

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Otolog ve Allojenik Hematopoetik Kök Hücre
Transplantasyonunda G-CSF Reseptörü *missense* Tek
Nükleotid Polimorfizmlerinin CD34⁺ Kök Hücre
Zenginleştirilmesi Üzerine Etkisi**

Biol. Bahar Zehra Çamurdanoğlu

Temel immünoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Emin KANSU

ANKARA

2010

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Temel İmmünoloji Programına Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Emin Kansu

Danışman: Prof. Dr. Emin Kansu

Üye: Prof. Dr. Dicle Güç

Üye: Prof. Dr. Vedat Bulut

Üye: Doç. Dr. Lale Doğan

Üye: Doç. Dr. Evren Özdemir

ONAY:

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hakan S. Orer
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bulunmakla çok mutluluk duyduğum Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans yapmama olanak tanıyan ve bu tez konusunda çalışma fırsatı vererek beni onurlandıran değerli hocalarıma, bilimsel ve insani açıdan kendime her gün yeni şeyler kazandırmamı ve kendimi geliştirmemi sağlayan bu seçkin ailenin bir ferdi olma ayrıcalığını doya doya yaşatan herkese teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışmayı gerçekleştirmemde bana her zaman yol gösterici olan, engin tecrübeleriyle ve lider kişiliği ile beni aydınlatan tez danışmanım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Emin Kansu'ya, her kademe de benden yardımlarını esirgemeyen, her zaman cesaret veren Sayın Dr. Güneş Esendağlı'ya en içten duygularıyla minnettarlığımı ifade etmek isterim.

Benden yoğun ilgilerini esirgemeyen, bana güvendiğini her an hissettiren Sayın Prof. Dr. Dicle Güç'e, sakin karakteriyle bana örnek olan Sayın Doç. Dr. Lale Doğan'a, pozitif enerjisiyle bana güç katan Sayın Dr. Hande Canpınar'a, sorularıma her zaman cevap bulan Sayın Doç. Dr. Evren Özdemir'e, istatistiki değerlendirmelerimde bana ışık tutan Sayın Doç. Dr. Mutlu Hayran'a, çalışmalarım sırasında bana destek veren başta Uzm.Kim. Banu Avşar olmak üzere tüm laboratuvar çalışanlarına, bölüm sekreterlerine ve veri toplamamda yardımcı olan aferez ünitesi ekibine içtenlikle teşekkür ederim.

Sevgili mesai arkadaşlarım Dr. Tariq Zeki, Dr. Dorina Rama, Uzm. Biol. Sevil Oskay, Uzm. Biol. Neşe Ünver, Uzm. Biol. Yusuf Dölen, Biol. Samet Öksüz'e ayrı ayrı paylaşımları ve dostlukları için teşekkür ederken Sevgili Yusuf'a ilk günden beri öğrettiği ve gösterdiği her ayrıntı için şükran duygularımı ayrıca belirtmek isterim.

Yüksek lisans çalışması yapma ve tez yazım aşamamda tüm kaprislerimi sabırla ve sevgiyle karşılayan arkadaşlarıma, Berk Akman'a, hayatımın her dönemimde olduğu gibi manevi desteğini benden bu süreçte de hiç esirgemeyen sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

ÇAMURDANOĞLU, B.Z., Otolog ve Allojenik Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonunda G-CSF Reseptörü *missense* Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin CD34⁺ Kök Hücre Zenginleştirilmesi Üzerine Etkisi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel İmmünoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2010.

Biyolojik büyüme faktörlerinden, "granülosit koloni stimüle edici faktör" (G-CSF) periferik kök hücre transplantasyonunda, kök hücrelerin mobilizasyonunu sağlamak amacıyla kullanılan en etkin ajandır. G-CSF'in etkisini gösterebilmesi için hedef hücreler yüzeyindeki özgül G-CSF reseptörüne (G-CSF-R) bağlanması gerekir. Bu çalışmada, G-CSF-R geninde yer alan ve protein dizisinde amino asit değişimine neden olan *missense* tek nükleotid polimorfizmlerin (*single nucleotide polymorphism*, SNP) sıklığı araştırılmıştır. Bu amaçla, H.Ü Onkoloji Hastanesi, Kemik İliği Transplantasyon (KİT) Ünitesi'nde 2000-2009 yılları arasında G-CSF rejimi uygulanmış 54'ü sağlıklı donör, 249'u KİT hastasından oluşan toplam 303 bireyin aferez ürünlerinden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. G-CSF-R genindeki 11 farklı SNP, PCR-RFLP tekniği ile analiz edilmiştir. Ayrıca, G-CSF-R'in esas sinyal yolağı olan JAK-STAT'ın intakt olup olmadığını göstermek amacıyla çalışma grubunda gerçek zamanlı alele özgül PCR yöntemi ile JAK2V617F mutasyonu taranmıştır. Sonuçta G-CSF-R genindeki polimorfik bölgelerin minör alel frekanslarının çok düşük düzeyde olduğu tespit edilmiştir. Takiben, G-CSF-R geninde polimorfik minör aleli taşıyan bireylerin CD34⁺ kök hücre toplanması sırasında elde edilen lökosit, mononükleer hücre ve CD34⁺ kök hücre/kg sayıları, polimorfik majör aleli taşıyan bireylerin aynı verileriyle ilişkilendirilmiştir. G-CSF-R SNP'lerinin G-CSF yanıtı üzerinde belirgin etkilerinin olmadığı gözlenmiştir. Ancak, g.6214055 G>A (rs 3918018) SNP'i G/A genotipteki bir MM hastasında ve g.6219475 C>T (rs 3917996) SNP'i T/T genotipteki sağlıklı bir donörde gözlenen belirgin yanıt azlığı, bu iki SNP'in fonksiyonel etkisinin olabileceğine işaret etmektedir. Yalnızca bir MM hastasında tespit edilen JAK2V617F mutasyonunun ise G-CSF'e yanıtta etkili olmadığı görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: G-CSF-R, tek nükleotid polimorfizm, periferik kök hücre transplantasyonu, JAK2V617F mutasyonu.

ABSTRACT

ÇAMURDANOĞLU, B.Z., The G-CSF Receptor Missense Single Nucleotide Polymorphisms Effect of CD34⁺ Stem Cell Enrichment in Autologous and Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation, Hacettepe University Institute of Health Sciences Program of Basic Oncology Master Thesis, 2010.

“Granulocyte colony stimulating factor” (G-CSF), which is one of the biological growth factors, is an effective reagent to provide mobilization of stem cells in peripheral stem cell transplantation. In order to G-CSF to show its full effect, it has to bind to specific G-CSF receptors (G-CSF-R) on target cells. In this study, frequency of missense single nucleotide polymorphisms (SNP) which cause amino acid substitution on protein sequence of G-CSF-R gene was studied. For this purpose, DNA isolation was performed from apheresis products of 303 total individuals, 54 from healthy donors and 249 from bone marrow transplantation patients, which had G-CSF treatment in H.U Oncology Hospital, Bone Marrow Transplantation Unit between years 2000-2009. Eleven different SNPs on G-CSF-R were analyzed with PCR-RFLP technique. Furthermore JAK2V617F mutation was screened in study group with real time allelic discrimination assay in order to show whether JAK-STAT pathway, which is the main pathway of G-CSF-R, is intact or not. As a result minor allele frequencies of polymorphic regions on G-CSF-R gene were determined at very low levels. Subsequently leukocyte, mononuclear cell and CD34⁺ stem cell/kg counts acquired from CD34⁺ stem cell collection from individuals carrying polymorphic minor allele of G-CSF-R gene were associated with same data of individuals carrying polymorphic major allele. It was observed that G-CSF-R SNPs had no significant effect on G-CSF response. However, lack of significant response observed in a MM patient with g.6214055 G>A (rs3918018) SNP G/A genotype and in a healthy donor with g.6219475 C>T (rs3917996) SNP T/T genotype, pointed that these two SNPs may have functional effects. It was observed that JAK2V617F mutation which was detected on only one MM patient was not effective on response to G-CSF.

Keywords: G-CSF-R, single nucleotide polymorphism, peripheral stem cell transplantation, JAK2V617F mutation

İÇİNDEKİLER

ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
TABLolar DİZİNİ	xxiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hematopoetik Sistem	3
2.1.1. Hematopoez	3
2.1.2. Hematopoetik Hiyerarşi	4
2.1.3. Hematopoetik Büyüme Faktörleri	6
2.2. Hematopoetik Kök Hücreler	7
2.2.1. Hematopoetik Kök Hücrelerin Özellikleri	7
2.2.2. Hematopoetik Kök Hücrelerin Biyolojik Özellikleri ve Tanınmaları	8
2.3. Hematopoetik Kök Hücrele Fonksiyonları ve “Niş Kavramı”	8
2.3.1. Hematopoetik Kök Hücre ve Niş Tanımı	8
2.3.2. Hematopoetik Kök Hücre Nişleri	9
2.3.3. Endotel Niş	10
2.3.4. Vasküler Niş	13
2.3.5. Hematopoetik Kök Hücre Nişlerinden Çıkış ve Giriş	15
2.4. Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör ve Biyolojik Etkileri	18
2.4.1. Granülosit Koloni-Stimüle Edici Faktör (G-CSF)	18
2.4.2. G-CSF’in Hematolojik Etkileri	18
2.4.3. G-CSF’in İmmünolojik Etkileri	19

2.4.4	Klinikte Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktörün Kullanımı ve Önemi	19
2.5.	Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör Reseptörü (G-CSF-R)	22
2.5.1.	G-CSF-R'ın Hücrelerdeki Ekspresyonu	22
2.5.2	G-CSF-R ve Moleküler Yapısı	23
2.5.3	G-CSF-R Bölgelerinin Rolü	26
2.5.4	G-CSF-R ve Sinyal İletimi	27
2.5.5	Miyeloid Hastalıklarda G-CSF-R ve JAK2 Defektleri	29
2.6.	G-CSF-R Tek Nükleotid Polimorfizmleri	33
2.6.1.	Polimorfizm	33
2.6.2.	G-CSF-R "Missense" Tek Nükleotid Polimorfizmleri	34
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1.	Çalışma Grubu	36
3.2.	Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler, Kitler ve Tamponlar	38
3.3.	Moleküler Yöntemler	39
3.3.1.	DNA İzolasyonu	39
3.3.2.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile DNA Amplifikasyonu	40
3.3.3.	Restriksiyon Parça Uzunluğu Metodu (RFLP)	43
3.3.4.	Agaroz ve Poliakrilamid Jel Elektroforezi	50
3.3.5.	Gerçek Zamanlı PCR (Real time PCR-TaqMan) ile JAK2V617F Mutasyon Analizi	53
3.5.	Aferez Ürünü Yayma Preparatı Hazırlanması	56
3.6.	İstatistiksel Analiz	56
4.	BULGULAR	57
4.1.	G-CSF-R Geni missense SNP'lerini İçeren Polimorfik Bölgelerin Amplifikasyonu	57
4.2.	G-CSF-R Geni Amplikonlarının RFLP Analizi ile missense SNP'lerin Belirlenmesi	60
4.2.1	G-CSF-R Geni Üzerindeki g.6210695 C>T SNP Belirlenmesi	60
4.2.2.	G-CSF-R Geni Üzerindeki g.6213664 T>C SNP Belirlenmesi	61

4.2.3.	G-CSF-R Geni Üzerindeki g.6213811 C>T SNP Belirlenmesi	62
4.2.4.	G-CSF-R Geni Üzerindeki g.6214055 G>A SNP Belirlenmesi	62
4.2.5.	G-CSF-R Geni Üzerindeki g.6216525 G>A SNP Belirlenmesi	64
4.2.6.	G-CSF-R Geni Üzerindeki g.6217128 G>C SNP Belirlenmesi	65
4.2.7.	G-CSF-R Geni Üzerindeki g.6218218 T>C SNP Belirlenmesi	66
4.2.8.	G-CSF-R Geni Üzerindeki g.6219430 G>A SNP Belirlenmesi	67
4.2.9.	G-CSF-R Geni Üzerindeki g.6219475 C>T SNP Belirlenmesi	69
4.2.10.	G-CSF-R Geni Üzerindeki g.6219871 C>T SNP Belirlenmesi	70
4.2.11.	G-CSF-R Geni Üzerindeki g.6219886 G>A SNP Belirlenmesi	71
4.3.	G-CSF Verilmiş Bireylerde JAK2V617F Mutasyon Analizi	75
4.4.	Aferez Ürünü Yayma Preparatının İncelenmesi	78
4.5.	Çalışma Grubundaki Bireylerin Verileri	78
4.5.1.	Taranan SNP'leri Majör Alel Homozigot Genotipte Taşıyan G-CSF Verilmiş Sağlıklı Donörlere Ait Veriler	79
4.5.2.	Taranan SNP'leri Majör Alel Homozigot Genotipte Taşıyan G-CSF Verilmiş Kanseri Hastalarına Ait Veriler	81
4.6.	Moleküler Bulguların Çalışma Grubundaki Bireylerin Verileri ile Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi	92
4.6.1.	G-CSF-R Genindeki g.6214055 G>A SNP'i Heterozigot (G/A) veya Minör Alel Homozigot (A/A) Genotipte Taşıyan Bireylerin Verileri	93
4.6.2.	G-CSF-R Genindeki g.6217128 G>C SNP'i Heterozigot (G/C) Genotipte Taşıyan Bireylerin Verileri	101
4.6.3.	G-CSF-R Genindeki g.6219430 G>A SNP'i Heterozigot (G/A) Genotipte Taşıyan MM Hastalarının Verileri	120
4.6.4.	G-CSF-R Genindeki g.6219475 C>T SNP'i Heterozigot (C/T) Genotipte Taşıyan MM Hastasının Verileri	124
4.6.5.	G-CSF-R Genindeki g.6219886 G>A SNP'i Heterozigot (G/A) Genotipte Taşıyan Bireylerin Veriler	127
4.6.6.	JAKV617F Mutasyonu Taşıyan MM Hastasının Verileri	133
5.	TARTIŞMA	137

6. SONUÇ VE ÖNERİLER	150
KAYNAKLAR	152
EKLER	161

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
aa	amino asit
AGE	Agaroz jel elektroforezi
Ala	Alanin
ALL	Akut lenfoblastik lösemi
AML	Akut miyeloid lösemi
APS	Amonyumperoksidisülfat
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Aspartik asit
BceAI	<i>Bacillus cereus</i> 1315
bç	baz çifti
BglI	<i>Bacillus globigii</i>
BK	Beyaz küre
bp	<i>base pair</i>
BSA	Bovin serum albumin
Bsal	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
BstNI	<i>Bacillus stearothermophilus</i> N
C	Sitozin
CAR	<i>CXCL-12 abundant reticular cells</i>
CG	Kathepsin G
CLP	<i>Common lymphoid progenitors</i>
CML	<i>Common myeloid leukemia</i>
CMP	<i>Common myeloid progenitors</i>
CRH	<i>Cytokine receptor homology</i>
CXCL	CXC kemokin ligandı
CXCR	CXC kemokin reseptörü
Cys	Sistein
DC	<i>Dendritic cell</i>
Ddel	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>
dNTP	Deoksiribonükleotid
Epo	Eritropoetin
ET	Essensiyel trombositemi
FGF-4	<i>Fibroblast growth factor-4</i>
FN	Fibronektin
G	Guanin
G-CSF	Granülosit koloni-stimüle edici faktör
G-CSF-R	Granülosit koloni- stimüle edici faktör reseptörü
gDNA	Genomik DNA
GF	Büyüme faktörü

Gln	Glutamin
Glu	Glutamik asit
Gly	Glisin
GM-CSF	Granülosit makrofaj koloni- stimüle edici faktör
GMP	<i>Granulocytic/ monocytic precursor</i>
Grb	<i>Growth factor receptor-bound protein</i>
GVHD	<i>Graft versus Host Disease</i>
H.Ü.	Hacettepe Üniversitesi
Hin1II	<i>Haemophilus influenza</i>
His	Histidin
HKH	Hematopoetik Kök Hücre
HL	Hodgkin lenfoma
HPH	Hematopoetik progenitör hücreler
HpyAv	<i>Helicobacter pylori 26695</i>
HSC	<i>Hematopoietic Stem Cell</i>
ICAM	<i>Intracellular cell adhesion molecule-1</i>
IFN	İnterferon
Ig	İmmünoglobulin
IL	İnterlökin
JAK	Janus kinaz
JH	JAK homoloji
KH ₂ PO ₄	Potasyum fosfat
KHT	Kök hücre transplantasyonu
Kİ	Kemik iliği
KİT	Kemik iliği transplantasyonu
KLL	Kronik lenfositik lösemi
KML	Kronik miyeloid lösemi
Leu	Lösin
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
Lin	<i>Lineage</i>
LPS	Lipopolisakkarit
LT-HSC	<i>Long term- Hematopoietic Stem Cell</i>
LTR	<i>Long term reconstitution</i>
Lys	Lizin
MAPK	Mitojen aktif protein kinaz
MCL	Mantle-hücreli lenfoma
M-CSF	Monosit koloni- stimüle edici faktör
MDS	Miyelodisplastik sendrom
MEP	<i>Megakaryocytic/erythroid precursor</i>
Met	Metiyonin
MF	Miyelofibrozis
MgCl ₂	Magnezyum klorür

Mlyl	<i>Micrococcus lylae</i>
mM	Milimolar
MM	Multipl miyelom
MMP-9	Matriks metalloproteinaz-9
MPD	Myeloproliferative disorder
MPP	Multipotent progenitors
MspI	<i>Moraxella</i> species
NaH ₂ PO ₄	Sodyum fosfat
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NE	Nötrofil elastaz
NHL	Non-hodgkin lenfoma
P	Prolin
PAGE	Poliakrilamid jel elektroforezi
PBPC	<i>Peripheral blood progenitor cell</i>
PBS	Fosfat tuz çözeltisi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PECAM	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
PI3K	Fosfoinositid-3 kinaz
PKB	Protein kinaz B
PPM	<i>Primers & Probe Mixes</i>
Pro	Prolin
PV	Polisitemi vera
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SCF	<i>Stem cell factor</i>
SCN	<i>Severe congenital neutropenia</i>
SD	<i>Standart deviation</i>
SDF-1	<i>stromal derived factor-1</i>
Ser	Serin
Sfcl	<i>Streptococcus faecium</i>
SH	Src Homoloji
SHIP	SH2 içeren inositol fosfataz
SNO	<i>Spindle shaped osteoblasts</i>
SHP	SH2 içeren protein tirozin fosfataz
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SOCS	Sitokin sinyal supresör
STAT	<i>Signal Transducers and Activator of Transcription</i>
ST-HSC	<i>Short term- Hematopoietic Stem Cell</i>
T	Timin
Ta	<i>Annealing temperature</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris- Borik asit- EDTA
TEMED	Tetrametiletildiamin

TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
Th	Yardımcı T hücre
Thr	Treonin
Tm	<i>Melting temperature</i>
TNF	Tümör nekroz faktör
TPO	Trombopoetin
Tyk	Tirozin kinaz
Tyr	Tirozin
UV	Ultra-Viyole
Val	Valin
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VLA	<i>Very late antigen</i>
W	Triptofan
Xaa	Spesifik olmayan/ tanımlanmamış amino asit
Xcml	<i>Xanthomonas campestris</i>
Y	Tirozin

ŞEKİLLER DİZİNİ

2.1	Hematopoetik hiyerarşi modeli.	5
2.2	Endotel nişte osteoblastlar ile HKH'ler arasında homeostazı sağlayan iletişim	11
2.3	Kemikte yer alan Endotel Niş ile Vasküler Niş arası etkileşimler	14
2.4.	G-CSF kullanılarak hematopoetik kök hücre mobilizasyonu	17
2.5	İnsan G-CSF-R proteini ve ilgili bölgeleri.	24
2.6	Alternatif kesimle oluşan 5 farklı insan G-CSF-R varyantı.	26
2.7.	Özgül hücresel yanıtlara neden olan doğal tip G-CSF-R'ın sinyal yolları.	28
2.8.	Miyeloid hastalıklarda tespit edilen G-CSF-R mutasyonları ve polimorfizmi.	31
3.1.	G-CSF-R genindeki SNP'lerin analizi için çoğaltılan gen bölgeleri ve RFLP enzimleri ile kesim şemaları gösterilmektedir.	45
3.2	Gene Ruler DNA büyüklük belirleyicisi (DNA Ladder).	52
3.3	Gerçek zamanlı PCR- Taqman problemleri ile JAK2V617F mutasyon analizinde referans ölçekleri, pozitif ve negatif kontrollerin amplifikasyonları sonucu elde edilmesi gereken grafik şekli.	55
4.1.	10 temsili örneğe ait G-CSF-R genindeki polimorfik bölgelerin PCR amplifikasyonu sonucu yürütülen bantların, 50 bp DNA büyüklük belirleyicisi ile agaroz jel elektroforez sonucu görülmektedir.	58
4.2.	Temsili 7 örneğe ait <i>XcmI</i> enzimi ile RFLP analizi sonucu oluşan parçaların agaroz jel elektroforezi görüntüsü görülmektedir.	60
4.3.	Temsili 22 örnekte <i>Hin1II</i> enzimi ile RFLP analizi sonucu oluşan	61

parçaların poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü görülmektedir.

- 4.4. Temsili 18 örnekte *BglI* enzimi ile RFLP analizi sonucu oluşan parçaların 62
agaroz jel elektroforezi görüntüsü görülmektedir.
- 4.5. Homozigot G/G genotipteki Temsili 4 ve heterozigot G/A genotipteki 1 63
örneğin *MlyI* enzimi ile RFLP analizi sonucu agaroz jelde görülmektedir.
- 4.6. Homozigot G/G genotipteki temsili 6 örnek ve homozigot A/A 64
genotipteki 1 örneğin *MlyI* enzimi ile RFLP analizi sonucu agaroz jelde
görülmektedir.
- 4.7. Temsili 19 örnekte *BsaI* enzimi ile RFLP analizi sonucu oluşan parçaların 65
agaroz jel elektroforezi görüntüsü görülmektedir.
- 4.8. Homozigot G/G genotipteki temsili 8 örnek ve heterozigot G/C 65
genotipteki 1 örneğin *BstNI* enzimi ile RFLP analizi sonucu agaroz jelde
görülmektedir.
- 4.9. Heterozigot G/C genotipteki 10 örneğin *BstNI* enzimi ile RFLP analizi 66
sonucu agaroz jelde görülmektedir.
- 4.10. Temsili 9 örnekte *SfcI* enzimi ile RFLP analizi sonucu oluşan parçaların 67
agaroz jel elektroforezi görüntüsü görülmektedir.
- 4.11. Temsili 19 örnekte *MspI* enzimi ile RFLP analizi sonucu oluşan 68
parçaların agaroz jel elektroforezi görüntüsü görülmektedir.
- 4.12. Heterozigot G/A genotipteki 2 örneğin *MspI* enzimi ile RFLP analizi 68
sonucu agaroz jelde görülmektedir.
- 4.13. Temsili 10 örnekte *BceAI* enzimi ile RFLP analizi sonucu oluşan 69
parçaların agaroz jel elektroforezi görüntüsü görülmektedir.

- 4.14. Homozigot C/C genotipteki temsili 5 örnek ve heterozigot C/T 70
genotipteki 1 örneğin *BceAI* enzimi ile RFLP analizi sonucu agaroz jelde
görölmektedir.
- 4.15. Temsili 10 örnekte *DdeI* enzimi ile RFLP analizi sonucu oluşan 71
parçaların agaroz jel elektroforezi görüntüsü görölmektedir.
- 4.16. Homozigot G/G genotipteki temsili 10 örnek ve heterozigot G/A 72
genotipteki 1 örneğin *HpyAv* enzimi ile RFLP analizi sonucu agaroz jelde
görölmektedir.
- 4.17. PCR-RFLP analizi ile taranan 11 missense SNP, neden oldukları amino 74
asit değişimleri, protein pozisyonları, heterozigot ve minör aleli
homozigot genotipte olan SNP'lerin dağılımı en uzun formdaki G-CSF-R
proteini (izoform c) üzerinde gösterilmiş, SNP'lerin protein yapısında
denk geldikleri bölgeler şematize edilmiştir.
- 4.18. Gerçek zamanlı PCR ile gerçekleştirilen JAK2V617F mutasyon analiz 76
grafiklerinde temsili 27 mutasyon taşımayan, 1 mutasyon taşıyan
örnek görölmektedir.
- 4.19. Aferez ürünü yayma preparatında nötrofil ve mononükleer hücreler 78
görölmektedir.
- 4.20. G-CSF verilmiş, taranan SNP'leri majör alel homozigot genotipte 80
taşıyan sağlıklı donörlerin toplama günlerine karşı veri değişim
grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) gösterilmektedir
- 4.21. G-CSF verilmiş, taranan SNP'leri majör alel homozigot genotipte 82
taşıyan kanser hastalarının toplama günlerine karşı veri değişim
grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) gösterilmektedir.

- 4.22. G-CSF verilmiş, taranan SNP'leri majör alel homozigot genotipte 83 taşıyan NHL hastalarının toplama günlerine karşı veri değişim grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) gösterilmektedir.
- 4.23. G-CSF verilmiş, taranan SNP'leri majör alel homozigot genotipte 85 taşıyan MM hastalarının toplama günlerine karşı veri değişim grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) gösterilmektedir.
- 4.24. G-CSF verilmiş, taranan SNP'leri majör alel homozigot genotipte 86 taşıyan HL hastalarının toplama günlerine karşı veri değişim grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) gösterilmektedir.
- 4.25. G-CSF verilmiş, taranan SNP'leri majör alel homozigot genotipte 88 taşıyan germ hücreli kanser hastalarının toplama günlerine karşı veri değişim grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) gösterilmektedir.
- 4.26. G-CSF verilmiş, taranan SNP'leri majör alel homozigot genotipte 89 taşıyan AML hastalarının toplama günlerine karşı veri değişim grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) gösterilmektedir.
- 4.27. G-CSF-R genindeki g.6214055 G>A (rs3918018) SNP'i A/A genotipte 95 taşıyan sağlıklı donörün toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir.
- 4.28. G-CSF-R genindeki g.6214055 G>A (rs3918018) SNP'i A/A genotipte 96 taşıyan sağlıklı donörün verileri, G/G genotipteki sağlıklı donör grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) ile karşılaştırıldı.
- 4.29. G-CSF-R genindeki g.6214055 G>A (rs3918018) SNP'i G/A genotipte 97 taşıyan MM hastasının toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir.

- 4.30. G-CSF-R genindeki g.6214055 G>A (rs3918018) SNP'i G/A genotipte taşıyan MM hastasının toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. 98
- 4.31. G-CSF-R genindeki g.6214055 G>A (rs3918018) SNP'i G/A genotipte taşıyan MM hastasının toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. 99
- 4.32. G-CSF-R genindeki g.6214055 G>A (rs3918018) SNP'i G/A genotipteki MM hastaları, G/G genotipteki MM hasta grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) ile karşılaştırıldı 100
- 4.33. G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i G/C genotipte taşıyan sağlıklı donörün toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. 103
- 4.34. G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i G/C genotipte taşıyan sağlıklı donörün toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. 104
- 4.35. G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i G/C genotipte taşıyan sağlıklı donörün toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. 105
- 4.36. G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i G/C genotipteki sağlıklı donörler, G/G genotipteki sağlıklı donör grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) ile karşılaştırıldı. 106
- 4.37. G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i G/C genotipte taşıyan NHL hastasının toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. 108

- 4.38. G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i G/C genotipte taşıyan NHL hastasının toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. 109
- 4.39. G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i G/C genotipteki NHL hastaları, G/G genotipteki NHL hasta grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) ile karşılaştırıldı. 110
- 4.40. G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i G/C genotipte taşıyan MM hastasının toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. 112
- 4.41. G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i G/C genotipte taşıyan MM hastasının toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. 113
- 4.42. G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i G/C genotipte taşıyan MM hastasının toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. 114
- 4.43. G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i G/C genotipte taşıyan MM hastasının toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. 115
- 4.44. G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i G/C genotipteki MM hastaları, G/G genotipteki MM hasta grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) ile karşılaştırıldı. 116
- 4.45. G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i G/C genotipte taşıyan HL hastasının toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. 118
- 4.46. G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i G/C genotipteki HL hastasının, G/G genotipteki HL hasta grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) ile karşılaştırıldı. 119

- 4.47. G-CSF-R genindeki g.6219430 G>A (rs3918001) SNP'i G/A genotipte taşıyan MM hastasının toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. 121
- 4.48. G-CSF-R genindeki g.6219430 G>A (rs3918001) SNP'i G/A genotipte taşıyan MM hastasının toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. 122
- 4.49. G-CSF-R g.6219430 G>A (rs3918001) SNP'i G/A genotipindeki MM hastaları, G/G genotipteki MM hasta grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) ile karşılaştırıldı. 123
- 4.50. G-CSF-R genindeki g.6219475 C>T (rs3918021) SNP'i C/T genotipte taşıyan MM hastasının toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. 125
- 4.51. G-CSF-R g.6219475 C>T (rs3918021) SNP'i i C/T genotipindeki MM hastası, C/C genotipteki MM hasta grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) ile karşılaştırıldı. 126
- 4.52. G-CSF-R genindeki g.6219886 G>A [115] SNP'i G/A genotipte taşıyan NHL hastasının toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. 128
- 4.53. G-CSF-R g.6219886 G>A [115] SNP'i G/A genotipteki NHL hastası, G/G genotipteki NHL hasta grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) ile karşılaştırıldı. 129
- 4.54. G-CSF-R genindeki g.6219886 G>A [115] SNP'i G/A genotipte taşıyan HL hastasının toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. 131
- 4.55. G-CSF-R g.6219886 G>A SNP'i G/A genotipteki HL hastası, G/G genotipteki HL hasta grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) ile karşılaştırıldı. 132

- 4.56. JAK2V617F mutasyonu taşıyan MM hastasının toplama günlerine karşı 134 verileri gösterilmektedir.
- 4.57. JAK2V617F mutasyonu taşıyan MM hastası, mutasyon taşımayan MM 135 hasta grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) ile karşılaştırıldı.

TABLOLAR DİZİNİ

2.1.	İzoformlara göre G-CSF-R geninde bulunabilecek SNP'lerin numaraları, yer aldıkları ekzon, neden oldukları baz ve protein değişimleri gösterilmiştir.	35
3.1.	H.Ü KİT ünitesinde 2000-2009 yılları arasında G-CSF almış bireylere ait bilgiler. Sayı, yaş dağılımı, yaş aralığı.	37
3.2.	Polimorfik bölgeler, içerdikleri SNP'ler ve tasarlanan primerler gösterilmiştir.	41
3.3.	G-CSF-R genindeki polimorfik bölgelerin amplifikasyonu için PCR tepkimesinde kullanılan bileşenlerin belirlenen optimal değerleri	42
3.4.	G-CSF-R gen bölgelerinin amplifikasyonunda kullanılan PCR reaksiyon koşulları.	43
3.5.	Birinci kromozomda (1p32-35'de) bulunan G-CSF-R geni missense SNP'lerine özgül restriksiyon endonükleaz enzimlerinin tanıma bölgeleri.	44
3.6.	G-CSF-R missense SNP'lerine göre RFLP işlemlerinde kullanılan enzimler ve reaksiyon koşulları gösterilmiştir	49
3.7.	PCR ile çoğaltım sonucu oluşan ampliconların uzunlukları ve missense SNP varlığına göre oluşabilecek kesim ürünü boyutları gösterilmiştir	50
3.8.	%20'lik poliakrilamid jel solüsyonunda kullanılan bileşenlerin hacimleri	52
3.9.	JAK2 MutaScreen™ kitteki bileşenler, reaksiyon başına kullanım oranları.	54
3.10.	Referans ölçekleri, pozitif ve negatif kontrollerin içeriği.	54
4.1.	Aferez ürününden izole edilen DNA örneklerinin PCR başarısı oranı ve PCR sonucu amplicon görülmeyen başarısız PCR örneklerinin özellikleri gösterilmiştir.	59

- 4.2. G-CSF-R geni üzerindeki missense SNP'lerin genotip frekansları 73
gösterilmektedir.
- 4.3. Gerçek zamanlı PCR ile gerçekleştirilen JAK2V617F mutasyon analizi 77
sayısal veri tablosunda referans ölçeklerinin (M1-M6) mutasyonlu
alel taşıma oranlarına göre FAM/VIC oranlarının çoğalarak arttığı,
253.örneğin FAM/VIC oranının (kırmızı halka) M1 referans ölçeğinin
oran değerinden (yeşil halka) yüksek olduğu görülmektedir.
- 4.4. Çalışma grubundaki 295 bireyin kök hücre toplama sayılarının 79
tanılara göre dağılımı gösterilmektedir.
- 4.5. Çalışma grubundaki diğer kanser hastalarına ait veriler 91
görülmektedir.
- 4.6. JAK2V617F mutasyonu, herhangi bir SNP'i heterozigot veya minör 93
aleli homozigot genotipte taşıyan bireylerin tanılarına göre dağılımı
ve toplam birey sayısına göre sıklığı gösterilmektedir.
- 4.7. Genomik g.6214055 G>A (rs3918018) SNP'i heterozigot genotipte 101
taşıyan primer amiloidoz hastasının 1. ve 2. toplama günlerindeki
verileri gösterilmektedir.
- 4.8. G-CSF-R genindeki polimorfizmleri heterozigot veya minör alel 136
homozigot genotipte taşıyan bireyler ile JAK2V617F mutasyonlu
bireyin toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir.

1.GİRİŞ

Hematopoez embriyonik ve yetişkin düzeyde bütün serilerde kan hücre oluşumunu sağlayan bir süreçtir. Hematopoetik sistem karmaşık kontrol mekanizmasıyla kan hücreleri arasındaki denge ve sayısal düzeyi sürekli değiştirmektedir. Vücut içerisindeki homeostezin devamı için kemik iliği tüm kan hücrelerinin yaşam boyu rejenerasyonunu sağlayan hematopoetik kök hücreleri (HKH) barındırır (1-3). Kök hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşma özellikleri, özelleşmiş hücresel mikroçevreler tarafından kontrol edilir (4). Hematopoetik kök hücrelerin kemik iliğinden ayrılıp sirkülasyona girmeleri (mobilizasyonları) sirkülasyondan kemik iliğine geri dönmeleri (*homing*) ve yerleşimleri (*engraftment*) gibi bir çok karmaşık sürecin düzeni de yine hematopoetik kök hücre nişlerinde sağlanır (5-6).

Hematopoetik büyüme faktörlerinden biri olan G-CSF fizyolojik koşullarda miyeloid hücrelerin hayatta kalımını, proliferasyonunu, nötrofillerin gelişimini ve aktivasyonunu sağlayarak hematopoez ve doğal immün sistemi düzenleyici rol oynar (7-9). Hematopoetik koşullar haricinde ise G-CSF, HKH'lerin ileri düzeyde mobilizasyonunu sağlayan ve HKH'lerin toplanmasına aracılık eden bir biyolojik büyüme faktörüdür. Bu fonksiyonu ile G-CSF benign ve malign hastalıkların tedavisi amacıyla periferik kök hücre transplantasyonunda kullanılan en etkin ajandır (10-11). Normal koşullarda; G-CSF'in 10µg/kg/gün dozda sub-kutan uygulanmasının 4-6 günde periferik kandaki CD34⁺ hücre/mm³ miktarını 30 kat (10-100 kat) artırdığı tespit edilmiştir (12-13) Ancak G-CSF'in etkisini gösterebilmesi için özgül hücrelerin yüzeyindeki G-CSF reseptörüne (G-CSF-R) bağlanması gerekmektedir (14-15).

Tip I sitokin reseptör ailesi üyesi olan G-CSF-R proteinini kodlayan gen, 1. kromozomun kısa kolunda (1p32-35) yer alır (16-17). G-CSF-R'in ekstrasellüler kısmı immünoglobulin benzeri kısım, sitokin reseptör homoloji bölgesi ve fibronektin tip III kısımlarından oluşur. İntrasellüler kısmı ise sinyal fonksiyonlarında etkili, korunmuş box1, box2 ve box3 motiflerinden meydana gelmektedir (14). G-CSF-R'daki bu bölgeler birbirinden farklı fonksiyonlarda görev alırlar (17-18). Ligandı G-CSF ile

bağlanan G-CSF-R farklı biyolojik yanıtların gerçekleşmesini sağlayan JAK-STAT, p21Ras/MAP kinaz ve PI3K/PKB gibi çoklu sinyal yollarının aktifleşmesini sağlar (14,19).

G-CSF-R geninde bulunabilecek genetik düzeydeki değişimlerden, birkaç mutasyon ve polimorfizmin sinyal fonksiyonlarında düzensizliğe ve hematolojik hastalıklara yatkınlığa neden olabileceği bildirilmektedir (14,20-21).

Bu çalışmanın amacı NCBI GenBank veri tabanı (22), Wölfler ve ark.'ın (23) çalışmasından yararlanılarak, G-CSF-R geninin kodlanan bölgesinde yer aldığı belirlenen 11 *missense* tek nükleotid polimorfizmin çalışma grubumuzdaki sıklıklarını araştırmaktır. Çalışmanın devamında 20 bireyde tespit edilen polimorfik minör alellerin, G-CSF rejimi sonrasında CD34⁺ kök hücre toplama günlerinde elde edilen mm³'teki lökosit, total mononükleer hücre ve CD34⁺ kök hücre/kg sayılarına etkisine bakılacak ve polimorfizmler G-CSF yanıtı ile ilişkilendirilecektir.

G-CSF-R genindeki polimorfizmlere ek olarak miyeloproliferatif hastalıklardan özellikle Polistemi Vera patojenezinde etkili olduğu bilinen, kontrolsüz proliferasyona neden olan JAK2V617F mutasyonu çalışma grubumuzdaki bireylerde analiz edilecektir (24).

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Hematopoetik Sistem

2.1.1. Hematopoez

Hematopoez embriyonik ve yetişkin düzeyde, vücut içerisinde bütün serilerde kan hücresi oluşumunu sağlayan bir süreçtir (1-2,25). Olgun bir bireyde günde yaklaşık olarak 2×10^9 eritrosit, 10^9 lökosit ve 10^9 trombosit üretimi gerçekleşmektedir (25). Bunun yanı sıra bu üretim kan hücrelerine ihtiyaç duyulduğunda 10 kat veya fazla arttırılabilir (25). Hematopoetik strese sebep olan kanama, toksik yaralanma, düşük oksijen düzeyi, enfeksiyon, kemoterapötik ajanlara maruz kalma gibi durumlarda olgun kan hücreleri arasındaki denge ve sayısal düzey sürekli değiştirilmektedir (2-3).

Fizyolojik koşullarda, bazı lenfoid hücre tipleri dışında olgun kan hücrelerinin yaşam süreleri saatlerden (granülositler) birkaç haftaya (eritrositler) kadar değişmek suretiyle çok kısadır (3). Bu yüzden fonksiyonel hücreler sürekli yenilenmeye ihtiyaç duyarlar ve olgun kan hücresi üretimi sürekli devam eder (3,26).

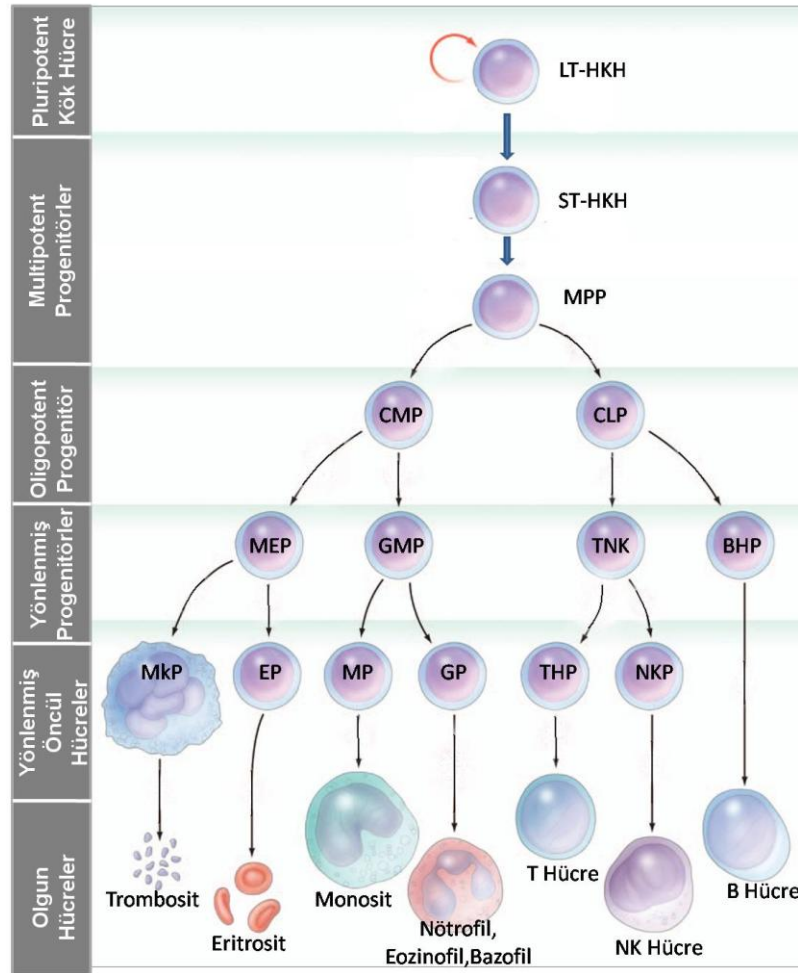
Homeostezin devamı ve hematopoetik streslere hızlı yanıtı sağlamak için kemik iliği tüm kan hücrelerinin yaşam boyu rejenerasyonunu sağlayan hematopoetik kök hücreleri barındırır (2). Hematopoez, erişkin kök hücre tiplerinden biri olan ve bütün kan hücre serilerine dönüşme yeteneğindeki hematopoetik kök hücrenin (HKH, *hematopoietic stem cell*, HSC) gelişim, kendini yenileme ve farklılaşma süreçlerini de kapsamaktadır (1). Kök hücreler tek bir hematopoetik seriye dönüşecek multiserial (*multilineage*) progenitörlerin ve öncül hücrelerin yaşam boyu yenilenmesinden sorumludur (27). HKH'ler birçok farklılaşma sürecinden sonra birbirinden değişik efektör kan hücresi oluşumu sağlarlar. Bu yüksek farklılaşma düzeyi gelişmiş bir homeostatik kontrol mekanizmasına ihtiyaç duyar (26).

2.1.2 Hematopoetik Hiyerarşi

Olgun hematopoetik sistem kademeli olarak farklılaşma yeteneğine sahip pluripotent, multipotent ve unipotent kök hücreleri içerir (28). Bu farklılaşma süreci, normal fizyolojik koşullar altında geri dönüşümsüzdür (26). Yüksek düzeyde proliferasyon yapabilme yeteneğine sahip bu hücreler, farklı fonksiyonel özelliklerde olgun kan hücrelerinin yapımını sağlarlar (3,28-29). Böylece hematopoetik sistemin sessiz fazda sürdürülmesi için gereken miktarda farklılaşmış hücre yapımı sağlanır (28). HKH'ler bir veya birden çok seriye farklılaşmaya sınırlanmış progenitör hücrelerden oluşan hiyerarşik düzenin ana kaynağını oluştururlar (26-28). Hiyerarşinin en üstünde ikamet eden HKH'ler üzerindeki proliferasyon baskısı en düşük düzeydedir (3,26). Homeostaz sırasında kemik iliğinde az sayıda yer alan HKH'ler farklılaşmış kan hücrelerinin belirli miktarda idamesi ve hematopoetik kök hücre havuzunun yenilenmesi için nadir olarak bölünürler (28,30).

Hiyerarşik düzende HKH'den sonra yer aldığı bulunan multipotent progenitör (Multipotent progenitors, MPP) hücreler bütün serilere farklılaşma potansiyelini sürdürürler ancak kendilerini yenileme kapasiteleri sınırlıdır. HKH'lerden daha fazla miktarda bulunan MPP hücreler gelişim potansiyeli kısıtlı oligopotent progenitörlere kaynak teşkil ederler (26). Bu hücreler ortak lenfoid progenitör (*Common lymphoid progenitors*, CLP) ve ortak miyeloid progenitörler (*Common myeloid progenitors*, CMP) ile hematopoetik hiyerarşi içerisinde ki dallanma noktasını temsil ederler (26,31). Sonuçta oligopotent hücreler, bütün olgun kan hücrelerini oluşturacak serisınırlı öncül hücrelerin oluşumunu sağlarlar (26). CLP'ler B, T, dendritik ve doğal öldürücü hücreleri içeren olgun lenfoid efektör hücreleri oluştururlarken miyeloeritroid hücre oluşturma potansiyelinden yoksundurlar (26,32). CMP'ler ise miyeloid ve eritroid seri ile dendritik hücreleri yapma yeteneğine sahiptirler (26,32-33). CLP hücreler interleukin-7 (IL-7) reseptörünü yüksek düzeyde eksprese etmeleri ile CMP'den ayrılırlar. Gelişimin daha ileri evrelerinde CMP hücreler CD34 ve Fcγ reseptör ekspresyonlarına göre megakaryosit eritrosit öncülleri (*megakaryocytic/*

erythroid precursor, MEP) ve granülosit monosit öncülleri (*granulocytic/ monocytic precursor*, GMP) olmak üzere iki farklı hücre grubuna bölünürler (31-33). Farklılaşma yeteneği sınırlı GMP'ler esas olarak olgun nötrofil, monosit ve makrofaj oluşumunu sağlarken daha az oranda eozinofil, bazofil ve mast hücrelerini meydana getirirler (33). MEP'ler ise eritrositlerin ve daha sonra platelletleri meydana getirecek megakaryositlerin oluşumundan sorumludur (Şekil2.1) (33). Böylece hematopoetik sistemin hiyerarşik düzeni içerisinde bütün serilerde kan hücrelerinin oluşumu ve idamesi gerçekleşmiş olur.



Şekil 2.1. Hematopoetik hiyerarşi modeli.(Kaushansky, 2006'dan uyarlanmıştır (25).)

2.1.3. Hematopoetik Büyüme Faktörleri

Hematopoetik kök hücreler ve progenitörler hematopoetik büyüme faktörlerinin kontrolü altındadır. Eritropoetin, granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF), granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF), IL-2, IL-3 ve IL-7 en iyi karakterize edilen hematopoetik büyüme faktörleridir (7,25).

Hematopoetik büyüme faktörleri polifonksiyonel özelliktedir(7). Gelişimin her aşamasında etken olan bu faktörler hematopoetik hücrelerin hayatta kalımını ve proliferasyonunu sağlar (25). Progenitör hücrelerin farklılaşmaya yönelmelerini, olgunlaşmalarını, farklılaşmış hücrelerin ise fonksiyonel aktivitelerini düzenlerler (7,34).

Genellikle sitokinler olarak adlandırılan hematopoetik büyüme faktörleri mililitre başına pikogram/nanogram düzeyde bulunmalarına rağmen yüksek düzeyde biyolojik yanıtı sebep olurlar (7). Hücre içerisinde sinyal iletimini sağlayan sitokin reseptörleri hücre yüzeyinde düşük yoğunlukta bulunmaktadır (7). Bu nedenle, sitokinlerin ve reseptörlerinin ekspresyonu-yıkımı sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir (8).

Kırmızı kan hücresi oluşumunu ve proliferasyonunu sağlayan faktör Eritropoietin (Epo) ilk tanımlanan hümmoral düzenleyicidir (7,25).

G-CSF granülositik yolaktaki hücrelerin canlılığını, proliferasyonunu, baskın olarak nötrofillere farklılaşmalarını ve nötrofillerin aktivasyonunu sağlar (7-8). Aynı zamanda IL-3 ile sinerjistik olarak erken hematopoetik progenitörlerin gelişimini stimüle eder (8).

GM-CSF'in hematopoetik hücreler üzerinde pleitropik ve yaygın etkisi vardır (8). Kültür ortamında nötrofil, eozinofil, bazofil, monosit ve dendritik hücre üretimini stimüle eder (25). Aynı zamanda bu faktörün hemotopetik progenitörlere etkisi monosit koloni stimüle edici faktör (M-CSF), G-CSF, IL-3 gibi sitokinlerle örtüşür (8).

M-CSF makrofajlar ve öncülleri monositlerin canlılığını, proliferasyonunu ve farklılaşmasını sağlar. Diğer sitokinlerle sinerjistik olarak hematopoetik progenitörlerin proliferasyonunu etkiler (8).

Trombopoetin (TPO) trombosit oluşumunda temel düzenleyici büyüme faktörü olarak kabul edilir (7). TPO, megakaryosit progenitörlerin yaşamlarını ve proliferasyonlarını düzenler, aynı zamanda *in vitro* koşullarda diğer hematopoetik kök hücrelerin de yaşamlarını ve proliferasyonlarını etkiler (25).

IL-3, koloni stimüle edici faktörlerin başında yer alır ve bütün serilerdeki kan hücrelerini regüle eder; miyeloid, eritroid, lenfoid serilerin gelişimini uyarır (7-8). B hücre farklılaşmasını IL-5, T hücre proliferasyonunu IL-2 sağlar. IL-7 ise T lenfosit oluşumunda anahtar faktördür (7).

2.2. Hematopoetik Kök Hücreler

2.2.1 Hematopoetik Kök Hücrelerin Özellikleri

Kök hücreler, sınırsız düzeyde kendini yenileme ve birden fazla seriye farklılaşma yeteneğine sahip olan klonojenik hücreler olarak tanımlanırlar (35-37). Kök hücreler, bir canlıda yaşam boyu yenilenen tüm farklılaşmış hücrelerin kaynağını oluştururlar (4). Kök hücreler ve bunlardan farklılaşan hücreler arasındaki biyolojik denge; gelişim, homeostaz, organ fonksiyonlarının uzun süreli idamesi ve doku onarımı için çok önemlidir (4-5,32,37).

Hematopoetik kök hücreler memelilerde en iyi tanımlanmış kök hücre türüdür(4,32,37). Diğer kök hücreler gibi hematopoetik kök hücreler de tek hücre düzeyinde kendini yenileme (*self-renewal*) ve pluripotent özelliğine sahiptirler (27-28,38). Pluripotensi, tek bir hücrenin çok çeşitli farklılaşmış hücreye kaynak oluşturma kapasitesi olarak tanımlanır (4,38). Kendini yenileme ise genelde asimetrik bölünmeler ile aynı tipte birden çok kök hücre oluşturma yeteneği olarak tanımlanır (37-38). HKH'ler kendini yenileme ve farklılaşma dengesini kurabilirler

(39). Böylece kan hücrelerinin yaşam boyu üretimi, HKH havuzundaki hücre sayısının azalmadan sürdürülmesi ve doku fonksiyonları için gerekli olgun hücre oluşumu gerçekleşir (1,30,32,38-39). Sessiz (uyku, *quiescent*) fazda olan kök hücreler genel olarak hücre siklusunun G₀ fazında bulunurlar. Bu sayede DNA replikasyonunun, hücre bölünmesinin, metabolik ürünlerin ve reaktif oksijen ürünlerinin mutajenik hasarından kendilerini korurlar (26). HKH'ler nadir olarak bölünerek doku homeostazını sağlarken onkojenik olayların oluşumunu da engellerler (4,30).

2.2.2. Hematopoetik Kök Hücrelerin Biyolojik Özellikleri ve Tanınmaları

HKH'ler farklılaşmaya yönelirken ilk olarak kendini yenileme özelliklerini aşamalı olarak kaybederler (40).

Farelerde yapılan *in vivo* deneyler sonucunda multipotent HKH'lerin iki türü izole edilmiştir (41-42). Bunlardan biri alıcıda yaşam boyu hematopoez yenilenmesi sağlarken (LT-HSC) diğeri yaklaşık 6-8 haftalık kısa süreli yenilenme (ST-HSC) sağlar (43). Uzun süreli hematopoezi yenileme (*long term reconstitution*, LTR) aktivitesine sahip en öncül HKH grubu LT-HKH'ler Thy-1.1düşük CD34⁻ CD38⁺ LSK grubu içinde yer alır. ST-HKH'ler CD34⁺ CD38⁻ Thy-1.1⁻ grubuna dahildir (5,33,37,39,44). LSK hücreleri fare kemik iliği hücrelerinin %0.1' ini temsil eder ve LSK popülasyonunun 1/30'u fonksiyonel kök hücreler ve diğer çoğunluğu da MPP'lerden oluşur (2-3,26).

İnsanlarda *in vivo* çalışmalar sınırlı olduğundan HKH karakterizasyonu ve izolasyonu hala zordur. Ancak en öncül insan HKH'sinin CD34, CD133, CXCR4 ve CD150 eksprese ettikleri bunun yanı sıra CD38⁻ ve Lin⁻ oldukları bilinmektedir (39).

2.3 Hematopoetik Kök Hücre Fonksiyonları ve "Niş Kavramı"

2.3.1 Kök Hücre ve Niş Tanımı

Kök hücrelerin kendini yenileme ve farklılaşma özellikleri özelleşmiş hücresel mikroçevreler tarafından kontrol edilir (4). Destekleyici hücreler ve bu hücrelerden

sağlanan sinyaller ile oluşan özel bir mikroçevre ‘kök hücre nişi’ olarak tanımlanmaktadır (4,10). Kök hücre nişlerinin; kök hücreyi eğittikleri ve onların doku homeostazını sürdürmelerine olanak sağladıklarına ait son yıllarda önemli veriler elde edilmiştir (45). Homeostazın uzun süreli yerine getirilmesi için kök hücre ve niş hücreleri arasında “spatiotemporal” bir ilişki söz konusudur (45). Özetle; “Niş” kök hücrenin kendi kimliğini sürdürmesine olanak veren ve mikroçevresini oluşturan özelleşmiş bir bölge ve etrafındaki hücre grubunun tamamı olarak tanımlanmaktadır (46).

2.3.2 Hematopoetik Kök Hücre Nişleri

İlk olarak 1978 yılında Schofield HKH’lerin ikamet ettiği fizyolojik mikroçevreyi tanımlamak amacıyla ‘HKH niş’ kavramını ortaya koymuştur (6,10,29,47). HKH’ler doğum öncesi dönemden başlayarak doğumun gerçekleşmesiyle görevlerini yaşam boyu sürdürecekleri kemik iliğine yerleşirler. HKH’ler kemik iliğindeki (Kİ) özelleşmiş mikroçevrelerde özgül mezenşimal kökenli stromal hücreler (osteoblast, fibroblast, endotelyal hücre, adiposit, vb.) ile HKH ve progenitörleri ile yakın etkileşim içerisinde bulunurlar. Aynı zamanda HKH’ler ile hücre-dışı matriks bileşenleri arasında da bazı moleküller, faktörler ve sinyaller aracılığıyla yüksek düzeyde bir etkileşim vardır. Hematopoetik kök hücrelerin kendilerini yenilemesi, hücre siklusunun G₀ evresinde sessiz olarak kalmaları, adezyonları, proliferasyonları, olgunlaşmaları, farklılaşmaya yönelmeleri, Kİ’den ayrılıp dolaşıma girmeleri (mobilizasyon) dolaşımdan Kİ’e geri dönmeleri (*homing*) ve yerleşimleri (*engraftment*) gibi birçok karmaşık sürecin düzeni de hematopoetik kök hücre nişlerinde sağlanmaktadır. (5-6,10-11,28-29,48).

