillenmesi genin bir kopyasını kaybedilmesinde nokta mutasyonları ile aynı etkiyi göstererek ilk vuruşu, diğer kopyanın kaybedilmesi de ikinci vuruşu oluşturarak protein fonksiyonu engellenebilir.(Şekil 2) Ailesel kanserlerde ise metilasyon ilk vuruş için geçerli olan bir mekanizma olmazken ikinci vuruşu oluşturabilir [3].



Şekil 2 Mutasyonlar, LOH ya da promotor hipermetilasyonu ile tumor baskılayıcı genlerin sessizleştirilmesi. İçi boş yuvarlaklar metillenmemiş, içi dolu yuvarlaklar ise metillenmiş sitozinleri temsil etmektedir.

DNA hipermetilasyonun tümör baskılayıcı genlerin sessizleştirilmesinde etkili bir mekanizma olduğu bilinmesine rağmen moleküler mekanizması tam olarak bilinmemektedir.

Hipermetile promotorların bulunduğu bölgelerde kromatin sıkıca paketlenmiştir ve histon deasetilasyonu sık görülür. Metillenmiş sitozinler HDAC'ların da arasında olduğu transkripsiyonu engelleyen protein komplekslerinin promotor bölge çevresine bağlanmasına aracılık eder. Histon deasetilasyonu yoğunlaşmış kromatin yapısı ve transkripsiyonel baskılanma ile yakından ilişkilidir. Metillenmiş sitozine bağlanan proteinlerin (MBP), HDACların ve kromatin şekillendirici proteinlerin promotorlara bağlanmasıyla kapalı kromatin yapısının oluştuğu ve bunun transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini engelleyerek transkripsiyonu baskıladığı düşünülmektedir (Şekil 3)



Şekil 3 Normal hücrelerde ve tümör hücrelerinde DNA metilasyonu paterni . A =Transkripsiyonel aktivatör, HAT = Histon Asetil Transferaz, TF = Transkripsiyon Faktörü, DNMT= DNA metil Transferaz, MBP = Metil sitozine bağlanan proteinler, R = transkripsiyonel represör

DNA metilasyonu tümör gelişimi sürecine tümör baskılayıcı genlerin sessizleştirilmesi dışında farklı mekanizmalarla da etki edebilmektedir. 5 metil sitozin molekülü mutasyona oldukça açıktır. Sitozinin hidrolitik deaminasyona uğraması C→T dönüşümlerine neden olur. İnsan tümörlerinde TP53 inaktive edici nokta mutasyonlarının yaklaşık 50%'si metillenmiş sitozinlerde görülür [2].

4.4 Metilasyonun Etkilediği Yolaklar

Kanserde birçok farklı tümör baskılayıcı genin promotor bölgesinde artan metilasyon olduğu ve bunun transkripsiyonel sessizleşmeye etkisi olduğu bilinmektedir. Ayrıca metilasyon profili çalışmaları hipermetile genlerin tümörlerin kaynaklandığı dokuya bağlı olarak çeşitlilik gösterdiğini ortaya koymuştur. Hipermetilasyon aracılı tümör baskılayıcı gen sessizleştirilmesi kanserle ilgili tüm

yolakları etkilemektedir. Değişen metilasyon paterninden etkilenen bazı genler ve dâhil oldukları yollar şöyledir:

Hücre döngüsü: Hücre döngüsü inhibitörü p16^{ink4a} birçok hücre serisinde ve primer tümörde hipermetile olarak bulunmuştur. Genin metilasyonu hücrelerin senesenssten çıkarak bölünmeye başlamasına neden olur. Ayrıca Rb geni de birçok tümörde hipermetile durumdadır.

P53 yolağı: p14ARF proteini p53'ün yıkımını sağlayan proteinlerden MDM2yi inhibe ederek p53'ün aktive olmasını sağlar. Kolon kanserlerinin yaklaşık % 28 inde bu gende hipermetilasyon gözlemlenmiştir. Ayrıca lösemilerde p53 homologu olan p73 geni geninde hipermetilasyon görülür [25].

DNA tamiri: DNA tamir genlerinden hMLH1 sporadik kolarektal, endometrial ve gastrik tümörlerde hipermetilasyon aracılığı ile sessizleştirilmiştir.

B- katenin /E- kaderin yolağı: E-kaderin, H-kaderin ve FAT gibi tümör baskılayıcı genlerdeki promotor hipermetilasyonu meme, kolon ve diğer tümör tiplerininin biyolojisinde etkilidir.

4.5 GADD45 Ailesi

GADD45 gen ailesi üyeleri GADD45 α , β ve γ evrim sürecinde korunmuş ve yüksek oranda homoloji gösteren 18 kd büyüklüğünde proteinler kodlarlar. Bu nükleer proteinler oldukça asidik (pI= 4.0- 4.2) yapıdadır ve hücre döngüsünün kontrolünde rolü olan birçok proteinle ilişki halindedirler. Ailenin üç elemanı da tüm normal ve fetal dokularda eksprese edilmektedir.

GADD45 gen ailesi üyeleri tarafından kodlanan proteinler p53 bağımlı ya da bağımsız mekanizmalarla çevresel ve fizyolojik stresin algılanması ve strese yanıt oluşturulmasında etkilidir. GADD45 genlerinin hücre döngüsünü, DNA tamiri, hücre sağ kalım, apoptoz ve senesensin kontrolünde etkili olduğu gösterilmiştir. GADD45 γ metilmetan sülfonat, UV radyasyonu, hidroksi üre gibi DNA hasarına yol açan ajanlar tarafından kolayca indüklenebilir. TP-53 tarafından regüle edilen

genlerdendir. Normal fibroblast hücrelerine GADD45 ekspresyon vektörü transfekte edildiğinde hücrelerin G2-M geçiş noktasını aşamadığı gözlemlenmiştir. GADD45 α cdc2 (Cdk1) ile etkileşime girerek cdc2/siklinB1 kompleksinin inaktive olmasına ve hücrelerin G2-M geçiş noktasında durmasına neden olur.

GADD45 β ilk olarak M1 miyeloid lösemi hücrelerinde terminal farklılaşma sonrası interlökin-6 tarafından aktive edilen miyeloid farklılaşmaya duyarlı bir gen olarak tanımlanmıştır.

GADD45 γ (GRP17/CR17) PCN ve siklin bağımlı kinaz ile etkileşime girer ve büyümenin negatif kontrolünde etkilidir. Ayrıca MTK1/ MEKK4 ile etkileşerek p38 /c-Jun NH2 terminal kinaz yolağını aktive ederek çevresel strese karşı apoptosu tetikler. Zerbini ve ark. kanser hücrelerinin NF κ B aracılı sağ kalımının GADD45 ailesi üyeleri GADD45 α ve γ ye bağımlı olduğunu göstermişlerdir. Çalışmada NF κ B'nin baskılanmasıyla artan GADD45 α ve γ ekspresyonunun apoptosu tetiklediği ve tümör büyümesini yavaşlattığı gösterilmiştir [11].

Ying ve ark. GADD45 γ 'nın birçok kanser türünde epigenetik mekanizmalarla sessizleştirildiğini göstermiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre GADD45 γ geni tümör tipine bağlı olarak hipermetile durumda bulunabilir ve hipermetilasyonun sıklığı tümör çeşidine göre değişiklik gösterir. Metilasyon, genin ekspresyonunun azalması ya da genin sessizleştirilmesiyle doğrudan ilişkilidir. Hipermetilasyonla azalan ekspresyonda demetile edici ajanların kullanılmasıyla artış görülmesi metilasyonun yol açtığı gen sesizleştirmesinin farmakolojik ajanlarla geri döndürülebileceğini göstermiştir. Bununla birlikte GADD45 γ nın ektopik olarak arttırılan ekspresyonunun tümör büyümesini ve koloni oluşumunu yavaşlattığı yani tümör baskılayıcı gen olarak işlev gördüğü anlaşılmıştır [26]. Başka bir çalışmada GADD45 α birçok meme kanseri örneğinde metillenmiş olarak bulunmuş ve bunun ekspresyonda azalmaya neden olduğu tespit edilmişken GADD45 γ geninde normal ve kanserli meme dokusu arasında metilasyonda bir değişiklik rapor edilmemiştir.

Bahar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada incelenen hipofiz adenom örneklerinin % 67 sinde GADD45 γ nın eksprese edilmediği ve ekspresyon görülmeyen örneklerin % 82'sinde genin metile durumda olduğu görülmüştür.

Ayrıca demetile ajanların kullanılmasının ekspresyonu indüklediği yani metilasyonun yol açtığı gen sessizleştirmesinin geri dönüşümlü olduğu görülmüştür. DNA tamiri ve hücre döngüsünün kontrolünde etkisi olan GADD45 γ nın ekspresyonunun gerek NF κ B aktivasyonu gerek metilasyonla baskılanması onkogeneizde önemli bir basamak olarak görülmektedir. NF κ B aktivasyonunu birçok kanser türünde hücrelerin apoptozdan kaçışında etkili olurken GADD45 α ve γ 'nın ekspresyonunu baskılar.

GADD45 γ ekspresyonunun metilasyon nedeniyle baskılanmasının da hücrelerde aynı fenotipin görülmesine neden olabileceği, kanser hücrelerinin DNA hasarına ve strese dirençli hale gelerek sağ kalımını destekleyebileceği düşünülmektedir.

4.6 Multipl Miyelom

Multipl miyelom (MM) monoklonal plazma hücrelerinin kemik iliğinde birikimiyle karakterize edilen bir hematolojik malignitedir. Miyeloma hücrelerinin kemik iliğindeki birikimi immunoglobülin üretiminin artmasına neden olarak böbrek fonksiyonunda aksamalara ve kemiklerde lezyonlara yol açar. Malign plazma hücreleri kemik iliğindeki stromal hücreler ile ekstraselüler matriks proteinleri ve büyüme faktörleri aracılığı ile etkileşime girerek tümör büyümesi, ilaç direnci ve sağ kalımı sağlayan sinyal mekanizmalarının aktif hale geçmesine neden olur [27]. En sık görülen semptomları halsizlik ve kemik ağrısıdır. Hastaların % 70'inde anemi, % 50'sinde böbrek yetmezliği ve % 25'inde hiperkalsemi görülmektedir [28].

4.6.1 Epidemiyoloji

MM beyaz ırkta görülen tüm malignitelerin % 1'ini oluştururken ikinci en sık görülen hematolojik malignitedir. Amerika Birleşik Devletlerinde teşhisin yapıldığı ortalama yaş 71'tir ve 2003 yılında 14600 yeni vaka tanımlanmıştır. 2002 yılında bu hastalık nedeniyle ABD'de kaybedilen vaka sayısı 10900'dür. İstatistiklere göre

beyaz erkeklerde görülme sıklığı 100000 de 6.7, siyahlarda 12.9 iken bu oran beyaz kadınlarda 4,2 ve siyah kadınlarda 10,4 olarak bulunmuştur [29].

