

Gökçe ERDOĞAN

DOKTORA TEZİ

2022-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

T-HÜCRELİ AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ'DE PHF6
PROTEİNİNİN FİZYOLOJİK ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Gökçe ERDOĞAN

DOKTORA TEZİ

2022-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

T-HÜCRELİ AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ'DE PHF6
PROTEİNİNİN FİZYOLOJİK ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI

Gökçe ERDOĞAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Ş. Burçak YOLDAŞ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TDK-2018-2968 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2022-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Tıbbi Biyoloji Programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir. 18/04/2022

İmza

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Ş. Burçak YOLDAŞ
(Akdeniz Üniversitesi)

Üye : Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM
(Akdeniz Üniversitesi)

Üye : Prof. Dr. O. Alphan KÜPESİZ
(Akdeniz Üniversitesi)

Üye : Prof. Dr. Nilgün GÜRBÜZ
(Süleyman Demirel Üniversitesi)

Üye : Doç.Dr. Çiğdem AYDIN ACAR
(Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi)

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

Prof. Dr. Melike CENGİZ

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Gökçe ERDOĞAN

İmza

Doç.Dr. Ş. Burçak YOLDAŞ

İmza

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim sürecinde bilgi ve deneyimleriyle yol göstererek beni geleceğe hazırlayan sayın danışman hocam Doç.Dr. Burçak YOLDAŞ'a;

Bilimsel bakış açısını ve desteğini her zaman paylaşan çok değerli hocam sayın Prof.Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM'e; tez izleme komitemde bulunan ve değerli katkılarından ötürü sayın Prof.Dr. Alphan KÜPESİZ'e; lisansüstü eğitimime başladığım günden itibaren, bilgi ve tecrübesini emekli olsa dahi esirgemeyen, her daim minnettar olacağım hocam sayın Prof.Dr. Osman Nidai ÖZEŞ'e; çalışmalarım için her zaman laboratuvarının kapılarını açan sayın Prof.Dr. Nuray ERİN'e; doktora jürimde bulunan sayın hocalarım Prof.Dr. Nilgün GÜRBÜZ ve Doç.Dr. Çiğdem AYDIN ACAR'a ve yedek jüri üyelerimiz Prof.Dr. Ahter ŞANLIOĞLU ve Prof.Dr. Zafer ÇETİN'e; Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof.Dr. Fahri UÇAR'a; emekleri için Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndaki tüm değerli öğretim üyelerine;

Çalışmalarımı yürüttüğüm Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı asistanları ve sekreterine ve Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü, sekreteri ve tüm personeline;

Bilimsel ve manevi destekleriyle bu uzun yolda yol arkadaşım olan Dr.Şule DARBAŞ, Özlem YILMAZ, Merve EMBEL, Mert ARIKAN ve Esra TAVŞAN'a;

Kimi zaman eğlenceli, kimi zaman hüznü ama bol koşturmacalı, uykusuz ve her şeye rağmen "iyi ki" dediğim bu yolculukta bir an olsun gözlerini üzerimden ayırmayan sevgili ailem Nermin-Bahattin ERDOĞAN'a; en ihtiyaç duyduğumda hep "orada" olan abim Alper ERDOĞAN ve Eloşum'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: T-hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi, erkeklerde kadınlara göre daha sık görülen, agresif seyirli hematolojik malignensi tipidir. Olgunlaşmamış T hücreleri üzerinde, T-ALL'de tümör baskılayıcı rol oynayarak son yıllarda aday genlerden biri olan PHF6'nın hastalığın oluşumundaki biyolojik aktivitesinin rolü ve sinyal yolağının moleküler mekanizmasının aydınlatılması amaçlanmıştır. T-ALL'de PHF6 proteininin S199 noktasının protein fonksiyonuna olan etkisi ve T-ALL hücrelerinin proliferasyonu, farklılaşması ve migrasyonu üzerindeki etkisini belirlemeyi amaçladık.

Yöntem: İnsan cDNA kütüphanesinden PHF6 cDNA'sı pcDNA3.1A vektörüne PCR klonlama ile klonlanması yapılan plazmide SDM yöntemi uygulanarak S199 bölgesinin A199 ve D199 dizilerine değiştirilmesi deneyi uygulandı. DND-41 hücrelerine transfekte edilen PHF6 protein ifade vektörlerinin; western blotlamayla işaretlemesi yapıldı, hücre proliferasyonuna etkileri MTT ile değerlendirilirken yabancı tip vektörün T-hücre farklılaşması üzerine etkileri akım sitometriyle, ve hücre migrasyonuna etkisi Transwell hücre migrasyon yöntemiyle değerlendirildi.

Bulgular: Transfekte edilen yabancı tip PHF6 ifade vektörünün, DND-41 hücrelerinde ektopik ifadesinin; hücrelerin CD4⁺ yönünde artışı gösterilirken migrasyonu üzerinde etkisi görülmemiştir. S199A⁺ hücrelerde Notch1 ifadesinin azaldığı gösterildi. S199A⁺/D⁺ mutant vektörlerinin yabancı tip ve kontrol grubuna göre hücrelerde proliferasyonu indüklediği gösterildi.

Sonuç: Çalışmamız PHF6'nın T-ALL hücrelerinde hücre migrasyonunun çalışıldığı literatüre göre ilk çalışma niteliğindedir. Bu çalışmada PHF6'nın ektopik ifadesinin T-ALL hücrelerinde migrasyona etkisinin olmadığı, hücreleri CD4⁺ yönüne indükleme potansiyeli olduğu ve S199 bölgesinin Notch1 sinyalizasyonu ve hücre proliferasyonu için anlamlı olabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: lösemi, PHF6, T-hücresi

ABSTRACT

Objective: T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia is an aggressive type of hematological malignancy that is more common in men than women. It was aimed to elucidate the role of the biological activity of PHF6 in the formation of the disease and the molecular mechanism of the signalling pathway, and has been one of the candidate genes in recent years by playing a tumor suppressor role in T-ALL on immature T cells. We aimed to determine the effect of PHF6 S199 region on protein function in T-ALL and on proliferation, differentiation and migration of T-ALL cells.

Method: Following PCR cloning method which performed from human cDNA library into pcDNA3.1A expression vector with PHF6 cDNA sequence, the experiment of changing the S199 region to the A199 and D199 sequences was applied by applying the SDM method to the PHF6 plasmid cloned. PHF6 protein expression vectors transfected into DND-41 cells; Protein expressions evaluated by western blotting, while effects on cell proliferation were determined with MTT wild-type vectors' T-cell differentiation effects evaluated by flow cytometry and cell migration were evaluated by Transwell cell migration method.

Results: The ectopic expression of the wild type PHF6 expression vector transfected in DND-41 cells; expression was increased in the CD4⁺ direction of the cells, had no effect on the migration of the cells. Reduced Notch1 expression was demonstrated in S199A⁺ cells. S199A⁺/D⁺ mutant vectors have been shown to induced proliferation compared to the PHF6⁺ cells and control group.

Conclusion: This study is the first for working on the cell migration of PHF6 in T-ALL cells in the literature. It was shown that ectopic expression of PHF6; has no effect on cell migration, has the potential to induce T-ALL cells towards CD4⁺ and S199 site might be significant for Notch1 signalling and cell proliferation.

Key words: leukemia, PHF6, T-cell

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLOLAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanser Tanımı	3
2.2. Hematopoez	4
2.2.1. T Hücre Gelişimi	6
2.3. Lösemi Tanımı ve Sınıflandırılması	7
2.3.1. Myeloid Lösemiler	8
2.3.2. T-hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi (T-ALL)	8
2.4. Plant Homeodomain Finger Protein 6 (PHF6) Gen ve Protein Yapısı	10
2.4.1. PHF6 İfadesi	11
3. GEREÇ ve YÖNTEM	16
3.1. Hücre Kültürü	16
3.2. Solüsyon ve Tamponlar	17
3.3. pcDNA3.1 İnsan PHF6 Memeli İfade Vektörünün Klonlanması ve Filtre Kağıdından Ayırıştırılması	21
3.4. İnsan PHF6 Yabancı Tip Vektörünün E. Coli DH5 α Suşuna Isı Şokuyla Transformasyonu	22
3.4.1. Kompetan Hücrelerin Hazırlanması	23

3.4.2. Isı Şokuyla Transformasyon	24
3.5. Plazmid İzolasyonu	25
3.6. PHF6 Geninin PCR Yöntemi ile Çoğaltılması	26
3.6.1. PCR Reaksiyon İçeriği ve Şartları	26
3.7. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme Sistemi	27
3.7.1. %2'lik Agaroz Jelin Hazırlanması	27
3.7.2. Agaroz Jelin Yürütülmesi ve Görüntülenmesi	27
3.8. PCR Amplikonlarının NaAc/Etanol Presipitasyonu ile Pürifikasyonu	27
3.9. Bölgesel Yönlendirilmiş Mutageniz (SDM)	28
3.10. Mutant Plazmidlerin DpnI Enzimi ile Kesimi	29
3.11. Katı Agar Plakalara Yayma ve Koloni Seçimi	29
3.12. PHF6 Geninin PCR Yöntemiyle Çoğaltılması ve Kontrolü	30
3.13. Sanger DNA Sekanslama	30
3.13.1. Sekans Reaksiyonu	31
3.13.2. Sekans Pürifikasyonu	31
3.13.3. DNA Sekanslama Cihazına Ürünlerin Yüklenmesi ve Değerlendirilmesi	31
3.14. PHF6 Protein İfadesinin Gösterilmesi İçin Western Blot Uygulanması	31
3.14.1. Hücrelere Vektör Transfeksiyonu	31
3.14.2. Hücre Lizatı Toplama	32
3.14.3. Bradford ile Protein Konsantrasyon Tayini	32
3.15. Western Blotlama	33
3.15.1. Örneklerin Hazırlanması ve Jele Yüklenmesi	34
3.15.2. PVDF Membrana Transferi	34
3.15.3. PVDF Membranın İşaretleme	34
3.15.4. Strip-Off Muamelesi	35
3.16. Yabancı Tip PHF6 İfade Vektörünün T-Hücre Farklılaşması Üzerine Etkisinin Gösterilmesi İçin Akım Sitometri ile Değerlendirilmesi	36
3.17. Yabancı Tip ve Mutant PHF6 İfade Vektörlerinin Hücre Proliferasyonuna Etkilerinin MTT ile Gösterilmesi	37
3.18. Yabancı Tip PHF6 İfade Vektörünün Hücre Migrasyonuna	37

Etkisinin Gösterilmesi	
3.18.1. Migrasyon Deneyi İçin Hücrelerin Hazırlanması ve Kemoatraktan Muamelesi	38
3.18.2. Göç Eden Hücrelerin Ayırıştırılması ve Boyanması	38
3.18.3. Migrasyon Analizi İçin Standart Eğri Hazırlanması	39
3.19. İstatistiksel Analiz	39
4. BULGULAR	40
4.1. İnsan PHF6 Yabanıl Tip İfade Vektörünün Agaroz Jel Elektroforeziyle Doğrulanması	40
4.2. İnsan PHF6 İfade Vektörünün Protein İfadesinin Gösterilmesi	41
4.3. İnsan PHF6 Proteininin Bölgesel Yönlendirilmiş Mutageniz (SDM) Yöntemi ile Mutantlarının Oluşturulması	41
4.4. Yabanıl Tip ve Mutant PHF6 İfade Vektörlerinin PHF6 İfadelerinin Belirlenmesi	44
4.5. İnsan PHF6 Yabanıl Tip ve Mutant İfade Vektörlerinin Hücre Canlılığına Etkisinin Belirlenmesi	45
4.6. Yabanıl Tip ve Mutant PHF6 İfade Vektörlerinin Notch1 İfadelerinin Belirlenmesi	47
4.7. İnsan PHF6 İfade Vektörünün T-Hücre Farklılaşması Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi	47
4.8. İnsan PHF6 İfade Vektörünün T-Hücre Migrasyonu Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi	49
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	56
KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİŞ	65

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1.	SDS-PAGE jel hazırlama miktarları	33
Tablo 3.2.	Strip-off solüsyonu hazırlama miktarları	35



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Hematopoez basamakları.	5
Şekil 2.2.	PHF6 proteininin üç boyutlu kristal yapısı	10
Şekil 2.3.	PHF6 proteininin ePHD bölgesinin üç boyutlu kristal yapısı	11
Şekil 2.4.	PHF6'nın HKH'lerde ifade seviyeleri	12
Şekil 2.5.	PHF6 post-translasyonel modifikasyonları	13
Şekil 2.6.	PHF6 proteininde korunmuş fosforilasyon dizisi	14
Şekil 3.1.	Memeli ifade vektörü pcDNA3.1A'nın şematik gösterimi	21
Şekil 3.2.	İnsan PHF6 cDNA dizisi.	23
Şekil 3.3.	Katı agar plakada tek koloni görüntüsü	30
Şekil 4.1.	İnsan PHF6 memeli ifade plazmitinin agaroz jel elektroforezi ile yapısal doğrulanması.	40
Şekil 4.2.	İnsan PHF6 memeli ifade plazmitinin Sanger sekans yöntemiyle dizisinin doğrulanması.	40
Şekil 4.3.	PHF6 protein ifadesinin western blotlama ile doğrulanması.	41
Şekil 4.4.	PHF6 SDM deneyi sonrası ve DpnI ürünlerinin yapısal ve boyutsal olarak agaroz jel ile doğrulanması.	42
Şekil 4.5.	Mutant PHF6 plazmid vektörlerinin agaroz jel ile boyutsal olarak doğrulanması.	43
Şekil 4.6.	SDM yöntemi ile oluşturulan PHF6 S199D mutant plazmitinin Sanger sekans ile dizisinin doğrulanması	43

Şekil 4.7.	SDM yöntemi ile oluşturulan PHF6 S199A mutant plazmitinin Sanger sekans ile dizisinin doğrulanması	44
Şekil 4.8.	Yabancı tip ve mutant PHF6 ifade vektörlerinin PHF6 ifade farklılıklarının western blotlama ile değerlendirilmesi.	44
Şekil 4.9.	Western blotlama ile değerlendirilen yabancı tip ve mutant PHF6 protein ifade farklılıklarının grafiksel analizi.	45
Şekil 4.10.	PHF6 yabancı tip ve mutant ifade vektörünün 48 saatlik hücre canlılığı üzerine etkileri.	46
Şekil 4.11.	PHF6 yabancı tip ve mutant ifade vektörünün 72 saatlik hücre canlılığı üzerine etkileri.	46
Şekil 4.12.	Yabancı tip ve mutant PHF6 ifade vektörlerinin Notch1 ifade farklılıklarının western blotlama ile değerlendirilmesi.	47
Şekil 4.13.	PHF6 ifade vektörünün transfekte edilmediği kontrol grubunun akım sitometri analizi	48
Şekil 4.14.	PHF6 ifade vektörünün T-hücre farklılaşması üzerine etkisinin CD4/CD8 yönünden akım sitometrisi ile analizi	49
Şekil 4.15.	Standart eğri hazırlanarak oluşturulan RFU grafiği	50
Şekil 4.16.	Hücre migrasyon grafiği	51

SİMGELER ve KISALTMALAR

ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi
AML	: Akut Myeloid Lösemi
BCR	: B-Hücre Reseptörü
CD	: Diferansiyasyon Kümesi (Cluster of Differentiation)
CLP	: Ortak Lenfoid Öncülü (Common Lymphoid Progenitor)
CMP	: Ortak Myeloid Öncülü (Common Myeloid Progenitor)
D	: Aspartik Asit
dH₂O	: distile su
DN	: Çift Negatif (Double Negative)
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DP	: Çift Pozitif (Double Positive)
ETP	: Erken Timik Öncülü (Early Thymic Progenitor)
fs	: Çerçeve Kayması (frame shift)
G2	: Kapı 2 (Gap2)
HKH	: Hematopoetik Kök Hücre
K	: Lizin
KML	: Kronik Myeloid Lösemi
LMPP	: Lenfoid-kökenli Multipotent Öncül (Lymphoid-primed Multipotent Progenitor)
M	: Mitoz
MÖ	: Milattan Önce
MPP	: Multipotent Öncülü (Multipotent Progenitor)
MS	: Milattan Sonra
N	: Asparajin
NK	: Doğal Öldürücü (Natural Killer)
NLS	: Nükleer Lokalizasyon Sinyali
NoLS	: Nükleolar Lokalizasyon Sinyali
NuRD	: Nükleozom Yeniden Modelleme ve Deasetilasyon Kompleksi
O.D.	: Optik Dansite

PHD	: Bitki Homeo Alanı (Plant HomeoDomain)
PHF6	: Bitki Homeodomain Parmak Proteini 6 (Plant Homeodomain Finger Protein 6)
Q	: Glutamin
R	: Arjinin
RBBP4	: Retinoblastoma Bağlanma Proteini 4
S	: Serin
T-ALL	: T- Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi
X	: Durdurma kodonu
yy	: yüzyıl
α	: alfa
β	: beta
γ	: gamma
ϵ	: epsilon
μ	:mikro
μl	:mikrolitre

1. GİRİŞ

Plant homeodomain finger protein 6 (PHF6) proteini bir sentromer proteini olup çekirdek ve çekirdekçikte ifadesi bulunur. Nuklear Lokalizasyon Sinyal bölgesi ve Nukleolar Lokalizasyon Sinyal bölgeleri aracılığıyla çekirdek ve çekirdekçiğe göç eder. Transkripsiyonel aktivitesini yerine getirebilmesi için Nukleozom Yeniden Modelleme ve Deasetilasyon Kompleksi (NuRD) ile bağlanır. PHF6'nın çeşitli karsinomalar, lenfoid ve hematopoetik neoplazmalardaki rolü üzerine yapılan çalışmalarda PHF6'nın T hücreli akut lenfoblastik lösemide genellikle inaktif ya da düşük ifadeye sahip olduğu tespit edilerek tümör baskılayıcı fonksiyonu gösterilmiştir (Hajjari ve ark., 2016; Li ve ark., 2016). T hücreli akut lenfoblastik lösemi (T-ALL), timositlerin agresif malignensisi, yüksek lenfosit sayısı, lenfoadenopati, merkezi sinir sistemi infiltrasyonu ve kemik iliği ve timusta olgunlaşmamış lenfoblastların çoğalmasıyla karakterize yaygın bir lenfoid malignensi tipidir. T-ALL'de yeni bir tümör baskılayıcı gen olarak fonksiyon gösteren ve NuRD kompleksi ile bağlanan ve DNA hasar tamirinde görev alan PHF6 geninin çift pozitif-T hücrelerinde (CD4⁺CD8⁺) ifadesinin arttığı literatür çalışmalarında gösterilmiştir. Hücre döngüsünün G2/M safhasında DNA hasarı gerçekleştiğinde fosforilasyonla düzenlenen protein (Holmfeldt ve ark., 2010, Wang ve ark., 2013) ve tümör baskılayıcı gen olarak fonksiyon gösteren PHF6'nın, tümör baskılayıcı özelliğini kaybetmesine nokta mutasyonlarının sebep olduğu ve proteinin güdük formunun ise yanlış anlamlı (farklı aminoasit kodlayan) veya anlamsız (durdurma kodonu oluşturan) mutasyonlarla oluştuğu literatürde gösterilmiştir. Ancak Notch1 ve PHF6'nın T-ALL patogenezinde sorumlu olan ana faktörlerden biri olduğu bilinmesine rağmen PHF6'nın T-ALL gelişiminde nasıl bir moleküler rol oynadığı halen belirsizliğini korumaktadır. Bu çalışmanın PHF6'nın T-ALL patogenezindeki moleküler yolağı üzerine konuyla ilgili yapılacak yeni çalışmalar için ön bilgi niteliğinde olması planlanmıştır.

PHF6'nın iki PHD alanı arasında bulunan RDRS199 motifiyle olgunlaşmamış T hücrelerinin proliferasyonunu önlediğini düşündük. T-ALL'de aktive edici mutasyonları görülen Notch1'in PHF6 ile geri besleme döngüsüyle transkripsiyonel olarak indüklenmesi, tümör baskılayıcı PHF6 gen ürününün T-hücre proliferasyonunda negatif geribesleme yolağı olarak kullanıldığını düşünüyoruz. T-hücre farklılaşmasına da negatif

etki yapacağını düşündüğümüz PHF6 gen ürününün bu fonksiyonunu yerine getirirken RDRS199 aracılı aktivasyonunun önemli olduğu kanaatindeyiz. Bu sebeple projemizde öncelikle yabancı tip PHF6 genini aracı vektöre klonlayarak PHF6 gen ürününün ifadesini sağlayan plazmid vektörünü elde ettikten sonra S199 bölgesinin inaktive edici Alanin (A) aminoasitine ve aktive edici Aspartik Asit (D) aminoasitlerine bölgesel yönlendirilmiş mutagenез deneyi ile çevirerek S199 bölgesinin aktivasyon ve inhibisyon durumundaki etkinliği değerlendirilmiştir.

Kanser hücrelerinin çevre dokulara veya kan-lenfatik sistem aracılığıyla uzak dokulara yerleşmesi metastaz olarak adlandırılır. Migrasyon ise hücrenin bulunduğu dokudan ve çevresel koşullardan başka bir dokuya doğru hareket ederek göç etmesidir. Metastaz hücre migrasyonunu da içeren, kanser hücrelerinin vücuda yayılmasına neden olan bir süreçtir. Bugüne kadar literatürde yer alan çalışmalarda T-ALL hücre migrasyon mekanizması netlik kazanmamıştır. PHF6'nın nöronal migrasyondaki regülatör rolünün gösterilmesi ve bunun yanı sıra T-ALL hücrelerinin migrasyon yeteneğinin altında yatan mekanizmanın netleşmemesi, bu çalışmada PHF6 proteininin T-ALL hücre migrasyonu üzerindeki etkisinin de araştırılmasına neden olmuştur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser Tanımı

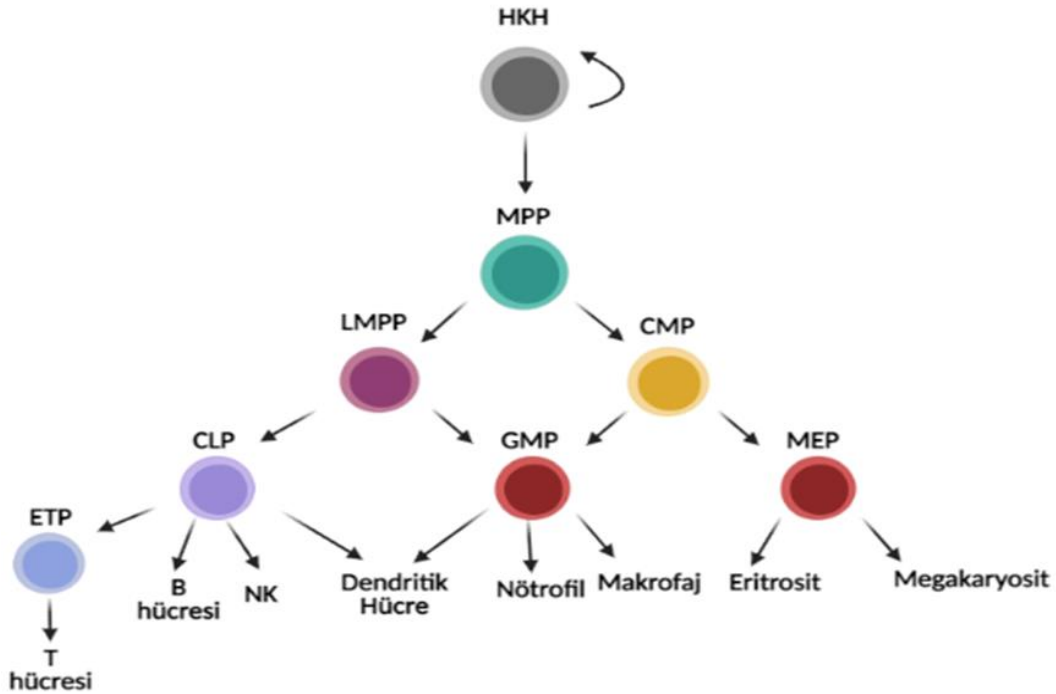
Kanser, kontrolsüz büyüyen ve çoğalan somatik hücrelerin çevre dokulara yayılmasıyla karakterize olan multigenetik bir hastalıktır. Antik Yunan literatürüne göre hekimler kanser dokusunu “vücudun yüzeyinde büyüyen ve bazen ülser olan, inflamatuvar yapıda, kırmızı, ateşli ve irine dönebilen şişlikler” olarak gördüler. Çoğunlukla zararsız olarak gördükleri bu şişliklerin kötü huylularına Hipokrat karkino veya karkinoma adını vermiştir, Galen (MS. 2.yy) ise bu dokuların yengeç ısırığına benzemesi ve görünümeleri sebebiyle Yunanca’da “yengeç” demek olan kanser kelimesini bu hastalık için kullanmıştır (Sigerist, 1932; Atici, 2007). Tarihte ilk kanser vakasına M.Ö. 1600’de rastlanılmış ve tedavisinin olmadığı belirtilmiştir (Lakhtakia, 2014). 20. yüzyılın başlarından itibaren kanser gelişimine neden olan mekanizmalar ve hastalığın modern tedavisine yönelik çalışmalar devam etmesine rağmen tüm mekanizmaları halen aydınlatılamamıştır. Kanser, genetik ve/veya epigenetik faktörlere bağlı olarak gelişebilen bir hastalıktır. Genetik faktörlere bağlı olarak hasarlı DNA’nın sentezlenmesi, onkogen adı verilen aktivasyonu kanserle ilişkilendirilmiş bir genin fonksiyon kazanması ya da tümör baskılayıcı bir genin fonksiyon kaybetmesi ile ortaya çıkmaktadır. Kromozomal aberasyonlarla onkogenin aktivasyonu ve tümör baskılayıcı genin fonksiyon kaybetmesiyle gelişebilmektedir. Epigenetik mekanizmalar ise, DNA dizisinde bir değişiklik yapmayan ancak fenotipe yansıyan modifikasyonlar ve yeniden düzenlemeler bütünüdür (Chen ve ark., 2014). Epigenetik modifikasyonlar, moleküler mekanizmaların gen ifadesinin regülasyonunu değiştirmesiyle fenotipe yansır. DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kromatin modifikasyonları gibi epigenetik regülasyonların bozukluğu kanser dahil birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir (Lu ve ark., 2020). Genetik ve epigenetik disregülasyonlar sonucunda çeşitli solid ve hematolojik neoplaziler gelişebilir. Bu neoplaziler kemik iliği hücrelerinde veya hematopoietik hücrelerde gelişirse hematolojik kanserler olarak değerlendirilir.