Kemik iliğinde HKH’lerin farklı fonksiyonlarını düzenleyen iki ayrı türde niş; endotel niş (osteoblastik niş) ve vasküler niş (endotelyal niş) bulunur. Bu iki niş birbirinden fiziksel olarak tamamen ayrı olmayıp birbirleriyle bağlantılıdır. HKH’ler farklı koşullar altında iki nişten birini kullanırlar (1,3,10-11,37,47,49-50).

2.3.3 Endostel Niş

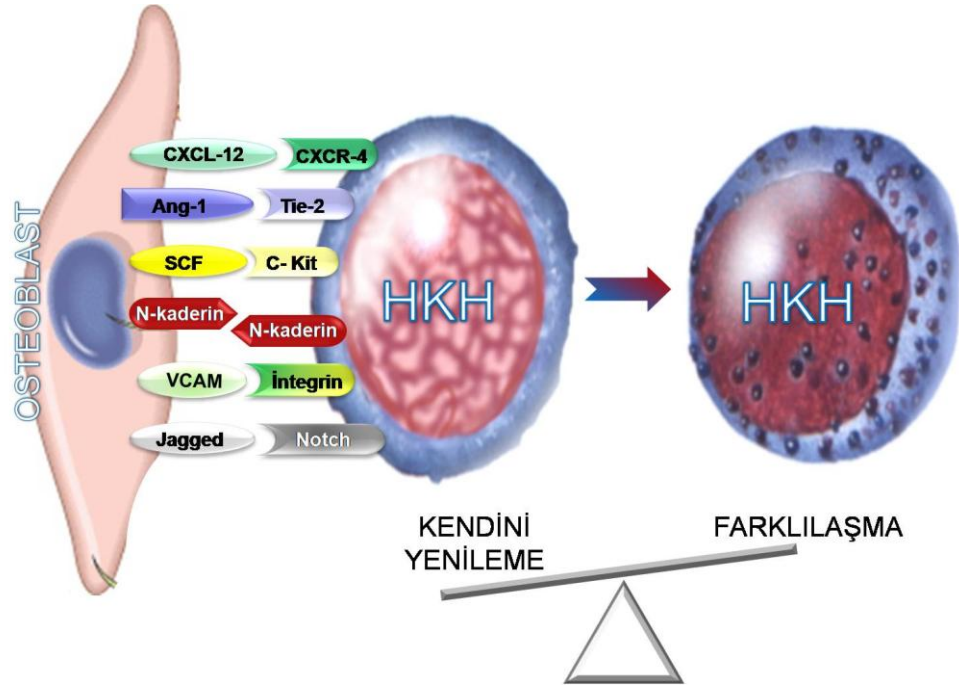
Uzun kemiklerin trabeküler alanında kemik ve kemik iliği birbirinden endosteum aracılığı ile ayrılır. Endosteum bölgesi kemiğin medüller kavitesine bakan kısım üzerinde uzanan osteojenik özellikteki tek sıralı hücreleri içerir (1,6,51). HKH'lerin en primitif olanları endosteum ile yakın ilişki içerisinde olup burada lokalize olmuşlardır (37,51-52).

Endostel nişteki özgül mikroçevre, hücreler ve salgıladıkları faktörler HKH'lerin sessiz (G_0) fazda, endostel nişe adhere halde farklılaşmadan yaşamlarını sürdürmelerini, mobilizasyonlarını ve yerleşimlerini sağlarlar. Böylece HKH havuzu yaşam boyu sabit düzeyde, aynı hücre sayısını koruyarak devam eder (1,6,11,29,37,47).

Endostel nişte kemiğe bu kadar yakın olma, hücrelerin düşük oksijen düzeyli bir anatomik bölgede konumlanıyor olmasına yol açar. Bu hipoksik ortam HKH'lerin reaktif oksijen türlerinden hasar görmelerini ve farklılaşmalarını önlemektedir (3,44-45,53).

Mezenşimal kök hücrelerden gelişen ve kemik formasyonunda rol alan osteoblastlar endostel nişin temel bileşenini oluşturur (1,10,47,49). Osteoblastlar hücre bağımlı, matriks bağımlı ve çözünmüş (solubl) sitokinler sentezleyerek HKH fonksiyonlarını module ederler. Bunların en önemlileri G-CSF, GM-CSF, M-CSF, IL-1, IL-6, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), CXCL12, IL-3, FLT ligand ve kök hücre faktörü (*Stem cell factor, SCF*)'dür. Aynı zamanda bu hücreler adezyon molekülleri de eksprese ederler. CD34, CD44, ICAM-1 (*intracellular cell adhesion molecule-1*), VLA-4 (*very late antigen*), VLA-5, PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule*), LFA-1 (*Lymphocyte function-associated antigen 1*) ve LFA-3 bu grubun önemli örnekleridir (29,54). Tüm bu faktörler dışında osteoblastların sayısal olarak değişimi HKH sayısını doğru orantılı olarak etkiler (1,6,11,37). Osteoblastların, endostel niş boyutunu ve aktivitesini sınırlayıcı bir faktör olduğunu ortaya koymaktadır(37). Endostel nişte özelleşmiş N-kaderin eksprese eden iğ şeklinde

osteoblast hücreleri (*spindle shaped osteoblasts*, SNO) ile LT-HKH'ler arasında sıkı bir hücre-hücre bağlantısı kuruludur (Şekil 2.2) (55). Bu sıkı bağlantılar HKH'lerin endostel nişe tutunarak kendini yenileme özelliklerinin sürekliliğini sağlar (37,49,54).



Şekil 2.2.Endostel nişte osteoblastlar ile HKH'ler arasında homeostazı sağlayan iletişim. (Li ve ark., 2006'dan uyarlanmıştır (6).)

Kemik iliğinde fonksiyonel özellikleri ile önemli bir diğer hücre grubu da osteoklastlardır. Osteoklastlar çok çekirdekli hücrelerdir. $CD34^+$ hematopoetik hücrelerden oluşurlar ve temel biyolojik görevleri kemik rezorpsiyonunu sağlamaktır (49,54). Osteoklastlar hasar, stres, inflamasyon durumlarında çevrelerinde proteolitik aktiviteyi artırırlar. Matriks metalloproteinaz-9 (MMP-9) ve katepsin salgılayarak endostel nişteki CXCL12'yi yıkıma uğratırlar ve olgunlaşmamış hematopoetik progenitör hücrelerin (HPH) dolaşıma girmelerine neden olurlar (6,11,56).

Kemik iliğinde HKH'ler üzerinde düzenleyici görevi olan bir diğer hücre grubu da retiküler hücrelerdir (*CXCL-12 abundant reticular cells*, CAR). Bu hücreler, CXCL12 veya diğer adıyla SDF-1 (*stromal derived factor-1*) kemokini yüksek miktarda eksprese ederler. Normal koşullarda endotel nişteki CXCL12, HKH üzerindeki reseptörü CXCR4 ile etkileşerek HKH havuzunun devamlılığında, HKH trafiğinde ve kök hücrelerin mobilizasyonunda rol oynar (1,6,49). CAR hücrelerinin kemik iliğinin sinusoidal bölgelerinde de HKH'ler ile bağlantılı olduğu bulunmuştur. Bu da CAR hücrelerinin hem endotel nişte hemde vasküler nişte etkili bir hücre grubu olduğunu ortaya koymaktadır (57).

Endotel Nişte Görev Alan Adezyon Molekülleri

Adezyon molekülleri HKH'lerin endotel nişe tutunmalarını , hücre siklusuna girip daha olgun hematopoetik hücrelere farklılaşmalarını engelleyerek sessiz fazda kalmalarını sağlar. Diğer yandan bu moleküller HKH göçünde de görev alırlar. HKH'lerin dinamik düzeni için kurulan denge çok önemlidir. Osteoblast veya ekstrasellüler matriks ile HKH bağlantısını oluşturan adezyon molekülleri N-kaderin, β -katenin, VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) / VLA-4 integrin, osteopontin/CD44 ve β_1 integrin'dir(10,37).

Adezyon moleküllerinden N-kaderin ve β -katenin, HKH ile osteoblastın birbirleriyle ilişki kurduğu kısımda asimetric olarak lokalize olup HKH'lerin endotel nişe bağlanmalarını sağlar. İki hücrede de eksprese olan N-kaderinler kendi aralarında homofilik bağlantı kurarlar. HKH'lerin üzerindeki integrinler, osteoblastlar üzerinde buluna VCAM gibi özgül ligandlara ve ekstrasellüler matriks proteinlerine bağlanarak kök hücrelerin nişe tutunmalarını sağlarlar (Bkz. Şekil 2.2)(1,10,37).

HKH'ler de yüksek düzeyde eksprese olan protoonkogen c-Myc geni; N-kaderin ve integrin ekspresyonunu baskılar. Adezyon moleküllerinin azalması sonucunda kök hücreler nişten ayrılarak, farklılaşmaya gidebilirler (6,10,58).

Osteoblastlardan salınan asidik matriks glikoproteini osteopontin HKH'lerin Kİ'den geçerek endotel nişe göçünü sağlar ve HKH sayılarının azalmasına neden olurlar (37,59-60).

2.3.4 Vasküler Niş

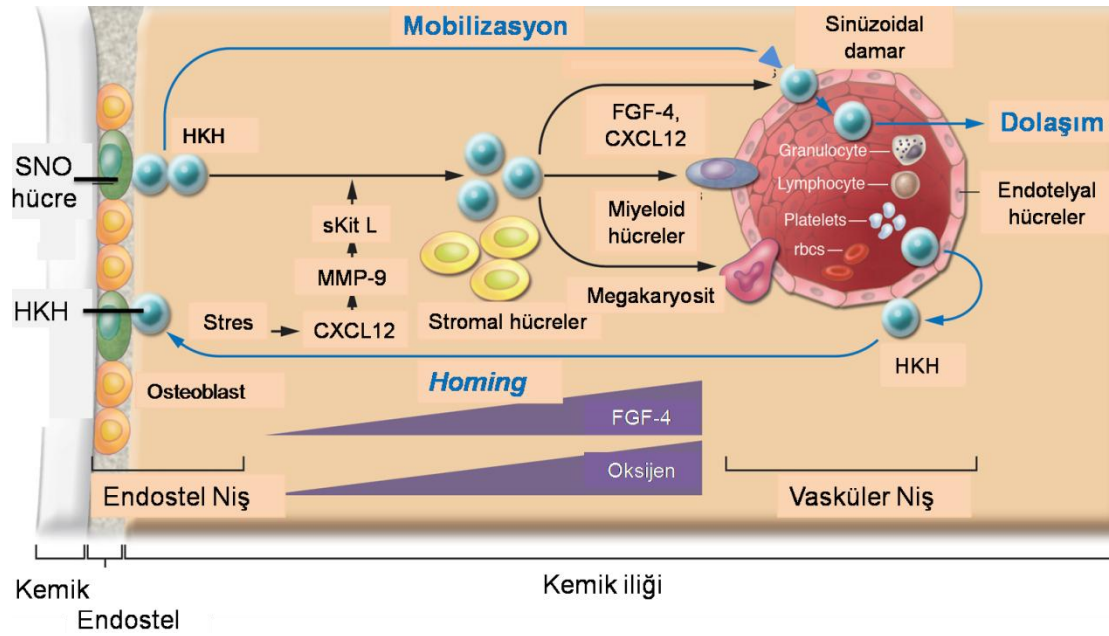
HKH'ler kemik iliğin orta bölümünde bulunan kaviteyi geçerek santral sinüse ulaşan sinüzoidlerin tek sıralı ve aralarında dar açılımlar sağlayabilen (fenestrasyon) endotel hücreleri ile ilişki içerisindeyler. Gelişim sürecinde hematopoez ve vaskülarizasyon aynı anda gerçekleştiğinden HKH ile endotel hücreleri arasındaki yakın ilişki önemli bir biyolojik süreçtir. İki hücre serisinin de kaynağı hemangioblast olarak adlandırılan embriyonik öncül hücrelerdir (6,10-11,37,49).

Kemik iliğinde bulunan sinüs duvarı trilaminar yapıda olup endotel hücreleri, bazal membran ve adventisyal retiküler hücrelerden oluşmaktadır(5,51). Kemik iliğindeki bu damar sistemi HKH ve progenitör hücrelerin yaşamlarını, çoğalmalarını, değişik serilere farklılaşmalarını, olgunlaşmalarını sağlayan özgül bir "Niş"tir (29,48-49). Vasküler niş hematopoetik kök ve progenitör hücrelere hormon, besin, oksijen ve büyüme faktörlerince zengin bir ortam sağlayarak HKH fonksiyonlarını düzenler. Buradaki HKH'lerin kandaki faktörlere sürekli maruz kalması, onların dolaşımdan gelen sinyalleri (stres, inflamasyon, sitotoksik ajanlar, vb.) anında algılamalarını ve yanıt vermelerini sağlar(6,47-49). Ayrıca, vasküler niş HKH'lerin mobilizasyonunu ve dolaşımdan kemik iliğine dönerek yerleşmelerini (*homing*) ve bu süreçte transendotelial geçişlerine yardımcı olur (10,48,61).

Radyasyon veya miyeloablatif ajanlar gibi herhangi bir nedenle kemik iliği hasar gördüğünde, ekstra-medüller hematopoetik organlar olarak nitelendirilen dalak ve karaciğerde bulunan vasküler nişlerde hematopoez ve kan yapımı süreci devam ettirilebilir (6,10,37).

Hematopoetik progenitör hücrelerin vasküler nişe toplanması temel düzeyde fibroblast büyüme faktörü (*fibroblast growth factor-4*, FGF-4)'ne ve

CXCL12'ye bağımlıdır (48,62). FGF-4; VLA-1 integrinin hematopoetik hücreler üzerinde, VCAM-1'in ise endotelial hücreler üzerinde ekspresyonunu artırır. Böylece hematopoetik hücrelerin (özellikle megakaryosit progenitörlerinin) vasküler nişe adezyonları ile yaşamlarını sürdürmelerini ve olgunlaşmaları sağlanır. Aynı zamanda vasküler nişte yüksek, osteoblastik nişte düşük olan FGF gradienti HKH veya progenitörlerin vasküler alana toplanmasında etkilidir (6). CXCL12 ise hematopoetik hücrelerin transendotelial göçünde etkin bir kemotaktik faktördür (10,29,49). Kemik iliği endotel hücreleri de CXCL12, VCAM-1 ve selektinler eksprese ederek HKH'lerin mobilizasyonunda, dolaşımdan kemik iliğine dönmelerinde ve yerleşimlerinde rol alırlar (Şekil 2.3) (29,37).



Şekil 2.3. Kemikte yer alan Endosteal Niş ile Vasküler Niş arası etkileşimler. (Yin ve ark., 2006'dan alınmıştır (10))

2.3.5 Hematopoetik Kök Hücre Nişlerinden Çıkış ve Giriş

Normal koşullarda HKH'lerin çoğunluğu kemik iliğinde lokalize olmasına rağmen çok az düzeyde HKH (%0.06) devamlı olarak periferik kanda bulunur (63-64). Ortaya çıkan HKH dolaşımı; HKH'lerin kemik iliğinden çıkıp vasküler sisteme girmesi sonrasında yeniden kemik iliğine dönmesiyle tamamlanır. Gerçekleşen birbirine zıt bu dinamik süreç literatürde "mobilizasyon" ve "*homing*" olarak adlandırılır (10,37,48-49). Ancak, HKH'ler spesifik sinyallere maruz kaldıklarında, kemiğin yeniden modellenmesi, stres, egzersiz, inflamasyon, kanama, adrenokortikotropik hormon veya sitotoksik ilaç uygulanması sırasında sessiz fazda bulundukları endotel nişten çıkabilmektedirler. Böylelikle, dolaşımdaki HKH'ler acil durumda ulaşılabilinen bir kaynak görevi üstlenmiş olurlar (37,63-64)

Hematopoetik koşullar haricinde, HKH'lerin ileri düzeyde mobilizasyonunu sağlayan G-CSF kök hücre nakli yapılan hastalarda kullanılan önemli bir biyolojik büyüme faktörüdür. Bu fonksiyonu ile G-CSF kök hücre transplantasyonunda HKH'lerin toplanmasına aracılık eder (6,10-11,37,48).

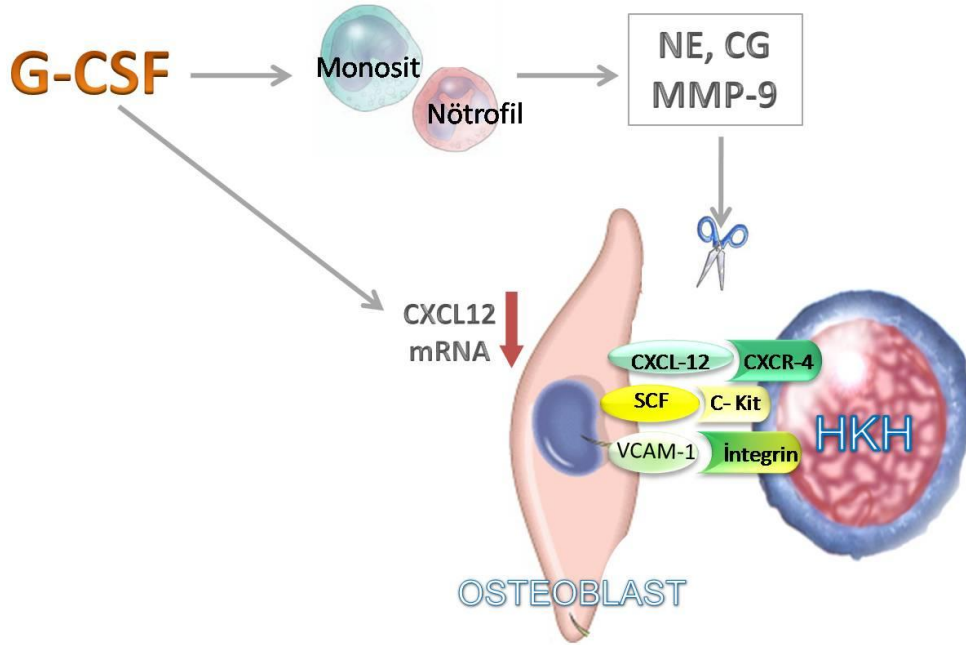
G-CSF Kullanılarak Hematopoetik Kök Hücre Mobilizasyonu

Kök hücrelerin mobilizasyonu sırasında kemik iliğinde kemokinler, sitokinler, proteazlar ve adezyon molekülleri arasında iletişimlerin gerçekleştiği biyolojik olarak oldukça karmaşık bir mikroçevre ortamı oluşur. G-CSF ile mobilizasyonun mekanizması günümüzde tam olarak bilinmese de genetik mühendislik ürünü fare modellerinin yardımıyla bu konuda önemli bilgilere ulaşılmıştır (65).

Deneyisel fare modellerinde, G-CSF'in HKH/HPH'ler üzerindeki moleküllere indirekt olarak etki ettiği ve G-CSF reseptör bağımlı sinyallerin trans-aktivasyonla mobilizasyonu sağladığı belirlenmiştir. Önerilen G-CSF aracılı mobilizasyon modeli ilk basamak olarak G-CSF etkisiyle olgun hematopoetik hücrelerin baskın olarak nötrofiller sonrasında monositlerin aktivasyonunu; ikinci basamakta ise aktive olmuş hücrelerden HKH/HPH'lerin mobilizasyonunu sağlayacak ikincil sinyallerin

oluşumunu kapsamaktadır. Kemik iliğinde oluşturulan ikincil sinyallerden mobilizasyonda en etkin olanları; proteazların salınımı ve kemik iliğindeki CXCL12'nin düzenlemesidir (12,63-64,66-69).

G-CSF ile çoğalan ve aktive olan nötrofillerden kemik iliği stromasına yüksek miktarda aktif formda salınan proteazlar arasında; nötrofil elastaz (NE), kathepsin G (CG) ve MMP-9 sayılabilir. Salınan proteazlar HKH/HPH'leri kemik iliği nişlerinde tutmakta görevli adezyon ve kemokatraktan moleküllerinden; VCAM-1, CXCL12, CXCR4 ve c-kit ligandı keserler (Şekil 2.4). Bunun dışında HKH ve HPH'ler üzerinde eksprese edilen membran bağımlı serin proteaz CD26 da CXCL12'yi proteolitik degradesyona uğratarak inaktive eder (12,64,67-70). Bunlara paralel olarak G-CSF uygulamasıyla kemik iliğindeki serin proteaz inhibitörleri serpin ve serpin3 miktarlarında düşme gözlenir (63-64,67,69). Bunlara rağmen; MMP-9, NE ve CG veya hematopoetik serin proteazların fonksiyonel aktivasyonundan sorumlu dipeptidilpeptidaz1 nakavt farelerde G-CSF aracılı mobilizasyonun normal olduğu, mobilizasyon için VCAM-1 kesimine gerek olmadığı, CXCL12 ve CXCR4 proteinlerinin azalmasında NE ve CG'in sorumlu olmadığı ortaya çıkmıştır (63-64,68-71). CD26 nakavt farede ise HKH mobilizasyonun %50-80 arasında azaldığı gösterilmiştir (12,63,70-71). Bulgular G-CSF aracılı mobilizasyondaki biyolojik sürecin temelinde proteolitik dengeden başka, farklı mekanizmaların da görev aldığını düşündürmektedir.



Şekil 2.4. G-CSF kullanılarak hematopoetik kök hücre mobilizasyonu. (Nervi ve ark., 2006'dan uyarlanmıştır (70).)

Kök hücre mobilizasyonunda proteolitik olmayan mekanizmalar da rol almaktadır. G-CSF uygulaması ile kemik iliğindeki CXCL12 mRNA düzeyinin büyük ölçüde azaldığı bulunmuştur (Bkz. Şekil 2.4). G-CSF'in ana CXCL12 kaynağı olan osteoblastların sayısını ve aktivitesini baskılaması, bu süreçte neden olabilecek potansiyel mekanizma olarak öngörülmektedir (63,67,70) Ayrıca G-CSF, osteoklastların aktivitesini artırarak yüksek düzeyde kemik rezorpsiyonuna neden olmaktadır (64,67)

Mobilize olmuş HKH/HPH'lerin fenotipi kemik iliğinde yer alan HKH/HPH'lerden farklıdır. Kemik iliğindeki HKH/HPH'ler G-CSF uyarımı sonucunda hızlıca dolaşıma girerlerken dolaşımdaki HKH/HPH'ler hücre siklusunun G₀ veya G₁ fazında bulunurlar. Bunun nedeni HKH/HPH'lerin yalnızca mitozu tamamladıktan ve M fazından sonra mobilize olmalarıdır. Ayrıca dolaşımdaki HKH/HPH'ler

yüzeylerinde VLA-4 integrin ve c-kit ligandını çok düşük düzeyde eksprese etmeleri ile ayrılırlar (66,68,70,72).

2.4 Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör ve Biyolojik Etkileri

2.4.1 Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör (G-CSF)

Granülosit koloni stimüle edici faktör, hematopoezi ve doğal immün sistemi düzenleyici temel hematopoetik büyüme faktörüdür. Kemik iliğindeki nötrofil progenitörlerinin gelişimini özgül olarak uyarma yeteneğine sahiptir (9,19,66,73).

Sitokin sınıf I süperailesi üyesi olan G-CSF, 4 antiparalel α -heliks yapısı ile karakterize edilir. G-CSF proteini Thr-133 pozisyonundan O-bağımlı glikozilasyona uğramış haldedir. Bu hidrofilik O-bağımlı şeker zinciri nötral Ph'da proteinin stabilitesini sağlayarak degradasyona uğramasını engeller ancak biyolojik aktivitesi için gerekli değildir (8,14,74).

Sağlıklı kişilerde fizyolojik koşullar altında G-CSF serum düzeyi ölçülemeyecek kadar azdır (9,15,66,75-76). Enfeksiyon durumunda ise G-CSF serum düzeyi yüksek düzeylere ulaşır ve iyileşmeye paralel olarak azalır (9,15,66,77). G-CSF, makrofaj, fibroblast, endotelyal hücre, monosit ve kemik iliği stromal hücrelerinden sentezlenir(19). İnflamatuvar uyarılar IL-1, IL-6, lipopolisakkarit (LPS), tümör nekroz faktör- α (TNF- α) ve özellikle IL-17 bu hücrelerden G-CSF üretimini uyarırlar (9,66,78).

1986 yılında insan G-CSF cDNA'sının klonlanması, rekombinant G-CSF proteininin üretimini sağlamıştır ve G-CSF'in biyolojik özellikleri tanımlanmıştır (79).

2.4.2 G-CSF' in Hematolojik Etkileri

G-CSF, istirahat fazında kandaki nötrofil miktarının sürdürülmesi için gereken sinyalleri sağlar, hematopoetik kök hücreden miyelosite kadar tüm granülosit hücre dizisinin proliferasyonunu ve yaşamlarını kontrol eder (14,16,21). Ayrıca G-CSF,

nötrofil seriye farklılaşmayı sağlar, nötrofillerin olgunlaşmasını hızlandırır. Nötrofillerin; süperoksit anyon üretimi, antikor bağımlı hücrel sitotoksitesi, fagositoz ve bakterisidal öldürme gibi efektör fonksiyonları G-CSF'in etkisiyle artar (14-15,19,21,66,80).

In vivo deneylerde G-CSF veya G-CSF reseptör defektif farelerde kandaki nötrofil düzeylerinin %15-30 arasına düşüşü ile nötropeni oluşumu gözlenmiştir. Bu farelerde kemik iliği miyeloid progenitör hücre sayıları da önemli ölçüde azalmıştır. Bununla beraber G-CSF veya G-CSF reseptör defektif farelerde enfeksiyon sonrasında G-CSF'in yalnızca durgun fazda değil bakteriyel enfeksiyonlara karşı gereken acil granülopoez sırasında da etkili olduğu kanıtlanmıştır (19,81-82).

2.4.3 G-CSF' in İmmünolojik Etkileri

G-CSF, T hücre reaktivitesini, antijen sunan hücrelerin fonksiyonlarını ve sitokin yanıtlarını değiştirerek immün sistemi düzenleyici rol oynamaktadır.

G-CSF, yardımcı T hücrelerin tip 2 yönüne (Th2) polarizasyonuna neden olmakta ve T hücre toleransını indüklemektedir (15,66,83-85). Hücrel immün yanıtta etkin rol alan dendritik hücreler (*dendritic cell*, DC), naif T hücreleri Tip 1 veya Tip 2 yönüne farklılaştırmalarına göre DC1 veya DC2 olarak tanımlanırlar. Yapılan deneylerde G-CSF'e maruz kalma sonucunda periferik kandaki DC2 miktarı artarken, DC1 miktarının değişmediği gösterilmiştir (15,66,80,85-87).

G-CSF lökositlerden ve özellikle monositlerden salınan sitokinleri modifiye ederek inflamatuvar yanıtta da etkisini gösterir. Özellikle pro-inflamatuvar sitokinlerden IL-1 β , IL-12, IFN- γ , IL-18 ve TNF- α sentezini azaltarak sitokin dengesinin anti-inflamatuvar yöne kaymasına neden olur (15,80,83,88).

2.4.4 Klinikte Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktörün Kullanımı ve Önemi

Rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen birçok farmösitik G-CSF ürününün insanlarda kullanımı onaylanmıştır. Ticari formdaki G-CSF preparasyonları:

Filgrastim (Neupogen), Lenograstim (Granocyte), Pegfilgrastim (Neulasta) olarak isimlendirilmektedir.

Kemoterapi sonucu gelişen nötropenilerde, ağır konjenital nötropenili veya kronik nötropenili hastalarda G-CSF kullanımı, nötrofil sayısının arttırmakta, enfeksiyonları, hastanede yatırılma gereksinimini ve antibiyotik kullanımını %50 oranında azaltmaktadır (14,74,84,89). G-CSF akut miyeloid lösemi, miyelodisplastik sendrom ve aplastik anemi tanısı konulan hastalarda uygulanmaktadır (90).

Bunların dışında G-CSF malign ve malign olmayan hematolojik hastalıklarda hematopoetik kök ve progenitör hücrelerin, transplantasyon amaçlı mobilizasyonunda yaygın olarak kullanılır (14,68,74,85,91).

Hematopoetik Kök Hücre Transplantasyonu

Kök hücre transplantasyonunun temel prensibi; kanser tedavisi sırasında yüksek doz kemoterapi ve/veya iyonize radyasyonla boşalan kemik iliğini, otolog veya allojenik hematopoetik kök hücrelerle yenileyerek, hematopoezi yeniden canlandırmaktır. Çoğunlukla hematolojik malignansiler için kullanılan bu işlem tedaviye yanıt oranını yükseltmekte ve yaşam süresine olumlu etki etmektedir (92-93).

Kök hücre transplantasyonu (KHT) yapılacak adaylarda hastalığın türü, şiddeti, hastanın aldığı kemoterapi sayısı, önceki tedavilere yanıtı, yaşı, psikolojik durumu ve cinsiyeti göz önüne alınmaktadır (12,94). Kök hücre transplantasyonu, kök hücrenin kaynağına göre; kemik iliğinden, periferik kandan veya kordon kanından yapılabilir. Kök hücre nakli; kök hücre kaynağına göre otolog, allojenik (akraba veya akraba dışı) veya sinjenik olarak uygulanabilmektedir (93).

1990'ların başlarında kök hücre kaynağı olarak periferik kan kök hücreleri, anestezi gerektirmemesi, transplantasyonu takiben kısa süreli sitopeni, daha hızlı hematopoetik ve immünolojik düzelme, hastanede kalım ve morbidite oranının

daha az olması gibi avantajları nedeniyle kemik iliğinin yerini almaya başlamıştır (12-13,92,94-95).

Periferik kandan otolog ve allojenik kök hücre transplantasyon işlemi genel olarak birbirine benzerlik gösterir (13,93). İlk basamak kök hücrelerin periferik kandan toplanmasıdır. Öncelikle kök hücrelerin kemik iliğindeki yerlerinden ayrılarak periferik kana geçmeleri diğer bir deyimle “mobilizasyonları” gerekir. Mobilizasyon için periferik kandaki kök hücrelerin artışı sağlayan ilaç (koloni uyarıcı faktör veya kemokin) subkutan yolla hastaya enjekte edilir (13,67,92,95-96). Kemik iliğinden, periferik kana yeterli miktarda kök hücre mobilize edildikten sonra bu hücreler (kök hücrelerce zengin lökosit bileşenleri) aferez işlemi ile kandan rahatlıkla toplanır (13,92-93,96). Yeterli miktarda kök hücre toplanabilmesi için aferez işleminin 1-3 kez tekrarlanması gerekebilir (12-13,92,96-97). Bu işlemin süresi ve tekrar sayısı kişisel farklılıklara, uygulanan tedavi rejimine, sonuçta elde edilen ve kilogram (kg) başına hesap edilen toplam $CD34^+$ hücre miktarına göre değişir (13,96). Toplanan kök hücreler kullanılacakları zamana kadar sıvı azot sistemi ile (kriyoprezervasyon) saklanırlar (93,96). Aferez işleminden sonra hastalar yüksek doz kemoterapi alırlar, kemoterapiden bir kaç gün sonra daha önceden toplanan kök hücreler hastanın dolaşımına periferik kandan infüzyonla verilir. Nakledilen kök hücreler kan dolaşımından sonra kemik iliğine göç ederek yerleşirler(*homing*). İnfüzyonu takiben 12-15 gün içinde hastanın normal hematopoezi başlar ve ilk önce nötrofiller daha sonra trombositler periferik kana çıkarlar (13,93).

Kök Hücre Nakli programlarında nakil için toplam $CD34^+$ hematopoetik kök hücreler hedef sayı olarak seçilir (12-13,92,95,98). Kabul edilebilir periferik kan öncül hücre (*periferal blood progenitor cell (PBPC)*) nakli en az $2.0-2.5 \times 10^6/\text{kg}$ $CD34^+$ hücre içermelidir. $CD34^+$ hücre sayısı; $\geq 4 \times 10^6/\text{kg}$ olduğunda granülosit ve trombositler tamamen yenilenir, $1.0-2.0 \times 10^6/\text{kg}$ olduğunda nötrofil engraftmanı olurken trombosit yenilenmesi daha nadir ve geç gerçekleşir. $CD34^+$ hücre sayısı $< 0.75 \times 10^6/\text{kg}$ olan hastalarda ise hücre yenilenmesinin ve hematopoezin başlaması gerçekleşmeyebilir (12-13,63,97).

Günümüzde transplantasyon öncesinde mobilizasyon amacıyla kullanılan büyüme faktörleri arasında "granülosit koloni-stimüle edici faktör" en etkin ajandır. G-CSF ile kök hücrelerin toplanması yaklaşık bir hafta sürer. Normal koşullarda; G-CSF'in 10µg/kg/gün dozda sub-kutan uygulanmasının 4-6 günde periferik kandaki CD34⁺ hücre/mm³ miktarını 30 kat (10-100kat arasında) artırdığı tespit edilmiştir (12-13,63-64,99). Buna rağmen G-CSF ile mobilizasyon her zaman başarı ile sonuçlanmayabilir. Bireylerin %1-5'i G-CSF uygulamasına hiç yanıt vermeyebilir veya çok zayıf yanıt verirler (67). Sağlıklı donörlerin %5-10'unda, otolog transplantasyon hastalarının ise %40'a kadar çıkan kısmında yeterli miktarda CD34⁺ hücre mobilizasyonu başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Bazı kaynaklarda lenfoma, multipl miyelom, akut lösemi hastalarının %25'inin, yüksek dozda kemoterapi veya radyasyon tedavisi almış hastaların %60'ının mobilizasyona zayıf yanıt verdiği belirtilmektedir (63,67,96-97,99).

2.5 Granülosit Koloni Stimüle Edici Faktör Reseptörü (G-CSF-R)

2.5.1 G-CSF-R'ın Hücrelerdeki Ekspresyonu

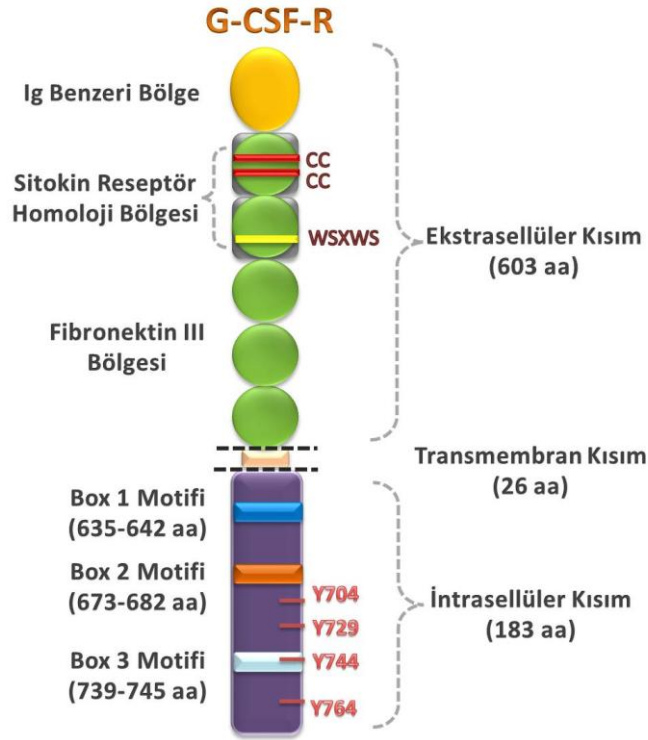
G-CSF reseptörü (G-CSF-R) birçok hematopoetik hücrede, miyeloid progenitör hücrelerde, olgun nötrofillerde, monositlerde, miyeloid ve lösemik lenfoid hücrelerde, B ve T lenfositlerinde, trombositlerde, hematopoetik olmayan hücrelerden özellikle kardiyomiyositlerde, nöronal progenitör hücrelerde ve vasküler endotel hücrelerde bulunur (14-17,19-20).

Reseptör ekspresyonu hücre maturasyonuna bağlı olarak artmakta ve olgun nötrofillerin yüzeylerinde en yüksek düzeye ulaşmaktadır. Buna rağmen nötrofiller hücre başına yaklaşık 50-1000 adet olacak şekilde düşük düzeyde G-CSF-R eksprese ederler. Ancak, çok az miktarda (3pmol/L) G-CSF ligand bağlantısı bile yüksek düzeyde biyolojik yanıt için yeterlidir (14-17,100-102).

2.5.2 G-CSF-R ve Moleküler Yapısı

G-CSF reseptörü “sitokin/ hematopoetin reseptör” süperaillesinin üyeleri arasında yer alır. İlgili proteini kodlayan gen 1. kromozomun kısa kolunda (1p32-35’de) yerleşmiştir. İnsan G-CSF reseptör geni 17 ekzon içerir ve her bir haploid genomda tek kopya olarak bulunur. G-CSF-R 100-150 kDA molekül ağırlığında, tek transmembran polipeptit yapısında olup 812-813 amino asit (aa) içerir. Ekstrasellüler bölgesi yaklaşık olarak 603 aa, transmembran bölgesi 26 aa, sitoplazmik bölgesi ise 183 aa’dan oluşmaktadır (16-17,20,100-101,103).

Ekstrasellüler kısım, N-terminalinde yaklaşık 100 aa’lık bir immünoglobulin (Ig) benzeri kısmı, devamında yaklaşık 200 aa’lık bir sitokin reseptör homoloji bölgesi (*Cytokine receptor homology*, CRH) içerir. CRH bölgesi iki adet fibronektin tip III (FNIII) benzeri kısımdan oluşur. N-terminal bölgesindeki ilk FN III kısmı korunmuş dört adet sistein rezidüsü taşıırken C-terminal bölgesindeki ikinci FN III kısmı “*trp-ser-xaa-trp-ser*” sekansına sahip WSXWS motifi taşır. G-CSF-R taşıdığı bu bölge ile sitokin reseptör ailesinin (büyüme hormon reseptörleri, eritropoetin reseptörü, trombopoetin reseptörü gibi) diğer üyeleri ile benzerlik gösterir. CRH bölgesi devamında üç adet “FN tip III kısım” ardışık olarak düzenlenmiştir (14,16-17,21,100,104). Diğer sitokin reseptör ailesi üyeleri ile sınırlı düzeyde homoloji gösteren intrasellüler kısım, membranın proksimalinde box1, box 2 korunmuş motifleri, membranın distal bölgesinde ise daha az korunmuş box3 motifini içerir. Prolin’den zengin Box1 bölgesi korunmuş “P-X-P motifi” taşır. Hidrofobik aa grubunu kapsayan Box2’yi asidik ve pozitif yüklü aa’ler takip eder. Ayrıca tüm box1/box2 bölgesi arası, sinyal transdüksiyonunda görev alan korunmuş bir triptofan (W650) rezidüsüdür. G-CSF-R’ın distal sitoplazmik bölgesinde 4 korunmuş tirozin yer alır. Bu tirozinler 704, 729, 744 ve 764’üncü pozisyondadırlar (14,17,20,100). G-CSF-R üzerindeki bu bölgeler birbirinden farklı fonksiyonlarda görev alırlar (Şekil 2.5).

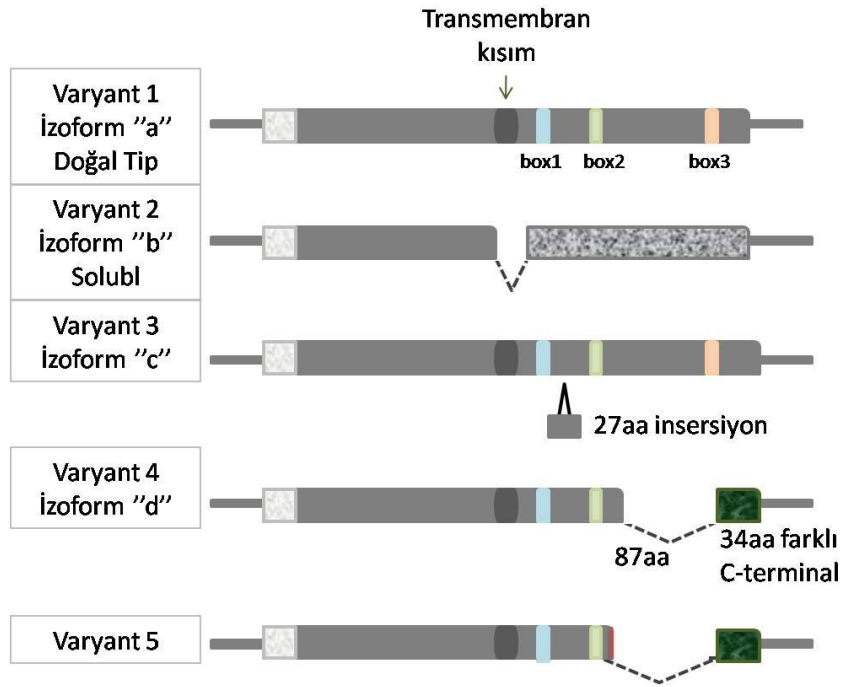


Şekil 2.5. İnsan G-CSF-R proteini ve ilgili bölgeleri.

İnsan genomu G-CSF-R için tek bir gen bölgesi içermektedir ve tek bir öncül RNA'dan alternatif kesilmeyle toplamda 5 farklı mRNA izoformu oluşturulur. Bu izoformların ekstrasellüler bölgeleri kodlayan sekansları özdeş olup, transmembran ve intasellüler bölgeleri kodlayan sekansları birbirlerinden ayrılır ve değişen boyutlarda protein kodlarlar. Doğal tip G-CSF-R (varyant 1); 183 aa uzunluğunda sitoplazmik bölgesi ile baskın form "*izoform a*"yı oluşturur (14,17,20-21,103). "*İzoform a*" olgun nötrofillerde, Ki hücrelerinde, plasentada, HL-60 ve U937 monositik lösemi hücrelerinde eksprese edilir. Varyant 2; varyant 1'e göre transmembran bölgeye denk gelen alternatif ekzonu (88 baz çifti) içermemesi sonucu *soluble* form olan "*izoform b*"yi oluşturur. Bu form U937 lösemik hücrelerde yüksek düzeyde eksprese olur. Varyant 3; alternatif çerçeve içi kırılma bölümü (81baz çifti) vardır, box1 ve box2 bölgeleri arasında içerdiği 27 aa insersiyon ile en uzun form olan "*izoform c*"yi oluşturur. HL-60 hücrelerinde ve plasentada ekspresyonu yüksektir. Varyant 4; varyant 1'e göre C-terminal uçta 87 aa'den

yoksun ve 34 aa farklı C-terminaline sahip izoform d'yi oluşturur. Varyant 5; varyant 4 ile özdeş C-terminali içermesine ek olarak box2 motifinin distalinden kısalmıştır. Varyant 4 ve 5, varyant 1'e göre çok düşük düzeyde granülositlerde eksprese edilirler. Ayrıca varyant 4 plasentada da eksprese edilir (Şekil 2.6)(17,103,105). Birbirinden farklı G-CSF-R izoformlarının fizyolojik rolleri ve ekspresyon düzenlemeleri bilinmemektedir. Ancak Kİ progenitörlerinde bu izoformların doğal tipe göre çok düşük düzeyde eksprese edilmeleri miyelopoezdeki rollerinin minimal düzeyde olduğunu düşündürürken, farklı varyantların ekspresyonundaki aberasyonların miyelopoetik hastalıkların patolojisinde rol oynadığını göstermektedir (14,17,21).

Yapılan deneylerde; farmakolojik dozda G-CSF kullanımının bireylerde önceden var olan monozomi 7 hücrelerinin artışına sebep olduğu bulunmuştur. Monozomi 7 taşıyan bireylerde G-CSF-R varyant 4 mRNA izoformunun ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Monozomi 7'li CD34 hücrelerinde JAK/STAT aracılı sinyal iletimi olağan dışı olup proliferasyona yatkınlık gösterir(84,106). Yeni bir çalışmada; G-CSF uygulaması sonrasında lösemik blastlarda 'farklılaşma defektif' varyant 4 G-CSF-R'in ekspresyonundaki artışın, çocukluk çağındaki AML'de rölaps insidansının artışı ile ilişkili olduğu bulunmuştur (107).



Şekil 2.6. Alternatif kesimle oluşan 5 farklı insan G-CSF-R varyantı (Avalos, 1996'dan uyarlanmıştır (17))

2.5.3 G-CSF-R Bölgelerinin Rolü

G-CSF-R aktivasyonu ve sinyal iletiminin başlayabilmesi için öncelikle ligandı G-CSF ile bağlanması gerekir. Kristalografik çalışmalar G-CSF ve G-CSF-R'ın birbirlerine çapraz bağlı 2:2 tetramerik kompleks yapı oluşturarak bağlandıklarını ortaya koymuştur. Ligand bir bölgesiyle reseptör monomerinin CRH bölgesine, başka bir bölgesiyle de ikinci reseptör monomerinin Ig benzeri kısmına bağlanır. Bu konfigürasyon IL-6/gp130 kompleksine benzerlik gösterir(14,18-19,108-109). Yapısını korumak için sistein rezidülerine ve WSXWS sekansına ihtiyaç duyan CRH bölgesi düşük afinite ile G-CSF ligandına bağlanır (18,104). Ig bölgesi ise liganda yüksek afiniteyle bağlanır ve reseptör dimerizasyonunda etkilidir. Bu bölgenin delesyonu sonucu bağlanma afinitesi %20 kaybolurken hücrenin proliferasyon yanıtı azalır (18,104,108). Reseptörün ekstrasellüler kısmındaki ardışık FNIII bölgelerinin fonksiyonu tam olarak bilinmese de aktif, kararlı reseptör kompleks oluşumunda

etkili oldukları düşünülmektedir. FNIII bölgelerinin delesyonu sinyal kapasitesinin azalmasına neden olmaktadır. Bu etkisini; reseptörün intrasellüler kısmının dimerizasyonu sırasında, sinyal iletimi için doğru oryantasyonu sağlayarak gösterdiği tahmin edilmektedir (14,104,108).

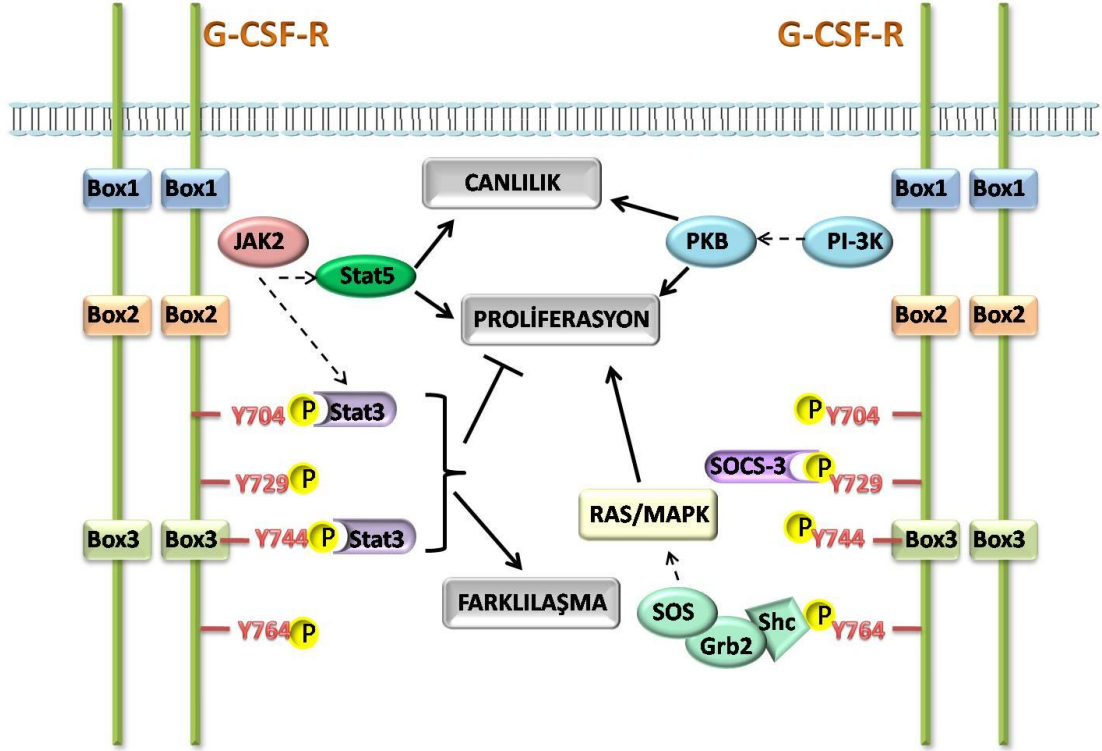
G-CSF-R intrasellüler kısmı box1 ve box2'yi içeren "*membran proksimal*", box3'ü içeren "*membran distal*" bölge olarak ikiye ayrılabilir. Miyeloid hücre serilerinde ve olgun nötrofillerde membran proksimal bölge mitojenik sinyallerden, distal bölge ise farklılaşma, canlılık, hücre olgunlaşması, proliferasyonun inhibisyonu ve Ig bağımlı fagositoz sinyallerinden sorumludur (14,21,110-111). Ayrıca box1 bölgesindeki P-X-P motifi mitojenik sinyallerle ve box2 bölgesi proliferatif sinyallerle, box3 bölgesi de maturasyon indüksiyonu ile direk olarak bağlantılıdır (17,100).

2.5.4 G-CSF-R ve Sinyal İletimi

Diğer sitokin reseptörleri gibi G-CSF-R da intrinsik tirozin kinazlardan yoksun olup sinyal iletimini birçok sitoplazmik tirozin kinaz aktivasyonu ile gerçekleştirir (20,112). G-CSF stimülasyonu reseptörün intrasellüler kısmındaki tirozinlerin (Y704, Y729, Y744, Y764) fosforilasyonuna sebep olur. G-CSF-R'daki bu fosfotirozinler, Src homoloji 2 (SH2) bölgesi içeren sinyal protein molekülleri için (STAT3, Shc, Grb2 gibi) potansiyel bağlanma bölgesi oluştururlar (17,19,100,110,113).

G-CSF-R'daki farklı fonksiyonel bölgeler, farklı biyolojik yanıtların gerçekleşmesini sağlayan çoklu sinyal yollarının varlığını göstermektedir. Sitokin reseptörlerinde JAK/STAT yolağı birincil sinyal mekanizmasıdır. G-CSF-R birden çok JAK kinazı; JAK1, JAK2, Tyk2, STAT1, STAT3, STAT5 aktive edebilir (14,17,19-20,112). Yüksek miktarda aktive edilen STAT3'ün majör bağlanma bölgeleri Y704 ve Y744'tür. STAT3 hücre siklusundan çıkış, farklılaşma ve miyeloid progenitörlerin proliferasyonunda rol alır. STAT5 aktivasyonu ise proliferasyon ve yaşam sinyallerini sağlar. G-CSF-R geni yaşam ve proliferasyondan sorumlu p21Ras/MAP kinaz ve PI3K/PKB sinyal yollarının aktivasyonunu da sağlayabilir. MAP kinaz yolağı bu

etkisini fosforile Y764'e Shc ve Grb2 moleküllerinin bağlanmasıyla gerçekleştirir (Şekil 2.7)(14,17,19-20,100,110,113-115).



Şekil 2.7. Özgül hücresel yanıtlara neden olan doğal tip G-CSF-R'ın sinyal yolları
(Van de Geijn ve ark.,2003'ten uyarlanmıştır (21).)

Sitokin yanıtları; sinyal moleküllerinin fosfatazlarla defosforilasyonu, reseptör endositozu, proteozomal hedefleme ile inhibe edilir. SH2 içeren protein tirozin fosfataz (SHP-1) proliferasyon ve farklılaşmayı baskılar. SH2 içeren inositol fosfataz (SHIP) PI3K/PKB bağımlı büyüme ve yaşamın negatif düzenleyicisidir. STAT'ların transkripsiyonel kontrolü altında olan sitokin sinyal supresörlerinden (SOCS); SOCS1 JAK kinazlara, SOCS3 fosforile Y729 bağlanarak sinyal inhibisyonunu sağlar. Bunlardan farklı olarak G-CSF-R C-terminalinde aa 749-755 ve aa 756-759 reseptör internalizasyonunda rol alır ve reseptörü endositoza yönlendirir (14,17,19-

20,100). Böylece sinyal iletimiyle meydana gelen fonksiyonlar arasında belirli bir denge kurulmuş olur.

2.5.5 Miyeloid Hastalıklarda G-CSF-R ve JAK2 Defektleri

G-CSF-R geninde bulunabilen nadir polimorfizmler ve birkaç mutasyon miyeloid hücrelerinde bozukluk ve dengesizlik gösteren; sıklıkla ağır konjenital nötropeni (*Severe congenital neutropenia*, SCN), akut miyeloid lösemi (*Acute myeloid leukemia*, AML), miyelodisplastik sendrom (*Myelodysplastic syndrome*, MDS) hastalarında rapor edilmiştir. Bu değişimler sinyal fonksiyonlarını bozarak, belli bazı hastalıklara yatkınlığa sebep olabilmektedir (14,20-21).

Özellikle SCN hastalarında G-CSF-R mutasyonları tespit edilmiştir. Bu mutasyonlar arasından G-CSF-R'in C-terminalinde 82-98 aa kısaltmaya sebep olan, translasyon sırasında "STOP" kodonu oluşturan, *non-sense* mutasyonlar ile sıklıkla karşılaşılır (Şekil 2.8). SCN hastalarının %20'sinde bulunan kısaltmış reseptör miyeloid hücre serilerinde eksprese olduğunda hiperproliferasyon ve yaşam sinyallerini sağlarken maturasyon indüksiyonu gerçekleştiremez (14,17,21,111-112,116). Bununla birlikte kısaltmış G-CSF-R mutasyonunu taşıyan SCN hastaları MDS ve AML geliştirmeye yatkınlık gösterirler. Bu progresyon sürecinde SCN hastalarındaki G-CSF-R mutasyonu taşıyan klonlar %80'e erişir ve G-CSF-R kısaltmalarının pre-lösemik klon gelişiminde önemli bir basamak olduğunu ortaya koymaktadır. Yapılan yeni çalışmalar kısaltmış G-CSF-R eksprese eden Kİ hücrelerinde G-CSF indüklü reaktif oksijen türlerinin arttığını göstermiştir. Bu özellik sonucu artan DNA hasarı, genotoksik stres, mutasyon oranı ile gelişen sekonder lösemiler ilişkilendirilmiştir (14,21,100,112,114). SCN hastalarında G-CSF-R mutasyonu ile hastanın yaşı, G-CSF dozu ve süresi, MDS/AML gelişimi arasında bir ilişki bulunmamıştır (20-21).