4.6.2 Patogenezi

MM B-lenfositlerinden orijinlenen bir hastalıktır. Hastalığın oluşması çok basamaklı bir süreçtir ve bu süreç MGUS (monoclonal gammopathy of undetermined significance) ile başlamaktadır. MGUS plazma hücrelerinin premalign proliferasyonudur ve MM oluşumuna zemin hazırlar. MGUS 50 yaş üstü bireylerin yaklaşık % 3'ünde görülür ve her yıl bu sayının yaklaşık % 1'i MM ya da benzer malignitelere dönüşür [28, 30].

Tablo 1 Durie-Salmon evreleme sistemi

Durie-Salmon evreleme sistemi [31]	
Evre I (Sayılan tüm kriterler)	- Hb > 10 g/dl - Normal kalsiyum - normal yada tek lezyon - Düşük M proteini: IgG < 5 g/dl, IgA < 3 g/dl - İdrarda hafif zincir miktarı < 4 g/24h
Evre II	Evre I ve III dışı kalan durumlar
Evre III (en az birinin görülmesi halinde)	- Hb < 8.5 g/dl - Yüksek kalsiyum oranı > 12 mg/dl 3 ya da daha fazla kemik lezyonu - Yüksek M protein IgG > 7 g/dl, IgA > 5 g/dl - İdrarda hafif zincir miktarı > 12 g/24h
Evre I, II ve III serum keratin seviyeleri göz önüne alınarak A ve B alt gruplarına ayrılabilir.	
• A: Serum kreatin < 2 mg/dl	• B: Serum kreatin > 2 mg/dl

MM oluşumunda monozomiler, translokasyonlar ve trizomiler gibi kromozomal bozuklukların etkisi vardır. Örneğin hastaların % 20-30'unda immunoglobulin ağır zincir geninin 14q32 bölgesinde translokasyon görölmüştür. Ayrıca hücre proliferasyonu ve farklılaşması süreçlerinin kontrolünde etkili genlerin bulunduğu 11q13 ve 8q24 lokuslarında meydana gelen değişiklikler de MM'de görölen başlıca kromozomal bozukluklardandır [27].

4.7 Akut Myeloid Lösemi

Akut miyeloid lösemi immatur blast hücrelerinin kemik iliği ve periferel kanda birikerek normal kan hücrelerinin üretilmesini engellemesiyle ortaya çıkan bir hematolojik malignitedir. WHO sınıflandırmasına göre AML teşhisi için kemik iliğinde en az %20 blast bulunduğunun tespit edilmesi gerekmektedir. Blast hücreleri sitokimyasal ve immünofenotipik olarak miyeloid hücre özelliği taşımalıdır. Birçok durumda etiyolojisi bilinmemekle birlikte radyasyon, sitotoksik kemoterapi ve benzen maruz kalma gibi durumlar AML ile ilişkili bulunmuştur. Malign karakterli miyoblast hücreler kemik iliğinde ve birçok durumda kanda bulunur. Malign miyoblastlar kemik iliğini işgal ederek normal hematopoietik hücrelerin gelişimini engeller. Sınıflandırma FAB sistemine göre yapılır. Bu sisteme göre AML M0-M7 olmak üzere 8 gruba ayrılır. Sınıflandırma farklılaşma ve hücre orijinine göre yapılır [32].

4.8 Epidemiyoloji

Amerika Birleşik Devletleri'nde kanserin yol açtığı ölümlerin yaklaşık %1.2 ' si AML'den kaynaklanmaktadır ve her yıl 10 500 yeni vaka ortaya çıkmaktadır. AML' in insidansı ileri yaşlarda artmaktadır ve teşhis için ortalama yaş 63'tür [33].

5 GEREÇ VE YÖNTEM

Kullanılan gereçler ve solüsyonlar

Tablo 2 Kullanılan gereçler

<i>Kullanılan Gereçler</i>	<i>Model ve Firma Adı</i>
Otoklav	Autoklave HMC, BPW Vertriebs-GmbH für Labortechnik; Süßen
Tip II Kabin	HSP 12, Heraeus instruments Hanau
İnkübatör	Cytoperm 2, Heraeus instruments, Hanau
Jel elektroforez tankı	MU-0030, i-Mupid Mini Gel Migration Through, Eurogentec; Cologne
Isı bloğu	Dri-Block DB 2A, Techne; Wertheim
Kamera	Camedia C3040Zoom, Olympus; Hamburg
Dondurucu	Cooler, Bosch; Stuttgart
Spektrofotometre	ABX Micros 60-OT, ABX Hématologie; Montpellier, France
Mikrodalga fırın	Micro-Chef 900W, Moulinex; Leipzig
Mikro Santrifüj	SD, 110 VAC, Sigma-Aldrich; Munich
Spektral Fotometre	GeneQuant II; Pharmacia Biotech; Cambridge, England
Isısal Döngü Cihazı1	Ome-E Thermal Cyclers, Thermo Hybaid; Ulm
Isısal Döngü Cihazı 2	PxE Thermal Cyclers, Thermo Electron Corporation; Dreieich
Transilluminator	UV-Transilluminator, Biostep GmbH; Jahnsdorf
Vorteks	Assistent Reamix 2789, Karl Hecht GmbH & Co KG; Sondheim
Hassas terazi	AC 100, Mettler Waagen GmbH; Giessen

Su banyosu	Köttermann Labortechnik; Uetze
Santrifüj 1	Universal 32, Hettich Zentrifugen; Tuttlingen
Santrifüj 2	Biofuge pico, Heraeus instruments; Hanau

Tablo 3 Kullanılan tampon ve solüsyonlar

Solüsyon	İçerik ve Firma Adı
Etanol	Etanol absolute, Baker Analyzed Reagents; Deventer, Netherlands
Fosfat buffer salin (PBS)	<u>RWTH Aachen Üniversite Hastanesi Eczanesi :</u> -1.3 g Na ₂ HPO ₄ . 2 H ₂ O (Disodyum hidrojen fosfat) -0.2 g KH ₂ PO ₄ (Potasyum hidrojen fosfat) -8.0 g NaCl (Sodyum klorür) -distile su ad 1 l
Tris-Asetat-EDTA (TAE) Buffer	<u>DNA Typing Grade 50 x TAE Buffer, Invitrogen; Karlsruhe:</u> -2 M Tris-Asetat -50 mM EDTA

5.1 Hücre Kültürü ve DAC muamelesi

Gereç	Firma
Hücre Kültürü flaskleri 50 ml	BD-Bioscience; Heidelberg
5'-aza-2 deoxycytidine 1 mg/ml (DAC)	Sigma-Aldrich Biochemie GmbH; Hamburg
Falkon Tüpler 50 ml	BD-Bioscience; Heidelberg
Fetal calf serum (FCS)	Biochrom AG; Berlin
RPMI 1640, IMDM Medium	GIBCO, Invitrogen; Karlsruhe

GADD45γ promotor metilasyon statüsünün belirlenmesi ve metilasyonun genin ekspresyonuna etkisinin gözlemlenmesi için kullanılan AML, Hodgkin Lenfoma, MM ve Burkitt Lenfoma hücre soylarıyla hücre kültürü yapılmıştır. Hücreler için kullanılan medium çeşitleri ve FCS oranları tabloda belirtilmiştir. 30

ml toplam hacim besi yeri içerisinde hücre yoğunluğu $0,5 \times 10^6$ hücre/ml olacak şekilde ekim yapılmıştır. İnkübatöre alınan hücrelerin 48 saat sonunda mikroskopla canlılığı kontrol edilmiş ve hücre yoğunluğu ölçülmüştür. Yeni pasajda gerekli hücre yoğunluğunu sağlayacak miktarda hücre süspansiyonu taze besi üzerine eklenerek inkübatöre alınmıştır.

DAC 1mg/ml konsantrasyonda $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ta saklanır.

1. DAC muamelesi için 15×10^6 hücre içeren hücre süspansiyonu falkon tüpe alınarak 1200 rpm'de 5dk santrifüj edilir,
2. Süpernatant atılarak pellet üzerine 10 ml taze besi yeri eklenir.
3. Hücre kültürü yapılacak flaskın içerisine 20 ml taze besi yeri konulur ve besi yerinin DAC konsantrasyonunun $1\mu\text{mol/l}$ olması için $6,84\mu\text{l}$, $2\mu\text{mol/}$ için $13,68\mu\text{l}$ DAC eklenir.
4. Hazırlanan 10 ml hücre süspansiyonu flaska konulduktan sonra inkübatöre alınır.
5. 24 saat arayla hücreler mikroskopta kontrol edildikten sonra besi yeri yukarıda anlatıldığı gibi değiştirilir ve aynı miktarda DAC eklenir.
6. Hücreler toplam 96 saat DAC ile muamele edilir. Hücre miktarı ölçülür ve hücre süspansiyonu Falcon tübe alınarak santrifüj edilir.
7. Taze medium eklenerek hücreler vortekslenir ve 1200 rpmde 5 dk santrifüj edilir, medium eklenerek vortekslenir.
8. Hücre süspansiyonu her tüpte 5×10^6 hücre olacak şekilde cryo tüplere dağıtılır.
9. Tüpler 1200 rpmde 10 dk santrifüj edilir, süpernatant atılarak peller $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ e kaldırılır.

Tablo 4 Kullanılan Hematolojik Malignite Hücre Soyları, Besi Yeri ve FCS oranları

	Hücre serisi	Besi Yeri	FCS oranı
AML	HL-60	RPMI 1640	10%
	KG1A	RPMI 1640	20%
	SET-2	RPMI 1640	20%
	GDM-1	RPMI 1640	20%
MM	LP-1	IMDM	20%
	OPM-2	RPMI 1640	10%
	RPMI-8226	RPIMI 1640	10%
	U-266	RPMI 1640	10%
Burkitt Lenfoma	Raji	RPMI 1640	10%
Hodgkin Lenfoma	L-428	RPMI 1640	10%
	L-1236	RPMI 1640	10%
	L-540	RPMI 1640	20%

5.2 Kandan Hücre İzolasyonu

Tablo 5 Kandan hücre izolasyonunda kullanılan materyaller

<i>Kullanılan Materyal</i>	<i>Firma</i>
Ficoll	Lymphoprep 1114545, Axis-Shield; Oslo, Norway
Pasteur Pipet	Abbocath-T 14G, G713-A01 4535-14 Abott GmbH & Co. KG; Wiesbaden
Cryo-tüp	Cryo freezing tubes, 2 ml, 121279, Greiner bio-one; Frickenhausen

Mononükleer hücrelerin izolasyonu için yoğunluk gradiyenti santrifügasyonu uygulanır. Heparinize kan ya da kemik iliği 3 ml Ficoll üzerine yavaşça eklenir ve 2400 rpmde 20 dk santrifüj edilir. Mononükleer hücreler bulut görünümünde bir ara yüzey oluşturur. Pastör pipet yardımıyla mononükleer hücreler toplanır ve PBS içeren başka bir tüpe aktarılır, 1200rpmde 10 dk santrifüj edilir. İşlem bir kez daha tekrar edilir ve 1ml PBS eklenerek vortekslenir. Micros 60 (Axon Lab AG) kullanılarak hücre sayımı yapılır. Hücre süspansiyonu $5-10 \times 10^6$ hücre olacak şekilde cryo tüplere bölünür ve 1200 rpmde 10 dk santrifüj edilir, süpernant atılır ve pellet DNA izolasyonu yapılana kadar saklanmak üzere -80 C de saklanır.