2.2. Hematopoez

Hematoloji, kan ve kan hastalıklarıyla ilgilenen bilim dalıdır. Kökeni Yunanca'da kan anlamına gelen "haimo" kelimesinden gelmektedir. Hematoloji terimi ilk kez 1743'de Thomas Schwenke tarafından kullanılmıştır (Atici, 2007). Hematopoez, insanda embriyonik gelişim safhasında ve erişkinlik döneminde görülür ve bu süreçte primer lenfoid organlar olan kemik iliği (embriyonik dönemde fetal karaciğer), timus ve sekonder lenfoid organ olan dalakta hematopoetik kök hücreler (HKH) gelişir (Godin ve Cumano, 2005). Hematopoez, kan hücrelerinin üretimi anlamına gelmektedir ve süreç boyunca pluripotent kök hücrelerden iki ana kan hücre hattı olan lenfoid ve myeloid hücrelerin gelişimi sağlanır. Lenfosit hücreleri lenfoid dokularda lenfoblastik progenitör hücrelerden köken alan T hücreleri, B hücreleri ve doğal öldürücü (NK) hücrelerdir. Kemik iliği ve timusta üretilirler ve sekonder organlara dolaşım yoluyla göç edebilirler. Vücudumuzdaki lenfosit hücrelerinin çoğunluğu dokular arasında bulunup, %1'i dolaşımda bulunmaktadır. Lenfositler ve diğer lökositler yüzeylelerinde kendilerine özgü belirteç ifade ederler. Bu belirteçler T ve B lenfositleri ayırt etmede kullanılır (Peter ve ark., 2007). Adaptif immun sistemin yapıtaşı B lenfositler, B hücre reseptörleri (BCR) ile antijeni tanıyarak antikor üreten hücrelerdir ve post-natal dönemde kemik iliğinde olgunlaşarak dolaşıma girerler (Nutt ve Kee, 2007). Hücresel immünite için kilit rol oynayan T lenfositler de kemik iliğinde üretilir ve timusta olgunlaşır. Myeloid kökenli hücreler ise eritrosit, granulosit (nötrofil, eozinofil, bazofil), monosit-makrofaj, mast hücreleri ve megakaryosit hücreleridir.

HKH'ler farklı hücre tiplerine farklılaşma yeteneği olan, kendi kendini yenileyebilen hücrelerdir (Şekil 2.1). Primer lenfoid organlarda lenfositler HKH'lerden olgunlaşarak farklılaşmalarını tamamlarlar. Hücrenin mikroçevresi, diferansiyasyonu sağlayan ve hangi hücre tipine farklılaşacağını belirleyen iç ve dış faktörleri sağlar. Bunlar transkripsiyon faktörleri, sitokin veya büyüme faktör sinyalleri, epigenetik modifikasyonlar ve stroma hücreleridir. Hücrelerin diferansiyasyonu ile hücre yüzey antijenleri de (cluster of differentiation-CD) farklılaşır, bu sayede ata popülasyonlarını ayırt etmede yüzey belirteci olarak kullanılırlar. Diferansiyasyonu sağlayan bu faktörler

aracılığıyla kemik iliğinde yüzey belirteçleri açısından $\text{Lin}^-/\text{CD34}^+/\text{CD38}^-$ olan HKH'ler multipotent progenitör (MPP) hücelere ($\text{Lin}^-/\text{CD34}^+/\text{CD38}^+$) dönüşürler (Bapat ve ark., 2019). HKH'ler farklılaşıp olgunlaşarak nötrofil ve monositleri oluşturduğunda CD34 ifadesi azalır ve kaybolur. MPP'ler yüzeylerinde düşük oranda olgun kök hücre belirtecini (Lineage-Lin), kök hücre antijeni-1 (Sca-1) ve CD117 (c-Kit) taşırlar. Bu yüzey belirteç grubu LSK ($\text{Lin}^-/\text{Sca-1}^+/\text{c-Kit}^+$) olarak adlandırılır. MPP kök hüceleri, yalnızca köken aldığı dokunun hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine sahiptirler. Bu sebeple MPP'ler Lymphoid-primed Multipotent Progenitor (LMPP) veya ortak myeloid progenitör (CMP) hücelere farklılaşırlar. CMP hüceleri eritrosit, granulosit, megakaryosit, nötrofil, dendritik hücre (DC) ve makrofajlara farklılaşarak olgunlaşırken, LMPP ($\text{Lin}^-/\text{CD34}^+/\text{CD45RA}^+/\text{CD90}^-$) hüceleri dendritik hücre, NK hücresi ve B-hücelerinin öncülü olan ortak lenfoid progenitör (CLP) hücelere ya da erken T hücre öncülü (ETP) hücelere farklılaşabilirler (Ceredig ve ark., 2009).



Şekil 2.1: Hematopoez basamakları. HKH, hematopoietik kök hücre; MPP, multipotent progenitör; LMPP, lymphoid-primed multipotent progenitor; CMP, common myeloid progenitor; CLP, common lymphoid progenitor; GMP, granulosit monosit progenitör; MEP, megakaryosit eritrosit progenitör; ETP, erken timik progenitörü; NK, doğal öldürücü.

2.2.1.T Hücre Gelişimi

Multipotent hematopoetik kök hücrelerden köken alan T lenfositler, timusta farklılaşarak olgunlaşmaya başlar ve sekonder lenfoid organlarda olgunlaşmasını tamamlarlar. Farklılaşmaya ve olgunlaşmaya başlayan T hücreleri timusta çok sıkı seçim aşamalarından geçer. Bu seçim aşamalarının erken evresinde spesifik yüzey belirteçleri olan $CD4^-CD8^-$ hücreler çift negatif, bir sonraki aşamada bu yüzey belirteçlerinden yalnızca biri tarafından pozitif ($CD4^+$ ya da $CD8^+$) hücelere farklılaşarak olgunlaşmamış tek pozitif hücreye, daha sonra her iki yüzey belirteci açısından pozitif olan ($CD4^+CD8^+$) çift pozitif evreye ve en sonunda ise T-hücreleri $CD4^+$ (yardımcı T hücresi) veya $CD8^+$ (sitotoksik T hücresi) hücelere farklılaşarak olgunlaşırlar.

Timus, kemik iliği veya fetal karaciğerden köken alan kök hücrelerin T-hücrelerine olgunlaştığı yerdir. Timusta bulunan olgunlaşmamış T lenfosit hücrelerine timosit denir. Bu hücre grubundan LMPP'ler timusa kortikamedullar bölgesinde bulunan kan damarlarından girerler. Burada çoğalarak ve diferansiye olarak timus korteksine doğru hareket ederler (Harrington, 2019). LMPP hücrelerinin farklılaşması, kemik iliğinden köken alan stromal hücreler aracılığıyla olmaktadır. In vitro şartlarda stromal hücreler LMPP ile inkübe edildiğinde B hücrelerinin oluşabildiği saptanmıştır (Karamitros ve ark., 2018). Ancak LMPP hücrelerinin T hücre oluşturabilmesi için mutlaka timusa göç etmesi gerekmektedir. LMPP hücrelerinin ilk olarak timusa göç etmelerinin sebebi timusun mikroçevresinde bulunan timik epitel hücreleri ve kortikal stroma hücrelerinin, LMPP hücrelerinden köken alan ve T hücre öncülü olan ETP hücrelerinin proliferasyonu, migrasyonu ve farklılaşmasını sağlayacak olan ligantlar ve kemokinleri bulundurmasıdır (Seo ve Taniuchi, 2016). ETP hücreleri timus korteksinde 10 gün proliferasyon olduktan sonra farklılaşmalarını tamamlayarak timusun medulla bölgesine dönerler. T-hücre öncüllerinin yüzeyinde bulunan $CD44$ ko-reseptörü ile timus endotel hücrelerinde bulunan $\alpha6$ -integrin ile bağlanarak kandan çıkış yaparlar (Ruiz ve ark., 1995; Kawakami ve ark., 1999). LMPP hücreleri timusa girdiklerinde $CD25^-CD44^+$ olup $CD4^-CD8^-$ olan çift negatif (DN1) hücelere farklılaşırlar (Srivastava ve Makarenkova, 2020). ETP hücreleri timusa giriş yaptıkları noktadan itibaren timus içinde düzenli ve tek yönlü olarak hareket ederler. Timusa kortikamedullar bölgesinden giren hücreler

farklılaşma süresince “dış kortekse” doğru hareket ederler. Timus içindeki bu hareketi, hücrelerin eksprese ettikleri integrinler ile timus epitel ve kortikal stroma hücrelerinin eksprese ettiği integrin ligantları kontrol etmektedir. Timusun bu bölgesinde Notch1, T-hücrelerinin farklılaşmalarını belirleyen önemli bir kontrol noktası görevi görmektedir (Srivastava ve Makarenkova, 2020). Notch1, ETP hücrelerinin ana transkripsiyon faktörüdür ve proliferasyonlarını indükler. Kortikamedullar bölgeden çıkıp korteks üzerinden subkapsüler bölgeye geçen T hücreleri DN2 (CD25⁺CD44⁺) aşamasına geçerek diferansiye olurlar (Laurent ve ark., 2004; Srivastava ve Makarenkova, 2020). DN2 aşamasında Notch1 sinyali yoktur. Ancak DN2 aşamasındaki T hücre popülasyonu homojen dağılım göstermediği için hücreler yüzey ifadeleri göre DN2a ve DN2b olarak sınıflandırılırlar (Rothenberg, 2008). Bu aşamada TCR, yeniden düzenleme aşamasına geçer ve ayrıca CD44 ifadesi azalarak T hücreler DN3 (CD25⁺CD44⁻) aşamasına geçerler. Bu hücreler TCR komponentleri olan CD4, CD8, CD25, CD3ε, CD3γ ve TCRA ve rekombinasyondan sorumlu RAG1 açısından negatif olması nedeniyle ETP hücreleri proliferasyon için TCR sinyal yolağını kullanmazlar, onun yerine timus mikroçevresinde bulunan ligantları kullanırlar. Bu aşamada görev alan en önemli transkripsiyon faktörü ise çinko parmak motifi içeren ve (A/T)GATA(A/G) konsensus dizisine bağlanan GATA3’tür. GATA3’ün transkripsiyon faktörlerinden biri de Notch1’dir ve ifadesi ETP-DN2-DN3 süreci boyunca kademeli olarak artış gösterir. GATA3, CD4⁺ T hücrelerinin ve yardımcı T-2 (Th2) sitokin oluşumundan sorumludur (Mak ve Saunders, 2006). TCR yeniden düzenlenmesiyle hücre yüzeylerinde CD4, CD8, CD3ε, CD3γ ifadeleri artar ve DN4 aşamasına geçilir. GATA3 fonksiyonu ile β-seleksiyon süreci başlar ve transkripsiyon faktörlerinin indüksiyonuyla birlikte CD4 ve CD8 ifadeleri başlatılarak hücreler çift pozitif (DP) T hücre karakterini kazanmaya başlar. Bu aşamada hücreler CD4 ve CD8 reseptörlerini eksprese ederler (Thompson, 2011).

2.3. Lösemi Tanımı ve Sınıflandırılması

Hematopoietik kök hücrelerin nokta mutasyonları veya kromozom mutasyonları ile malign forma dönüşmesiyle de hematolojik kanserler gelişebilmektedir. Bu kanserlerin en sık görülen tiplerinden biri lösemidir. Dünya Sağlık Örgütü’nün (WHO) güncel

verilerine göre 2018 yılında 18,1 milyon yeni kanser vakası görülmüş ve 9,6 milyon kansere bağlı ölüm bildirilmiştir. Bu ölümlerin %3.2'si lösemi kaynaklıdır (WHO, 2020). Rudolf Virchow 1845'de hastalığı "beyaz ve kırmızı kan hücrelerinin tersine dengesi" olarak tanımlayıp tarihte ilk kez 1847'de lösemi terimini kullanmıştır (Kampen, 2012). Günümüzde lösemi, kemik iliği veya kanda beyaz kan hücrelerinin neoplastik proliferasyonu ile gelişen, şişmiş lenf nodları, genişlemiş karaciğer veya dalak, lökopeni, trombositopeni, terleme, ateş ve halsizlikle karakterize malignan klonojenik hastalık olarak tanımlanmaktadır. Hücre tipine göre myeloid veya lenfoid, hastalığın ilerlemesine göre ise akut ve kronik olarak 4 ana gruba ayrılır.

2.3.1. Myeloid Lösemiler

Kemik iliği ve dalaktaki myeloid kökenli hücrelerin proliferasyonu sonucu periferik kana salınan granulosit ve myeloblast hücrelerinin kontrolsüz çoğalmasıyla karakterizedir. 2 ana tipi vardır. Kronik myeloid lösemi (KML), 9. kromozomdaki proto-onkogen olan c-abl ile 22. kromozomdaki BCR geninin resiprokal translokasyonu ile (t(9;22)(q34;q11.2)) karakterize myeloid lösemi tipidir ve bu translokasyon sonucu oluşan kısa kalmış 22. kromozoma "Philadelphia kromozomu" denir (Molica ve ark., 2020). Philadelphia kromozomu BCR-ABL1 füzyon genini taşır ve KML olgularının %95'inde gözlenir. BCR-ABL1 onkoproteininin oluşmasıyla hücre proliferasyonu ya da apoptozun inhibisyonu gibi kanserli hücrenin sağkalımını sağlayan birçok yolağın aktivasyonu tetiklenir. KML hastalarında yüksek lökosit ve yüksek bazofil sayısı, trombositopeni, trombositoz, periferik kanda blast hücrelerinin varlığı, splenomegali ve Philadelphia kromozomunun varlığı belirleyici özelliklerdir (Eden ve ark., 2022). Akut myeloid lösemi (AML), kemik iliğinde farklılaşmasını tamamlamamış myeloid hücrelerin ve olgunlaşmamış myeloid öncül hücrelerin artması ile gelişen heterojenik hematolojik malignansi tipidir (Zjablovskaja ve Florian, 2020).

2.3.2. T-hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi (T-ALL)

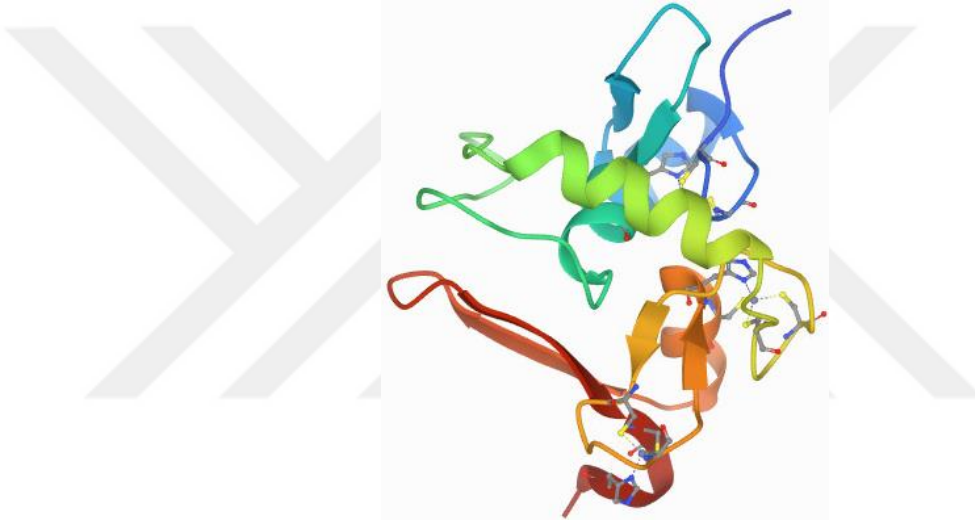
T hücreli akut lenfoblastik lösemi (T-ALL) olgunlaşmamış T lenfositlerin proliferasyonu ile karakterize bir kanser türüdür. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre ALL'nin %25'ini yetişkin ve yaklaşık %16'sını da pediatrik T-ALL'li bireyler oluşturmaktadır.

Toplumda görülme sıklığı diğer lösemi/lenfoma tiplerine göre daha düşük olsa da daha agresif seyirli bir hematolojik malignensidir. Olgunlaşmamış T-hücrelerinin kemik iliğine infiltrasyonu ile karakterize bir hastalıktır. Hastalarda beyaz kan hücrelerinde artış, nötropeni, anemi, trombositopeni gibi kan hücrelerinde düşüş, timüs kütlelerinde artış ve beyine infiltrasyon görülmektedir (Gianni ve ark., 2020). Eksternal belirtiler arasında diş eti kanaması, kemik ağrısı, yüksek ateş ve sık görülen enfeksiyon, solgun cilt, boyun/koltukaltı/abdomen ve kasıklarda lenf nodu şişmesine bağlı yumru oluşumu bulunur. Daha önce alınan kemoterapi-radyoterapi ve ailesel geçmiş T-ALL gelişiminde risk faktörleri arasında yer almaktadır.

T-ALL tedavisinde güncel tedavi yöntemleri olarak hematopoietik kök hücre transplantasyonu (HSCT) ve CAR-T hücre tedavisinde lösemi/lenfoma için hayli ümit verici çalışmalar bulunmaktadır (Dai ve ark., 2022). Ancak bu tedavilerin kişiye yönelik olması, ciddi yan etkilerinin bulunması ve hastaneye bağımlı yaşam koşulları sebebiyle halen faz çalışmaları devam etmektedir (Sheykhhasan ve ark., 2022). Hastalığın insidansı yaşla beraber artarken 15-40 yaş üstü olgularda görülme oranı dramatik bir şekilde artış göstermektedir (Siegel ve ark., 2019; Malard ve Mohamad, 2020). T-ALL'nin pediatrik bireylerde görülme sıklığı yetişkinlere göre düşük olsa da, akut lenfoblastik lösemiler çocukluk dönemi lösemilerinin %80'ini, yetişkin dönemi lösemilerininse %20'sini oluşturmaktadır. Hastalığın etyolojisine baktığımızda birçok kromozomal anomali tespit edilmiş olup, transkripsiyon faktörlerinin anormal ifadesine yol açan nokta mutasyonları (GATA3, RUNX1 gibi), çeşitli translokasyonlar (Notch1 yolağını etkiler), hücre döngüsünde görev alan inhibitörlerde (CDKN2A/B, CDKN1B gibi) ve kromatin düzenleyici faktörlerde (PHF6, DNMT3A gibi) görülen mutasyonlar karşımıza çıkmaktadır (Bayón-Calderón ve ark., 2020) ancak güncel tedavilerde bu bulguların prognostik önemi belirsizliğini korumaktadır (Raetz ve Teachey, 2016). Bu mutasyonlardan hematopoez ve T hücre gelişiminde önemli rolü olan Notch1'in aktive edici mutasyonları ile Notch1 sinyal yolağını etkileyen translokasyonlar T-ALL'li olguların %40-60'ında görülmektedir (Weng ve ark., 2004). PHF6 mutasyonu görülen bireylerde ise T-ALL karakteristiği olan yüksek trombosit sayısı ve kemik iliğinde blast hücre sayısının yüksekliği tespit edilmiştir (Wang ve ark., 2011).

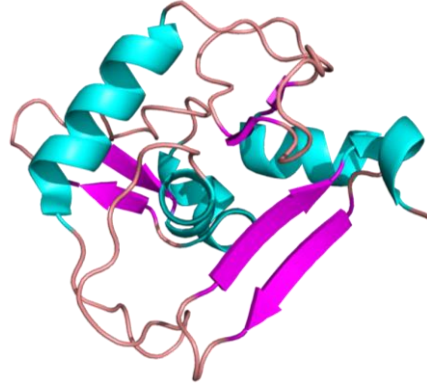
2.4. Plant Homeodomain Finger Protein 6 (PHF6) Gen ve Protein Yapısı

PHF6 (Plant Homeodomain Finger protein 6) geni (Gen ID:84295) X kromozomunun Xq26.2 bölgesinde lokalize olup 11 ekzondan oluşur ve 4,5 kb'lık mRNA transkribe eder. 1095bp'lik *PHF6* cDNA'sı 365 aminoasit içeren 41,290 Da büyüklüğünde protein kodlar (Uniprot: Q8IWS0). N- terminalinde C2HC çinko parmak (pre-PHD alanı) alanı bulunur. Protein Data Bank'tan alınan *PHF6* proteininin 3 boyutlu kristal yapısı Şekil 2.2'de gösterilmiştir (<https://www.rcsb.org/structure/4nn2>, Erişim tarihi: 01.03.2022).



Şekil 2.2: PHF6 proteininin üç boyutlu kristal yapısı.

PHF6 geninin 2-10. ekzonları transkribe olur ve 8-10. ekzonları en çok mutasyon görülen bölgeleridir. 2 adet atipik PHD alanı bulunup hastalığa neden olan mutasyonlar en sık *extended* PHD (ePHD) alanında görülür (Van Vlierberghe ve ark., 2011). Atipik PHD parmak alanının sahip olduğu ana Zn^{+2} bağlayıcı histidin rezidülü dizisi C_4HC_2H 'dir. PHD çinko parmak bölgeleri 2 adet alfa-helikaz tabakası içerir ve bunlar 2 adet birbirine karşıt β -tabakası ile birbirinden ayrılmıştır. ePHD alanının C-terminali, birer uzun (β 3- β 4 saç tokası bulunduran) ve kısa birbirine karşıt β -tabakasından oluşan PHD parmak bölgesidir. Bu iki tabaka alfa-heliks tabakası ile bağlanmıştır. *PHF6* proteininin ePHD bölgesinin yüksek çözünürlüklü üç boyutlu kristal yapısı Şekil 2.3'de gösterilmiştir.



