

**SİTOKİN SİNYAL BASKILAYICILARINDAN  
SOCS-1 GEN POLİMORFİZMİNİN ORAK HÜCRE HASTALIĞINDA  
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**YEŞİM TAVŞANOĞLU**

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI**

**MERSİN  
AĞUSTOS - 2019**

**SİTOKİN SİNYAL BASKILAYICILARINDAN  
SOCS-1 GEN POLİMORFİZMİNİN ORAK HÜCRE  
HASTALIĞINDA ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**YEŞİM TAVŞANOĞLU**

**MERSİN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI**




**Danışman  
Doç. Dr. A. Ata ÖZÇİMEN**

**İkinci Danışman  
Prof. Dr. Selma ÜNAL**

**MERSİN  
AĞUSTOS - 2019**

## ONAY

Yeşim TAVŞANOĞLU tarafından Doç.Dr. A. Ata ÖZÇİMEN danışmanlığında, Prof. Dr. Seima ÜNAL ikinci danışmanlığı'nda hazırlanan "Sitokin Sinyal Baskılayıcılarından SOCS-1 Polimorfizminin Orak Hücre Hastalığında Araştırılması" başlıklı çalışma aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından 26/08/2019 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavı sonucunda oy birliği/çokluğu ile Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Doç. Dr. Şenay GÖRÜCÜ YILMAZ	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Ertan AY	
Üye	Doç.Dr. A. Ata ÖZÇİMEN	

Yukarıdaki Jüri kararı Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 11/10/2019 tarih ve 209/1603 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

## ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlâk kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'ne devrettiğimi beyan ederim.

## ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written informations and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works.
- I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis as an another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

26 AĞUSTOS 2019 / 26 AUGUST 2019

İmza / Signature

Yeşim TAVŞANOĞLU

## ÖZET

### SİTOKİN SİNYAL BASKILAYICILARINDAN SOCS-1 GEN POLİMORFİZMİNİN ORAK HÜCRE HASTALIĞINDA ARAŞTIRILMASI

Orak Hücre Hastalığı (OHH) hayatı tehdit edebilen akut komplikasyonlar ve çeşitli organlarda kronik hasarlar ile sonuçlanabilen otozomal resesif doğuştan bir kan hastalığıdır. Orak hücre hastalığı bölgemiz için de oldukça önemli bir sağlık sorunudur. Enflamatuvar bir hastalık olan OHH'nın patogenezinde önemli rol oynadığı bilinen sitokin sinyalleri ve baskılayıcı proteinleri çeşitli hücre tiplerinde gen ekspresyonunun düzenlenmesi ve kontrolünde rol almaktadır.

Bu çalışmada, Bölgemizde bulunan OHH bireylerin genotipik farklılıklarının belirlenmesi amacıyla öncelikle OHH hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarından kan örnekleri alındı ve DNA izolasyonu yapıldı. Stabil durumdaki hasta ve kriz nedeniyle hastaneye başvuran orak hücre anemili 70 birey, aynı yaş grubundaki 70 sağlıklı populasyon ile karşılaştırılmak amacıyla yapılan çalışmada, katılımcıların SOCS-1 gen lokusu içerisinde yer alan 2 farklı SOCS-1 düzeyinin tespiti için PCR ve RFLP çalışması yapılarak (rs11549428, rs33989964) gen dizileri tarandı.

Bu çalışmada yer alan hasta grubunun, SOCS1 promotör bölgesindeki -1478 CA/del polimorfizm verileri istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, ekson2'de bulunan 1335 G/C tek nükleotit polimorfizmi verilerinde istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Tek Nükleotit Polimorfizm (SNP), İnflamasyon, Orak Hücre Hastalığı (OHH), SOCS-1, Otozomal, Sitokin.

**Danışman:** Doç.Dr. A. Ata ÖZÇİMEN, Mersin Üniversitesi, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Mersin.

## ABSTRACT

### THE INVESTIGATION OF SOCS-1 GENE POLYMORPHISM FROM CYTOKINE SIGNAL SUPPRESSORS (SOCS PROTEIN FAMILY) IN SICKLE CELL DISEASE

Sickle Cell Disease (SCD) is an autosomal recessive congenital blood disorder that can result in life-threatening acute complications and chronic damage to various organs. Sickle cell disease for the area. It's a major health problem. Cytokine signals and repressor proteins, which play an important role in the pathogenesis of OHH, are regulated and regulated by gene expression at various cell ends.

In this study, blood samples were taken from SCD patients and healthy control groups and DNA isolation was performed in order to determine the genotypic differences of SCD individuals in our region. In a study of 70 patients with stable sickle cell anomalies who were admitted to the hospital due to the crisis and compared to 70 healthy populations in the same age group, participants were asked to conduct a study such as the detection of 2 different SOCS-1 levels in the SOCS-1 gene locus (rs11549428, rs33989964) gene sequences were screened.

In the result of the study, the -1478 CA/del polymorphism data on the SOCS1 promoter region were found to be statistically significant, whereas 1335 G/C single nucleotide polymorphism data on ekson2 were not statistically significant.

**Keywords:** Single Nükleotit Polimorfizim (SNP), Inflammation, Sickle Cell Anemia (SCD), SOCS-1, Autozomal, Cytokine.

**Advisor:** Assoc. Prof. Dr. A. Ata ÖZÇİMEN, Department of Biology, Universty of Mersin, Mersin.

## TEŞEKKÜR

Bana bu çalışmayı yapma fırsatı veren, her konuda desteğini eksik etmeyen ve bana karşı her zaman sabır ve hoşgörü ile yaklaşan çok değerli hocam Doç.Dr. Ahmet Ata ÖZÇİMEN'e ve Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri Anabilim Dalı'ndan ikinci danışmanım olan Prof.Dr. Selma ÜNAL'a, değerli hocam Prof.Dr. Yasemin KAÇAR'a çok teşekkür ederim.

Kan örneklerinin toplanmasında ve laboratuvar çalışmamız esnasında yardımını esirgemeyen Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri Anabilim Dalı'nda görev yapan çalışanlara, laboratuvar çalışanlarına ve Yüksek lisans tez çalışmam süresince benden yardımlarını esirgemeyen Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesinden asistan arkadaşım Leyla ERSOY'a özel olarak teşekkür etmek istiyorum. Ayrıca çalışma arkadaşım Uzm. Bio. İsmail Ayberk KIRBIYIK ve gece çalışmalarım da dahi yanımda bulunan Uzm. Bio. Hediye KILIÇ arkadaşım a teşekkürlerimi borç bilirim.

Benden maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen aileme ve ayrıca her zaman bana destek olan mesai arkadaşlarıma edeceğim teşekkür hiçbir zaman yeterli olmayacaktır. Desteklerinden dolayı tüm arkadaşlarıma en içten sevgilerimle teşekkür ederim.