5.3 DNA İzolasyonu

<i>Materyal</i>	<i>Firma</i>
QIAmp® DNA Mini Kit (50)	QIAGEN; Hilden

1. Hasta örneklerinden ya da hücre kültüründen izole edilen ve -80 °C de muhafaza edilen hücreleri oda sıcaklığında bekletilerek çözünmeleri sağlanır.
2. Hücre pelletlerinin üzerine 200 µl AL- Buffer eklenir ve vortekslenir.
3. 200µl PBS ve 20µl QIAGEN proteaz eklenerek tüpler vortekslenir.
4. Örnekler 56 C de su banyosunda 10dk inkübe edilir.

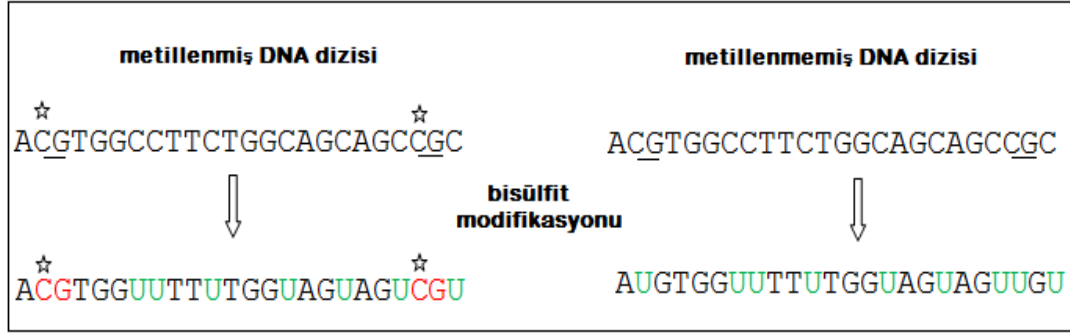
5. İnkübasyon sonrası tüpler 6–7 sn santrifüj edilerek çeperlere biriken sıvı toplanır. 200 µl % 98 etanol eklenir ve vortekslenir.
6. Süspansiyon filtreli tüplere (QIAmp spin column) aktarılır, 13000 rpm’de 1 dk santrifüj edilir.
7. Süzüntünün bulunduğu tüp (collection tube) yenilenir ve filtreli tüplere 500 µl of AW1-Buffer eklenir.
8. 8000 rpm de 1dk santrifüj edilir.
9. Tekrar 500 µl of AW2-Buffer (kit) eklenir ve 13 000 rpm de 3 dk santrifüj edilir.
10. Filtreli tüpler 1.5 ml’lik Eppendorflara konulur ve üzerlerine 200 µl distile su eklenir
11. Örnekler oda ısısında 1 dk inkübe edildikten sonra 8000 rpmde 1 dk santrifüj edilir.
12. 100 µl distile su eklenir ve oda ısısında 5 dk inkübasyon sonrasında 8000rpmde santrifüj edilir.
13. 20 µl örnek 50µl distile su ile seyreltilir ve fotometrede 260 ve 280 nm’de ölçüm yapılarak DNA miktarı belirlenir. DNA örnekleri -80 °C de saklanır.

5.4 Bisülfid Modifikasyonu

Tablo 6. Bisülfid modifikasyonunda kullanılan materyaller

<i>Kullanılan Materyal</i>	<i>Üretici Firma</i>
EZ DNA Methylation Kit™	Zymoresearch; Freiburg

MSP öncesi DNA örnekleri bisülfid ile muamele edilir. Metil grubu taşımayan sitozin bazıları deaminasyona uğrayarak urasile dönüşürken metillenmiş sitozinler değişime uğramadan kalır.



Şekil 4 Metillenmiş ve metillenmemiş DNA dizilerinde bisülfid uygulaması sonucu meydana gelen değişiklikler. Bisülfid uygulaması sonucunda metillenmiş sitozin molekülleri değişime uğramazken metillenmemiş sitozin molekülleri urasile dönüşür (☆işareti metil gruplarını temsil etmektedir).

1. Kit ilk kez kullanılmaya başlandığında M-Wash Buffer üzerine 24 ml % 98 etanol eklenir.
2. Her bisülfid modifikasyonu öncesi kullanılacak CT- Conversion Reagent üzerine 210 µl M- Dilution Buffer ve 750 µl distile su eklenerek vortekslenir.
3. DNA, 45 µl distile su içerisinde 1µg olacak şekilde seyreltilir.
4. 5 µl M- Dilution Buffer eklenerek vortekslenir ve 37 °C su banyosun da 15 dakika inkübe edilir.

5. İnkübasyon sonrası örnekler 5–10 saniye santrifüj edilir ve üzerlerine 100 µl CT- Conversion Reagent eklenerek karıştırılır.
6. Örnekler 50 °C ısı blokunda, karanlıkta 16 saat inkübe edilir.
7. İnkübasyon sonrası örnekler 10 dakika buz üzerinde bekletilir.
8. 5–10 saniye santrifüj edildikten sonra üzerlerine 400 µl M- Binding Buffer eklenir ve örnekler filtreli Zymo-SpinTM tüplere aktarılır. Filtreli tüpler Collection Tube'lara yerleştirilerek 13000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilir.
9. Collection Tube'lara biriken sıvı boşaltılır.
10. Filtreli tüplere 180 µl M- Wash Buffer eklenir ve tüpler 13000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilir.
11. Tüplere 200 µl M- Desulphonation Buffer eklenir ve oda ısısında 15 dakika inkübasyon sonrası 13000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilir.
12. 180 µl M- Wash Buffer eklenerek 13000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilir. Tekrar 180 µl M- Wash Buffer eklenerek aynı hızda 1 dakika santrifüj edilir.
13. Filtreli tüpler 1.5ml 'lik Eppendorf tüplere alınarak üzerlerine 10µl M- Elution Buffer eklenir ve 8000 rpm 'de 1 dakika santrifüj edilir.
14. Modifiye edilen DNA üzerine 12 µl distile su eklenerek 10'ar µl hacminde alikotlanır.
15. Modifiye DNA -20 °C de saklanır.

5.5 Metilasyon Spesifik PCR

Tablo 7 MSP’de kullanılan Materyaller

<i>Kullanılan Materyal</i>	<i>Firma</i>
DNA-Ladder	Trackit 1kb Plus DNA Ladder, Invitrogen; Karlsruhe
dNTP	Deoxynucleotide Set 100 mM, Sigma-Aldrich; Munich
Primer	MWG Biotech AG; Ebersberg
RedTaq Polymerase	D 4309, Sigma-Aldrich; Munich

10 X PCR tamponu:

- 16.6 ml Ammonium sülfat (1 M)
- 33.5 ml Tris (2 M, pH 8.8)
- 6.7 ml Magnezyum klorid (1 M)
- 0.7 ml β -Mercaptoetanol (14.4 M)
- 42.5 ml distile su

Kullanılan Primerler:

Tablo 8 GADD45 γ MSP primerleri

GADD45 γ M1	5’ACGTGGTTTTTTGGTACGAGTC3’
GADD45 γ M2	5’ GCCCACCACCAACGAATACG 3’
GADD45 γ U1	5’ ACGTGGTTTTTTGGTACGAGTC 3’
GADD45 γ U2	5’ ACCCACCACCAACAAATACA 3’

GADD45 γ geninin promotor bölgesinin metilasyon durumu MSP tekniği ile belirlenmiştir. Bisülfıt muamelesi sonucu metillenmiş sitozin molekülleri değişmeden kalırken metillenmemiş sitozin molekülleri urasile dönüşür. MSP, bisülfıt

modifikasyonu sonrası DNAda meydana gelen değişiklikler göz önünde bulundurularak metillenmiş ve metillenmemiş DNA ‘ya özgü primerlerin kullanılmasıyla metilasyon durumunun belirlenmesi prensibine dayanır [34]. Yüksek spesifite ve sensivitenin yakalanması için MSP primerlerinin 1–3 CpG dinükleotidini içermesi ve primer uzunluğunun 21–24 bç olması önerilmektedir [35]. Her örnek için metillenmiş ve metillenmemiş DNA’ya özgü primer çiftleri ile 2 ayrı reaksiyon gerçekleştirilmiş ve PCR ürünleri agaroz jel elektorforezinde yürütülerek UV ışığı altında görüntülenmiştir.

Tablo 9 Reaksiyon Başına PCR Bileşeni Miktarı

<i>PCR Bileşeni</i>	<i>Hacim</i>
10 X Tampon	2,5 µl
dNTP (25mM)	1,25 µl
Primer 1 (20µM)	0,5 µl
Primer 2 (20µM)	0,5 µl
Steril dH ₂ O	14,25 µl
RedTaq (0.625 units)	13,5 µl

10 X PCR tamponu, dNTP karışımı, primerler ve steril su yukarıdaki tabloda verilen hacimlerde karıştırılarak PCR tüplerine dağıtılır (Her örnek için sadece metile ve sadece unmetile primerlerden oluşan iki ayrı PCR karışımı hazırlanır). Bisülfıt modifikasyonu yapılmış DNA örneklerinden 1’er µl tüplere eklenir. Üzerlerine mineral yağ eklenir ve ısısal döngü cihazına yerleştirilerek PCR başlatılır. Program 95 °C’de 5 dakika olarak başlar ve sonrasında sıcaklık 80 °C’ye düşer. Bu aşamada

tüplere 5'er µl RedTaq eklenerek pipetle karıştırılır. PCR programı devam ettirilir. Kullanılan PCR programı aşağıda özetlenmiştir:

95 °C	5 dakika	
80 °C	RedTaq eklenir	
95 °C	Denatürasyon	30 saniye
58 °C	Bağlanma	30 saniye
72 °C	Sentez	30 saniye
72 °C	Final uzaması	5 dakika

35 döngü

Her MSP için unmetile, metile ve negatif kontroller gereklidir. Unmetile kontrol olarak, bilinen herhangi bir sağlık sorunu olmayan bireylere ait kan örneklerinden izole edilen ve bisülfıt modifikasyonu yapılan DNA kullanılmıştır. Hücre serilerinin metilasyon durumlarının belirlenmesi için yapılan MSP'lerde pozitif metile kontrol olarak in vitro olarak metillenmiş hale getirilen DNA örnekleri kullanılmıştır. Hasta örnekleri ile yapılan MSP'lerde ise pozitif metile olarak GADD45γ'nın tamamıyla metillenmiş olduğu tespit edilen Raji örnekleri kullanılmıştır.