SCN hastalarının yaklaşık %10'u G-CSF tedavisine yanıt vermemektedir. Bu yanıtsızlığın birkaçında G-CSF-R'in ekstrasellüler kısmına denk gelen mutasyonların sorumlu olduğu görülmüştür (112). Bu mutasyonlardan ilki G-CSF-R'in CRH bölgesindeki proline zengin menteşe motifinin bir parçası olan korunmuş prolinin

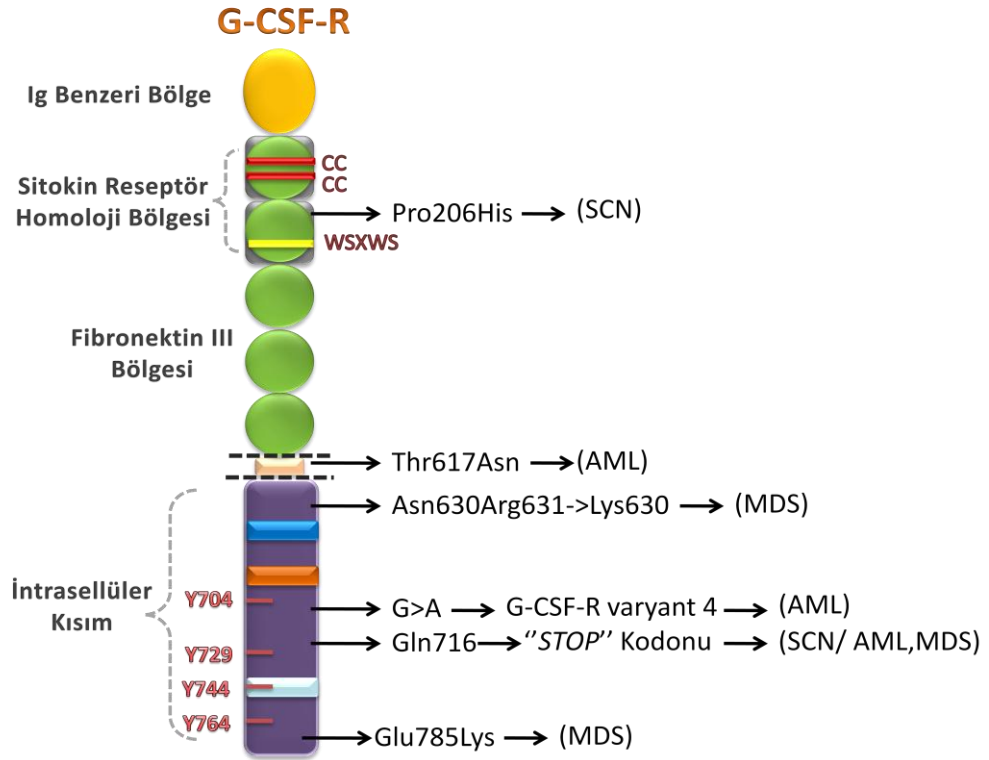
histidine (Pro206His) dönüşümüne sebep olur (Bkz. Şekil 2.8)(14,21,112,115). Miyeloid hücrelerde eksprese olan mutant G-CSF-R, G-CSF bağımlı proliferasyon ve canlılığı sağlayamaz. Bu reseptör kompleksinin aktivasyonunun bozulmasıyla bağıntılıdır. Mutant G-CSF-R normal ligand bağlanması göstermesine rağmen reseptör başına düşen ligand bağlanma bölgeleri azalmış, ligand-reseptör mimarisi değişikliğe uğramıştır (14,21,100,112,115). Diğer mutasyonlar sırasıyla; $\Delta 322$, G-CSF-R geninde WSXWS motifi ile başlayan bölgeden 182 baz çiftlik (bç) (*base pair*, bp) delesyona sebep olur ve doğal tip G-CSF-R yanıtını baskılar. $\Delta 319$, bir öncekine benzer olup 191 bç'lik delesyon taşır, doğal tip G-CSF-R ile heterodimerize olarak sinyal fonksiyonlarını etkiler. Kronik idiopatik nötropeni hastalarında karşılaşılan diğer bir mutasyon ise FNIII bölgelerinin ardından reseptör kısalmasına sebep olur ve ligand varlığında sinyal oluşturmaz (112).

G-CSF-R'in transmembran bölgesine denk gelen (Thr617Asn) ligand bağımsız reseptör aktivasyonuna sebep olan nokta mutasyon 2/555 *de novo* AML hastasında tanımlanmıştır (Bkz. Şekil 2.8)(14,21,100,112). Ayrıca AML hastalarının 70'te birinde görülen bir mutasyon (G>A) lösemik blast hücrelerinde fonksiyonel olmayan, "farklılaşma defektif" G-CSF-R varyant 4'ün ekspresyon artışına neden olur (117). Bu örnek tek olmasına rağmen değişmiş varyant 1(doğal tip)/varyant 4 G-CSF-R oranları %50'den fazla AML hastasında rapor edilmiştir (14,17,20,100,112).

MDS hastalarında bulunan 3 nükleotidin delesyonuna ve değişimine neden olan mutasyon (Asn630Arg631->Lys630) sinyal yolağının uzun süreli aktivasyonuna sebep olur (Bkz. Şekil 2.8) (112).

Popülasyon un %6'sında rastlanan G-CSF-R'in intrasellüler bölgesine denk gelen tek nükleotid polimorfizm (*single nucleotide polymorphism*, SNP) Glu785Lys, yüksek riskli MDS gelişimi ile anlamlı korelasyon göstermektedir (Bkz. Şekil 2.8). Yapılan deneyde yüksek riskli MDS hastalarında heterozigot Glu785Lys genotipinin 10 kat daha fazla sıklıkta bulunduğu gösterilmiştir (23). G-CSF-R C- terminalinin distal kısmına denk gelen bu polimorfizmin sinyal iletimine veya reseptör internalizasyonuna etkisi daha önceden bahsedilmemiştir. Yapılan fare deneylerinde; SNP'in G-CSF uyarımı sonrasında birincil hematopoetik progenitör

hücrelerde proliferasyon sinyallerini ve koloni oluşumunu azalttığı bulunmuştur (14,23,112). Bu bulgulara karşın; daha fazla sayıda, yaş ortalaması daha düşük hastayla yapılan deney sonucunda polimorfizm sıklığının önceden belirtilenene göre çok düşük olduğu ve polimorfizmin biyolojik bir aktivitesinin olamayacağı savunulmuştur (118).



Şekil 2.8. Miyeloid hastalıklarda tespit edilen G-CSF-R mutasyonları ve polimorfizmi.

Pro: Prolin, His: Histidin, Thr: Treonin, Asn: Asparajin, Arg: Arjinin, Lys: Lizin, Gln: Glutamin, Glu: Glutamik asit. (Touw ve ark., 2007'den uyarlanmıştır (14).)

Önceden anlatılan kazanılmış mutasyonlara ek olarak 2009 yılında kronik nötropenili ailenin G-CSF-R geninde otozomal nokta mutasyonu tanımlanmıştır. Thr617Asn mutasyonu G-CSF-R dimerizasyonuna neden olarak reseptörün konstitütif aktivasyonunu destekler. Proliferasyon ve farklılaşma için G-CSF'e karşı

gelişen hipersensitivite, kronik nötrofili ile sonuçlanır. Aslen bu mutasyon, 2 AML hastasında tanımlanmış aktifleştirici mutasyonla aynıdır (119).

JAK2, sitokin reseptörlerindeki sinyal iletiminin aşağıya akımında aracı bir proteindir. Hematopoetik hücrelerde antiapoptotik sinyalleri yürüten sitoplazmik protein tirozin kinaz JAK2 iki homolog kinaz bölgesiyle; fonksiyonel JAK homoloji 1 (JH1), katalitik kinaz aktivitesinden yoksun JH2 karakterize edilir. Birçok düzenleyici rolü olan JH2 bölgesi ligand yokluğunda JH2/JH1 bağlantısıyla otoinhibitör özellik gösterir. Bu bölgede ortaya çıkabilecek bir değişim otoinhibisyonun bozulmasına sebep olur. Polisitemi vera (*polycythemia vera*, PV), essensiyel trombositemi (*essential thrombocythemia*, ET) , miyelofibrozis (*myelofibrosis*, MF) hastalarında yüksek oranda, diğer miyeloproliferatif hastalıklı (*myeloproliferative disorder*, MPD) bireylerde düşük oranda kazanılmış JAK2 mutasyonu bulunmuştur. Miyeloid hücrelerde görülen G>C somatik mutasyonu Val617Phe değişimiyle sonuçlanır ve JAK2'nin otoinhibitör özelliğini bozar. Mutasyonlu JAK2 kendinden sonraki STAT'ların spontane aktivasyonuna neden olarak ligand yokluğunda transkripsiyona, canlılık ve proliferasyon indüklenmesine sebep olur. Yapılan çalışmalarda PV hastalarının neredeyse hepsinde %95, ET ve MF hastalarının %50'ye yakın kısmında, atipik MPD %20'sinde, MDS ve AML hastalarının %3'ten azında var olan mutasyon yaygın miyeloid lösemi (*common myeloid leukemia*, CML) hastalarında %0'dır. HKH/HPH' lerde bulunan JAK2 V617F mutasyonunun hücrelerin farklılaşma potansiyelini değiştirdiği ve PV'nin HKH hastalığı olduğu açığa çıkmıştır. Ayrıca mutasyonlu PV hastalarında periferel kandaki HKH sayısının arttığı bulunmuştur. Keşfedilen JAK2V617F mutasyonunun biyolojik etkisinin yanısıra miyeloproliferatif hastalıkların tanısal yaklaşımlarına, moleküler patogeneze ve ilaç geliştirme araştırmalarına etkisi yadsınamaz (24,120-122).

2.6. G-CSF-R Tek Nükleotid Polimorfizmleri

2.6.1 Polimorfizm

Genetik polimorfizm bireyler veya popülasyon lar arasında, sıklıkla görülebilen DNA sekans iç farklılıklar, varyasyonlardır (123). Tanım olarak, bir türün, sadece yineleyen mutasyonlar ile sürdürülemeyen en nadir orandaki, birbirinden ayrı iki ya da daha fazla form ya da fazının, aynı habitatta bir arada bulunmasıdır (124). Bu durumda hiçbir alel standart sekans olarak kabul edilememektedir (125). Eğer DNA sekansındaki bir farklılık normalin dışında kalıyor, genellikle dışardan bir ajan etkisi altında oluşuyor ve hastalığa neden oluyor ise “mutasyon” olarak adlandırılır (125-126). Mutasyon ile polimorfizm arasındaki sınır %1’dir. Popülasyon da en az rastlanan alel %1 veya daha yüksek sıklıkta bulunursa polimorfizm olarak tanımlanabilir. Popülasyon da bulunma sıklığı %1’in altında ise bu alel mutasyon olarak kabul edilir (125). Alel her bir genin mutasyonlar sonucunda oluşan alternatif formlarıdır. Genotipi aynı alel oluşturduğunda birey için homozigot, aleller farklı olduğunda ise heterozigot terimi kullanılır (127).

Gen sekansı içerisindeki herhangi bir baz (örneğin Adenin) başka bir baza (örneğin Guanin’e) değişebilir. Değişimin olduğu bu bölge SNP olarak nitelendirilir ve olası iki baz da alel olarak adlandırılır. Örnekteki SNP’ler A>G olarak gösterilir. Bu terminolojiden anlaşılması gereken popülasyon da yaygın olarak bulunan majör alelin “A”, nadir olarak bulunan minör alelin ise “G” olduğudur. Genom içerisindeki polimorfizm tiplerinden en yüksek sıklıkta olan SNP’ler DNA’nın kodlanan ve kodlanmayan bölgelerinde olabilirler (128-131). Kodlanan bölgelerdekiler “*synonymous*” ve “*non-synonymous*” olarak ikiye ayrılırlar ve birbirlerinden farklı etkiler gösterirler. “*Synonymous*” SNP’ler protein düzeyinde aminosit değişimine neden olmazlar. “*Non-synonymous*” SNP’ler ise baz değişimi sonucu kodonda farklı bir amino asit oluşumu ile protein değişimi görülen *missense* SNP’ler ve istenmeyen yerde “*STOP*” kodonu oluşumuna neden olan *nonsense* SNP’ler olarak ikiye ayrılırlar (126,132).

Bazı hastalıklara yatkınlık oluşturabildikleri ve ilaç yanıtları üzerine etkili olabildikleri saptanan SNP'lerin fonksiyonel olduğu ve evrimsel açıdan tahmin edilenden daha da önemli olabilecekleri düşünülmektedir (125,132).

2.6.1 G-CSF-R "*Missense*" Tek Nükleotid Polimorfizmleri

Gerçekleştirilen araştırmamız için yapılan ön çalışmada, NCBI GenBank veri tabanı (22), Wölfler ve ark.'ın (23) çalışmasından yararlanılarak, G-CSF-R'ın kodlanan bölgesi üzerindeki olası *missense* tek nükleotid polimorfizmleri belirlenmiştir. Bu polimorfik bölgeler 1. kromozom (1p32-35'de) genomik DNA dizisinin; 6210428-6210803, 6213468-6213980, 6213891-6214079, 6214121-6214380, 6214763-6215070, 6216362-6216780, 6216991-6217230, 6218091-6218240, 6218321-6218576, 6219301-6219580, 6219661-6220011, 6219661-6219909 numaralı nükleotidleri arasında yer alır. Genomik DNA'da 6210428-6210803, 6213468-6213980, 6219301-6219580 ve 6219661-6220011 numaralı nükleotidler arasındaki bölgeler dizilerinde birden fazla SNP içerirler. Toplam 16 *missense* SNP G-CSF-R mRNA dizisi en uzun izoform olan "*c*" üzerindedir. Hücrelerin yüzeyinde en sık rastlanan predominant "*izoform a*"da 14 *missense* SNP, "*izoform b*"de 11 *missense* SNP ve "*izoform d*"de 12 *missense* SNP vardır. İzoform c üzerindeki 16 *missense* SNP'den 11'i ekstrasellüler kısımdaki Ig benzeri kısımda, sitokin reseptör homoloji bölgesinde, ekstrasellüler kısımda, WSXWS motifinde, FN tip III benzeri kısımda geri kalan 5 SNP ise intrasellüler kısımda Box1-Box2 motifleri arasında, tirozin amino asidinden zengin bölgede ve C-terminalin uç kısmında yer almaktadır. İntrasitoplazmik kısımdaki 2 SNP "*izoform a*"da, 5 SNP "*izoform b*"de, 4 SNP ise "*izoform d*"de bulunmamaktadır (Tablo 2.1).

Periferik kök hücre naklinde G-CSF verilen bireylerin toplam CD34⁺ hücre sayısı, mobilizasyon süresi, nakil sonrası engrafman kalitesi birbirinden farklıdır. Bu farkta G-CSF reseptör genine yer alan protein dizisinde amino asit değişimine neden olan *missense* tek nükleotid polimorfizmlerinin etkisi olabilir. Bu polimorfizmler G-

CSF'in normal etkisinin değişimine, inhibisyonuna veya stimulasyonuna sebep olabilir.

Tablo 2.1. İzofomrlara göre G-CSF-R geninde bulunabilecek SNP'lerin

numaraları, yer aldıkları ekzon, neden oldukları baz ve protein değişimleri gösterilmiştir. *NCBI veri tabanının SNP numaralandırması

**(23)

Ekzon	Gen Üzerinde missense SNP	Missense SNP Numarası*	Aminoasit Değişimi	İzoform "a"	İzoform "b"	İzoform "c"	İzoform "d"
4	g.6210695 C>T	rs34362628	PRO>LEU	+	+	+	+
4	g.6210911 A>C	rs78901962	ASN>THR	+	+	+	+
7	g.6213664 T>C	rs3917973	MET>THR	+	+	+	+
7	g.6213811 C>T	rs34845290	ALA>VAL	+	+	+	+
8	g.6214055 G>A	rs3918018	ASP>ASN	+	+	+	+
9	g.6214232 A>G	rs3917974	GLN>ARG	+	+	+	+
10	g.6214827 G>A	rs3918019	GLU>LYS	+	+	+	+
11	g.6216525 G>A	rs3918020	ARG>GLN	+	+	+	+
12	g.6217128 G>C	rs3917991	ASP>HIS	+	+	+	+
13	g.6218218 T>C	rs3917996	TYR>HIS	+	+	+	+
14	g.6218393 C>T	rs3917997	ARG>CYS	+	+	+	+
17	g.6219430 G>A	rs3918001	GLY>ARG	-	-	+	-
17	g.6219475 C>T	rs3918021	ARG>CYS	-	-	+	-
17	g.6219661 C>A	rs78861150	PRO>THR	+	-	+	+
17	g.6219871 C>T	rs35622214	PRO>SER	+	-	+	-
17	g.6219886 G>A	Wölfler.**	GLU>LYS	+	-	+	-

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmadaki moleküler yöntemler, Hacettepe Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü, Temel Onkoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya dahil edilen örnekler Hacettepe Üniversitesi Yerel Etik Kurulu FON 09/32 no'lu izni ile kullanılmıştır.

3.1 Çalışma Grubu

Çalışma, Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Hastanesi Kemik İliği Transplantasyonu (KİT) ünitesinde 2000-2009 yılları arasında G-CSF verilmiş olan toplam 303 bireyin aferez ürünleri kullanılarak yürütülmüştür. Çalışmada aferez ürünlerinin kriyoprezarvasyon işlemi sırasında hasta veya donör örneklerinden yaklaşık 1 ml alikot alınarak saklanan örnekler kullanılmıştır. Bu örnekler, transplantasyonda kullanılan (veya kullanılacak) aferez ürününden bağımsız olarak saklanmaktadır. G-CSF almış bireylerin 54'ü sağlıklı donörlerdir. Geri kalan 249 birey kemik iliği transplantasyonu yapılmış hasta grubunu oluşturmaktadır. Bu grup non-hodgkin lenfoma (NHL, n=78), multipl miyelom (MM, n=81), hodgkin lenfoma (HL, n=53), germ hücreli kanser (n=15), akut miyeloblastik lösemi (AML, n=11), diğer grup (n=11) ise rabdomiyosarkom, nazofarinks kanseri, primer amiloidoz, nöroblastom, akut lenfoblastik lösemi (ALL), kronik lenfositik lösemi (KLL), kronik miyeloid lösemi (KML), mantle-hücreli lenfoma (*mantle-cell lymphoma, MCL*) hastalarından oluşmaktadır (Tablo 3.1).

Çalışma grubundaki bireyler genellikle 5 gün süreyle 10µg/kg/gün G-CSF rejimi uygulanmıştır. Bu süre otolog transplantasyon yapılacak kanser hastalarında 7-8 güne kadar çıkabilmektedir. G-CSF verilen ilk gün 0.gün kabul edilirse lökosit artışına paralel olarak genellikle sağlıklı donörlerden +5-6., kanser hastalarından ise +5-10. günde aferez toplamaları yapılmaya başlanır. Bir günde toplanan total hücre hacmi (ml) ölçülür ve yoğunluklarına göre (dilüsyon faktörü) seyreltilirler. Toplanan ürünlerdeki hücrelerin canlılıkları (% viabilite) ve mm³'te içerdikleri lökosit (beyaz

küre, BK), %CD34⁺ hücre sayıları akım sitometri yöntemi ile hesaplanır. Öğrenilen BK sayısı/mm³ değeri Formül 3.1 kullanılarak toplanan total mononükleer hücre sayısı elde edilir.

$$\text{Total Mononükleer Hücre Sayısı} = \frac{\text{Dilüsyon Faktörü} \times \text{Lökosit (mm}^3\text{)} \times \text{Toplama Hacmi(ml)} \times \% \text{ Viabilite} \times 1000}{100} \quad (3.1)$$

Total mononükleer hücre sayısı, % CD34⁺ katsayısı ile çarpılarak kilogram başına düşen CD34⁺ kök hücre sayısı elde edilir. Her toplama gününde kök hücre transplantasyonu yapılacak kişinin kilosu tartılır. Bunun nedeni kiloyu bireyler arasında sabit bir parametre olarak kullanıp infüze edilecek CD34⁺ kök hücre sayılarının buna göre ayarlanmasını sağlamaktır.

Tablo 3.1. H.Ü KİT ünitesinde 2000-2009 yılları arasında G-CSF almış bireylere ait bilgiler. Sayı, yaş dağılımı, yaş aralığı. SD: Standart Sapma (*Standard Deviation*)

Birey Tanısı	Birey Sayısı (n)		Yaş dağılımı (ortalama±SD)		Yaş Aralığı	
	Erkek	Kadın	Erkek	Kadın	Erkek	Kadın
Non Hodgkin Lenfoma	50	28	44±13	38±15	(71-17)	(65-18)
Multipl Miyelom	54	27	55±10	54±10	(77-30)	(75-37)
Hodgkin Lenfoma	29	24	31±14	31±10	(61-17)	(54-16)
Germ Hücreli Kanser	13	2	32±10	34±18	(59-22)	(47-21)
Akut Miyeloid Lösemi	5	6	48±16	35±11	(63-21)	(58-27)
Diğer Kanser Çeşitleri	6	5	38±13	29±16	(52-21)	(56-16)
Sağlıklı Donör	26	28	-	-	-	-
	Σ = 303					

3.2 Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler, Kitler ve Tamponlar

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler, kitler ve tamponlar tedarik edildiği firmalara göre aşağıda sıralanmıştır.

- QIAamp DNA Blood Mini Kit - Qiagen, ABD.
- %100-96 etil alkol - Sigma-Aldrich,Almanya.
- Primer oligonükleotid dizisi - AlphaDNA, Kanada.
- *Taq* DNA Polimeraz (rekombinant) 5 u/μl, (NH₄)₂SO₄ içeren 10X *Taq* tamponu, KCl içeren *Taq* Tamponu, MgCl₂ 25 mM, dNTP karışımı 2mM, Yükleme tamponu 6X, *Gene Ruler Low Range* 25-700 baz çiftlik ve *Gene Ruler* 50 baz çiftlik DNA büyüklük belirleyicisi, *Sfcl* FastDigest restriksiyon enzmi, 10X FastDigest Tampon, *Hin1II* restriksiyon enzimi, 10X G Tamponu. - Fermentas International, Litvanya
- DyNAzyme II DNA Polimeraz 2u/ μl, 10X Mg⁺²- free DyNAzyme tamponu, MgCl₂ 50 mM, 500 reaksiyonluk dNTP karışımı- Finnzymes, Finlandiya
- *Taq* DNA polimeraz, 10X reaksiyon tamponu, MgCl₂ 25 mM – Bioron, Almanya.
- *XcmI*, *BglI*, *MlyI*, *BsaI*, *BstNI*, *Sfcl*, *MspI*, *BceAI*, *DdeI*, *HpyAV* restriksiyon enzimleri, 10X NEB Tampon2, 10X NEB Tampon3, 10X NEB Tampon 4, 100X BSA (*Bovine Serum Albumin*)- New England Biolabs, İngiltere
- Etidyum bromür, 1X Fosfat tuz çözeltisi (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) - Sigma-Aldrich/Sigma Chemical Co. , ABD.
- Tris-Borik Asid-EDTA (TBE) – Dr.Zeydanlı, Türkiye.
- Agaroz (standart), Akrilamid- *Aqua Plus* (%30) - Applichem, Almanya.
- Agaroz (standart) - Lonza, ABD.
- Amonyumperoksidisülfat (APS)- Reidel-de Haën, Almanya.
- Tetrametiletilendiamin (*Tetramethylethylenediamin*, TEMED) – GERBU, Almanya.
- JAK2 MutaScreen™ Kit & Reference Scale - Ipsogen, Fransa.
- Giemsa boyası, KH₂PO₄, NaH₂PO₄- Merck, Almanya.
- Enjeksiyonluk distile su- Eczacıbaşı, Türkiye.

3.3 Moleküler Yöntemler

G-CSF-R geni *missense* tek nükleotid polimorfizmleri Polimeraz Zincir Reaksiyonu- Restriksiyon Parça Uzunluğu (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*, PCR-RFLP) metodu ile incelenmiştir. Bu metod ilgilenilen gen bölgesinin genomik DNA kalıp olarak kullanılarak çoğaltılması ve sonrasında restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilmesi prensibine dayanmaktadır. Çalışmamızda, G-CSF-R genomunda bulunabileceği saptanan *missense* SNP'lerden 5'i hariç (rs78901962, rs3917974, rs3918019, rs3917997, rs78861150) geriye kalan 11 SNP'in sıklık taramasına karar verilmiştir. Ek olarak gerçek zamanlı alel özgül PCR (*Real time PCR-TaqMan Allelic Discrimination Assay*) yöntemi ile bireylerde JAK2V617F Mutasyon analizi yapılmıştır.

3.3.1 DNA İzolasyonu

QIAamp DNA Blood Mini kit ile aferez ürününden genomik DNA (gDNA) izolasyon işlemi üretici firmanın kullanım talimatları temel alınarak gerçekleştirildi.

Başlangıçta bireyin aferez kan ürününden 200µL ependorfa alındı ancak izolasyon sürecinde bu miktarda örneğin filtreleri tıkadığı ve başarılı sonuç vermediği ortaya çıktı. Aferez ürününün normal periferik kan örneğine göre çok daha yoğun hücre miktarı içeriyor olmasından kaynaklı bu sorunun giderilmesi için, ependorf içerisine alınan 100µl aferez ürünü üzerine 100µl 1x PBS eklendi. Elde edilen her bir örneğe 20µl Proteinaz K ve 200µl AL tamponu eklenip vorteks (Cyclone, Nickel Electro, İngiltere) ile karıştırıldı, 56°C de 30-45 dakika çalkalamalı su banyosunda (OLS 200, Grant, İngiltere) inkübe edildi. Daha sonra örnekler 200 µl %100-96 etil alkol eklenip 10 saniye vorteks ile karıştırıldı. Kısa bir santrifüj (5417 R, Eppendorf, Almanya) işleminden sonra örnekler 2 ml toplama tüpleri içerisindeki *QIAamp Mini* spin kolona aktarıldı ve 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Filtratı içeren toplama tüpü atılıp kolon temiz bir 2ml toplama tüpüne yerleştirildi. İçerisine 500 µl AW1 tamponu eklenen kolon, 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten

sonra tekrar temiz bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi. Bu kez kolon üzerine 500 µl AW2 tamponu eklendi ve 13000 rpm'de 4 dakika santrifüj edildikten sonra steril bir 1.5 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi. Son olarak kolon üzerine 200 µl AE tamponu eklenip 1-2 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek gDNA'nın tüpte toplanması sağlandı. Elde edilen DNA -20 °C de derin dondurucuda saklandı.

DNA izolasyon sürecinde hücre yoğunluğu yüksek olan bazı aferez ürünlerinde, tampon ekleme-santrifüj aşaması yapıldıktan sonra kolon filtrelerinden geçişte sorunlar yaşandı. Böyle durumlarda yalnızca bu örneklerde bazı santrifüj aşamaları fazladan 1 veya 2 kez tekrarlandı.

3.3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile DNA Amplifikasyonu

G-CSF-R genomik DNA'sı üzerinde çalışılacak bütün SNP'leri içeren 11 polimorfik bölge için tasarlanan *forward* ve *reverse* primerler ($T_m \approx 58-60^\circ\text{C}$) ile PCR yöntemi gerçekleştirilmiştir (Tablo3.2).

Çalışmada uyguladığımız PCR yöntemi için 25 mM ve 10mM stok dNTPs mix çözeltisi, 2 mM konsantrasyonuna; 100 µM stok primer çözeltisi 5 µM'a seyreltilerek, MgCl_2 ise 25mM konsantrasyonda kullanılmıştır.

Aferez ürünlerinden elde edilen DNA'ların kalitesi, çoğaltılacak polimorfik bölgeler ve primerlerin özellikleri birbirinden farklılık göstermektedir. Bu nedenle, çoğaltılacak her bölge için PCR koşullarının optimizasyonu amacıyla kullanılan bileşenlerin bir veya birden fazlasında oransal farklılıklar yapıldı. Genel olarak, MgCl_2 son konsantrasyonları 2,25-3 mM, primer son konsantrasyonu 0,075-0,2 mM arasında denendi ve her bölge için optimum değerler belirlendi. Genomik DNA miktarları ise 2,5-5µl arasında değişen hacimlerde kullanıldı. Her polimorfik bölge için kullanılan bileşenlerin oranları Tablo 3.3.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Polimorfik bölgeler, içerdikleri SNP'ler ve tasarlanan primerler gösterilmiştir.

Çoğaltılan Genomik DNA Bölgesi	Forward Primer	Reverse Primer	Gen Üzerindeki missense SNP
6210428-6210803	tgcttttctctgccaagctgg	tgaagctctgctcccagtct	g.6210695 C>T
6213468-6213980	ggcaagagcggaacagag	agagctcatactgaagggcc	g.6213664 T>C, g.6213811 C>T
6213891-6214079	tagaatggcccagcgatcca	tcagctccaggctagggtcga	g.6214055 G>A
6216362-6216780	ggctaagatgttgacctacc	ccatgtctcttgggcagttc	g.6216525 G>A
6216991-6217230	ctcactagaggtctgaggct	agccttgggagagagaggaga	g.6217128 G>C
6218091-6218240	gcacctctctctcccatag	gcgttggtccagaagatgct	g.6218218 T>C
6219301-6219580	aactgaccatgctgagtctg	gcttctttcatcctcctcc	g.6219430 G>A, g.6219475 C>T
6219661-6220011	ccaagagcagtttccacca	taagaggcaggcccaagaag	g.6219871 C>T
6219661-6219909	ccaagagcagtttccacca	tggcccaaagacacagtcgtc	g.6219886 G>A

DNA polimeraz enziminin aktivitesini sınırlandırmak için tüm PCR karışımları buz üzerinde hazırlandı. PCR işleminde ilk toplam örnek sayısı kadar reaksiyon karışımı gDNA haricinde karıştırılarak bir ana karışım oluşturuldu ve 200 µl'lik PCR tüplerine bölündü. Örneklerin numarası yazılı her bir PCR tüpüne örnekler ait gDNA'lar eklendi. Kısa bir vorteksleme ve santrifüj işlemi sonrası örnekler istenen reaksiyon koşullarına ayarlanan PCR cihazına (GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems, ABD) yerleştirildi ve program başlatıldı (Tablo 3.4).

Genel olarak kullanılan PCR reaksiyon koşulları Tablo 3.6'da verilmiştir. Çalışmada PCR bağlanma sıcaklığı (Ta: *Annealing temperature*) 58-62°C arasında denendi ve çoğunlukla optimum olarak belirlenen Ta=60°C kullanıldı. İki bölge dışında bağlanma ve uzama basamaklarının süreleri 30 saniyede tutulup, PCR en yüksek döngü sayısına (38) doymuş amplikon eldesi için ayarlandı.

PCR sonucunda kullanılan primerlerin sınırlandırdığı G-CSF-R *missense* SNP'leri içeren polimorfik bölgeler çoğaltılmış oldu ve PCR ürünleri (amplikon) elde edildi. PCR sonrasında kesim için gerekli bu amplikonların varlığı ve miktarı %1'lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi ve restriksiyon kesim işlemine geçildi.

Tablo 3.4. G-CSF-R gen bölgelerinin amplifikasyonunda kullanılan PCR reaksiyon koşulları.

Çoğaltılan Genomik DNA Bölgesi	Giriş denatürasyonu	Denatürasyon	Bağlanma (Annealing)	Uzama (Extention)	Son uzama	Bekleme
6210428-6210803	94°C 5 dk.	94°C 30 sn	59°C 30 sn	72°C 30 sn.	72°C 5dk.	4 °C ∞
6213468-6213980	94°C 5 dk.	94°C 30 sn	58°C 30 sn	72°C 30 sn.	72°C 5dk.	4 °C ∞
6213891-6214079	94°C 5 dk.	94°C 30 sn	61°C 25 sn	72°C 25 sn.	72°C 5dk.	4 °C ∞
6216362-6216780	94°C 5 dk.	94°C 30 sn	60°C 30 sn	72°C 30 sn.	72°C 5dk.	4 °C ∞
6216991-6217230	94°C 5 dk.	94°C 30 sn	60°C 30 sn	72°C 30 sn.	72°C 5dk.	4 °C ∞
6218091-6218240	94°C 5 dk.	94°C 30 sn	59°C 30 sn	72°C 30 sn.	72°C 5dk.	4 °C ∞
6219301-6219580	94°C 5 dk.	94°C 30 sn	61°C 30 sn	72°C 30 sn.	72°C 5dk.	4 °C ∞
6219661-6220011	94°C 5 dk.	94°C 30 sn	60°C 30 sn	72°C 20 sn.	72°C 5dk.	4 °C ∞
6219661-6219909	94°C 5 dk.	94°C 30 sn	60°C 30 sn	72°C 30 sn.	72°C 5dk.	4 °C ∞

3.3.3 Restriksiyon Parça Uzunluğu Metodu (RFLP)

Restriksiyon endonükleazlar çift zincirli veya tek zincirli DNA'yı şeker-fosfat hattından kesen enzimlerdir. Her bir restriksiyon enzimi DNA zincirindeki özgül nükleotid sekanslarını (genellikle 4-6 baz çifti uzunluğundaki) tanır. Restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanılarak DNA zincirinde bulunan baz değişimlerini saptamak mümkündür. Bu tür değişimler bir restriksiyon endonükleaz enzimi için tanıma bölgesi oluşmasına veya ortadan kalkmasına neden olabilir. (133-136)

Bu çalışmada kullanılan G-CSF-R geni *missense* SNP'lerine özgül restriksiyon endonükleaz enzimleri ve enzimlerin tanıma bölgeleri Tablo 3.5'de gösterilmiştir.

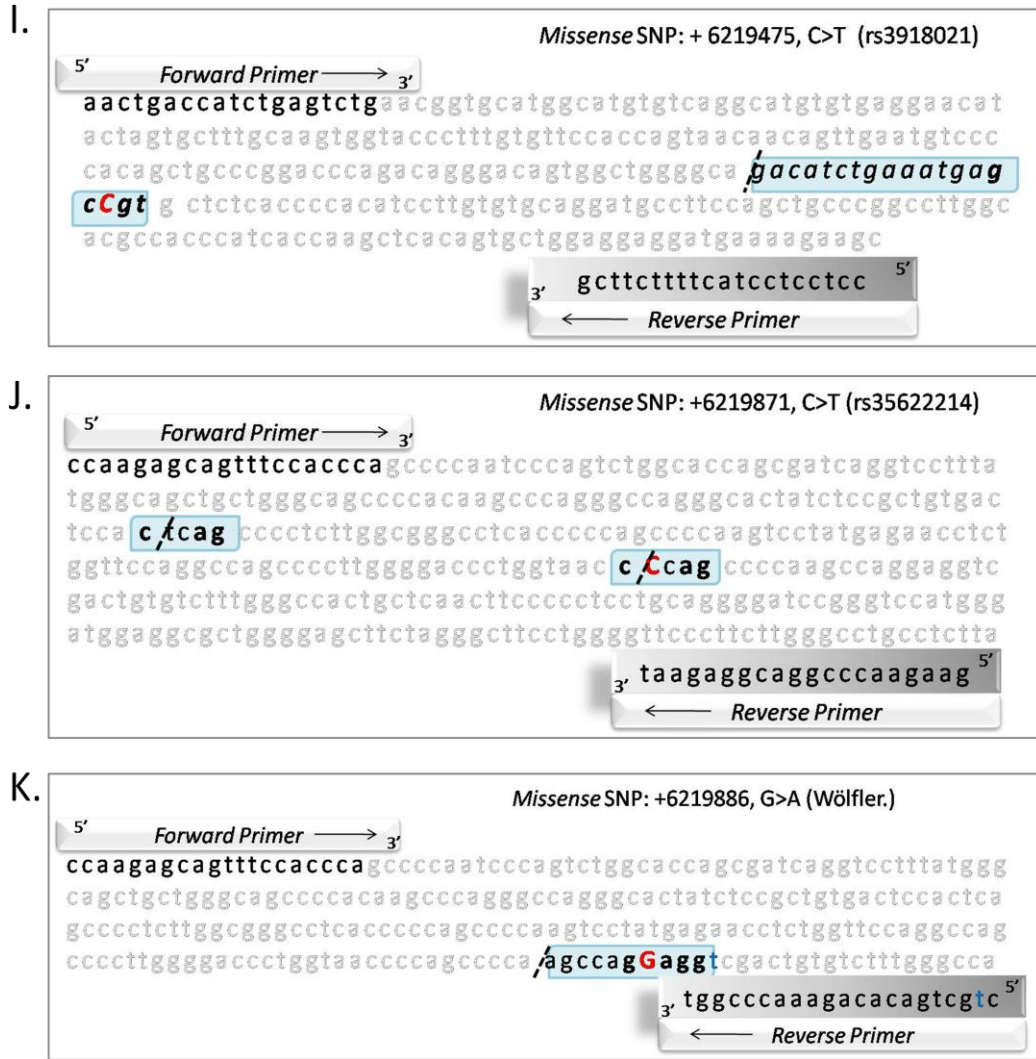
Tablo 3.5. Birinci kromozomda (1p32-35'de) bulunan G-CSF-R geni *missense* SNP'lerine özgül restriksiyon endonükleaz enzimlerinin tanıma bölgeleri. Oklar kesim noktalarını göstermektedir. (Nükleik asit adlandırması N: G,T,A veya C, W: A veya T, R: G veya A, Y: T veya C'dir)

Gen Üzerinde <i>missense</i> SNP	Kesen Enzim	Enzim Tanıma Bölgesi
g.6210695 C>T	<i>XcmI</i>	5'...CCANNNNNNNNTGG...3' 3'...GGTNNNNNNNNNACC...5'
g.6213664 T>C	<i>Hin1II</i>	5'...CATG...3' 3'...GTAC...5'
g.6213811 C>T	<i>BglI</i>	5'...GCCNNNNNGGC...3' 3'...CGGNNNNNCCG...5'
g.6214055 G>A	<i>MlyI</i>	5'...GAGTC(N) ₅ ...3' 3'...CTCAG(N) ₅ ...5'
g.6216525 G>A	<i>BsaI</i>	5'...GGTCTC(N) ₁ ...3' 3'...CCAGAG(N) ₅ ...5'
g.6217128 G>C	<i>BstNI</i>	5'...CCWGG...3' 3'...GGWCC...5'
g.6218218 T>C	<i>SfcI</i>	5'...CTRYAG...3' 3'...GAYRTC...5'
g.6219430 G>A	<i>MspI</i>	5'...CCGG...3' 3'...GGCC...5'
g.6219475 C>T	<i>BceAI</i>	5'...ACGGC(N) ₁₂ ...3' 3'...TGCCG(N) ₁₄ ...5'
g.6219871 C>T	<i>DdeI</i>	5'...CTNAG...3' 3'...GANTC...5'
g.6219886 G>A	<i>HpyAV</i>	5'...CCTTC(N) ₆ ...3' 3'...GGAAG(N) ₅ ...5'

PCR ile DNA amplifikasyonu sonucu elde edilen ampliconlardaki restriksiyon enzimi tanıma bölgeleri ve kesim ürünleri Şekil 3.1'de gösterilmiştir.

- A. **Missense SNP: +6210695, C>T (rs34362628)**
- 5' Forward Primer → 3'
- tgcttttctctgccaagctggctgataaacgggttaccagcacatcactatctctgtgtca
 cccccgtagcctctcgaagcttccgtcccatccttccatttccagccccataatcttga
 aggggtgagacaggaaggtagggcctctgagcttaggagtaaaaaggcctagattatag
 cccagctctgctaggcagagggcgtcgttccctggccattcttccaccccagggtctgg
 aggagtgcgggcacatcagtggtctcagccc **Ccatcgtc/cacctgg** gggatcccatc
 acagcctcctgcatcatcaagcagaactgcagccatctggaccggagccaagattc
 tgtggagactgggagcagagcttca
- 3' tgaagctctgctcccagtct 5'
- ← Reverse Primer
- B. **Missense SNP: +6213664, T>C (rs3917973)**
- 5' Forward Primer → 3'
- ggcaagagcggaaacagagacctaagagagaaaacaaagacacatagagatcga
 accacagaaaacgtgtcatttggcaacgtggacagatgggtgaaccaagacaggg
 agacaagagggagctaaggcagagccctctagggtgggtagggagacattct
 gacagccccactccttgcagtgaaaactggagcccc **caTg/c** tgcggaccatg/
 gccccagccctgaagcggccccctccccaggcaggctgcctacagctgtgtctggg
 agc **catg/c** gcagccaggcctgcacataaaatcagaagtgtgagctgcgccacaa
 gcgcagcgtggagaa **gccagct,gggC** actggtagggcagaggggcaaccttgga
 gagcctgaggtgggtgggggcagggggcagggtaagtctgggctcagagctggccc
 tagaatggcccagcgatccaaggctcagagtcctgtccacccctcaccagggtgg
 gccccctcccccttggaggcccttcagtattgagctct
- 3' agagctcatactgaagggcc 5'
- ← Reverse Primer
- C. **Missense SNP: +6213811, C>T (rs34845290)**
- 5' Forward Primer → 3'
- ggcaagagcggaaacagagacctaagagagaaaacaaagacacatagagatcga
 accacagaaaacgtgtcatttggcaacgtggacagatgggtgaaccaagacaggg
 agacaagagggagctaaggcagagccctctagggtgggtagggagacattct
 gacagccccactccttgcagtgaaaactggagcccc catg c tgcggaccatg
 gccccagccctgaagcggccccctccccaggcaggctgcctacagctgtgtctggg
 agc catg gcagccaggcctgcacataaaatcagaagtgtgagctgcgccacaa
 gcgcagcgtggagaa **gccagct,gggC** actggtagggcagaggggcaaccttg
 gagagcctgaggtgggtgggggcagggggcagggtaagtctgggctcagagctggc
 cctagaatggcccagcgatccaaggctcagagtcctgtccacccctcaccagggt
 gggccccctcccccttggaggcccttcagtattgagctct
- 3' agagctcatactgaagggcc 5'
- ← Reverse Primer
- D. **Missense SNP: +6214055, G>A (rs3918018)**
- 5' Forward Primer → 3'
- tagaatggcccagcgatccaagggtca **gagtcctgtc/c** acccctcaccagggtgggc
 cccctcccccttggaggcccttcagtattgagctctgcgggctcctccagccaaggcct
 acacccctgcagatacgtgcatccgctggccccctgcctggccact,ggagc
Gactc g agccctagcctggagctga
- 3' tcagctccaggctagggtctcga 5'
- ← Reverse Primer

- E. Missense SNP: +6216525, G>A (rs3918020)
- 5' *Forward Primer* → 3'
- ggctaagatgttgacctaccaaggtcaccagcctgtataatagcaaacccagg
 atttgaacccaggcttcttggtcacaagggcctgcatcttttcaaccttcattccacc
 atttccacccctgtctccaggccagctctgaccagacttccatgccatggcccG
 agaccctcacagcctctgggtaggctgggagccccccaatccatggcctcagg
 gctatgtgattgagtggggcctgggccccccagcgcgagcaatagcaacaaga
 cctggaggatggaaacagaatgggagagccacgggggtttctgctgaagggtgag
 gctggcctggaaagtgggcaggggccagggaacaaagggaaggcagtgcttatct
 gacaataggcatgggacaacctgaactgccccagagacatgg
- 3' ccatgtctcttgggcagttc 5'
- ← *Reverse Primer*
- F. Missense SNP: +6217128, G>C (rs3917991)
- 5' *Forward Primer* → 3'
- ctcactagaggtctgaggctagctcctgatacttagcacaggttaggccctaacaga
 agtgcctacccattttctctcagagaaatcaggccctttcagctctatgagat
 catcgtgactcccttgta c c agG acaccatgggacccctccagcatgtctatgcc
 tactctcaagaaatgggtttgtcaactatcaggccccctttccagaatcc
 tctcctctctctcccaaggct
- 3' agccttgggagagagaggaga 5'
- ← *Reverse Primer*
- G. Missense SNP: +6218218, T>C (rs3917996)
- 5' *Forward Primer* → 3'
- gcacctctctcttcccatagctccctcccatgccccagagctgcatctaaagca
 cattggcaagacctgggacacagctggagtggtgacctgagccccctgagctg
 gggaaagagcccccttaccac c T acag catcttctggaccaacgc
- 3' gcgttgggtccagaagatgct 5'
- ← *Reverse Primer*
- H. Missense SNP: +6219430, G>A (rs3918001)
- 5' *Forward Primer* → 3'
- aactgaccatctgagctgaacgggtgcatggcatgtgtcaggcatgtgtgaggaaacat
 actagtgcctttgcaagtggtaacctttgtgttccaccagtaacaaacagttgaatgtccc
 cacagctgc c c Gg acccagacagggacagtggtggggcagacatctgaatga
 gccgtgctctcaccacacatccttgtgtgcaggatgccttccagctgc c cgg c ctg
 gcaagccaccatcaccaagctcacagtgtggaggaggatgaaaaagaagc
- 3' gcttcttttcatcctcctcc 5'
- ← *Reverse Primer*



Şekil 3.1. G-CSF-R genindeki SNP'lerin analizi için çoğaltılan gen bölgeleri ve RFLP

enzimleri ile kesim şemaları gösterilmektedir. A. SNP g.6210695 C>T (rs34362628)'i içeren gen bölgesi ve *XcmI* enzimi ile kesimi. B. SNP g.6213664 T>C (rs3917973)'i içeren gen bölgesi, *Hin1II* RFLP kesimi. C. SNP g.6213811 C>T (rs34845290)'i içeren gen bölgesi, *BglII* enzimi ile kesimi. D. SNP g.6214055 G>A (rs3918018)'i içeren gen bölgesi, *MlyI* enzimi ile kesimi. E. SNP g.6216525 G>A (rs3918020)'i içeren gen bölgesi, *BsaI* enzimi ile kesimi. F. SNP g.6217128 G>C (rs3917991)'i içeren gen bölgesi, *BstNI* enzimi ile kesimi. G. SNP g.6218218 T>C (rs3917996) içeren gen bölgesi, *Sfcl* enzimi ile kesimi. H. SNP g.6219430 G>A (rs3918001) içeren gen bölgesi, *MspI* enzimi ile kesimi. I. SNP g.6219475 C>T (rs3918021) içeren gen bölgesi, *BceAI*

enzimi ile kesimi. J. SNP g.6219871 C>T (rs35622214) içeren gen bölgesi, *DdeI* enzimi ile kesimi. K. SNP g.6219886 G>A (Wölfler.(23)) içeren gen bölgesi, *HpyA* enzimi ile kesimi gösterilmiştir. Primerlerin yerleşimi (koyu harfli üst ve alttaki barlar), SNP'ler (kırmızı renkli koyu harfler), kesim için tasarlanan primer dizisi modifikasyonları (mavi renkli bazlar), restriksiyon endonükleazın tanıma bölgesi (mavi renkli dikdörtgen çerçeveler) ve kesim noktası (kesik çizgiler) anlamlı zincir üzerinde gösterilmiştir.

İki farklı üreticiden (*New England Biolabs*, *Fermentas*) temin edilen enzimler, tamponlar RFLP işlemi için belirlenen optimal koşullarda kullanıldı (Tablo 3.6). Kesim sonucu heterozigot polimorfik olma ihtimali gözlenen örneklerde, kesim işlemi tekrarlanırken enzim miktarı normalde kullanılanıdan en az 1,5 kat arttırılmıştır. Bununla beraber, bazı örneklerde PCR ürün miktarı da en az 1,5 kat azaltılarak deneyler tekrarlanmıştır. Restriksiyon enzimleriyle kesim sonucu *missense* SNP varlığına göre oluşabilecek kesim ürünü boyutları Tablo 3.7'de gösterilmiştir.

Tablo 3.6. G-CSF-R *missense* SNP'lerine göre RFLP işlemlerinde kullanılan enzimler ve reaksiyon koşulları gösterilmiştir.* FastDigest

Sfcl enzimi ** Polimorfik minör alel taşıma ihtimali gözlenen örneklerde inkübasyon süresi 20 saate kadar çıkarıldı.

Gen Üzerinde <i>missense</i> SNP	Kesen Enzim	dH ₂ O (μl)	10X Tampon (μl)	100X Bovine Serum Albumin (BSA) (μl)	Enzim Miktarı (μl)	PCR ürünü (μl)	Toplam (μl)	İnkübasyon sıcaklığı (16-18 saat**)
g.6210695 C>T	<i>XcmI</i>	-	2	-	0,6	17,4	20	37°C
g.6213664 T>C	<i>Hin1II</i>	11,6	1,3	-	0,6	5	18,5	37°C
g.6213811 C>T	<i>BglI</i>	8	2	-	0,15	10	20,15	37°C
g.6214055 G>A	<i>MlyI</i>	5,6	2	0,2	0,2	12	20	37°C
g.6216525 G>A	<i>BsaI</i>	15,9	2	-	0,1	2	20	50°C
g.6217128 G>C	<i>BstNI</i>	12,5	2	0,2	0,3	5	20	60°C
g.6218218 T>C	<i>Sfcl</i>	12,6	2	0,2	0,2	5	20	37°C
g.6218218 T>C	<i>Sfcl*</i>	11,9	1,4	-	0,7	7	21	37°C
g.6219430 G>A	<i>MspI</i>	12,8	2	-	0,2	5	20	37°C
g.6219475 C>T	<i>BceAI</i>	13,5	2	0,2	0,3	4	20	37°C
g.6219871 C>T	<i>DdeI</i>	14,8	2	-	0,2	3	20	37°C
g.6219886 G>A	<i>HpyAV</i>	12,6	2	0,2	0,2	5	20	37°C

Tablo 3.7. PCR ile çoğaltım sonucu oluşan ampliconların uzunlukları ve *missense* SNP varlığına göre oluşabilecek kesim ürünü boyutları gösterilmiştir.

Çoğaltılan Genomik DNA Bölgesi	Gen Üzerinde <i>missense</i> SNP	Kesen Enzim	Amplicon Uzunluğu	RFLP Parça Uzunluğu (bp)	RFLP Parça Uzunluğu (bp)
6210428-6210803	g.6210695 C>T	<i>XcmI</i>	386	C:27, 45, 74, 230	T:27, 119,230
6213468-6213980	g.6213664 T>C	<i>Hin1II</i>	513	T:194, 12, 62, 245	C:206, 62, 245
6213468-6213980	g.6213811 C>T	<i>BglI</i>	513	C:340, 173	T:513
6213891-6214079	g.6214055 G>A	<i>MlyI</i>	189	G:37, 30, 122	A:37, 152
6216362-6216780	g.6216525 G>A	<i>BsaI</i>	420	G:159, 261	A:420
6216991-6217230	g.6217128 G>C	<i>BstNI</i>	240	G:135, 105	C:240
6218091-6218240	g.6218218 T>C	<i>Sfcl</i>	150	T:127, 23	C:150
6219301-6219580	g.6219430 G>A	<i>MspI</i>	280	G:128, 93, 59	A:221, 59
6219301-6219580	g.6219475 C>T	<i>BceAI</i>	280	C:158, 122	T:280
6219661-6220011	g.6219871 C>T	<i>DdeI</i>	351	C:122, 229	T:122, 88, 141
6219661-6219909	g.6219886 G>A	<i>HpyAV</i>	249	G:249	A:30,219

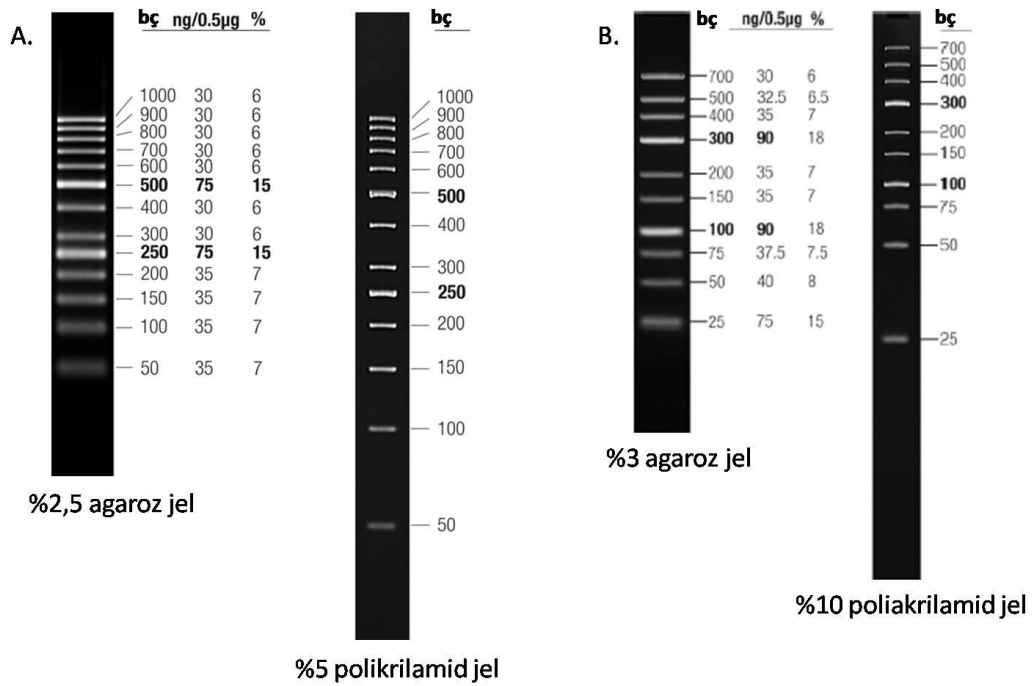
3.3.4 Agaroz ve Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Ampliconlar RFLP kesim enzimiyle muamele edildikten sonra ortaya çıkan PCR kesim ürünü boyutuna göre; ürün boyutu 20 nükleotidin üstünde olan 10 polimorfik bölgedeki SNP durumunu belirlemek için agaroz jel elektroforezi (AGE), 20 nükleotidin altında olan ve kesim ürünleri arasındaki fark daha büyük parçalardan da ayırt edilemeyen 1 polimorfik bölgedeki SNP durumu (+6213664, T>C) için ise poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) yöntemi kullanıldı.