Bu çalışma, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu tarafından 2017-2-AP2-2538 numaralı proje ile desteklenmiştir. Desteklerinden dolayı BAP birimine teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR ve SİMGELER	xi
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI</b>	<b>4</b>
2.1. Orak Hücre Hastalığı	4
2.1.1. Orak Hücre Hastalığının Prevelans ve Coğrafi Dağılım	4
2.1.2. Orak Hücre Hastalığının Genetik Geçişi	4
2.1.3. Orak Hücre Hastalığında Uygulanan Gen Tedavisi Yöntemleri	5
2.2. Sitokinler	6
2.3. Sitokin Sinyal Baskılayıcılarından SOCS Protein Ailesi	7
2.3.1. SOCS Proteinlerinin İnflamatuvar hastalıklarla ilişkisi	9
2.3.2. SOCS Düzeyini Etkileyen Polimorfizmler	10
<b>3. MATERYAL ve YÖNTEM</b>	<b>12</b>
3.1. Araştırma Populasyonu	12
3.2. Materyal	13
3.2.1. Kullanılan Cihazlar	13
3.2.2. Kullanılan Malzemeler	13
3.3. Yöntemler	15
3.3.1. Kan Alımı	15
3.3.2. Kandan DNA Eldesi ve Kalitatif/Kantitatif Analizleri	15
3.3.3. Tam Kan ya da Buffy-Coat'dan DNA İzolasyonu	15
3.3.4. Buffy Coat Eldesi	16
3.3.5. Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin Belirlenmesi	16
3.3.5.1. SOCS1 geni Promotor -1478CA/del (rs33989964) Tek Nükleotid Polimorfizmi	16
3.3.5.2. SOCS1 -1335 G/C (11549428) Tek Nükleotid Polimorfizmi	19

	Sayfa
3.3.6. Agaroz Jel Elektroforez İşlemi	21
3.3.7. Tek Nükleotid Polimorfizminden Sorumlu Gen Bölgelerinin Tespiti	22
3.4. İstatistiksel Analiz	22
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA</b>	<b>23</b>
4.1. Hasta ve Sağlıklı Kontrol Gruplarının Genel Özellikleri	23
4.2. Tek Nükleotid Polimorfizm Sonuçları	23
4.2.1. SOCS1 Geni Promotor -1478 CA/del Tek nükleotid Polimorfizm Sonuçları	23
4.2.2. SOCS1 Geni 1335 G/C Tek nükleotid Polimorfizm Sonuçları	26
4.3. Tartışma	28
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	<b>33</b>
<hr/>	
KAYNAKLAR	35
ÖZGEÇMİŞ	40
<hr/>	

## TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
<b>Tablo 3.1.</b> SOCS1 geni Promotor -1478 CA/del (rs33989964) Tek Nükleotid Polimorfizmi PZR-RFLP yönteminde kullanılan primer dizileri	17
<b>Tablo 3.2.</b> SOCS1 geni Promotor -1478 CA/del polimorfizmi PZR reaksiyon karışımı	17
<b>Tablo 3.3.</b> SOCS1 geni Promotor -1478 CA/DEL polimorfizmi amplifikasyonunda kullanılan PZR koşulları	18
<b>Tablo 3.4.</b> SOCS1 geni Promotor -1478 CA/del polimorfizmi RFLP reaksiyon karışımı	18
<b>Tablo 3.5.</b> SOCS1 geni Promotor -1478 CA/del polimorfizmi restriksiyonunda kullanılan RFLP koşulları	18
<b>Tablo 3.6.</b> SOCS1 ekson2 1335 G/C (rs11549428) Tek Nükleotid Polimorfizmi PZR-RFLP yönteminde kullanılan primer dizileri	19
<b>Tablo 3.7.</b> SOCS1 geni ekson2 1335 G/C polimorfizmi PZR reaksiyon karışımı	19
<b>Tablo 3.8.</b> SOCS1 geni ekson2 1335G/C polimorfizmi amplifikasyonunda kullanılan PZR koşulları	20
<b>Tablo 3.9.</b> SOCS1 geni ekson2 1335G/C polimorfizmi RFLP reaksiyon karışımı	20
<b>Tablo 3.10.</b> SOCS1 geni ekson2 1335G/C polimorfizmi restriksiyonunda kullanılan RFLP koşulları	21
<b>Tablo 4.1.</b> Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarındaki SOCS1 geni promoter -1478 CA/del genotip ve allel dağılımı	25
<b>Tablo 4.2.</b> Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarındaki SOCS1 geni ekson2 1335 G/C genotip dağılımı	27

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
<b>Şekil 2.1.</b> Orak hücre hastalığında eritrositlerin elektron mikroskopik görünümü	1
<b>Şekil 2.2.</b> Orak hücre hastalığında nokta mutasyonu oluşum şeması	2
<b>Şekil 2.3.</b> Orak hücre hastalığının genetik geçişi.	5
<b>Şekil 2.4.</b> SOCS ailesi üyelerinin domen yapıları ve adları	8
<b>Şekil 2.5.</b> SOCS Proteinlerinin Etki Mekanizması	9
<b>Şekil 4.1.</b> SOCS1 geni promotor -1478 CA/del tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen bölgesinin primer spesifik PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 250 bç'lik bölgenin %1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü	23
<b>Şekil 4.2.</b> SOCS1 geni promoter -1478 CA/del tek nükleotid polimorfizmi PZR ürünlerinin DdeI restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu oluşan fragman uzunluklarının %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü	24
<b>Şekil 4.3.</b> SOCS1 geni promoter -1478 CA/del tek nükleotid polimorfizmi PZR ürünlerinin DdeI restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu oluşan fragman uzunluklarının %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü	24
<b>Şekil 4.4.</b> SOCS1 geni 1335 G/C tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen bölgesinin primer spesifik PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 439 bç'lik bölgenin %1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü	26
<b>Şekil 4.5.</b> SOCS1 geni 1335 G/C tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen bölgesi PZR ürünlerinin Hpy188III restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu oluşan fragman uzunluklarının %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü	27

## KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simge	Tanım
<b>CIS</b>	Sitokinle İndüklenebilir SH2 Domeni
<b>CRP</b>	C Reaktif Protein
<b>DMSO</b>	Dimetilsülfoksit
<b>DSÖ</b>	Dünya Sağlık Örgütü
<b>HCC</b>	Hepatosellüler Karsinoma
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	İnterferon Gama
<b>IL</b>	İnterlökin
<b>İNS</b>	İdiopatik Nefrotik Sendrom
<b>JAK</b>	Januse Kinaz
<b>KIR</b>	Kinase İnhibitory Region
<b>NF-KB</b>	Nükleer Faktör Kappa B
<b>NK</b>	Doğal Öldürücü Hücre
<b>OHH</b>	Orak Hücre Hastalığı
<b>PZR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>RA</b>	Rheumatoid Arthritis
<b>RFLP</b>	Restriction Fragment Length Polymorphism
<b>RT-PZR</b>	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>SH2</b>	Scr-Homology-2
<b>SNP</b>	Tek Nükleotit Polimorfizmi
<b>SLE</b>	Sistemik Lupus Eritramatoz
<b>SOCS</b>	Sitokin Sinyal Baskılayıcı
<b>STAT</b>	Sinyal İletim ve Transkripsiyon Aktivatörü
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tümör Nekrozis Faktör Alfa
<b>UC</b>	Ülseratif Kolit