5.6 İnvitro metillenmiş DNA

Tablo 10 IVD elde etmek için kullanılan materyaller

<i>Kullanılan Materyal</i>	<i>Firma</i>
CpG Methyltransferase (M.SssI)	New England BioLabs

MSP'de metile kontrol olarak kullanılmak üzere genomik DNA SssI metilaz enzimi ile inkübe edilerek in vitro olarak metillendirilmiştir. Sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulanmıştır:

1. 32mM SAM'den 1µl alınarak üzerine 19µl nükleaz içermeyen su eklenerek seyreltme yapılmıştır.
2. 14 µl nükleaz içermeyen su, 2.2 µl 10X NEBuffer, 1.2 µl seyreltilmiş SAM, 1 µg genomik DNA ve 1 µl SssI metilaz (4U/ µl) iyice karıştırılarak 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir.
3. Reaksiyonun durdurulması için karışım 65°C'de 20 dakika inkübe edilmiştir.

5.7 Agaroz Jel Elektroforezi

Tablo 11. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan Materyaller

<i>Kullanılan Materyal</i>	<i>Firma</i>
Agaroz	UltraPure™ Agarose, Invitrogene
Etidyum Bromid Solüsyonu	Ethidium Bromide Solution, Invitrogene

MSP de amplifiye edilen ürünlerin görüntülenerek örneklerin metilasyon durumlarının belirlenmesi için agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. 1 gr agaroz 1X TAE ile 40 ml' ye tamamlanmış ve karışım mikrodalga fırında kaynatılmıştır. 5µl 10mg/ml EtBr eklenerek karıştırılmış ve elektroforez tankına dökülmüştür. Çözelti donarak jel haline gelince tanka jelin üstünü kapatacak miktarda 1X TAE eklenmiş ve jele 10 ar µl MSP ürünü jele yüklenerek 100 V 'ta 25 dakika yürütülmüştür. UV ışığında görüntüleme yapılmıştır.

5.8 RNA İzolasyonu

<i>Materyal</i>	<i>Firma</i>
Filtreli Pipet Uçları	MultiGuard Barrier Tip, Sorenson™ Bioscience Inc.; Salt lake City, USA
QIAshredder	QIAGEN; Hilden
RNeasy Mini Kit	QIAGEN; Hilden
β-Merkaptoetanol	Sigma-Aldrich; Munich

RNA izolasyonu RNeasy Mini Kit kullanılarak yapılmıştır. -80 °C’de muhafaza edilen hücre pelletleri oda sıcaklığında bekletilerek çözünmeleri sağlanır. İzolasyon sırasında filtreli RNaz içermeyen filtreli pipet uçları kullanılır. Kitte bulunan RLT Buffer’den 2 ml alınarak üzerine 20 µl β- Merkaptotanol eklenir. Hazırlanan karışımdan 350 µl hücre pelleti üzerine eklenerek pipet yardımıyla karıştırılır. Karışım filtre içeren QIAshredder Mini Spin tüplerine aktarılır. 13000 rpm’de 2 dakika sentrifüj edilir. Filtreli tüpler atılarak pellet üzerine 350 µl % 70 etanol eklenir ve pipetle karıştırılarak RNeasy Mini Spin Tüplerine alınır. Üzerine 700 µl Buffer RW1 eklenir ve 10000 rpm’de 15 saniye santrifüj edilir. Filtreli kısım kit içindeki 2 ml’lik tüplere yerleştirilir ve 500 µl Buffer RPE eklenerek 10000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilir. Süzüntü atılarak filtreli tübe tekrar 500 µl Buffer RPE eklenir ve 13000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilir. Filtreli tüp 1.5 ml’lik yeni tüplere yerleştirilir. Ağzı parafinlenerek 37 °C lik su banyosunda bekletilen RNAaz içermeyen sudan 50 µl filtre üzerine eklenerek 13000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir. 10 µl örnek 60 µl su ile karıştırılarak spektrofotometrede 260nm’de ölçüm yapılır. İzole edilen RNA -80 °C’ de muhafaza edilir.

5.9 Ters Transkripsiyon

Tablo 12 Ters transkripsiyonda kullanılan materyaller

<i>Materyal</i>	<i>Firma</i>
SuperScript™ First- Strand	Invitrogene

- Ters transkripsiyon sırasında RNaz içermeyen tüpler ve Filtreli pipet uçları kullanılır.
- DNA kontaminasyonunun yol açabileceği yalancı pozitifliği görebilmek amacıyla her örnek için negatif kontrol hazırlanır.

10 X tampon, 25 mM Magnezyum, dNTP mix, Rd hexamere örnek başına aşağıda verilen miktarlarda karıştırılarak master mix hazırlanır. Karışım her tüpte 14.4 µl olacak şekilde dağıtılır. 1 µg RNA eklenir ve tüpteki karışım RNaz free su ile

21 µl ye tamamlanır. 70 °C ısı blokunda 10 dakika inkübe edilir. Negatif kontrol tüpüne 48 µl RNase içermeyen su konulur ve ısı blokunda inkübasyonu tamamlanmış örnekten 2 µl eklenerek negatif kontrol hazırlanmış olur. Örneğin üzerine 1 µl terstranskriptaz (SS RT II) eklenerek 37 °C’de 1 saat inkübe edilir. 30 µl RNaz içermeyen su eklenir.

Tablo 13 Ters Transkripsiyon Reaksiyon Bileşenleri

Bileşen	Miktar	Konsantrasyon
10 X RT Buffer	2 µl	1X
dNTP mix	4 µl	5,5mM
25mM Magnezyum klorür	4,4 µl	500µM
Random Hexamer	4 µl	10µM

5.10 Real Time PCR

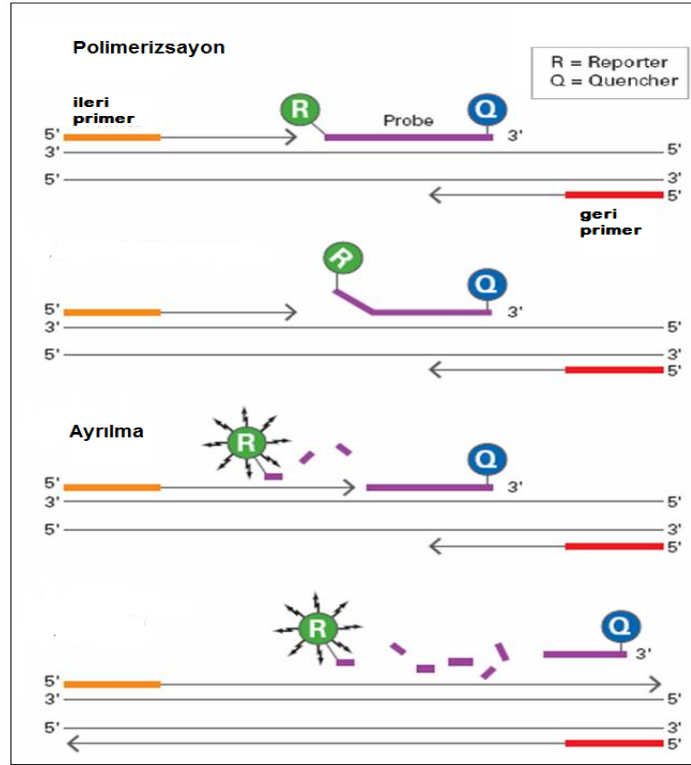
Tablo 14 RT-PCR’da kullanılan gereçler

Gereçler	Firma
7700 Sequence Detector	Applied Biosystems®; Foster City, USA
GAPDH Primer & TaqMan probe	TaqMan® GAPDH Control reagent, Applied Biosystems; Foster City, USA
Master Mix	TaqMan® PCR Master Mix, Applied Biosystems; Foster City, USA
Primer	MWG Biotech AG; Ebersberg
MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems; Foster City , USA

Tablo 15 Primerler

İleri Primer	5’CAG CGT CAG GGC TGC CT 3’
Geri primer	5’GCC CTC GTC CTC CTC ACC 3’
TqP1:	5’ACG TGG ACC CCG ACA ATG TGA CCT TC 3’

Promotor metilasyonunun GADD45 γ ekspresyonuna etkisinin gözlemlenmesi için DAC ile muamele edilen ve edilmeyen hücre serilerinde ekspresyon farkının belirlenmesi için Real Time PCR uygulanmıştır. Terse transkripsiyonla cDNA elde edilmesinin ardından ürünler PCR tekniği ile çoğaltılırken kantifikasyon için Taqman probe kullanılmıştır. Taqman prob iki ucu birer floresan boyayla işaretlenmiş, çoğaltılmak istenen DNA'ya komplementer olan, tek zincirli bir nükleotid dizisidir. Proben 5' ucu reporter (6-karboksifloresin = 6-FAM) ve 3' ucu quencher (6-karbosi-tetrametil-rodamin=TAMRA) denilen floresan boyalarla işaretlidir. 3' uçtaki TAMRA boyası 5' uçtaki FAM boyasının sinyal oluşturmamasını baskılar. TAMRA probun komplementer DNA dizisine bağlanamıyorsa durumunda bile FAM'ın yaydığı sinyal oldukça düşüktür. Amplifikasyon sürecinde TaqMan prob primerlerin bağlandığı bölgelerin arasında bulunan komplementer diziye bağlanır. TaqMan probun bulunduğu bölgeye gelindiğinde polimeraz 5'→3' ekzonükleaz aktivitesiyle FAM'ı probtan ayırarak serbest bırakır. TAMRA'nın baskılayıcı etkisinden uzaklaşan FAM sinyal oluşturur. Her döngüde ürün miktarı arttıkça sinyal artar. Üründe ilk anlamlı artışın tespit edildiği döngü sayısına eşik değeri (Ct) denir. Başlangıçta reaksiyona giren spesifik cDNA miktarının fazla olması durumunda floresan sinyale erken ulaşıldığından Ct değeri düşüktür.



Şekil 5 TaqMan Probe yöntemi

Ters transkripsiyon sonucu elde edilen her cDNA örneği için aynı anda üç reaksiyon, negative örnekler için tek reaksiyon gerçekleştirilmiştir. RT-RCR bileşenleri reaksiyon başına aşağıdaki tabloda verilen hacimlerde karıştırılarak 22'şer µl hacminde 96'lık plağa dağıtılmıştır. Negatif kontrol reaksiyonunun gerçekleştirileceği 2 göze 3'er µl distile su eklenerek üstleri optic kapaklarla kapatılır. Geri kalan gözlere de 3'er µl örnek eklenir ve üstleri kapatılarak ABI 7700 Sequence Detector'e yerleştirilerek RT-PCR döngüsü başlatılır. RT-PCR döngüsü aşağıda verildiği gibidir.