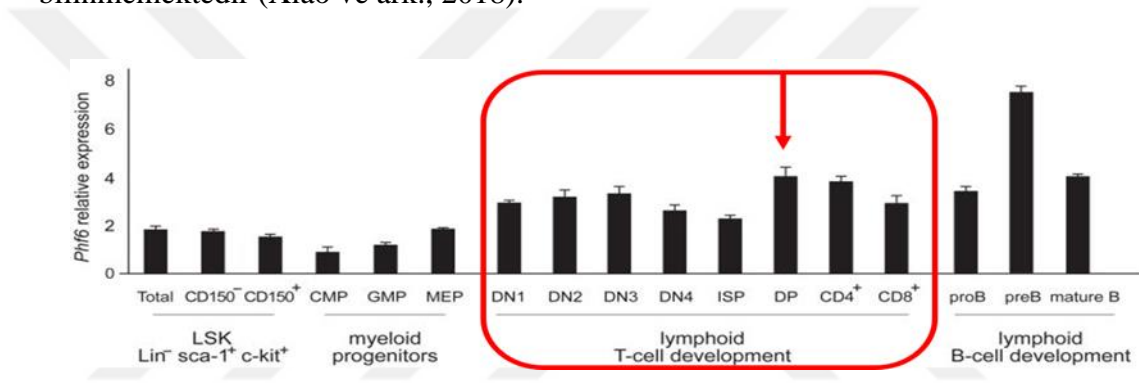
Şekil 2.3: PHF6 proteininin ePHD bölgesinin üç boyutlu kristal yapısı (Liu ve ark., 2014).

2.4.1. PHF6 İfadesi

İnsan Protein Atlası veri tabanında gösterilen immunoflorasan ve proteomik çalışmalarına göre PHF6 proteini bir sentromer proteini olup nukleus ve nukleolusta ifadesi bulunmaktadır (The Human Protein Atlas, 2019). 13.-16. ve 129.-133. aminoasitleri arasında Nuklear Lokalizasyon Dizisi (*nuclear localization sequence-NLS*), 157.-169. aminoasitleri arasında da Nukleolar Lokalizasyon Dizisi (*nucleolar localization sequence-NoLS*) bulunmaktadır. NLS, proteini işaretleyip nuklear transport yoluyla hücre çekirdeğine taşınmasında görev alır. Bu diziler importin- α reseptörleri tarafından tanınır. Daha sonra nuklear por kompleksinden geçebilmek için importin- α reseptörleri nukleoporine bağlanır. Burada RNA, RNP ve proteinlerin taşınmasından sorumlu kargo proteini olan Ran-GTP kompleksi devreye girer. Ran-GAP ve *Ran Binding Protein* (RBP) birlikte GTP'nin hidrolize olmasını sağlar ve Ran-GTP kompleksine bağlı importinin Ran'dan RBP aracılı ayrılarak taşıdığı proteinin nukleusa salınmasını sağlar. Böylece bu sinyal dizileri aracılığıyla protein nukleus ve nukleolusa göç ederek ifade olmaya başlar. PHF6 transkripsiyonel aktivitesini yerine getirebilmesi için Nukleozom Yeniden Modelleme ve Deasetilasyon Kompleksi (NuRD) ile bağlanması gereklidir. NuRD kompleksi, DNA metilasyonu ile gen susturmada işlev görürken kompleksi oluşturan proteinlerdeki hasarlar çeşitli karsinomalar ile ilişkilendirilmiştir (Hajjari ve ark., 2016).

Epigenetik regülasyonlarda görev alan kromatin adaptör proteinlerinden PHF6, hematopoez ve onkogeneze de rol alan bazı genlerin transkripsiyonel regülatörü olan

NuRD'a bağlanarak transkripsiyonel aktivasyona uğrar (Todd ve ark., 2015). Aynı zamanda NuRD kompleksinin bir üyesi olan Retinoblastoma Bağlanma Proteini 4 (RBBP4)'ün promotoruna bağlanarak hücre döngüsünde kilit rolü olan tümör baskılayıcı p21 proteininin ifadesini baskılar (Xiang ve ark., 2019). Tümör baskılayıcı gen olan ve en yüksek ekspresyonu çift pozitif (DP⁺) T hücrelerinde görülen *PHF6*'nın (Van Vlierberghe ve ark., 2011) (Şekil 2.4), CD4⁺T hücrelerinde de eksprese olduğu gösterilmesine rağmen (Van Vlierberghe ve ark., 2010) T hücre farklılaşması, migrasyonu ve proliferasyonu aşamasındaki görev mekanizması literatürde tam olarak bilinmemektedir (Xiao ve ark., 2018).



Şekil 2.4: PHF6'nın HKH'lerde ifade seviyeleri. T hücre gelişiminde en yüksek ifadesinin çift pozitif T hücrelerinde olduğu gösterilmiştir (Van Vlierberghe ve ark., 2011)

Erken T hücre farklılaşmasında kilit rol oynayan Notch1 transkripsiyon faktörünün mutasyona uğrayarak onkogenik aktivasyon kazanmasıyla T hücre farklılaşmasının sekteye uğradığı (Berquam-Vrieze ve ark., 2011; Herranz ve Ferrando, 2016) ve fonksiyon kazanma mutasyonuna sahip hiperaktif Notch1'in T-ALL prognozundan %50-60 oranında sorumlu olduğu çalışmalarda bildirilmiştir (Osborne, 2011; Neumann ve ark., 2015). T hücre çoğalma ve farklılaşma aşamalarında, ETP aşamasından DN2a aşamasına geçerken indüksiyona uğrayan Notch1 (Yui ve Rothenberg, 2014), T-hücre farklılaşması için "aşama spesifik" gen ifadesi sağlanmasında önemli rol oynamaktadır (Haji ve ark., 2014). 2015 yılında 83 T-ALL olgusuyla yapılan bir çalışmaya göre *PHF6* gen mutasyonunun olduğu tüm pediatrik olgularda Notch1 mutasyonu olduğu tespit edilmiş ancak bu ilişkinin yetişkinlerde görülmediği (n=9/23) tespit edilmiştir (Yuan ve ark., 2015). Başka bir çalışmada da *PHF6* mutasyonunun en yüksek insidansının Asya popülasyonunda (%27,1) olduğu gösterilerek bu popülasyonda mutant *PHF6* ve mutant

Notch1'in yüksek oranda birlikte görüldüğü belirtilmiştir (Li ve ark., 2016). Lösemik hücre hatlarıyla *in vitro* koşullarda yapılan bir çalışmada ise PHF6 ve Notch1 arasındaki ilişkinin anlaşılabilmesi için PHF6'nın baskılanarak hücre içi Notch1 sinyali ve T hücre gelişimi kontrol edilmiş. Çalışma sonucunda elde edilen verilerde PHF6'nın Notch1 sinyal aktivitesini ve protein ifadesini düzenlediği, PHF6'nın baskılanmasıyla hücrelerde Notch1 ifadesinin de azaldığı tespit edilmiş. PHF6'nın normal hematopoez için gerekli olduğu, T hücre gelişimi sırasında Notch1 ifadesi ve sinyalleşmesinin PHF6 ifadesine bağlı olduğu çalışmanın sonuçlarında bildirilmiştir (Loontjens ve ark., 2020). Bu çalışmalar ışığında Notch1 ve PHF6 arasında T-ALL patolojisi açısından linkaj olabileceği söylenebilir.

PhosphoSite veri tabanına göre (Şekil 2.5) PHF6 protein dizisinde RDRS199 dizisinin fosforilasyonu metastatik potansiyel ile ilişkilendirilmiştir (PhosphoSitePlus v6.5.7, 2019). Ancak veritabanına göre bu ilişki T-ALL ile çalışılmamıştır.

Protein Information	Site Table	Upstream	Downstream	Cancer	Conservation
Treatment:					
anti-CD3			S138-p , S145-p , S155-p		
AZD1152			S138-p , S145-p		
BI2536			S158-p		
BI_4834			S145-p , S155-p		
ionizing_radiation			S120-p		
metastatic potential			S154-p , S155-p , S199-p , S204-p		
MLN8054			S155-p , S158-p		
nocodazole			S145-p , S206-p , T208-p		
UV			S120-p		
ZM447439			S138-p , S145-p		

T187-p	RstssHGtDEMESsa	0	3	T187	RSTSSHGTDETESS	T187	RSTSSHGTDEMES	
S193-p	GtDEMESsyyRDRsP	0	1	S193	GTDETESSSYRDRsP	S193	GTDEMESSSYRDR	
S194-p	tDEMESsyyRDRsPH	0	1	S194	TDETESSSYRDRsPH	S194	TDEMESSSYRDRs	
Y195-p	DEMESsyyRDRsPHR	0	1	Y195	DETESSSYRDRsPHR	Y195	DEMESSSYRDRsP	
S199-p	SsyyRDRsPHRPs	Upstream	0	27	S199-p	SSSYRDRsPHRSSPN	S199-p	SSSYRDRsPHRSS
S203-p	RDRsPHRssPsDtRP	0	5	S203	RDRsPHRSSPNDTRP	S203	RDRsPHRSSPNDT	
S204-p	DRsPHRssPsDtRPk	Upstream	0	12	S204	DRsPHRSSPNDTRPK	S204	DRsPHRSSPNDTR
S206-p	sPHRssPsDtRPkCG	Upstream	0	2	N206	sPHRSSPNDTRPKCG	N206	sPHRSSPNDTRPK
T208-p	HRssPsDtRPkCGFC	Upstream	0	1	T208	HRSSPNDTRPKCGFC	T208	HRSSPNDTRPKCG
K211-ub	sPsDtRPkCGFCHVG	0	1	K211	SPNDTRPKCGFCHVG	K211	SPNDTRPKCGFCH	
K227-ac	EENEARGkLHIFNAK	0	2	K227	EENEARGKLHIFNAK	K227	EENEARGKLHIFN	
K227-ub	EENEARGkLHIFNAK	0	3	K227	EENEARGKLHIFNAK	K227	EENEARGKLHIFN	
K227-sm	EENEARGkLHIFNAK	0	1	K227	EENEARGKLHIFNAK	K227	EENEARGKLHIFN	
K234-ub	kLHIFNAKAAAHYK	0	1	K234	KLHIFNAKAAAHYK	K234	KLHIFNAKAAAHH	

Şekil 2.5: PHF6 post-translasyonel modifikasyonları

Bu motifin evrimsel süreçte korunmuş oluşu önemli bir fonksiyona sahip olduğunu düşündürmektedir (Şekil 2.6).

Human PHF6	SSYRDR <u>S</u> PHRSSPSDTR
Mouse PHF6	SSYRDR <u>S</u> PHRSSPNDTR
Rat PHF6	SSYRDR <u>S</u> PHRSSPNDTR
Xenopus PHF6	SSSRDR <u>S</u> PHRSSPSDTR
Chicken PHF6	SSYRDR <u>S</u> PHRSSPSDTK
Zebrafish PHF6	SSHRDR <u>S</u> PLRGSPGDSG

Şekil 2.6: PHF6 proteininde korunmuş fosforilasyon dizisi

2013 yılında PHF6'nın, transkripsiyonel uzamada görevli PAF1 (Polymerase Associated Factor I) kompleksi aracılı beyin dokusunda nöronal migrasyon ve olgunlaşmayı sağladığı gösterilmiştir (Zhang ve ark, 2013). Ayrıca yapılan doktora tez çalışmasında hedef fosforilasyon bölgemiz olan S199'un, nöronal maturasyon ve migrasyon sürecinde görev alan Cdk5 (cyclin dependent kinase 5) tarafından fosforile edildiği in vitro kinaz yöntemiyle gösterilmiştir (Zhang ve ark, 2013). Ayrıca hepatoselüler karsinomada hücreleri mikroRNA aracılı ya da baskılanarak proliferasyon ve migrasyona yönlendirdiği (Yu ve ark., 2019; Yu ve ark., 2020) gösterilmiş ancak ALL'de migrasyona yönlendirdiği veya yönlendirmediği ile ilgili bir bilgiye rastlanılmamıştır.

Bir meta-analiz çalışması sonucunda T-ALL'de PHF6'nın genellikle inaktif halde olduğu bildirilmiştir. Bu sonuçla birlikte PHF6'nın T-ALL'de tümör baskılayıcı rolü olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte en düşük ifadesinin baş-boyun kanserlerinde olduğu ve fonksiyon kaybı mutasyonlarının en çok lenfoid ve hematopoietik kanserlerde görüldüğü bildirilmiştir (Hajjari ve ark., 2016). PHF6 aktivitesinin dokuya özgü olduğu hipotezi bu meta-analiz ile desteklenmiştir. T-ALL'de PHF6'nın somatik fonksiyon kaybı mutasyonları %30 oranında görülmekte olup (Xiao ve ark., 2018) erkeklerde kadınlardan 3 kat daha sık görüldüğü tespit edilmiştir (Van Vlierberghe ve ark., 2010). PHF6'nın T-ALL'de tümör baskılayıcı özelliğini kaybetmesine nokta mutasyonlarının sebep olduğu ve proteinin güdük formunun ise yanlış anlamlı veya anlamsız mutasyonlarla oluştuğu bilinmektedir (Holmfeldt ve ark., 2010). PHF6'nın R274X, Q270X, S176fs, K279fs, N262fs mutasyonları nedeniyle fonksiyon kaybına uğradığı

gösterilmiştir (Wang ve ark., 2011). Bildirilen bu mutasyonlar PHF6 proteininin ePHD bölgesinin *upstream'inde* oluşarak protein kaybıyla sonuçlanır. ePHD bölgesinde bu kadar sık mutasyon olması T-ALL'de bu bölgenin ve *upstream* alanının tümör baskılamadaki önemini göstermektedir. Ayrıca DNA hasarı esnasında G2/M safhasında fosforilasyonla düzenlenen protein (Holmfeldt ve ark., 2010; Wang ve ark., 2013) olarak fonksiyon gösteren PHF6'da, T-ALL'de yüksek oranda fonksiyon kaybı mutasyonu tespit edilmiştir. Ancak PHF6'nın T-ALL gelişiminde nasıl bir moleküler rol oynadığı belirsizliğini korumaktadır (Chiaretti ve ark., 2014; Girardi ve De Keersmaecker, 2015; Xiao ve ark., 2018).



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü

In vitro hücre kültürü çalışmalarında DND-41 (DSMZ, ACC525) hücre hattı kullanıldı. PHF6 gen ifadesinin bulunmadığı (Van Vlierberghe ve ark., 2010), 13 yaşındaki T-ALL'li bireyin periferik kanından izole edilen DND-41 hücrelerinde CDKN2B (p15INK4B) ve CDKN2A (p16INK4A) delesyonları ile TP53 (p53) mutasyonu da bulunmaktadır. Hücrelerin tamamı içerisine L-glutamin (Sigma, 25030024), esansiyel olmayan amino asitler, sodyum pirüvat (Thermo, 11360070), %10 Fetal Dana Serum (Invitrogen, 10270106) ve %1 Penisilin/Streptomisin (Invitrogen, 15140-122) eklenmiş RPMI-1640 (Invitrogen, 21875-034) besiyeri kullanıldı. FBS besiyerine eklenmeden önce ısı ile inaktive edildi. Hücreler %5 CO₂'lik atmosfer, %95 nem ve 37°C'lik inkübatörde (Shel Lab) çoğaltıldı. Hücre hattının katalogunda belirtilen çoğalma süresi 35 saattir. Yapılmaya devam edilen deneylerinde hücre pasaj sayısı arttıkça hücre çoğalması yavaşlamaya ve morfolojisi değişmeye başlamıştır (Hughes ve ark., 2007; Krampe ve Al-Rubeai, 2010). Bazı hücrelerin küme görünümünü aldığı gözlemlendi. Hücrelerin bu davranışı hücre içi apoptotik sinyal yollarının aktive edildiği durumlarda ortaya çıkmaktadır. Çalışmanın devam edebilmesi amacıyla yurtiçinden temin edilen DND-41 hücre hattında da hücrelerin sağlıklı çoğalma göstermeyerek, istenilen hücre sayısına ulaşamadığı tespit edildi. Bu koşullarda deney prosedürüne uygun hücre hattı bulunmadığı için oluşturulan mutant vektörlerin bu hücrelerin migrasyonu üzerine etkisi değerlendirilememiştir. PHF6 antikörünün kontrolü için kullanılan ve PHF6 geninin ifadesinin bulunduğu 293T hücrelerinin DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) besiyerlerinde pasajlanması amacıyla 3 kez 1ml 1xPBS ile yıkandıktan sonra 1ml soğuk tripsin enzimi (Invitrogen, 25300054) 1dk hücrelere muamele edilerek kullanıldı.

DND-41 hücrelerinin pasajlanması için hücreler besiyeri ile birlikte 15ml'lik falkona alınarak 200g x 5dk santrifüjlendi. Besiyeri uzaklaştırılarak hücre peleti %10 FBS içeren RPMI-1640 ile süspansiyon edilerek T75 flaska (Greiner Bio-One, 658175) aktarıldı. DND-41 hücrelerinin sayımında, hücre içi proteinlere bağlanarak mavimsi renk veren trypan

mavisi kullanıldı. Böylece boyanmamış canlı hücreler ile mavi renkli boyanmış ölü hücrelerin ayrıştırılması sağlandı.

3.2. Solüsyon ve Tamponlar

1) Luria Bertani (LB) Broth: Mikrobiyal sıvı besiyeri %2,5'lük olacak şekilde hazırlandı. 1L dH₂O'ya 25gr LB Broth tozu eklendi. Otoklav cihazında 121°C'de 15 dakika 1 atm basınç altında sterilize edildi. +4°C'de soğutucuda saklandı.

2) LB Agar: Mikrobiyal katı besiyeri %2,5'lük olacak şekilde hazırlandı. 1L dH₂O'ya 25gr Agarlı LB Broth (Lennox) tozu eklendi. Otoklav cihazında 121°C'de 15 dakika 1 atm basınç altında sterilize edildi. LB Agar 45-50°C'ye soğuduğunda 100mg/ml ampisilin antibiyotik 1/1000 oranında eklendi ve mikrobiyolojik plakalara eşit hacimde dağıtıldı. Donması beklendi. +4°C'de soğutucuda ters çevirilerek saklandı.

3) 1M Tris-HCl (pH:8.0): 12.11gr Tris Base, 80ml bdH₂O ile çözdürüldü. pH:8.0'a HCl ile ayarlandıktan sonra hacim 100ml'ye bdH₂O ile tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

4) 100mM Tris-HCl (pH:7,4): 5ml 1M Tris-HCl üzerine 20ml bdH₂O eklenerek pH:7.4'e ayarlandı. Hacim 50ml'ye bdH₂O ile tamamlandı.

5) 50mM CaCl₂ /10mM Tris-HCl (pH:7.4): 1,39gr CaCl₂ 150ml bdH₂O'da çözdürüldü ve üzerine 25ml 100mM Tris-HCl eklendi. Hacim 250ml'ye bdH₂O ile tamamlandı. 0,22µm porlu filtreden (Millipore, SLGP033RS) geçirildi.

6) 10XTE (Tris-EDTA) Tamponu: 1ml 1M Tris-HCl (pH:8.00)'e 200µl 0,5M EDTA tamponu eklenerek hacim 10ml'ye bdH₂O ile tamamlandı. 0,22µm porlu filtreden geçirildi ve oda sıcaklığında saklandı.

7) 1XTE Tamponu (Elüsyon Tamponu): 1ml 10XTE tamponuna 9ml steril dH₂O eklenerek DNA ve primerlerin uzun süre saklanmasında tampon olarak kullanıldı.

- 8) Resuspansiyon Tamponu: 10ml 1M Tris-HCl (pH:8.0) üzerine 2ml 0,5M EDTA ve son konsantrasyonu 100µg/ml olacak şekilde RNaz A eklendi ve hacim 100ml'ye dH₂O ile tamamlandı. 0,22µm porlu filtreden geçirildi ve +4°C'de soğutucuda saklandı.
- 9) Parçalama Tamponu: 2ml 10M NaOH üzerine 10ml %10 SDS ilave edildi ve hacim 100ml'ye dH₂O ile tamamlandı. 0,22µm porlu filtreden geçirildi ve +4°C'de soğutucuda saklandı.
- 10) Nötralizasyon (Çökeltme) Tamponu: 60ml 5M KAc üzerine 11,5ml glasiyel asetik asit eklendi ve hacim 100ml'ye dH₂O ile tamamlandı. 0,22µm porlu filtreden geçirildi ve +4°C'de soğutucuda saklandı.
- 11) Yıkama Tamponu: 70ml %96 Etanol 100ml'ye dH₂O ile tamamlanarak %70'lik yıkama tamponu elde edildi. -20°C'de saklandı.
- 12) 10X TBE (Tris-Borate-EDTA) Agaroz Jel Elektroforez Tamponu: 108gr Tris Base, 55gr Borik Asit ve 40ml 0,5M EDTA (pH:8.0) karıştırılıp, hacim dH₂O ile 1 litreye tamamlandı. Oda sıcaklığında ışık görmeyen yerde saklandı.
- 13) 1X TBE Agaroz Jel Elektroforez Tamponu: 100ml 10X TBE tamponundan alınıp hacim 900ml dH₂O ile 1 litreye tamamlandı. Kullanmadan önce taze hazırlandı.
- 14) Stok BSA (10mg/ml): 10ml steril dH₂O'da 100mg BSA çözdürüldü. 0,22µm porlu filtrelerden geçirildi. -20°C'de soğutucuda saklandı.
- 15) SDS Yükleme Tamponu (2X Laemmli Tamponu): Son konsantrasyonları 0.125M Tris-HCl (pH:6.8), %6 SDS, %20 gliserol ve %10 β-Merkaptoetanol (Merck, 8057400250) (kullanmadan önce taze eklendi) üzerine yaklaşık 2µg bromofenol mavisi eklendi. 0,22µm porlu filtreden geçirilerek alikotlandı ve -20°C'de saklandı.
- 16) Triton-X Lizis Tamponu: Kimyasallar ve son konsantrasyonları 100mM Sodyum Florür (Sigma, 201154), 50mM HEPES, 150mM Sodyum Klorür, %10 gliserol, %1,2 Triton-X100, 1mM Magnezyum Klorür, 1mM EGTA, 1mM Sodyum-o-vanadate ve 1X proteaz inhibitör kokteyli (Thermo Scientific™, A32955) olacak şekilde tampon hazırlandı ve pH: 7,4'e ayarlandı. -20°C'de soğutucuda saklandı.