---

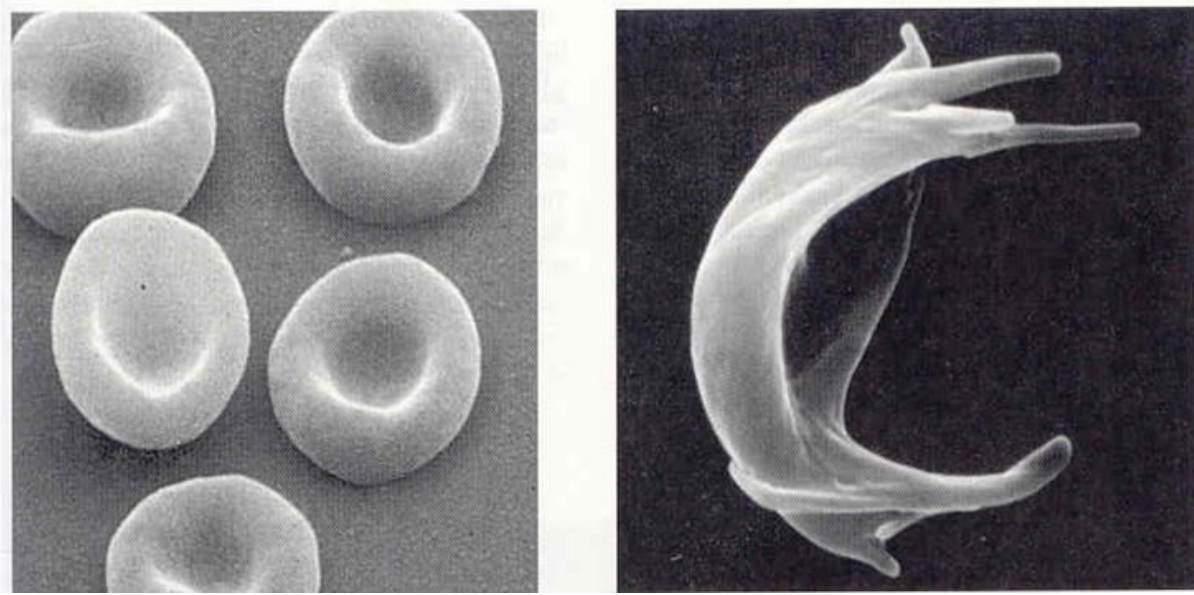
## 1. GİRİŞ

Orak Hücre Hastalığı (OHH) hayatı tehdit edebilen akut komplikasyonlar ve çeşitli organlarda kronik hasarlar ile sonuçlanabilen otozomal resesif doğuştan bir kan hastalığıdır. Hastalığın merkezi Afrika olmakla birlikte göçler ile tüm dünyaya yayılım göstermiştir [1, 2].

Oraklaşan eritrositler küçük damarlarda tıkanıklık yaparak organ hasarına neden olur. Kronik hemolitik anemi, tekrarlayan ağrılı ataklar ve etkilenen organda görülen işlev bozukluğu hastalığın temel bulguları arasında sayılabilir. Hastalığın gidişatı sırasında oluşan akut vazooklüzif ağrılı krizler en sık rastlanan komplikasyonlardır [3].

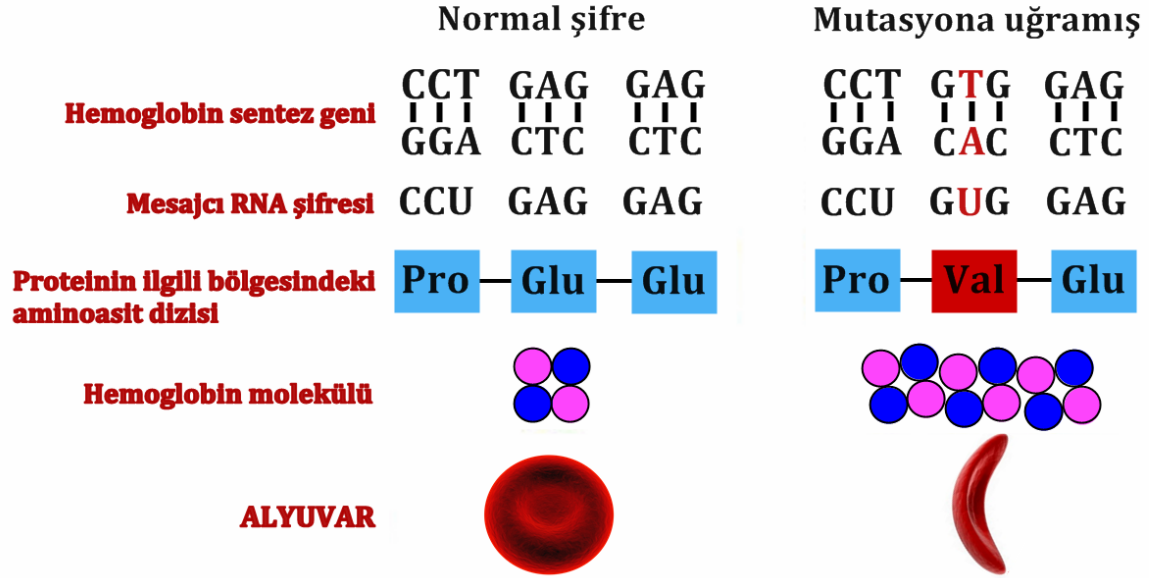
Günümüzde Orak hücre sendromlu hastalarda yaşam süresi 50-60'lı yaşlara kadar uzamış olsada ortalama yaşam erkeklerde 42, kadınlarda 48 dir. Hastalık nedeni ile yaşam süresinin kısaltıldığı ve yaşam kalitesinin düştüğü görülmektedir [2].

Orak Hücre Hastalığında, eritrositlerde Oraklaşma mutasyonu;



**Şekil 2.1.** Orak hücre hastalığında eritrositlerin elektron mikroskopik görünümü [4].

$\beta$ -hemoglobin geninin 6. Kodonunda bulunan (GAG) adenin yerine timin (GTG) gelmesi ile hemoglobinin  $\beta$  zincirinin 6. pozisyonundaki glutamik asitle valinin yer değiştirmesi sonucu oluşur. Hemoglobin S düşük oksijen seviyesinde polimerize olarak eritrositin orak şeklini almasına neden olur. Eriyebilirliği azalır, kan akışkanlığı azalır, orak hücreler küçük kapilleri geçmek için gerekli şekil değiştirme özelliklerini kaybederler [1].



Şekil 2.2. Orak hücre hastalığında nokta mutasyonu oluşum şeması [5].

Hemoglobin (Hb), dokulara oksijeni dağıtırken aynı zamanda eritrositin şeklini koruma ve şekil değiştirebilme yeteneğini sağlayan faktördür. Eritrosit içinde yoğunluğu yüksektir. İnsan hemoglobinin de 4 tane polipeptit zinciri ve 4 tane de hem grubu bulunur. Polipeptit zincirleri 2 tane  $\alpha$  ve 2 tane  $\beta$  zincirinden oluşur. Erişkinlerde bulunan temel hemoglobin HbA'dır ve HbA2 miktarı çok azdır. Fetal hayat boyunca HbF düzeyi yüksektir, doğumdan 6 ay sonra ise HbF yerini yavaş yavaş HbS'e bırakmaya başladığında hastalık kendini belli eder [6].

İnflamatuvar bir hastalık olan OHH'nın patogenezinde önemli rol oynadığını düşündüğümüz sitokin sinyalleri ve baskılayıcı proteinleri çeşitli hücre tiplerinde gen ekspresyonunun düzenlenmesi ve kontrolünde rol almaktadır.

Daha önce yapılmış araştırmalarda Sitokin sinyal baskılayıcı SOCS-1, SOCS-2, SOCS-3 ifadesi ile ilgili üç farklı kromozom üzerinde çok sayıda tek nükleotit polimorfizimlerinin (SNP) varlığı belirlenmiş ve bunların populasyonlar arasındaki dağılımında farklılıklar olduğu gösterilmiştir. SOCS sentezi üzerine artırıcı etki gösteren SOCS-1 gen lokusu içerisinde yeralan daha önce tanımlanmış olan sekiz polimorfizim'in (**rs27829**, **rs188754154**, **rs182726276**, **rs147807471**, **rs1753383**, **rs139221703**, **rs11549428**, **rs1801729**) SOCS-1 düzeyi için genetik belirteç olabileceği düşüncesi çalışmalarla desteklenmektedir. Ancak, Türkiye geneli ve bölgemizde henüz SOCS-1 varyasyonları tanımlanmamıştır. Bu çalışmada, orak hücreli hastalarda SOCS-1 lokusu **rs11549428**, **rs33989964** dizileri ile taranarak, genetik yakınlıkla ilişkilendirilmiştir [7].