%1'lik agaroz jeli için 100 ml 1X TBE solüsyonuna 1 gr agaroz; %2'lik agaroz jeli için 100 ml 1X TBE solüsyonuna 2 gr agaroz; %2,5'luk agaroz jeli için ise 100 ml 1X TBE solüsyonuna 2,5 gr agaroz eklendi. Mikrodalga fırında kaynayana kadar (yaklaşık 1,5-2 dakika) tutularak agarozun eriyip TBE içerisinde çözünmesi sağlandı.

Çalkalanarak soğutulan agaroz çözeltisine 10 mg/ml etidyum bromür solüsyonundan 5 µl ilave edilip karıştırılarak (son konsantrasyon 0.5µg/ml) tarakların yerleştirildiği elektroforez tankına döküldü. Agaroz çözeltisinin oda sıcaklığına soğuması ile polimerizasyon ve jel formasyonu sağlandı. Jel, 1X TBE tamponu ile doldurulmuş yatay elektroforez ünitesi (2012 Maxiphor, LKB, Avustralya) içerisine yerleştirildi. PCR-RFLP ürününden 10 µl alınarak 2 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırıldı, homojen karışım jeldeki kuyucuklara yüklendi. Örnek sıralarının başına, sonuna veya ortasına 3,5 µl 50 bç veya *Low Range* (25- 700 bç) DNA moleküler büyüklük belirleyicisi yüklendi (Şekil3.2). Yatay elektroforez sistemi güç kaynağına (2301 Macrodrive, LKB, Avustralya) bağlandı ve sabit 140 voltta yaklaşık 45-60 dakika yürütüldü. Jel sistemden çıkarılarak görüntüleme sistemi (Gel Logic 1500 Imaging System, Kodak, Japonya) ile dijital olarak görüntülendi ve kaydedildi.

Çözünürlük kapasitesi agaroz jelden daha yüksek olan poliakrilamid jel çok daha küçük DNA parçalarının (5-1000 bç) ayırımını yapabilirler. Çalışmamızda elde edilen kesim ürünlerinin etkin ayırımı için 6-100 bç farkını ayırt edebilen %20'lik poliakrilamid jel hazırlanmıştır. Poliakrilamid jel çözeltisinde kullanılan bileşenler ve oranları Tablo 3.8 'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Gene Ruler DNA büyüklük belirleyicisi (DNA Ladder). A. 50 bç B. 25-700 bç. Jel görüntüleri ve bant özellikleri ürüne ait bilgi sayfasından sağlanmıştır(137).

Tablo 3.8. %20'lik poliakrilamid jel solüsyonunda kullanılan bileşenlerin hacimleri.

100 ml %20'lik Poliakrilamid jel

%30 Akrilamid	66,6 ml
dH2O	12,7 ml
5xTBE	20 ml
%10 Amonyum peroksidisülfat	0,7 ml
TEMED	0,035 ml

PAGE için öncelikle 20x20 cm'lik ayıraçlı ve çentikli temiz cam tabakalar düz bir zeminde üst üste getirildi, çentikli kısım üst tarafa gelecek şekilde dikey olarak sıkıştırılmalı jel döküm aracına cam tabakalar yerleştirildi. Döküm aracının iki tarafında yer alan ve poliakrilamid jelin polimerleşmeden önce akmasını engellemek amacıyla vidalar eşit miktarda sıkıştırıldı. Böylece, iki cam tabaka arasında 1mm' lik

poliakrilamid jel çözeltisinin döküleceği sabit bir boşluk elde edildi. %20'lik poliakrilamid jel çözeltisi için sırasıyla %30'luk Akrilamid, dH₂O, 5X TBE, %10'luk APS karıştırıldı, en son olarak polimerleşmede katalizör rolündeki TEMED, karışıma eklendi ve 50ml'lik bir şırınga yardımıyla cam tabakalar arasındaki boşluğa jel çözeltisi boşaltıldı. Hemen ardından yükleme kuyucuklarını oluşturacak tarak, hava kabarcığı oluşturulmayacak şekilde jele yerleştirildi. Jel polimerleştikten sonra tarak çıkartıldı ve dikey elektroforez tankındaki yerine yerleştirildi. Tank, jeldeki kuyucukları ve çentikli cam tabakanın tamamını kapatacak düzeyde 1X TBE ile dolduruldu ve 2 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırılmış 10 µl PCR-RFLP ürünü jeldeki kuyucuklara yüklendi. Güç kaynağına bağlanan dikey elektroforez sistemi (OmniPAGE Maxi Dikey Elektroforez Sistemi, Cleaver Scientific, İngiltere) 100V elektrik akımı altında 16-18 saat yürütüldü. Elektroforez sonrasında jel etidyum bromürlü 1X TBE içerisinde 1-2 dakika bekletildi. Bantlar görüntüleme sistemi ile görüntülendi ve dijital olarak kaydedildi.

3.3.5. Gerçek Zamanlı PCR (*Real time* PCR-*TaqMan*) ile JAK2V617F Mutasyon Analizi

JAK2V617F mutasyonu gerçek zamanlı PCR aracılığıyla Taqman alelik ayırım analizi (*Taqman Allelic Discrimination Assay*) ile tespit edilmektedir. Alelik ayırım analizinde iki Taqman probu kullanılmaktadır. Bunlardan biri, doğal tip alele (mutant olmayan) diğeri ise mutasyonu tanıyan alele tam olarak uyum gösterir, bağlanır. Her bir prob farklı bildirici (*reporter*) floresan boya (FAM veya VIC) ile işaretlidir. Oluşan floresan sinyal her PCR döngüsünün sonunda toplanır ve örnekteki hedef dizinin (doğal tip alel/ mutasyonlu alel/ her iki alel) varlığını belirtir.

Çalışmamızda JAK2 MutaScreen™ Kit ve JAK2 V617F mutasyonu için referans ölçeği kullanılarak analiz yapıldı. Eksi 20°C'de saklanan JAK2 MutaScreen™ kitteki, 10X PPM-JAK2 V617F, 2X Prob PCR karışımı ve nükleaz-içermeyen H₂O' dan Tablo 3.9' da belirtilen oranlarda koyularak ana karışım oluşturuldu. Toplam örnek sayısına ek olarak 6 referans ölçeği, pozitif ve negatif kontroller hesaplanarak

hazırlanan ana karışım 200 µl'lik PCR tüplerine bölündü. Örneklerin numarası yazılı her bir PCR tüpüne örnekler için gDNA'lar eklendi. Buz üzerinde bekletilen belirli oranlarda mutasyonlu alel içeren referans ölçekleri ve kontroller de kendilerine ait PCR tüplerine eklendiler (Tablo 3.10). Kısa bir vorteksleme ve santrifüj işlemi sonrası örnekler gerçek zamanlı PCR cihazına (Rotor-Gene 6000, Corbett, Avustralya) yerleştirildi ve JAK2 programı başlatıldı.

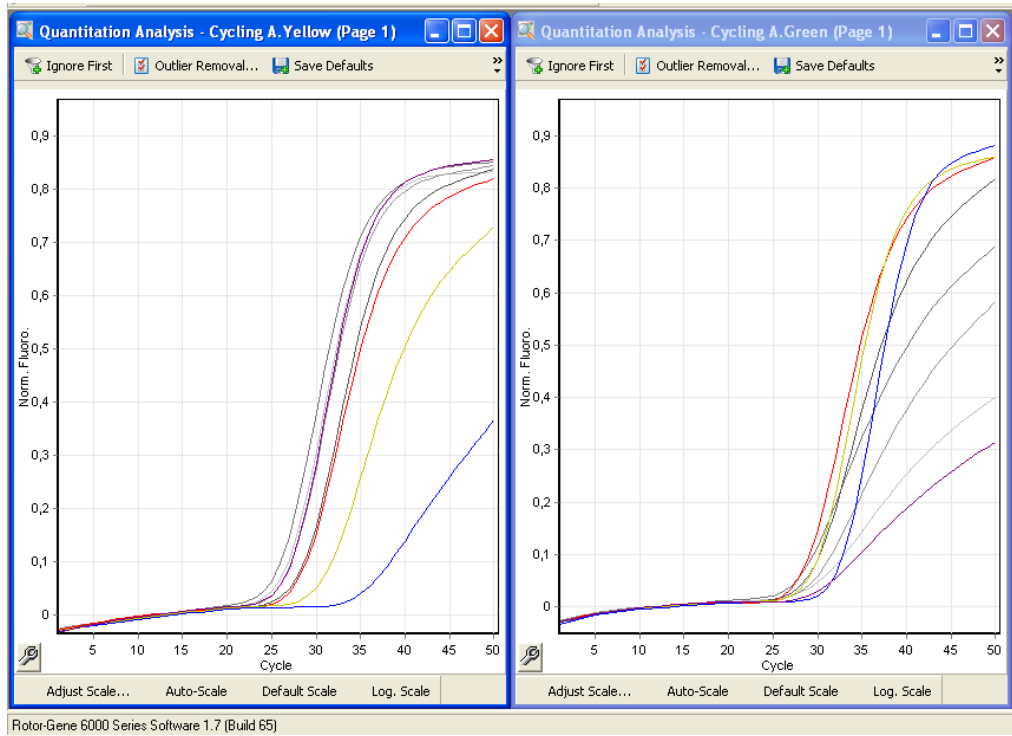
Tablo 3.9. JAK2 MutaScreen™ kitteki bileşenler, reaksiyon başına kullanım oranları.

Bileşenler	Son Konsantrasyon	Reaksiyon Başına
10X PPM-JAK2 V617F Karışımı (JAK2 genine özgül <i>forward</i> ve <i>reverse</i> primer, V617F FAM prob, doğal tip VIC prob)	1X	12,5µl
2X PCR Ana Karışımı	1X	2,5µl
Nükleaz-muaf H ₂ O		5µl
gDNA, Referans ölçekleri, Kontroller		5µl
	Toplam Hacim =	25

Tablo 3.10. Referans ölçekleri, pozitif ve negatif kontrollerin içeriği.

Örnek	Ad	İçerik
V617F Pozitif Kontrol	MP-VF	%100 Mutasyonlu Alel
V617F Negatif Kontrol	MN-VF	%0 Mutasyonlu Alel
Referans Ölçeği M1	M1-VF	%2 Mutasyonlu Alel (Tespit Sınırı)
Referans Ölçeği M2	M2-VF	%5 Mutasyonlu Alel
Referans Ölçeği M3	M3-VF	%12,5 Mutasyonlu Alel
Referans Ölçeği M4	M4-VF	%31 Mutasyonlu Alel
Referans Ölçeği M5	M5-VF	%50 Mutasyonlu Alel
Referans Ölçeği M6	M6-VF	%78 Mutasyonlu Alel

Program bitiminde iki probtan (V617F FAM prob, doğal tip VIC prob) elde edilen sinyaller ile iki kantitatif analiz grafiği elde edildi. Bunlardan Çevrim A.Sarı (*Cycling A. Yellow*) VIC probundan elde edilen sinyallerle oluşmuş ve doğal tip alelin amplifikasyon miktarını, diğeri Çevrim A.Yeşil (*Cycling A. Green*) ise FAM probundan elde edilen sinyallerle oluşmuş ve JAK2V617F mutasyonlu alellerin amplifikasyon miktarını göstermektedir. Örneklerin analizi her iki grafik karşılaştırılarak yapıldı. Çevrim A.Yeşil grafiğinden referans ölçeklerinin amplifikasyon miktarlarının M1'den M6'ya doğru arttığı, pozitif kontrolün en yüksek miktarda, negatif kontrolün en düşük miktarda amplifiye olduğu ve deneyin doğru çalıştığını göstermektedir (Şekil 3.13). Bilgisayar programının oluşturduğu grafiklerde ve sayısal veri tablosunda M1 referans ölçeği baz alınarak örneklerin mutasyon taşıyıp taşımadığı belirlendi ve alelik ayırım analizi yapıldı.



Şekil 3.3. Gerçek zamanlı PCR- Taqman probları ile JAK2V617F mutasyon analizinde referans ölçekleri, pozitif ve negatif kontrollerin amplifikasyonları sonucu elde edilmesi gereken grafik şekili.

3.5 Aferez Ürünü Yayma Preparatı Hazırlanması

Çalışmamızda aferez ürünlerinin içerdiği hücreler tiplerini görmek amacıyla yayma preparatı hazırlandı. Preparat hazırlanırken, temiz bir lamin uç kısmına bir damla aferez ürünü damlatıldı. İkinci bir lamin kısa kenarı, kan damlasının ortasına gelecek ve birinci lamla 30-35°'lik açı (yayma kalınlığını belirler) oluşturacak şekilde yerleştirildi. Hızlı, titreşimsiz, tek bir hareketle üstteki lam, yaymanın uzunluğu 2-3 cm olacak şekilde geriye doğru çekildi ve kurutulmaya bırakıldı. Bu sırada boyama çözeltisi hazırlandı.

Boyama çözeltisi için gerekli Sorenson's çözeltisi önceden hazırdır. Bir litre distile su içerisine 5.26 gr KH_2PO_4 , 8,65 gr NaH_2PO_4 katılıp pH'ı 7.00 'a ayarlanarak hazırlanan Sorenson's çözeltisi, +4°C 'de saklanır. Boyama çözeltisi hazırlanırken, 100 ml distile suya 0,5 ml Sorenson's çözeltisi eklenip karıştırıldı devamında bu karışıma 5 ml Giemsa boyası katıldı ve homojen bir karışım elde edildi.

Kuruyan yayma dikey şekilde şale içerisindeki ızgaralara yerleştirildi ve 5 dakika boyanmaya bırakıldı. Boyama bittikten sonra distile su yardımıyla, yayma üzerinde kalan boya artığı uzaklaştırıldı ve mikroskop altında incelendi.

3.6 İstatistiksel Analiz

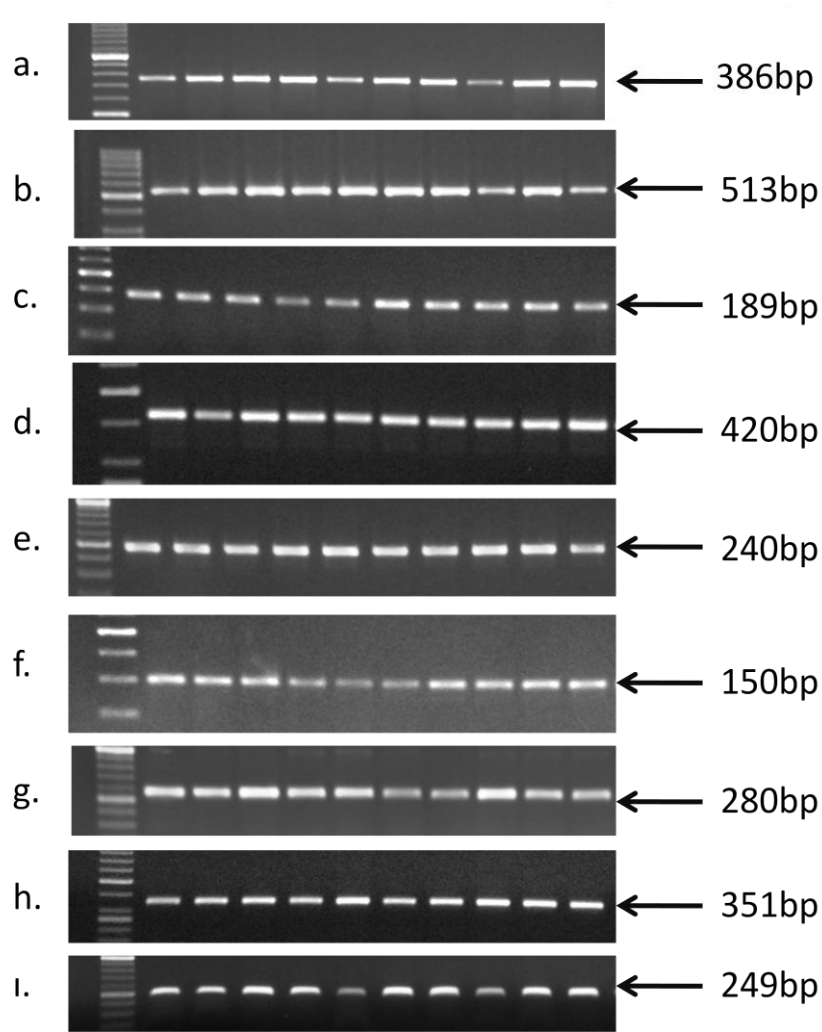
Hacettepe Üniversitesi KİT ünitesinde G-CSF almış bireyler G-CSF-R *missense* SNP sıklıkları sınıflandırıldı. SNP'leri majör alel homozigot genotipte taşıyan bireylerin G-CSF aldıktan sonraki aferez günlerindeki verileri (beyaz kan hücre, toplam mononükleer hücre, kilogram başına CD34^+ hücre sayıları) , tanılara göre gruplandırıldı. Ayrıca SNP'leri heterozigot veya minör alel homozigot genotip taşıyan bireylerin verileri toplama günlerine karşı ayrı ayrı grafiklendirildi. Bu istatistiksel analizler SPSS 13.0 (IBM) ve Microsoft Office Excel 2007 programları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.BULGULAR

4.1 G-CSF-R Geni *missense* SNP'lerini İçeren Polimorfik Bölgelerin Amplifikasyonu

G-CSF-R genindeki *missense* SNP'leri içeren polimorfik bölgeler tasarlanan primerler kullanılarak çoğaltıldı. PCR sonrasında oluşan ürün miktarını belirlemede %1'lik agaroz jel elektroforezi kullanıldı. PCR işlemi başarısız olan örnekler PCR işlemi optimize edilerek tekrar çalışıldı. PCR işlemi başarılı olan örnekler ait bantlar amplikon uzunluğuna göre (Bkz. Tablo 3.7) belirlendi (Şekil 4.1). Elde edilen PCR ürünleri taşıdıkları SNP'lere özgül kesim yapabilecek restriksiyon endonükleaz enzimleri ile muamele edilerek genotipik özellikleri belirlendi.

Çoğaltılan polimorfik bölgelerde PCR işlemi başarılı olan örneklerin toplam sayısı, PCR işlemi başarısız olan örnekler sahip bireylerin tanı ve cinsiyet özellikleri Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Çalışmamızda kullanılan toplam örnek sayısı ile elde edilen veri karşılaştırıldığında, aferez ürününden izole DNA'ların yaklaşık %90'ından PCR ürünü elde edilebilmiştir (Tablo 4.1).



Şekil 4.1. 10 temsili örneğe ait G-CSF-R genindeki polimorfik bölgelerin PCR

amplifikasyonu sonucu yürütülen bantların, 50 bp DNA büyüklük belirleyicisi ile agaroz jel elektroforez sonucu görülmektedir. a. Çoğaltılan g.6210428-6210803 DNA bölgesi b. Çoğaltılan g.6213468-6213980 DNA bölgesi c. Çoğaltılan g.6213891-6214079 DNA bölgesi d. Çoğaltılan g.6216362-6216780 DNA bölgesi e. Çoğaltılan g.6216991-6217230 DNA bölgesi f. Çoğaltılan g.6218091-6218240 DNA bölgesi g. Çoğaltılan g.6219301-6219580 DNA bölgesi h. Çoğaltılan g.6219661-6220011 DNA bölgesi i. Çoğaltılan g.6219661-6219909 DNA bölgesi.

Tablo 4.1. Aferez ürününden izole edilen DNA örneklerinin PCR başarısı oranı ve PCR sonucu amplikon görülmeyen başarısız PCR örneklerinin özellikleri gösterilmiştir.

Çoğaltılan Genomik DNA Bölgesi	Gen Üzerinde <i>missense</i> SNP	PCR'ı başarısız örnek sayısı	PCR'ı başarısız örnek sayısı		Başarılı PCR/ Toplam örnek sayısı (n)
		Birey tanısı (n)	Erkek	Kadın	
6210428-6210803	g.6210695 C>T	-	-	-	303/303 (%100)
6213468-6213980	g.6213664 T>C	MM:3,HL:2,NHL:1, AML:1, KLL:1	7	2	294/303 (%97)
6213468-6213980	g.6213811 C>T	MM:3,HL:2,NHL:1, AML:1, KLL:1	7	2	294/303 (%97)
6213891-6214079	g.6214055 G>A	Donör:5, HL:2, NHL:1, MM:1	6	3	294/303 (%97)
6216362-6216780	g.6216525 G>A	MM:11, HL:9, NHL:5, Donör:3, Germ hücreli:3, AML:1, Nöroblastom:1	19	14	270/303 (%89)
6216991-6217230	g.6217128 G>C	-	-	-	303/303 (%100)
6218091-6218240	g.6218218 T>C	Donör:2, MM:1	2	1	300/303 (%99)
6219301-6219580	g.6219430 G>A	Donör:2, NHL:1	-	3	300/303 (%99)
6219301-6219580	g.6219475 C>T	Donör:3, NHL:1	-	4	299/303 (%99)
6219661-6220011	g.6219871 C>T	Donör:4, MM:2, HL:2, AML:2, KLL:1	5	6	292/303 (%96)
6219661-6219909	g.6219886 G>A	Donör:6, MM:3, HL:3, NHL:1, AML:2, KLL:1	9	7	287/303 (%96)

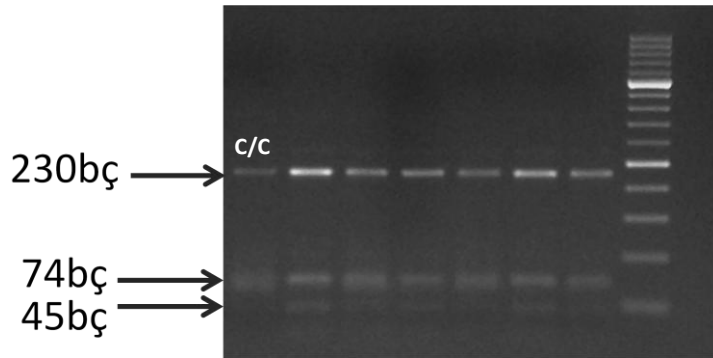
4.2 G-CSF-R Geni Amplikonlarının RFLP Analizi ile *missense* SNP'lerin Belirlenmesi

4.2.1 G-CSF-R Geni Üzerindeki g.6210695 C>T SNP Belirlenmesi

Birinci kromozomdaki G-CSF-R geni üzerine yerleşik g.6210695 C>T SNP'i (rs34362628) içermesi olasılığı olan 386 bç'lik amplikonunun RFLP analizi *XcmI* enzimi ile gerçekleştirildi.

Genomik g.6210695 konumunda sitozin nükleotidi içeren (C) alelde *XcmI* enzimi ile kesim sonucunda 27, 45, 75, 230 bç, timin nükleotidi içeren (T) alel varlığında ise 27, 119, 230 bç uzunluğundaki kesim ürünleri ortaya çıkar (Bkz. Tablo 3.7). Çalışmamızda %2,5'luk ya da %2'lik agaroz jelde yürütme sonucu en küçük kesim ürünü olan 27 bç'lik parça görüntülenemese de polimorfizm tespiti için diğer kesim ürünleri arası farktan elde edilen bilgi yeterli olmuştur (Şekil 4.2).

Sonuç olarak RFLP analizi yapılan örneklerde homozigot C alelinin varlığı belirlendi. Çalışılan 303 bireyde G-CSF-R'nin İmmüoglobulin benzeri (*Ig-like*) bölgesinde yer alan, amino asit düzeyinde Prolin>Lösin değişimine neden olan g.6210695 C>T polimorfizminin %100 C/C genotipinde olduğu bulundu.



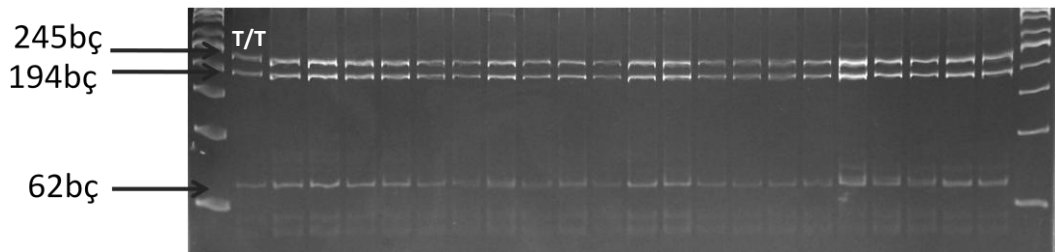
Şekil 4.2. Temsili 7 örneğe ait *XcmI* enzimi ile RFLP analizi sonucu oluşan parçaların agaroz jel elektroforezi görüntüsü görülmektedir. Bantın üstünde genotip değerlendirmesi belirtilmiştir. Jelde 50 bç'lik DNA boyut belirteci kullanılmıştır.

4.2.2 G-CSF-R Geni Üzerindeki g.6213664 T>C SNP Belirlenmesi

Birinci kromozomdaki G-CSF-R geni üzerine yerleşik g.6213664 C>T SNP'i (rs3917973) içermesi olasılığı olan 513 bç'lik amplikonunun RFLP analizi *Hin1II* enzimi ile gerçekleştirildi.

Genomik g.6213664 konumunda timin nükleotidi içeren (T) alelde *Hin1II* enzimi ile amplikon kesilince 194, 12, 62, 245 bç, sitozin nükleotidi içeren (C) alel varlığında ise 206, 62, 245 bç uzunluğundaki parçalar ortaya çıkar (Bkz. Tablo 3.7). Çalışmamızda %20'lik poliakrilamid jelde yürütülme sonucunda bantlar halinde görülmesi beklenen kesim ürünlerinden 12 bç'lik parça görüntülenememiştir (Şekil 4.3).

Sonuç olarak RFLP analizi yapılan örneklerde homozigot T alelinin varlığı belirlendi. Çalışılan 294 bireyde G-CSF-R'nin sitokin reseptör homoloji bölgesinde yer alan, amino asit düzeyinde Metiyonin>Treonin değişimine neden olan g.6213664 T>C polimorfizminin %100 T/T genotipinde olduğu görüldü.



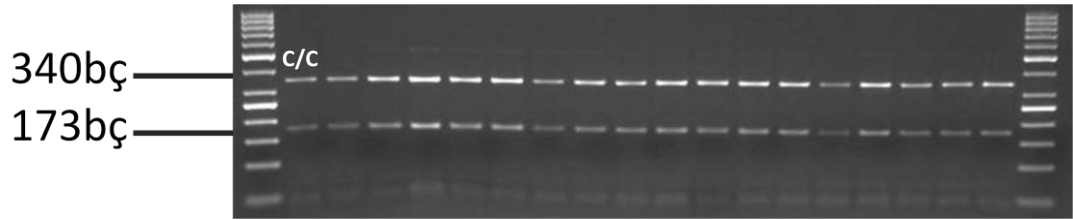
Şekil 4.3 Temsili 22 örnekte *Hin1II* enzimi ile RFLP analizi sonucu oluşan parçaların poliakrilamid jel elektroforezi görüntüsü görülmektedir. Bantın üstünde genotip değerlendirmesi belirtilmiştir. Jelde 50 bç'lik DNA boyut belirteçi kullanılmıştır. 50 bç altında silik görülen bantlar primer dimerlerinin enzim ile reaksiyonunda kaynaklanmaktadır.

4.2.3 G-CSF-R Geni Üzerindeki g.6213811 C>T SNP Belirlenmesi

Birinci kromozomdaki G-CSF-R geni üzerine yerleşik g.6213811 C>T SNP'i (rs34845290) içermesi olasılığı olan 513 bç'lik ampliconunun RFLP analizi *Bgl*I enzimi ile gerçekleştirildi.

Genomik g.6213811 konumunda sitozin nükleotidi içeren (C) alelde *Bgl*I enzimi ampliconu 340, 173 bç'lik parçalara keser. Aynı konumda timin nükleotidi içeren (T) alel varlığında 513bç'lik amplicon *Bgl*I enziminin tanıma bölgesini içermediğinden kesim gerçekleşmemektedir (Bkz. Tablo 3.7) (Şekil 4.4).

Sonuç olarak RFLP analizi yapılan örneklerde homozigot C alelinin varlığı belirlendi. Çalışılan 294 bireyde G-CSF-R'ın fibronektin tip III bölgesinde yer alan, amino asit düzeyinde Alanin>Valin değişimine neden olan g.6213811 C>T polimorfizminin %100 C/C genotipinde bulunduğu saptandı.

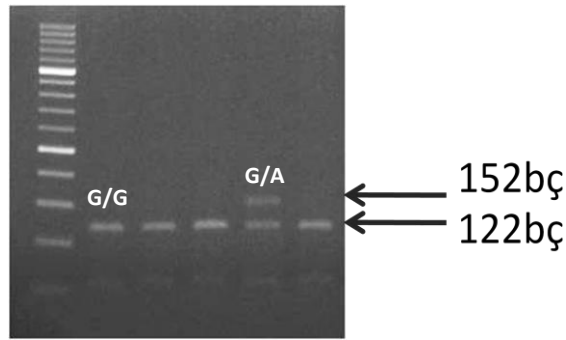


Şekil 4.4. Temsili 18 örnekte *Bgl*I enzimi ile RFLP analizi sonucu oluşan parçaların agaroz jel elektroforezi görüntüsü görülmektedir. Bantın üstünde genotip değerlendirmesi belirtilmiştir. Jelde 50 bç'lik DNA boyut belirteci kullanılmıştır.

4.2.4 G-CSF-R Geni Üzerindeki g.6214055 G>A SNP Belirlenmesi

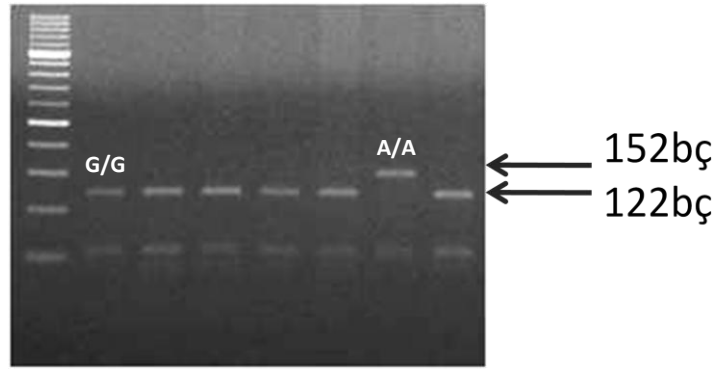
Birinci kromozomdaki G-CSF-R geni üzerine yerleşik g.6214055 G>A SNP'i (rs3918018) içermesi olasılığı olan 189 bç'lik ampliconunun RFLP analizi *Mly*I enzimi ile gerçekleştirildi.

Genomik g.6214055 konumunda Guanin nükleotidi içeren (G) alel içeren ampikon *MlyI* enzimi ile kesime uğradığında 37, 30 122 bç, adenin nükleotidi içeren (A) alel varlığında ise 37, 152 bç uzunluğundaki parçalar ortaya çıkar (Bkz. Tablo 3.7). Heterozigot bireylerde ise bu iki durum birlikte görülür. Çalışmamızda %2'lik agaroz jelde yürütme sonucu en küçük kesim ürünleri 37 ve 30 bç'lik parçalar görüntülenememiştir. Nükleotide göre oluşan 122 ve 152 bç'lik kesim ürünleri arasındaki farka göre polimorfizm tespiti yapılmıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Homozigot G/G genotipteki Temsili 4 ve heterozigot G/A genotipteki 1 örneğin *MlyI* enzimi ile RFLP analizi sonucu agaroz jelde görülmektedir. Bantların üstünde genotip değerlendirmeleri belirtilmiştir. Jelde 50 bç'lik DNA boyut belirteci kullanılmıştır. 50 bç altında silik görülen bantlar primer dimerlerlerinden kaynaklanmaktadır.

Sonuç olarak RFLP analizi yapılan 294 örnekten 289'unda homozigot G alelinin varlığı belirlendi. Geriye kalan örneklerden ise 4'ünün heterozigot (G/A genotipi) (Bkz. Şekil 4.5) , 1 tanesinin A aleli homozigot olduğu (A/A genotipi) tespit edildi (Şekil 4.6). Toplamda çalışılan 294 bireyde G-CSF-R'ın *WSXWS* korunmuş bölgesinde yer alan, amino asit düzeyinde Aspartik asit>Asparagin değişimine neden olan g.6214055 G>A polimorfizminin %97,3 homozigot G/G, %1,36 heterogizot G/A, %0,34 homozigot A/A genotipinde olduğu görüldü.



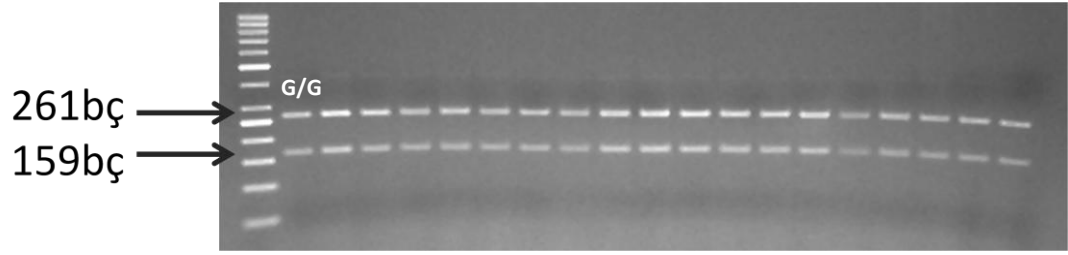
Şekil 4.6. Homozigot G/G genotipteki temsili 6 örnek ve homozigot A/A gentipteki 1 örneğin *MlyI* enzimi ile RFLP analizi sonucu agaroz jelde görülmektedir. Bantların üstünde genotip değerlendirmeleri belirtilmiştir. Jelde 50 bç'lik DNA boyut belirteçi kullanılmıştır. 50bç altında silik görülen bantlar primer dimerlerlerinden kaynaklanmaktadır.

4.2.5 G-CSF-R Geni Üzerindeki g.6216525 G>A SNP Belirlenmesi

Birinci kromozomdaki G-CSF-R geni üzerine yerleşik g.6216525 G>A SNP'i (rs3918020) içermesi olasılığı olan 420 bç'lik amplikonunun RFLP analizi *BsaI* enzimi ile gerçekleştirildi.

Genomik g.6216525 konumunda guanin nükleotidi içeren (G) alel içeren amplikon *BsaI* enzimi ile kesime uğradığında 159, 261 bç parçalar ortaya çıkar. Aynı konumda adenin nükleotidi içeren (A) alel varlığında 420 bç'lik amplikon *BsaI* enziminin tanıma bölgesini içermediğinden kesim gerçekleşmemektedir (Bkz. Tablo 3.7) (Şekil 4.7).

Sonuç olarak RFLP analizi yapılan örneklerde homozigot G alelinin varlığı belirlendi. Çalışılan 270 bireyde G-CSF-R'in fibronektin tip III bölgesinde yer alan amino asit düzeyinde Arginin>Glutamin değişimine neden olan g.6216525 G>A polimorfizmi çalışma grubumuzda %100 G/G genotipinde olduğundan A alel frekansı sıfır olarak tespit edildi. PCR –RFLP sonuçlarına elde edilemeyen 33 örneğin daha sonra yeniden analiz edilmesine karar verilmiştir.

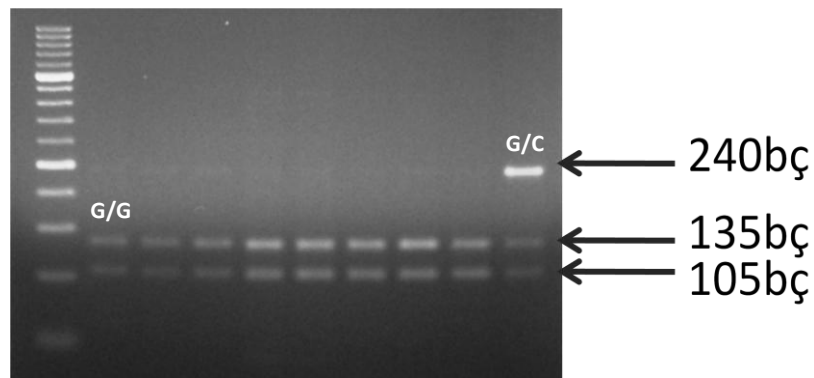


Şekil 4.7. Temsili 19 örnekte *BsaI* enzimi ile RFLP analizi sonucu oluşan parçaların agaroz jel elektroforezi görüntüsü görülmektedir. Bantın üstünde genotip değerlendirmesi belirtilmiştir. Jelde 50 bç'lik DNA boyut belirteci kullanılmıştır.

4.2.6 G-CSF-R Geni Üzerindeki g.6217128 G>C SNP Belirlenmesi

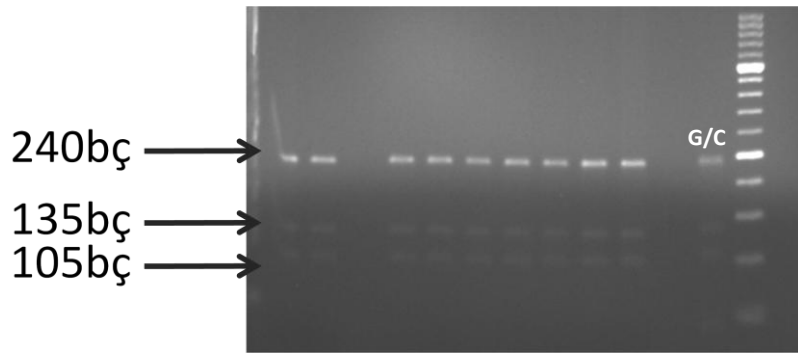
Birinci kromozomdaki G-CSF-R geni üzerine yerleşik g.6217128 G>C SNP'i (rs3917991) içermesi olasılığı olan 240 bç'lik ampikonunun RFLP analizi *BstNI* enzimi ile gerçekleştirildi.

Genomik g.6217128 konumunda guanin nükleotidi içeren (G) alel *BstNI* enzimi ile kesime uğradığında 135, 105 bç parçalar ortaya çıkar. Sitozin nükleotidi içeren (C) alel varlığında ise 240 bç'lik ampikon *BstNI* enziminin tanıma bölgesini içermediğinden kesim gerçekleşmemektedir (Bkz. Tablo 3.7) (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. Homozigot G/G genotipteki temsili 8 örnek ve heterozigot G/C genotipteki 1 örneğin *BstNI* enzimi ile RFLP analizi sonucu agaroz jelde görülmektedir. Bantların üstünde genotip değerlendirmeleri belirtilmiştir. Jelde 50 bç'lik DNA boyut belirteci kullanılmıştır.

Sonuç olarak RFLP analizi yapılan 303 örnekten 293'ünde homozigot G alelinin varlığı belirlendi. Geriye kalan 10 örneğin ise heterozigot (G/C genotipi) olduğu tespit edildi (Şekil 4.9). Toplamda çalışılan 303 bireyde G-CSF-R'ın fibronektin tip III bölgesinde yer alan, amino asit düzeyinde Asparagin>Histidin değişimine neden olan g.6217128 G>C polimorfizminin genotip frekanslarının %96,7 homozigot G/G, %3,3 heterogizot G/C olarak bulunduğu saptandı.



Şekil 4.9. Heterozigot G/C genotipteki 10 örneğin *BstNI* enzimi ile RFLP analizi sonucu agaroz jelde görülmektedir. Bantın üstünde genotip değerlendirmesi belirtilmiştir. Jelde 50 bç'lik DNA boyut belirteci kullanılmıştır.

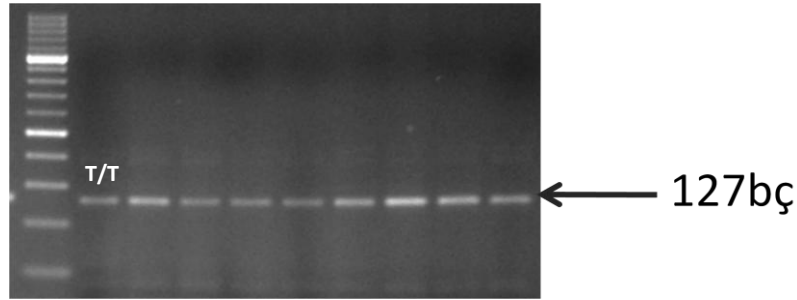
4.2.7. G-CSF-R Geni Üzerindeki g.6218218 T>C SNP Belirlenmesi

Birinci kromozomdaki G-CSF-R geni üzerine yerleşik g.6218218 T>C SNP'i (rs3917996) içermesi olasılığı olan 150 bç'lik ampliconunun RFLP analizi *Sfcl* enzimi ile gerçekleştirildi.

Genomik g.6218218 konumunda timin nükleotidi içeren (T) alel *Sfcl* enzimi ile kesime uğradığında 127, 23 bç'lik parçalar ortaya çıkar. Aynı konumda sitozin nükleotidi içeren (C) alel varlığında 150 bç'lik amplicon *Sfcl* enziminin tanıma bölgesini içermediğinden kesim gerçekleşmemektedir (Bkz. Tablo 3.7). Çalışmamızda %2'lik agaroz jelde yürütülme sonucunda bantlar halinde görülmesi beklenen kesim ürünlerinden 23 bç'lik parça görüntülenememiştir. Nükleotide göre

oluşan 127 ve 150 bç'lik kesim ürünleri arasındaki farka göre polimorfizm tespiti yapılmıştır (Şekil 4.10).

Sonuç olarak PCR-RFLP analizi başarısız olan 6 örnek haricinde çalışılan 297 örnekte homozigot G alelinin varlığı belirlendi. G-CSF-R'ın fibronektin tip III bölgesinde yer alan, amino asit düzeyinde Tirozin>Histidin değişimine neden olan g.6218218 T>C polimorfizminin %100 T/T genotipinde bulunduğu görüldü.

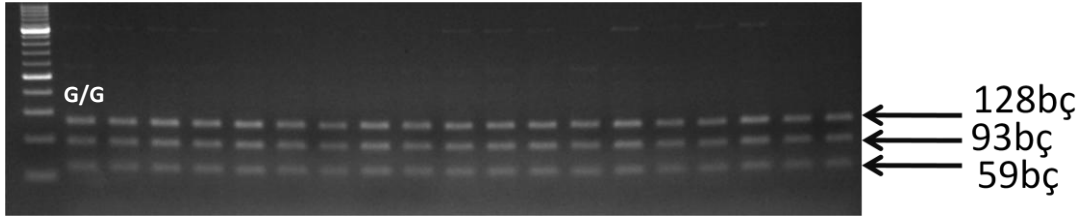


Şekil 4.10. Temsili 9 örnekte *SfcI* enzimi ile RFLP analizi sonucu oluşan parçaların agaroz jel elektroforezi görüntüsü görülmektedir. Bantın üstünde genotip değerlendirmesi belirtilmiştir. Jelde 50 bç'lik DNA boyut belirteçi kullanılmıştır.

4.2.8 G-CSF-R Geni Üzerindeki g.6219430 G>A SNP Belirlenmesi

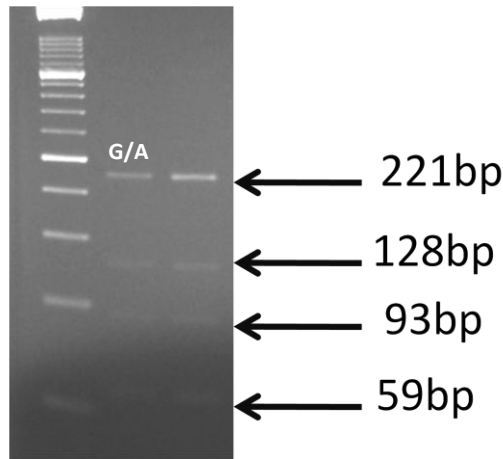
Birinci kromozomdaki G-CSF-R geni üzerine yerleşik g.6219430 G>A SNP'i (rs3918001) içermesi olasılığı olan 280bç'lik amplikonunun RFLP analizi *MspI* enzimi ile gerçekleştirildi.

Genomik g.6219430 konumunda guanin nükleotidi içeren (G) alelde *MspI* enzimi amplikonu 128, 93, 59 bç'lik üç parçaya, adenin nükleotidi içeren (A) alel varlığında ise 221, 59 bç'lik iki parçaya keser (Bkz. Tablo 3.7) (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Temsili 19 örnekte *MspI* enzimi ile RFLP analizi sonucu oluşan parçaların agaroz jel elektroforezi görüntüsü görülmektedir. Bantın üstünde genotip değerlendirilmesi belirtilmiştir. Jelde 50 bç'lik DNA boyut belirteçi kullanılmıştır.

Sonuç olarak RFLP analizi yapılan örneklerden 298'inin homozigot G aleli taşıdığı, 2 örneğin ise heterozigot (G/A genotipi) olduğu belirlendi (Şekil 4.12). Toplamda çalışılan 300 bireyde G-CSF-R'nin hücre içi bölgesinde yer alan amino asit düzeyinde Glisin>Arginin değişimine neden olan g.6219430 G>A polimorfizminin %99,34 homozigot G/G, %0,66 heterogizot G/A genotipinde bulunduğu görüldü.

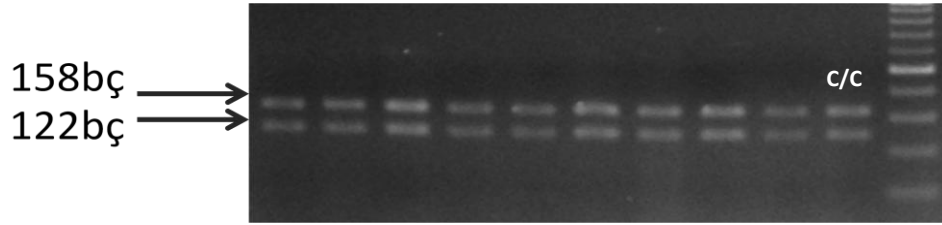


Şekil 4.12. Heterozigot G/A genotipteki 2 örneğin *MspI* enzimi ile RFLP analizi sonucu agaroz jelde görülmektedir. Bantın üstünde genotip değerlendirilmesi belirtilmiştir. Jelde 50 bç'lik DNA boyut belirteçi kullanılmıştır.

4.2.9. G-CSF-R Geni Üzerindeki g.6219475 C>T SNP Belirlenmesi

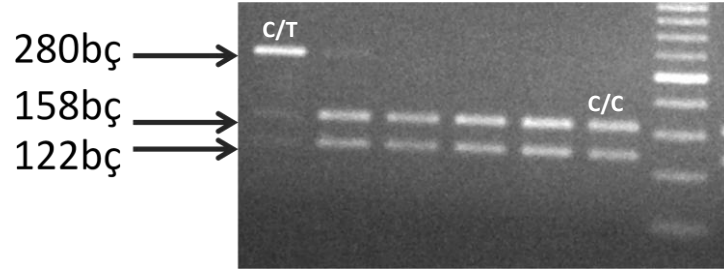
Birinci kromozomdaki G-CSF-R geni üzerine yerleşik g.6219475 C>T SNP'i (rs3918021) içermesi olasılığı olan 280 bç'lik ampliconunun RFLP analizi *BceAI* enzimi ile gerçekleştirildi.

Genomik g.6219475 konumunda sitozin nükleotidi içeren alel varlığında *BceAI* enzimi ampliconu 158, 122 bç'lik parçalara keser. Aynı konumda timin nükleotidi içeren (T) alel varlığında 280 bç'lik amplicon *BceAI* enziminin tanıma bölgesini içermediğinden kesim gerçekleşmemektedir (Bkz. Tablo 3.7) (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Temsili 10 örnekte *BceAI* enzimi ile RFLP analizi sonucu oluşan parçaların agaroz jel elektroforezi görüntüsü görülmektedir. Bantın üstünde genotip değerlendirmesi belirtilmiştir. Jelde 50 bç'lik DNA boyut belirteçi kullanılmıştır.

Sonuç olarak RFLP analizi yapılan örneklerden 298'inin homozigot C aleli taşıdığı, 1 örneğin ise heterozigot (C/T genotipi) olduğu belirlendi (Şekil 4.14). Toplamda çalışılan 299 bireyde G-CSF-R'nin hücre içi bölgesinde yer alan amino asit düzeyinde Arginin>Sistein değişimine neden olan g.6219475 C>T polimorfizminin genotip frekanslarının %99,67 C/C, %0,33 heterogizot C/T olarak dağıldıkları tespit edildi.



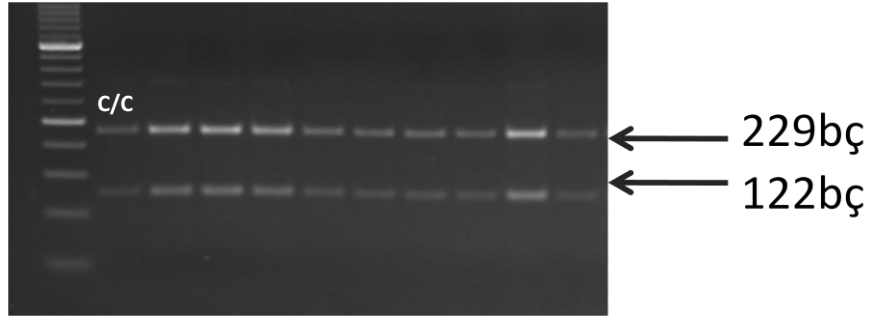
Şekil 4.14. Homozigot C/C genotipteki temsili 5 örnek ve heterozigot C/T genotipteki 1 örneğin *BceAI* enzimi ile RFLP analizi sonucu agaroz jelde görülmektedir. Bantın üstünde genotip değerlendirmesi belirtilmiştir. Jelde 50 bp'lik DNA boyut belirteçi kullanılmıştır.

4.2.10. G-CSF-R Geni Üzerindeki g.6219871 C>T SNP Belirlenmesi

Birinci kromozomdaki G-CSF-R geni üzerine yerleşik g.6219871 C>T SNP'i (rs35622214) içermesi olasılığı olan 351 bp'lik amplikonunun RFLP analizi *DdeI* enzimi ile gerçekleştirildi.

Genomik g.6219871 konumunda sitozin nükleotidi içeren (C) alelini içeren amplikon *DdeI* enzimi ile kesime uğradığında 122, 229 bp, timin nükleotidi içeren (T) alel varlığında 122, 88, 141 bp uzunluğundaki kesim ürünleri ortaya çıkar (Bkz. Tablo 3.7) (Şekil 4.15).

Sonuç olarak PCR-RFLP analizi başarısız olan 13 örnek haricinde çalışılan 292 örnekte homozigot C alelinin varlığı belirlendi. G-CSF-R'in hücre içi bölgesinde yer alan, amino asit düzeyinde Prolin>Serin değişimine neden olan g.6219871 C>T polimorfizmi çalışma grubumuzda %100 C/C genotipinde olduğundan T alel frekansı tespit edilemedi. PCR –RFLP sonuçlarına elde edilemeyen 12 örneğin daha sonra yeniden analiz edilmesine karar verilmiştir.



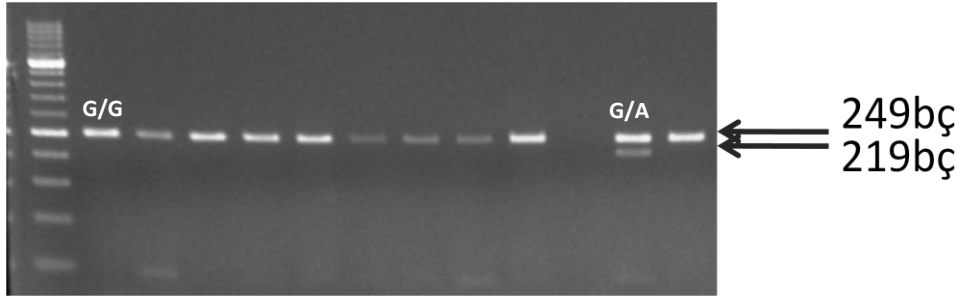
Şekil 4.15. Temsili 10 örnekte *DdeI* enzimi ile RFLP analizi sonucu oluşan parçaların agaroz jel elektroforezi görüntüsü görülmektedir. Bantın üstünde genotip değerlendirilmesi belirtilmiştir. Jelde 50 bç'lik DNA boyut belirteci kullanılmıştır.

4.2.11. G-CSF-R Geni Üzerindeki g.6219886 G>A SNP Belirlenmesi

Birinci kromozomdaki G-CSF-R geni üzerine yerleşik g.6219886 G>A SNP'i (Wölfler.(23)) içerme olasılığı olan 249 bç'lik ampliconunun RFLP analizi *HpyAv* enzimi ile gerçekleştirildi.

Genomik g.6219886 konumunda guanin nükleotidi içeren (G) alelde *HpyAv* enzimi için bir tanıma bölgesi oluşmamaktadır ve amplicon kesimi gerçekleşmemektedir. Aynı konumda adenin nükleotidi içeren (A) alel varlığında *HpyAv* enzimi 249 bç'lik ampliconu 30, 219 bç uzunluğundaki parçalara keser (Bkz. Tablo 3.7)(Şekil 4.16).

Sonuç olarak RFLP analizi yapılan örneklerden 285'inin homozigot G aleli taşıdığı, 2 örneğin ise heterozigot olduğu belirlendi (Bkz. Şekil 4.16). Toplamda çalışılan 287 bireyde G-CSF-R'ın hücre içi bölgesinde yer alan amino asit düzeyinde Glutamik asit>Lizin değişimine neden olan g.6219886 G>A polimorfizminin, %99,31 G/G , %0,69 heterozigot G/A genotipinde dağıldığı görüldü.