50 ° C.....	2 dakika	
95 ° C.....	10 dakika	} 40 Döngü
95 ° C.....	15 saniye	
72 ° C.....	30 saniye	

Tablo 16 RT-PCR bileşeni

RT-PCR Bileşeni	Hacim
Master Mix [2 x]	12.5µl
Primer forward [20 µM]	1.0 µl
Primer terse [20 µM]	1.0 µl
Taq-man Probe [20 µM]	0.1 µl
Distilled water	7.4 µl

Her örneğe ait başlangıçta kullanılan RNA'nın kalitesi ve ters transkripsiyon etkinliği farklı olduğundan hedef genin ekspresyonu seçilen bir housekeeping genin ekspresyonu ile normalize edilir. RT-PCR çalışmasında internal kontrol olarak GAPDH (Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz) kullanılmıştır. Ters Transkripsiyon sonucu elde edilen cDNA örnekleri ile GAPDH için Ct değerlerinin belirlenmesi amacıyla RT- PCR yapılmış, elde edilen değerler GADD45γ'nın örneklerdeki ekspresyon düzeyinin belirlenmesi ve karşılaştırılması için kullanılmıştır. RT-PCR bileşenleri ve miktarları aşağıda belirtilmiştir.

Tablo 17 RT-PCR bileşeni (GAPDH)

RT-PCR Bileşeni	Hacim
Master Mix	12,5 µl
İleri Primer	1 µl
Geri Primer	1 µl
Probe (JOE)	1 µl
Distile su	7,4 µl
cDNA örneği	3 µl

6 BULGULAR

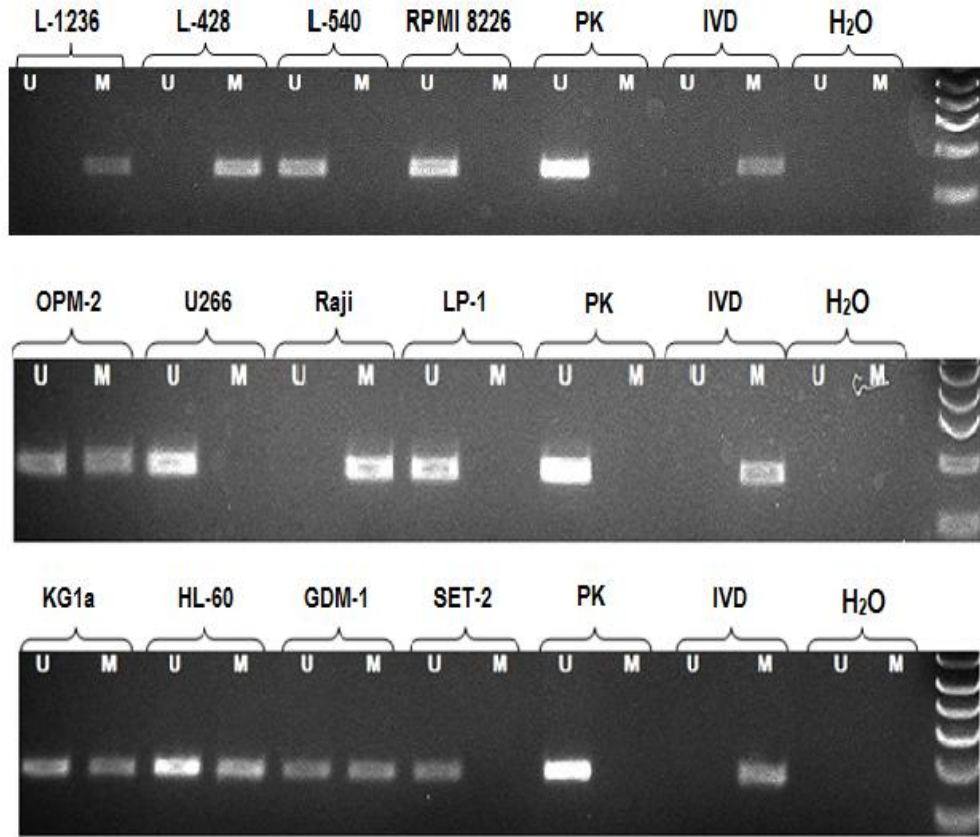
6.1 DNA İzolasyonu Sonuçları

Çalışmaya alınan RWTH Aachen Tıp Fakültesi Hastanesi Hematoloji – Onkoloji Servisinde takip edilen 117 AML , 94 MM hasta örneği ve hücre soylarından elde edilen DNA'ların saflık ve konsantrasyon tayini için ölçümler spektrofotometre cihazında 260 ve 280 nm dalga boylarında yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre saflık derecesini gösteren 260/280 oranının 1,6 ile 1,8 arasında yoğunlaştığı görüldü.

6.2 Hücre Soyları Metilasyon Durumları

Hücre serilerinin metilasyon durumları MSP ile belirlenmiştir. MSP ürünleri agaroz jelde yürütülmüş ve UV ışığı altında görüntülenmiştir. GADD45γ 'nın Hodgkin lenfoma hücre serileri L-1236, L-428 ve Burkitt lenfoma hücre soyu Raji hücrelerinde tamamiyle metillenmiş, AML hücre serileri GDM-1, HL-60, KG1a ve MM hücre serisi OPM-2 hücrelerinde kısmen metillenmiş olduğu görülmüştür. Diğer hücre soyları U266, LP-1 ,SET-2, RPMI8226, L – 540 hücrelerinde ise metilasyon gözlemlenmemiştir (Şekil 6).

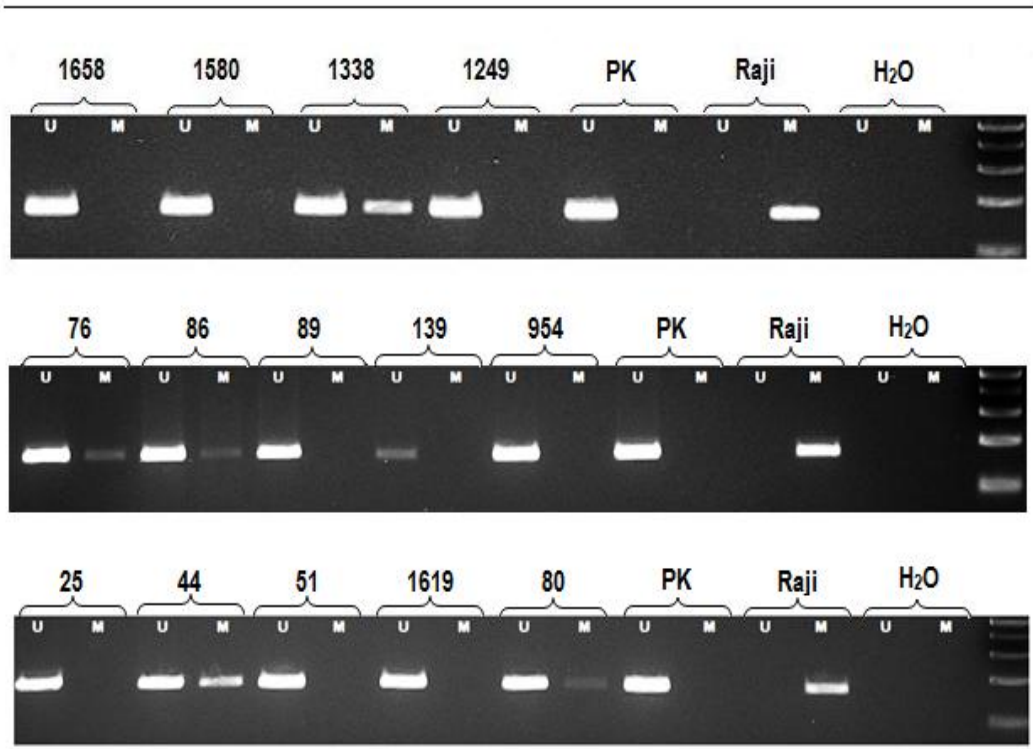
Yapılan MSP'lerde sağlıklı bireylerden alınan peripheral kan örnekleri (PK), invitro olarak metillenmiş DNA (IVD) ve su (H₂O) kontrol olarak kullanılmıştır. (U) metillenmemiş DNA dizisini tanıyan primerlerle amplifiye olan MSP ürününü, (M) metillenmiş DNA dizisini tanıyan primerlerle çoğalmış MSP ürünlerini göstermektedir.



Şekil 6. Hücre serilerinin metilasyon durumları Periferal kan örnekleri (PK) , in vitro olarak metillenmiş DNA (IVD) ve su kontrol olarak kullanılmıştır. U metillenmemiş DNA ve M metillenmiş DNA'yı temsil etmektedir.

6.3 Hasta Örnekleri MSP Sonuçları

117 adet AML, 94 MM hasta örneğinin MSP ile metilasyon durumu araştırılmıştır. MSP ürünleri agaroz jelde yürütülmüş ve UV ışığında görüntülenmiştir. AML örneklerinde metilasyon saptanmazken MM örneklerinin 8'inde metilasyon sinyali gözlemlenmiştir.



Şekil 7. MM hasta örnekleri temsili MSP sonuçları. Sağlıklı bireylerden alınan periferik kan örnekleri (PK),Raji hücreleri ve su kontrol olarak kullanılmıştır. (U) metillenmemiş DNA ve (M) metillenmiş DNA'yı temsil etmektedir.

Tablo 18 MM hasta listesi ve metilasyon durumları

Örnek	Evre	Metilasyon Durumu	Örnek	Evre	Metilasyon Durumu
943	MGUS	U	1256	III A	U
946	MGUS	U	1339	III A	U
954	MGUS	U	1360	III A	U
1570	MGUS	U	1399	III A	U
1617	MGUS	U	1564	III A	U
898	I A	U	1565	III A	U

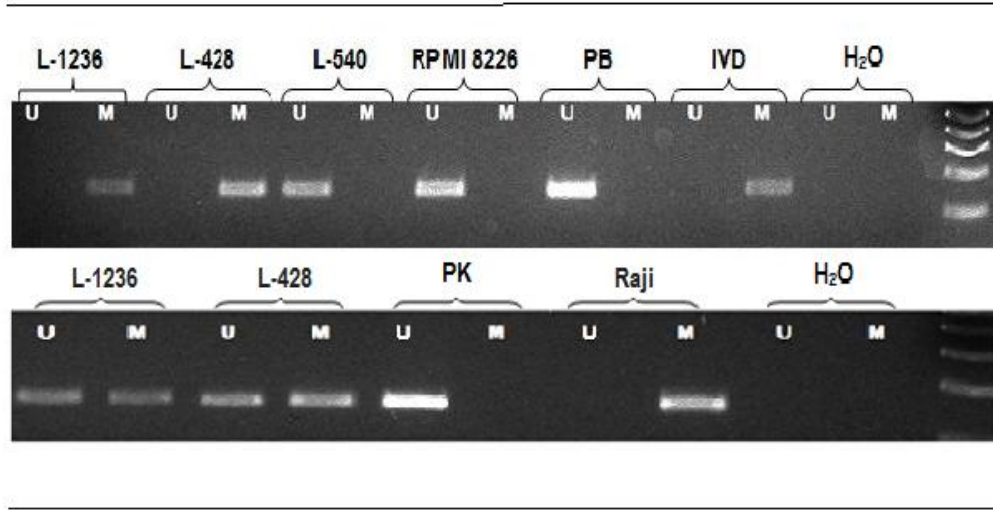
911	I A	U	1567	III A		U
968	I A	U	1568	III A		U
1033	I A	U	1571	III A	U	U
1244	I A	U	1573	III A		
1250	I A	U	1574	III A		U
1572	I A	U	1575	III A		U
1577	I A	U	1576	III A		U
9	II A	U	1580	III A		U
19	II A	U	1581	III A		U
47	II A	U	1619	III A		U
54	II A	U	88=1309	III A		U
81	II A	U	22	III B		U
849	II A	U	25	III B		U
908	II A	U	51	III B		U
1252	III	U	70	III B		U
1618	III A	U	76	III B		U/M
29	III A	U	80	III B		U/M
46	III A	U	86	III B		U/M
48	III A	U	89	III B		U
49	III A	U	897	III B		U
72	III A	U	904	III B		U
77	III A	U	910	III B		U
85	III A	U	914	III B		U
139	III A	U	1086	III B		U
149	III A	U/M	1240	III B		U
901	III A	U	1241	III B		U