Bu çalışma kapsamında, Bölgemizde bulunan OHH bireylerin genotipik farklılıklarının belirlenmesi amacıyla öncelikle OHH hastaları ve sağlıklı kontrol gruplarından kan örnekleri alındı ve DNA izolasyonu yapıldı.

Kriz nedeniyle hastaneye başvuran hastalarda dahil olmak üzere Stabil durumdaki 70 orak hücre anemili hasta ve 70 sağlıklı populasyon ile karşılaştırılmak suretiyle yapılan çalışmada, katılımcıların SOCS-1 gen lokusu içerisinde yer alan 2 farklı SOCS-1 düzeyinin tespiti için polimeraz zincir reaksiyonu (Restriction Fragment Length Polymorphism-PZR-RFLP) yöntemleri kullanılarak (rs11549428, rs33989964) gen dizileri tarandı.

SOCS düzeyini etkileyen SOCS gen lokusu taranarak, bireysel genotipik farklılıkların belirlenmesi sonucu hastalık süreçlerinin daha iyi anlaşılması ve mevcut tedavilerin daha etkin uygulanmasına katkı sağlanması hedeflenmektedir.

OHH'nın gelecekteki geliştirilebilecek tedavi yaklaşımları için de temel oluşturmasını beklenen bu çalışmayla, sinyal yollarında önemli rollere sahip SOCS-1 genlerinin ifadesini etkileyen polimorfik varyasyonların araştırılmasının bu alandaki eksikliklerin tamamlanması açısından önemli olduğu düşünülmektedir.

## **2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI**

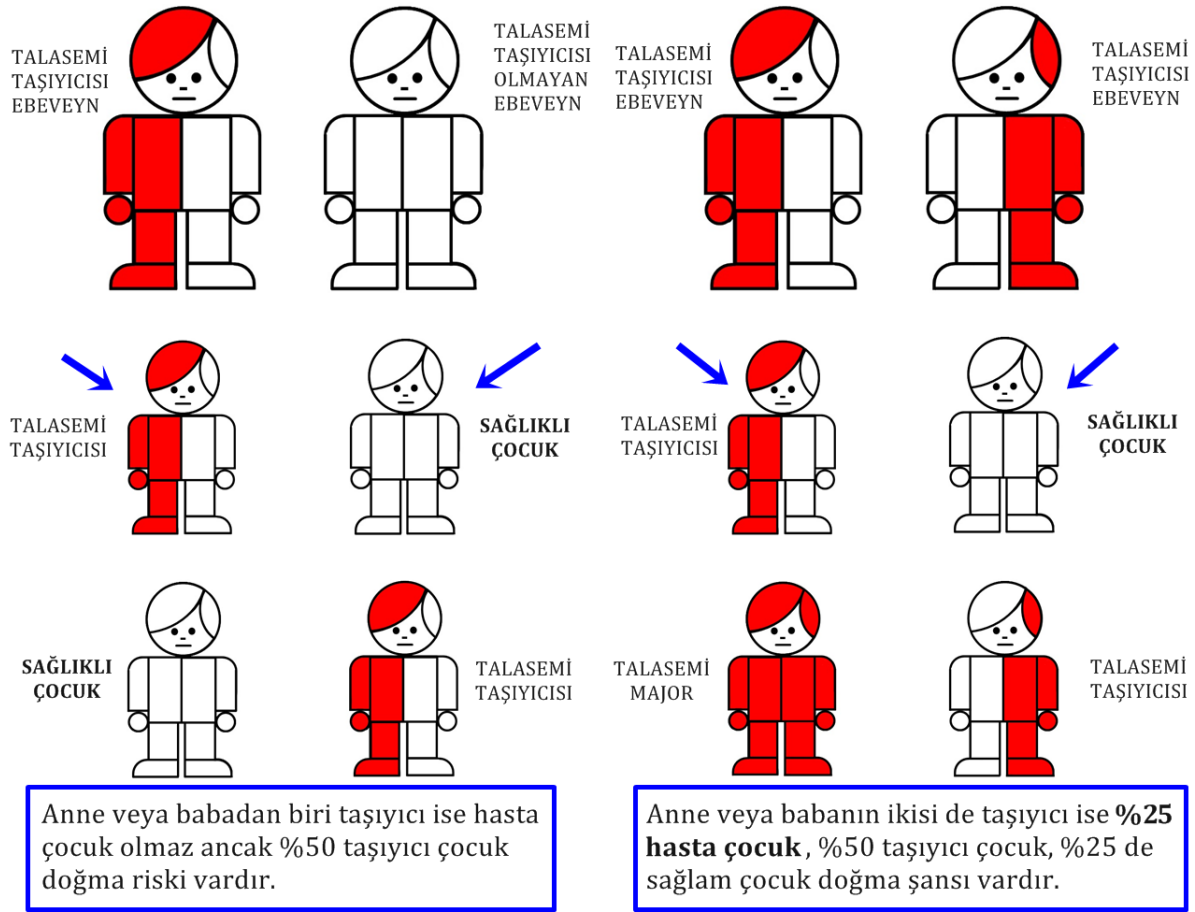
### **2.1. Orak Hücre Hastalığı**

#### **2.1.1. Prevelans ve Coğrafi Dağılım**

Karaibler, Orta ve Güney Amerika, Akdeniz bölgesi (Türkiye ve Yunanistan'ı içine alan), Ortadoğu ve Hindistan hastalığın sık görüldüğü bölgelerdir. M. Aksoy tarafından 1950'li yıllarda Ülkemizde hemoglobinopatiler ile ilgili ilk çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar Çukurova bölgesinde yaşayan Eti Türkleri'nde yapılmıştır [8]. Ulusal Hemoglobinopati Konseyi ve Sağlık Bakanlığının verilerine göre taşıyıcı sıklığının Mersin'de %13,6, Adana'da %10, Antakya'da %10,5 ve dikkat edilirse ülkemizde güney bölgelerimizde yoğun olmak üzere, toplam orak hücre hastalığı olan kişi sayısının yaklaşık 1200 civarında olduğu belirtilmiştir [9,10]. Ayrıca hastalığın diğer bazı bölgelerimizde de Antalya'da %2,5, Diyarbakır'da %0,5, Muğla'da %0,5 sıklıkta görüldüğü bildirilmiştir [11].

#### **2.1.2. Orak Hücre Hastalığının Genetik Geçişi**

Victor E. EMMEL tarafından 1917 yılında bir OHH hastasının babasında orak hücrelerinin gösterilmesi, hastalığın genetik bir temeli olduğunu gündeme getirmiştir [12]. Orak hücre mutasyonu homozigot ya da heterozigot durumda olabilir. Kişi anne ya da babanın sadece birinden mutasyona uğramışsa Heterozigot durumdadır ve eritrositlerde HbA ile birlikte HbS de bulunmaktadır. Bu durumdaki bireyler OHH taşıyıcılığı olarak adlandırılmaktadır. Homozigot durumda ise anne ve babanın her ikisinden de mutasyona uğramış gen alınarak OHH söz konusu olmaktadır. Genotip olarak OHH taşıyıcısı (HbAS) olan ebeveynler %25 olasılıkla OHH'li hasta çocuğa sahip olma riski taşımaktadır. Böyle anne ve babadan genotipi normal olan (HbAA) çocuk doğma olasılığı ancak %25'tir (şekil 2.3.) [13].