- 17) 10X PBS (Phosphate Buffered Saline): 80gr NaCl₂, 2gr KCl₂, 14.4gr Na₂HPO₄ (dibazik anhidrat), 2.4gr KH₂PO₄ (monobazik anhidrat) HCl ile pH:7.4'e ayarlanıp hacim dH₂O ile 1 litreye tamamlandı. Otoklavlanarak sterilize edildi. Oda sıcaklığında saklandı.
- 18) 1X PBS: 100ml 10X PBS tamponundan alınıp hacim 900ml bdH₂O ile 1 litreye tamamlandı. Otoklavlanarak sterilize edildi. Oda sıcaklığında saklandı.
- 19) 1X PBS-T: 100ml 10X PBS üzerine 1ml Tween-20 eklendi ve 1 litreye dH₂O ile tamamlandı.
- 20) %10 SDS: 10gr Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) 100ml bdH₂O ile çözdürüldü. 0,22µm'lik porlu filtreden geçirildi. Oda sıcaklığında saklandı.
- 21) Bloklama Tamponu (%1 BSA): 1gr Bovine-Serum-Albumin (BSA), 100ml 1X PBS-T içinde çözüldü ve filtre kağıdından geçirildi. Kullanmadan önce taze hazırlandı.
- 22) 10X Yürütme Tamponu (Western Blotlama): 15gr Tris Base, 94gr glisin 900ml dH₂O suda çözüldü ve üzerine 50ml %10 SDS eklendi. Hacim 1 litreye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.
- 23) Ayırıştırma (Resolving) Tamponu: 1L tampon solüsyon için, 181,64gr Tris Base (1,5M) 700ml dH₂O'da çözümlenerek pH:8.8'e ayarlandı. Hacim 1 litreye tamamlandı. +4°C'de saklandı.
- 24) Hizalama (Stacking) Tamponu: 1litre tampon solüsyon için, 60,5gr Tris Base (0,5M) 700ml dH₂O'da çözümlenerek pH:6.8'e ayarlandı. Hacim 1 litreye tamamlandı. +4°C'de saklandı.
- 25) Transfer Tamponu (Western Blotlama): 1 litre tampon solüsyon için 3,75g Glisin, 7,25g Tris Base bdH₂O'da çözüldü. 250 ml metanol (Merck, 1060092511) eklendi. Kullanmadan önce taze hazırlandı ve +4°C'de soğukta bekletildi.
- 26) %10 APS: 0,1gr Amonyum Persülfat (APS) (Sigma, A3678) 1ml bdH₂O içerisinde çözdürüldü. Kullanmadan önce taze hazırlandı.

27) MTT (5mg/ml): 0,05gr MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), 10ml steril 1X PBS içerisinde alüminyum folyo kaplı tüpte ışık görmeyecek şekilde çözdürüldü ve steril kabinde 0,22µm porlu filtreden geçirildi. Kullanmadan önce taze hazırlandı.

28) Akrlamid/Bisakrlamid (29:08): 145g Akrlamid (CHEMSOLUTE, 9912.0500), 4g Bisakrlamid (Sigma, M7256-25G) tartılarak 500ml bdH₂O ile çözdürüldü. 0,22µm'lik porlu filtreden geçirildi. +4°C'de alüminyum folyo kaplı şişede ve soğukta saklandı.

29) Western Blotlama PVDF Membran Görüntülemesi: PVDF membran Western Bright ECL-HRP Substrate (Advansta, K-12045-D50) ile HRP ışıması sağlandı.

30) Western Blotlama Film Görüntülemesi: 350ml Developer (ILFORD PQ UNIVERSAL, 1155091, 1155082) 650ml su ile karıştırılarak alüminyum folyo kaplı şişede ışık görmeyecek şekilde saklandı. 300ml Fixer (ILFORD PQ UNIVERSAL, 1984262, 1984253) 700ml su ile karıştırılarak alüminyum folyo kaplı şişede ışık görmeyecek şekilde saklandı. Film görüntülemede X-ray filmi önce Developer solüsyonu daha sonra Fixer solüsyonunda gerektiği kadar bekletilerek bant görüntülemesi yapıldı.

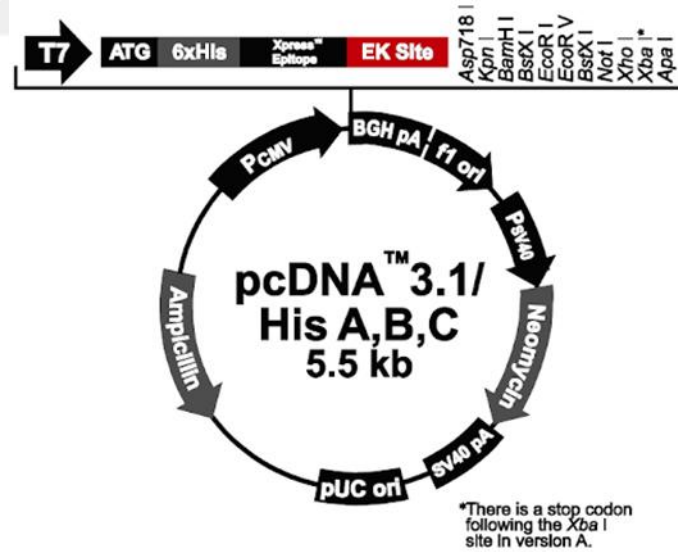
31) Antikorlar ve Belirteçler: Western blotlamada anti-PHF6 primer antikoru (St John's Laboratory, STJ29530) ve anti-rabbit-HRP sekonder antikoru (Advansta, R-05072-500), Notch1 primer antikoru (Cell Signalling Technology (D6F11), 4380S), GAPDH (Cell Signalling Technology, sc-47724) ve anti-mouse-HRP sekonder antikor (KPL, 474-1806) kullanıldı. Deneylerde gerektiği kadar %1 BSA ile sulandırılarak kullanıldı. Proteinin boyutsal doğrulanması için Opti Protein XL Marker (G266) kullanıldı. -20°C'de soğutucuda saklandı.

32) RIPA Tamponu: Hücre lizatı toplamada kullanılan RIPA tamponu (Sigma, R0278) 10ml'si içine 1 adet proteaz inhibitör tableti (Thermo Scientific, A32955) koyularak -20°C'de soğutucuda saklandı.

33) 3M Sodyum Asetat (NaAc) pH:5.2: 40,8gr NaAc 70ml dH₂O içerisinde çözdürüldü. Glasiyel asetik asitle pH:5.2'ye ayarlandı ve hacim 100ml'ye dH₂O ile tamamlandı. 0,22µm porlu filtreden geçirilerek 1ml'lik ependorf tüplere alıktlandı. - 20°C'de soğutucuda saklandı.

3.3. pcDNA3.1 İnsan PHF6 Memeli İfade Vektörünün Klonlanması ve Filtre Kağıdından Ayırılması

PHF6 proteininin 199. pozisyonundaki Serin aminoasitinin Alanin (A) ve Aspartik Asit (D) aminoasitlerine çevirilebilmesi amacıyla 1095bp'lik insan PHF6 cDNA'sının 5.5kb'lik pcDNA3.1A plazmit vektörüne aktarılması çalışılmıştır. Ticari olarak satılan bu plazmidler çoklu klonlama bölgeleri (multiple cloning sites-MCS) içerirler. Bu klonlama bölgeleri, DNA'yı kesen restriksiyon endonükleazlar (restriksiyon enzimleri) tarafından tanınan spesifik dizileri içerir (Şekil 3.1). PHF6 cDNA'sı bu klonlama bölgesinden BamHI enzim kesim bölgesi yardımıyla aktarıldı.



Şekil 3.1. Memeli ifade vektörü pcDNA3.1A'nın şematik gösterimi

pcDNA3.1 insan PHF6 memeli ifade vektörü Altay Therapeutics Inc. Kurucu ve CEO'su Dr. Ali Rayet Özeş ve Prof. Dr. Osman Nidai Özeş tarafından BamHI ile pcDNA3.1(A) vektörüne klonlanıp filtre kağıdına emdirilerek temin edilmiştir. PHF6 ifade vektörü, 200µl 1xTE tamponu içerisinde vortekslenerek filtre kağıdından

ayrıştırılması sağlandı. Şekil 3.2’de klonlama deneyinde kullanılan PHF6 cDNA dizisi verilmiştir. Klonlama işlemi şu şekilde yapıldı; 3 bazlık durdurma kodonu klonlaması yapılacak dizi içerisine alınmadığı için 1095 bp’lik insan PHF6 cDNA’sının PCR yöntemiyle çoğaltılması için kullanılan PHF6’ya özgül klonlama primerleri (Invitrogen, 10629012) aşağıda yazıldığı gibidir. Altı çizili diziler BamHI enzim kesim bölgesidir.

İleri primer dizisi 5'-CGC G^AGA TCC GCC GCC ATG TCA AGC TCA GTT GAA CAG AAA AAA GGG-3'

Geri primer dizisi 5'-CGC G^AGA TCC GTT TCC ATT AAG TTG CTG CTG AGT TAG TTG-3'

Çoğaltılan PHF6 cDNA’sının BamHI enzim kesim noktasından pcDNA3.1A vektörüne insert edilebilerek klonlanması için insert ve vektör BamHI restriksiyon enzimiyle (Thermo Scientific, FD0054) kesilerek fenol:kloroform:izoamilalkol (25:24:10 v/v) ile saflaştırılması gerçekleştirildi. BamHI enzim kesiminin ardından yapışkan uç oluşturan vektörün 5’ terminali vektörün yalnızca ligasyon yapıldığında kapanması amacıyla alkalın fosfataz (CIP) ile defosforile edilerek fenol:kloroform:izoamilalkol ile çöktürme yöntemiyle temizlenmesi sağlandı. Doğrulama için %1 agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. Ligasyon işlemi için vektör ve insert T4 DNA Ligaz kiti (NEB, B0202S) ile klonlandı. Hazırlanan reaksiyon 16°C’de geceboyu inkübasyona bırakıldı. Klonlamanın doğrulanması %1 agaroz jel elektroforezi ile gerçekleştirildi. Doğrulan vektör bakteriyel transformasyon ile çoğaltılarak ileriki deneylerde kullanılmak amacıyla -20°C’de soğutucuda saklandı.

3.4. İnsan PHF6 Yabanıl Tip Vektörünün E. Coli DH5α Suşuna Isı Şokuyla Transformasyonu

Plazmid vektörünün çoğaltılabilmesi için öncelikle vektörlerin, E. coli DH5α suşuna ısı şokuyla transformasyonu gerçekleştirilmiştir. Transformasyonu gerçekleştirmek için bakteriler, plazmid vektörünü hücre içine alabilecek kompetan haline getirildi. Yapılan tüm işlemler bunzen beki alevi etrafında çalışılmıştır.

ATGTCAAG CTCAGTTGAA CAGAAAAAAG GGCCTACAAG ACAGCGCAAA
 TGTGGCTTTT GTAAGTCAAA TAGAGACAAG GAATGTGGAC AGTTACTAAT
 ATCTGAAAAC CAGAAGGTGG CAGCGCACCA TAAGTGCATG CTCTTTTCAT
 CTGCTTTGGT ATCATCACAC TCTGATAATG AAAGTCTTGG TGGATTTTCT
 ATTGAAGATG TCCAAAAGGA AATTTAAAAGA GGCACGAAGC TGATGTGTTT
 TTTGTGCCAT TGTCCCTGGAG CAACAATTGG TTGTGATGTG AAAACATGTC
 ACAGGACATA CCACTACCAC TGTGCATTGC ATGATAAAGC TCAAATACGA
 GAGAAACCTT CACAAGGAAT TTAC**ATGGTC TATTGCCGAA AACACAAGAA**
AACTGCACCAT AACTCCGAAG CTGATTTAGA AGAAAGTTTT AATGAACATG
 AACTGGAGCC CTCATCACCT AAAAGTAAAA AGAAAAGTCG CAAAGGAAGG
 CCAAGAAAAA CTAATTTTAA AGGGCTGTCA GAAGATACCA GGTCCACATC
 CTCCCATGGA ACAGATGAAA TGGAAAGTAG TTCCTATAGA GATAGG**TCTC**
 CACACAGAAG CAGCCCTAGT GACACCAGGC CTAATGTGG ATTT**TGCCAT**
GTAGGGGAGG AAGAAAATGA AGCACGAGGGA AACTGCATA TATTTAATGC
 CAAGAAGGCA GCTGCCCATTA ATAAGTGCAT GTTGTTTTCT TCTGGCACAG
 TCCAGCTCAC AACAAACATCA AGAGCAGAAT TTGGAGACTT TGATATTAAA
 ACTGTACTTC AGGAGATTAA ACGAGGAAAA AGAATGAAAT GTACACTTTG
 CAGTCAGCCT GGTGCTACTA TTGGATGTGA AATAAAAGCC TGTGTTAAGA
 CTTACCATTA CCACTGTGGA GTACAAGACA AAGCTAAATA CATTGAAAAT
 ATGTCACGAG GAATTTACAA ACTATACTGT AAAAATCATA GTGGAAATGA
 TGAGAGAGAT GAAGAAGATG AGGAACGAGA GAGTAAAAGC CGAGGAAAAG
 TAGAAATTGA TCAGCAACAA CTAACTCAGC AGCAACTTAA TGGAAACTAG

Şekil 3.2. İnsan PHF6 cDNA dizisi. Sarı ile işaretli ATG dizisi başlangıç kodonu olan Metiyonin (M) aminoasitini göstermektedir. Altı çizili diziler PHF6 genini plazmid vektörüne klonlama için kullanılan primer dizilerini (sırasıyla ileri ve geri) göstermektedir. Kırmızı ile işaretli alan 199. pozisyonadaki Serin (S) aminoasitini göstermektedir.

3.4.1. Kompetan Hücrelerin Hazırlanması

- 1) Daha önceden -80°C’de donmuş halde bulunup içerisindeki bakteri yoğunluğu O.D.600 =0,2-0,5 aralığında olan E. coli DH5α kompetan hücre buz üzerinde yavaşça erimeye bırakıldı.
- 2) 10ml antibiyotik içermeyen LB besiyerine 20µl kompetan hücre eklendi ve 37°C’de etüvde (Thermo Scientific-Heraeus) hafifçe çalkalanarak gece boyu inkübasyona bırakıldı.

- 3) İnkübasyon süresi sonunda çoğaltılan bakterilerden 1-2ml alınarak 200ml antibiyotiksiz LB besiyerine eklendi.
- 4) 37°C’de etüvde hafifçe çalkalanarak 4 saat inkübasyona bırakıldı.
- 5) Optik dansitesi 0,2-0,5 aralığına ulaşan 600nm dalga boyundaki bakteriler 10 dakika buzda inkübe edilerek soğutuldu.
- 6) 50ml’lik falkon tüplere bölündü.
- 7) Bakteriler 2000rpm’de +4°C’de 5 dakika santrifüj (Beckman-Coulter Allegra) edildi.
- 8) Süpernatant atıldı ve pelet üzerine 25ml 50mM CaCl₂/10mM Tris (pH:7.4) soğuk olarak eklendi. Hafifçe pipetaj yapıldı.
- 9) 15 dakika buzda inkübasyona bırakıldı.
- 10) 2000rpm’de +4°C’de 5 dakika santrifüj edildi.
- 11) Süpernatant atılarak pelet üzerine her bir falkona 9ml 50mM CaCl₂/10mM Tris (pH:7.4) ve 1ml saf gliserol eklenerek homojenize edildi.
- 12) Önceden buz üzerinde hazırlanan 1,5ml’lik ependorf tüplerine 100µl’şer alikotlanarak -80°C’de soğutucuda saklandı.

3.4.2. Isı Şokuyla Transformasyon

- 1) Hazırlanan E. coli DH5α kompetan hücrelerin 1 tüpü ile transforme edilecek 1:10 dilue edilmiş plazmid DNA’sı buz üzerinde yavaşça çözülmeye bırakıldı.
- 2) 50µl DH5α kompetan hücre ve 10-50ng plazmid DNA’sı steril ependorf içerisinde 30 dakika buzda inkübe edildi.
- 3) Su banyosunda 1 dakika 42°C’de ısı şoku uygulandı ve hemen ardından 2 dakika buzda bekletildi.

4) 900µl antibiyotiksiz LB besiyeri eklenip 37°C'de etüvde 1 saat yatay çalkalanacak şekilde inkübasyona bırakıldı.

5) a. LB katı besiyerine (katı agar) ekim: 1 saatin sonunda bakterilerden 150-300µl'si içerisinde 100µl/ml Ampisilin antibiyotiği bulunan katı agar plakalara steril öze yardımıyla yayılarak ekim gerçekleştirildi. Plakalar ters çevrilerek 37°C'de etüvde gece boyu inkübasyona bırakıldı.

b. LB sıvı besiyerine ekim (mini kültür): 1 saatin sonunda bakteriler 3ml LB sıvı besiyerine ekildi ve besiyerine 100µl/ml Ampisilin konsantrasyonunda antibiyotik eklenerek 37°C'de etüvde gece boyu inkübasyona bırakıldı.

6) a. Ertesi gün çoğalan kolonilerden tek koloni seçimi yapılarak LB sıvı besiyerinde 37°C'de etüvde gece boyu inkübasyona bırakılarak çoğaltıldı. Çoğalan bakterilerden %16,5 gliserol içeren bakteri stoğu hazırlanarak daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere -80°C'de kriyo tüp içinde muhafaza edildi. Süre sonunda bakteriler +4°C'de 4500rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pelet plazmid izolasyonunda kullanıldı.

b. Mini kültür kurulan bakteriler +4°C'de 4500rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Pelet plazmid izolasyonunda kullanıldı.

3.5. Plazmid İzolasyonu

1. 1,5ml bakteri kültürü 2 dakika 10.000rpm'de santrifüj edildi.

2. Süpernatant atıldı. Pelet üzerine 200µl resuspansiyon tamponu eklenerek vortekslendi. Pelet homojenize edildi.

3. 250µl parçalama tamponu eklenerek tüp yavaşça 10 kez alt-üst edildi. Temiz ve visköz bir görüntü elde edildi.

4. Ardından 350µl nötralizasyon tamponu eklendi ve tüp 10 kez yavaşça alt-üst edilerek presipitat oluşması beklendi.

5. +4°C’de 10.000rpm’de 10 dakika santrifüj edildi.
6. Süpernatant dikkatlice temiz bir tüpe transfer edildi. Üzerine 700µl 2-propanol eklendi.
7. 15 dakika -20°C’de inkübasyona bırakıldı.
8. Süre sonunda içerik spin kolona alındı ve 1 dakika 7000rpm’de santrifüj edildi.
9. Kolona 400µl soğutulmuş yıkama tamponu eklendi ve 1 dakika 7000rpm’de santrifüj edildi. Bu aşama 2 kez tekrar edildi.
10. Boş kolon 2 dakika 10.000rpm’de santrifüj edildi.
11. Kolon, temiz ependorfa yerleştirildi ve kolonda kalan plazmid DNA’sının kolondan ayrıştırılması için kolonun tam ortasına 50µl elüsyon tamponu eklenerek 1 dakika 10.000rpm’de santrifüj edildi.
12. Ependorf içerisinde toplanan plazmid DNA konsantrasyonu µDrop Plate spektrofotometrede (Thermo Scientific, Multiskan GO Microplate Spectrophotometer) ölçüldü. Ayrıca plazmidin bant boyu, izolasyon işleminin başarılı olup olmadığının ve yapısal hasar olup olmadığının kontrolü için agaroz jel elektroforezi uygulandı.

3.6. PHF6 Geninin PCR Yöntemi ile Çoğaltılması

PCR analizleri için ABI GeneAmp PCR System 9700 ve Blue-Ray Biotech TurboCycler Lite marka ısı döngü cihazları kullanıldı. Amplifikasyon ürünlerinin yaklaşık boyutları agaroz jel elektroforeziyle ölçüldü.

3.6.1. PCR Reaksiyon İçeriği ve Şartları

pcDNA3.1A vektörüne klonlanan PHF6 plazmid dizisinin kontrolünün yapılabilmesi için klonlamada kullanılan primer çifti kullanıldı. Dizayn edilen ileri primer dizisi 5'-CGCGGATCCGCCCATGTCAAGCTCAGTTGAACAGAAAAAAGGG-3', geri primer dizisi ise 5'-CGCGGATCCGTTTCCATTAAGTTGCTGCTGAGTTAGTTG-3'. PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasalların içeriği ve miktarları şu şekildedir; 1X PCR

Reaksiyon tamponu (ThermoScientific), 0,2µM ileri primer, 0,2µM geri primer, 200µM dNTP, 1 ünite Dream Taq Polimeraz (ThermoScientific), 100ng plazmid DNA ve steril H₂O. PCR amplifikasyon şartları; 95°C'de 3' ön denatürasyon yapıldı ve 30 döngü ise 95°C'de 30'', 70°C'de 30'', 72°C'de 1' yapıldı ardından 15 döngü 95°C'de 30'', 58°C'de 30'', 72°C'de 1' yapıldı, son uzama evresi 72°C'de 15' uygulandı.

3.7. Agaroz Jel Elektforezi ve Görüntüleme Sistemi

3.7.1. %2'lik Agaroz Jelin Hazırlanması

2gr agaroz tartılarak 100 ml 1X TBE'de mikrodalgada ısıtılarak çözüldü. 50-55°C'ye gelene kadar soğuması beklendi ve ardından son konsantrasyonu 0.5µg/ml olacak şekilde etidyum bromür ilave edildi. Elektforez küvetine taraklar yerleştirildikten sonra hazırlanan solüsyon agaroz jel elektforez küvetine döküldü. Oda sıcaklığında 15-20 dakika agaroz jelin polimerize olması için beklendi. Polimerizasyon gerçekleşikten sonra taraklar jelden çıkarılarak içerisinde 1X TBE bulunan elektforez tankına yerleştirildi.

3.7.2. Agaroz Jelin Yürütülmesi ve Görüntülenmesi

PCR ürünü ve SM#1333 belirteci ve 1100bp bandını gösteren belirteçler (marker), DNA yükleme tamponu kullanılarak kuyucuklara yüklendi. Elektforez tankına bağlı güç kaynağı ile 120 voltta 60 dakika yürütüldü. Örnekler UV ışık veren transilluminatör yardımıyla incelendi. Vü (Pop-bio) jel görüntüleme sistemine bağlı olan monitörlü sistem kullanılarak fotoğraflar alındı.

3.8. PCR Amplikonlarının NaAc/Etanol Presipitasyonu ile Pürifikasyonu

Amplifikasyon ürünlerinin reaksiyon sonrasında amplikon dışı kimyasal bileşenlerden uzaklaştırılması amacıyla sodyum asetat (NaAc)/Etanol presipitasyonu ile ürün saflaştırma yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Pürifikasyon ürünleri agaroz jelle yüklenerek ürün kontrolü yapıldı. Kısaca yöntem aşağıda belirtildiği şekilde uygulandı:

1. 2µl 3M NaAc (pH:5.2) PCR ürünlerinin üzerine eklendi.

2. 1-2 kez homojenize edildikten sonra 1,5ml'lik ependorf tüpe aktarıldı ve üzerine 30µl %100 etanol eklendi, 2 saniye vortekslendi.
3. 30 dakika -20°C'de bekletildi.
4. 13.400rpm'de 25 dakika santrifüj edildi.
5. Dibe değmeden süpernatant alımp atıldı. 200µl %70 soğuk etanol eklendi.
6. 13.400rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.
7. Dibe değmeden süpernatant atıldı ve PCR ürünleri oda ısısında 20-25 dakika kurumaya bırakıldı.
8. Pelet 20µl steril H₂O ile çözdürüldü.

3.9. Bölgesel Yönlendirilmiş Mutagenез (SDM)

İnsan PHF6 yabanıl tip ifade vektörü üzerinde bölgesel yönlendirilmiş mutagenез (SDM) deneyi ile S199 pozisyonundaki Serin (S) amino asitinin kodonu Alanin (S199A) ve Aspartik Asit (S199D) kodonlarına çevrilmesi için PCR reaksiyonu kuruldu. Oluşturulmak istenilen mutantlar için ilgili bölgelere özgü mutagenез primer dizileri (Invitrogen, 10629012) aşağıdaki gibidir:

S199A

İleri Primer 5'-TCCTATAGAGATAGGGCTCCACACAGAAGCAGC-3'

Geri Primer 5'-GCTGCTTCTGTGTGGAGCCCTATCTCTATAGGA-3'

S199D

İleri Primer 5'-TCCTATAGAGATAGGGGATCCACACAGAAGCAGC-3'

Geri Primer 5'-GCTGCTTCTGTGTGGATCCCTATCTCTATAGGA-3'

İnsan PHF6 mutant vektörlerini oluşturmak amacıyla tasarlanan SDM deneyi için ABI GeneAmp PCR System 9700 ve Blue-Ray Biotech TurboCycler Lite marka ısı döngü

cihazları kullanıldı. PCR reaksiyonu, yukarıda verilen primer çiftleri ve Phusion High-Fidelity DNA Polimeraz (NEB, M0530L) enzim kiti kullanılarak gerçekleştirildi. PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasalların içeriği ve miktarları şu şekildeydi; 1X Phusion GC tamponu (NEB), 0,3µM ileri primer, 0,3µM geri primer, 200µM dNTP, 2 ünite Phusion DNA Polimeraz (NEB), 60ng plazmid DNA ve steril H₂O.