905	III A	U	1253	III B	U
906	III A	U	1255	III B	U
909	III A	U/M	1338	III B	U/M
913	III A	U	1566	III B	U
962	III A	U	1569	III B	U
972	III A	U/M	1247=1311	III B	U
1000	III A	U	8	PCL	U
1080	III A	U	44	PCL	U/M
1081	III A	U	84	PCL	U
1242	III A	U	912	PCL	U
1243	III A	U	1312	PCL	U
1245	III A	U	1318	PCL	U
1246	III A	U	1622	PCL	U
1249	III A	U	892=1308	PCL	U
1254	III A	U	1696	PCL	U

(U) metillenmemiş, (M) metillenmiş DNA örneğini temsil etmektedir.

6.4 DAC ile inkübasyon sonrası hücre soylarının metilasyon durumları

DAC'nin GADD45γ promotorunun metilasyon durumuna etkisinin gözlemlenmesi için 96 saat boyunca 1µM DAC ile inkübe edilmiş L-1236 ve L-428 hücreleri ile MSP yapılmıştır. Inkübasyon öncesi sadece metillenmiş DNA dizisini tanıyan primerlerle amplifikasyon gösteren L-1236 ve L-428 hücre serilerinde DAC ile inkübasyon sonrası hem metillenmiş (M) hem de metillenmemiş (U) DNA dizisini tanıyan primerlerle amplifikasyon gözlemlenmiştir.

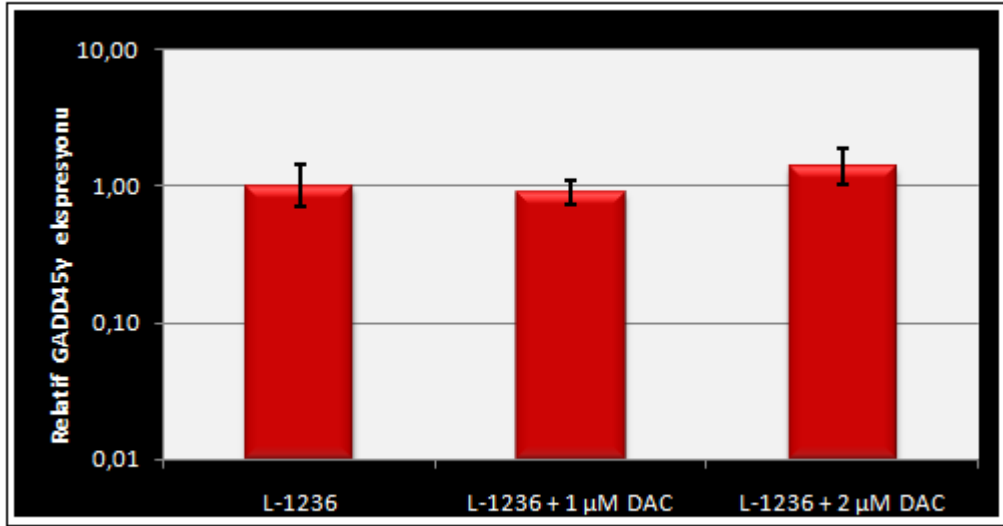
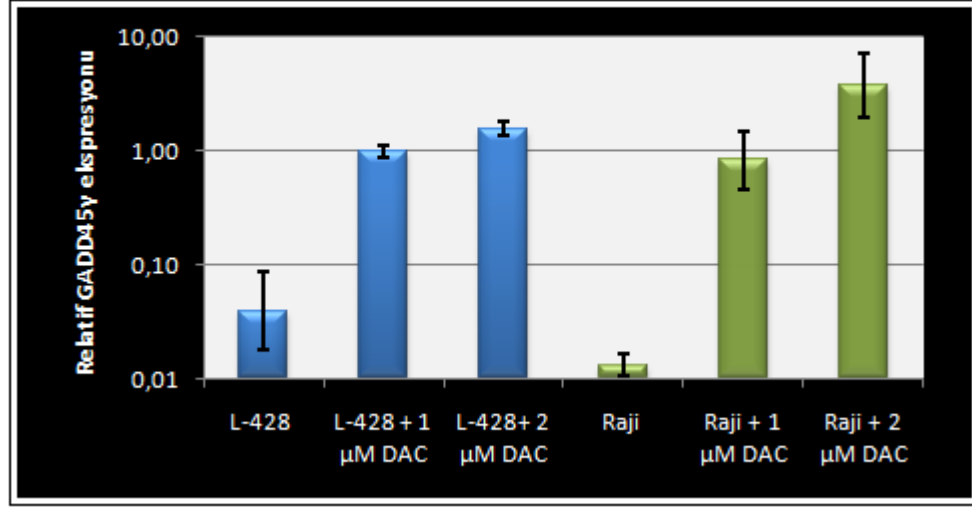


Şekil 8 DAC inkübasyonu sonrası hücre serilerinin metilasyon durumları

96 saat süresince 1µM DAC ile inkübe edilen Hodgkin Lenfoma hücre soyları L-1236 ve L-428 hücrelerinde hem metillenmiş (M) hem de metillenmemiş (U) DNA dizilerini tanıyan primerlerle amplifikasyon görülmüştür.

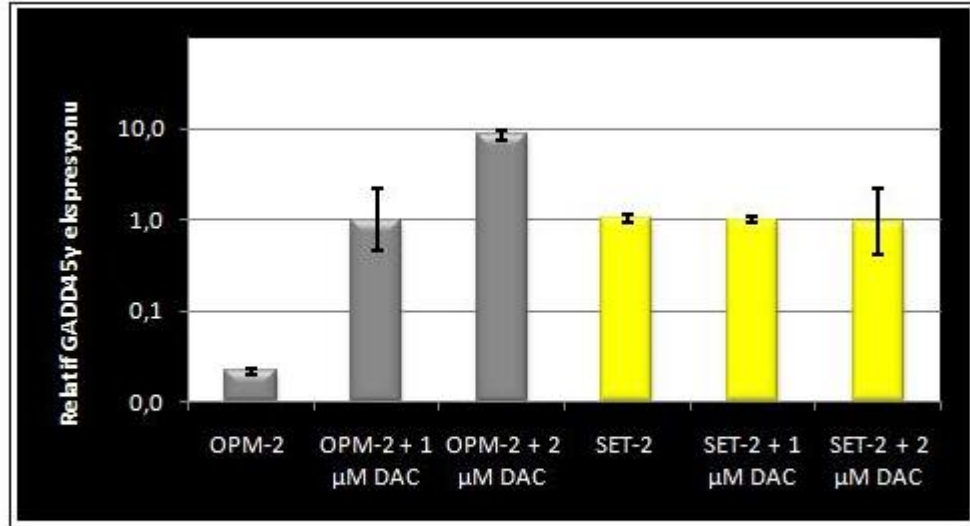
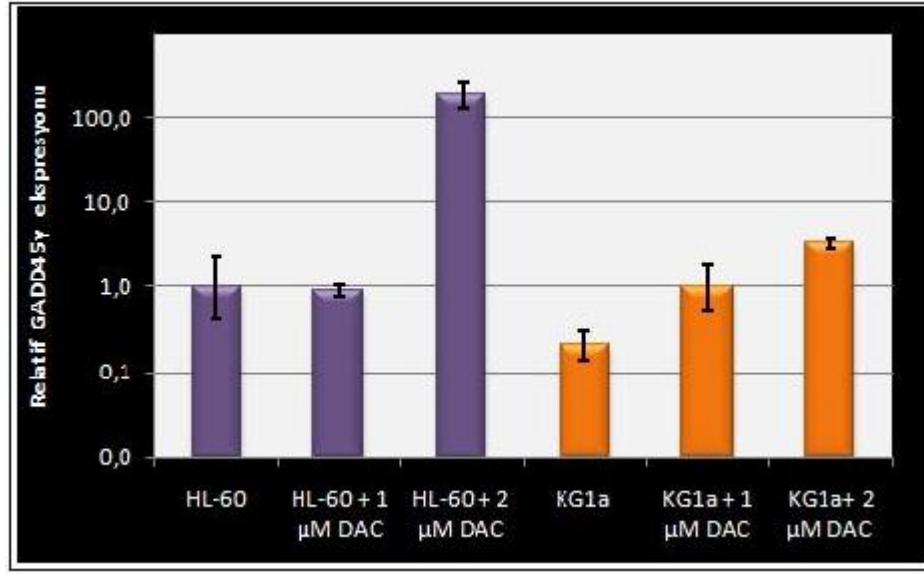
6.5 RT-PCR sonuçları

GADD45γ promotor metilasyonunun genin ekspresyonuna etkisinin belirlenmesi için RT-PCR tekniği kullanılmıştır. DAC ile inkübe edilmeyen ve 1 µM ve 2 µM DAC ile 96 saat süresince inkübe edilen hücre soylarından RNA izolasyonu yapılmıştır. Ters transkripsiyon methodu ile RNAdan cDNA elde edilerek RT-PCR yapılmıştır. GAPDH internal kontrol olarak kullanılmıştır. DAC inkübasyonu sonrası L-428, Raji, OPM-2, HL-60 and KG1a hücrelerinde ekspresyonda artış gözlenirken, L-1236 hücrelerinde DAC inkübasyonu öncesi ve sonrası arasında GADD45γ ekspresyonunda değişiklik gözlemlenmemiştir. Metillenmemiş SET-2 hücrelerinde inkübasyon öncesi ve sonrası GADD45γ ekspresyonu sabit kalmıştır.



Şekil 9. GADD45γ'nın tamamiyle metile durumda olduğu hücre soylarında DAC inkübasyonu öncesi ve sonrası GADD45γ ekspresyonu.

Hodgkin Lenfoma hücre soyu L-428'de ve Burkitt Lenfoma hücre soyu Raji'de DAC inkübasyonu sonrası ekspresyonda artış gözlenirken Hodgkin Lenfoma hücre soyu L-1236 hücrelerinde ekspresyon düzeyi stabil bulunmuştur.