Şekil 2.3. Talasemi ile Orak hücre hastalığının genetik geçişi benzerlik gösterir [14].

### 2.1.3. Orak Hücre Hastalığında Uygulanan Gen Tedavisi Yöntemi

Orak hücre hastalığında uygulanan hücresel gen tedavisi yöntemi genellikle allojenik kemik iliği transplantasyonu (KIT)'dur. Genellikle ağır komplikasyonları olan hastalara uygulanır [15]. Kronik organ hasarı az olan küçük çocuklarda, HLA kardeşlerden uygun olanlarından yapılan allojenik kök hücre transplantasyonu ile başarı %93'dür, hastalısız yaşam oranı ise %82'dir. Akraba olmayan donörlerden yapıldığında başarı oranı %70'dir [16-20]. Gen tedavisi çok büyük bir umut olmakla birlikte uygun olmayan gen transferi ve etkisi düşük gen ekspresyonu nedeni ile yavaş ilerlemektedir [7].

## 2.2. Sitokinler

Çok hücreli organizmaların karmaşıklığı düşünüldüğünde hücrelerin iletişim kurması ve dolayısıyla farklı ipuçlarına cevap verebilmelerini sağlayan sistemler bulunmaktadır. Sitokin ve reseptörleri, hücrede önemli rol oynayan böyle bir sistemi temsil eder. Proliferasyon, farklılaşma, göç ve apoptozistte kilit role sahiptir. Hemotopoez çeşitliliği, bağışıklık tepkileri, büyüme ve embriyonik gelişme gibi biyolojik faaliyetlerde kritik öneme sahiptir [7]. İnflamatuvar olayları düzenlerlerken aynı zamanda hücre büyümesi, iyileşmesi gibi yaralanmaya karşı sistemik yanıt verme olaylarının da düzenleyicisidir. Başlıca monosit, lenfosit, nötrofil, platelet, fibroblast, endotel hücresi, kas hücresi ve diğer hücreler tarafından üretilir [21].

Bir sitokin farklı hücrelerde farklı sinyal yollarını uyarabilirken farklı sitokinler hücrede aynı sinyal yollarını da tetikleyebilirler. Hücre içi sinyal yoluna, bu da bağlandığı reseptörlere, reseptörlerin ilişkide olduğu alt birimlere ve transkripsiyon faktörlerine bağlı olarak sitokinin hangi sürecin tetikleneceği değişmektedir [22].

### Sitokinler başlıca altı ana gruba ayrılır:

- 1) Büyüme faktörleri (Epidermal büyüme faktörü, EGF; Trombosit orijinli büyüme faktörü, PDGF; insülin benzeri büyüme faktörü-1, IGF-1; insülin benzeri büyüme faktörü-2, IGF-2; Sinir büyüme faktörü (NGF); Asidik fibroblast büyüme faktörü, aFGF; Bazik fibroblast büyüme faktörü, bFGF; Nörolökin; Hepatosit büyüme faktörü, HGF v.b.) [23].
- 2) Lenfokinler (İnterlökin-1a, IL-1b; IL-2; IL-3; IL-4; IL-5; IL-6; IL-7; IL-8; IL-9; IL-10; IL-11; IL-12; IL-13; IL-14; IL-15, IL-37) [24].
- 3) Koloni teşvik eden faktörler (Granülosit/makrofaj koloni teşvik eden faktör, GM-CSF; Granülosit-CSF; Multi-CSF; Eritropoetin, EPO; Lösemi inhibitör faktör, LIF) [23].
- 4) Transforme edici büyüme faktörleri (TGF- $\alpha$ ; TGF- $\beta$ ) [23].
- 5) Tümör nekroz faktörleri (TNF- $\alpha$ ; TNF-  $\beta$ ) [23].
- 6) İnterferonlar (IFN-  $\alpha$ ; IFN-  $\beta$ ; IFN- $\gamma$ ) [23].

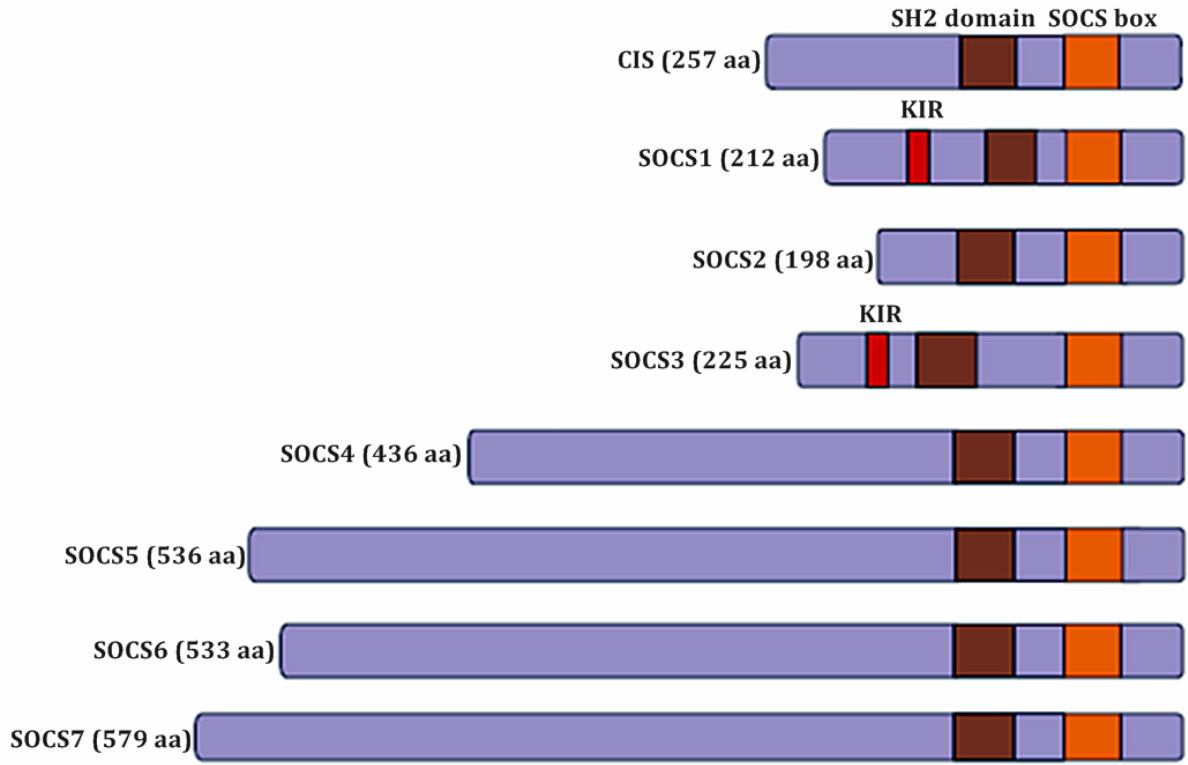
OHH'nda plazmanın kimyasal bileşimini, kronik hemoliz sonucu açığa çıkan hücre içeriği değiştirmekte ve inflamatuvar bir ortam hazırlamaktadır [23]. OHH da kronik inflamasyon bulguları olmakla beraber, hasta krize girdiğinde akut inflamasyon bulgularının da arttığı görülür [25].