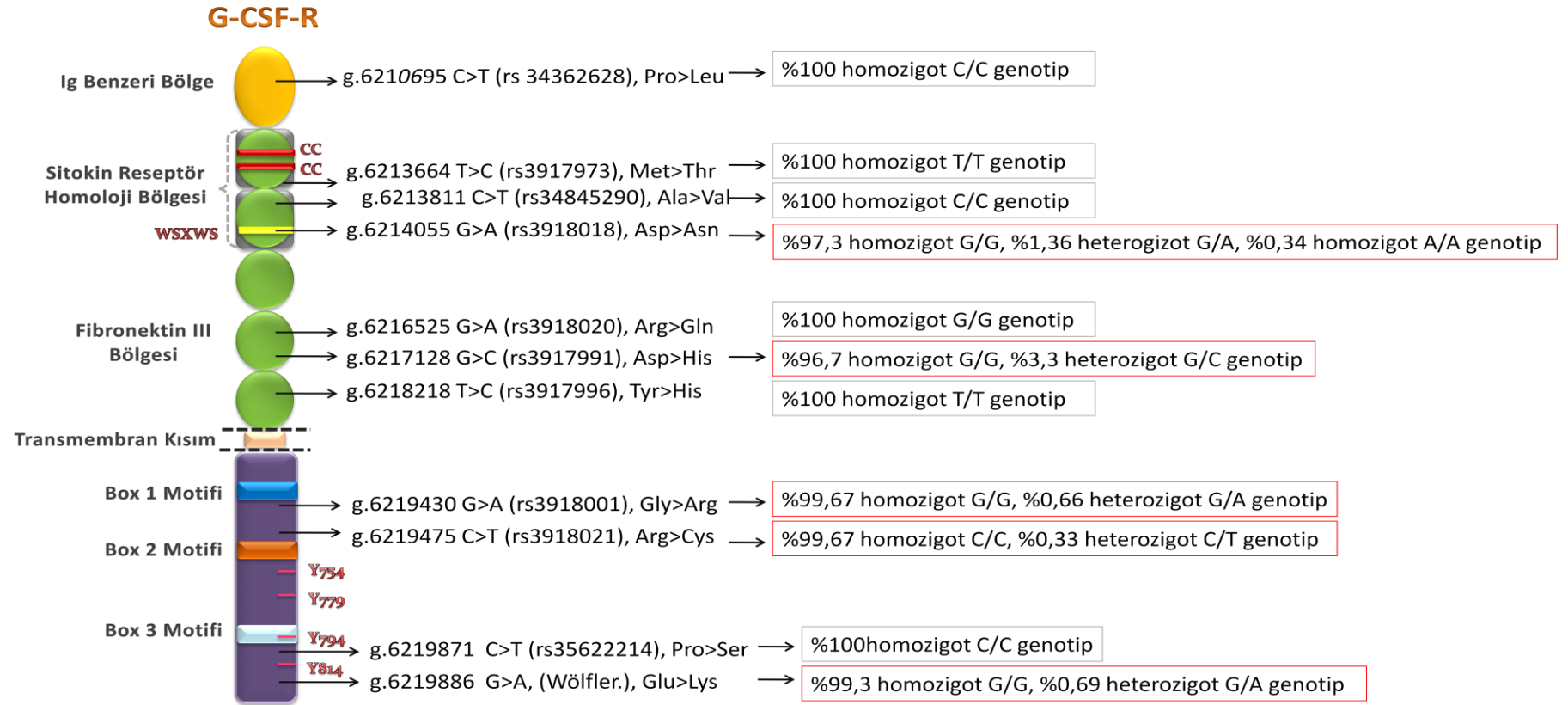
Şekil 4.16. Homozigot G/G genotipteki temsili 10 örnek ve heterozigot G/A

genotipteki 1 örneğin *HpyAv* enzimi ile RFLP analizi sonucu agaroz jelde görülmektedir. Bantların üstünde genotip değerlendirmeleri belirtilmiştir. Jelde 50 bç'lik DNA boyut belirteçi kullanılmıştır.

Bu çalışmada G-CSF uygulanmış bireylerde G-CSF-R geni üzerinde bulunma olasılığı olan 16 *missense* SNP'ten 11'i taranmıştır. Çalışma grubundaki 20 kişide SNP varlığı tespit edilerek, taranan 11 SNP'ten 5'inin polimorfik olduğu bulunmuştur. SNP taramasında kullanılan çalışma grubumuz ile ilk defa Türk popülasyonunda G-CSF-R geni SNP sıklığı hakkında bir fikir sahibi olunmuştur. G-CSF-R genindeki 11 *missense* SNP'in genotip dağılımları Tablo 4.2'de gösterilmektedir. G-CSF-R proteininin farklı işlevsel bölgelerine düşen *missense* SNP'ler, heterozigot ve minör aleli homozigot genotipte olan SNP'lerin dağılımları 4.17'de şematize edilmiştir.

Tablo 4.2. G-CSF-R geni üzerindeki missense SNP'lerin genotip frekansları gösterilmektedir. *(23)

Gen Üzerindeki <i>missense</i> SNP	Toplam Birey Sayısı (n)	Birey Sayısına Göre Genotip Dağılım (n)	% Genotip Dağılım	Genotip
g.6210695 C>T (rs34362628)	303	303/303	%100	homozigot C/C genotip
g.6213664 T>C (rs3917973)	294	294/294	%100	homozigot T/T genotip
g.6213811 C>T (rs34845290)	294	294/294	%100	homozigot C/C genotip
g.6214055 G>A (rs3918018)	294	289/294	%97,3	homozigot G/G genotip
		4/294	%1,36	heterozigot G/A genotip
		1/294	%0,34	homozigot A/A genotip
g.6216525 G>A (rs3918020)	270	270/270	%100	homozigot A/A genotip
g.6217128 G>C (rs3917991)	303	293/303	%96,7	homozigot G/G genotip
		10/303	%3,3	heterozigot G/C genotip
g.6218218 T>C (rs3917996)	297	297/297	%100	homozigot T/T genotip
g.6219430 G>A (rs3918001)	300	298/300	%99,4	homozigot G/G genotip
		2/300	%0,66	heterozigot G/A genotip
g.6219475 C>T (rs3918021)	299	298/299	%99,67	homozigot C/C genotip
		1/299	%0,33	heterozigot C/T genotip
g.6219871 C>T (rs35622214)	292	292/292	%100	homozigot C/C genotip
g.6219886 G>A (Wölfler.)*	287	285/287	%99,31	homozigot G/G genotip
		2/287	%0,69	heterozigot G/A genotip

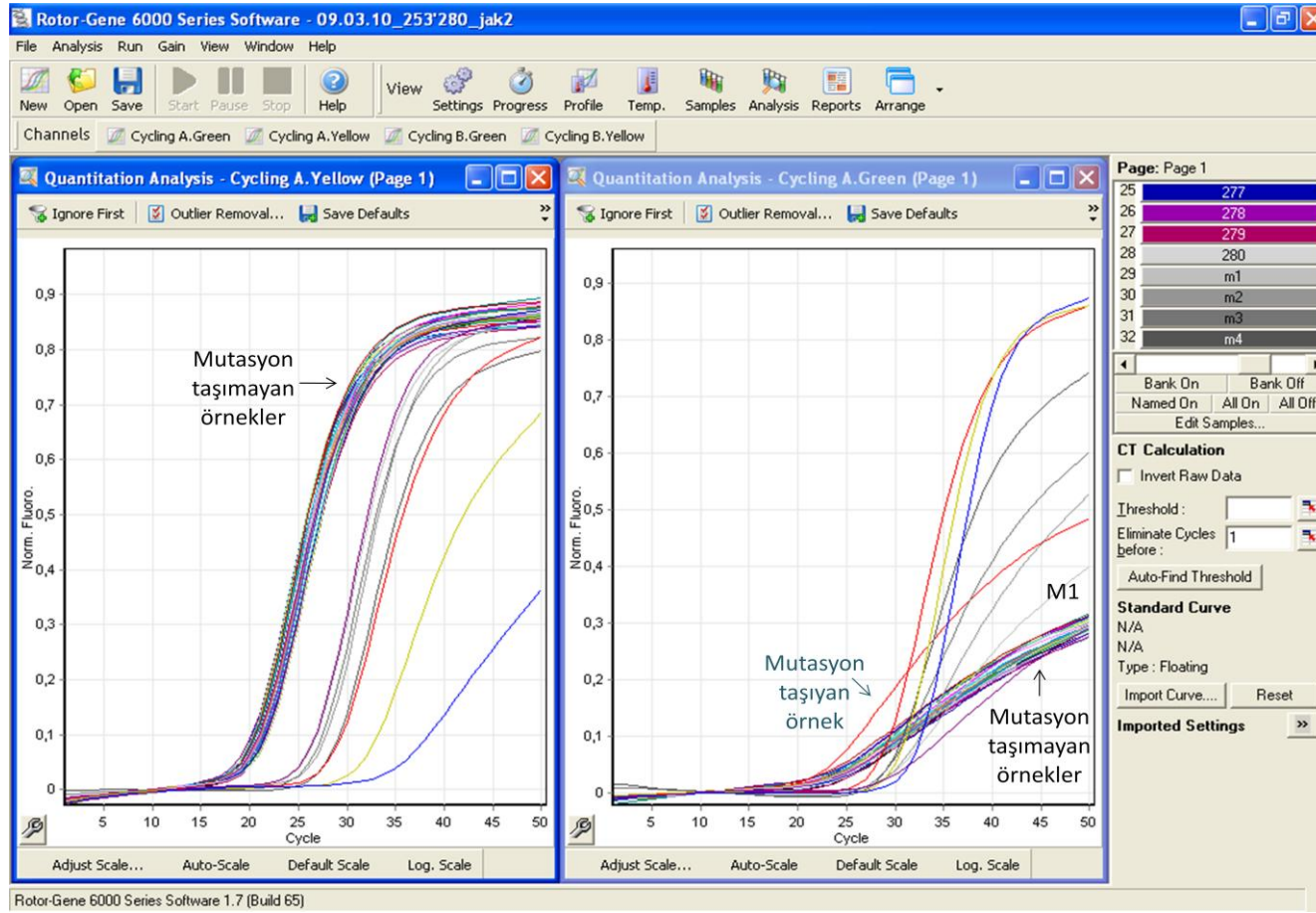


Şekil 4.17. PCR-RFLP analizi ile taranan 11 *missense* SNP, neden oldukları amino asit değişimleri, protein pozisyonları (22), heterozigot ve minör aleli homozigot genotipte olan SNP'lerin dağılımı en uzun formdaki G-CSF-R proteini (*izoform c*) üzerinde gösterilmiş, SNP'lerin protein yapısında denk geldikleri bölgeler şematize edilmiştir.

4.3. G-CSF Verilmiş Olan Bireylerde JAK2V617F Mutasyon Analizi

G-CSF verilmiş, farklı hematolojik malignansi tiplerini, solid tümörleri taşıyan hastalar ve sağlıklı donörlerden oluşan çalışma grubumuzda JAK2V617F mutasyon analizi gerçekleştirildi. Buna göre toplamda 303 bireyden yalnızca birinde (%0,33) JAK2V617F mutasyonu tespit edildi.

Gerçek zamanlı PCR cihazında mutasyon analizi için kullanılan JAK2 programı bittiğinde elde edilen iki kantitatif analiz grafiği Şekil 4.18'de görülmektedir. Özellikle JAK2V617F mutasyonlu alellerin amplifikasyon miktarını gösteren çevrim A.Yeşil grafiğinde bir örneğin amplifikasyon eğrisinin tespit sınırı kabul edilen M1 referans ölçeğinden daha yüksekte olduğu görülmektedir. Hesaplanan mutant alel/doğal alel amplifikasyon oran bilgileri kullanılarak, oran değeri, M1 referans ölçek değerinden yüksek olan örneğin mutasyonlu alel taşıdığı, M1 referans değerden düşük oran değerine sahip örneklerin ise mutasyonlu alel taşımadığı tespit edildi (Tablo 4.3).



Şekil 4.18. Gerçek zamanlı PCR ile gerçekleştirilen JAK2V617F mutasyon analiz grafiklerinde temsili 27 mutasyon taşımayan, 1 mutasyon taşıyan örnek görülmektedir. M1: M1 referans ölçeğinin amplifikasyon eğrisi.

Tablo 4.3. Gerçek zamanlı PCR ile gerçekleştirilen JAK2V617F mutasyon analizi

sayısal veri tablosunda referans ölçeklerinin (m1-m6) mutasyonlu alel taşıma oranlarına göre FAM/VIC oranlarının çoğalarak arttığı, 253.örneğin FAM/VIC oranının (kırmızı halka) M1 referans ölçeğinin oran değerinden (yeşil halka) yüksek olduğu görülmektedir.

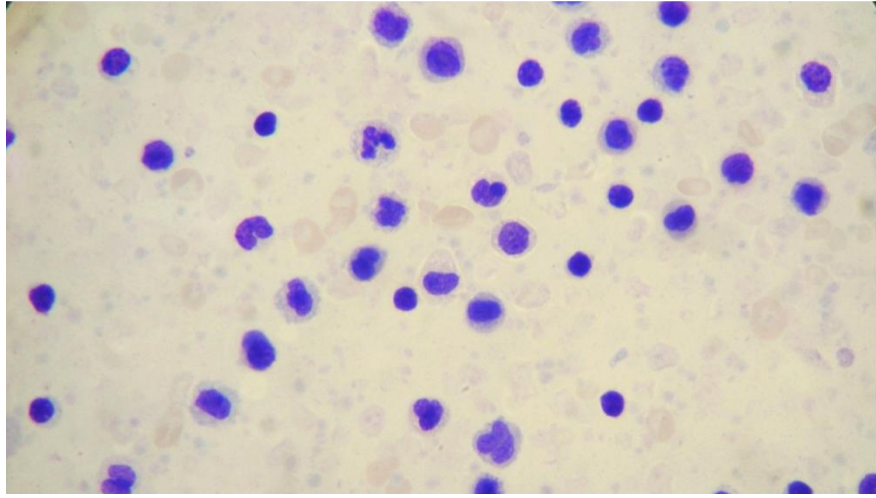
Örnek	Fluo FAM (M) (Green)	Fluo VIC (W) (Yellow)	FAM/VIC
253	18.00455591	39.37012937	0.46
254	11.34105004	39.08652955	0.29
255	11.09737799	36.97272743	0.30
256	11.81862109	42.25909819	0.28
257	11.56440579	41.02845808	0.28
258	11.85105399	43.80674449	0.27
259	11.98016327	44.03404942	0.27
260	11.48300086	43.21527937	0.27
261	11.41832609	43.45954724	0.26
262	12.23830777	44.0743936	0.28
263	11.20059158	40.82900086	0.27
264	11.40745403	39.59814276	0.29
265	11.4571276	41.85620133	0.27
266	12.44874604	43.79753458	0.28
267	12.5654524	43.91056033	0.29
268	11.13287338	40.22571615	0.28
269	11.62823301	42.45324381	0.27
270	11.48499627	42.66378925	0.27
271	11.47872638	41.58541238	0.28
272	12.40339132	45.23317693	0.27
273	10.93080034	39.47149929	0.28
274	10.92371579	40.04683346	0.27
275	10.78240635	39.2381679	0.27
276	11.59278757	43.17184202	0.27
277	11.46421214	43.18392208	0.27
278	10.60537235	39.19859617	0.27
279	10.48742402	37.83181037	0.28
280	11.22209506	42.02698499	0.27
m1	14.69982961	41.47361461	0.35
m2	20.53079598	42.09302917	0.49
m3	22.40863661	35.89292526	0.62
m4	29.87454904	32.10269322	0.93
m5	44.9485008	38.61023008	1.16
m6	43.1412392	26.76192656	1.61
positive	42.00478116	11.54446733	3.64
negative	10.75408912	38.7206836	0.28

Mutant alel

Artan mutant
DNA oranları

4.4 Aferez Ürünü Yayma Preparatının İncelenmesi

Çalışma grubunda G-CSF verilmiş bireylerden birinin aferez ürününden yayma preparatı hazırlandı. Böylelikle aferez ürünlerinin içerdiği hücre tipleri ve morfolojileri hakkında fikir sahibi olundu (Şekil 4.19). Dondurulmuş aferez ürünlerinin içerdiği nötrofil ve mononükleer hücrelerin sağlıklı morfolojide olduğu gözlemlendi.



Şekil 4.19. Aferez ürünü yayma preparatında nötrofil ve mononükleer hücreler görülmektedir.

4.5. Çalışma Grubundaki Bireylerin Verileri

Hacettepe Üniversitesi KİT ünitesinde G-CSF uygulamasından +5-10 gün sonra kök hücreleri toplanmaya başlanan çalışma grubundaki 303 bireyden 295'inin, her bir toplama gününe ait lökosit (beyaz küre, BK), total mononükleer hücre, kilogram başına düşen $CD34^+$ kök hücre sayılarına ($CD34^+$ kök hücre/kg) ilişkin verileri mevcuttur.

Periferik kandan kök hücre toplamaları bir gün aralıkla yapılmaktadır. En az 5×10^6 $CD34^+$ kök hücre/kg toplanana kadar toplamalar devam ettirilmekte, yeterli sayıda $CD34^+$ kök hücre toplanmasına paralel olarak toplama sayısı azalmaktadır.

Verileri mevcut olan çalışma grubundaki bireylerin kök hücre toplama gün sayıları Tablo 4.4' de gösterilmektedir.

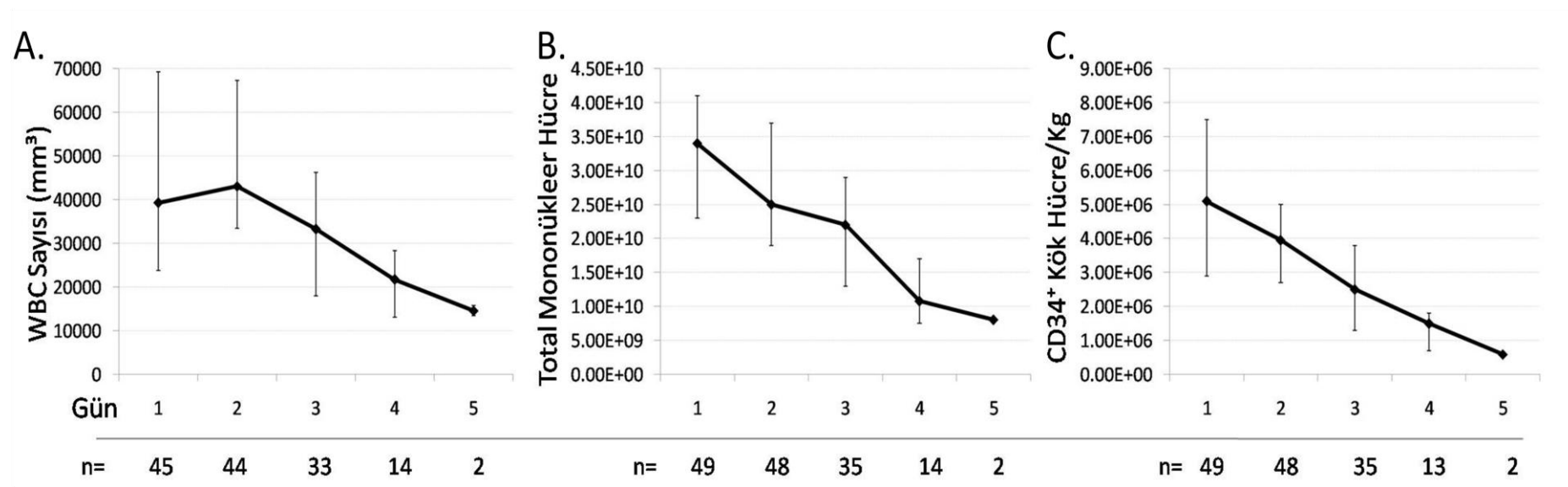
Tablo 4.4. Çalışma grubundaki 295 bireyin kök hücre toplama sayılarının tanılara göre dağılımı gösterilmektedir.

Toplama Sayısı	1 (1.gün)	2 (1.,2.gün)	3 (1.,2.,3.gün)	4 (1.,2.,3.,4. gün)	5 (1.,2.,3.,4.,5.gün)	Toplam Birey
Birey Tanısı						
Sağlıklı Donör	1	14	24	12	2	53
NHL	3	34	31	5	1	74
MM	0	21	49	10	0	80
HL	1	24	21	3	2	51
Germ Hücreli Kanseri	1	7	5	1	1	15
AML	0	5	5	1	0	11
Nöroblastom	0	1	1	0	0	2
Rabdomiyosarkom	0	1	1	0	0	2
Nazofarinks Kanseri	0	1	1	0	0	2
Primer Amiloidoz	0	1	0	0	0	1
ALL	0	1	0	0	0	1
KLL	0	1	0	0	0	1
MCL	0	1	0	0	0	1
KML	0	1	0	0	0	1
Toplam	6	113	138	32	6	295

4.5.1. Taranan SNP'leri Majör Alel Homozigot Genotipte Taşıyan G-CSF Verilmiş Sağlıklı Donörlere Ait Veriler

Çalışma grubundaki taranan SNP'leri majör alel homozigot genotipte taşıyan sağlıklı donörlerin her bir toplama günündeki BK, total mononükleer hücre, CD34⁺ kök hücre/kg sayıları Şekil 4.20'de görülmektedir. Bu grupta yer alan 49 bireyden toplamı beşinci güne kadar devam eden sadece 2 birey vardır.

BK sayıları karşılaştırıldığında, 2. toplama gününde artışın en yüksek değere ulaştığı ve takiben 3.,4. ve 5. toplama günlerinde giderek azaldığı gözlenmektedir (Şekil 4.20.A). Total mononükleer hücre sayısında ise birinci günde görülen yüksek düzeydeki artış devam eden günlerde giderek azalmaktadır (Şekil 4.20.B). CD34⁺ kök hücre/kg sayılarındaki değişim total mononükleer hücrelerdekine benzer şekildedir (Şekil 4.20.C).



Şekil 4.20. G-CSF verilmiş, taranan SNP'leri majör alel homozigot genotipte taşıyan sağlıklı donörlerin toplama günlerine karşı veri değişim grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) gösterilmektedir. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.

4.5.2 Taranan SNP'leri Majör Alel Homozigot Genotipte Taşıyan G-CSF Verilmiş Kanser Hastalarına Ait Veriler

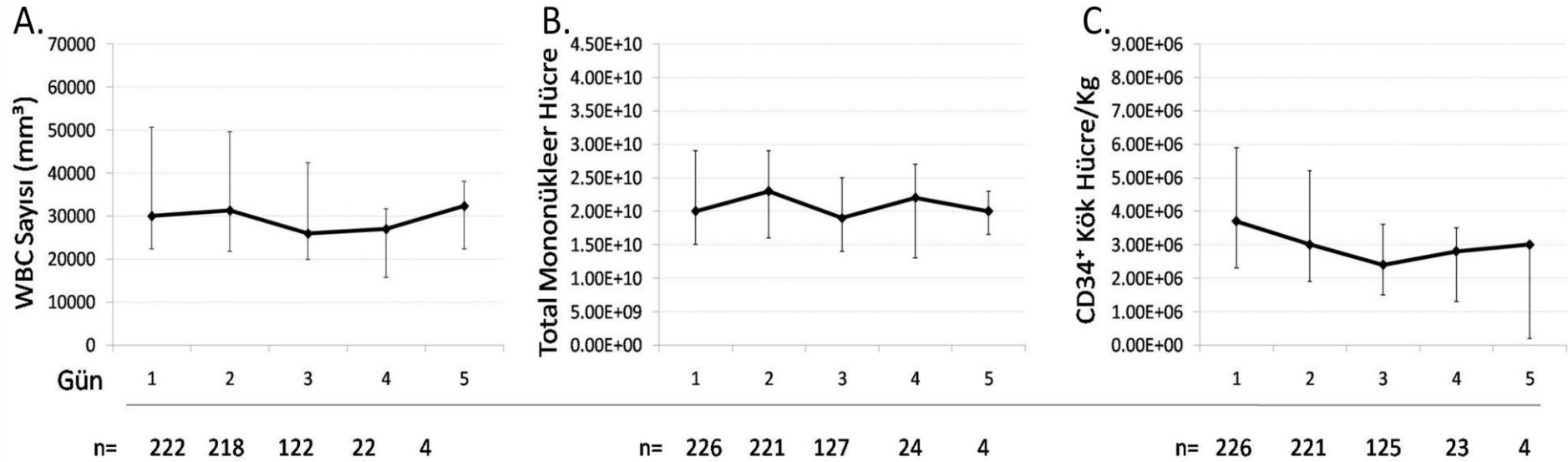
Çalışma grubundaki taranan SNP'leri majör alel homozigot genotipte taşıyan kanser hastalarının her bir toplama günündeki BK, total mononükleer hücre, CD34⁺ kök hücre/kg sayıları Şekil 4.21'de görülmektedir. Bu grupta yer alan 226 bireyden toplamı beşinci güne kadar devam eden sadece 4 birey vardır.

BK sayılarının 2. toplama gününde, 1. günde göre biraz daha fazla arttığı 3. ve 4. günlerde ise azaldığı gözlenmektedir. 5. günde artış yalnızca 4 vakaya ait olduğundan anlamlı olma ihtimali düşüktür (Şekil 4.21.A). Total mononükleer hücre sayılarındaki kinetik değişiminde BK sayılarına benzer olduğu görülmektedir (Şekil 4.21.B). CD34⁺ kök hücre/kg sayıları ise 1. günde artışı takiben diğer günlerde azalma yönündedir (Şekil 4.21.C).

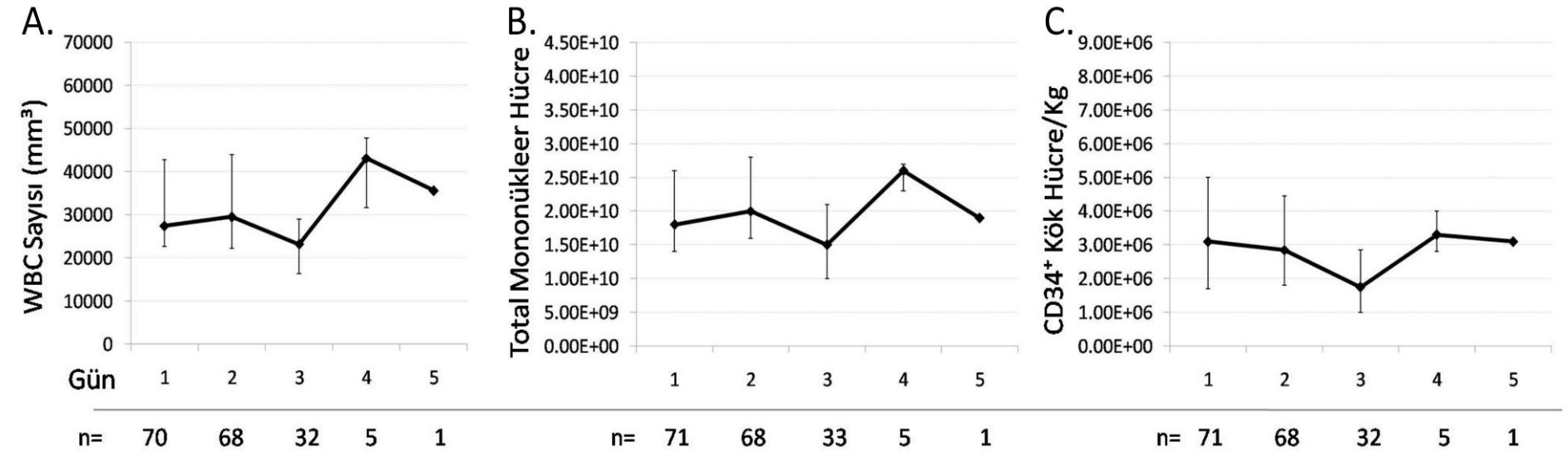
G-CSF Verilmiş Taranan SNP'leri Majör Alel Homozigot Genotipte Taşıyan NHL Hastalarına Ait Veriler

Çalışma grubundaki taranan SNP'leri majör alel homozigot genotipte taşıyan NHL hastalarının her bir toplama günündeki BK, total mononükleer hücre, CD34⁺ kök hücre/kg sayıları Şekil 4.22'de görülmektedir. Bu grupta yer alan 71 bireyden toplamı beşinci güne kadar devam eden sadece 1 birey vardır.

BK ve total mononükleer hücre sayılarının kinetikleri benzerdir ve 1. toplama gününden 2. güne göre doğru artıp 3. günde azalmaktadırlar. Üçüncü günden sonra 4. ve 5. günlerdeki ciddi artışlar az sayıda vakada gözlemlendiğinden anlamlı bulunmamıştır (Şekil 4.22.A,B). CD34⁺ kök hücre/kg sayıları ise 1. günde artarken diğer günlerde azalarak devam etmektedir (Şekil 4.22.C).



Şekil 4.21. G-CSF verilmiş, taranan SNP'leri majör alel homozigot genotipte taşıyan kanser hastalarının toplama günlerine karşı veri değişim grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) gösterilmektedir. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.



Şekil 4.22. G-CSF verilmiş, taranan SNP'leri majör alel homozigot genotipte taşıyan NHL hastalarının toplama günlerine karşı veri değişim grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) gösterilmektedir. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.

Taranan SNP'leri Majör Alel Homozigot Genotipte Taşıyan G-CSF Verilmiş MM Hastalarına Ait Veriler

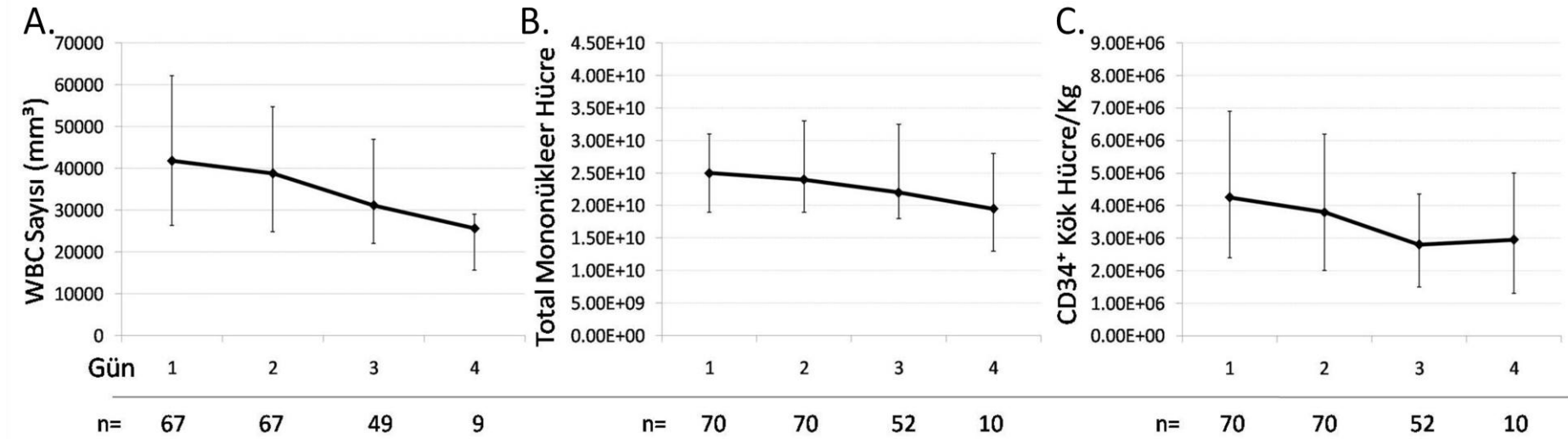
Çalışma grubundaki taranan SNP'leri majör alel homozigot genotipte taşıyan MM hastalarının her bir toplama günündeki BK, total mononükleer hücre, CD34⁺ kök hücre/kg sayıları Şekil 4.23'de görülmektedir. Bu grupta yer alan 70 bireyden toplamı dördüncü güne kadar devam eden 10 birey vardır.

BK, total mononükleer hücre ve CD34⁺ kök hücre/kg sayılarının günlere göre değişimleri benzerdir. MM hasta grubunda 1. toplama gününde tüm hücrelerde diğer gruplardan daha yüksek artış olduğu gözlenmektedir. Takiben 2.,3. ve 4. günlerde hücre sayıları azalmaktadır.

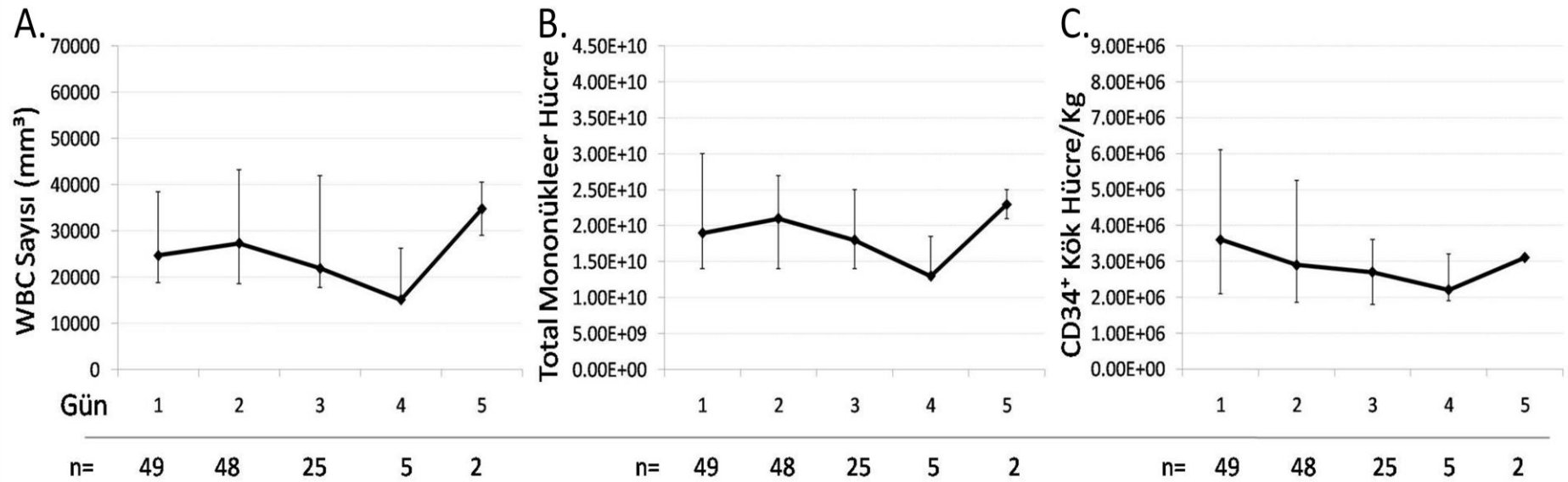
Taranan SNP'leri Majör Alel Homozigot Genotipte Taşıyan G-CSF Verilmiş HL Hastalarına Ait Veriler

Çalışma grubundaki taranan SNP'leri majör alel homozigot genotipte taşıyan HL hastalarının her bir toplama günündeki BK, total mononükleer hücre, CD34⁺ kök hücre/kg sayıları Şekil 4.24'de görülmektedir. Bu grupta yer alan 49 bireyden toplamı beşinci güne kadar devam eden sadece 2 birey vardır.

BK ve total mononükleer hücre sayılarının kinetikleri benzerdir. Birinci toplama gününden 2. güne göre doğru arttıkları, 3. ve 4. günde ise azaldıkları gözlenmektedir. Beşinci günlerdeki ciddi artışlar yalnızca 2 vakada gözlemlendiğinden anlamlı bulunamamıştır (Şekil 4.24.A,B). CD34⁺ kök hücre/kg sayıları ise 1. günde artarken diğer günlerde azalarak devam etmektedir (Şekil 4.24.C).



Şekil 4.23. G-CSF verilmiş, taranan SNP'leri majör alel homozigot genotipte taşıyan MM hastalarının toplama günlerine karşı veri değişim grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) gösterilmektedir. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.



Şekil 4.24. G-CSF verilmiş, taranan SNP'leri majör alel homozigot genotipte taşıyan HL hastalarının toplama günlerine karşı veri değişim grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) gösterilmektedir. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.

Taranan SNP'leri Majör Alel Homozigot Genotipte Taşıyan G-CSF Verilmiş Germ Hücreli Kanser Hastalarına Ait Veriler

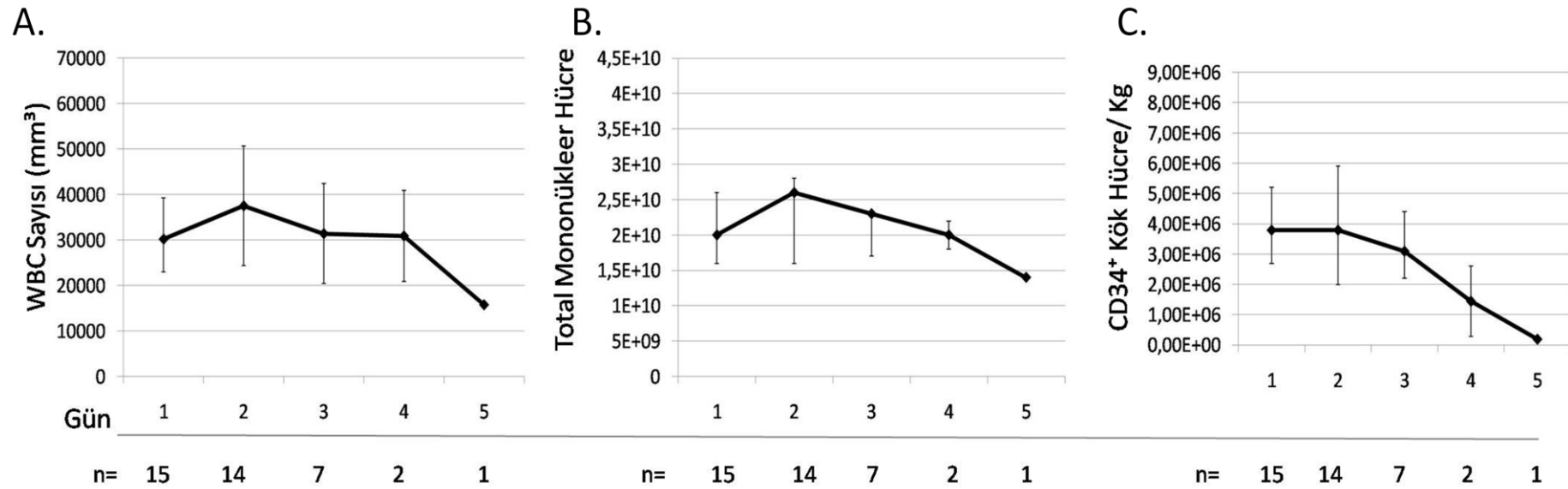
Çalışma grubundaki taranan SNP'leri majör alel homozigot genotipte taşıyan germ hücreli kanser hastalarının her bir toplama günündeki BK, total mononükleer hücre, CD34⁺ kök hücre/kg sayıları Şekil 4.25'de görülmektedir. Bu grupta yer alan 49 bireyden toplamı beşinci güne kadar devam eden sadece 2 birey vardır.

BK ve total mononükleer hücre sayılarının kinetikleri benzerdir 2. toplama günündeki ciddi artışı takiben 3.,4. ve 5. toplama günlerinde giderek azalma olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.25.A,B). CD34⁺ kök hücre/kg sayıları ise 1. günde artmakta takip eden günlerde azalmaktadır (Şekil 4.25.C).

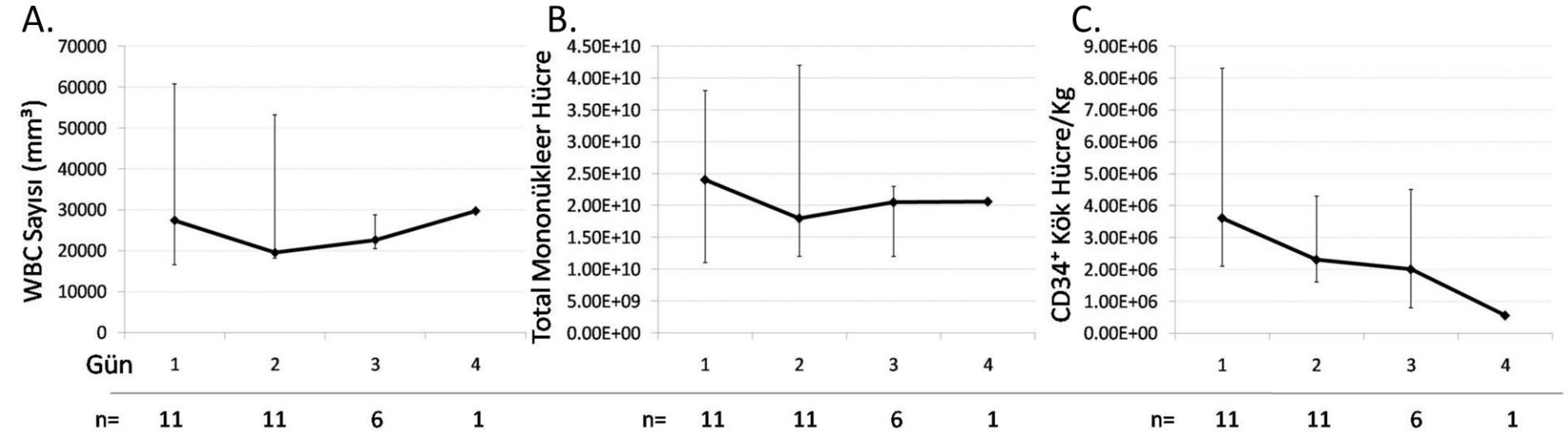
Taranan SNP'leri Majör Alel Homozigot Genotipte Taşıyan G-CSF Verilmiş AML Hastalarına Ait Veriler

Çalışma grubundaki taranan SNP'leri majör alel homozigot genotipte taşıyan AML hastalarının her bir toplama günündeki BK, total mononükleer hücre, CD34⁺ kök hücre/kg sayıları Şekil 4.26'da görülmektedir. Bu grupta yer alan 11 bireyden toplamı dördüncü güne kadar devam eden sadece 1 birey vardır.

BK ve total mononükleer hücre sayılarının kinetikleri benzerdir ve 1. toplama gününden 2. güne göre doğru azaldıkları ancak 3. günde hafif de olsa yeniden arttıkları gözlenmektedir (Şekil 4.26.A,B). CD34⁺ kök hücre/kg sayılarında ise 1. günde gözlenen artış, 2. ve 3. günlerde azalarak devam etmektedir (Şekil 4.26.C).



Şekil 4.25. G-CSF verilmiş, taranan SNP'leri majör alel homozigot genotipte taşıyan germ hücreli kanser hastalarının toplama günlerine karşı veri değişim grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) gösterilmektedir. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.



Şekil 4.26. G-CSF verilmiş, taranan SNP'leri majör alel homozigot genotipte taşıyan AML hastalarının toplama günlerine karşı veri değişim grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) gösterilmektedir. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.

Taranan SNP'leri Majör Alel Homozigot Genotipte Taşıyan G-CSF Verilmiş Diğer Kansere Hastalarına Ait Veriler

Geriye kalan taranan SNP'leri majör alel homozigot genotipte taşıyan kanser hastaları rabdomiyosarkoma, nazofarinks kanseri, nöroblastoma, akut lenfoblastik lösemi (ALL), kronik lenfositik lösemi (KLL), kronik miyeloid lösemi (KML), mantle-hücreli lenfoma (MCL) hastalarından oluşmaktadır. Toplamda 10 kişiden oluşan bu heterojen gruba ait grafik oluşturulamamıştır ve hastaların verileri Tablo 4.5'de gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Çalışma grubundaki diğer kanser hastalarına ait veriler görülmektedir. * g.6214055G>A (rs3918018) SNP'i taşımaktadır.

TANI	WBC sayısı (mm3) 1.gün	WBC sayısı (mm3) 2.gün	WBC sayısı (mm3) 3.gün	Total mononükleer hücre sayısı 1.gün	Total mononükleer hücre sayısı 2.gün	Total mononükleer hücre sayısı 3.gün	CD34+ kök hücre/kg 1.gün	CD34+ kök hücre/kg 2.gün	CD34+ kök hücre/kg 3.gün
Nöroblastom	9,900	25,700	17,400	5.70E+09	1.30E+10	9.10E+09	2.40E+06	8.40E+05	2.40E+06
Nöroblastom	28,700	20,400		2.40E+10	1.80E+10		6.20E+06	2.60E+06	
Rabdomiyosarkom	31,200	66,500		1.70E+10	3.40E+10		3.60E+06	5.80E+06	
Rabdomiyosarkom	30,800	27,700	28,000	1.70E+10	1.60E+10	1.50E+10	3.90E+06	3.50E+06	3.60E+06
Nazofarink Kanseri	28,400	49,900		1.30E+10	2.40E+10		3.90E+06	2.00E+06	
Nazofarink Kanseri	51,600	54,400	30,000	1.60E+10	2.60E+10	1.70E+10	4.40E+06	5.10E+06	3.00E+06
KLL	32,900	19,500		1.70E+11	1.10E+11		1.60E+07	1.20E+07	
KML	35,100	31,800		1.80E+10	1.80E+10		6.50E+06	5.90E+06	
MCL	29,000	28,100		1.60E+10	1.60E+10		5.20E+06	2.90E+06	
ALL	30,600	10,100		1.70E+10	3.70E+10		1.70E+06	2.30E+06	

4.6. Moleküler Bulguların Çalışma Grubundaki Bireylerin Verileri ile Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi

G-CSF-R genindeki 11 *missense* SNP'in çalışma grubunda taranması sonucunda 6 polimorfik bölgenin tüm bireylerde majör alel homozigot genotipte, 5 polimorfik bölgenin ise heterozigot veya minör alel homozigot genotipte bulunabildiği tespit edildi. G-CSF verilmiş 303 bireyden, herhangi bir SNP'i heterozigot veya minor alel homozigot genotipte taşıyan 20 birey belirlendi. Birinci kromozomdaki G-CSF-R geni üzerine yerleşik g.6214055G>A (rs3918018) SNP'i 3 MM, 1 primer amiloidoz hastasında heterozigot, bir sağlıklı donörde minör alel homozigot olarak toplam 5 kişide, g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i 4 MM, 2 NHL, 1 HL hastasında ve 3 sağlıklı donörde heterozigot polimorfik olarak toplam 10 kişide, g.6219430 G>A (rs3918001) SNP'i 2 MM hastasında heterozigot polimorfik, g.6219475 C>T (rs3918021) SNP'i 1 MM hastasında heterozigot polimorfik, g.6219886 G>A SNP'i (23) 1 NHL ve 1 MM hastasında heterozigot polimorfik olarak bulundu. Ayrıca JAK2V617F mutasyonunun 303 bireyden yalnızca 1 MM hastasında taşındığı tespit edildi. JAK2V617F mutasyonu veya herhangi bir SNP'i heterozigot veya minör aleli homozigot genotipte taşıyan birey sıklığı Tablo 4.6'da gösterilmektedir.

Tablo 4.6. JAK2V617F mutasyonu, herhangi bir SNP’i heterozigot veya minör aleli homozigot genotipte taşıyan bireylerin tanılarına göre dağılımı ve toplam birey sayısına göre sıklığı gösterilmektedir. *Bir MM hastası 2 farklı heterozigot genotipteki polimorfizmi birden taşımakta olmasına rağmen 1 birey olarak sayılmıştır.

Birey Tanısı	Herhangi bir SNP’i heterozigot veya minör aleli homozigot durumda taşıyan birey / Toplam birey sayısı	JAK2V617F mutasyonu taşıyan birey / Toplam birey sayısı
MM*	9/81 (%11,1)	1/81 (%1,2)
Sağlıklı Donör	4/54 (%7,4)	-
NHL	3/78 (%3,8)	-
HL	2/53 (%3,7)	-
Primer Amiloidoz	1/1	-
Toplam=	21/303 (%6,9)	1/303 (%0,3)

4.6.1. G-CSF-R Genindeki g.6214055 G>A SNP’i Heterozigot (G/A) veya Minör Alel Homozigot (A/A) Genotipte Taşıyan Bireylerin Verileri

SNP’i Minör Aleli Homozigot Genotipte Taşıyan Sağlıklı Donör

G-CSF-R genindeki g.6214055 G>A (rs3918018) SNP’i minör alel homozigot genotipte taşıyan sağlıklı donörün 1. ve 2. toplama günlerine ait verileri vardır. Toplama günlerine göre BK, total mononükleer hücre, CD34⁺ kök hücre/kg sayıları Şekil 4.27’ de görülmektedir ve SNP’leri majör alel homozigot genotipte taşıyan sağlıklı donör verileri kullanılarak oluşturulmuş grafikler ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.28).

Grafiklere göre BK ve total mononükleer hücre sayılarının kinetiklerinin benzer olduğu ve 1. toplama gününden 2. güne göre doğru çok hafif arttıkları (Şekil 4.27.A,B), CD34⁺ kök hücre/kg sayılarında ise 1. gündeki artıştan sonra 2. günde sabit denecek kadar hafif bir azalma olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.27.C).

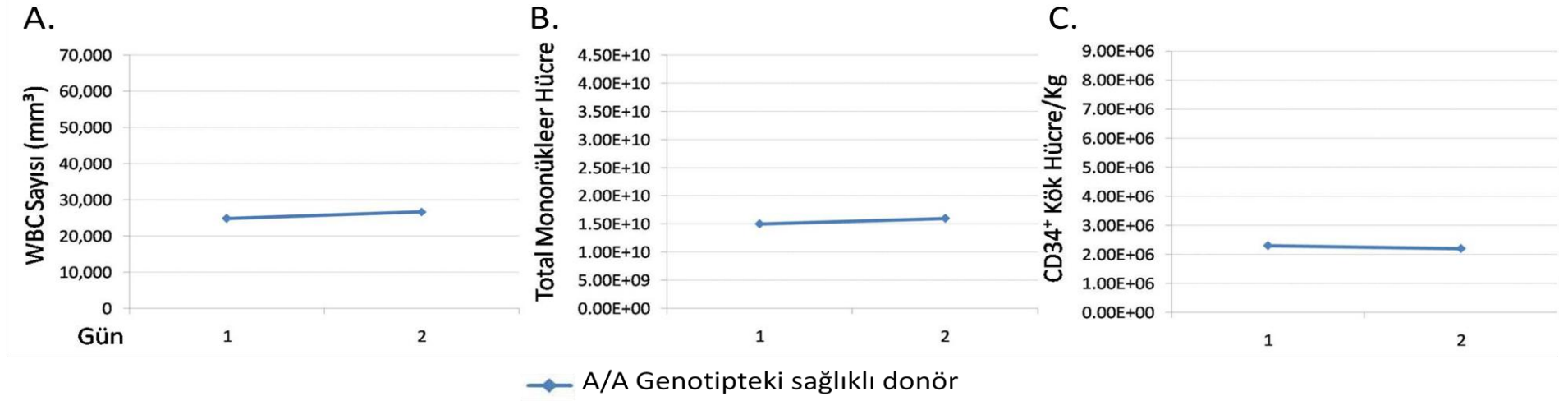
Polimorfik bölgesi minör alel homozigot A/A genotipteki donörün verileri, G/G genotipteki sağlıklı donör grubu ile karşılaştırıldığında üç verinin de grup dağılımı içerisinde olmadığı Şekil 4.28’de görülmektedir.

SNP’i Heterozigot Genotipte Taşıyan MM Hastaları

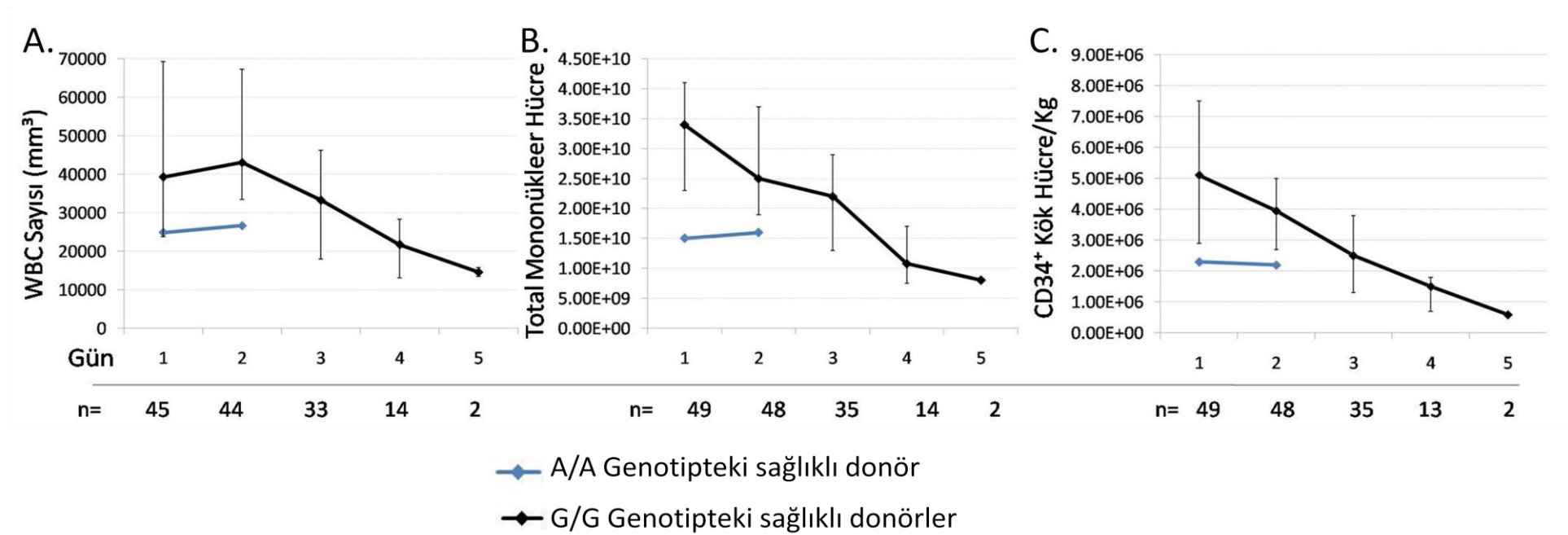
G-CSF-R genindeki g.6214055 G>A (rs3918018) SNP’i heterozigot polimorfik olarak taşıdığı tespit edilen 3 MM hastasının BK, total mononükleer hücre, CD34⁺ kök hücre/kg sayıları ile oluşturulan grafikler (Şekil 4.29-31) SNP’i majör alel homozigot taşıyan MM hastalarının değişim grafikleri ile karşılaştırıldı (Şekil 4.32).

Heterozigot G/A genotipteki MM hastası-1’de BK, total mononükleer hücre, CD34⁺ kök hücre/kg sayılarının günlere göre değişimleri benzerdir. 1. ve 2. gündeki artışlar 3.günde azalmaya dönmüştür (Şekil 4.29). Heterozigot G/A genotipteki MM hastası-2’de BK ve total mononükleer hücre sayılarındaki artışlar 2. günde 1.ye göre çok daha fazladır. CD34⁺ kök hücre/kg sayılarında ise 2.günde 1.güne göre ciddi azalma vardır(Şekil 4.30). Heterozigot G/A genotipteki MM hastası-3’de BK ve total mononükleer hücre değişimleri 1. ve 3. günde artış, 2. günde ise azalma yönündedir. CD34⁺ kök hücre/kg sayı eldesi genel olarak az olsa da 1. günden 3. güne doğru artmaktadır(Şekil 4.31).