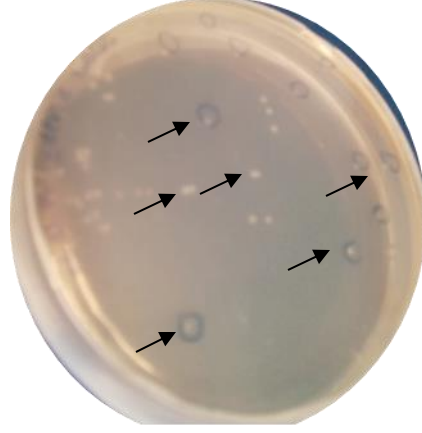
PCR amplifikasyon şartları; 95°C'de 30'', 16 döngü 95°C'de 30'', 55°C'de 1', 72°C'de 14' yapıldı, son uzama döngüsü 72°C'de 15'' ve son olarak 4°C'de ∞ uygulandı.

3.10. Mutant Plazmidlerin DpnI Enzimi ile Kesimi

E. coli'de DNA adenin metiltransferaz (Dam) enzimi tarafından GATC dizisi metillenmektedir. SDM yöntemiyle *in vitro* koşullarda çoğaltılan ampikonların ata zincirleri GATC dizisinden metillidir. Bu sebeple SDM yöntemiyle çoğaltılmış ampikonların, yalnızca metillenmiş GATC dizilerini tanıyarak kesen DpnI restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi gerçekleştirildi. Böylece reaksiyon içerisinde yalnızca istenilen mutant dizileri içeren plazmid vektörlerinin kalması sağlandı. Kısaca kesim reaksiyonu şu şekilde uygulandı; 1X Fast Digest DpnI Tamponu (Thermo Scientific, FD1704), 0,2µg DNA, 1µl Fast Digest DpnI Enzim (Thermo Scientific, FD1704) steril H₂O. Reaksiyon 25µl'de kuruldu. 15 dakika 37°C'de ısıtıcıda inkübasyona bırakıldı.

3.11. Katı Agar Plakalara Yayma ve Koloni Seçimi

Enzim kesiminden alınan ürünler 1/10 oranında steril su ile sulandırılarak ısı şoku yöntemiyle kompetan hücrelere transforme edildi. Elde edilen transformantın 150µl ve 300µl'si içerisinde 100µg/ml ampisilin bulunan katı agar plakalara steril öze yardımıyla ekimi yapıldı. Plakalar ters çevrilerek 37°C'de etüv cihazında gece boyu inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün içerisinde ampisilin direnç geni bulunan plazmid DNA'sını alan bakteri kolonilerinden çoğalan tek koloniler (Şekil 3.3), steril tip (Iso Lab, T-B-1000) (Thermo Scientific, 94300120) yardımıyla alınarak ampisilinli LB sıvı besiyerinde çoğaltıldı ve plazmid izolasyonu gerçekleştirildi.



Şekil 3.3: Katı agar plakada tek koloni görüntüsü

3.12. PHF6 Geninin PCR Yöntemiyle Çoğaltılması ve Kontrolü

İzole edilen plazmid DNA'ları doğrulamak için pcDNA3.1A vektörüne klonlanan PHF6 gen dizisini tanıyan klonlamada kullanılan primer çifti ile reaksiyon kuruldu. 50µl hacimde kurulan PCR reaksiyonunda kullanılan kimyasalların içeriği ve miktarları; 1X Dream Taq Reaksiyon tamponu (ThermoScientific), 0,3µM ileri primer, 0,3µM geri primer, 200µM dNTP, 1 ünite Dream Taq Polimeraz (ThermoScientific), 100ng plazmid DNA ve steril H₂O. PCR amplifikasyon şartları; 95°C'de 3' ön denatürasyon yapıldı ve 30 döngü ise 95°C'de 30'', 70°C'de 30'', 72°C'de 1' yapıldı ardından 15 döngü 95°C'de 30'', 58°C'de 30'', 72°C'de 1' yapıldı, son uzama evresi 72°C'de 15'' uygulandı.

Amplikonlar agaroz jel elektroforezi ile yapısal ve boyutsal olarak kontrol edildi, amplikonların doğrulaması yapıldı.

3.13. Sanger DNA Sekanslama

PHF6 gen dizilerinin doğrulanması amacıyla Sanger DNA Dizileme yöntemi uygulandı. Mutant PHF6 gen dizisini içeren plazmid vektörlerinin PCR yöntemiyle çoğaltılıp, agaroz jel ile kontrol edilmesinin ardından NaAc/Etanol yöntemiyle PCR pürifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Daha önce pürifikasyonu yapılan yabancı tip PHF6 PCR örnekleriyle birlikte SDM uygulanan PHF6 PCR örneklerine sekans reaksiyonu uygulanarak Sanger DNA sekanslama cihazına ürünler yüklenerek dizilemesi yapıldı.

3.13.1. Sekans Reaksiyonu

Sekans reaksiyonu; 1X Sekans tamponu, 3,2pmol ileri ya da geri primer, 1µl BigDye enzim, 1µl PCR ürünü ve steril H₂O koşullarında 10µl reaksiyon hacminde kuruldu. Sekans PCR amplifikasyon şartları ise şu şekildeydi; 96°C'de 1dk ön denatürasyon yapıldı ve 25 döngü ise 96°C'de 10sn, 50°C'de 5sn, 60°C'de 4dk, 4°C'de ∞ olarak uygulandı. Reaksiyon BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) ile gerçekleştirildi.

3.13.2. Sekans Pürifikasyonu

Sekans PCR'ından alınan ürünler NaAc/Etanol ürün saflaştırma yöntemiyle saflaştırıldı. Saflaştırılan ürünler alüminyum folyoya sarılarak ışık görmeyecek şekilde -20°C'de dizileme cihazına yüklenene kadar muhafaza edildi. Muhafaza süresi 1 haftayı geçmedi.

3.13.3. DNA Sekanslama Cihazına Ürünlerin Yüklenmesi ve Değerlendirilmesi

Dizilemesi yapılacak olan saflaştırılmış PCR ürünleri, MicroAmp Fast 96 kuyucuklu optik plakalara (Applied Biosystems) yüklendi ve ABI 3130xL Genetic Analyzer cihazında Sequencing Analysis programında yürütüldü. Bu sonuçlarda Adenin (A) yeşil, Guanin (G) siyah, Sitozin (C) mavi ve Timin (T) kırmızı renkli pikler ile gösterilmektedir. Bu pikler, NCBI veritabanından PHF6 cDNA referans dizisi ile karşılaştırılarak DNA dizi analizi değerlendirilmesi yapıldı.

3.14. PHF6 Protein İfadesinin Gösterilmesi İçin Western Blot Uygulanması

İzole edilen PHF6 plazmid vektörünün doğrulanması amacıyla western blotlama yöntemiyle protein işaretlemesi yapıldı.

3.14.1. Hücrelere Vektör Transfeksiyonu

DND41 hücrelerine Lipofektamin 2000 lipozom ajanıyla gerçekleştirildi. Transfeksiyon 6 kuyucuklu plakada gerçekleştirildi. PHF6 yabancı tip plazmiti kuyucukta 3µg olacak şekilde hesaplanarak 250µl serumsuz RPMI-1640 besiyerinde oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Bu inkübasyonun 2,5'inci dakikasında her kuyucukta 250µl serumsuz

RPMI-1640 içinde 8µl Lipofektamin 2000 lipozom ajanı, DNA içeren tüpe aktarıldı. Lipozom ajanının DNA'yı içine alması için birlikte 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Süre sonunda kuyucuklara eşit miktarda dağıtıldı. İnkübasyon sırasında DND-41 hücreleri thoma lamıyla sayıldı. Kuyucuk başına 1×10^6 hücre sayılarak DNA/Lipofektamin kompleksinin üzerine 500µl ekilerek ters transfeksiyon yapılmış oldu. Kontrol grubu hücelere transfeksiyon yapılmadı.

3.14.2. Hücre Lizatı Toplama

Hücre kültüründen protein lizatı toplanması amacıyla Triton-X Lizis tamponu ve RIPA tamponu kullanıldı. Bradford protein konsantrasyon tayininde her iki tamponla elde edilen protein miktarı arasında anlamlı bir farklılık görülmedi. PHF6 proteininin ifadesinin nukleusta olması sebebiyle çalışmaya RIPA tamponuyla devam edildi. RIPA tamponu (Sigma, R0278) içerisinde 150 mM sodyum klorid içeren 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, %1 Igepal CA-630 (NP-40), %0.5 sodyum deoksikolat ve %0.1 SDS bulunmaktadır. 10ml RIPA tamponunun içerisine 1 adet proteaz inhibitör kokteyli (Thermo Scientific™, A32955) eklendi. Protokol şu şekildedir; Hücreler 15ml'lik falkona aktarıldı. 450xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Supernatant atıldı. Pelete 5ml 1xPBS tamponu eklendi. 450xg'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Bu yıkama aşaması 3 kez tekrar edildi. Pelet üzerine 1ml RIPA tamponu eklenerek 20 dakika buzda inkübasyonu sağlandı. Ve hücre lizatı blotlamada kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırıldı.

3.14.3. Bradford ile Protein Konsantrasyon Tayini

Elde edilen hücre lizatında bulunan protein miktarının western blotlama jeline eşit miktarda yüklenebilmesi için, Bradford reaktif (BioRad) boyası kullanılarak artan miktarlarda hazırlanan BSA standardına karşı protein konsantrasyon tayini gerçekleştirildi. 10mg/mL konsantrasyonunda BSA solüsyonundan 1µg/µl olacak şekilde BSA solüsyonu hazırlandı. Standart eğride R^2 değerinin hesaplanabilmesi için 96 kuyucuklu plakaya 0,5, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13µg olacak şekilde 3'lü tekrarlar halinde eklendi. -80°C'deki hücre lizatları buz üzerinde eritildi ve BSA'nın koyulduğu 96 kuyucuklu plakaya üç tekrarlı olarak 1µl eklendi. Tüm örnekler spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda okundu. Değişen BSA konsantrasyonlarının okuma değerlerinin

ortalaması alınarak hazırlanan standart eğri denklemine göre elde edilen lizatların protein konsantrasyonları belirlendi.

3.15. Western Blotlama

Western blotlama için SDS-poliakrilamid jel (PAGE) hazırlandı. İncelenecek olan proteinin büyüklüğüne göre hazırlanacak jel yüzdesi belirlendi. Öncelikle ayrıştırma jeli hazırlandı. Western blot camlarının arasına TEMED eklendikten hemen sonra polimerizasyon gerçekleşmeden döküldü. Üzerine %0,1 SDS eklenerek jelin polimerize olurken açıkta kalan üst kısmının düz çizgi halinde donması sağlandı. Jel donduktan sonra SDS'i peçete yardımıyla alarak üzerine hizalama jeli döküldü. Hizalama jeli döküldükten hemen sonra polimerizasyon yaşanmadan taraklar yerleştirildi ve jelin polimerleşmesi beklendi. Jel hazırlamasında kullanılan kimyasallar ve miktarları aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: SDS-PAGE jel hazırlama miktarları

Ayrıştırma Jeli (30ml)	%7	%10	%12	Hizalama Jeli (10ml)
bdH ₂ O	15ml	11,55ml	10,5ml	6ml
Ayrıştırma Jeli	7,5ml	7,5ml	7,5ml	2,5ml hizalama tamponu
Acr:BisAcr (29:08)	7,05ml	10,5ml	12ml	1,25µl
10% SDS	300µl	300µl	300µl	100µl
10% APS (Sigma, A3678)	300µl	300µl	300µl	100µl
TEMED (Sigma, T7024)	30µl	30µl	30µl	10µl

3.15.1. Örneklerin Hazırlanması ve Jele Yüklenmesi

Bradford yöntemiyle protein miktarı belirlenerek eşitlenen örneklerin hacminin yarısı kadar 2XSDS + β -merkaptoetanol yükleme boyası konuldu ve 4 dakika 95°C’de sıcak blokta denatürasyon için bekletildi. Örnekler bu esnada 2 kez vortekslendi. Jel yüklemeye uygun pipet uçlarıyla (ExactaCruz, sc-201732), hazırlanan jele yüklendi. Örnekler hizalama jelini geçene kadar 120 voltta, ayırıştırma jelinde ise 150 voltta yürütüldü (Kullanılan Cihaz: Amersham 80-6171-96). Yürüme sonunda PVDF membrana transfer edildi.

3.15.2. PVDF Membrana Transferi

Örnekler yürütüldükten sonra ıslak transfer için kullanılacak süngerler transfer tamponuyla ıslatıldı. Transfer kasetinin negatif yüklü siyah kısmına süngerlerden biri yerleştirilerek üzerine transfer tamponunda ıslatılmış whatman kağıdı (Thermo Scientific, LSG-88620) yerleştirildi. Bunun üzerine örneklerin yürütüldüğü jel cam plakalar arasından dikkatli bir şekilde çıkarılarak kondu. Jel üzerine saf metanolde 1 dakika fikse edilmiş PVDF membran hava kabarcığı kalmayacak şekilde yerleştirildi. Üzerine transfer tamponuyla ıslatılmış whatman kağıdı ve diğer sünger konularak transfer aparatı dikkatlice kapatıldı. Bekletmeden soğuk transfer tamponuyla doldurulan transfer cihazına yerleştirildi. Örnekler gece boyu 40 voltta +4°C’de transfer edildi. Ertesi gün transfer tankı açıldı.

3.15.3. PVDF Membranın İşaretlemesi

Membran 1xPBS-T-BSA (1X PBS, %0.1 Tween-20, %1 BSA) solüsyonunda 2 saat bloklandı. %1 BSA içinde hazırlanan PHF6 primer antikorunun 1:1000 dilüsyonu ile 1 saat işaretlendi, süre sonunda antikor uzaklaştırıldı ve membran 1xPBS-T ile 2x30 dakika oda sıcaklığında yıkandı. Ardından, %1 BSA içinde hazırlanmış uygun anti-rabbit-HRP sekonder antikoruyla (Advansta, R-05072-500) 1:25000 dilüsyonu ilave edildi ve işaretleme 1 saat oda sıcaklığında yapıldı. Sekonder antikorun uzaklaştırılmasının ardından membran 1xPBS-T ile 2x30 dakika yıkandı. ECL reaktifi

(Advansta, K-12045-D50) ilave edildi ve 1 dakika beklendikten sonra uzaklaştırıldı ve görüntülemesi yapıldı. Görüntülenerek ifadesi belirlenen proteinin, yüklemesi yapılan total proteinin bazal seviyelerinin belirlemesi amacıyla *house-keeping* GAPDH işaretlemesi uygulandı. GAPDH işaretlemesinin yapılabilmesi için membrana strip-off uygulandı.

3.15.4. Strip-Off Muamelesi

Western blotlamada PVDF membrana strip-off muamelesi SDS-PAGE jele yüklenen protein miktarının kontrolünün sağlanabilmesi, aynı membranda iki farklı proteinin ifadesinin kontrolü için uygulanabilir bir yöntemdir. Bu yöntemle PVDF membrana bağlanan primer ve sekonder antikorların membrandan ayrılması sağlanarak Notch1 (Cell Signalling, 4380S) ve GAPDH (sc-47724) antikorlarıyla işaretlenmesi sağlandı. Hazırlanan strip-off solüsyonu Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.2: Strip-off solüsyonu hazırlama miktarları

Kimyasallar	Miktarlar
Hızalama Tamponu	12,5ml
10% SDS	20ml
bdH ₂ O	67,5ml
β-merkaptolanol	704µl
Toplam Hacim	100ml

100ml strip-off solüsyonu ağzı kapaklı cam şişede hazırlanarak 55°C’ye kadar mikrodalga fırında ısıtıldı. Uygun sıcaklığa geldiğinde β-merkaptolanol eklenerek kapalı bir kap içersine membran yerleştirilerek 30 dk süresinde 55°C’de çalkalamalı inkübatörde inkübe edildi. Süre sonunda membranın 2x15dk 1xPBS-T ile yıkanması sağlanarak istenilen antikorla işaretlenmesine hazır hale getirildi.

Yıkamanın ardından 2 saat boyunca %1 BSA ile membranın bloklanması sağlandı. PHF6 ifade vektörlerinin, PHF6 sinyal yolağında ana transkripsiyon faktörlerinden biri olan Notch1 ifadesi üzerine etkisinin değerlendirilmesi için Notch1 primer antikoruyla (Cell Signalling, 4380S) membran işaretlendi. Notch1 primer antikoru 1:500 dilüsyonunda gece boyu, bir sonraki strip-off'da GAPDH primer antikoru 1:10000 dilüsyonunda 1 saat boyunca işaretlemesi yapıldı. Her iki antikor için 3x10dk 1xPBS-T ile yıkanması sağlandı. Notch1 için 1:5000 sekonder anti-rabbit-HRP, GAPDH için 1:25000 sekonder anti-mouse-HRP (KPL, 474-1806) antikoru ile 1 saat işaretlemesi gerçekleştirildi. Ardından membranın 3x10dk 1xPBS-T ile yıkanması sağlandıktan sonra 1 dakika ECL ile inkübe edilerek kemilüminesans görüntülenmesi gerçekleştirildi.

3.16. Yabancı Tip PHF6 İfade Vektörünün T-Hücre Farklılaşması Üzerine Etkisinin Gösterilmesi İçin Akım Sitometri ile Değerlendirilmesi

PHF6'nın T-hücre farklılaşması üzerine etkileri CD4/CD8 western blotlama antikoru proje kapsamında temin edilemediği için CD4/CD8 farklılaşması Akdeniz Üniversitesi Merkez Laboratuvarı Özel Hematoloji bölümünde BD FACSDiva 7.0 akım sitometri cihazı ile değerlendirildi. Ayrıca hücrelerin CD3, CD7, CD2, CD1a ve TdT yüzey belirteçleri yönünden analizi yapıldı. Analiz yapılabilmesi için 2×10^4 hücre/ μ l hücre sayıldı. T-ALL hücrelerinin bir grubuna PHF6 yabancı tip ifade plazmidi Lipofektamin 2000 lipozomu aracılı transfekte edilirken kontrol grubu olarak transfeksiyon yapılmamış T-ALL hücre hattı kullanıldı. Hücre yoğunluğu yüksek olduğu için hücrelerin apoptoza uğramadan toplanabilmesi için transfeksiyonun ardından hücreler 24 saatlik 37°C'de inkübasyonun ardından toplandı. Akım sitometrisi için hücre lizatı şu şekilde toplandı: Hücreler 15ml'lik falkona alınarak 450xg'de 5 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. Süpernatant atıldı. Peletin 1ml FBS ve 4ml 1xPBS içinde çözülmesi sağlandı. Hücrelerin CD2, CD1a, TdT CD3, CD4, CD7 ve CD8 antikolarıyla işaretlemesi yapılarak sonuçlar değerlendirildi.

3.17. Yabancı Tip ve Mutant PHF6 İfade Vektörlerinin Hücre Proliferasyonuna Etkilerinin MTT ile Gösterilmesi

MTT testi, hücrenin metabolik aktivitesini gösteren renk göstergesine bağlı canlılık testidir. Canlı hücrelerde NADPH oksidatif enzimlerinin etkinliği ile hücre içerisine tetrazolyum alınır. Canlı hücrelerde hücre içine alınan sarı tetrazolyum boyası, enzimatik reaksiyon sonucunda mor formazan boyasına çevrilir. PHF6'nın S199 bölgesinden regülasyonu sonucunda hücre proliferasyonu üzerine etkisi 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) proliferasyon testi ile incelendi. PHF6 yabancı tip ve mutant plazmitler ve ifade geni içermeyen PHF6'nın klonlama iskeletine sahip pcDNA3.1 plazmid vektörü (mock), ayrı ayrı kuyucuk başına 300ng olacak şekilde hesaplanarak 25µl serumsuz RPMI-1640 besiyerinde oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Bu inkübasyonun 2,5'inci dakikasında kuyucuk başına 25µl serumsuz RPMI-1640 içinde 0,4µl Lipofektamin 2000 lipozom ajanı, DNA içeren tüpe aktarıldı. Lipozom ajanının DNA'yı içine alması için birlikte 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildiler. Süre sonunda kuyucuklara eşit miktarda dağıtıldı. İnkübasyon sırasında DND-41 hücreleri thoma lamıyla sayıldı. Kuyucuk başına 5×10^4 hücre sayılarak DNA/Lipofektamin kompleksinin üzerine 100µl ekilerek ters transfeksiyon yapılmış oldu. Kontrol grubu olarak yalnızca eşit sayıda hücre ekimi yapıldı. Her grup kendi içinde 6 tekrarlı olacak şekilde çalışıldı. 48 ve 72 saat sonra üzerlerine karanlık ortamda 20µl MTT solüsyonu eklendi. %5 CO₂'lik atmosfer, %90 nem ve 37°C'lik inkübatörde 3 saatlik inkübasyonun ardından 450g'de 5 dakika santrifüj yapıldıktan sonra besiyeri dökülüp MTT kristallerini çözmek için her kuyuya 100µl DMSO (dimetil sulfoksit) eklendi. 5 dakika oda sıcaklığında bekletilirken plaka hafifçe çalkalandı. Spektrofotometrede 570-690nm dalga boyunca ışımaya miktarı ölçüldü.

3.18. Yabancı Tip PHF6 İfade Vektörünün Hücre Migrasyonuna Etkisinin Gösterilmesi

PHF6 proteininin T-ALL hücre migrasyonuna etkisi 24 kuyucuklu plaka formatında EZCell™ Hücre Migrasyon/Kemotaksis kiti (BioVision, K910-12) ile gerçekleştirildi. Deney kit manueline göre uygulandı.

3.18.1. Migrasyon Deneyi İçin Hücrelerin Hazırlanması ve Kemoatraktan Muamelesi

Her kuyu içerisinde 5µm'lik pora polikarbonat membrana sahip st çember bulunmaktadır. 24 kuyucuklu plakanın tabanı da alt çemberi oluşturmaktadır. Yabancı tip PHF6 vektörü Lipofektamin 2000 aracılı DND-41 hücresine ters transfekte edildi. Hücre kontrol grubu olarak transfeksiyon yapılmamış hücre grubu kullanıldı. Hücreler Boyden emberi'ne ekilmeden önce gece boyu serumsuz ortamda a bırakıldı. Ardından hücreler falkon tüpünde toplanıp 1000xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılıp, pelet serumsuz RPMI-1640 besiyerinde üzüldü ve hemositometrede sayımı yapıldı. Alt embere kuyucuk başına son konsantrasyonu 10ng/µl CCL2 (Sino Biological,10134-H08Y) kemoatraktanı içeren 600µl serumsuz besiyeri eklendi. CCL2, monosit, makrofaj, olgunlaşmamış dendritik hücrelerin ve CD4⁺ T hücrelerinin enfeksiyon alanına g etmesini sağlayan bir kemoatraktandır (Hao ve ark., 2020). Alt embere CCL2 elenerek hücrelerin indüklenmesi ve migrasyonu hedeflendi. Kemoatraktan pozitif kontrol grubu olarak kit içeriğinden çıkan kontrol migrasyon indkleyiciden 60µl alınıp 540µl serumsuz besiyeriyle karıştırılarak kullanıldı. Negatif kontrol grubuna yalnızca 600µl serumsuz besiyeri kullanıldı, herhangi bir ajan eklenmedi. st çembere 2x10⁵ hücre olacak şekilde 200µl olarak ekildi. Hafifçe karıştırdıktan sonra kapağı kapatılarak 37°C'de inkübasyona bırakıldı. DND-41 hücresine insan CCL2 kemokin muamelesinden 30 saat sonra spektrofotometre ile hücre sayımı yapıldı.