### **2.3. Sitokin Sinyal Baskılayıcı SOCS Protein Ailesi:**

Sitokin sinyal transdüksiyon aktivatör (STAT) düzenleyicilerin yeni bir ailesi olan sitokin sinyal baskılayıcıları (SOCS) üzerine olan çalışmalar artırılmıştır. SOCS lar, sitokinlerin negatif düzenleyicileri olarak rol oynarlar. Genel olarak hücre proliferasyon ve sinyal yollarında, özellikle kanser patogenezinde aktif olan onkojenik sinyal yollarının düzenlenmesinde önemli rolleri vardır [26].

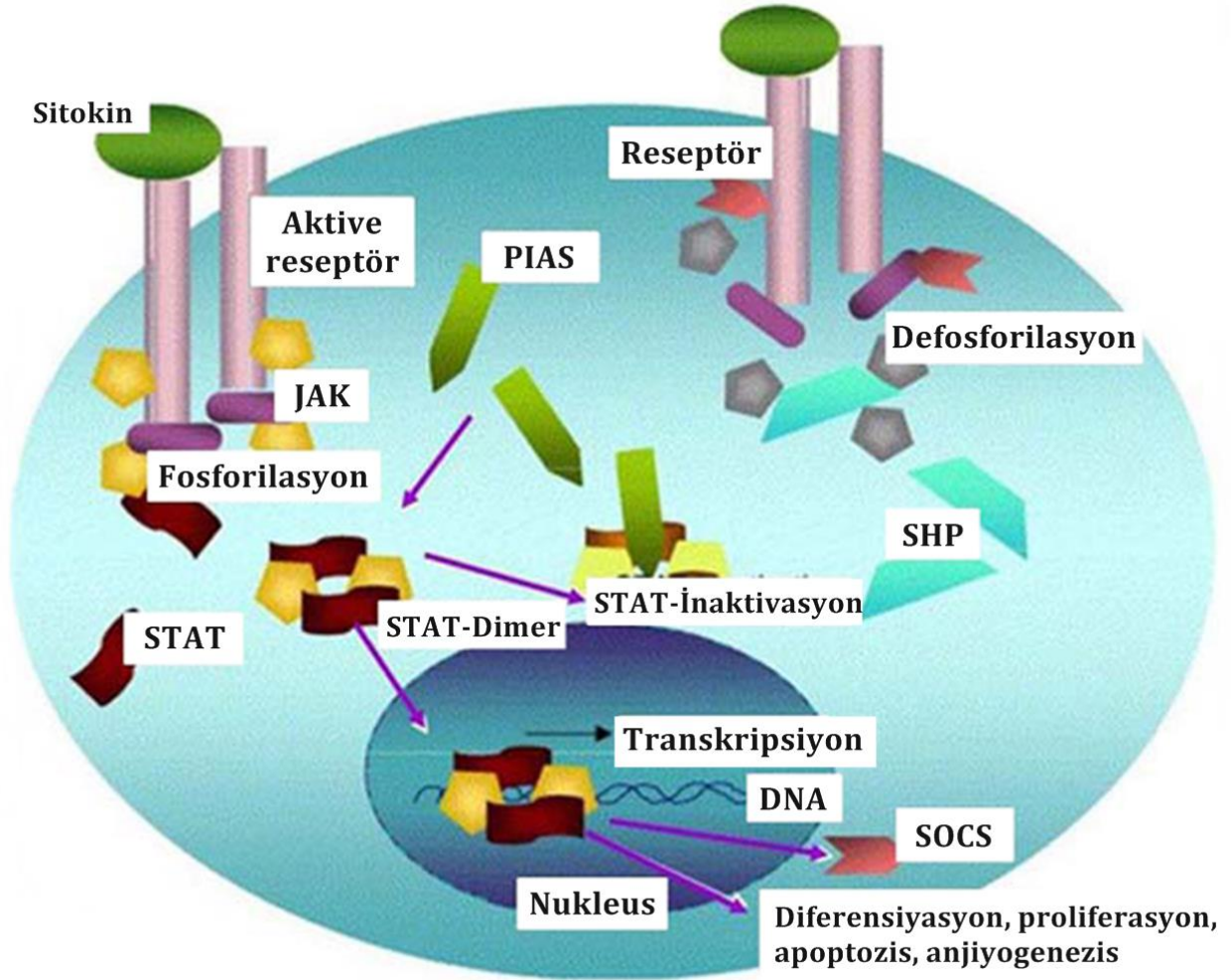
Önemli bir mekanizmayı temsil eden sitokin sinyal baskılayıcı (SOCS) protein ailesi, sitokin ve büyüme faktörü reseptör sinyalini durdurmak içindir. Memelilerde 8 tane SOCS proteini bulunmaktadır; SOCS 1-7 ye kadar ve alternatif olarak (CIS) proteini içeren-SH2 ile uyarılabilen sitokin olmak üzere. SOCS-3 ve CIS, ağırlıklı olarak sitokin reseptör sinyal düzenlemesi ve SOCS 4-7 ise daha yaygın olarak, tirozin kinaz (RTK) reseptör sinyallerinde kontrol olarak yer alır. Bireysel SOCS proteinleri, tipik olarak spesifik sitokinler ve büyüme faktörleri tarafından uyarılmaktadır. Böylece negatif geri besleme döngüsü üretilir. Düzenleyici özelliklerin bir sonucu olarak, hastalığın gelişimi ve homeostazından SOCS proteinlerinin önemli bir fonksiyonu vardır. Bu fonksiyonlar, hastalığın rollerinin gittikçe tanınması, özellikle de tümör baskılayıcı ve iltihap önleyici durumlarda görülür [26,27].

Bu proteinlerin amino-terminal bölgelerinde 50 ila 380 amino asit uzunluğunda bölgeler mevcut iken bütün bu sekiz proteinin ortak özellikleri; yaklaşık 95 amino asit uzunluğunda olan src homoloji-2 (SH2)-domen, değişen uzunluklarda amino-terminal-domen, SOCS-box adı verilen 40-aminoasit motifinden oluşan karboksi-terminal domenden oluşmalarıdır [27]. Ayrıca SOCS-1 ve SOCS-3 proteinlerinde diğerlerinden farklı olarak SH2-domene bitişik KIR adı verilen kinaz inhibitor bölgesi (Kinase Inhibitory Region) yer almaktadır (Şekil 2.6.) [28].



**Şekil.2.4.** SOCS ailesi üyelerinin domen yapıları ve adları [7].

JAK-STAT mekanizması ile oluşan sitokin sinyal iletimi kısmi olarak, sitokin sinyal baskılayıcı genler (SOCS) veya SH2 proteinleri (CIS) olarak bilinen endojen JAK kinaz inhibitör proteinleri tarafından düzenlenmektedir [29]. SOCS proteinleri sadece JAK/STAT yoluyla ile indüklenir. Uyarılmamış hücrelerde JAK'lar ve STAT'lar aktif değildir ve tipik olarak SOCS genleri de bu hücrelerde eksprese edilmezler [27]. Ancak sürekli aktif JAK-STAT sinyali sonucunda çekirdekte hızlı bir şekilde transkribe olurlar ve JAK-STAT mekanizmasını durdurmaya yönelik aktive olurlar [29]. SOCS ailesine ait proteinler sahip oldukları SH2 domainleri sayesinde hem JAK'lar (SOCS-1) hem de sitokin reseptörleri (SOCS-2, SOCS-3 ve CIS) üzerindeki fosfotirozin rezidülerine bağlanabilmektedirler (şekil 2.7.). Bunlar sitokin sinyalini ya JAK aktivitesini inhibe etmek suretiyle veya reseptör üzerindeki fosforile olmuş bölge için STAT'lar ile rekabet etmek üzere ya da E3 ubiquitin ligazın bir parçası olan SOCS BOX'lar aracılığıyla inhibe ederler. Böylece, SOCS BOX'lar SOCS-SH2 interaktif proteinler ile E3 ubiquitin ligaz arasında bir köprü olarak hareket ederler ve protein turnover'ini düzenlerler [30-32].