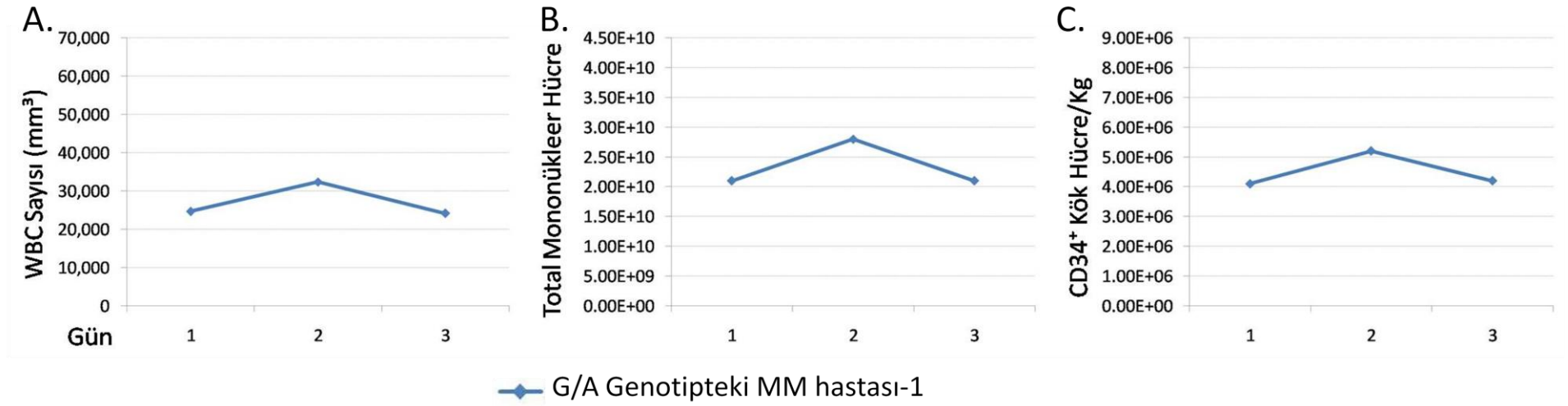
Heterozigot MM hasta verilerine, SNP’i G/G genotipte taşıyan MM hasta grubu ile bir arada bakıldığında G/A genotipteki MM hastası-1 ve 3’ün BK sayı verilerinin grup ile neredeyse üst üste oturduğu, total mononükleer hücre sayı değişimlerinin ise grup dağılımına benzer olduğu gözlenmektedir(Şekil 32.A,B).



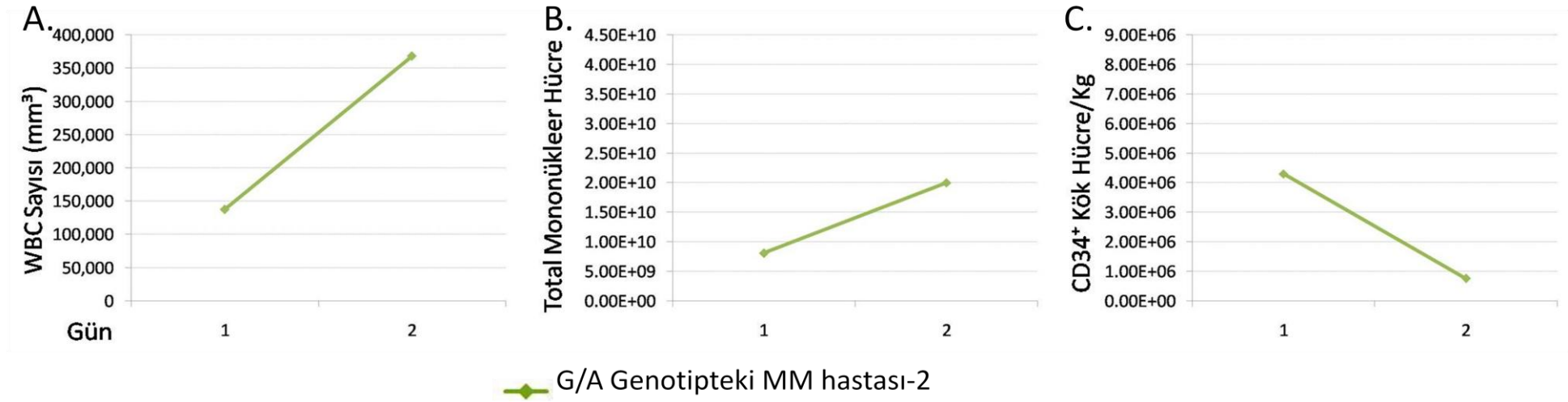
Şekil 4.27. G-CSF-R genindeki g.6214055 G>A (rs3918018) SNP'i A/A genotipte taşıyan sağlıklı donörün toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.



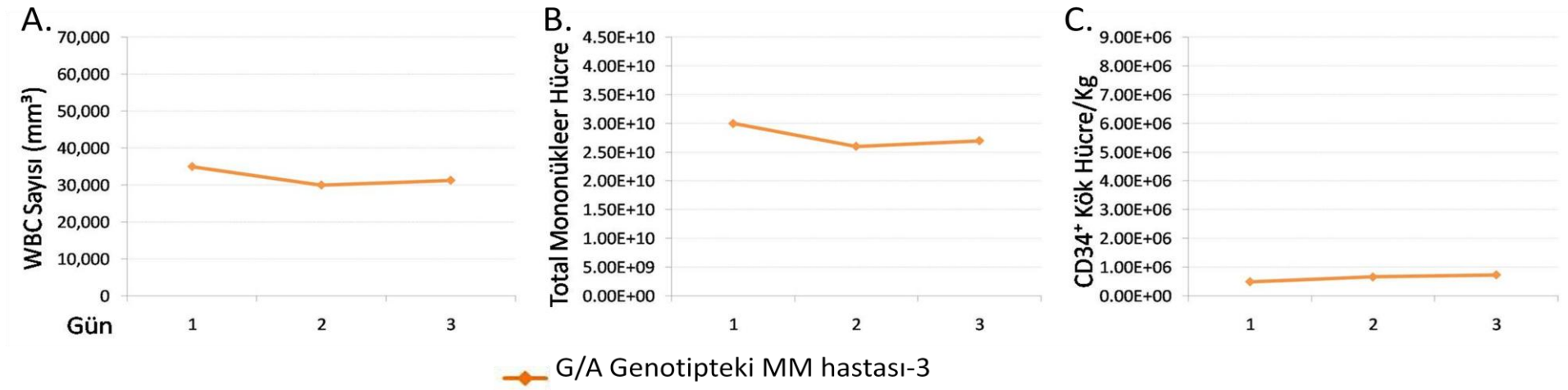
Şekil 4.28. G-CSF-R genindeki g.6214055 G>A (rs3918018) SNP'i A/A genotipte taşıyan sağlıklı donörün verileri, G/G genotipteki sağlıklı donör grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) ile karşılaştırıldı. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.



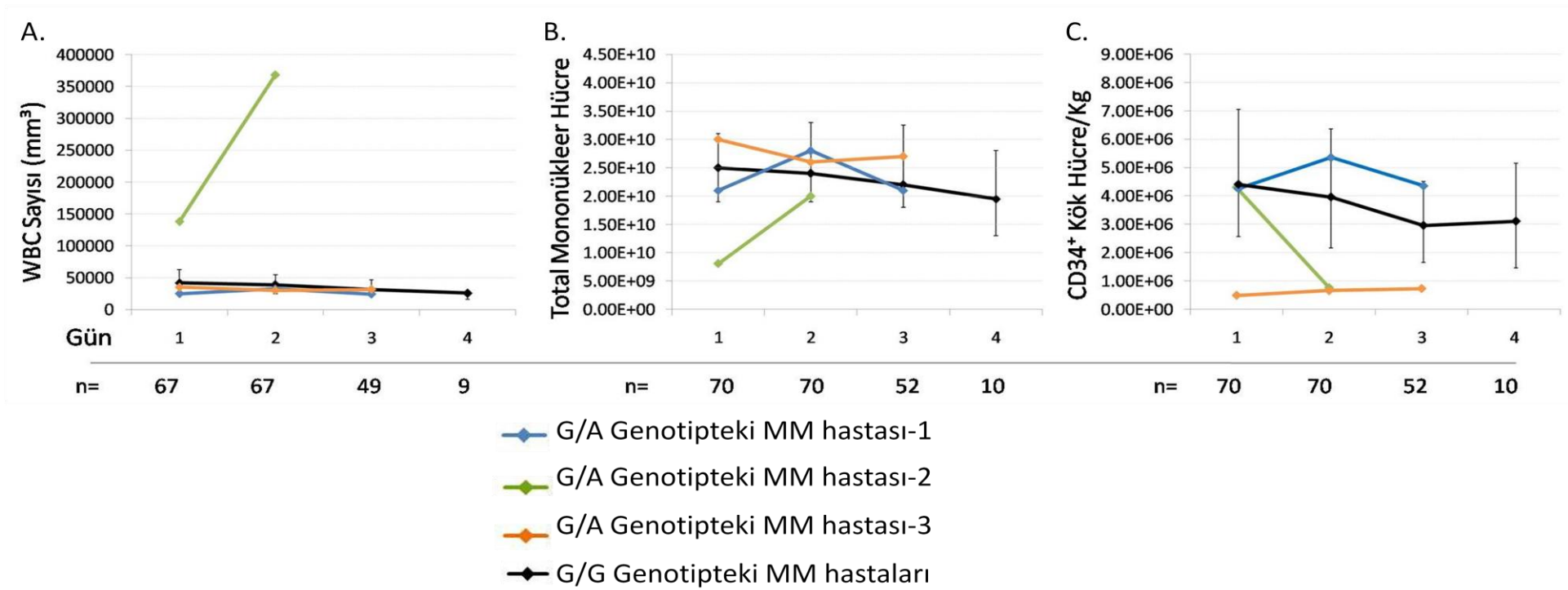
Şekil 4.29. G-CSF-R genindeki g.6214055 G>A (rs3918018) SNP'i G/A genotipte taşıyan MM hastasının toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.



Şekil 4.30. G-CSF-R genindeki g.6214055 G>A (rs3918018) SNP'i G/A genotipte taşıyan MM hastasının toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.



Şekil 4.31. G-CSF-R genindeki g.6214055 G>A (rs3918018) SNP'i G/A genotipte taşıyan MM hastasının toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.



Şekil 4.32. G-CSF-R genindeki g.6214055 G>A (rs3918018) SNP'i G/A genotipteki MM hastaları, G/G genotipteki MM hasta grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) ile karşılaştırıldı. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.

Heterozigot genotipteki MM hastası-1'in CD34⁺kök hücre/kg sayıları da grup çoğunluğuna benzer ancak MM hastası-2'de kilogram başına elde edilen CD34⁺kök hücre sayıları 1.,2. ve 3. günlerde grubun oldukça altında olduğu gözlenmektedir. G/A genotipteki MM Hastası-3 ise üç veride de gruptan farklı bir kinetik göstermektedir(şekil 32.C.).

SNP'i Heterozigot Polimorfik Olarak Taşıyan Primer Amiloidoz Hastası

G-CSF-R genindeki g.6214055 G>A (rs3918018) SNP'i heterozigot G/A genotipte taşıyan primer amiloidoz hastası çalışma grubunda tek olduğundan karşılaştırma yapmak mümkün değildir. G/A genotipteki primer amiloidoz hastasına ilişkin bilgiler Tablo 4.7'de verilmiştir.

Tablo 4.7. Genomik g.6214055 G>A (rs3918018) SNP'i heterozigot genotipte taşıyan primer amiloidoz hastasının 1. ve 2. toplama günlerindeki verileri gösterilmektedir.

Tanı	WBC Sayısı (mm ³) 1.gün	WBC Sayısı (mm ³) 2.gün	Total mononükleer hücre sayısı 1.gün	Total mononükleer hücre sayısı 2.gün	CD34 ⁺ kök hücre/kg 1.gün	CD34 ⁺ kök hücre/kg 2.gün
Primer Amiloidoz	72,400	11,000	4.00E+10	5.50E+10	1.50E+07	1.80E+07

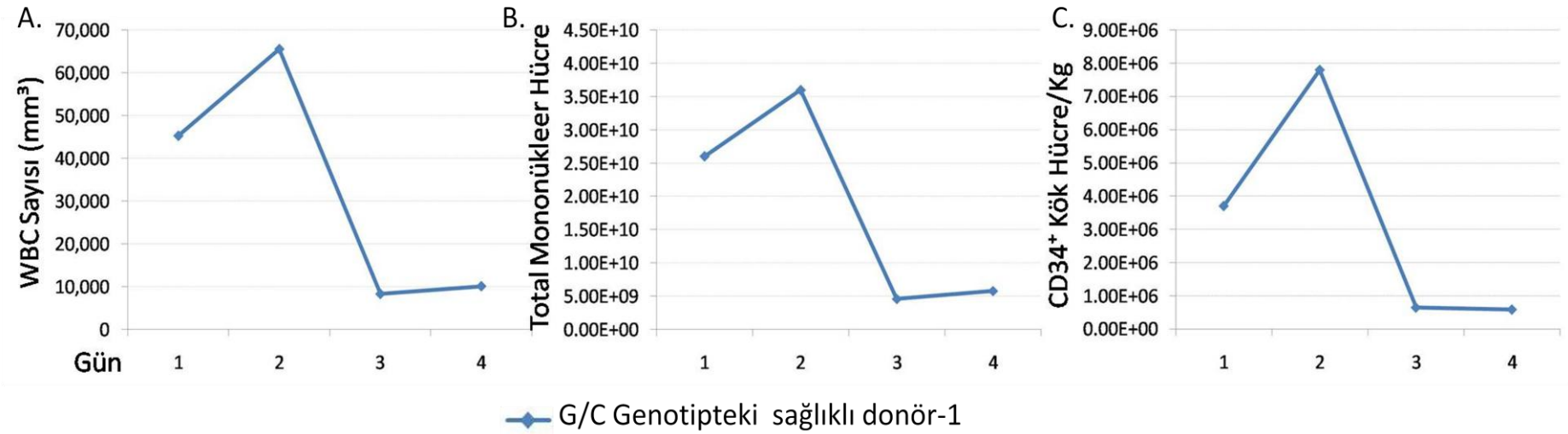
4.6.2. G-CSF-R Genindeki g.6217128 G>C SNP'i Heterozigot (G/C) Genotipte Taşıyan Bireylerin Verileri

SNP'i Heterozigot Genotipte Taşıyan Sağlıklı Donörler

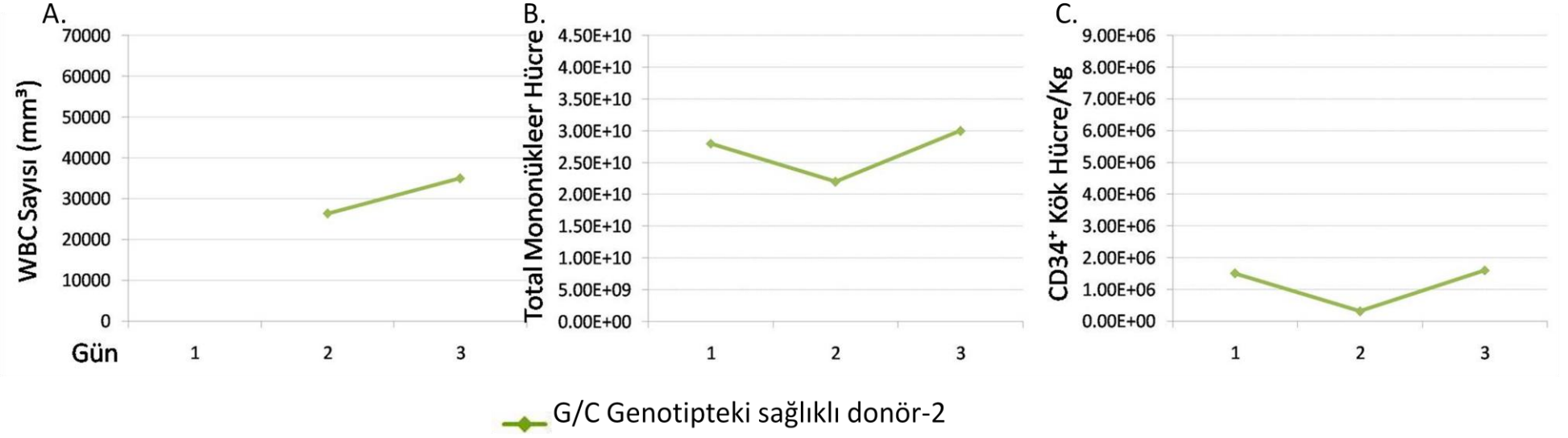
G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i heterozigot polimorfik olarak taşıdığı tespit edilen 3 sağlıklı donörün BK, total mononükleer hücre, CD34⁺ kök hücre/kg sayıları ile oluşturulan grafikler (Şekil 4.33-35) SNP'i majör alel homozigot taşıyan sağlıklı donörlerin değişim grafikleri ile karşılaştırıldı (Şekil 4.36).

Heterozigot G/C genotipteki sağlıklı donör-1’de BK, total mononükleer hücre, CD34⁺ kök hücre/kg sayılarının günlere göre değişimleri benzerdir. Birinci gündeki artış, 2.günde de devam edip pik yapmaktadır. Üçüncü günde görülen ciddi azalmayı takiben 4. günde hafif artış gözlenmektedir (Şekil 4.33). Heterozigot G/C genotipteki sağlıklı donör-2 ‘nin 1. gündeki BK sayısı mevcut değildir ancak 2. günden 3. güne doğru artış olduğu görülmektedir. Total mononükleer hücre ve CD34⁺ kök hücre/kg sayıları 1. ve 3. günde artmakta, aradaki 2. günde ise azalmaktadır (Şekil 4.34). Heterozigot G/C genotipteki sağlıklı donör-3’de BK sayıları 1. gündeki artışı takiben azalmaktadır. Total mononükleer hücre ve CD34⁺ kök hücre/kg değişimleri 1. ve 3. günde artış, 2. günde ise azalma yönündedir (Şekil 4.35).

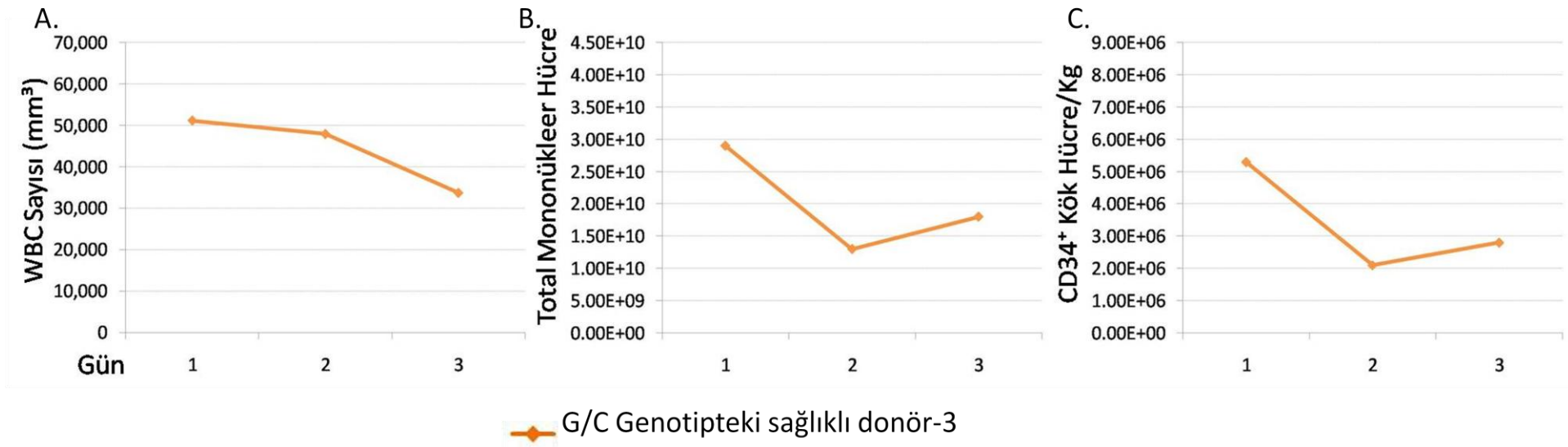
Heterozigot sağlıklı donör verileri ile SNP’i G/G genotipte taşıyan sağlıklı donör grubu bir arada bakıldığında G/C genotipteki sağlıklı donör-1’in 2. gündeki CD34⁺ kök hücre/kg sayısının gruptan farklı bir kinetikte yüksek düzeyde arttığı görülmektedir (Şekil 4.36.C) G/C genotipteki sağlıklı donör-2 ise 2. gündeki BK sayıları ve 1., 2. gündeki düşük CD34⁺ kök hücre/kg sayıları ile farklılık göstermektedir (Şekil 4.36.A,C). G/C genotipteki sağlıklı donör-3’ün 2. günlerdeki total mononükleer hücre ve CD34⁺ kök hücre/kg sayıları grubun dağılım gösterdiği aralığın hafif de olsa altındadır (Şekil 4.36.B,C).



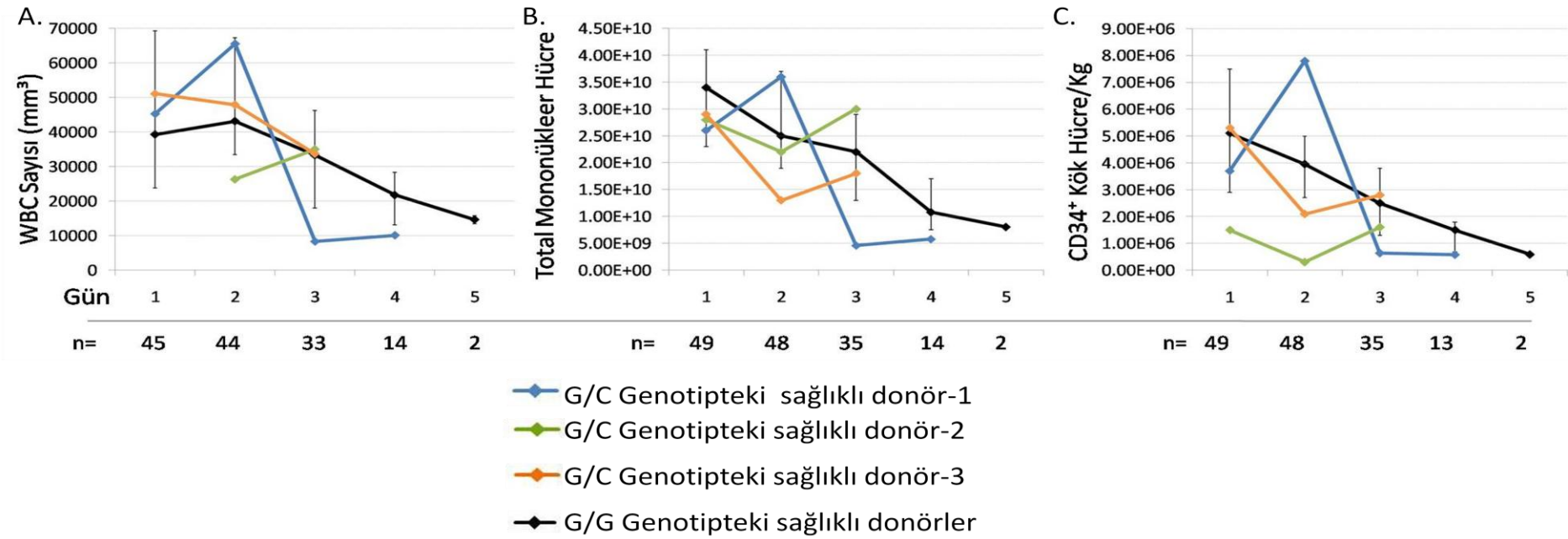
Şekil 4.33. G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i G/C genotipte taşıyan sağlıklı donörün toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.



Şekil 4.34. G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i G/C genotipte taşıyan sağlıklı donörün toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.



Şekil 4.35. G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i G/C genotipte taşıyan sağlıklı donörün toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.



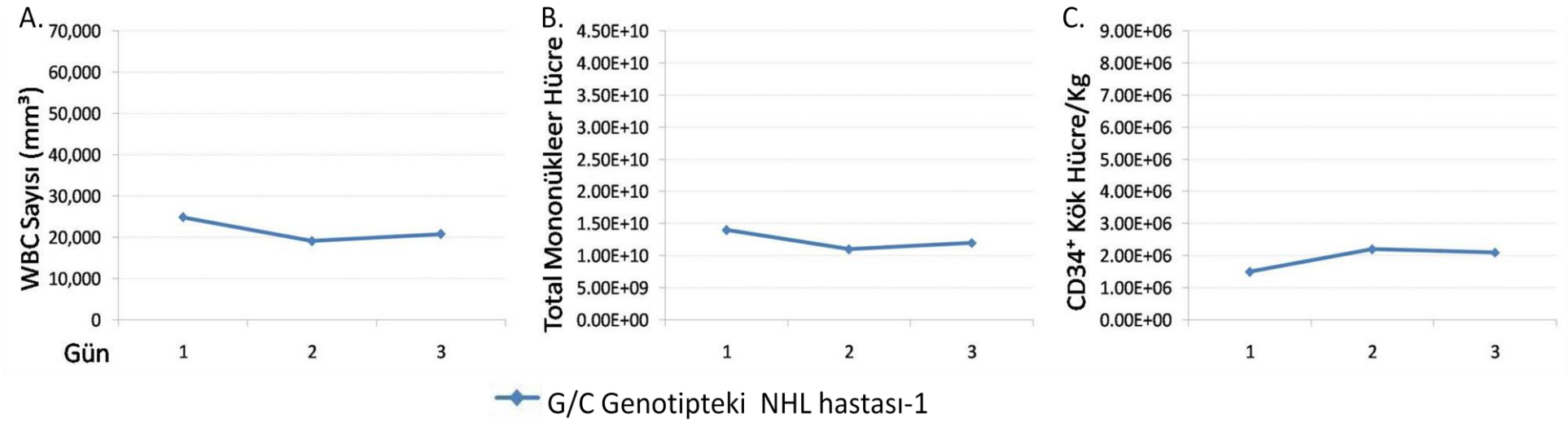
Şekil 4.36. G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i G/C genotipteki sağlıklı donörler, G/G genotipteki sağlıklı donör grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) ile karşılaştırıldı. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.

SNP'i Heterozigot Genotipte Taşıyan NHL Hastaları

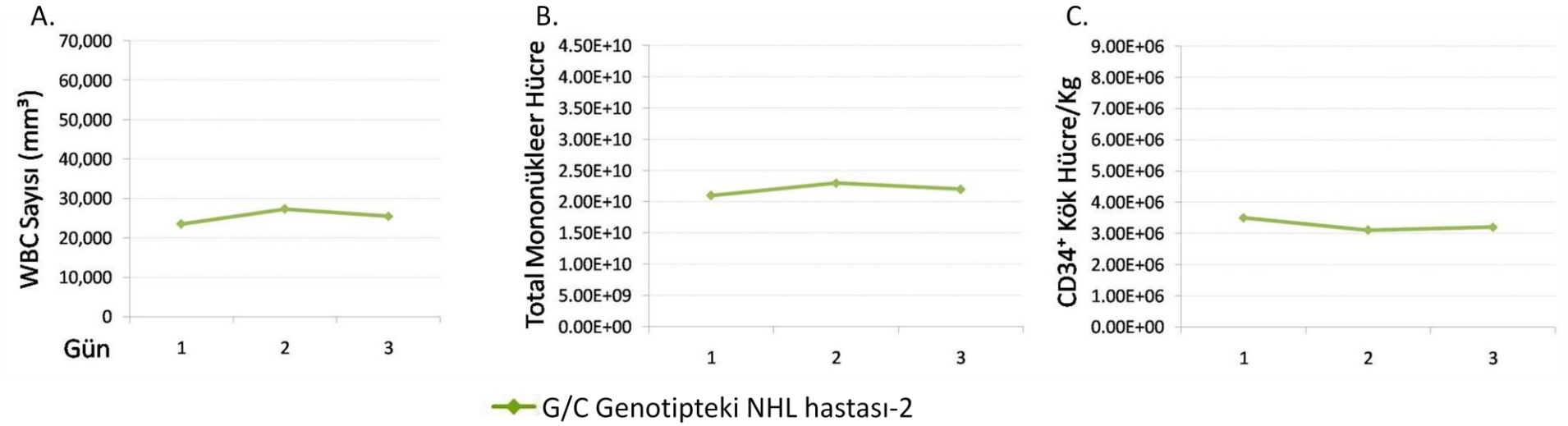
G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i heterozigot polimorfik olarak taşıdığı tespit edilen 2 NHL hastasının BK, total mononükleer hücre, CD34⁺ kök hücre/kg sayıları ile oluşturulan grafikler (Şekil 4.37,38) SNP'i majör alel homozigot taşıyan NHL hastalarının değişim grafikleri ile karşılaştırıldı (Şekil 4.39).

Heterozigot G/C genotipteki NHL hastası-1'de BK ve total mononükleer hücre sayılarında 1. günde artış, 2. günde azalma, 3. günde yeniden hafif artış olarak gözlenmektedir. CD34⁺ kök hücre/kg sayıları ise 1.günden 2.güne doğru artmaktadır (Şekil 4.37). Heterozigot G/C genotipteki NHL hastası-2 'nin BK, total mononükleer hücre, CD34⁺ kök hücre/kg sayılarının günlere göre değişimleri benzerdir ve 2. gün artışın en yüksek olduğu gün olarak görülmektedir (Şekil 4.35).

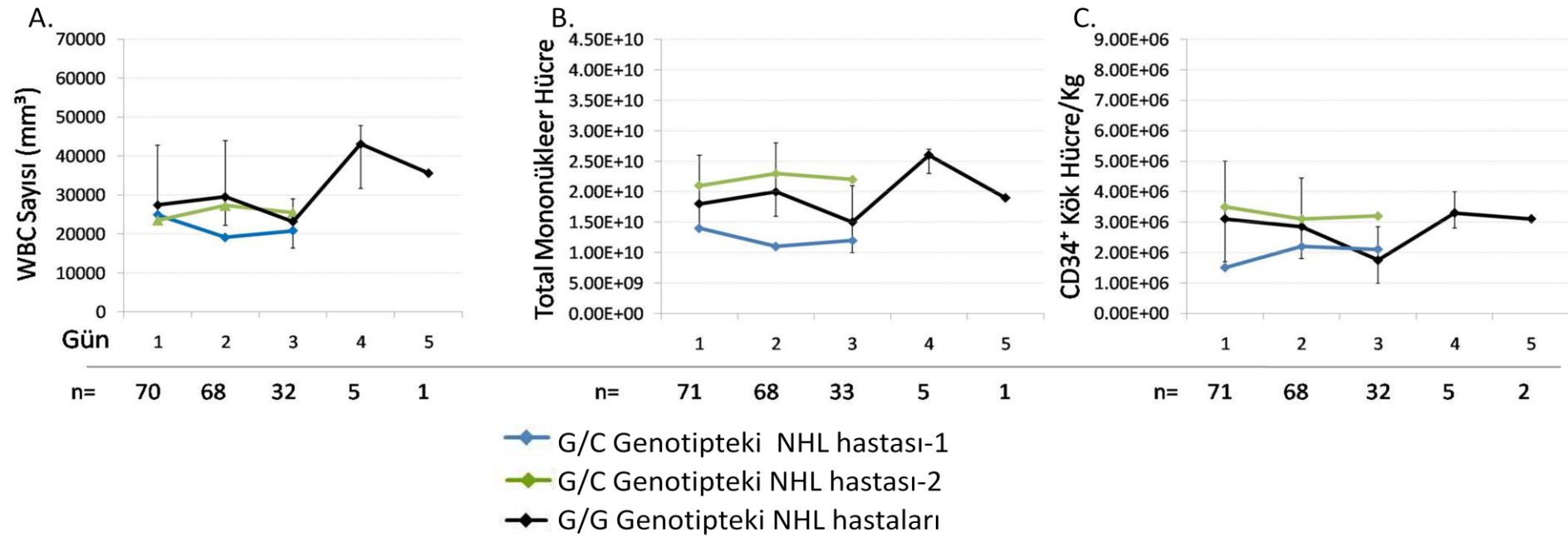
Heterozigot NHL hasta verileri ile SNP'i G/G genotipte taşıyan NHL hasta grubuna bir arada bakıldığında yalnızca G/C genotipteki NHL hastası-1'de 2. günde gözlenen BK ve total mononükleer hücre azalışları grubun dağılımı dışında kalmaktadır (Şekil 39.A,B).



Şekil 4.37. G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i G/C genotipte taşıyan NHL hastasının toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.



Şekil 4.38. G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i G/C genotipte taşıyan NHL hastasının toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.



Şekil 4.39. G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i G/C genotipteki NHL hastaları, G/G genotipteki NHL hasta grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) ile karşılaştırıldı. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.

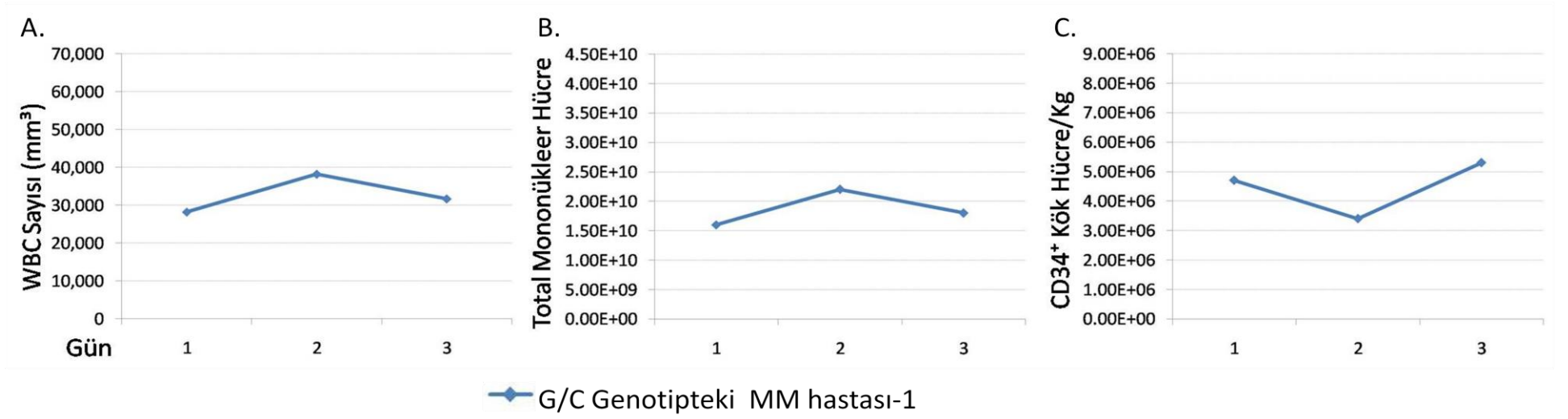
SNP'i Heterozigot Genotipte Taşıyan MM Hastaları

G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i heterozigot polimorfik olarak taşıdığı tespit edilen 4 MM hastasının BK, total mononükleer hücre, CD34⁺ kök hücre/kg sayıları ile oluşturulan grafikler (Şekil 4.40-43), SNP'i majör alel homozigot taşıyan MM hastalarının değişim grafikleri ile karşılaştırıldı (Şekil 4.44).

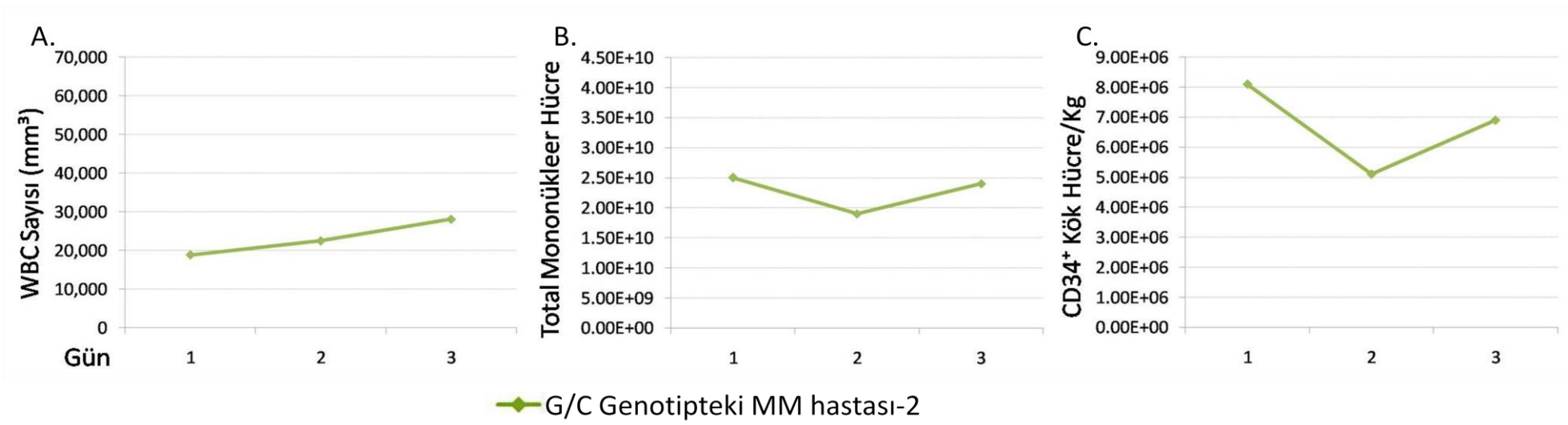
Heterozigot G/C genotipteki MM hastası-1'de BK ve total mononükleer hücre sayılarının günlere göre değişimleri benzerdir ve artışın 2. günde en yüksek düzeye ulaşp 3. günde azaldığı gözlenmektedir. CD34⁺ kök hücre/kg sayıları 1. ve 3. günde artış, 2. günde azalma göstermektedir (Şekil 4.40). G/C genotipteki MM hastası-2'nin BK sayıları 3. güne kadar artmaktadır. Total mononükleer hücre ve CD34⁺ kök hücre/kg sayıları 1. ve 3. günde artmakta, aradaki 2. günde ise azalmaktadır. Özellikle ilk gündeki CD34⁺ kök hücre/kg'ın artış değeri yüksek düzeydedir (Şekil 4.41). Heterozigot G/C genotipteki MM hastası-3'ün BK, total mononükleer hücre, CD34⁺ kök hücre/kg sayıları 1. günde ciddi düzeyde artmakta takiben 2. günde ciddi düzeyde azalmaktadır (Şekil 4.42).

G/C genotipteki MM hastası-4'de BK sayıları 1. günden 3. güne kadar artış, total mononükleer hücre ve CD34⁺ kök hücre/kg değişimleri ise 1. ve 3. günde artış, 2. günde ise azalma yönündedir (Şekil 4.43).

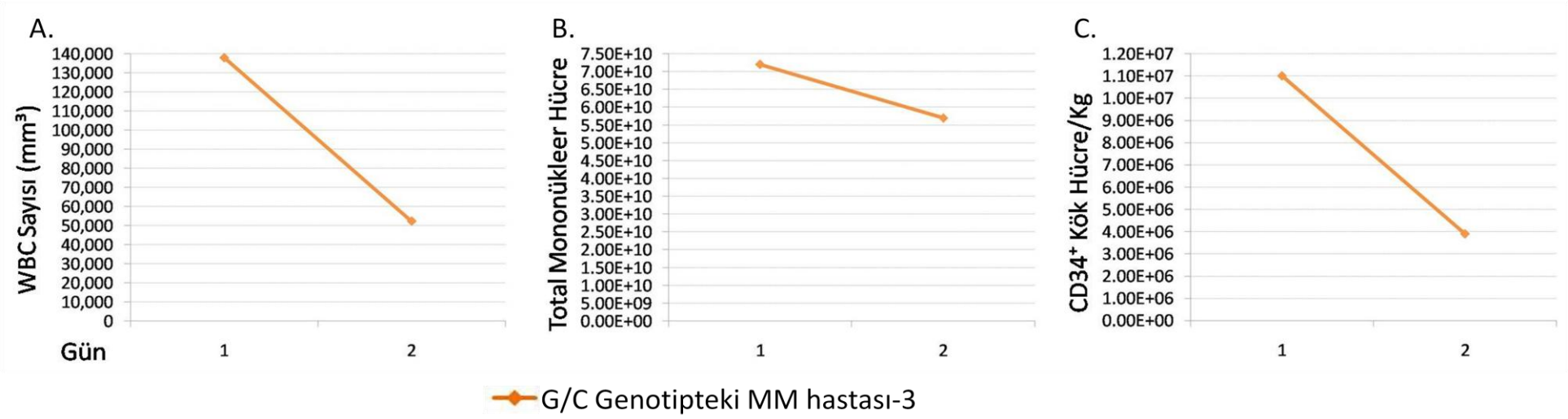
Heterozigot MM hasta verileri ile SNP'i G/G genotipte taşıyan MM hasta grubu bir arada bakıldığında ilk başta G/C genotipteki MM hastası-3'ün verilerinin grubun çok üstünde olduğu görülmektedir (Bkz. Şekil 4.44). Total mononükleer hücre değişimleri ise heterozigot MM hastası-1 'de 1. günde, heterozigot MM hastası-4 'de ise 1., 2.günlerde grup dağılımından düşüktür (Şekil 4.44.B). G/C genotipli MM hastası-2 ise 1. ve 3. günlerdeki CD34⁺ kök hücre/kg sayı artışlarıyla gruptan farklılık göstermektedir (Şekil 4.44.C).



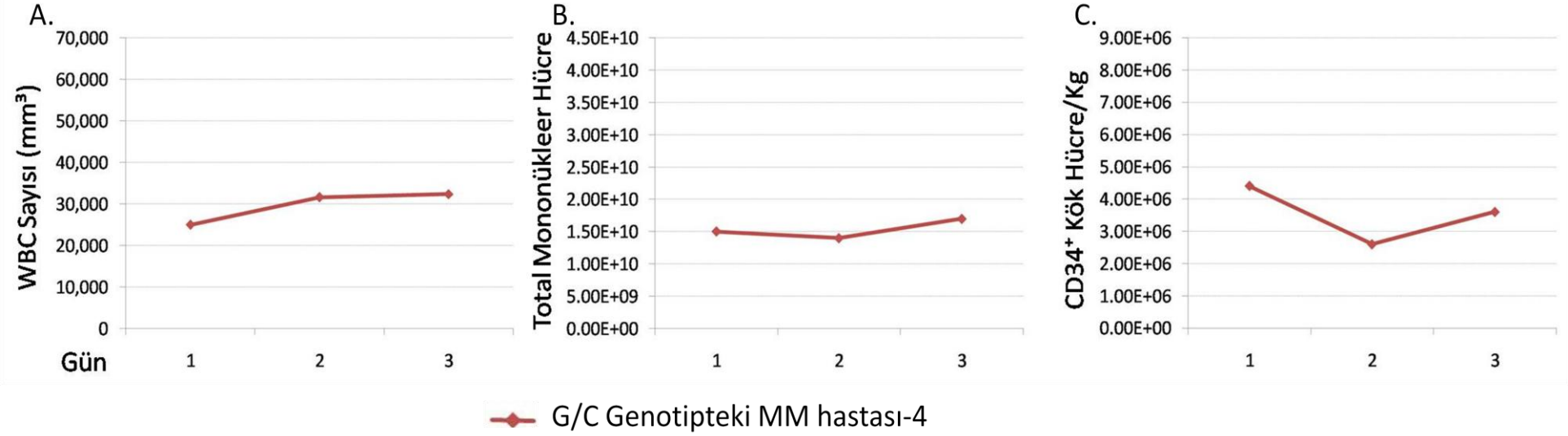
Şekil 4.40. G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i G/C genotipte taşıyan MM hastasının toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.



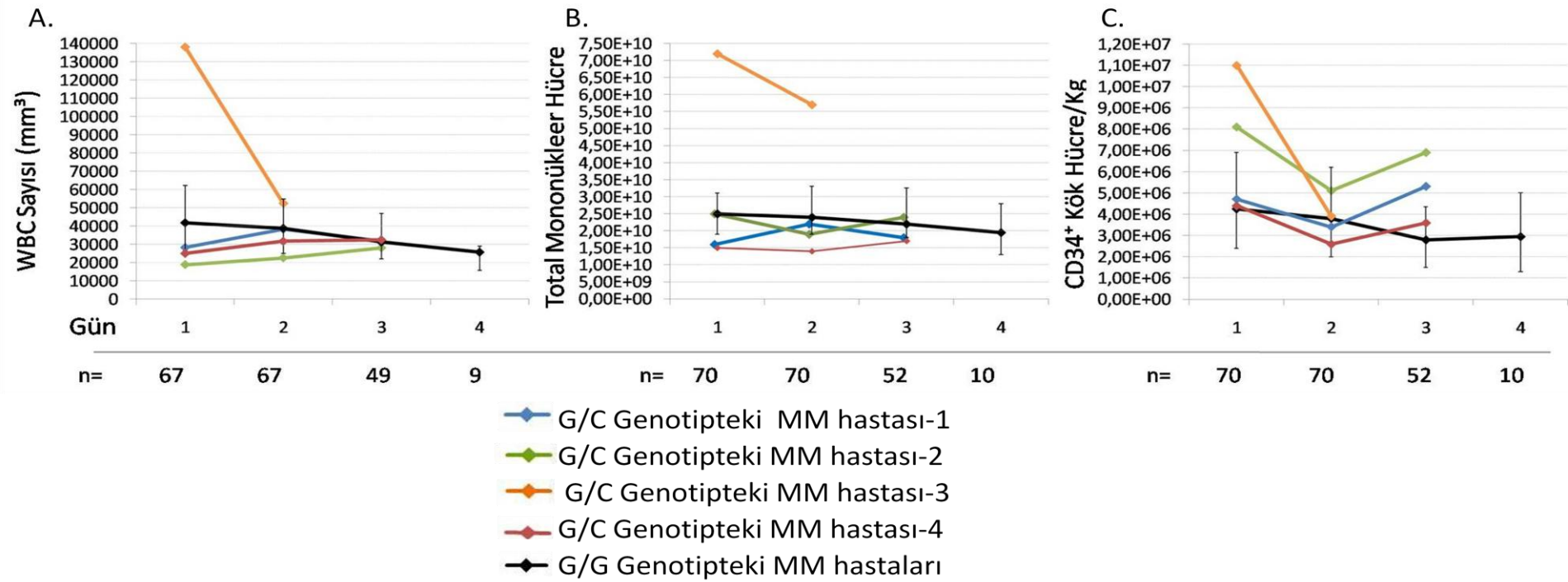
Şekil 4.41. G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i G/C genotipte taşıyan MM hastasının toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.



Şekil 4.42. G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i G/C genotipte taşıyan MM hastasının toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.



Şekil 4.43. G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i G/C genotipte taşıyan MM hastasının toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.



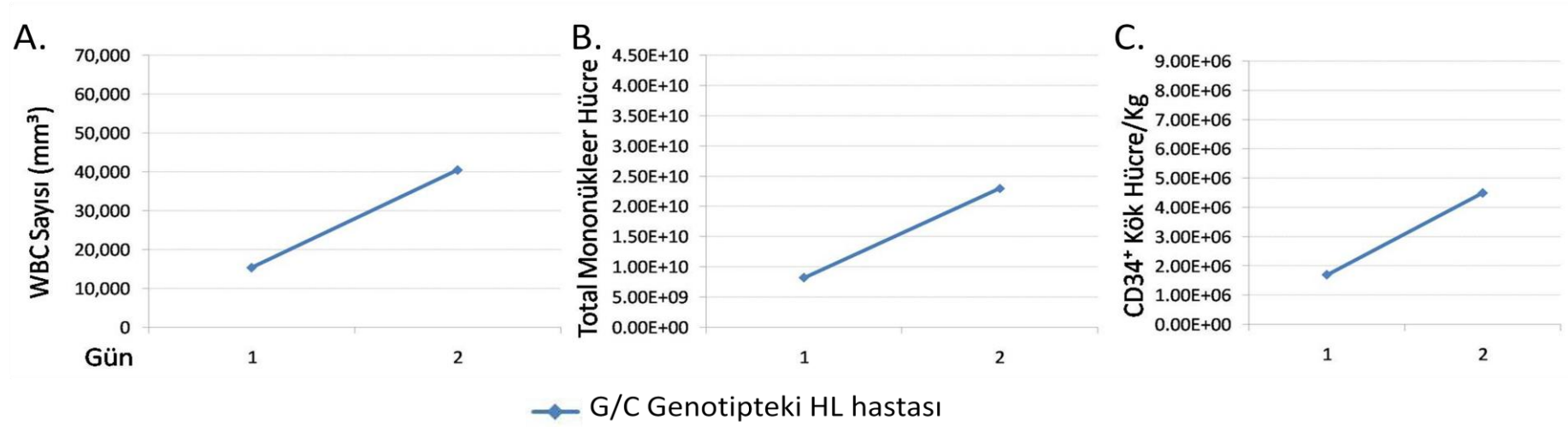
Şekil 4.44. G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i G/C genotipteki MM hastaları, G/G genotipteki MM hasta grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) ile karşılaştırıldı. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.

SNP'i Heterozigot Genotipte Taşıyan HL Hastası

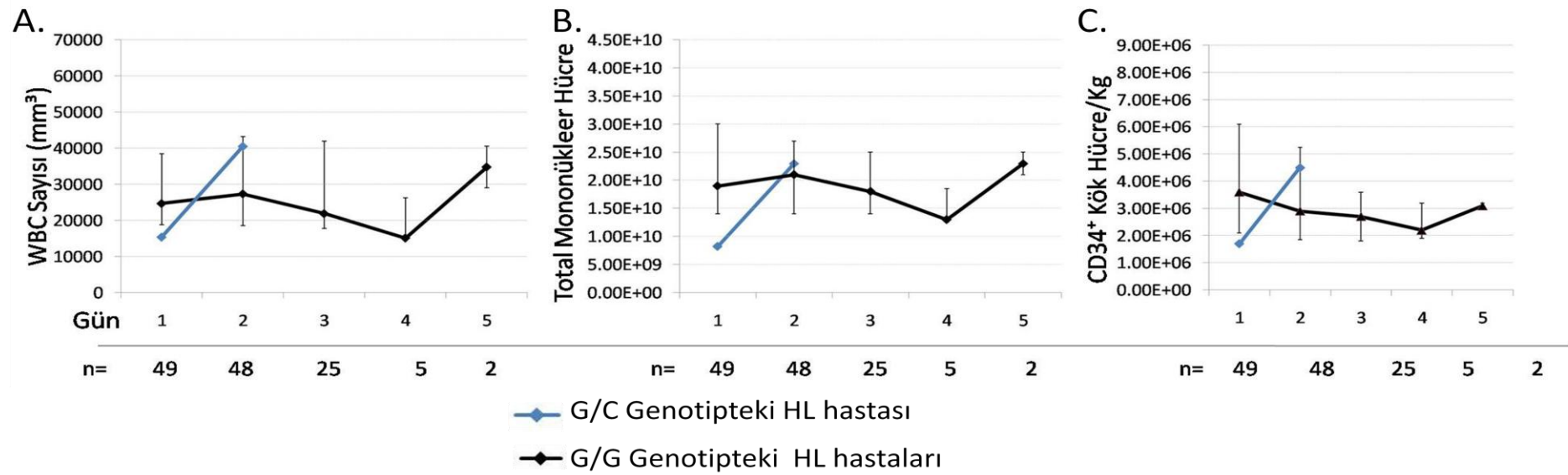
G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i heterozigot polimorfik olarak taşıdığı tespit edilen HL hastasının BK, total mononükleer hücre, CD34⁺ kök hücre/kg sayıları ile oluşturulan grafikler (Şekil 4.45) SNP'i majör alel homozigot taşıyan HL hastalarının değişim grafikleri ile karşılaştırıldı (Şekil 4.46).

Heterozigot G/C genotipteki HL hastasında 1. ve 2. günlerde gözlenen BK, total mononükleer hücre ve CD34⁺ kök hücre/kg değişimleri benzerdir ve 2. günde yüksek artış gözlenmektedir.

Heterozigot HL hasta verileri ile SNP'i G/G genotipte taşıyan HL hasta grubu karşılaştırıldığında G/C genotipteki hastanın 1. gündeki değerlerinin grup dağılımında görülen değerlerden az olduğu görülmektedir (Bkz. Şekil 4.45).



Şekil 4.45. G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i G/C genotipte taşıyan HL hastasının toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.



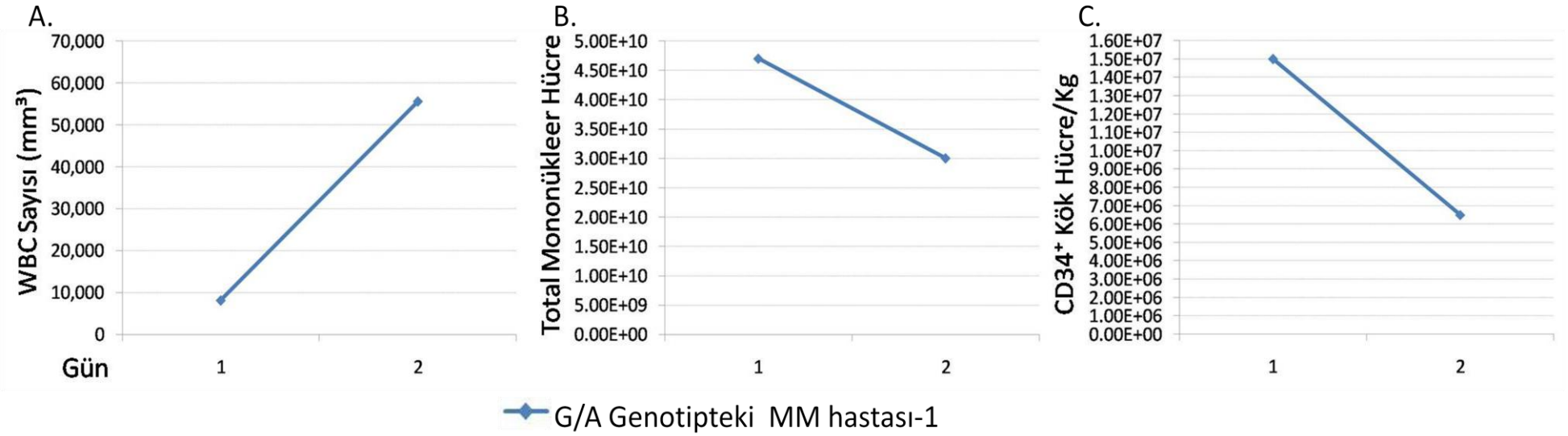
Şekil 4.46. G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i G/C genotipteki HL hastasının, G/G genotipteki HL hasta grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) ile karşılaştırıldı. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.