3.18.2. Göç Eden Hücrelerin Ayırıştırılması ve Boyanması

Polikarbonat membrandan alt çembere göç eden hücrelerin ayırıştırılıp boyanması için kit içeriğindeki solüsyonlar kullanıldı. Protokol şu şekildedir; st çemberdeki besiyeri dikkatlice alınarak atıldı. Kulak pamuğu yardımıyla st çemberdeki hücreler membrana zarar vermeden hafifçe alındı. Çember çıkartılıp ters çevirilerek peçete üzerine koyuldu. 24 kuyucuklu plakanın kapağı kapatılarak 1000xg'de 5 dakika santrifüjlendi. Süre sonunda dikkatlice süpernatant alındı ve kuyucuklara 500µl kit içeriğinden çıkan yıkama tamponu eklendi. 1000xg'de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatant alındı, atıldı. Kit içeriğinden çıkan hücre ayırıştırma solüsyonu içine %10 hücre boyası (Calcein-AM) eklenerek iyice homojenize edilmesi sağlandı. Her kuyucuğa 550µl karışımdan eklendi.

Daha sonra kenara koyulan üst çember baloncuk olmayacak şekilde alt çemberin üzerine geri koyuldu. 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda plaka kenarlarından hafifçe vurularak iyice karıştırılması sağlandı. Böylece polikarbonat membranın altında kalan hücrelerin ayrışması sağlandı. Üst çember dikkatlice alındı. Düz tabanlı 96 kuyucuklu optik plakaya her kuyucuktan 110µl alınarak eklendi. 530/590nm dalga boyunda spektrofotometrede okutuldu. Sonuç 5 ile çarpılarak sayım analizi yapıldı.

3.18.3. Migrasyon Analizi İçin Standart Eğri Hazırlanması

Migrasyon analizinin yapılabilmesi amacıyla standart eğrisi hazırlandı. Protokol şu şekildedir; 96 kuyucuklu optik plakaya 50µl hücre süspansyonu (5×10^4 hücre/kuyucuk) kit içeriğinden çıkan yıkama tamponuyla 1:1 oranında sulandırılarak kuyucuk başına 50000, 25000, 12500, 6250, 3125, 1562, 781 ve 390 hücre olacak şekilde seri hücre dilusyonu hazırlandı. Her kuyucuğa 10µl hücre boyası eklendi. 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Eksitasyon/Emisyon=530/590nm dalga boylarında spektrofotometrede florasan okuması yapıldı.

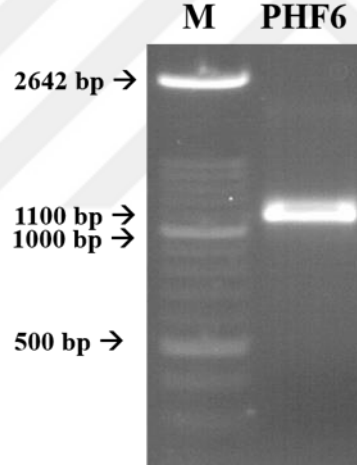
3.19. İstatistiksel Analiz

T-ALL hücre hattı ile yapılan proliferasyon ve migrasyon çalışmaları one-way ANOVA (parametrik olmayan) kullanılarak analiz edildi. Her iki deney çalışması için Kruskal-Wallis testi kullanıldı ve analiz Graphpad Prism 9.3.0 yazılımı ile gerçekleştirildi. P değerleri, $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi. Western blotlama deney sonuçları Image J yazılımı ile, sekans sonuçları Chromas ve SnapGene Viewer yazılımları ile analiz edildi.

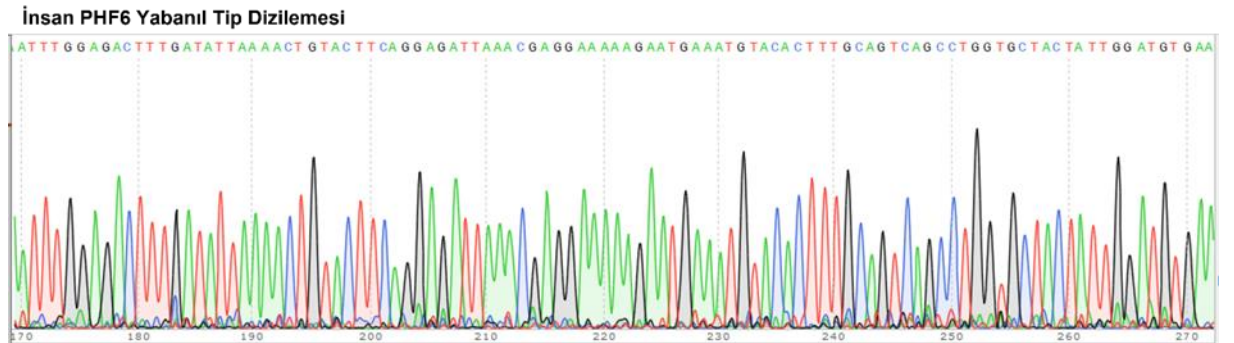
4. BULGULAR

4.1. İnsan PHF6 Yabanıl Tip İfade Vektörünün Agaroz Jel Elektroforeziyle Doğrulanması

Temin edilen BamHI ile pcDNA3.1A vektörüne klonlanan pcDNA3.1A insan PHF6 memeli ifade plazmiti, E.coli'nin DH5 α suşuna ısı şoku yöntemiyle transforme edilerek çoğaltıldı ve spin kolon temelli plazmid izolasyonu ile saflaştırıldı. Saflaştırılan plazmid vektörü yapısal ve dizisel doğrulanması için klonlama için kullanılan primerler ile PCR reaksiyonu gerçekleştirildi ve agaroz jel elektroforeziyle görüntülendi (Şekil 4.1) ve dizileme reaksiyonu gerçekleştirildi (Şekil 4.2).



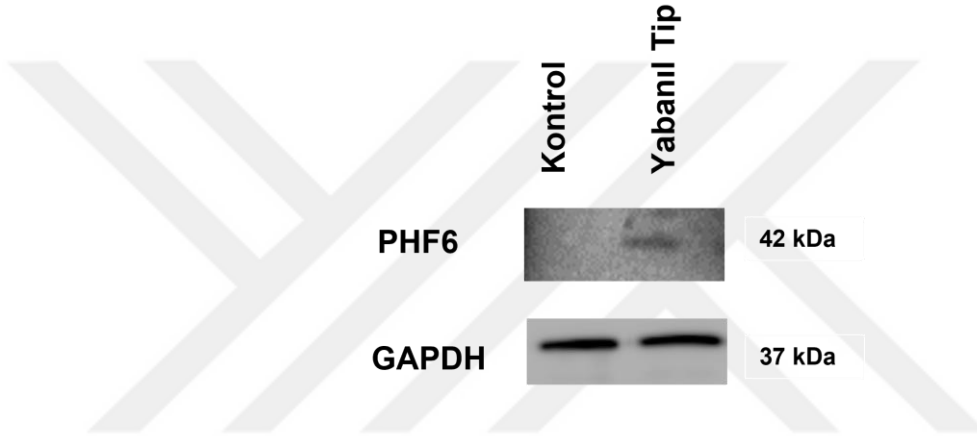
Şekil 4.1: İnsan PHF6 memeli ifade plazmitinin agaroz jel elektroforezi ile yapısal doğrulanması (M:Marker, belirteç).



Şekil 4.2: İnsan PHF6 memeli ifade plazmitinin Sanger sekans yöntemiyle dizisinin doğrulanması.

4.2. İnsan PHF6 İfade Vektörünün Protein İfadesinin Gösterilmesi

pcDNA3.1A insan PHF6 memeli ifade plazmitinin memeli hücrelerinde protein ifadesinin gösterilebilmesi için, DND-41 hücrelerine Lipofektamin 2000 ajanıyla ters transfeksiyon yöntemiyle transfekte edildi (Şekil 4.3). House-keeping gen olarak GAPDH (sc-47724/insan, anti-mouse) işaretlemesi yapıldı.



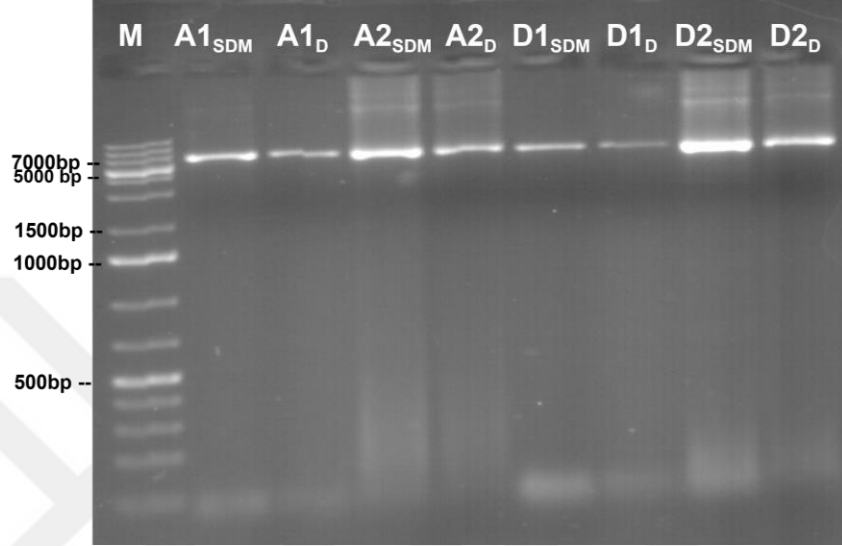
Şekil 4.3: PHF6 protein ifadesinin western blotlama ile doğrulanması. Kontrol: DND41 hücrelerine PHF6 transfeksiyonu yapılmamış, Yabanıl Tip: PHF6 transfekte edilmiş hücre lizatının western blotlama görüntüsü.

Elde edilen western blot görüntüsünde transfeksiyonun yapıldığı yabanıl tipte 42 kDa'luk bant elde edilerek protein doğrulaması yapıldı.

4.3. İnsan PHF6 Proteininin Bölgesel Yönlendirilmiş Mutageniz (SDM) Yöntemi ile Mutantlarının Oluşturulması

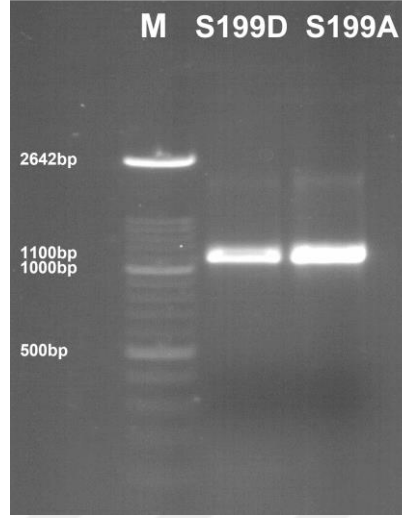
PHF6'nın muhtemel fosforilasyon bölgelerinin T hücre gelişimi üzerindeki etkilerini moleküler düzeyde gösterebilmek için insan PHF6 proteininin fosforilasyon noktaları olduğunu düşündüğümüz Serin199 (S199) nolu amino asitinin kodonlarını fosforile edilemeyen Alanin (A) ve fosforilasyonu taklit eden Aspartik asit (D) kodonlarına SDM yöntemiyle değiştirilerek mutasyon oluşması sağlandı. SDM yönteminde yalnızca baz değişikliği yapılması dolayısıyla, deney sonrası 6600bp'lik (5.5kb pcDNA3.1A + 1.1kb PHF6 cDNA) PHF6 vektörü boyutunda olması beklendi ve doğrulandı. Mutant olmayan

dizilerin kesilmesi ve transforme olmaması için DpnI kesim enzimiyle kesimi gerçekleştirildi. Agaroz jel elektroforezi ile PCR reaksiyonu ve enzim kesimi sonrası ürünlerin yapısal ve boyutsal doğrulanması yapıldı (Şekil 4.4).

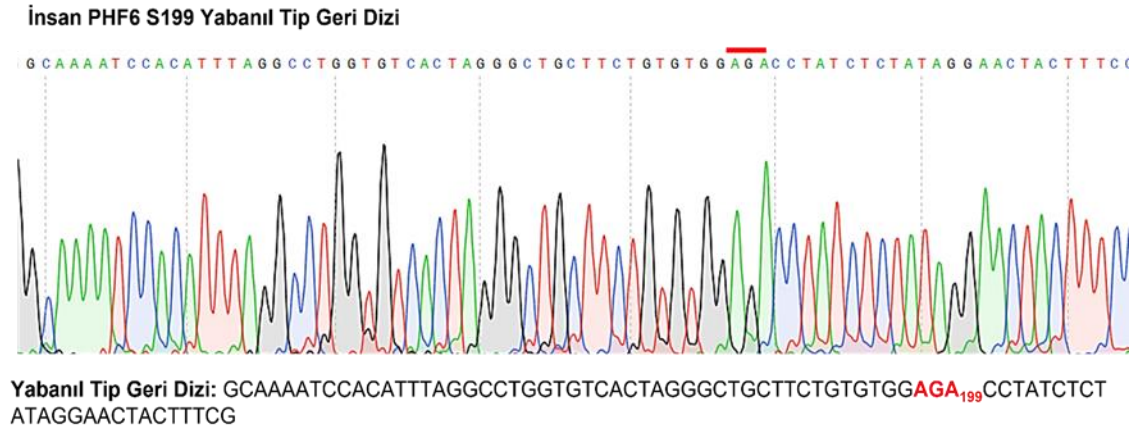
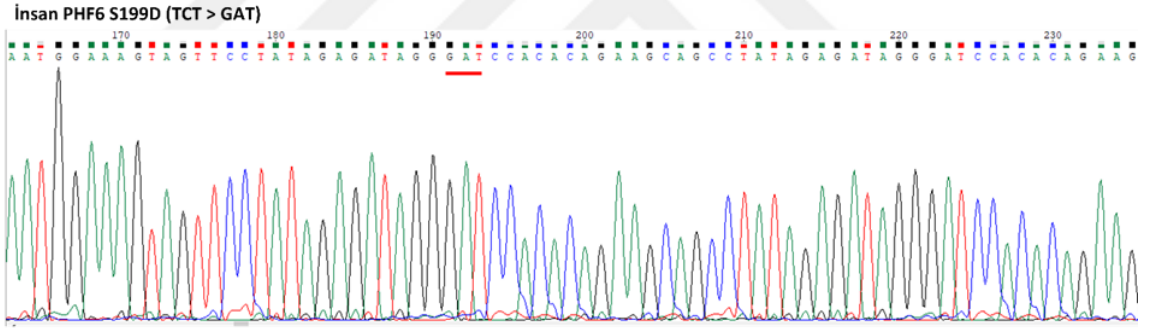


Şekil 4.4: PHF6 SDM deneyi sonrası ve DpnI ürünlerinin yapısal ve boyutsal olarak agaroz jel ile doğrulanması. M: Marker. A1/A2: Alanin. D1/D2: Aspartik Asit. D: DpnI ürünleri. SDM: Side-Directed Mutagenesis ürünleri

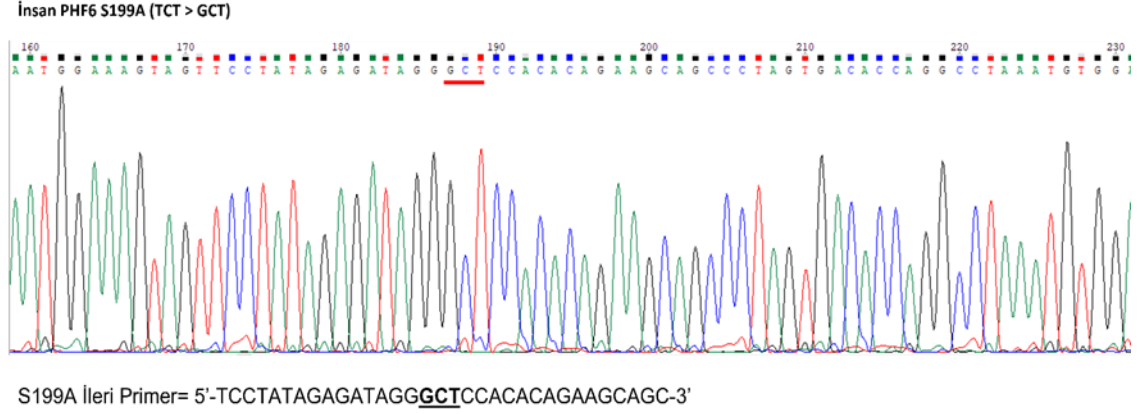
Mutant plazmidler E.coli DH5 α suşuna transforme edilerek, ampisilin içeren agar petrilere ekildi ve ertesi gün oluşan bakteri kolonileri mini kültürde çoğaltıldı ve ardından plazmid izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen mutant plazmitler kalıp DNA olarak kullanılarak PHF6'nın ilgili bölgelerine spesifik primerleri aracılığıyla PCR uygulandı ve agaroz jel ile boyutsal olarak doğrulandı (Şekil 4.5). Ardından DNA dizi analizleri gerçekleştirildi ve mutasyonlar doğrulandı (Şekil 4.6, 4.7).



Şekil 4.5: Mutant PHF6 plazmid vektörlerinin agaroz jel ile boyutsal olarak doğrulanması.



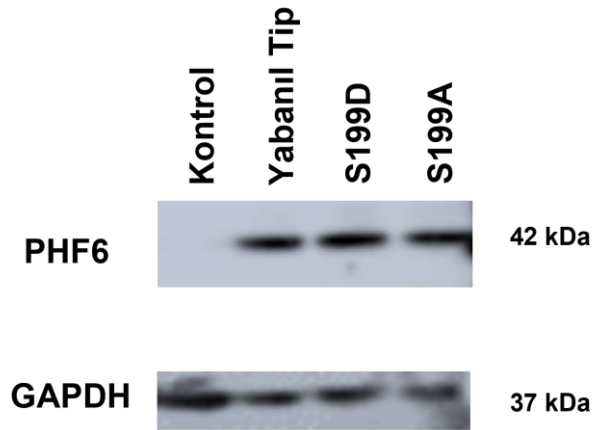
Şekil 4.6: SDM yöntemi ile oluşturulan PHF6 S199D mutant plazmidinin Sanger sekans ile dizisinin doğrulanması



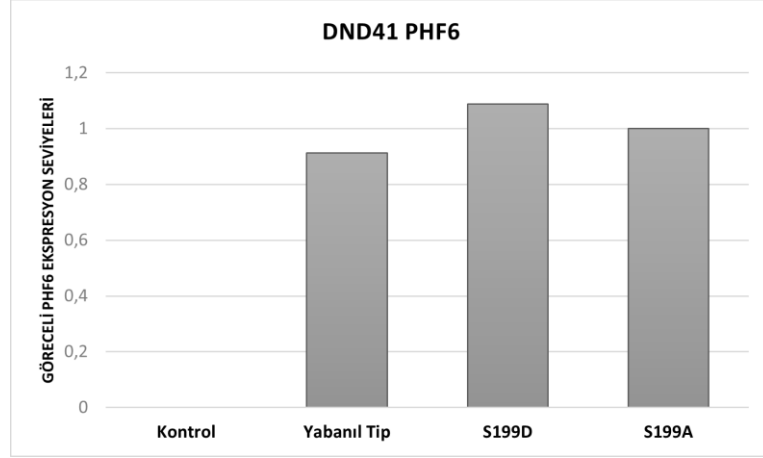
Şekil 4.7: SDM yöntemi ile oluşturulan PHF6 S199A mutant plazmitinin Sanger sekans ile dizisinin doğrulanması

4.4. Yabanıl Tip ve Mutant PHF6 İfade Vektörlerinin PHF6 İfadelerinin Belirlenmesi

Yabanıl tip PHF6 ve mutant S199D ve S199A PHF6 ifade vektörleri transfekte edilen hücrelerin ektopik PHF6 ifadeleri western blotlama yöntemiyle değerlendirildi (Şekil 4.8). ImageJ programıyla yapılan analiz sonucunda PHF6 vektörlerinin ifade seviyeleri arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı (Şekil 4.9).



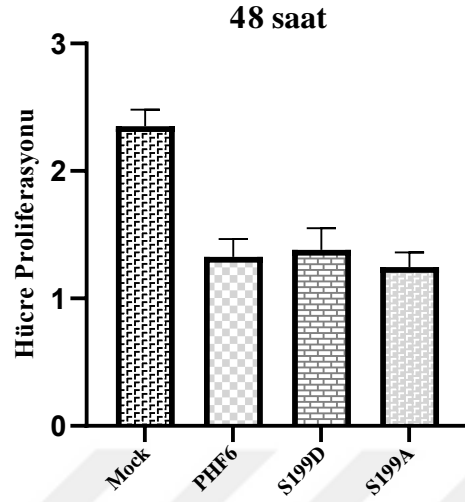
Şekil 4.8: Yabanıl tip ve mutant PHF6 ifade vektörlerinin PHF6 ifade farklılıklarının western blotlama ile değerlendirilmesi.



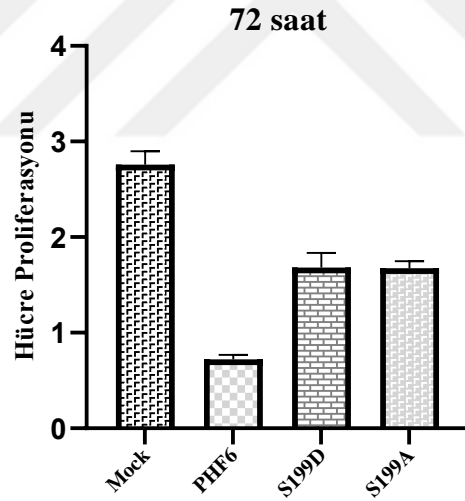
Şekil 4.9: Western blotlama ile değerlendirilen yabanıl tip ve mutant PHF6 protein ifade farklılıklarının grafiksel analizi.

4.5. İnsan PHF6 Yabanıl Tip ve Mutant İfade Vektörlerinin Hücre Canlılığına Etkisinin Belirlenmesi

İnsan PHF6 yabanıl tip ve mutant ifade vektörlerinin T-ALL hücrelerinde proliferasyona etkisinin incelenmesi amacıyla PHF6 ifade vektörleri Lipofektamin 2000 aracılı ters transfeksiyonla hücelere verildi. Transfeksiyonun ardından 48 ve 72 saatlik inkübasyondan sonra hücelere MTT solüsyonu verilerek sonuçlar analiz edildi (Şekil 4.10, Şekil 4.11). Kontrol grubu olarak transfeksiyon yapılmayan hücre grubu ve PHF6'nın klonlandığı boş pcDNA3.1 plazmid vektörü (mock) kullanıldı. Çalışmamızın bu aşaması farklı hücre sayılarında en az 6 tekrarlı olacak şekilde tekrar edildi.



Şekil 4.10: PHF6 yabanıl tip ve mutant ifade vektörünün 48 saatlik hücre canlılığı üzerine etkileri.