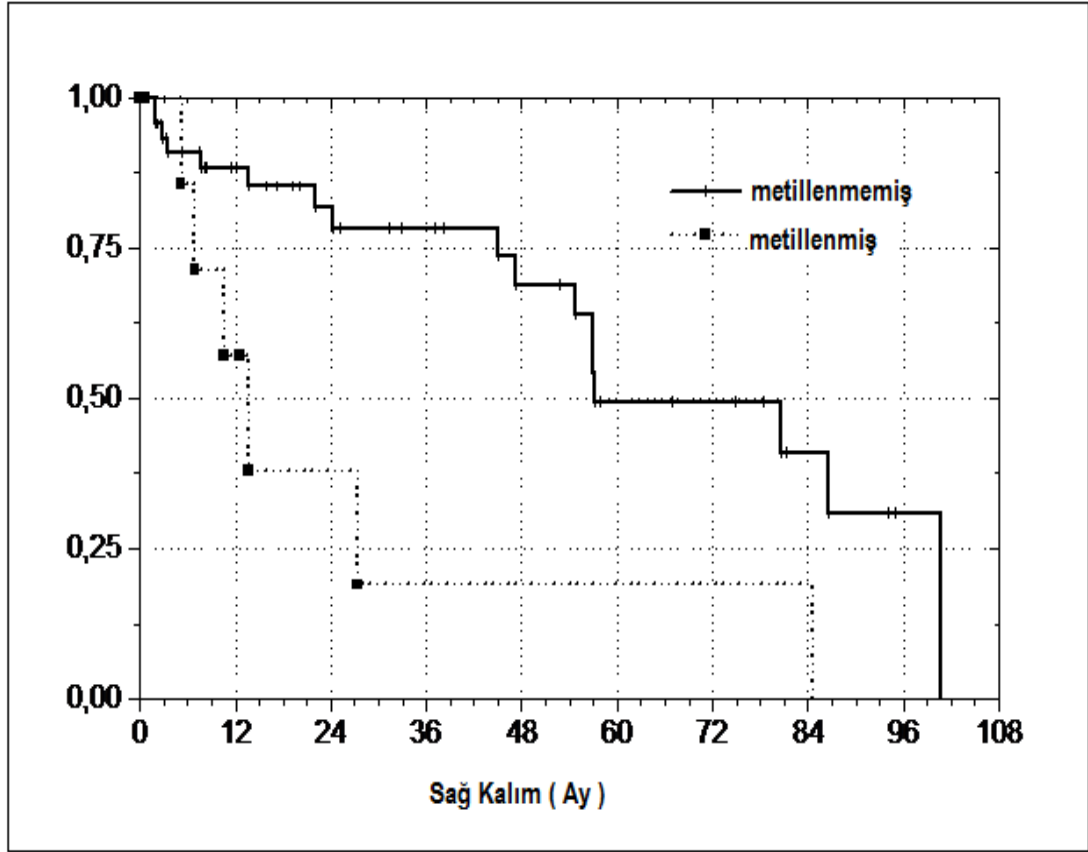


Şekil 10. GADD45γ'nın parçalı metile ve metillenmemiş durumda olduğu hücre serilerinde DAC inkübasyonu öncesi ve sonrası GADD45γ ekspresyonu.

GADD45γ'nın kısmi metile durumda bulunduğu AML hücre soyları HL-60, KG1a ve MM hücre soyu OPM-2 hücre serilerinde DAC uygulaması sonrası ekspresyonda artış gözlenmiştir. Genin metillenmemiş durumda olduğu AML hücre soyu SET-2 hücrelerinde ise DAC inkübasyonu sonrası ekspresyon düzeyinde değişiklik görülmemiştir.

6.6 GADD45 γ metilasyon durumu ve klinik parametreler

MM hasta örneklerinde GADD45 γ promoter metilasyonu artmış kalsiyum oranı ($p=0,004$) ve sağ kalım ile ilişkili bulunmuştur. Ortalama kalsiyum düzeyinin metillenmemiş promotora sahip hastalarda 2.30, metillenmiş promotora sahip hastalarda 2.65 olduğu görülmüştür. GADD45 γ promotorunun metillenmiş olarak bulunduğu 8MM hastasının ortalama sağ kalım süresi 13.7 ayken genin metillenmemiş olarak bulunduğu hastalarda bu süre ortalama 57.1 aydır. Grafik metilasyon ve sağ kalım arasındaki korelasyonu göstermektedir.



Şekil 11 Grafik MM hastalarının sağ kalım süreleri ve GADD45 γ 'nın metilasyon durumunu göstermektedir. ($p=0.001$)

7 TARTIŞMA

DNA metilasyonunun kanserle yakından ilişkili olması genetik bozukluklar dışında genlerin promotorlarının metilasyon durumlarını da prognozda ve hastalığın tedavisinde etkili kılmaktadır. Tümör baskılayıcı genlerin metilasyon durumları birçok solid tümör ve hematopoietik malignitede araştırılmıştır [3]. Non- Hodgkin lenfomada DAP kinaz 1, p57, p16, O⁶ MGMT, GST, RAR β 2 genleri epigenetik olarak sessizleştirilmiş olduğu gösterilen genlerdendir [13, 14, 36-38]. Akut lenfoblastik lösemilerde p15, E-cadherin, p 73, AML’lerde SOCS–1, p15 genlerinin hipermetilasyondan etkilendiği gösterilmiştir [39-42] .

GADD45 γ ’ nın PCA (proliferating cell nuclear antigen) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörü p21^{WAF1/CTP1} ile ilişkili olduğu ve hücre büyümesi ve bölünmesinin negatif kontrolünde etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca GADD45 γ p38/c-Jun NH2-terminal kinaz yolağını aktive ederek apoptozu tetikleyen MTK1/MEKK4 ile de etkileşim halindedir. GADD45 γ ekspresyon vektörü ile transfekte edilen hipofiz tümörü hücre soylarında koloni oluşumunun kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında %55- 88 oranında azaldığı görülmüştür [43]. GADD45 γ promotorunun metillenmiş ve geninin sessizleştirilmiş olduğu nasofarenjial, hepatoselüler, özofajiyel ve larinjiyel karsinoma ve lenfoma hücre soylarına GADD45 γ ekspresyon vektörünün transfekte edilmesinin hücre proliferasyonunu ve koloni formasyonunu baskıladığı gösterilmiştir [26]. Bu bulgu farklı tümör tipi hücre soylarında GADD45 γ ’nın tümör baskılayıcı gen işlevine sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Ying ve arkadaşları farklı tümör tiplerine ait hücre soylarıyla yaptıkları çalışmada GADD45 γ promotorunun Non-Hodgkin lenfoma hücre soylarının %85’inde , Hodgkin lenfoma hücre soylarının %73’ünde , servikal karsinomların %50’sinde , akciğer karsinomlarının %40’ında metillenmiş olarak bulunduğunu belirlemişlerdir. Aynı çalışmada GADD45 γ ’nın metillenmiş olarak bulunduğu hücre soylarında genin ekspresyonunun azaldığı ya da genin sessizleştirildiği gösterilmiştir [26]. Ying ve ark.’larının sonuçlarına benzer olarak bu çalışmada hematolojik malignite hücre soylarında GADD45 γ ’nın Raji (Burkitt lenfoma), L-1236 ve L-428’de (Hodgkin lenfoma) tamamiyle metillenmiş , GDM-1, HL-60, KG1a (Akut

miyeloid lösemi) ve OPM-2’de (Multiple myelom) kısmen metillenmiş olarak bulunmuştur. L-1236, L-428, Raji, OPM-2, HL-60 ve SET-2 hücre soyları demetile edici ajan DAC ile inkübe edilmiş ve inkübasyon öncesi ve sonrası genin hücrelerdeki ekspresyon seviyeleri karşılaştırılmıştır. Inkübasyon sonrası DAC’nin demetile edici etkisi MSP ve agaroz jel elektroforezi ile tespit edilmiştir. GADD45 γ promotorunun tamamıyla ya da kısmi olarak metillenmiş olarak bulunduğu L-428, Raji , OPM-2, HL-60 ve KG1a hücrelerinde DAC inkübasyonu sonrası GADD45 γ ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Ying ve ark.’larının yaptığı çalışmada da GADD45 γ promotoru L-428 ve Raji hücrelerinde metillenmiş olarak bulunmuş ve DAC inkübasyonu sonrası genin ekspresyonunda artış görülmüştür [26].

L-1236 hücrelerinde ise DAC uygulaması sonrası demetilasyon görülmesine rağmen ekspresyonda beklenen artış gözlenmemiştir. Epigenetik mekanizmalar dışında NF- κ B regülasyonu GADD45 γ ekspresyonunun düzenlenmesinde etkili olduğu tanımlanmış bir mekanizmadır. Buna göre birçok kanser türünde aktivasyonu artmış olarak bulunan NF- κ B GADD45 α ve γ ’nın ekspresyonunu baskılayarak hücrelerin apoptozdan kaçışına neden olmaktadır [11]. L-1236 hücrelerinde elde edilen sonuç GADD45 γ ekspresyonunun kontrolünde etkili, epigenetik mekanizmalar dışında, NF- κ B aktivasyonu ya da henüz tanımlanmamış mekanizmaların da var olabileceğini düşündürmüş ve bu hücrelerde metilasyonun genin ekspresyonuna bu aşamada etki etmediği görülmüştür.

Çalışmada AML ve MM teşhisi konulmuş hastalardan ve sağlıklı bireylerden alınmış örneklerin metilasyon durumları incelenmiş, MM örneklerinin 8,5%’inde kısmi metilasyon görülmüştür. Metillenmiş DNA örneklerinin hepsi evre III MM hastalarına aittir. Ying ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da çeşitli tümör tipleri ve normal doku örnekleri incelenmiş, tümörlerde farklı sıklıklarda GADD45 γ metilasyonu gözlenirken normal dokularda metilasyon görülmemiştir [26].