4.6.3. G-CSF-R Genindeki g.6219430 G>A SNP'i Heterozigot (G/A) Genotipte Taşıyan MM Hastalarının Verileri

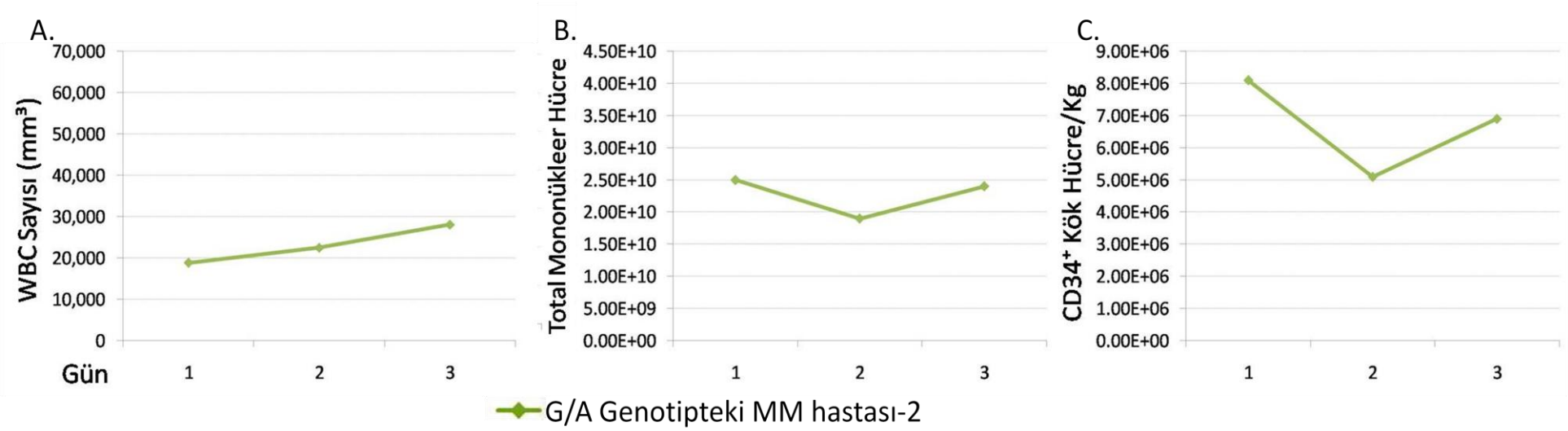
G-CSF-R genindeki g.6219430 G>A (rs3918001) SNP'i heterozigot polimorfik olarak taşıdığı tespit edilen 2 MM hastasının BK, total mononükleer hücre, CD34⁺ kök hücre/kg sayıları ile oluşturulan grafikler (Şekil 4.47,48) SNP'i majör alel homozigot taşıyan MM hastalarının değişim grafikleri ile karşılaştırıldı (Şekil 4.49).

Heterozigot G/A genotipteki MM hastası-1'in BK sayısında 2. günde ciddi artış gözlenmektedir. Total mononükleer hücre ve CD34⁺ kök hücre/kg sayıları ise 1.günde en yüksek düzeye ulaşip devamında düşüşe geçmektedir (Şekil 4.47). G/A genotipteki MM hastası-2 'de BK sayıları günlerce artmaktadır. Ancak 2. günden 3. güne doğru artış olduğu görülmektedir. Total mononükleer hücre ve CD34⁺ kök hücre/kg kinetikleriyse benzer olup sayılar 1. ve 3. günde artmakta, aradaki 2. günde ise azalmaktadır (Şekil 4.48).

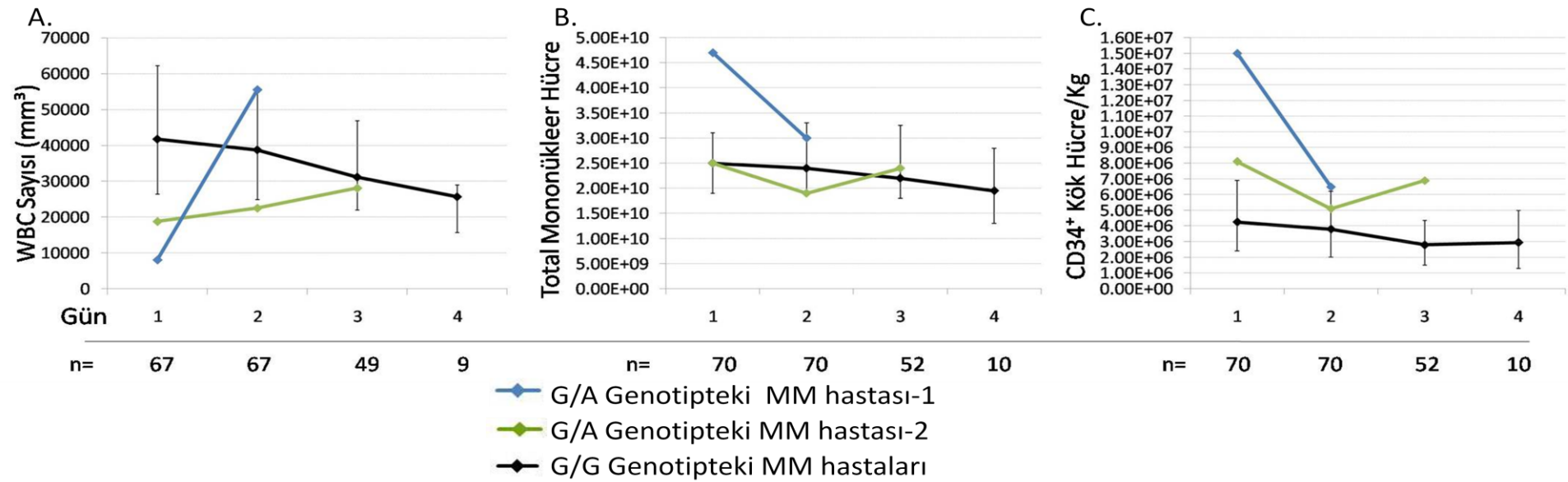
Heterozigot MM hastaları ile SNP'i G/G genotipte taşıyan MM hasta grubu bir arada bakıldığında G/A genotipteki MM hastası-1'in 1. gününde gözlenen BK sayısının grubun altında, bu gündeki total mononükleer hücre ve CD34⁺ kök hücre/kg sayılarının ise grubun çok üstünde olduğu görülmektedir. G/C genotipteki MM hastası-2 ise 1. gündeki BK sayısı ve 1., 2. gündeki yüksek CD34⁺ kök hücre/kg sayıları ile farklılık göstermektedir (Şekil 4.49).



Şekil 4.47. G-CSF-R genindeki g.6219430 G>A (rs3918001) SNP'i G/A genotipte taşıyan MM hastasının toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.



Şekil 4.48. G-CSF-R genindeki g.6219430 G>A (rs3918001) SNP'i G/A genotipte taşıyan MM hastasının toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.



Şekil 4.49. G-CSF-R g.6219430 G>A (rs3918001) SNP'i G/A genotipindeki MM hastaları, G/G genotipteki MM hasta grafikleri

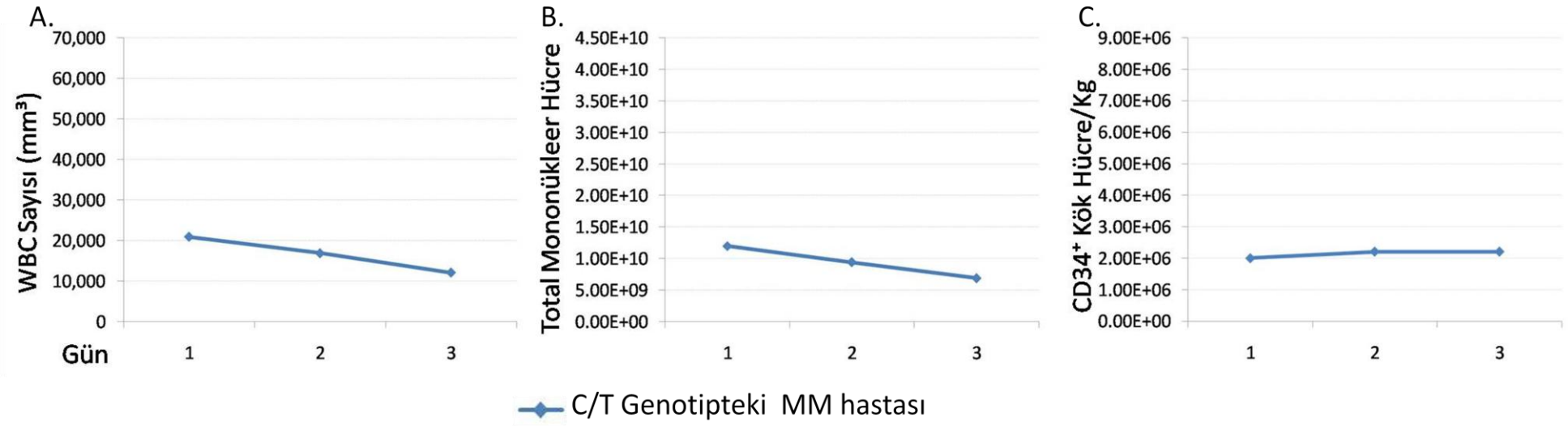
(Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) ile karşılaştırıldı. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.

4.6.4. G-CSF-R Genindeki g.6219475 C>T SNP'i Heterozigot (C/T) Genotipte Taşıyan MM Hastasının Verileri

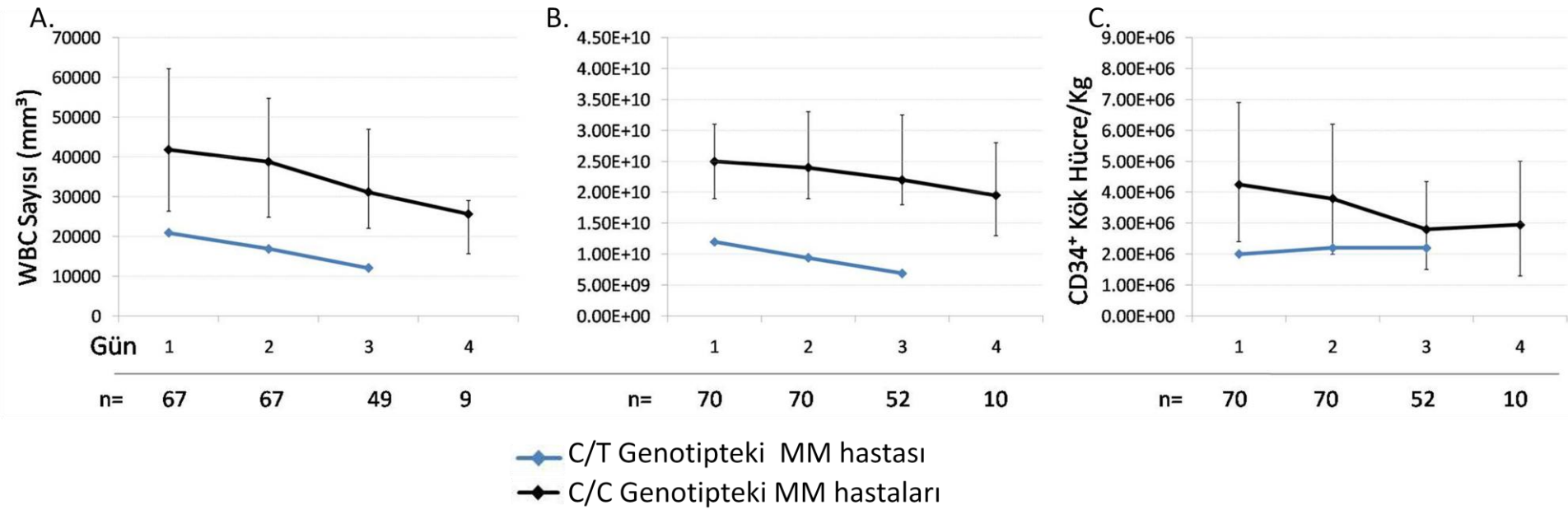
G-CSF-R genindeki g.6219475 C>T (rs3918021) SNP'i taşıyan heterozigot polimorfik olarak taşıdığı tespit edilen MM hastasının BK, total mononükleer hücre, CD34⁺ kök hücre/kg sayıları ile oluşturulan grafikler (Şekil 4.50) SNP'i majör alel homozigot taşıyan MM hastalarının değişim grafikleri ile karşılaştırıldı (Şekil 4.51).

Heterozigot C/T genotipteki MM hastasının BK ve total mononükleer hücre sayılarının 1.günden 3. güne doğru azalarak gittiği görülmektedir (Şekil 4.50.A,B). Bunun tam tersine CD34⁺ kök hücre/kg sayıları ise günden güne artmaktadır (Şekil 4.50.C).

Heterozigot MM hastası ile SNP'i C/C genotipte taşıyan MM hasta grubuna bir arada bakıldığında C/T genotipteki MM hastasının BK ve total mononükleer hücre sayılarının grubun çok altında olduğu görülmektedir. CD34⁺ kök hücre/kg sayılarının 1. gün dışındaki değerleri grup dağılımının içindedir (Şekil 4.51).



Şekil 4.50. G-CSF-R genindeki g.6219475 C>T (rs3918021) SNP'i C/T genotipte taşıyan MM hastasının toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.



Şekil 4.51. G-CSF-R g.6219475 C>T (rs3918021) SNP'i i C/T genotipindeki MM hastası, C/C genotipteki MM hasta grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) ile karşılaştırıldı. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.

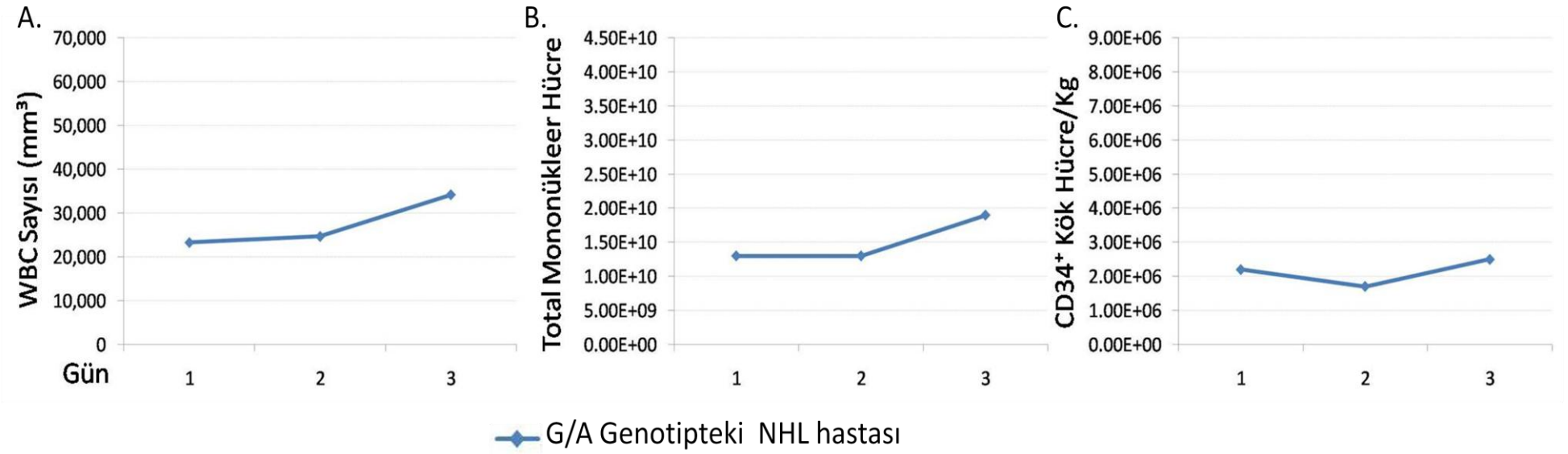
4.6.5. G-CSF-R Genindeki g.6219886 G>A SNP'i Heterozigot (G/A) Genotipte Taşıyan Bireylerin Verileri

SNP'i Heterozigot Genotipte Taşıyan NHL Hastası

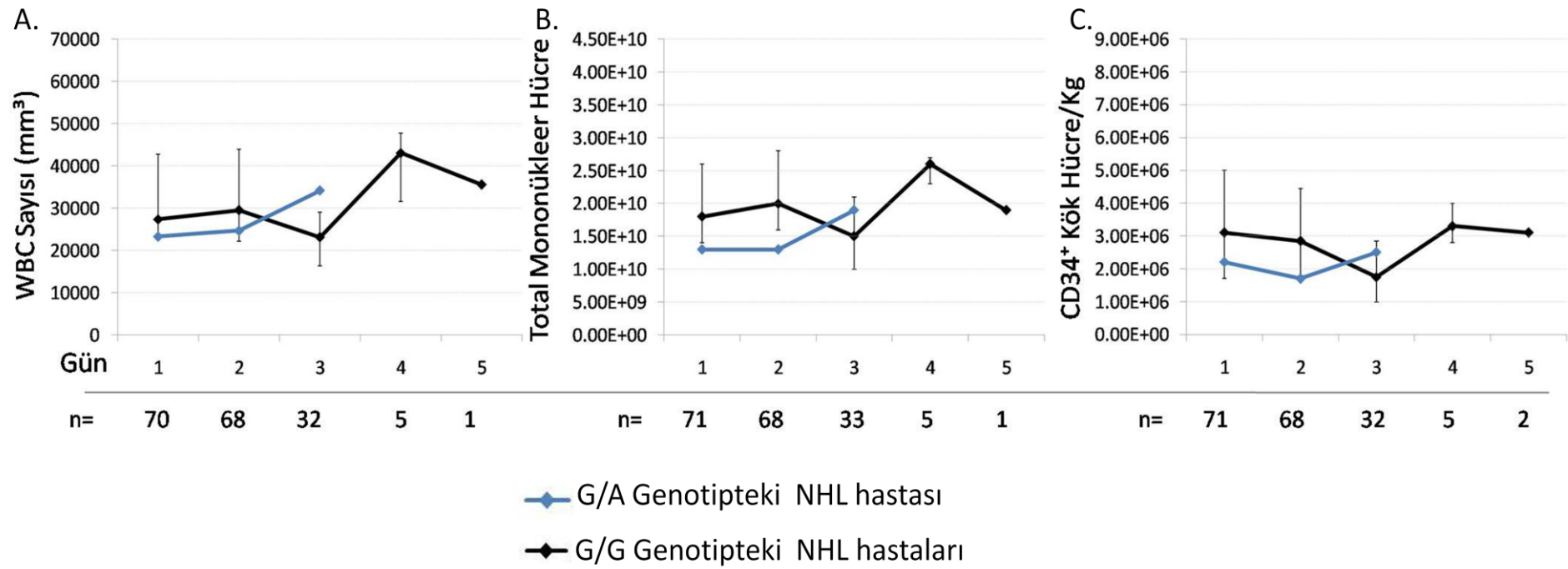
G-CSF-R genindeki g.6219886 G>A (23) SNP'i heterozigot polimorfik olarak taşıdığı tespit edilen NHL hastasının BK, total mononükleer hücre, CD34⁺ kök hücre/kg sayıları ile oluşturulan grafikler (Şekil 4.52) SNP'i majör alel homozigot taşıyan NHL hastalarının değişim grafikleri ile karşılaştırıldı (Şekil 4.53).

Heterozigot G/A genotipteki NHL hastasının BK sayısındaki artış 1. günden 2. güne çok hafif 3. günde ise belirgin düzeydedir (Şekil 4.52.A). Artan total mononükleer hücre sayıları 1.ve 2. günde aynı olup 3. günde yükselmektedir (Şekil 4.52.B). CD34⁺ kök hücre/kg sayılarında ise 1. ve 3. günde artış 2. günde azalma gözlenmektedir (Şekil 4.52.C).

Heterozigot NHL hastası ile SNP'i G/G genotipte taşıyan NHL hasta grubuna bir arada bakıldığında G/A genotipteki hasta verilerinin genelde grup dağılımı içerisinde olduğu ancak 3. gündeki BK sayısı ve 2. gündeki total mononükleer hücre sayılarının dağılım hafif de olsa dışında kaldığı görülmektedir (Şekil 4.53).



Şekil 4.52. G-CSF-R genindeki g.6219886 G>A (23) SNP'i G/A genotipte taşıyan NHL hastasının toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.



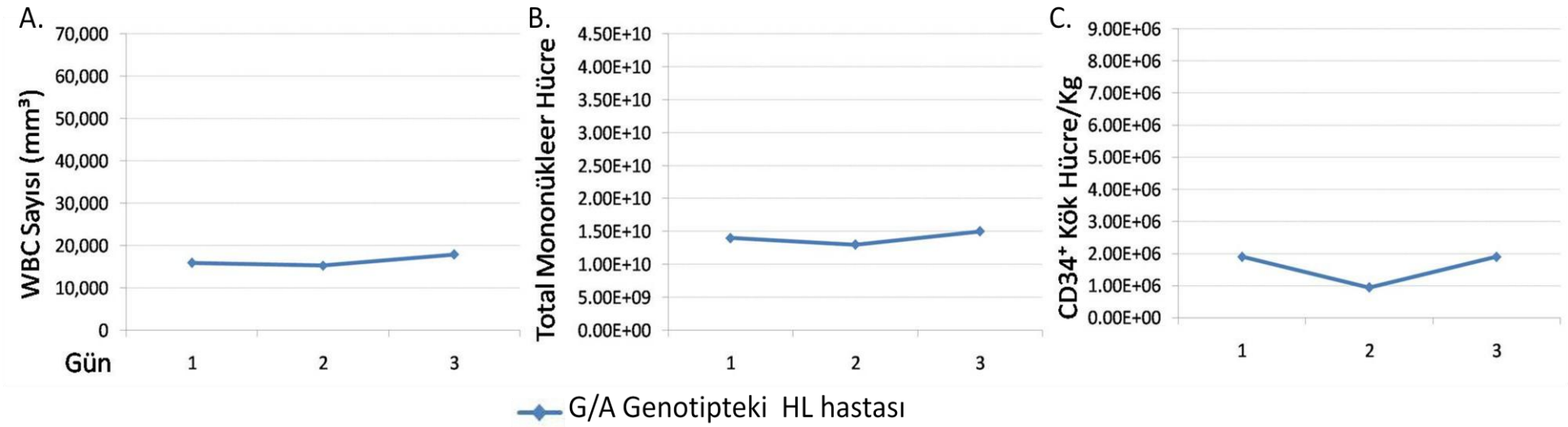
Şekil 4.53. G-CSF-R g.6219886 G>A (23) SNP'i G/A genotipteki NHL hastası, G/G genotipteki NHL hasta grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) ile karşılaştırıldı. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.

SNP'i Heterozigot Genotipte Taşıyan HL Hastası

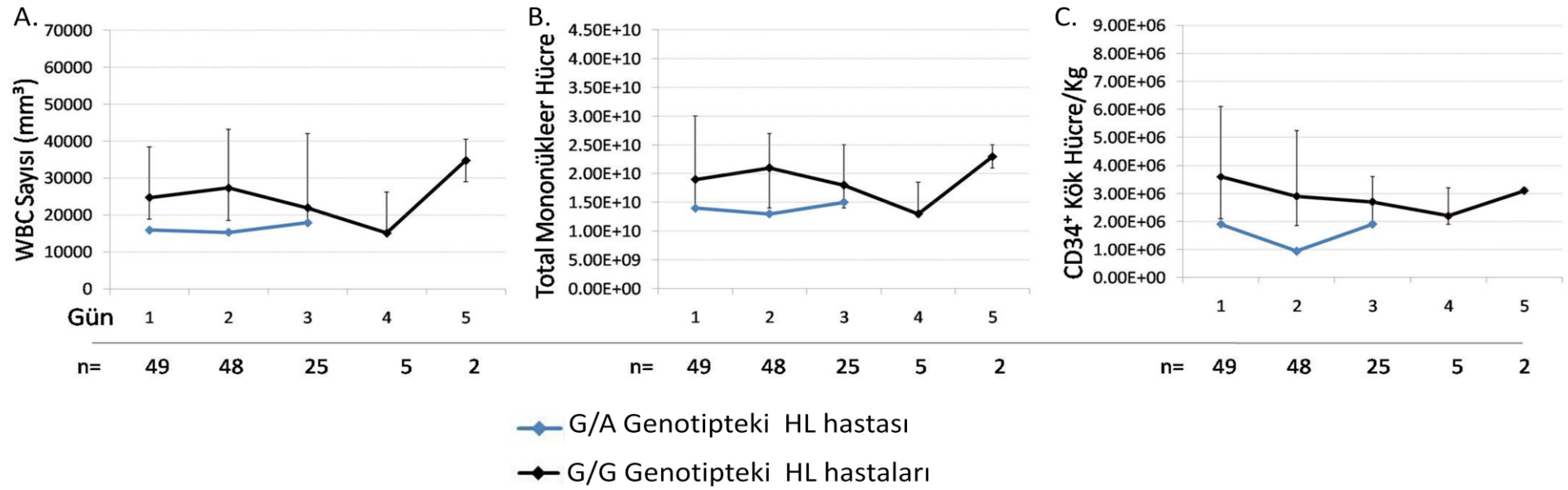
G-CSF-R genindeki g.6219886 G>A (23) SNP'i heterozigot polimorfik olarak taşıdığı tespit edilen HL hastasının BK, total mononükleer hücre, CD34⁺ kök hücre/kg sayıları ile oluşturulan grafikler (Şekil 4.54). SNP'i majör alel homozigot taşıyan HL hastalarının değişim grafikleri ile karşılaştırıldı (Şekil 4.55).

Heterozigot G/A genotipteki HL hastasının BK, total mononükleer hücre, CD34⁺ kök hücre/kg kinetikleri benzer olup 1. ve 3. günde artış 2. günde azalma yönündedir.

Heterozigot HL hastası ile SNP'i G/G genotipte taşıyan HL hasta grubuna bir arada bakıldığında 2. gündeki G/C genotipteki hasta verilerinin grup dağılımdan düşük değerde olduğu görülmektedir.



Şekil 4.54. G-CSF-R genindeki g.6219886 G>A (23) SNP'i G/A genotipte taşıyan HL hastasının toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.



Şekil 4.55. G-CSF-R g.6219886 G>A (23) SNP'i G/A genotipteki HL hastası, G/G genotipteki HL hasta grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) ile karşılaştırıldı. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.

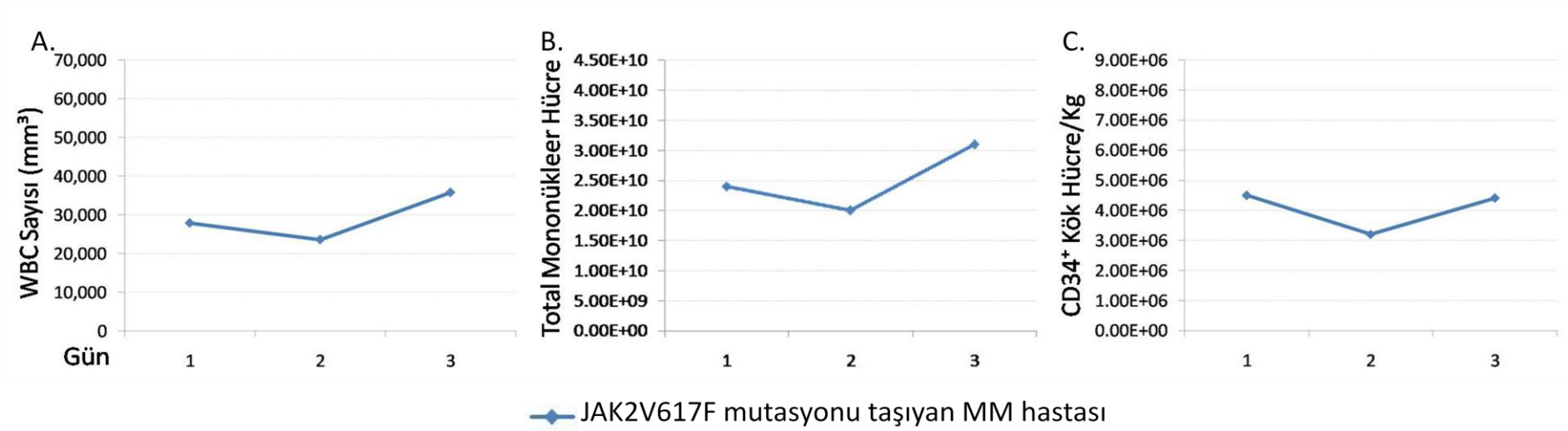
4.6.6. JAKV617F Mutasyonu Taşıyan MM Hastasının Verileri

JAKV617F Mutasyonu taşıdığı tespit edilen MM hastasının BK, total mononükleer hücre, CD34⁺ kök hücre/kg sayıları ile oluşturulan grafikler (Şekil 4.56). SNP'i majör alel homozigot taşıyan MM hastalarının değişim grafikleri ile karşılaştırıldı (Şekil 4.57).

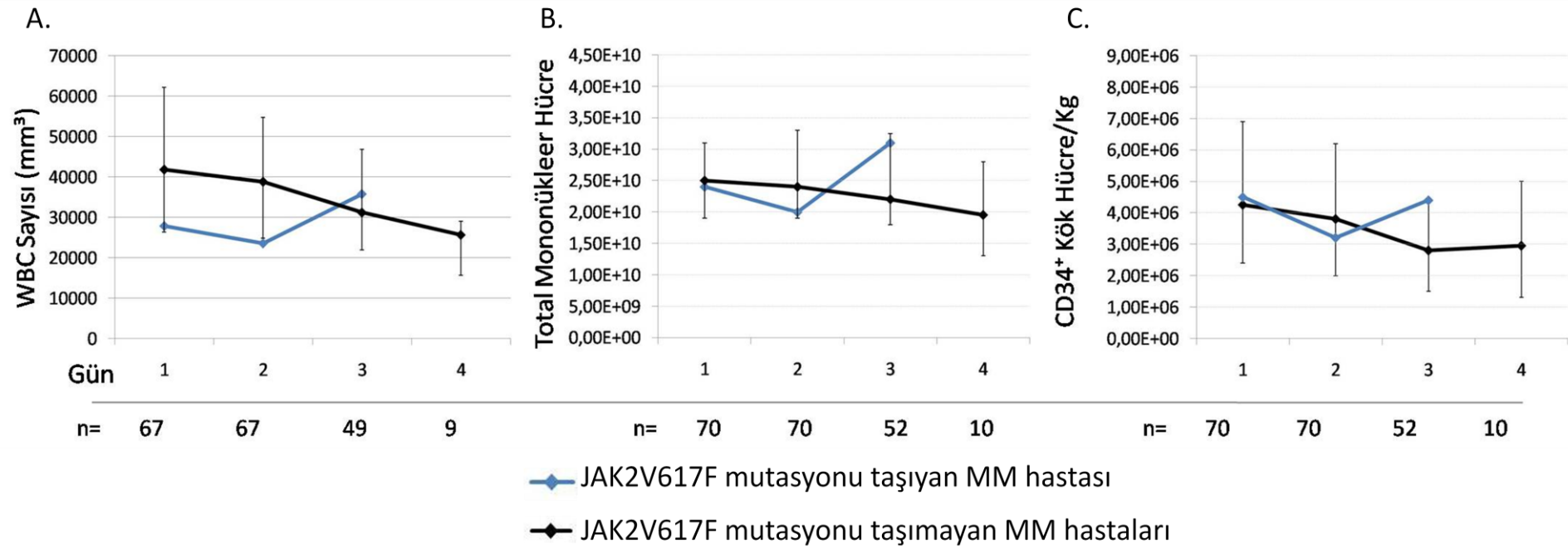
JAKV617F Mutasyonu taşıyan MM hastasının BK, total mononükleer hücre, CD34⁺ kök hücre/kg kinetikleri benzer olup 1. gündeki artış 2. günde azalırken 3.günde yeniden arttığı gözlenmektedir.

Mutasyon taşıyan birey ile mutasyon taşımayan MM hasta grubuna bir arada bakıldığında mutasyonlu birey verilerinin grup dağılımının sınır değerlerine yakın olduğu görülmektedir.

G-CSF-R genindeki polimorfizmleri heterozigot veya minör alel homozigot genotipte taşıyan bireyler ile JAK2V617F mutasyonlu bireyin toplama günlerinde elde edilen mm³'teki BK, total mononükleer hücre ve CD34⁺ kök hücre/kg sayıları Tablo 4. 8'de gösterilmektedir.



Şekil 4.56. JAK2V617F mutasyonu taşıyan MM hastasının toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.



Şekil 4.57. JAK2V617F mutasyonu taşıyan MM hastası, mutasyon taşımayan MM hasta grafikleri (Ortanca ve çeyrekler arası değerleri) ile karşılaştırıldı. A. BK sayısı (mm³) kinetik değişim grafiği B. Total mononükleer hücre sayısı kinetik değişim grafiği C. CD34⁺ kök hücre/kg sayısı kinetik değişim grafiği.

Tablo 4.8. G-CSF-R genindeki polimorfizmleri heterozigot veya minör alel homozigot genotipte taşıyan bireyler ile JAK2V617F mutasyonlu bireyin toplama günlerine karşı verileri gösterilmektedir.*(23)

G-CSF-R Genindeki missense SNP	Genotip	Tanı	WBC Sayısı (mm ³) 1.gün	WBC Sayısı (mm ³) 2.gün	WBC Sayısı (mm ³) 3.gün	WBC Sayısı (mm ³) 4.gün	Total Mononükleer Hücre Sayısı 1.gün	Total Mononükleer Hücre Sayısı 2.gün	Total Mononükleer Hücre Sayısı 3.gün	Total Mononükleer Hücre Sayısı 4.gün	CD34* Kök Hücre/Kg 1. gün	CD34* Kök Hücre/Kg 2. gün	CD34* Kök Hücre/Kg 3. gün	CD34* Kök Hücre/Kg 4. gün
g.6214055 G>A (rs3918018)	A/A	Sağlıklı donör	24,900	26,700			1.50E+10	1.60E+10			2.30E+06	2.20E+06		
	G/A	MM-1	24,700	32,400	24,200		2.10E+10	2.80E+10	2.10E+10		4.10E+06	5.20E+06	4.20E+06	
	G/A	MM-2	137,800	368,000			8.10E+09	2.00E+10			4.30E+06	7.60E+05		
	G/A	MM-3	35,000	30,000	31,300		3.00E+10	2.60E+10	2.70E+10		4.90E+05	6.60E+05	7.30E+05	
	G/A	Primer Amiloidoz	72,400	11,000			4.00E+10	5.50E+10			1.50E+07	1.80E+07		
g.6217128 G>C (rs3917991)	G/C	Sağlıklı donör-1	45,300	65,600	8,300	10,100	2.60E+10	3.60E+10	4.60E+09	5.80E+09	3.70E+06	7.80E+06	6.40E+05	5.80E+05
	G/C	Sağlıklı donör-2		26,300	35,000		2.80E+10	2.20E+10	3.00E+10		1.50E+06	3.10E+05	1.60E+06	
	G/C	Sağlıklı donör-3	51,100	47,900	33,700		2.90E+10	1.30E+10	1.80E+10		5.30E+06	2.10E+06	2.80E+06	
	G/C	MM-1	28,200	38,200	31,700		1.60E+10	2.20E+10	1.80E+10		4.70E+06	3.40E+06	5.30E+06	
g.6217128 G>C (rs3917991), g.6219430 G>A (rs3918001)	G/C, G/A	MM-2	18,800	22,500	28,100		2.50E+10	1.90E+10	2.40E+10		8.10E+06	5.10E+06	6.90E+06	
	G/C	MM-3	138,000	52,300			7.20E+10	5.70E+10			1.10E+07	3.90E+06		
g.6217128 G>C (rs3917991)	G/C	MM-4	25,000	31,600	32,400		1.50E+10	1.40E+10	1.70E+10		4.40E+06	2.60E+06	3.60E+06	
	G/C	NHL-1	24,900	19,100	20,800		1.40E+10	1.10E+10	1.20E+10		1.50E+06	2.20E+06	2.10E+06	
	G/C	NHL-2	23,500	27,300	25,500		2.10E+10	2.30E+10	2.20E+10		3.50E+06	3.10E+06	3.20E+06	
	G/C	HL	15,400	40,500			8.20E+09	2.30E+10			1.70E+06	4.50E+06		
	G/A	MM-1	8,100	55,500			4.70E+10	3.00E+10			1.50E+07	6.50E+06		
g.6219430 G>A (rs3918001)	G/A	MM-1	8,100	55,500			4.70E+10	3.00E+10			1.50E+07	6.50E+06		
g.6219475 C>T (rs3918021)	C/T	MM	20,900	16,900	12,100		1.20E+10	9.40E+09	6.90E+09		2.00E+06	2.20E+06	2.20E+06	
g.6219886 G>A (Wölfler.)	G/A	NHL	23,300	24,700	34,200		1.30E+10	1.30E+10	1.90E+10		2.20E+06	1.70E+06	2.50E+06	
	C/T	HL	15,900	15,300	17,900		1.40E+10	1.30E+10	1.50E+10		1.90E+06	9.40E+05	1.90E+06	
JAK2V617F +		MM	27,900	23,600	35,800		2.40E+10	2.00E+10	3.10E+10		4.50E+06	3.20E+06	4.40E+06	

5. TARTIŞMA

Dünyadaki her insan –tek yumurta ikizleri hariç– eşsiz kendine özgü bir genoma sahiptir. Herhangi iki bireyin genomları birbirine % 99,9 oranında benzer olsa bile, genomdaki 3,2 milyar baz çifti aralarında milyonlarca farklılık barındırabilir. Genomdaki bu farklılıklar, bireyler arasındaki kalıtsal varyasyonları oluştururlar(138).

Genomdaki sekans varyasyonlarının %90'ı DNA sekansındaki tek bir baz değişimi ile oluşan polimorfizmlerdir ve SNP olarak adlandırılırlar(129,139). İnsan DNA'sındaki 3,2 milyar bazdan, 17 milyonunun SNP olarak bulunduğu tahmin edilmektedir(139). Genlerin kodlanan bölgelerinde lokalize olan SNP'ler direkt olarak bulunduğu genin proteinini etkileyerek, protein kayıplarına ve fonksiyonel değişimlere neden olabilirler. Bunun yanı sıra SNP'ler kodlanmayan genlerin promotor ve regülatör bölgelerinde de yer alabilir ve genin transkripsiyonel aktivitesini modifiye edebilirler(128,140). Genlerin farklı bölgelerinde bulunabilen SNP'ler insan genomuna eşit olarak dağılmamışlardır. SNP'lerin yalnızca takriben 500.000'i, genomun %5'ini kapsayan kodlanan bölgelerdedir(126,139). Genel olarak kodlanmayan bölgelerdeki baz değişimleri ve kodlanan bölgelerdeki protein değişimine neden olmayan "*synonymous*" baz değişimleri, protein değişimine neden olan "*non-synonymous*" değişimlerden daha yaygındır. Bu durum amino asitlerin kimliğini belirleyen pozisyonların çeşitliliğini azaltan ciddi bir selektif baskıyı yansıtır(141).

Farklı tipteki SNP'lerin yalnızca bulunma oranları değil, minör alel frekansları da birbirinden farklıdır. SNP'ler minör alel frekanslarına göre > %15 yüksek, %5-15 orta, <%5 düşük olarak gruplandırılabilirler. Yetmişbin civarındaki "*non-synonymous*" SNP'lerin ve özellikle bunlar arasından *missense* değişimlere neden olanların diğerlerine göre daha nadir bulunmaları ve daha düşük (%5'in altında) minör alel frekanslarına sahip olmaları insan evrimi süresince devam eden arındırıcı seleksiyonunun kanıtı olduğu düşünülmektedir(130).

SNP'ler sonucu genlerde oluşan tek baz değişimleri hastalıklara karşı yatkınlıklara neden olabilir, ilaç etkinliğine ve toksisitesine etki edebilirler(129). İnsanlar arasındaki çeşitlilikten sorumlu olan SNP'lerin alel frekansları, etnik gruplar ve popülasyonlar arasında değişkenlik göstermektedir(126,141). SNP'lerin insan genomunda sıklıkla bulunmaları ve stabil olmaları, onları genlerin tanımlanmasında cazip bir araç veya belirteç haline getirmiştir(128,132).

Sitokinler hedef hücrelerdeki özgül reseptörlerine bağlanarak hücrenin aktivitelerini kontrol eden solübl protein veya glikoprotein yapısında mediatörlerdir. Sitokinler hücre içerisinde sinyal transdüksiyonunu başlatır ve sekonder yolları modüle ederler. İnterlökinler, koloni stimüle edici faktörler, büyüme faktörleri, interferonlar ve tümör nekroz faktör ailesini içinde barındıran sitokinler pleiotropik olup vücuttaki birçok sistemi etkilemekte ve homeostazı sağlamaktadır. Son yıllarda sitokinlerin ve sitokin reseptörlerinin yüksek düzeyde polimorfik oldukları gösterilmiş, bu polimorfizmler birden çok immün hastalık ve transplantasyon komplikasyonları ile ilişkilendirilmiştir(142).

Grimaldi ve diğ. (143) IL-1 α geninin promotor bölgesinde belirlenen bir SNP'in erken görülen Alzheimer Hastalığında etkili olduğunu göstermişlerdir. Japon popülasyon unda yapılan bir araştırma IL-12-R β geninin kodlanan bölgelerindeki 3 *missense* ve 1 "*synonymous*" SNP'in reseptör fonksiyonunu kısmi olarak bozup cevap verme yeteneğini azalttığını bu nedenle de SNP'leri taşıyan bireylerin tüberküloza eğilimli olduklarını rapor etmişlerdir (144). He ve diğ.'i (145) GM-CSF genlerinin intron veya ekzon bölgelerinde taşınan birkaç SNP'i, 12 aylık çocuklarda görülen astım, dermatit ve diğer atopik hastalıklar ile ilişkilendirmişlerdir. Ayrıca VEGF geninin promotor bölgesinde bir baz değişime neden olan polimorfizmin prostat kanseri için kullanılabilecek bir genetik belirteç adayı olabileceğini (146), Cozen ve ark. (147) ise IL-6 geninin promotor bölgesine denk gelen SNP'in IL-6 ekspresyon düzeyini etkilediğini dolaylı olarak da genç erişkin HL kanser riskine etkisi olduğunu göstermiştir.

Yapılan çalışmalar polimorfizmlerin, hastalıkların yanı sıra kök hücre transplantasyonu ve devamında görülebilen GVHD (*Graft versus Host Disease*) ile de

bağıntılı olabildiğini göstermektedir. Örneğin Ishikawa ve diğ.'lerinin (148) Japon kemik iliği transplantasyon hastalarında ve donörlerinde yaptığı bir çalışma sonucunda TNF- α geninin promotor, TNF-R2 geninin kodon bölgesinde yer alan SNP'lerin GVHD insidansını ve bundan bağımsız olarak rölaps oranını da etkilediği bulunmuştur. Japon popülasyonundaki çocuklarda gerçekleştirilen bir çalışmada ise HLA-identik ikiz donörlerden gerçekleştirilen kemik iliği transplantasyonunda alıcıların TGF- β 1RII, donörlerin ise TGF- β 1 genindeki bir polimorfizmin akut GVHD gelişimi ile bağlantılı olduğu saptanmıştır.(149) Son olarak Shamim ve ark.'ları (150) allojenik kök hücre transplantasyonunda donörlerin IL-7R α genindeki *missense* SNP'in tedavi bağımlı mortalite ile ilişkili olduğunu tespit etmişlerdir.

Bu çalışmalar sitokin ve sitokin reseptörlerindeki polimorfizmlerin fonksiyonel etkilerinin yadsınamayacağını belirtmektedir. Ancak, granüositlerin oluşumunu, proliferasyonunu, farklılaşmasını sağlayan, doğal immün yanıtta rol alan, kök hücre mobilizasyonunda en etkin ajan olarak kullanılan G-CSF'in bağlandığı G-CSF reseptörünün polimorfizmleri ile ilgili çalışmaların çok az olması, konuya ilgilimizi arttırarak, çalışmamızın temelini oluşturmuştur.

G-CSF-R genindeki polimorfizmlerin sadece birinden bahseden ve birbirine zıt bulgular gösteren literatürde iki araştırma bulunmaktadır. İlkinde Wölfler ve ark.'ları (23) G-CSF-R'in intrasitoplazmik distal ucundaki Glu785Lys amino asit değişimine neden olan SNP'i, G-CSF stimülasyonu sonrasında koloni formasyon kapasitesinin azalması ve yüksek- riskli MDS gelişimine yatkınlık ile ilişkilendirmiştir. Diğer çalışma ise polimorfizm ile MDS arasındaki ilişki varlığını desteklememektedir(118).

Çalışmamızda, NCBI GenBank veri tabanı (22), Wölfler ve ark.'ın (23) çalışmasından yararlanılarak, 1. kromozomun kısa kolundaki (1p 32-35) G-CSF-R geninde varlığı belirlenen 16 "*non-synonymous*" *missense* SNP'ten 11'i taranmış ve genotip frekansları çıkarılmıştır. G-CSF-R'daki polimorfik alellere ilişkin elde edilen tüm genotip verileri ekstrasellüler kısımdan intrasellüler kısma doğru sırasıyla incelendiğinde, G-CSF-R başlangıç kodonundan sonra gelen g.6210695 C>T (rs34362628) ilk SNP olup reseptörün Ig benzeri bölgesinde yer alır. Çalışma

grubumuzdaki 303 bireyin hepsinde bu polimorfizmin %100 C/C genotipinde olduğunu belirleme imkanımız oldu. Beyaz ve siyah ırktaki insanlardan oluşan 78 kişilik bir popülasyon çalışmasında bu polimorfizmin %97,4 C/C, %2,6 C/T genotipinde olduğu belirtilmiştir(151). Sarı ırkı yansıtan bir popülasyon çalışması olmaması nedeniyle bizim grubumuzun hangi ırka daha yakın olduğu tahmin edilememektedir, ancak yapılan popülasyon çalışmasında minör alel frekansının %1 olması dikkat çekmektedir. Bu frekans çok düşük olup bir popülasyondaki varyasyonun polimorfizm olarak nitelendirme sınırındır. Bu nedenle kendi çalışma grubumuzda "T" polimorfik alelin bulunmaması olağandır.

G-CSF-R'in CRH bölgesinde yer alan g.6213664 T>C (rs3917993) SNP'i çalışma grubumuzdaki 294 bireyde tarandı ve yalnızca T alelinin varlığı (%100 homozigot T/T genotipi) saptandı. DNA sekans varyasyonlarını ve sıklıklarını tespit etmeyi hedef almış Uluslararası Hapmap projesi doğrultusunda 90 Çinli, 90 Japon ve 120 Avrupalıda taranan bu SNP'in %100 T alel frekansında olduğu bulunmuştur(152). Başka bir çalışmada ise 48 Afro-Amerikanda tarama yapılmıştır ve % 6,2 C alel frekansına rastlanmıştır(153). Bu bulgular Türklerden oluşan örneklem grubumuzun sarı ile beyaz ırka benzer olabileceğini ancak siyah ırktan farklı olduğunu düşündürmektedir.

G-CSF-R'in CRH bölgesinde yer alan diğer bir SNP g.6213811 C>T (rs34845290) çalışma grubumuzdaki 294 bireyde tarandı ve yalnızca C aleli (%100 homozigot C/C genotipi) tespit edildi. Yukarda belirtilen yarı yarıya beyaz ve siyah ırktaki insanlardan oluşan 78 kişilik popülasyon çalışmasında bu polimorfizmin de %97,4 C/C, % 2,6 C/T genotipinde olduğu bulunmuş, Hardy-Weinberg kuralına göre hesaplama yaptıklarında T alel frekansının %1 olduğunu belirtmişlerdir(154). Bu SNP ile ilişkili popülasyon çalışmaları yetersiz olduğu için irksal benzerlik açısından kesin bir yorum yapılamamaktadır.

Yine G-CSF-R'in CRH bölgesinde yer alan g.6214055 G>A (rs3918018) SNP'i çalışma grubumuzdaki 294 bireyde tarandı ve %97,3 homozigot G/G , %1,36 heterozigot G/A , %0,34 homozigot A/A genotipinde bulunduğu tespit edildi. Uluslararası Hapmap projesi başlığı altında oluşturulan grupta (120 beyaz, 180 sarı,

120 siyah ırktan bireylerde) bu SNP taranmış ve beyaz ırk hariç diğerlerinde %100 G/G genotipi saptanmıştır. Beyaz ırkta ise % 3,4 A/G genotip frekansı görülürken homozigot A/A genotipine hiç rastlanmamıştır(155). Popülasyon bulguları çalışma grubumuzdan elde edilen veriler ile karşılaştırıldığında genotip frekanslarımız $\leq 1\%$ olsa da beyaz ırka yakın olduğumuz görülmektedir. Ancak hiçbir popülasyon da A/A genotipi görülmezken örneklem grubumuzda karşılaşılması ilginçtir.

G-CSF-R'ın CRH bölgesine denk gelen 3 SNP üzerinde düşünülecek olunursa, Tip-1 sitokin reseptör ailesi üyesi G-CSF-R'ın özellikle ekstrasellüler kısımdaki yapılarının bu ailenin diğer üyeleri olan IL-2,7,9,11,12, GM-CSF, TPO, EPO..vb. ile benzer olduğu bilinmektedir. Hatta aile üyeleri ekstrasellüler kısımda yer alan CRH bölgesindeki konservatif sistein reziduları, *WSXWS* motifleri ile tanımlanırlar(14,16-17). Sonuçta sitokin reseptör homoloji bölgesi, Tip-1 sitokin reseptör aile üyeleri arasında evrimsel açıdan korunmuş bir bölgedir bu nedenle bölgedeki polimorfik minör alel frekansının olmaması ya da çok düşük olması makul gelmektedir.

G-CSF-R geninin ilk FN tip III bölgesini kodlayan ekzonunda yer alan g.6216525 G>A (rs3918020) SNP'i taranırken bazı bireylerin PCR-RFLP analizlerinde optimizasyon sorunları yaşandığından diğer polimorfizmlere oranla daha az kişide (n=270) taranabildi ve %100 G/G genotipi tespit edildi. Hapmap Proje grubunda SNP'in sarı ve siyah ırkta %100 G/G genotipte, beyaz ırkta ise %1,7 heterozigot genotipte olduğu belirlenmiştir. Bu da beyaz ırkta A alelinin Hardy-Weinberg kuralına göre % 0,8 frekansta olduğunu işaret eder ki bu frekans polimorfizm olarak adlandırılmayacak kadar düşüktür(156). Fonksiyonel özelliği kesin olarak bilinmese de örneklem grubumuzun ve tüm ırkların birbirine benzer şekilde %100'e yakın G alel frekansını göstermesi bu bölgedeki polimorfik A alelinin evrimsel süreç içerisinde yönlü seleksiyon ile elendiğini göstermektedir. Yönlü seleksiyon, doğal popülasyonlar içerisinde avantajlı alel dışındaki tüm alellerin yok olmasına, elimine edilmesine neden olur. Bu seleksiyonun etkisi alel frekansları %100 olan diğer G-CSF-R geni polimorfizmlerinde de düşünülebilir (157).

G-CSF-R geninin ikinci FN tip III bölgesinde olan g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'nin 303 bireyde genotip dağılımları %96,7 homozigot G/G, %3,3 heterozigot

G/C olarak saptandı. Bu polimorfik heterozigot genotip, çalışma grubumuzda taranan 11 polimorfik G-CSF-R gen bölgesi içerisinde en yüksek oranda olanıdır. Buna paralel olarak, minör alel frekansını en yüksek oranda bulundurabilecek bölgenin de burası olduğu söylenebilir. Hapmap proje grubunda taranan bu SNP sarı ırkta %100 G/G genotipinde, beyaz ırkta %1,7 heterozigot, %98,3 homozigot G/G genotipinde, Sahra altı Afrikalı siyah ırkta ise %3 homozigot C/C, %26,7 heterozigot ve %70 homozigot G/G genotip profili ortaya çıkmıştır. Başka bir panel çalışmasında da ırklara göre dağılım Hapmap grubu ile uyumlu olup ek olarak 120 Afro-Amerikan taranmıştır ve bu popülasyon un %24,6 heterozigot, %75,4 homozigot G/G genotipte olduğu tespit edilmiştir (158). Minör alel frekansı yüksekten az orana doğru ırklar içerisinde sırasıyla Sahra altı Afrikalı, Afro-Amerikan siyah ırk, beyaz ırk ve sarı ırk yer almaktadır. Türkleri kapsayan örneklem grubumuzun, beyaz ırkla siyah ırk arasında ancak beyaz ırka çok daha yakın yerleşim gösterdiği söylenebilir.

G-CSF-R geninin üçüncü FN tip III bölgesini kodlayan ekzonda yer alan g.6218218 T>C (rs3917996) SNP'i 297 kişide tarandı ve %100 T/T genotipi bulunup polimorfik minör "C" aleline rastlanmadı. Bu polimorfik bölge Hapmap proje grubunda tarandığında sarı ve beyaz ırkta %100 T/T, Sahra altı Afrikalılarda ise %94,7 T/T, %3,5 C/T, %1,8 C/C genotipinde bulunmuştur. Kırksekiz Afro-Amerikanı içeren bir panelde ise genotipler %95,8 T/T, %4,2 C/T olarak dağılmaktadır (159). Bu durumda siyah ırkın %2-3 arasında ama yine de düşük minör alel frekansında olması ve beyaz, sarı ırkın minör aleli hiç taşıyor olması evrimsel açıdan bu polimorfik alellerin yönlü seleksiyon ile elendiklerini ve konservatif bir bölge oluşumuna yönlenildiği düşünülebilir. Bu polimorfik bölge içerisinde de çalışma grubumuzun beyaz ve sarı ırka yakın olduğu dikkat çekmektedir.

G-CSF-R geninin intrasitoplazmik kısmını kodlayan ekzonlardaki SNP'lerin ilki g.6219430 G>A (rs3918001)'dir. Çalışma grubumuzda taranan 300 bireyden %99,67'si G/G, %0,66 ise heterozigot genotiptedir. Hapmap ve diğer popülasyon çalışmalarında Avrupa ve Asya popülasyon larının %100 G/G genotipte oldukları belirtilmiştir. Sahra-altı Afrikalıları ve Afro-amerikalıları kapsayan çalışmalarda ise sırasıyla minör A aleli frekansının %14,4 ve %25 olduğu saptanmıştır (153).

Örneklem grubumuz polimorfik minör aleli tamamen kaybetmemiş olsa da, gruptaki birey sayısı arttırılrsa bile minör alel frekansının siyah ırktakiler kadar yükselemeyeceği belirgindir. Bu açıdan Türk popülasyonunun yine beyaz ya da sarı ırka daha yakın olduğu söylenebilir.