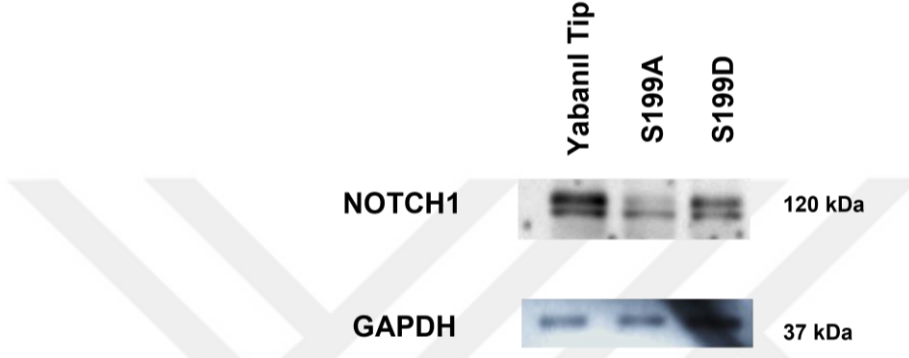


Şekil 4.11: PHF6 yabanıl tip ve mutant ifade vektörünün 72 saatlik hücre canlılığı üzerine etkileri.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre yabanıl tip PHF6 ifade vektörünün kontrole göre hücrelerde canlılığa anlamlı etki etmediği bununla birlikte mutant S199D ve S199A vektörlerinde hücre canlılığının 72 saat sonunda kontrole göre artış gösterdiği belirlendi ($p < 0,0001$). Boş plazmit transfekte edilen hücrelerde canlılığın azalmaması, plazmid iskeletinin ve transfeksiyon ajanının hücrelerde toksik etki yaratmadığını göstermiştir.

4.6. Yabani Tip ve Mutant PHF6 İfade Vektörlerinin Notch1 İfadelerinin Belirlenmesi

Yabani tip ve mutant PHF6 ifade vektörlerinin T-ALL hücrelerinde Notch1 protein ifadesi western blotlama ile değerlendirildi (Şekil 4.12).



Şekil 4.12: Yabani tip ve mutant PHF6 ifade vektörlerinin Notch1 ifade farklılıklarının western blotlama ile değerlendirilmesi.

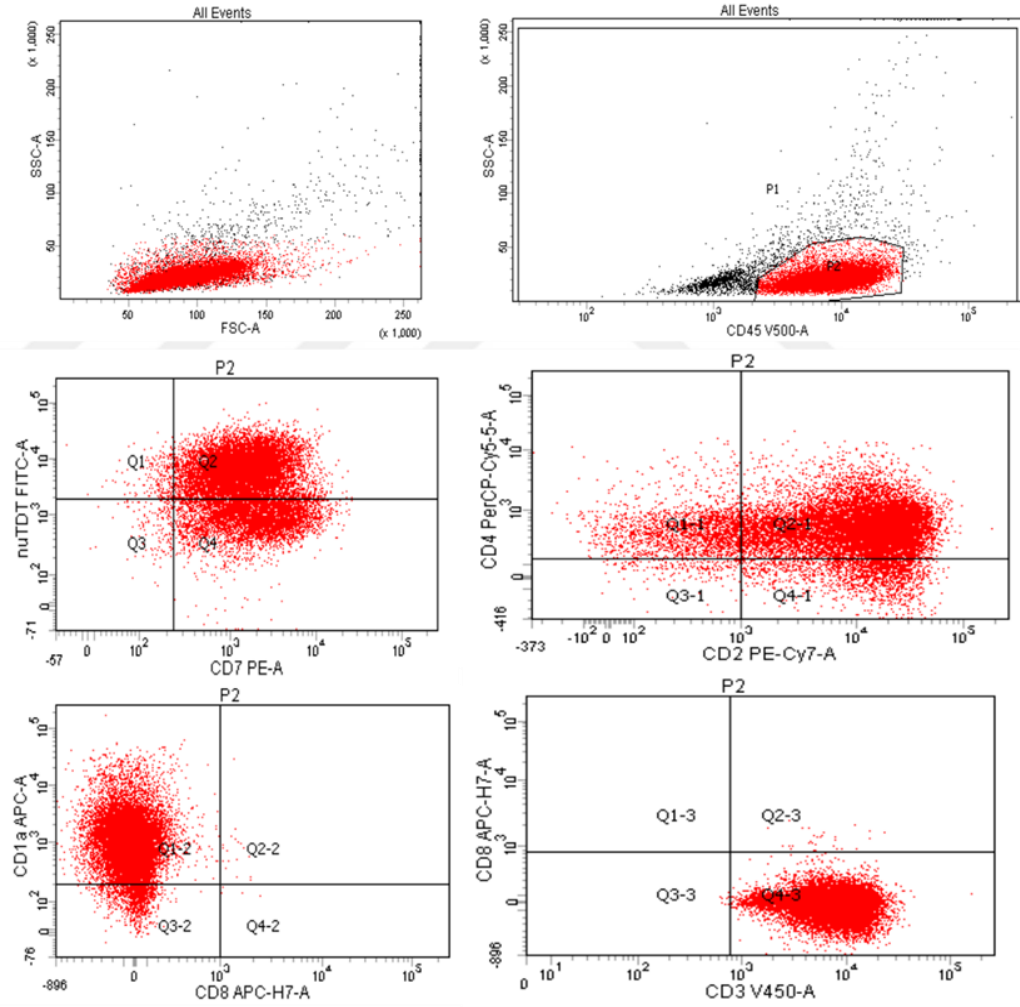
Elde edilen sonuçlara göre PHF6^{yabani tip+} vektör aracılı Notch1 ifadesinin mutant vektörlere göre daha yüksek olduğu gösterildi. S199A vektörünün transfekte edildiği hücrelerde S199D ve yabani tip vektöre göre düşük Notch1 ifadesi tespit edildi.

4.7. İnsan PHF6 İfade Vektörünün T-Hücre Farklılaşması Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

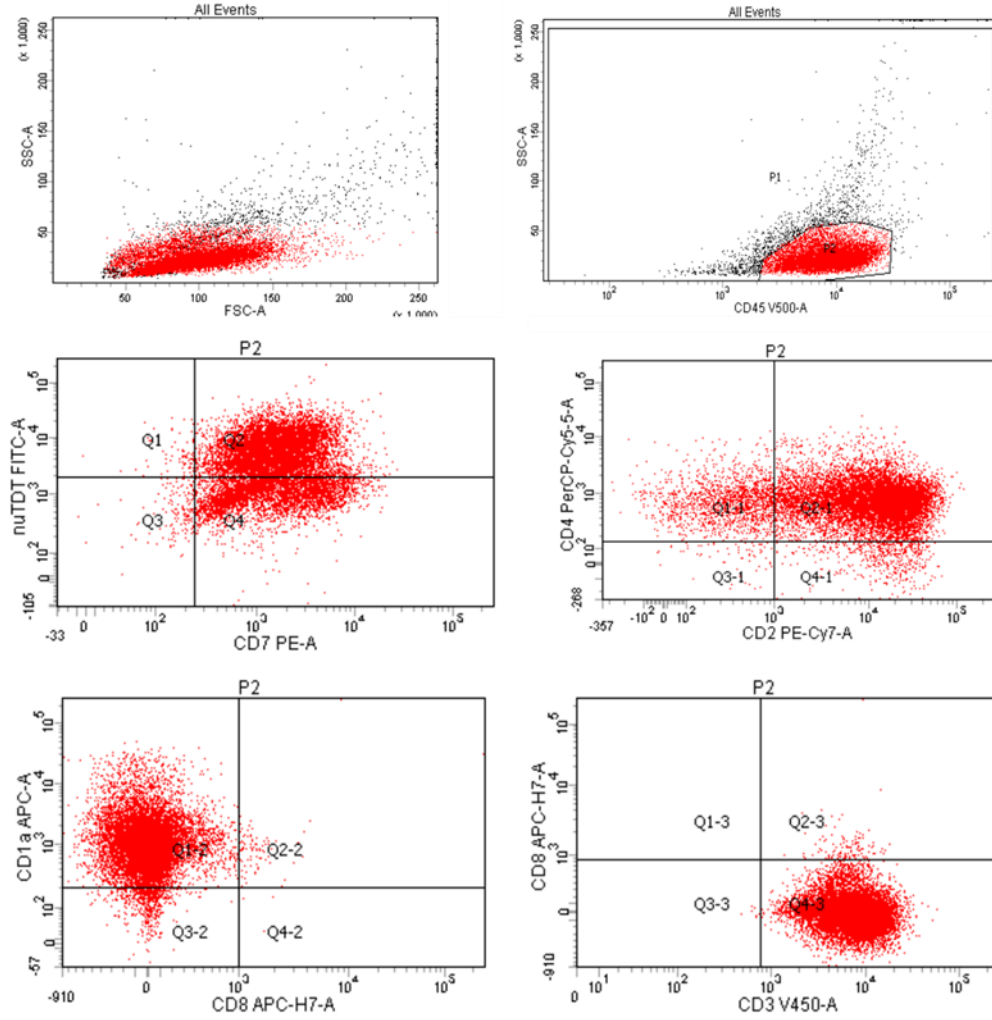
Çalışmamızda en yüksek ifadesinin CD4⁺/CD8⁺ T-hücrelerinde olan PHF6 proteininin, hücreleri CD4 veya CD8 ifadesine yönlendirerek farklılaşması üzerine etkisi BD FACSDiva 7.0 akım sitometri cihazı ile değerlendirilerek analizi yapıldı. PHF6 ifade vektörü verilmemiş kontrol grubu hücrelerinin CD1a %92, CD2 %88, CD3 %100, CD4 %88, CD7 %97 ve TdT %69 oranlarında pozitif olduğu saptandı. Kontrol grubu hücreler %90 oranında T-ALL blast hücresi olup CD8⁻ olarak analiz edildi (Şekil 4.13). Ayrıca kontrol grubu hücreleri %90,3 oranında T-ALL blast hücresinin TdT/CD7 birlikteliği %67,8, CD4/CD2 birlikteliği %77,4, CD1a yüzdesi %92, CD3 yüzdesi %99,8 olarak analiz edilmiş olup bu hücrelerin CD8 taşımadığı gösterildi. Transfekte edilmiş hücreler %91 oranında T-ALL blast hücresi olup CD8⁻ olarak analiz edildi (Şekil 4.14). %91

oranında T-ALL blast hücresinin TdT/CD7 birlikteliği %61,8, CD4/CD2 birlikteliği %83, CD1a yüzdesi %94,3, CD3 yüzdesi %99 olarak analiz edilmiş olup bu hücrelerin CD8 taşımadığı gösterildi. PHF6 transfekte edilen T-ALL hücrelerinde CD1a %95, CD2 %87, CD3 %99, CD4 %98, CD7 %98 ve TdT %62 oranlarında pozitif olduğu saptandı.

Bu çalışmayla birlikte hücre kültürü çalışmalarında kullanılan DND-41 T-ALL hücre hattının immünolojik yüzey antijenlerinin (CD3⁺, CD4⁺, CD6⁺, CD7⁺, CD8⁻, CD13⁻, CD19⁻, CD34⁻) doğrulaması da yapıldı.



Şekil 4.13: PHF6 ifade vektörünün transfekte edilmediği kontrol grubunun akım sitometri analizi



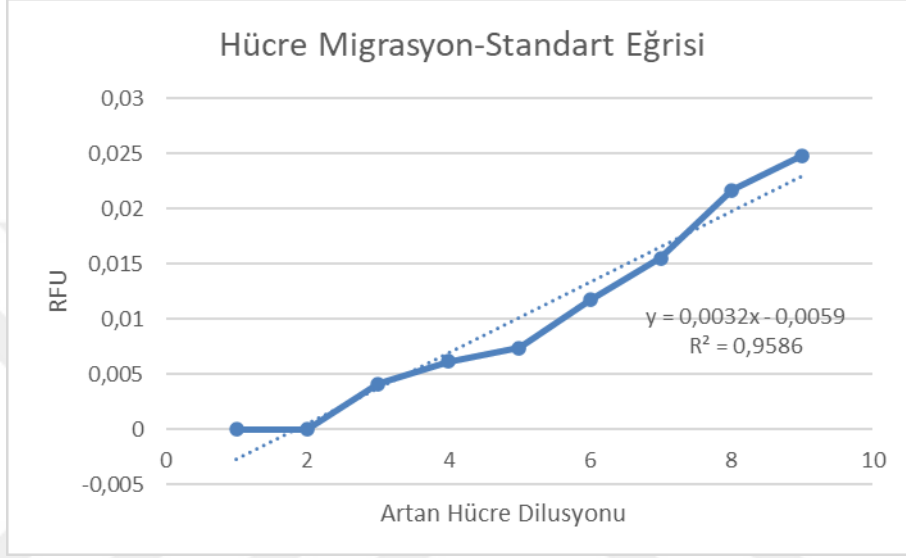
Şekil 4.14: PHF6 ifade vektörünün T-hücre farklılaşması üzerine etkisinin CD4/CD8 yönünden akım sitometrisi ile analizi

Akım sitometrisi ile yapılan bu çalışmada CD4 hariç yüzey belirteçleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. Ancak CD4 dışındaki hücre yüzey belirteçleri arasında yalnızca %1-3'lük farklılık görülürken yabancı tip PHF6 ektopik ifadesi yapılan hücre grubunda hücrelerin CD4⁺ yönünde %10'luk artışı görüldü.

4.8. İnsan PHF6 İfade Vektörünün T-Hücre Migrasyonu Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

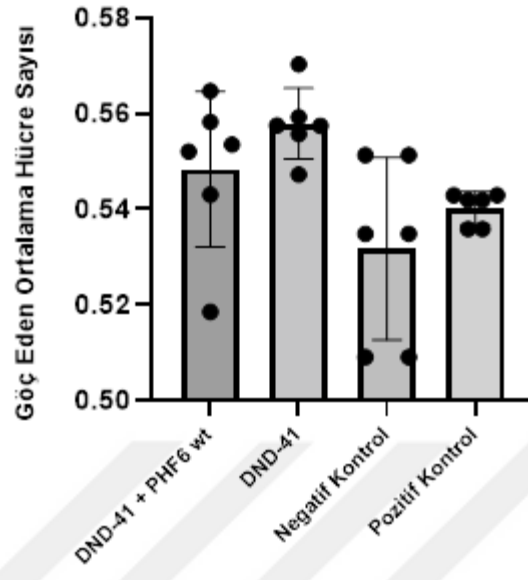
PHF6 transfekte edilerek indüklenen hücrelerde CCL2 kemokinine doğru migrasyonun pozitif yönde olduğu ya da olmadığı değerlendirilebilmesi için öncelikle hücre

standartı hazırlandı. Aşağıda verilen çizelge hiç hücre ekilmeyen yıkama tamponu örneğiyle başlayıp sırasıyla 390-781-1562-3125-6250-12500-25000-50.000 hücre ekilen kuyucuk serisini göstermektedir (Şekil 4.15). X eksenini ise Göreceli Florasan Birimleri (Relative Fluorescence Units-RFU) göstermektedir.



Şekil 4.15: Standart eğri hazırlanarak oluşturulan RFU grafiği

Spektrofotometrede 530/590 dalga boyunda okutulan migrasyon plakasındaki hücrelerin 5 katı alınarak standart eğride çıkan x değeri yerine koyuldu. Elde edilen grafiksel verilere göre CCL2 kemokininine doğru migrasyon hareketi yapan hücre oranında, PHF6 transfekte edilmeyen kontrol grubuyla (DND-41), transfeksiyonunun yapıldığı grup (PHF6^{yabancı tip+} DND-41) arasında anlamlı farklılık görülmedi (Şekil 4.16).



Şekil 4.16: Hücre migrasyon grafiği

5. TARTIŞMA

T-ALL'yi diğer lenfoblastik lösemi tiplerine benzer şekilde lenf nodlarının büyümesiyle ortaya çıkan lenfoadenopati, olgunlaşma ve farklılaşma yeteneğini kaybetmiş lenfoblastların aşırı proliferasyonu ile buldukları dokunun eritrosit, trombosit ve lenfosit oranını bozmasıyla akyuvar sayısının artması ve merkezi sinir sistemine infiltrasyonudur. Projemizin ana faktörü olan PHF6 proteininin en yüksek ekspresyonu farelerde beyin dokusunda (Friedner ve ark., 2020), insanda ise timüs ve ovaryumda bulunmaktadır. T-ALL patogenezi için neden olan anomalilerden bazıları sinyal yollarının aktive edici mutasyonları, tümör baskılayıcı gen delesyonları, epigenetik faktörler veya kromozomal aberasyonla ilişkisi olmayan hücre döngüsü ile ilişkili sinyal genlerinin aşırı ifadesidir. PHF6, son 2 dekatta çalışılmaya başlanmış ve T-ALL'de tümör baskılayıcı rolü olduğu keşfedilen, X kromozomunda lokalize gen ve nükleus proteindir. PHF6, kromatin düzenlenmesinde epigenetik faktör olarak rol almaktadır. NuRD kompleksine bağlanır ve PHF6 yokluğunda T hücrelerini CD4 yolağına yönlendiren GATA3'ün transkripsiyon başlangıç alanına daha kolay bağlandığı bilinmektedir (Soto-Feliciano ve ark., 2017). T-ALL'de en çok çalışılan sinyal yollarından biri Notch1'dir. Notch1, ETP hücre proliferasyonunu ve CD4⁺ T hücre farklılaşmasının ana faktörü GATA3'ün transkripsiyonel indüksiyonunu sağlar (Radtko ve ark., 2013). Ayrıca PHF6'nın Notch1 ve RUNX1 promotorlarına bağlanarak T-ALL'de birlikte ifadeleri bulunduğu da bildirilmiştir (Todd ve ark., 2015). RUNX1 ise CD8⁺ T hücrelerinin farklılaşmasında rol oynayan transkripsiyon faktörüdür. PHF6 promotorunda da, Notch1'in bağlanma dizisinin bulunması ve lösemik hücrelerde PHF6 baskılandığında Notch1'in gen ifadesinin regüle edilmesi (Loontjens ve ark., 2020), iki genin birbiri arasında geribesleme yolu olduğu düşüncemizi kuvvetlendirmiştir.

Projemizde PhosphoSite veritabanına göre metastatik potansiyeli olduğu gösterilmiş ve CD-1 farelerde nöronal migrasyonu baskılamada rolü olduğu bilinen S199 bölgesinin (Zhang ve ark., 2013), insan T-ALL hücrelerinde migrasyon, proliferasyon ve CD4/CD8 yüzey belirteçleri açısından araştırılmasını hedefledik.

Bu amaçla DND-41 hücrelerine transfeksiyonu gerçekleştirilen PHF6 yabancı tip, S199A ve S199D mutantlarının, western blotlama tekniğiyle PHF6 ve Notch1 ifadesi üzerine etkisi değerlendirildi. Yabancı tip ve mutant A/D vektörlerinin PHF6 ifadesi bakımından aralarında anlamlı bir farklılık bulunmadı. Hücrelere yalnızca PHF6 ifade vektörlerini verdiğimiz için elde ettiğimiz bu sonuç ile vektörlerin PHF6 ekspresyonunu değiştirmedini göstererek çalışmanın bu aşamasında istenilen sonuca ulaşılmış olduk. Bununla birlikte Notch1 ekspresyonunun, transfekte edilen PHF6 vektörleri aracılığıyla regülasyonunda anlamlı farklılıklar olduğu gösterildi. En yüksek Notch1 ekspresyonunun PHF6 yabancı tip vektörü aracılı gerçekleştiği tespit edildi. Lösemik hücrelerde PHF6 ifadesinin Notch1 ifadesini modüle ettiği düşünüldüğünde elde edilen veri, literatürle uyumlu (Loontjens ve ark., 2020) ve beklenen bir sonuçtur. Bununla birlikte S199D vektörünün yabancı tip vektörden daha düşük ancak S199A vektöründen daha yüksek Notch1 ifadesinin olması lösemik hücrelerde bu fosforilasyon alanının Notch1 ifadesi için aktif rol oynadığını düşündürmektedir. Aminoasit değişikliğiyle protein düzeyinde gerçekleşmiş olası konformasyonel değişiklikler, proteinin fosforilasyonla aktivasyonuna ya da inhibisyonuna neden olabilir (Johnson ve Lewis, 2001). Ayrıca fosforile olan protein, bu fosfomotifleri yapısal olarak korunmuş bölgeleri aracılığıyla tanıyıp bağlanan, civarındaki proteinleri de kendine çeker (Pawson ve Nash, 2003). Alanin (A), non-polar, hidrofobik molekül yapısına sahip olması sebebiyle fosforile olamayan aminoasittir ve bu bölgenin fosforilasyonuyla aktifleşen proteinlerin ifadesi azalır veya ifade olamaz. Aspartik asit (D) ise polar, hidrofilik molekül yapısıyla sürekli fosforile olma kabiliyetindedir, bu sayede bu bölgenin fosforilasyonuyla aktivite kazanan protein sürekli aktif halde kalır, proteinin ifadesi artar. Bu nedenle Notch1 ifadesinin fosforile olamayan PHF6 varlığında (S199Alanin mutantında) azalması buna karşılık sürekli fosforile olan PHF6 varlığında (S199Aspartik asit mutantında) Alanin'e göre artış göstermesi, PHF6 proteininin S199 fosforilasyon bölgesinin lösemik hücrelerde Notch1 ifadesi için fonksiyonel rol oynadığını düşündürmektedir. Loontjens ve ekibinin çalışmasında PHF6'nın *knockdown* edilmesiyle Notch1 ifadesinin de azaldığının gösterilmesi (Loontjens ve ark., 2020) elde ettiğimiz verileri güçlendirerek, PHF6 S199 fosforilasyon alanının T hücre farklılaşması ve sinyalleşmesi için rol

oynadığı hipotezimizi işaret etmektedir. Bu veriler literatüre katkı sağlaması bakımından değerlidir.

Çalışmamızda T-ALL hücrelerinde PHF6'nın hücre migrasyonu üzerine etkisinin literatür taramalarımıza göre daha önce gösterilmemiş olması sebebiyle, DND-41 hücrelerinde PHF6 yabancı tip vektörünün migrasyona etkisinin değerlendirilmesi literatür için ön bilgi sağlaması açısından önemlidir. Western blotlama ve Sanger dizileme yöntemiyle doğrulanan yabancı tip PHF6 vektörünün, transfekte edildiği DND-41 hücrelerinin (PHF6⁺ DND-41), transfeksiyon yapılmamış DND-41 kontrol grubu hücrelere göre CCL2 kemokin ligandına daha düşük oranda göç ettiği gösterildi. Bununla birlikte DND-41 hücrelerinin migrasyon deneyinin pozitif kontrol (kit içeriğinde bulunan kemokin ile indüklenen hücreler) grubuna göre daha yüksek oranda göç ettiği gösterildi. Literatüre göre PHF6'nın T-ALL'de hücre migrasyonuna etkisi daha önce çalışılmamış olup yalnızca hepatoselüler karsinomada downregülasyonunun migrasyonu inhibe ettiği ve kaybının nöronal dokularda hücre migrasyonunu sekteye uğratmasıyla sonuçlandığı bilinmektedir. Bu veriler istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte PHF6'nın T-ALL'de tümör baskılayıcı rolü olması sebebiyle, PHF6⁺ hücrelerin migrasyon oranının daha düşük olması beklenen bir sonuçtur. Ayrıca kit içeriğinde bulunan kemokin ile çalışmamızda kullandığımız kemokin arasındaki olası farklılık da PHF6-migrasyon arasındaki ilişkinin anlamlı çıkmamasının nedenleri arasında olabilir.