**Şekil.2.5.** Sitokin- JAK/STAT yolağında; negatif regülatörler (SHP:SH2) içeren fosfotazlar, PIAS: aktive STAT'ların protein inhibitörleri, SOCS: sitokin sinyal yolağını inhibe eden supresör proteinler. Sitokinlerin spesifik reseptörlerine bağlanmasıyla JAK'lar aktive olur. JAK'lar, STAT'ları fosforilleyerek aktive eder. STAT'lar dimerleşerek nükleusa taşınırlar ve gen ekspresyonuna neden olurlar. Sinyal iletimi farklı mekanizmalarla baskılanmaktadır. SHP'lar, SOCS ve PIAS negatif regülatörlerdir. SHP ve SOCS, aktive reseptörleri ve JAK'ları defosforile eder. PIAS, STAT'ları inaktive eder [33].

### 2.2.1. SOCS Proteinlerinin İnflamatuvar hastalıklarla ilişkisi:

Sitokinler İmmün yanıtların düzenlenmesi ve kontrolünde yer alır ve Sitokin çeşitlerinin çoğu biyolojik işlevlerini; Janus Tirozin Kinaz (JAK) ve transkripsiyon sinyal ileticileri (STAT) aracılığıyla yapar. SOCS proteinleri, sitokinle aktive edilen JAK/STAT yolağındaki etkileriyle birçok hastalığın patogeneğinde yer alırlar. SOCS-1, SH2 domeni ile direk JAK'larla etileşerek onların tirozin kinaz aktivitesini inhibe edebilir. SOCS-1 ekspresyonu STAT yolağını aktive eden sitokinlerin yanı sıra insülin, lipopolisakkarid (LPS), CpG DNA ve diğer bazı moleküller tarafından da indüklenebilir [34,35].

M1 makrofajlar için, SOCS1 sadece pro-enflamatuar araçların (IL-6, IL-12, MHC sınıf II, NO) önemli bir düzenleyicisidir. M2- makrofajlar iyileşme ve onarım teşvik ederler. SOCS1-regülasyonu IL-4 bağımlıdır ve M2'nin aktivasyonu için önemli olduğu düşünülmektedir. Ancak bu etkileşimlerde SOCS-3 ün herhangi bir etkisi yoktur [36].

SOCS-1, Grb-2 ve Rho-ailesi guanin nükleotid değişim faktörleri Vav sinyal proteinine bağlanır. Grb2 bağlı SOCS-1, N-ucunda yer alan olası diproline belirleyici olan SH3 alan ile SOCS-1 vasıtasıyla bağlandığını göstermektedir. Bu veriler, SOCS-1 reseptör tirozin kinaz sinyal yollarının bir adaptör protein olarak hücre yaşam sinyalleri ve işlevleri lehine proliferatif sinyalleri modüle eden indüklenebilir bir anahtar olduğunu düşündürmektedir [37].

Diyabet hastalığında, İnsülin direnci ile inflamasyon ilişkilidir. İnflamasyon, SOCS proteinlerinin ekspresyonunu indükler. SOCS-1 ve SOCS-3, muhtemelen elongin BC ubiquitin ligazı aracılığı ile IRS-1 ve IRS-2 (insülin reseptör substrat-1 ve -2) bağlanıp birden fazla hücre tiplerinde bunların dağılmasını ve sonraki bozunmasını teşvik ettiği düşünülmektedir [38].

Sitokin sinyal baskılayıcıları SOCS-1 ve SOCS-3 sinyal ve gen ifadesinin anormal aktivasyonu ile hücre büyümesi ve hayatta kalma için kullanılan sinyal yollarındaki oluşan bu düzensizliğin birçok katı tümör oluşumunda etkili olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmalarda, SOCS-1 ve SOCS-3 bölgesinin lokuslarında, spesifik PCR ile metilasyon tespit edilmiştir. GBM (Glioblastoma) hücre dizileri SOCS-1 proteininin aşırı ifadesi veya SOCS-3 yoksun ekstrasellüler sinyal ayarlı kinaz (ERK) ve mitogen aktive edilmiş protein kinaz (MAPK) aktivasyonu sonucu fosforilasyon, spesifik Western blot ile belirlenmiştir. Glial inflamasyon birçok nörodejeneratif hastalığın önemli bir özelliğidir. Sitokin sinyalizasyon baskılayıcı (SOCS) proteinleri glial hücreler de dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde, inflamatuvar gen ekspresyonunda, sitokin sinyal engellenmesinde önemli bir rol oynadığı görülmektedir [39,40].

### **2.2.2. SOCS Düzeyini Etkileyen Polimorfizmler:**

Sitokin sinyal baskılayıcı SOCS-1, SOCS-2, SOCS-3 ifadesi ile ilgili üç farklı kromozom üzerinde çok sayıda tek nükleotid polimorfizimlerinin (SNP) varlığı belirlenmiş ve bunların popülasyonlar arasındaki dağılımında farklılıklar olduğu gösterilmiştir. Araştırılan polimorfizimlerden ve SOCS sentezi üzerine artırıcı etki gösteren SOCS-1 gen lokusu içerisinde yeralan tanımlanmış olan sekiz polimorfizmin (rs27829, rs188754154, rs182726276, rs147807471, rs1753383, rs139221703, rs11549428, rs1801729) SOCS-1 düzeyi için OHH gibi

enflamatuar ilişkili İdiyopatik Nefrotik Sendrom (INS) hastalarında genetik belirteç olabileceği çalışmalarla desteklenmektedir [7].

Daha önceki yapılan SOCS-1 ve SOCS-3 gen ifade seviyeleri ile ilgili çalışmada, OHH kriz grubunun SOCS-1 gen ifadesinin, orak hücre anemisi ve sağlıklı kontrollerden anlamlı derecede düşük olduğu fakat SOCS-3 gen ifadesinin kontrol grubuna göre değişmediği sonucu elde edilmiştir [41]. SOCS-1 gen ifadesinin kriz döneminde azalması, özellikle SOCS-1 geninin inflamasyonla ilişkili olduğu ve inflamasyonu azaltıcı yönde etki yapabileceği fikrini ve SOCS-1 gen lokusunda SNP farklılıklarının olabileceğini düşündürmektedir.

### **3. MATERYAL ve YÖNTEM**

#### **3.1. Araştırma Populasyonu**

Zoorska (2014), Trengove (2013), Egan (2016) kaynakları incelendiğinde ve bölgemizdeki mevcut hasta kayıtları dikkate alındığında yaklaşık 100 hasta olduğu ve bunun %30-40'nın çalışmaya katılmayı kabul etmeyebileceği göz önünde bulundurulduğunda minimum 70 OHH'lı çocuk, 70 sağlıklı kontrol grubu ile araştırmanın yürütülmesi planlandı. OHH'lı bireyler ve OHH'lı olmayan bireyler Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Bilim Dalı Kliniğine başvuran çocuklar arasından dahil etme kriterleri göz önüne alınarak seçildi.

#### **Gönüllülerin/dosyaların/kayıtların/materyallerin araştırmaya dahil edilme kriterleri**

##### **i) Hasta grubu**

- 1) Orak hücre hastası 2 yaş üstü 24 yaş altı bireyler
- 2) Gönüllü olur formunu imzalayıp çalışmaya katılmayı kabul eden tüm bireyler
- 3) Orak hücre hastalığı dışında farklı bir hemoglobinoziye sahip olmayan bireyler
- 4) Bilinen başka kronik ya da inflamatuvar bir hastalığı olmayan bireyler.