Intrasitoplazmik bölgedeki bir diğer polimorfizm g. 6219475 C>T (rs3918021) çalışma grubumuzdaki 299 kişide tarandı. SNP'in genotip dağılımı %99,67 homozigot C/C, %0,33 heterozigot C/T olarak belirlendi. Yapılan popülasyon çalışmalarında Asya, Sahra-altı Afrikalılar ve Afro-amerikalıların %100 C/C genotipi taşıırken yalnızca Avrupalıların %8,7 heterozigot ve geri kalan %91,3'ün C/C genotipte dağılım gösterdikleri bulunmuştur (160). Evrimsel açıdan minör alelin yalnızca beyaz ırkta korunmasıyla ilgili bir bilgiye rastlanmasa da örneklem grubumuzun minör alel taşımasıyla beyaz ırka yakın bir genotip gösterdiği söylenebilir.

G-CSF-R'ın intrasitoplazmik distal ucunda yer alan SNP g.6219871 C>T (rs35622214) 292 kişinin hepsinde, %100 C/C genotipte tespit edildi ve minör T aleline rastlanmadı. Bu polimorfik bölge yalnızca beyaz Kafkas ve siyah Afro-Amerikalıları yarı yarıya içeren 78 kişilik grupta taranmış ve genotip dağılımının %97 C/C, %2,6 C/T olduğu gözlenmiştir. Bu durumda T alel frekansı yalnızca %1,3'tür. (161). Beyaz Avrupa ve sarı ırktan çalışmalar olmaması örneklem grubumuzun karşılaştırılmasını zorlaştırırsa da genel olarak minör alel frekansının çok düşük olduğu bu durumdan tahmin edilebilir.

Son olarak, G-CSF-R geninin en distal ucunda Wölfler ve ark.'larının (23) makalesinde incelenen g. 6219886 G>A SNP'i yer alır. Bu polimorfik bölge NCBI genbank veri tabanında geçmediğinden SNP numarası bilinmemektedir. Grubumuzdaki 287 bireyde taranan bu SNP'nin %0,69 heterozigot G/A, %99,3 homozigot G/G genotipinde dağılım gösterdiği saptandı. Minör alel içeren genotip dağılımının çok düşük olması dışında, karşılaştırılacak popülasyon çalışması olmadığından bu polimorfik bölge hakkında bir yorum yapılamamaktadır.

G-CSF-R'ın polimorfik bölgeleri ile ilişkili popülasyon çalışmalarının sonuçlarını bir arada ele alacak olursak genel olarak minör alel frekanslarının (yalnızca %1-4 arasında) çok düşük olduğu dikkati çekmektedir. Hatta 5 polimorfik

bölgede (rs3917993, rs3918018, rs3918020, rs3917996, rs3918021) bazı popülasyonlar minör aleli taşımamaktadırlar. G-CSF-R polimorfik bölgelerinde minör alel frekansının düşük olması normal olarak kabul edilecek olursa bu normalin dışında yalnızca iki polimorfik bölge kalır. Bunlardan biri G-CSF-R 'ın ekstrasellüler kısımdaki FN tip III bölgesinde yer alan rs3917991, ikincisi ise intrasellüler kısımdaki rs3918001'dir. Bu polimorfik bölgelerin ikisindedeki minör alel frekansı en az %12 olup %25'e kadar çıkabilmektedir ki bu yüksek alel frekansları da yalnızca siyah ırklarda gözlenmiştir. Bu veriye dayanarak evrimsel süreç içerisinde G-CSF-R 'ın polimorfik alellerinin genel olarak yönlü seleksiyon ile seçildiğini ve ırklar arasında korunduğunu düşünebiliriz. Bizim örneklem grubumuz da popülasyon çalışmalarından elde edilen verilerle paraleldir ve 11 polimorfik bölgenin 6'sı (rs34362628, rs3917973, rs34845290, rs3918020, rs3917996, rs35622214) minör alel taşımamaktadır. Popülasyon çalışmalarında en yüksek minör alel frekansı gözlenen rs3917991 SNP'i çalışmamızda da aynı özelliktedir.

Evrimsel çalışmalar yaklaşık 794 milyon yıl önce urokordat ve vertebralı ayırımından sonra tip-1 sitokin reseptör ailesinde asıl çeşitlenmenin meydana geldiği belirtilmektedir. Urokordatlardan "*sea squirt*" sonrası adaptif immüitenin ortaya çıktığı düşünülürse Tip-1 Sitokin reseptörlerinin adaptif immüitenin gelişimi ve doğal immüitenin yenilenmesiyle korole olarak çeşitlendiği öne sürülmektedir(162-163) (164). Liongue ve ark. (164) yaptıkları evrim çalışmasında insanlardaki G-CSF-R sekansının 476 milyon yıl önceki *zebrafish* ile aynı olduğundan bahsetmektedir. G-CSF-R sekansının bu kadar eskiye dayandığı ve korunulmuş olduğu düşünülecek olursa G-CSF-R genindeki polimorfik bölgelerde genellikle majör alel homozigot genotip görülmesi makul gelmektedir.

Bilindiği üzere 1980'li yılların başından bugüne benign ve malign hastalıkların tedavisinde periferik kök hücre transplantasyonu kullanılmaktadır. Bu tedavi sürecinde kullanılan kök hücre mobilizasyon rejimleri sonucunda kök hücreler kemik iliğindeki nişlerinden ayrılarak periferik kana geçmektedir ve gerçekleştirdikleri giriş-çıkışlar doğrudan hematopoez biyolojisi ile ilişkilidir. Kök hücrelerin

mobilizasyonunu sağlamak amacıyla yaygın olarak kullanılan en etkin biyolojik büyüme faktörü G-CSF'dir. G-CSF'in etkisini gösterebilmesi için hücre yüzeylerindeki G-CSF reseptörüne bağlanması gerekmektedir (14-15,20,95). Çalışmamızın devamında G-CSF-R genindeki polimorfizmlerin G-CSF ile sağlanan mobilizasyon yanıtı üzerine etkili olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. G-CSF-R genindeki polimorfizmleri minör alel homozigot ve heterozigot genotipte taşıyan bireylerin kök hücre toplama günlerinde elde edilen mm^3 'teki BK, total mononükleer hücre ve $CD34^+$ kök hücre/kg sayıları, polimorfizmleri majör alel homozigot genotipte taşıyan bireylerin aynı verileri ile karşılaştırılmıştır.

G-CSF-R polimorfizmlerini majör alel homozigot genotipte taşıyan birey verileriyle oluşturulmuş grafiklerde sağlıklı donörlerin G-CSF'e en yüksek düzeyde yanıt verdiği söylenebilir. BK sayılarının ilk toplama gününde $>30,000mm^3$ oldukları ve ikinci günde artış gösterip devam eden günlerde azalmaları literatür ile uyumludur (165-166). $CD34^+$ kök hücre/kg sayılarında ilk günde gözlenen "pik" neredeyse yeterli miktarda kök hücre elde edilebildiğini göstermektedir. Hastalara ait grafikler de donörler ile benzer kinetik özellik göstermektedir. Ancak toplamının başladığı günde hücre sayılarının donörlerden biraz daha düşük olması dikkat çekmektedir. Hastaların kemik iliğinde kanser nedeniyle oluşmuş patolojik "mikroçevre" ve verilen kemoterapi kürleri sonucu kemik iliğinin zarar görmüş olması bu düşüşte etkili olabilir. Donörlerin kemik iliğinin ise normal ve sağlıklı olması G-CSF aracılı mobilize olan hücrelerin fizyolojik olarak yüksek düzeyde yanıt vermesine bir açıklama getirebilir. Hastalar tanı gruplarına ayrıldıklarında (4. ve 5. güne kadar toplamaları devam eden birey sayıları azaldığından) grafikler ilk 3 güne bakılarak yorumlanırsa hastalıklar içerisinde kinetiklerin benzer olduğu görülmektedir. Bu durumda kanser çeşitlerinin mobilizasyona yanıtta çok etkili olmadığı düşünülebilir. Tüm bunların yanı sıra hastaların ve donörlerin periferik kök hücre transplantasyon programına alındığı günlerde G-CSF uygulaması öncesinde, toplam BK sayısının rutin olarak yapılmaması özellikle heterozigot polimorfik MM hastalarında gözlenen ani BK iniş ve çıkışlarının yorumunda bizler için güçlük yaratmıştır.

G-CSF-R genindeki polimorfizmlerden herhangi birini heterozigot genotipte taşıyan bireyler tanılarına göre gruplandırıldıklarında BK, total mononükleer veya CD34⁺ kök hücre/kg değişimlerinde benzer paterne sahipse bu genotipin veya minör alelin fonksiyonel bir farklılığa neden olabileceği söylenebilir. Bu düşünce ile hareket ederek G-CSF yanıtı ve polimorfizm bulguları ilişkilendirilmiştir. G-CSF-R genindeki polimorfizmlerden bazılarını heterozigot genotipte taşıyan 10 MM hastası vardır. Bu MM hastalarından biri hem rs3917991 hem de rs3918001 polimorfizmlerini heterozigot genotipte taşımaktadır. G-CSF-R genindeki g.6214055 G>A (rs3918018) SNP'ini G/A genotipte taşıdığı saptanan 3 MM hastasının biri hariç, SNP'i G/G genotipte taşıyan MM gruptan farklılık göstermemesi SNP'in mobilizasyonda belirgin bir etkisinin olmadığına işaret etmektedir. SNP g.6217121 G>C (rs3917991)'nin G/C genotipindeki 4 MM hastası biri dışında genel olarak G/G genotipteki MM grup dağılımı içerisindeydir. Ancak muhtemelen MM'daki kemik iliği infiltrasyon yoğunluğuna bağlı olarak heterozigot genotiptekilerin düşük mobilizasyon hızına sahip oldukları gözlenmektedir. İntrasitoplazmik gen bölgesindeki g.6219430 G>A (rs3918001) polimorfizmini G/A genotipte taşıyan 2 MM hastası birbirinden farklı paternler de yanıt vermektedir. Yalnızca iki heterozigot birey olduğu için yorum yapmak mümkün olmamakta, daha iyi değerlendirme için bu genotipteki birey sayısının artırılması gerekmektedir. SNP g.6219475 C>T (rs3918021) heterozigot genotipteki MM hastası C/C genotipteki MM hastalarına göre BK ve total mononükleer hücre sayılarında belirgin yanıt azlığı göstermektedir. G-CSF 'in direkt etkisinin miyeloid hücre proliferasyonu, olgunlaşması, özellikle nötrofil sayılarını ve fonksiyonlarını düzenlemek olduğu dikkate alınırsa monosit ve nötrofilleri içeren BK sayısının karşılaştırılan gruptan çok düşük olması reseptörün distal kısmındaki polimorfizmin etkisinden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

G-CSF-R genindeki g.6214055 G>A (rs3918018) SNP'i minör aleli homozigot A/A genotipte taşıyan sağlıklı donörün paterni, G/G genotipteki sağlıklı donörlerin gösterdiği paternin çok altındadır. Ayrıca grup kinetiğinden farklı olarak 1. günden 2. güne hücre değerleri neredeyse sabittir. Bulgularımızın yanısıra daha önce bildirilen

popölasyon çalışmalarının hiç birinde bu polimorfizme A/A genotipte rastlanmaması polimorfizmin G-CSF'e karşı yanıtta fonksiyonel bir etkisinin olabileceğini kuvvetle dőřündürmektedir.

Üç sağlıklı donörde heterozigot genotipte taşıdığı bulunan bir diğer SNP g.6217121 G>C (rs3917991)'tir ve her bireyde birbirinden farklı paterne neden olmaktadır. Heterojen yanıt özelliğinin, bu SNP'i heterozigot genotipte taşıyan donörlerde görölmesi dikkat çekmektedir.

İki NHL ve bir HL hastası g.6217128 G>C (rs 3917991) SNP'ini, bir NHL ve bir HL hastası da g.6219886 G>A (23) SNP'ini heterozigot genotipte taşımaktadır. Bunlara ait veriler kendi tanı gruplarının grafiklerinde dağılım sınırları içerisinde kaldığından, iki polimorfizmin de G-CSF yanıtı üzerine etkilerinin olmadığı söylenebilir. Paternin hasta grupları ile benzer özellik taşıması büyük ihtimalle NHL ve HL'larda kemik iliği tutulumunun gözlenmemesinden olabilir.

G-CSF yanıtlarının hastalar arasında bu kadar heterojen olması ve polimorfizm etkisinin ayırt edilebilmesinin zor olmasının nedeni bireyler arasında göz ardı edilemeyecek birçok farklı etken bulunmasıdır. G-CSF verilmesinden önce alınan kemotrapileri, bir önceki mobilizasyon ile yenisi arasında geçen zaman, hastalığın evresi ve her insanın biyolojisinin kendine özgü olması bu etkenlerin arasında sayılabilir(167).

Son olarak, polimorfik bölgelerdeki amino asit (aa) değişimlerinin etkilerine değinecek olursak; bilindiği gibi amino asitler non-polar ve nötral, polar ve nötral, asidik ve polar (negatif yüklüler), bazik ve polar (pozitif yüklüler) olmak üzere dört gruba ayrılırlar. Polarite kavramı aa'lerdeki atomların birbirleri arasındaki elektronegatiflik farkını yansıtır ve bu fark arttıkça aa'in polar özelliği artar. Ayrıca bir aa'in polar olması onun hidrofilik, non-polar olması ise hidrofobik özellik taşıdığını yansıtır. Aa'lerin karakteristik yapılarının bilhassa da polar ve non-polar özelliklerinin protein fonksiyonlarını etkilediği bilinmektedir. Polimorfizmlerin neden olduğu aa değişimleri de bu şekilde fonksiyonel etkilere neden olmaktadır(168-170). Yaptığımız çalışmada birinci kromozomdaki G-CSF-R geninde, *WSXWS* korunmuş motifindeki bilinmeyen amino asit (X) üzerine denk gelen g.6214055G>A

(rs3918018) SNP'i polar ve negatif yüklü aspartik asitin, polar ve nötral asparajine değişimine neden olmaktadır. Bu değişimle aa'in polaritesinin etkilenmemesi ile heterozigot genotipteki MM hastalarında fonksiyonel etki görülmemesi paralel olabilir. Ancak A/A genotipteki sağlıklı donörün G-CSF'e karşı düşük ve sabit yanıt veriyor olmasında polarite dışında amino asitin yük değişiminin negatiften, nötrale dönüşümünün etkili olduğu düşünülebilir. Layton'un (108) çalışmasında G-CSF ligandına bağlanmada CRH bölgesindeki amino asitlerin hidrofobik özelliklerinin ve yüklerinin kristalografik yapıda çok önemli olduğunu belirtmesi de bu düşüncüyü desteklemektedir.

G-CSF-R geninde, Fibronektin tip III bölgesinde yer alan 6217128 G>C (rs3917991) SNP'i polar ve negatif yüklü aspartik asitin, polar ve pozitif yüklü histidine değişimine neden olmaktadır. Aa değişimi sonucu hidrofilik özellikte farklılık gözlenmemesi SNP'in heterozigot genotipte bulunduğu bireylerde heterojen patern görülmesini ve belirgin bir fonksiyonel etki yaratmamasını açıklayabilir.

İki MM hastasında heterozigot genotipte bulunan, reseptörün intrasitoplazmik kısmındaki g.6219430 G>A (rs3918001) SNP'i nonpolar ve nötral özellikteki glisin amino asitinin, polar ve pozitif yüklü histidine dönüşümüne neden olur. Hidrofilik molekülün hidrofobik özelliğe dönüşmesi ve elektrostatik değişim oluşmasına rağmen bu polimorfizmin heterozigot genotipte G-CSF yanıtına belirgin bir etki yaratmadığı görülmüştür. Özellikle sinyal iletiminin yoğun aktivite gösterdiği bu bölgede kristalografik yapıda bu düzeyde bir değişimin etkisiz olması ilginçtir.

G-CSF-R'in intrasitoplazmik kısmındaki g.6219475 C>T (rs3918021) polimorfizmi polar ve pozitif yüklü arjininin, nonpolar ve nötral özellikteki sisteine dönüşümüne neden olur. Hidrofilik özelliği değişebilen polimorfizmin, sinyal iletiminde proliferasyon ve canlılık yanıtlarında rol alan bölgelerine yakın olması sinyal yolağında negatif bir etki yaratıyor olabilir. Bu nedenle polimorfizmi heterozigot genotipte taşıyan MM hastasında G-CSF'e yanıt azlığı dolayısıyla BK ve total mononükleer hücre sayılarında normalden daha düşük değerler gözleniyor olabilir.

Reseptörün distal ucundaki g.6219886 G>A SNP polar ve negatif yüklü glutamik asit, polar ve pozitif yüklü lizine dönüştürebilir. Polarite ve dolaylı olarak hidrofilik özellik farkı olmayan aa değişiminin NHL ve HL hastalarındaki G-CSF yanıtına etki etmemesi beklenebilir.

Son yıllarda miyeloproliferatif hastalıklarda özellikle “Polisitemi Vera”nın patojenezinde JAK2 mutasyonu büyük önem kazanmıştır. Polisitemi Vera tanısı alan hastaların %80’inden fazlasında JAK2V617F mutasyonu bulunmaktadır.(121,171-172) G-CSF-R genindeki polimorfizmlere ek olarak, çalışma grubumuzdaki bireylerde kontrolsüz proliferasyona neden olan JAK2V617F mutasyonu da analiz edilmiştir (24). Bunun amacı grubumuzdaki bireylerde, G-CSF-R’in esas sinyal yolağı olan JAK-STAT ‘ın intakt olup olmadığını ve grup içinde homojen bir parametre olduğunu göstermektir (14). Yalnızca bir MM hastasında tespit edilen bu mutasyonun G-CSF’e yanıtı etkilemediği görülmüştür. G-CSF’in mobilizasyondaki etkisinden bağımsız olarak yapılan bir diğer çalışmada 93 MM hastasında JAK2V617F mutasyonu taranmış ve bulunamamıştır. Araştırmacılar MM patojenezinde bu mutasyonun rol almadığını öne sürmüşlerdir(173). Çalıştığımız 81 MM hastamızdan yalnızca birinde bu mutasyonun bulunması da bu görüşü destekler niteliktedir.

Sonuç olarak, hematopoezin biyolojik düzenlenmesinde, kök hücrelerin *homing*, engraftman ve mobilizasyon kinetiklerinde G-CSF başta olmak üzere hematopoetik büyüme faktörleri ile bağlandıkları hücre yüzey reseptörlerinin moleküler yapıları giderek önem kazanmaktadır. Çalışmamız G-CSF ile CD34⁺ kök hücre mobilizasyonunda sağlıklı bireylerde ve hematolojik malignansilerde G-CSF reseptöründeki polimorfizmlerin varlığının önemine dikkat çeken ilk çalışmalardan biri olma niteliğindedir.

Önümüzdeki yıllarda hematopoezin moleküler biyolojisinin daha iyi anlaşılması için büyüme faktörlerinin, reseptörlerinin, sinyal sistemlerinin ve transkripsiyon faktörlerinin, genomik ve proteomik alanlarda araştırılmasının gerekliliğine inanıyoruz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- 1- G-CSF-R genindeki g.6210695 C>T (rs34362628), g.6213664 T>C (rs3917993), g.6213811 C>T (rs34845290), g.6216525 G>A (rs3918020), g.62182128 T>C (rs3917996), g.6219871 C>T (rs35622214) SNP'lerinin çalışma grubumuzdaki bireylerde %100 majör alel homozigot genotipte olduğu belirlendi.
- 2- G-CSF-R genindeki g.6214055 G>A (rs3918018) SNP'i %97,3 G/G, %1,36 G/A, %0,34 A/A genotiplerinde dağılım gösterdiği tespit edildi.
- 3- G-CSF-R genindeki g.6217128 G>C (rs3917991) SNP'i %96,7 G/G, %3,3 G/C genotip dağılımı ile çalışma grubumuzda taranan SNP'ler arasından en yüksek oranda heterozigot genotipte taşınan olarak belirlendi.
- 4- SNP g.6219430 G>A (rs3918001)'nin çalışma grubumuzun %99,67'sinde homozigot G/G, %0,66'sında heterozigot G/A genotipte olduğu belirlendi.
- 5- G-CSF-R genindeki g.6219475 C>T (rs3918021) SNP'in genotip dağılımı %99,67 C/C, %0,33 C/T olarak tespit edildi.
- 6- Wölfler ve ark.'larının (23) çalışmasından yararlanılarak G-CSF-R geninde varlığı belirlenen g.6219886 G>A SNP'in %99,3 G/G, %0,69 G/A genotipte dağıldığı belirlendi.
- 7- Çalışma grubumuzda taranan G-CSF-R geni *missense* SNP'lerinin genotip dağılımları, önceden yapılmış popülasyon çalışmalarındaki ile uyumludur.
- 8- G-CSF-R genindeki g.6214055 G>A (rs3918018) SNP'ini A/A genotipte taşıyan sağlıklı donör ve g.6219475 C>T (rs3918021)'i heterozigot C/T genotipte taşıyan MM hastasında G-CSF'e karşı belirgin yanıt azlığı gözlemlendi. Bu örnekler dışında diğer SNP'lerin hücre düzeyinde G-CSF yanıtına etkili olmadığı bulundu.
- 9- Çalışma grubumuzdaki 303 bireyden yalnızca bir MM hastasının JAK2V617F mutasyonu taşıdığı ve bu mutasyonunda periferik kök hücre transplantasyonunda G-CSF yanıtına etki etmediği saptandı.

- 10- Türk popülasyonunu yansıtan çalışma grubumuzdaki birey sayısı arttırılırsa polimorfik minör alele rastlanabilir. Bu da köken ve ırksal benzerliği daha da iyi yansıtan bir grup oluşturup verilerimizin kuvvetlenmesini sağlayacaktır.
- 11- G-CSF-R geninde yer alan taramasını yapmadığımız geri kalan beş SNP'in de çalışma grubunda taranması çalışmanın bütünlüğünü sağlayacaktır. Devamında polimorfizmlerin genotip dağılımlarına göre, G-CSF ile mobilizasyona uğramış kök hücrelerin toplamaları yapılırken elde edilen lökosit, mononükleer hücre ve CD34⁺ kök hücre/kg sayıları ile ilişkilendirilebilir.
- 12- G-CSF-R genindeki polimorfik bölgelerde RFLP yöntemi ile minör alel taşıdığı tespit edilen örneklerin DNA dizi analizi ile doğrulanması planlanmıştır.
- 13- G-CSF-R genindeki polimorfik bölgelerin, farklı G-CSF-R izoformlarının transkripsiyonuna ve hücre yüzey ekspresyonlarına etki edip etmediği araştırılabilir.
- 14- G-CSF-R genindeki polimorfik bölgelerde minör alel taşıyan örneklerin G-CSF sinyaline hücresel düzeyde farklı yanıt verip vermedikleri araştırılabilir.
- 15- Bireylerin G-CSF yanıtlarında gözlenen yüksek heterojeniteye neden olan etkenlerin elimine edilmesi amacıyla hücresel düzeydeki deneyler önemli olabilir.

KAYNAKLAR

- 1.Huang, X., Cho, S.,Spangrude, G.J. (2007) Hematopoietic stem cells: generation and self-renewal. *Cell Death Differ*, 14 (11), 1851-1859.
- 2.Wilson, A., Laurenti, E.,Trumpp, A. (2009) Balancing dormant and self-renewing hematopoietic stem cells. *Curr Opin Genet Dev*, 19 (5), 461-468.
- 3.Sigvardsson, M. (2009) New light on the biology and developmental potential of haematopoietic stem cells and progenitor cells. *J Intern Med*, 266 (4), 311-324.
- 4.Martinez-Agosto, J.A., Mikkola, H.K., Hartenstein, V.,Banerjee, U. (2007) The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view. *Genes Dev*, 21 (23), 3044-3060.
- 5.Wilson, A., Oser, G.M., Jaworski, M., Blanco-Bose, W.E., Laurenti, E., Adolphe, C. ve diğeri. (2007) Dormant and self-renewing hematopoietic stem cells and their niches. *Ann N Y Acad Sci*, 1106, 64-75.
- 6.Li, Z.,Li, L. (2006) Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. *Trends Biochem Sci*, 31 (10), 589-595.
- 7.Metcalf, D. (2008) Hematopoietic cytokines. *Blood*, 111 (2), 485-491.
- 8.Barreda, D.R., Hanington, P.C.,Belosevic, M. (2004) Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev Comp Immunol*, 28 (5), 509-554.
- 9.Eyles, J.L., Roberts, A.W., Metcalf, D.,Wicks, I.P. (2006) Granulocyte colony-stimulating factor and neutrophils--forgotten mediators of inflammatory disease. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2 (9), 500-510.
- 10.Yin, T.,Li, L. (2006) The stem cell niches in bone. *J Clin Invest*, 116 (5), 1195-1201.
- 11.Kaplan, R.N., Psaila, B.,Lyden, D. (2007) Niche-to-niche migration of bone-marrow-derived cells. *Trends Mol Med*, 13 (2), 72-81.
- 12.Cashen, A.F., Lazarus, H.M.,Devine, S.M. (2007) Mobilizing stem cells from normal donors: is it possible to improve upon G-CSF? *Bone Marrow Transplant*, 39 (10), 577-588.
- 13.Jansen, J., Thompson, J.M., Dugan, M.J., Nolan, P., Wiemann, M.C., Birhiray, R. ve diğeri. (2002) Peripheral blood progenitor cell transplantation. *Ther Apher*, 6 (1), 5-14.
- 14.Touw, I.P.,van de Geijn, G.J. (2007) Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in normal myeloid cell development, leukemia and related blood cell disorders. *Front Biosci*, 12, 800-815.
- 15.Anderlini, P.,Champlin, R.E. (2008) Biologic and molecular effects of granulocyte colony-stimulating factor in healthy individuals: recent findings and current challenges. *Blood*, 111 (4), 1767-1772.
- 16.Demetri, G.D.,Griffin, J.D. (1991) Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. *Blood*, 78 (11), 2791-2808.
- 17.Avalos, B.R. (1996) Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Blood*, 88 (3), 761-777.
- 18.Layton, J.E., Iaria, J., Smith, D.K.,Treutlein, H.R. (1997) Identification of a ligand-binding site on the granulocyte colony-stimulating factor receptor by molecular modeling and mutagenesis. *J Biol Chem*, 272 (47), 29735-29741.
- 19.Panopoulos, A.D.,Watowich, S.S. (2008) Granulocyte colony-stimulating factor: molecular mechanisms of action during steady state and 'emergency' hematopoiesis. *Cytokine*, 42 (3), 277-288.
- 20.Avalos, B.R. (1998) The granulocyte colony-stimulating factor receptor and its role in disorders of granulopoiesis. *Leuk Lymphoma*, 28 (3-4), 265-273.

- 21.van de Geijn, G.J., Aarts, L.H., Erkeland, S.J., Prasher, J.M.,Touw, I.P. (2003) Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor in normal hematopoietic cell development and myeloid disease. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 149, 53-71.
- 22.NCBI Single Nucleotide Polymorphisms. 9.06.2010, Ağ Sitesi: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?geneId=1441&ctg=NT_032977.9&mrna=NM_156039.2&prot=NP_724781.1&orien=forward
- 23.Wolfler, A., Erkeland, S.J., Bodner, C., Valkhof, M., Renner, W., Leitner, C. ve diğerleri. (2005) A functional single-nucleotide polymorphism of the G-CSF receptor gene predisposes individuals to high-risk myelodysplastic syndrome. *Blood*, 105 (9), 3731-3736.
- 24.McLornan, D., Percy, M.,McMullin, M.F. (2006) JAK2 V617F: a single mutation in the myeloproliferative group of disorders. *Ulster Med J*, 75 (2), 112-119.
- 25.Kaushansky, K. (2006) Lineage-specific hematopoietic growth factors. *N Engl J Med*, 354 (19), 2034-2045.
- 26.Bryder, D., Rossi, D.J.,Weissman, I.L. (2006) Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol*, 169 (2), 338-346.
- 27.Orkin, S.H.,Zon, L.I. (2008) Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, 132 (4), 631-644.
- 28.Durand, C.,Dzierzak, E. (2005) Embryonic beginnings of adult hematopoietic stem cells. *Haematologica*, 90 (1), 100-108.
- 29.Shiozawa, Y., Havens, A.M., Pienta, K.J.,Taichman, R.S. (2008) The bone marrow niche: habitat to hematopoietic and mesenchymal stem cells, and unwitting host to molecular parasites. *Leukemia*, 22 (5), 941-950.
- 30.Mikkola, H.K.,Orkin, S.H. (2006) The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development*, 133 (19), 3733-3744.
- 31.Akashi, K., Kondo, M., Cheshier, S., Shizuru, J., Gandy, K., Domen, J. ve diğerleri. (1999) Lymphoid development from stem cells and the common lymphocyte progenitors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 64, 1-12.
- 32.Weissman, I.L. (2000) Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*, 100 (1), 157-168.
- 33.Iwasaki, H.,Akashi, K. (2007) Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell. *Immunity*, 26 (6), 726-740.
- 34.Smithgall, T.E. (1998) Signal transduction pathways regulating hematopoietic differentiation. *Pharmacol Rev*, 50 (1), 1-19.
- 35.Till, J.E.,Mc, C.E. (1961) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*, 14, 213-222.
- 36.Watt, F.M.,Hogan, B.L. (2000) Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*, 287 (5457), 1427-1430.
- 37.Wilson, A.,Trumpp, A. (2006) Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*, 6 (2), 93-106.
- 38.Cumano, A.,Godin, I. (2007) Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu Rev Immunol*, 25, 745-785.
- 39.Ratajczak, M.Z. (2008) Phenotypic and functional characterization of hematopoietic stem cells. *Curr Opin Hematol*, 15 (4), 293-300.
- 40.Lai, A.Y.,Kondo, M. (2008) T and B lymphocyte differentiation from hematopoietic stem cell. *Semin Immunol*, 20 (4), 207-212.
- 41.Smith, L.G., Weissman, I.L.,Heimfeld, S. (1991) Clonal analysis of hematopoietic stem-cell differentiation in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 (7), 2788-2792.

- 42.Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H.,Nakauchi, H. (1996) Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*, 273 (5272), 242-245.
- 43.Morrison, S.J.,Weissman, I.L. (1994) The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*, 1 (8), 661-673.
- 44.Eliasson, P.,Jonsson, J.I. (2010) The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. *J Cell Physiol*, 222 (1), 17-22.
- 45.Moore, K.A.,Lemischka, I.R. (2006) Stem cells and their niches. *Science*, 311 (5769), 1880-1885.
- 46.Scadden, D.T. (2006) The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*, 441 (7097), 1075-1079.
- 47.Suda, T., Arai, F.,Hirao, A. (2005) Hematopoietic stem cells and their niche. *Trends Immunol*, 26 (8), 426-433.
- 48.Kopp, H.G., Avecilla, S.T., Hooper, A.T.,Rafii, S. (2005) The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology (Bethesda)*, 20, 349-356.
- 49.Zhang, J.,Li, L. (2008) Stem cell niche: microenvironment and beyond. *J Biol Chem*, 283 (15), 9499-9503.
- 50.Kiel, M.J.,Morrison, S.J. (2008) Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol*, 8 (4), 290-301.
- 51.Nagasawa, T. (2006) Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol*, 6 (2), 107-116.
- 52.Gong, J.K. (1978) Endosteal marrow: a rich source of hematopoietic stem cells. *Science*, 199 (4336), 1443-1445.
- 53.Kubota, Y., Takubo, K.,Suda, T. (2008) Bone marrow long label-retaining cells reside in the sinusoidal hypoxic niche. *Biochem Biophys Res Commun*, 366 (2), 335-339.
- 54.Taichman, R.S. (2005) Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood*, 105 (7), 2631-2639.
- 55.Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W.G. ve diğerleri. (2003) Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 425 (6960), 836-841.
- 56.Kollet, O., Dar, A., Shvitiel, S., Kalinkovich, A., Lapid, K., Sztainberg, Y. ve diğerleri. (2006) Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nat Med*, 12 (6), 657-664.
- 57.Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M.,Nagasawa, T. (2006) Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*, 25 (6), 977-988.
- 58.Wilson, A., Murphy, M.J., Oskarsson, T., Kaloulis, K., Bettess, M.D., Oser, G.M. ve diğerleri. (2004) c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev*, 18 (22), 2747-2763.
- 59.Nilsson, S.K., Johnston, H.M., Whitty, G.A., Williams, B., Webb, R.J., Denhardt, D.T. ve diğerleri. (2005) Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 106 (4), 1232-1239.
- 60.Stier, S., Ko, Y., Forkert, R., Lutz, C., Neuhaus, T., Grunewald, E. ve diğerleri. (2005) Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J Exp Med*, 201 (11), 1781-1791.
- 61.Lapidot, T., Dar, A.,Kollet, O. (2005) How do stem cells find their way home? *Blood*, 106 (6), 1901-1910.

- 62.Avecilla, S.T., Hattori, K., Heissig, B., Tejada, R., Liao, F., Shido, K. ve diğerleri. (2004) Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat Med*, 10 (1), 64-71.
- 63.Winkler, I.G.,Levesque, J.P. (2006) Mechanisms of hematopoietic stem cell mobilization: when innate immunity assails the cells that make blood and bone. *Exp Hematol*, 34 (8), 996-1009.
- 64.Kfir Lapid, Y.V., Orit Kollet and Tsvee Lapidot,. (2009). Egress and mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells. Erişim:12.03.10,
- 65.Papayannopoulou, T. (2004) Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Blood*, 103 (5), 1580-1585.
- 66.Roberts, A.W. (2005) G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all! *Growth Factors*, 23 (1), 33-41.
- 67.Borneo, J., Munugalavadla, V., Sims, E.C., Vemula, S., Orschell, C.M., Yoder, M. ve diğerleri. (2007) Src family kinase-mediated negative regulation of hematopoietic stem cell mobilization involves both intrinsic and microenvironmental factors. *Exp Hematol*, 35 (7), 1026-1037.
- 68.Thomas, J., Liu, F.,Link, D.C. (2002) Mechanisms of mobilization of hematopoietic progenitors with granulocyte colony-stimulating factor. *Curr Opin Hematol*, 9 (3), 183-189.
- 69.Claire Magnon, P.S.F. (2008). Hematopoietic stem cell trafficking. Erişim:14.03.10,
- 70.Nervi, B., Link, D.C.,DiPersio, J.F. (2006) Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. *J Cell Biochem*, 99 (3), 690-705.
- 71.Levesque, J.P., Liu, F., Simmons, P.J., Betsuyaku, T., Senior, R.M., Pham, C. ve diğerleri. (2004) Characterization of hematopoietic progenitor mobilization in protease-deficient mice. *Blood*, 104 (1), 65-72.
- 72.Papayannopoulou, T. (1999) Hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. A continuing quest for etiologic mechanisms. *Ann N Y Acad Sci*, 872, 187-197; discussion 197-189.
- 73.Nicola, N.A., Metcalf, D., Matsumoto, M.,Johnson, G.R. (1983) Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as granulocyte colony-stimulating factor. *J Biol Chem*, 258 (14), 9017-9023.
- 74.Hubel, K.,Engert, A. (2003) Clinical applications of granulocyte colony-stimulating factor: an update and summary. *Ann Hematol*, 82 (4), 207-213.
- 75.Cebon, J., Layton, J.E., Maher, D.,Morstyn, G. (1994) Endogenous haemopoietic growth factors in neutropenia and infection. *Br J Haematol*, 86 (2), 265-274.
- 76.Watari, K., Asano, S., Shirafuji, N., Kodo, H., Ozawa, K., Takaku, F. ve diğerleri. (1989) Serum granulocyte colony-stimulating factor levels in healthy volunteers and patients with various disorders as estimated by enzyme immunoassay. *Blood*, 73 (1), 117-122.
- 77.Kawakami, M., Tsutsumi, H., Kumakawa, T., Abe, H., Hirai, M., Kurosawa, S. ve diğerleri. (1990) Levels of serum granulocyte colony-stimulating factor in patients with infections. *Blood*, 76 (10), 1962-1964.
- 78.Fossiez, F., Djossou, O., Chomarat, P., Flores-Romo, L., Ait-Yahia, S., Maat, C. ve diğerleri. (1996) T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med*, 183 (6), 2593-2603.
- 79.Nagata, S., Tsuchiya, M., Asano, S., Kaziro, Y., Yamazaki, T., Yamamoto, O. ve diğerleri. (1986) Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor. *Nature*, 319 (6052), 415-418.
- 80.Anderlini, P. (2009) Effects and safety of granulocyte colony-stimulating factor in healthy volunteers. *Curr Opin Hematol*, 16 (1), 35-40.

- 81.Lieschke, G.J., Grail, D., Hodgson, G., Metcalf, D., Stanley, E., Cheers, C. ve diğerleri. (1994) Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood*, 84 (6), 1737-1746.
- 82.Liu, F., Wu, H.Y., Wesselschmidt, R., Kornaga, T., Link, D.C. (1996) Impaired production and increased apoptosis of neutrophils in granulocyte colony-stimulating factor receptor-deficient mice. *Immunity*, 5 (5), 491-501.
- 83.Rutella, S., Zavala, F., Danese, S., Kared, H., Leone, G. (2005) Granulocyte colony-stimulating factor: a novel mediator of T cell tolerance. *J Immunol*, 175 (11), 7085-7091.
- 84.Battiwalla, M., McCarthy, P.L. (2009) Filgrastim support in allogeneic HSCT for myeloid malignancies: a review of the role of G-CSF and the implications for current practice. *Bone Marrow Transplant*, 43 (5), 351-356.
- 85.Gyger, M., Stuart, R.K., Perreault, C. (2000) Immunobiology of allogeneic peripheral blood mononuclear cells mobilized with granulocyte-colony stimulating factor. *Bone Marrow Transplant*, 26 (1), 1-16.
- 86.Arpinati, M., Green, C.L., Heimfeld, S., Heuser, J.E., Anasetti, C. (2000) Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. *Blood*, 95 (8), 2484-2490.
- 87.Pulendran, B., Banchereau, J., Burkeholder, S., Kraus, E., Guinet, E., Chalouni, C. ve diğerleri. (2000) Flt3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J Immunol*, 165 (1), 566-572.
- 88.Boneberg, E.M., Hareng, L., Gantner, F., Wendel, A., Hartung, T. (2000) Human monocytes express functional receptors for granulocyte colony-stimulating factor that mediate suppression of monokines and interferon-gamma. *Blood*, 95 (1), 270-276.
- 89.Bhana, N. (2007) Granulocyte colony-stimulating factors in the management of chemotherapy-induced neutropenia: evidence based review. *Curr Opin Oncol*, 19 (4), 328-335.
- 90.Sung, L., Dror, Y. (2007) Clinical applications of granulocyte-colony stimulating factor. *Front Biosci*, 12, 1988-2002.
- 91.Imamura, R., Miyamoto, T., Yoshimoto, G., Kamezaki, K., Ishikawa, F., Henzan, H. ve diğerleri. (2005) Mobilization of human lymphoid progenitors after treatment with granulocyte colony-stimulating factor. *J Immunol*, 175 (4), 2647-2654.
- 92.Arslan, O., Moog, R. (2007) Mobilization of peripheral blood stem cells. *Transfus Apher Sci*, 37 (2), 179-185.
- 93.Sheet, N.C.İ.F. (2008). Bone Marrow Transplantation and Peripheral Blood Stem Cell Transplantation 8.01.2010, Ağ Sitesi: <http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/Therapy/bone-marrow-transplant>
- 94.Lemoli, R.M., D'Addio, A. (2008) Hematopoietic stem cell mobilization. *Haematologica*, 93 (3), 321-324.
- 95.Devetten, M., Armitage, J.O. (2007) Hematopoietic cell transplantation: progress and obstacles. *Ann Oncol*, 18 (9), 1450-1456.
- 96.Kessinger, A., Sharp, J.G. (2003) The whys and hows of hematopoietic progenitor and stem cell mobilization. *Bone Marrow Transplant*, 31 (5), 319-329.
- 97.Pelus, L.M. (2008) Peripheral blood stem cell mobilization: new regimens, new cells, where do we stand. *Curr Opin Hematol*, 15 (4), 285-292.
- 98.Thomas, E.D. (1995) Hematopoietic stem cell transplantation. *Science & Medicine*.
- 99.Levesque, J.P., Winkler, I.G. (2008) Mobilization of hematopoietic stem cells: state of the art. *Curr Opin Organ Transplant*, 13 (1), 53-58.

100. Kimura, A., Sultana, T.A. (2004) Granulocyte colony-stimulating factor receptors on CD34++ cells in patients with myelodysplastic syndrome (MDS) and MDS-acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*, 45 (10), 1995-2000.
101. Tsuji, K., Ebihara, Y. (2001) Expression of G-CSF receptor on myeloid progenitors. *Leuk Lymphoma*, 42 (6), 1351-1357.
102. Shinjo, K., Takeshita, A., Ohnishi, K., Ohno, R. (1997) Granulocyte colony-stimulating factor receptor at various differentiation stages of normal and leukemic hematopoietic cells. *Leuk Lymphoma*, 25 (1-2), 37-46.
103. Fukunaga, R., Seto, Y., Mizushima, S., Nagata, S. (1990) Three different mRNAs encoding human granulocyte colony-stimulating factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87 (22), 8702-8706.
104. Fukunaga, R., Ishizaka-Ikeda, E., Pan, C.X., Seto, Y., Nagata, S. (1991) Functional domains of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *EMBO J*, 10 (10), 2855-2865.
105. NCBI Entrez Gene. (2010). 16.06.2010, Ağ Sitesi: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1441#geneReference> sequences
106. Sloand, E.M., Yong, A.S., Ramkissoon, S., Solomou, E., Bruno, T.C., Kim, S. ve diğerleri. (2006) Granulocyte colony-stimulating factor preferentially stimulates proliferation of monosomy 7 cells bearing the isoform IV receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (39), 14483-14488.
107. Ehlers, S., Herbst, C., Zimmermann, M., Scharn, N., Germeshausen, M., von Neuhoff, N. ve diğerleri. (2010) Granulocyte Colony-Stimulating Factor (G-CSF) Treatment of Childhood Acute Myeloid Leukemias That Overexpress the Differentiation-Defective G-CSF Receptor Isoform IV Is Associated With a Higher Incidence of Relapse. *J Clin Oncol*.
108. Layton, J.E., Hall, N.E. (2006) The interaction of G-CSF with its receptor. *Front Biosci*, 11, 3181-3189.
109. Tamada, T., Honjo, E., Maeda, Y., Okamoto, T., Ishibashi, M., Tokunaga, M. ve diğerleri. (2006) Homodimeric cross-over structure of the human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor signaling complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 (9), 3135-3140.
110. Ward, A.C., Smith, L., de Koning, J.P., van Aesch, Y., Touw, I.P. (1999) Multiple signals mediate proliferation, differentiation, and survival from the granulocyte colony-stimulating factor receptor in myeloid 32D cells. *J Biol Chem*, 274 (21), 14956-14962.
111. Santini, V., Scappini, B., Indik, Z.K., Gozzini, A., Ferrini, P.R., Schreiber, A.D. (2003) The carboxy-terminal region of the granulocyte colony-stimulating factor receptor transduces a phagocytic signal. *Blood*, 101 (11), 4615-4622.
112. Ward, A.C. (2007) The role of the granulocyte colony-stimulating factor receptor (G-CSF-R) in disease. *Front Biosci*, 12, 608-618.
113. Hermans, M.H., van de Geijn, G.J., Antonissen, C., Gits, J., van Leeuwen, D., Ward, A.C. ve diğerleri. (2003) Signaling mechanisms coupled to tyrosines in the granulocyte colony-stimulating factor receptor orchestrate G-CSF-induced expansion of myeloid progenitor cells. *Blood*, 101 (7), 2584-2590.
114. Touw, I.P., Bontenbal, M. (2007) Granulocyte colony-stimulating factor: key (f)actor or innocent bystander in the development of secondary myeloid malignancy? *J Natl Cancer Inst*, 99 (3), 183-186.
115. Ward, A.C., van Aesch, Y.M., Gits, J., Schelen, A.M., de Koning, J.P., van Leeuwen, D. ve diğerleri. (1999) Novel point mutation in the extracellular domain of the granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor in a case of severe

- congenital neutropenia hyporesponsive to G-CSF treatment. *J Exp Med*, 190 (4), 497-507.
- 116.Hunter, M.G.,Avalos, B.R. (2000) Granulocyte colony-stimulating factor receptor mutations in severe congenital neutropenia transforming to acute myelogenous leukemia confer resistance to apoptosis and enhance cell survival. *Blood*, 95 (6), 2132-2137.
 - 117.Dong, F., van Paassen, M., van Buitenen, C., Hoefsloot, L.H., Lowenberg, B.,Touw, I.P. (1995) A point mutation in the granulocyte colony-stimulating factor receptor (G-CSF-R) gene in a case of acute myeloid leukemia results in the overexpression of a novel G-CSF-R isoform. *Blood*, 85 (4), 902-911.
 - 118.Platzbecker, U., Germing, U., Schakel, U., Illmer, T., Soucek, S., Schaich, M. ve diğeri. (2006) Association with the single-nucleotide polymorphism (Glu785Lys) of the granulocyte colony-stimulating factor receptor with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with multilineage dysplasia. *Leukemia*, 20 (12), 2188-2189.
 - 119.Plo, I., Zhang, Y., Le Couedic, J.P., Nakatake, M., Boulet, J.M., Itaya, M. ve diğeri. (2009) An activating mutation in the CSF3R gene induces a hereditary chronic neutrophilia. *J Exp Med*, 206 (8), 1701-1707.
 - 120.Tefferi, A. (2006) Classification, diagnosis and management of myeloproliferative disorders in the JAK2V617F era. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 240-245.
 - 121.Lippert, E., Boissinot, M., Kralovics, R., Girodon, F., Dobo, I., Praloran, V. ve diğeri. (2006) The JAK2-V617F mutation is frequently present at diagnosis in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood*, 108 (6), 1865-1867.
 - 122.Tefferi, A.,Gilliland, D.G. (2005) The JAK2V617F tyrosine kinase mutation in myeloproliferative disorders: status report and immediate implications for disease classification and diagnosis. *Mayo Clin Proc*, 80 (7), 947-958.
 123. (2009). 1.04.2010, Ağ Sitesi: <http://www.bioinformatics.fr/biology.php?subsection=SNPs>
 - 124.Conn, H.J., Wolfe, G.E.,Ford, M. (1940) Taxonomic Relationships of Alcaligenes spp. to Certain Soil Saprophytes and Plant Parasites. *J Bacteriol*, 39 (2), 207-226.
 - 125.Mutation or polymorphism? 16.06.2010, Ağ Sitesi: http://genome.wellcome.ac.uk/doc_wtd020780.html
 - 126.Smith, K. (2002). Genotyping, Haplotype Assembly Problem, Haplotype Map, Functional Genomics and Proteomics. Erişim:01.05.2010,
 - 127.Öner, C., ed. *Genetik Kavramlar*. 6 ed., ed. W. S. Klug & M. R. Cummings. 2002, Prentice Hall.
 - 128.Schork, N.J., Fallin, D.,Lanchbury, J.S. (2000) Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. *Clin Genet*, 58 (4), 250-264.
 - 129.Karchin, R., Kelly, L.,Sali, A. (2005) Improving functional annotation of non-synonymous SNPs with information theory. *Pac Symp Biocomput*, 397-408.
 - 130.Cargill, M., Altshuler, D., Ireland, J., Sklar, P., Ardlie, K., Patil, N. ve diğeri. (1999) Characterization of single-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet*, 22 (3), 231-238.
 - 131.den Dunnen, J.T.,Antonarakis, S.E. (2001) Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet*, 109 (1), 121-124.
 - 132.Single Nucleotide Polymorphisms. (2003). 16.01.2010, Ağ Sitesi: <http://cmbi.bjmu.edu.cn/cmbidata/snp/index.htm>
 - 133.Phillips, T. (Restriction Enzymes Explained). 09.06.2010, Ağ Sitesi: <http://biotech.about.com/od/proteinengineering/a/restrictenz.htm>

134. Biology and Activity of Restriction Endonucleases. (1999).
135. Restriction Enzymes Background Paper. 09.06.2010, Ağ Sitesi:
<http://www.accessexcellence.org/AE/AEC/CC/restriction.php>
136. Restriction Enzymes. (2009). 09.06.2010, Ağ Sitesi:
<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/R/RestrictionEnzymes.html>
137. Fermentas Products. 09.06.2010, Ağ Sitesi:
<http://www.fermentas.com/en/products/all/dna-electrophoresis>
138. Leonid Kruglyak, D.A.N. (2001) Variation is the spice of life. *Nature Genetics*, 27.
139. Collins, F.S., Brooks, L.D., Chakravarti, A. (1998) A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res*, 8 (12), 1229-1231.
140. Dhiman, N., Ovsyannikova, I.G., Vierkant, R.A., Pankratz, V.S., Jacobson, R.M., Poland, G.A. (2008) Associations between cytokine/cytokine receptor single nucleotide polymorphisms and humoral immunity to measles, mumps and rubella in a Somali population. *Tissue Antigens*, 72 (3), 211-220.
141. Gray, I.C., Campbell, D.A., Spurr, N.K. (2000) Single nucleotide polymorphisms as tools in human genetics. *Hum Mol Genet*, 9 (16), 2403-2408.
142. Keen, L.J. (2002) The extent and analysis of cytokine and cytokine receptor gene polymorphism. *Transpl Immunol*, 10 (2-3), 143-146.
143. Grimaldi, L.M., Casadei, V.M., Ferri, C., Veglia, F., Licastro, F., Annoni, G. ve diğerleri. (2000) Association of early-onset Alzheimer's disease with an interleukin-1alpha gene polymorphism. *Ann Neurol*, 47 (3), 361-365.
144. Akahoshi, M., Nakashima, H., Miyake, K., Inoue, Y., Shimizu, S., Tanaka, Y. ve diğerleri. (2003) Influence of interleukin-12 receptor beta1 polymorphisms on tuberculosis. *Hum Genet*, 112 (3), 237-243.
145. He, J.Q., Ruan, J., Chan-Yeung, M., Becker, A.B., Dimich-Ward, H., Pare, P.D. ve diğerleri. (2003) Polymorphisms of the GM-CSF genes and the development of atopic diseases in at-risk children. *Chest*, 123 (3 Suppl), 438S.
146. Lin, C.C., Wu, H.C., Tsai, F.J., Chen, H.Y., Chen, W.C. (2003) Vascular endothelial growth factor gene-460 C/T polymorphism is a biomarker for prostate cancer. *Urology*, 62 (2), 374-377.
147. Cozen, W., Gill, P.S., Ingles, S.A., Masood, R., Martinez-Maza, O., Cockburn, M.G. ve diğerleri. (2004) IL-6 levels and genotype are associated with risk of young adult Hodgkin lymphoma. *Blood*, 103 (8), 3216-3221.
148. Ishikawa, Y., Kashiwase, K., Akaza, T., Morishima, Y., Inoko, H., Sasazuki, T. ve diğerleri. (2002) Polymorphisms in TNFA and TNFR2 affect outcome of unrelated bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 29 (7), 569-575.
149. Hattori, H., Matsuzaki, A., Suminoe, A., Ihara, K., Nagatoshi, Y., Sakata, N. ve diğerleri. (2002) Polymorphisms of transforming growth factor-beta1 and transforming growth factor-beta1 type II receptor genes are associated with acute graft-versus-host disease in children with HLA-matched sibling bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 30 (10), 665-671.
150. Shamim, Z., Ryder, L.P., Heilmann, C., Madsen, H., Lauersen, H., Andersen, P.K. ve diğerleri. (2006) Genetic polymorphisms in the genes encoding human interleukin-7 receptor-alpha: prognostic significance in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 37 (5), 485-491.
151. 09.06.2010, Ağ Sitesi:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=34362628
152. The International HapMap Project. (2003) *Nature*, 426 (6968), 789-796.

- 153.,, 09.06.2010, Ağ Sitesi:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=3917973
- 154., 09.06.2010, Ağ Sitesi:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=34845290
155. (.), 09.06.2010, Ağ Sitesi:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=3918018
- 156., 09.06.2010, Ağ Sitesi:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=3918020
157. Factors Influencing Allele Frequency or Deviations From Hardy Weinberg Equilibrium. 09.06.2010, Ağ Sitesi:
<http://www.microbiologyprocedure.com/genetics/population-genetics/factors-influencing-allele-frequency-or-deviations-from-hardy-weinberg-equilibrium.htm>
158. (.), 09.06.2010, Ağ Sitesi:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=3917991
159. (.), 09.06.2010, Ağ Sitesi:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=3917996
160. (,), 09.06.2010, Ağ Sitesi:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=3918021
161. 09.06.2010, Ağ Sitesi:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=35622214
162. Boulay, J.L., O'Shea, J.J., Paul, W.E. (2003) Molecular phylogeny within type I cytokines and their cognate receptors. *Immunity*, 19 (2), 159-163.
163. Klein, J., Nikolaidis, N. (2005) The descent of the antibody-based immune system by gradual evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (1), 169-174.
164. Liongue, C., Ward, A.C. (2007) Evolution of Class I cytokine receptors. *BMC Evol Biol*, 7, 120.
165. Arpacı, F., Komurcu, S., Ozturk, B., Ozet, A., Kinalp, C., Sengul, A. ve diğerleri. (2000) A successful and simplified filgrastim primed single apheresis method without large volume apheresis for peripheral blood stem cell collection. *Jpn J Clin Oncol*, 30 (3), 153-158.
166. Atkinson, K. (2004). Clinical bone marrow and blood stem cell transplantation [Elektronik Sürüm]. Cambridge University Press.
167. Siemionow, M.Z. (2006). Tissue Surgery [Elektronik Sürüm]. Springer.
168. Ng, P.C., Henikoff, S. (2006) Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 7, 61-80.
169. Characteristics and Properties of Amino Acids. 12.06.2010
Ağ Sitesi: <http://www.elmhurst.edu/~chm/vchembook/561aminostructure.html>
170. AMINO ACIDS AND PRIMARY STRUCTURE. 12.06.2010, Ağ Sitesi:
<http://class.fst.ohio-state.edu/FST822/lecturesab/AAcids.htm>
171. Vainchenker, W., Constantinescu, S.N. (2005) A unique activating mutation in JAK2 (V617F) is at the origin of polycythemia vera and allows a new classification of myeloproliferative diseases. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 195-200.
172. Jones, A.V., Kreil, S., Zoi, K., Waghorn, K., Curtis, C., Zhang, L. ve diğerleri. (2005) Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood*, 106 (6), 2162-2168.
173. Fiorini, A., Farina, G., Reddiconto, G., Palladino, M., Rossi, E., Za, T. ve diğerleri. (2006) Screening of JAK2 V617F mutation in multiple myeloma. *Leukemia*, 20 (10), 1912-1913.

EKLER

EK 1. Hacettepe Üniversitesi Yerel Etik Kurulu FON 09/32 no'lu izni.