Metilasyondan etkilenmiş genlerin kanserin prognozu ve uygulanan tedaviye verilecek cevapta etkili olabileceği ve metilasyon biomarkırlarının hastalığın prognozu ve tedaviye verilen cevabın belirlenmesinde kullanılabileceği düşünülmektedir. Örneğin hücre döngüsü regülatörü p15 geninin metilasyonu AML hastalarında negatif prognoz ile ilişkili bulunmuştur [44]. Hücre döngüsünün

kontrolünde rol alan p16^{INK4a} [45] ve apoptoz regülatörü DAP kinaz [46] metilasyonunun MM hastalarında negatif prognoz göstergesi olabileceği gösterilmiştir. MGMT proteini guanine alkil grubu eklenmesiyle meydana gelen DNA hasarının tamirinde görevlidir. Bazı alkilleyici sitotoksik ilaçlar için guanin hedefidir. MGMT hipermetilasyonu görülen difüz büyük hücreli lenfoma hastalarına siklofosfamid içeren kemoterapi uygulandığında sağ kalım süresinin uzadığı görülmüştür. MGMT hipermetilasyonunun lenfoma hücrelerini daha duyarlı hale getirerek hücreleri apoptoza götürdüğü düşünülmektedir. Bu çalışmada GADD45γ promotorunun metillenmiş olarak bulunduğu MM teşhisi konulmuş hastalarda sağ kalım süresinin 13,7 ay ve metillenmemiş olanlarda ise 57,1 ay olduğu belirlenmiştir. Evre III MM hastalarının ortalama sağ kalım süresinin 39 [47] ay olmasına karşın çalışmaya katılan evre III ve GADD45γ'nın metillenmiş olduğu MM hastalarında bu sürenin 13,7 ay olması metilasyon ve sağ kalım arasında ilişki olabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte çalışılan hasta örneği sayısı genin metilasyonunun klinik etkilerinin belirlenmesini sınırlandırmaktadır.

Genetik bozuklukların aksine epigenetik değişikliklerin DNMT ve HDAC inhibitörleri gibi farmakolojik ajanlar kullanılarak geri döndürülebilir olması karsinogenezde etkili metillenmiş genlerin tespit edilerek tedaviye yönelik olarak kullanılmasını mümkün kılmaktadır. Histon modifikasyonları ve DNA metilasyonu arasındaki ilişki araştırmacıları DNMT ve HDAC inhibitörlerinin kombine edilerek kullanıldığı ve epigenetik mekanizmalarla sessizleştirilmiş kanserle ilişkili genlerin tekrar eksprese edilmesini hedefleyen terapiler araştırmaya itmiştir. Yapılan klinik çalışmalarda AML ve miyelodisplastik sendrom (MDS) hastalarına deri altı enjeksiyonu ile 10-14 gün boyunca DNMT inhibitörü AZA ve ardından bir hafta boyunca fenilbütirat verilmiş ve bu hastaların %50'sinin tedaviye tam ve kısmi cevap verdiği görülmüştür [48]. Bununla birlikte DAC (15mg/m² – 10 gün) ve HDAC inhibitörü VPA'nın (20- 50 mg/kg) birlikte kullanımının AML ve MDS hastalarında tedaviye verilen tam cevabı %22 oranında arttırdığı gösterilmiştir [49]. Bu ajanların kemoterapötik ilaçlarla birlikte kullanıldığında kanser tedavisine başarı oranını olumlu etkileyebildiği de bildirilmiştir [50].

Sonuç olarak çalışmada hüce soylarında ve bazı hasta örneklerinde GADD45 γ gen promotorunda metillenmenin var olduğu, metillenme durumunun/ in vitro/ ortamda DAC kullanımı ile ortadan kaldırılmasıyla, önceki durma göre GADD45 γ ekspresyonunda artış sağlanabileceği gösterilmiştir. Bu uygulamanın hücre sağkalım ve çoğalma potansiyelini nasıl etkilediğine ilişkin verilerin değerdendirilmesi sürdürölmektedir.

Hastalara ait sonuçlar ise GADD45 γ promotor metilasyonunun sağ kalım süresiyle ilişkili olabileceğini düşöndürmektedir. Buna bağlı olarak GADD45 γ gibi tümör baskılayıcı genlerin metilasyon durumları ve bunun klinik parametrelerle ilişkilerinin belirlenmesi prognozun takibi ve yeni tedavi seçeneklerinin oluşturulması ve uygulanması için kullanılabilecektir.

8 KAYNAKLAR

1. Gardiner-Garden, M. and M. Frommer, *CpG islands in vertebrate genomes*. J Mol Biol, 1987. **196**(2): p. 261-82.
2. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. Nat Rev Genet, 2002. **3**(6): p. 415-28.
3. Herman, J.G. and S.B. Baylin, *Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation*. N Engl J Med, 2003. **349**(21): p. 2042-54.
4. Esteller, M. and J.G. Herman, *Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours*. J Pathol, 2002. **196**(1): p. 1-7.
5. Ehrlich, M., *DNA methylation in cancer: too much, but also too little*. Oncogene, 2002. **21**(35): p. 5400-13.
6. Bird, A., *DNA methylation patterns and epigenetic memory*. Genes Dev, 2002. **16**(1): p. 6-21.
7. Zerbini, L.F. and T.A. Libermann, *GADD45 deregulation in cancer: frequently methylated tumor suppressors and potential therapeutic targets*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(18): p. 6409-13.
8. Claus, R. and M. Lubbert, *Epigenetic targets in hematopoietic malignancies*. Oncogene, 2003. **22**(42): p. 6489-96.
9. Liebermann, D.A. and B. Hoffman, *Gadd45 in the response of hematopoietic cells to genotoxic stress*. Blood Cells Mol Dis, 2007. **39**(3): p. 329-35.
10. Vairapandi, M., et al., *GADD45b and GADD45g are cdc2/cyclinB1 kinase inhibitors with a role in S and G2/M cell cycle checkpoints induced by genotoxic stress*. J Cell Physiol, 2002. **192**(3): p. 327-38.
11. Zerbini, L.F., et al., *NF-kappa B-mediated repression of growth arrest- and DNA-damage-inducible proteins 45alpha and gamma is essential for cancer cell survival*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(37): p. 13618-23.
12. Bahar, A., et al., *Loss of expression of the growth inhibitory gene GADD45gamma, in human pituitary adenomas, is associated with CpG island methylation*. Oncogene, 2004. **23**(4): p. 936-44.

13. Katzenellenbogen, R.A., S.B. Baylin, and J.G. Herman, *Hypermethylation of the DAP-kinase CpG island is a common alteration in B-cell malignancies*. Blood, 1999. **93**(12): p. 4347-53.
14. Esteller, M., *Profiling aberrant DNA methylation in hematologic neoplasms: a view from the tip of the iceberg*. Clin Immunol, 2003. **109**(1): p. 80-8.
15. Guillemin, G., et al., *p16(INK4a) and p15(INK4b) gene methylations in plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance*. Blood, 2001. **98**(1): p. 244-6.
16. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
17. Singal, R. and G.D. Ginder, *DNA methylation*. Blood, 1999. **93**(12): p. 4059-70.
18. Takai, D. and P.A. Jones, *Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(6): p. 3740-5.
19. Esteller, M., *Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005. **45**: p. 629-56.
20. Jaenisch, R. and A. Bird, *Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals*. Nat Genet, 2003. **33 Suppl**: p. 245-54.
21. Turner, B.M., *Cellular memory and the histone code*. Cell, 2002. **111**(3): p. 285-91.
22. Richards, E.J. and S.C. Elgin, *Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects*. Cell, 2002. **108**(4): p. 489-500.
23. Bernstein, B.E., A. Meissner, and E.S. Lander, *The mammalian epigenome*. Cell, 2007. **128**(4): p. 669-81.
24. Esteller, M., *Epigenetics in cancer*. N Engl J Med, 2008. **358**(11): p. 1148-59.
25. Esteller, M., et al., *A gene hypermethylation profile of human cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(8): p. 3225-9.
26. Ying, J., et al., *The stress-responsive gene GADD45G is a functional tumor suppressor, with its response to environmental stresses frequently disrupted epigenetically in multiple tumors*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(18): p. 6442-9.

27. Hallek, M., P.L. Bergsagel, and K.C. Anderson, *Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process*. Blood, 1998. **91**(1): p. 3-21.
28. Kyle, R.A., et al., *Review of 1027 patients with newly diagnosed multiple myeloma*. Mayo Clin Proc, 2003. **78**(1): p. 21-33.
29. Cohen, H.J., et al., *Racial differences in the prevalence of monoclonal gammopathy in a community-based sample of the elderly*. Am J Med, 1998. **104**(5): p. 439-44.
30. Kyle, R.A., et al., *A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance*. N Engl J Med, 2002. **346**(8): p. 564-9.
31. Durie, B.G. and S.E. Salmon, *A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival*. Cancer, 1975. **36**(3): p. 842-54.
32. Rubin, R. and D.S. Strayer, **Rubin's Pathology** 2007, Wolters Kluwer
33. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2002*. CA Cancer J Clin, 2002. **52**(1): p. 23-47.
34. Herman, J.G., et al., *Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(18): p. 9821-6.
35. Galm, O. and J.G. Herman, *Methylation-specific polymerase chain reaction*. Methods Mol Med, 2005. **113**: p. 279-91.
36. Li, Y., et al., *Aberrant DNA methylation of p57(KIP2) gene in the promoter region in lymphoid malignancies of B-cell phenotype*. Blood, 2002. **100**(7): p. 2572-7.
37. Esteller, M., et al., *Hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine DNA methyltransferase and survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma*. J Natl Cancer Inst, 2002. **94**(1): p. 26-32.
38. Rossi, D., et al., *Aberrant promoter methylation of multiple genes throughout the clinico-pathologic spectrum of B-cell neoplasia*. Haematologica, 2004. **89**(2): p. 154-64.

39. Gutierrez, M.I., et al., *Concurrent methylation of multiple genes in childhood ALL: Correlation with phenotype and molecular subgroup*. Leukemia, 2003. **17**(9): p. 1845-50.
40. Melki, J.R., P.C. Vincent, and S.J. Clark, *Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia*. Cancer Res, 1999. **59**(15): p. 3730-40.
41. Garcia-Manero, G., et al., *DNA methylation of multiple promoter-associated CpG islands in adult acute lymphocytic leukemia*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(7): p. 2217-24.
42. Toyota, M., et al., *Methylation profiling in acute myeloid leukemia*. Blood, 2001. **97**(9): p. 2823-9.
43. Zhang, X., et al., *Loss of expression of GADD45 gamma, a growth inhibitory gene, in human pituitary adenomas: implications for tumorigenesis*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(3): p. 1262-7.
44. Wong, I.H., et al., *Aberrant p15 promoter methylation in adult and childhood acute leukemias of nearly all morphologic subtypes: potential prognostic implications*. Blood, 2000. **95**(6): p. 1942-9.
45. Kramer, A., et al., *Alterations of the cyclin D1/pRb/p16(INK4A) pathway in multiple myeloma*. Leukemia, 2002. **16**(9): p. 1844-51.
46. Ng, M.H., et al., *Frequent death-associated protein kinase promoter hypermethylation in multiple myeloma*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(6): p. 1724-9.
47. Greipp, P.R., et al., *International staging system for multiple myeloma*. J Clin Oncol, 2005. **23**(15): p. 3412-20.
48. Gore, S.D., *Inhibitors of signaling in myelodysplastic syndrome*. Best Pract Res Clin Haematol, 2004. **17**(4): p. 613-22.
49. Issa, J.P., et al., *Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies*. Blood, 2004. **103**(5): p. 1635-40.
50. Galm, O. and M. Esteller, *Beyond genetics--the emerging role of epigenetic changes in hematopoietic malignancies*. Int J Hematol, 2004. **80**(2): p. 120-7.