Olgunlaşmamış T-hücrelerinin CD4⁺ yöne farklılaşması için GATA3 transkripsiyon faktörünün aktivasyonuna ihtiyaç vardır. GATA3'ün aktivasyonu ise kendisinin transkripsiyon faktörü olan Notch1 aktivasyonu ile mümkündür. PHF6, linaj spesifik transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasına izin veren veya bloke eden bir kromatin yapısını destekleyerek hedef genlerin transkripsiyonunu kontrol etmektedir (Soto-Feliciano, 2017). Loontiens ve arkadaşlarının 2020'de yayınladığı güncel çalışmasına göre PHF6 sinyal aktivitesinin Notch1 sinyalizasyonu ile paralellik gösterdiği bildirilmiş ayrıca CD4⁺CD8⁻ hücrelerde PHF6 ifadesinin, CD3⁺CD4⁻CD8⁺ hücrelere göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Van Vlierberghe ve ark., 2010; Loontiens ve ark., 2020). PHF6'nın lösemik T hücrelerinde, CD4 ve CD8 üzerine olan etkilerini belirlemek için

DND-41 hücrelerine transfekte edilerek 24 saat sonra CD4 ve CD8 ifadeleri akım sitometrisi ile analiz edildi. Elde ettiğimiz sonuçlara göre CD4 hariç diğer yüzey belirteçleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı. CD4 dışındaki hücre yüzey belirteçleri arasında yalnızca %1-3'lük farklılık görülürken PHF6⁺DND-41 hücre grubunda hücrelerin CD4⁺ yönünde %10'luk artışı görüldü. Bu sonuç PHF6 transfeksiyonuyla, PHF6 ifadesinin artarak, hücreleri CD4⁺ T-hücresi yönüne farklılaşmaya neden olduğunu düşündürmektedir. Aynı zamanda Notch1'in CD4⁺ T hücre farklılaşmasının ana transkripsiyon faktörü olan GATA3'ün transkripsiyon faktörü olması, en yüksek ekspresyonu CD4⁺CD8⁺ T-hücrelerinde görülen PHF6'nın, T-hücre farklılaşması açısından Notch1-GATA3-RUNX1 aksında kilit noktada bulunması, tez çalışmamızdan elde edilen bu verilerle daha geniş kapsamlı bir proje yapılabilmesine de olanak sağlamaktadır.

Çalışmamızda PHF6 yokluğunun T-ALL gelişimindeki önemini test etmek için DND-41 hücrelerine ökaryotik yabancı tip ve S199A/D mutant PHF6 ifade vektörleri geçici transfeksiyonla verilip bu proteinin ektopik ifadesinin DND-41 hücrelerinin proliferasyonuna olan etkisi MTT testi ile değerlendirildi. PHF6⁻ hücreler ile yabancı tip vektör ifade eden hücrelerin, hücre proliferasyonuna etkisinin bulunmadığı ancak S199A ve D vektörlerinin kontrol hücre grubuna göre hücre proliferasyonunu artırdığı gösterildi. Testte kullanılan yöntemden bağımsız olarak proliferasyon farkı, hücre içerisindeki enzim aktivasyonları ile PHF6 proteini degrade edilmiş olabilir. Bu ihtimali elemek için elde ettiğimiz western blotlama görüntüsünde proliferasyon testi gerçekleştirilen zamanda PHF6 protein ifadesi gösterilerek elenmiştir. Elde edilen bu sonuç, T-ALL'de tümör baskılayıcı olan proteinimiz ile uyumludur (Hajjari ve ark., 2016; Li ve ark., 2016).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. T-hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi, toplumda görülme sıklığı %15 olan hematolojik malignensidir. PHF6'nın T-ALL gelişiminde ana faktörlerden biri olan Notch1'in transkripsiyonel indükleyicisi olarak düşünülmesi ve T-ALL'de tümör baskılayıcı protein olması, hastalığın gelişim nedenlerinin araştırılması için önemli bir aday protein olduğunu göstermektedir.
2. Yapılan bu projede PHF6'nın metastatik potansiyeli olduğu düşünülen S199 bölgesinden SDM ile mutant vektörler oluşturularak hücrelerin, fosforile olamayan Alanin (A199) ve sürekli fosforile olan Aspartik Asit (D199) vektörünü ektopik olarak eksprese etmesini sağladık.
3. PHF6 yabancı tip vektör eksprese eden hücrelerin, hücre proliferasyonunda azalma gösterilirken mutant vektörlerin hücre proliferasyonunu artırdığı gösterilmiştir. Çalışmamızdan elde edilen bu veri, literatüre katkı olabilecek niteliktedir.
4. Yabancı tip PHF6 vektörünün, kontrol hücrelerine göre hücre migrasyonu üzerinde etkisi olmadığı gözlenmiştir. Farklı kemoatraktan kullanılarak ve mutant vektörler ile çalışma tekrar edilebilir.
5. S199A mutant vektörünün Notch1 proteinini, S199D ve yabancı tip vektörüne göre azalmış ifadesi tespit edilmiştir. Notch1 proteininin, PHF6'nın S199 bölgesinden fosforilasyonu ile muhtemel aktivitesi için ileri çalışmalar yapılarak bu fosforilasyon noktasının PHF6-Notch1 sinyal mekanizmasındaki yeri ve önemi belirlenebilir.
6. PHF6⁺ hücrelerin, PHF6⁻ hücrelere göre blast hücrelerini CD4⁺ yolağına indüklediği akış sitometrisi ile gösterilmiştir. Mutant vektörlerle birlikte çalışılarak S199 noktasının CD4⁺ T- hücre farklılaşmasındaki yeri belirlenebilir.

KAYNAKLAR

- Atici E. Tip tarihinde kanser ve lösemi. *Turk Onkol Derg.* 2007;22(4):197–204.
- Bapat A, Keita N, Sharma S. Pan-myeloid Differentiation of Human Cord Blood Derived CD34+ Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *J Vis Exp.* 2019 Aug 9;2019(150):1–9.
- Bayón-Calderón F, Toribio ML, González-García S. Facts and Challenges in Immunotherapy for T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020; 21(20):7685.
- Berquam-Vrieze KE, Nannapaneni K, Brett BT, Holmfeldt L, Ma J, Zagorodna O, Jenkins NA, Copeland NG, Meyerholz DK, Knudson CM, Mullighan CG, Scheetz TE, Dupuy AJ. 2011. “Cell of origin strongly influences genetic selection in a mouse model of T-ALL.” *Blood.* 118(17), 4646-56.
- Ceredig R, Rolink AG, Brown G. Models of haematopoiesis: seeing the wood for the trees. *Nat Rev Immunol.* 2009 Apr;9(4):293–300.
- Chen QW, Zhu XY, Li YY, Meng ZQ. Epigenetic regulation and cancer. *Oncol Rep.* 2014;31(2):523–32.
- Dai Hp, Cui W, Cui Qy, Zhu Wj, Meng Hm, Zhu Mq, Zhu Xm, Yang L, Wu Dp, Tang Xw. Haploidentical CD7 CAR T-cells induced remission in a patient with TP53 mutated relapsed and refractory early T-cell precursor lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Biomark Res.* 2022; 10, 6.
- Devlin S, Cimera R, Zhang Y, Arcila ME, Papaemmanuil E, Levine RL, Roshal M. PHF6 and DNMT3A mutations are enriched in distinct subgroups of mixed phenotype acute leukemia with T-lineage differentiation. *Blood.* 2018. 2(23): 3526–3539.

Eden RE, Coviello JM. Chronic Myelogenous Leukemia. [Updated 2022 Jan 24]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531459/>

Fliedner A, Gregor A, Ferrazzi F. et al. Loss of PHF6 leads to aberrant development of human neuron-like cells. *Sci Rep* 10, 19030 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75999-2>.

Gianni F, Belver L, Ferrando A. The Genetics and Mechanisms of T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2020 Mar 2;10(3):a035246.

Girardi T, De Keersmaecker K. T-ALL: ALL a matter of Translation? *Haematologica*, 2015. 100(3), 293-5.

Godin I, Cumano A. Of birds and mice: hematopoietic stem cell development. *Int J Dev Biol*. 2005;49(2–3):251–7.

Hao Q, Vadgama JV, Wang P. CCL2/CCR2 signaling in cancer pathogenesis. *Cell Commun Signal*. 2020 May 29;18(1):82.

Harrington LE. T-Cell Development. In: *Clinical Immunology*. Fifth Edit. Elsevier; 2019. p. 119-125.e1.

Hajjari M, Salavaty A, Crea F, Kee Shin Y. The potential role of PHF6 as an oncogene: a genotranscriptomic/proteomic meta-analysis. *Tumour Biol*. 2016. 37(4), 5317-25.

Haji Y, Suzuki M, Moriya K, So T, Hozumi K, Mizuma M, Unno M, Ishii N. Activation of Notch1 promotes development of human CD8(+) single positive T cells in humanized mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014. 447(2), 346-51.

Herranz D, Ferrando AA. 2016. “Targeting NOTCH1 in T-ALL: Starving the dragon” *Cell Cycle*, 15(4), 483-484.

Holmfeldt L, Mullighan CG. PHF6 Mutations in T-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatr Blood Cancer*, 2010. 55, 595–596.

Hughes P, Marshall D, Reid Y, Parkes H, Gelber C. The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need? *Biotechniques*. 2007 Nov;43(5):575, 577-8, 581-2 *passim*.

Johnson LN, Lewis RJ. Structural Basis for Control by Phosphorylation. *Chem. Rev.* 2001, 101, 2209-2242.

Kampen KR. The discovery and early understanding of leukemia. *Leuk Res.* 2012 Jan;36(1):6–13.

Karamitros D, Stoilova B, Aboukhalil Z, Hamey F, Reinisch A, Samitsch M, et al. Single-cell analysis reveals the continuum of human lympho-myeloid progenitor cells. *Nat Immunol.* 2018 Jan 21;19(1):85–97.

Kawakami N, Nishizawa F, Sakane N, Iwao M, Tsujikawa K, Ikawa M, et al. Roles of integrins and CD44 on the adhesion and migration of fetal liver cells to the fetal thymus. *J Immunol.* 1999 Sep 15;163(6):3211–6.

Krampe B, Al-Rubeai M. Cell death in mammalian cell culture: molecular mechanisms and cell line engineering strategies. *Cytotechnology.* 2010 Jul;62(3):175-88.

Lakhtakia R. A brief history of breast cancer: Part I: Surgical domination reinvented. *Sultan Qaboos Univ Med J.* 2014;14(2):166–9.

Laurent J, Bosco N, Marche PN, Ceredig R. New insights into the proliferation and differentiation of early mouse thymocytes. *Int Immunol.* 2004 Aug;16(8):1069–80.

Li M, Xiao L, Xu J, Zhang R, Guo J, Olson J, Wu Y, Li J, Song C, Ge Z. Co-existence of PHF6 and NOTCH1 mutations in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Lett.* 2016, 12(1), 16-22.

Liu Y, Easton J, Shao Y, Maciaszek J, Wang Z, Wilkinson MR, McCastlain K, Edmonson M, Pounds SB, Shi L, Zhou X, Ma X, Sioson E, Li Y, Rusch M, Gupta P, Pei D, Cheng C, Smith MA, Auvil JG, Gerhard DS, Relling MV, Winick NJ, Carroll AJ, Heerema NA, Raetz E, Devidas M, Willman CL, Harvey RC, Carroll WL, Dunsmore

KP, Winter SS, Wood BL, Sorrentino BP, Downing JR, Loh ML, Hunger SP, Zhang J, Mullighan CG. The genomic landscape of pediatric and young adult T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2017 Aug;49(8):1211-1218.

Liu Z, Li F, Ruan K, Zhang J, Mei Y, Wu J, Shi Y. Structural and Functional Insights into the Human Börjeson-Forssman-Lehmann Syndrome-associated Protein PHF6. *J Biol Chem.* 2014 Apr 4; 289(14): 10069–10083.

Loontjens S, Dolens AC, Strubbe S, Van de Walle I, Moore FE, Depestel L, Vanhauwaert S, Matthijssens F, Langenau DM, Speleman F, Van Vlierberghe P, Durinck K, Taghon T. PHF6 Expression Levels Impact Human Hematopoietic Stem Cell Differentiation. *Front Cell Dev Biol.* 2020 Nov 4;8:599472.

Lu Y, Chan YT, Tan HY, Li S, Wang N, Feng Y. Epigenetic regulation in human cancer: The potential role of epi-drug in cancer therapy. *Mol Cancer.* 2020;19(1):1–16.

Mak TW, Saunders ME. Chapter 13-T Cell Development. In: Mak TW, Saunders ME, eds. *The Immune Response: Basic and Clinical Principles*, Academic Press, 2006, p:341-372.

Malard F, Mohty M. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet.* 2020 Apr 4;395(10230):1146-1162.

Molica M, Abruzzese E, Breccia M. Prognostic Significance of Transcript-Type BCR-ABL1 in Chronic Myeloid Leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2020;12(1):e2020062.

Neumann M, Vosberg S, Schlee C, Heesch S, Schwartz S, Gökbuget N, Hoelzer D, Graf A, Krebs S, Bartram I, Blum H, Brüggemann M, Hecht J, Bohlander SK, Greif PA, Baldus CD. Mutational spectrum of adult T-ALL. *Oncotarget.* 2015. 20;6(5):2754-66.

Nutt SL, Kee BL. The Transcriptional Regulation of B Cell Lineage Commitment. *Immunity.* 2007 Jun;26(6):715–25.

Osborne BA. Notch, a T-ALL order. *Blood.* 2011. 117(10), 2749-50.

Pawson T, Nash P. Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science*. 2003 Apr 18;300(5618):445-52. doi: 10.1126/science.1083653.

Peter J. Delves, Seamus J. Martin, Dennis R. Burton IMR. *Roitt's Essential Immunology*. 12th ed. Vol. 4, Wiley-Blackwell; 2017. 576 p.

Radtke F, MacDonald HR, Tacchini-Cottier F. Regulation of innate and adaptive immunity by Notch. *Nat Rev Immunol*. 2013 Jun 13;13(6):427–37.

Raetz EA, Teachey DD. T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2016 Dec 2; 2016(1): 580–588.

Rothenberg EV., Moore JE, Yui MA. Launching the T-cell-lineage developmental programme. *Nat Rev Immunol*. 2008 Jan;8(1):9–21.

Ruiz P, Wiles MV., Imhof BA. $\alpha 6$ integrins participate in pro-T cell homing to the thymus. *Eur J Immunol*. 1995 Jul;25(7):2034–41.

Seo W, Taniuchi I. Transcriptional regulation of early T-cell development in the thymus. *Eur J Immunol*. 2016 Mar;46(3):531–8

Sheykhasan M, Manoochehri H, Dama P. Use of CAR T-cell for acute lymphoblastic leukemia (ALL) treatment: a review study. *Cancer Gene Ther*. 2022 Jan 5. Epub ahead of print. PMID: 34987176.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 2019; 69:7–34.

Sigerist HE. The Historical Development of the Pathology and Therapy of Cancer. *Bull N Y Acad Med*. 1932 Nov;8(11):642–53.

Soto-Feliciano YM, Bartlebaugh JME, Liu Y, Sánchez Rivera FJ, Bhutkar A, Weintraub AS, et al. PHF6 regulates phenotypic plasticity through chromatin organization within lineage-specific genes. *Genes Dev*. 2017 May 15;31(10):973–89.

Srivastava A, Makarenkova HP. Innate Immunity and Biological Therapies for the Treatment of Sjögren's Syndrome. *Int J Mol Sci.* 2020 Dec 1;21(23):9172.

Thompson PK, Zúñiga-Pflücker JC. On becoming a T cell, a convergence of factors kick it up a Notch along the way. *Semin Immunol.* 2011 Oct;23(5):350-9.

Todd M, Ivanochko D, Picketts D. PHF6 Degrees of Separation: The Multifaceted Roles of a Chromatin Adaptor Protein. *Genes (Basel).* 2015 Jun 19;6(2):325–52.

Van Vlierberghe P, Patel P, Abdel-Wahab O, Lobry C, Hedvat CV, Balbin M, Nicolas C, Payer AR, Fernandez HF, Tallman MS, Paietta E, Melnick A, Vandenberghe P, Speleman F, Aifantis I, Cools J, Levine R, Ferrando A. PHF6 Mutations in Adult Acute Myeloid Leukemia. *Leukemia.* 2011. 25(1), 130-4.

Van Vlierberghe P, Palomero T, Khiabani H, Van der Meulen J, Castillo J, Van Roy N, De Moerloose B, Philippé J, González-García S, Toribio ML. et al. PHF6 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia, *Nat Genet.* 2010. 42(4), 338–342.

Wang J, Leung JW, Gong Z, Feng L, Shi X, Chen J. PHF6 regulates cell cycle progression by suppressing ribosomal RNA synthesis. *J Biol Chem.* 2013. 1;288(5):3174-83.

Wang Q, Qiu H, Jiang H, Wu L, Dong S, Pan J, Wang W, Ping W, Xia J, Sun A, Wu D, Xue Y, Drexler HG, MacLeod RAF, and Chen S. Mutations of PHF6 are associated with mutations of NOTCH1, JAK1 and rearrangement of SET-NUP214 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2011. 96(12),1808-1814.

Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP IV, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, Blacklow SC, Look AT, Aster JC. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute Lymphoblastic leukemia. *Science.* 2004 Oct 8;306(5694):269-71.

WHO. Who Report on Cancer. 2020.

Xiang J, Wang G, Xia T, Chen Z. The depletion of PHF6 decreases the drug sensitivity of T-cell acute lymphoblastic leukemia to prednisolone. *Biomed Pharmacother.* 2019 Jan;109(312):2210–7.

Xiao W, Bharadwaj M, Levine M, Farnhoud N, Pastore F, Getta BM, Hultquist A, Famulare C, Medina JS, Patel MA, Gao Q, Lewis N, Pichardo J, Baik J, Shaffer B, Giralt S, Rampal R, Devlin S, Cimera R, Zhang YE, Arcila M, Papaemmanuil E, Levine RL, Roshal M. PHF6 and DNMT3A mutations are enriched in distinct subgroups of mixed phenotype acute leukemia with T-lineage differentiation. *Blood Adv.* 2018. 2 (23), 3526-3539.

Yuan L, Lu L, Yang Y, Sun H, Chen X, Huang Y, Wang X, Zou L, Bao L. Genetic mutational profiling analysis of T cell acute lymphoblastic leukemia reveal mutant FBXW7 as a prognostic indicator for inferior survival. *Ann Hematol.*, 2015. 94, 1817–1828.

Yui MA, Rothenberg EV. Developmental gene networks: a triathlon on the course to T cell identity. *Nature reviews Immunology*, 2014. 14(8):529-545.

Yu Q, Yin L, Jian Y, Li P, Zeng W, Zhou J. Downregulation of PHF6 Inhibits Cell Proliferation and Migration in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Biother Radiopharm.* 2019 May;34(4):245–51.

Yu Q, Zhou J, Jian Y, Xiu Z, Xiang L, Yang D, et al. MicroRNA-214 suppresses cell proliferation and migration and cell metabolism by targeting PDK2 and PHF6 in hepatocellular carcinoma. *Cell Biol Int.* 2020;44(1):117–26.

Zjablovskaja P, Florian MC. Acute myeloid leukemia: Aging and epigenetics. *Cancers (Basel).* 2020;12(1):1–18.

Zhang C, Mejia LA, Huang J, Valnegri P, Bennett EJ, Anckar J, Jahani-Asl A, Gallardo G, Ikeuchi Y, Yamada T, Rudnicki M, Harper JW, Bonni A. The X-linked Intellectual Disability Protein PHF6 Associates with the PAF1 Complex and Regulates Neuronal Migration in the Mammalian Brain. *Neuron.* 2013. 78(6): 986–993.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Gökçe	Uyruğu	TC
Soyadı	ERDOĞAN	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Metin-Nuran Çakallıklı Anadolu Lisesi	2004
Lisans	Selçuk Üniversitesi	2011
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi	2014
Doktora	Akdeniz Üniversitesi	2022

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Biyolog	Tosun Tıbbi Tahliller Laboratuvarı	2012
Antalya Bölge Satış Sorumlusu	Medsantek Tıbbi Laboratuvar Malzemeleri	2022-halen

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YÖKDİL (2018)	88,75
Fransızca	MEB Sertifika Kursu (2019)	80

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Santral Seröz Koryoretinopati (SSR)' De KDR Gen Polimorfizminin Değerlendirilmesi	Akdeniz Üniversitesi BAP	2013-2014
Bilimsel Araştırmalarda Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalının Yeri ve Önemi	Akdeniz Üniversitesi BAP	2019-2020

Yayımlanan Bildiriler ve Makaleler:

1. Hüseyin İnan Şayran, Muhammet Kazım Erol, Gökçe Erdoğan, Deniz Turgut Çoban, Mahmut Akyol, Ahmet Burak Bilgin, Deniz İlhan. Santral Seröz Koryoretinopati (Ssr)'De Kdr Gen Polimorfizmlerinin Değerlendirilmesi. PS-1029. Türk Oftalmoloji Derneği. 48. Ulusal Kongre. 5-9 Kasım 2014, Kemer, Antalya. POSTER SUNUMU.
2. M. Akyol, G. Erdogan, M. Erol, E. Turkoglu. Is the KDR gene associated with Central serous chorioretinopathy. European Journal of Human Genetics, vol 23-1; 382. June 6 - 9, 2015 Glasgow, Scotland, United Kingdom. PUBLISHED ABSTRACT.
3. Pehlivanoglu S., Erdogan G., Türkkan E., Akgemci E.G. Novel Cu(Ii) Complexes Of 2-Hydroxy-5 Methoxyacetophenone Thiosemicarbazone And Its N(4)-Substituted Derivatives And Their Spectral, Voltammetric, Dft, And Biological Studies. SANKO University Innovation in Medicine Summit-3; 22, 11-13 May 2017, Gaziantep, Turkey. SÖZLÜ SUNUM.
4. Gökçe Erdoğan, Suray Pehlivanoğlu, Osman Nidai Özeş, Ercan Türkkan, Mükerrerem Fındık, Emine Güler Akgemci. 2-Hidroksi-5 metoksiasetofenon tiyosemikarbazon ve N(4) türevli çinko komplekslerinin antikanser etkilerinin değerlendirilmesi. XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Uluslararası Katılımlı); 26-29 Ekim 2017, Ölüdeniz-Fethiye, Muğla. SÖZLÜ SUNUM.
5. Türkkan E., Sayin U., Erbilin N., Pehlivanoglu S., Erdogan G., Tasdemir H.U., Saf A.O., Leyla G., Akgemci E.G. Anticancer, antimicrobial, spectral, voltammetric and DFT studies with Cu (II) complexes of 2-hydroxy-5-methoxyacetophenone thiosemicarbazone and its N (4)-substituted derivatives. Journal of Organometallic Chemistry. 831 (2017) 23-25. doi: 10.1016/j.jorganchem.2016.12.020.
6. Suray Pehlivanoglu, Kadriye Aktaş Kont, Gökçe Erdoğan, Bahadır Öztürk. Twist1 glukoz transporter 12 ekspresyonunu indükleyerek glikoz alımını destekler. XV. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (Uluslararası Katılımlı); 26-29 Ekim 2017, Ölüdeniz-Fethiye, Muğla. POSTER SUNUMU.
7. Pehlivanoğlu Suray, Erdoğan Gökçe, Akgemci Emine Güler, Fındık Mükerrerem, Türkkan Ercan, Özeş Osman Nidai. Novel Thiosemicarbazone Copper Complexes Exert Anti-Metastatic Effect Through Inhibition of Epithelial Mesenchymal Transition in Cancer Cells. 7th International Molecular Biology and Biotechnology Congress; 2018. 5099159. POSTER SUNUMU.

Kurs ve Sertifikalar:

2014 EACR-Sponsored 2nd Anticancer Agents Congress:Targeting Cancer Stem Cells. Participant Certificate.

2014 Deney Hayvanları Bakım-Kullanım Sertifika Kursu

2015 Transplantasyon İmmünolojisi'nde Güncel Gelişmeler Kursu, Katılım Sertifikası

2015 5.Ulusal Transplantasyon İmmünolojisi ve Genetiği Kongresi, Katılım Sertifikası

2015 Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi PEDİ-STEM Kök Hücre Günü-2015 Toplantısı, Katılım Belgesi

2017 15. Ulusal Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Kongresi (Uluslararası Katılımlı)-2017, Katılım Sertifikası

2019 Sağlık ve Tıp Alanında Bilimsel Araştırmalar Sempozyumu-Katılım Belgesi

2019 T.C. Millî Eğitim Bakanlığı Hayat Boyu Öğrenme Genel Müdürlüğü Kurs Bitirme Belgesi, Fransızca A1 Seviyesi programı