##### **ii) Kontrol grubu**

- 1) 2 yaş üstü 24 yaş altı hasta olmayan (sağlıklı) bireyler.
- 2) Gönüllü olur formunu imzalayıp çalışmaya katılmayı kabul eden tüm bireyler
- 3) Bilinen herhangi bir mevcut hastalığı olmayan bireyler.

#### **Gönüllülerin/dosyaların/kayıtların/materyallerin araştırmadan dışlanma kriterleri**

##### **i) Hasta grubu**

- 1) 2 yaşın altında ve 24 yaşın üzerinde olan bireyler
- 2) Orak hücre hastalığı dışında farklı hemoglobinoziye sahip bireyler
- 3) Bilinen başka kronik ya da inflamatuvar hastalığı olan bireyler
- 4) Gönüllü olur formunu imzalamayan ve çalışmaya katılmayı kabul etmeyen bireyler

##### **ii) Kontrol grubu**

- 1) 2 yaşın altında ve 24 yaşın üzerinde olan bireyler
- 2) Bilinen herhangi bir mevcut hastalığı olan bireyler
- 3) Gönüllü olur formunu imzalamayan ve çalışmaya katılmayı kabul etmeyen bireyler

## 3.2. Materyal

### 3.2.1. Kullanılan Cihazlar

- PZR cihazı (Thermal Cyclers, Eppendorf Mastercycler)
- Hassas Terazı (Scaltec)
- Mikropipet Seti (Brand- 0,2-2µl, 2-20µl, 20-200µl)
- Mikrodalga Fırın (Beko-MD 1500)
- Güvenlik Kabini (Heraeus-HERA safe)
- Elektroforez Güç Kaynağı (Biometra P30)
- Elektroforez Tankı (Agagel Mini Biometra)
- Jel Görüntüleme Sistemi (Vilber Lourmat Marne La Vallée, France)
- Derin Dondurucu (Uğur)
- Etüv (Memmert)
- Otoklav (Nüve-OT 020)
- Buzdolabı (Indesit)
- Vortex (NM-110)
- Distile su cihazı (Nüve NS 108)

### 3.2.2. Kullanılan Malzemeler

- Borik asit (Sigma B6768 Lot-BCBS7652)
- Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), disodium salt dihydrate (Sigma E5134 Lot-BCBV7014)
- Trisma base (Sigma T1503, Lot-SLBL6398V)
- Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), disodium salt dihydrate (Sigma E5134 Lot-BCBV7014)
- 25mM MgCl<sub>2</sub> (Thermo Scientific)
- %95'lik etil alkol (Sigma E-285 USA)
- Etidyum-Bromid (Sigma E8751-1G USA)
- Agaroz (Sigma- A-9539 lot 013K0008)
- Taq DNA Polimeraz (Thermo Scientific)
- 10X PCR Buffer (KCl/NH<sub>4</sub>) (Thermo Scientific)
- 10mM dNTP Mix (Thermo Scientific)
- 100 bç'lik Markır (100 bp DNA Step Ladder) (Thermo Scientific)
- %95'lik etil alkol (Sigma E-285 USA)
- Metilen mavisi (Sigma 6900 USA)

- Etidyum-Bromid (Sigma E8751-1G USA)
- DNase, RNase içermeyen su (Thermo Scientific)
- Primerler
- Distile Su
  - ✓ SOCS1 geni, promotor bölgesi -1478 CA/del polimorfizmi  
F: 5'-TGTCGTCCAGCTGCACCTC-3'  
R: 5'-ACCACAGGCTTCAGAGGAAC-3'
  
  - ✓ SOCS1 geni, ekson2, 1335 G/C polimorfizmi  
F: 5'-GCT GCT GGAGCACTACGT G-3'  
R: 5'-CCAGATACAGTTAAGCTGCTAC-3'
- Restrüksiyon Endonükleaz Enzimleri
  - ✓ HpyF3I (DdeI) (Thermo Scientific ER1881)  
5'...C↓TNAG...3'  
3'...GANT↑C...5'
  - ✓ Hpy188III (Biolaps R06622S)  
5'...TC↓NNGA...3'  
3'...AGNN↑CT...5'

### **3.3. Yöntemler**

#### **3.3.1. Kan Alımı:**

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Kliniği'nde mevcut takip edilen 70 OHH'lı çocuk hasta, aynı yaş aralığında 70 sağlıklı birey olmak üzere toplam 140 bireyden oluşan deney grubu Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD'dan Çocuk Hematolojisi Bilim Dalı Başkanı Selma Ünal'ın onayı ile, hasta çocukların takip edildikleri klinikte, taşıyıcı ebeveynlerin ise Mersin Üniversitesi Çiflikköy Kampüsü Mediko Sosyal Ünitesi Laboratuvarında kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri MEİTAM'da bulunan Hemoglobinopati laboratuvarına getirilerek +4°C'de buzdolabında depolandı. Çalışmanın bundan sonraki aşamaları da bu merkezde yapıldı. Toplanan kan örneklerinden DNA izolasyonu yapıldı ve örnekler -20°C saklandı. Daha sonra SNP genotiplendirmesi için, çalışmanın bundan sonraki aşamaları da MEİTAM Biyoteknoloji laboratuvarlarında Fluidigm marka Biomark otomatik sekans cihazında gerçekleştirildi.

#### **3.3.2. Kandan DNA Eldesi ve Kalitatif/Kantitatif Analizleri**

Toplanan kan örneklerinin DNA izolasyonu tam kan veya "Buffycoat"dan yapılacaktır. Uygulama için hazır DNA izolasyon kiti kullanıldı. Aşağıda verilmiş üretici tarafından hazırlanan izolasyon protokolüne göre yapıldı. Elde edilen DNA örnekleri bir sonraki analize kadar +4°C buzdolabında saklandı. Bundan sonra sırasıyla örnek DNA'nın jel elektroforeziyle kontrolü, mikro-volüm spektrofotometre cihazıyla kantitatif miktar tayini, PCR-DNA titrasyon kontrolü aşamalarından sonra Fluidigm marka Biomark Real Time PCR sisteminde Flexisix SNP chip ile gerçekleştirildi.

#### **3.3.3. Tam Kan ya da Buffy-Coat'dan DNA İzolasyonu**

1. 2ml'lik tüplere 200-300µl tam kan veya 200µl "buffy-coat" pipetlenir, üzerine 200µl "Binding Buffer" ve 40µl proteinaz K eklenerek, karışım vortekslenir ve 70°C'de 10 dakika inkübasyona bırakılır.
2. Kısa santrifüjden sonra üzerine 100µl izopropanol eklenir ve vortekslenerek santrifüj edilir.
3. Filtreli kolonlar 2ml'lik tüplere yerleştirilir ve örnekler kolona aktarıldıktan sonra 8000 dev/dk.'da 1 dakika santrifüj edilerek kolon yeni tüpe aktarılır.
4. Kolon üzerine 500µl "inhibitor removal buffer" eklenir ve tekrar 8000 dev/dk.'da 1 dakika santrifüj edilir ve kolonlar yeni tüpe aktarılır.

5. **Yıkama işlemi:** Kolon üzerine 500µl “wash buffer” eklenir ve 8000 dev/dk.’da 1 dakika santrifüj edilir, kolonlar yeni tüpe aktarılır.
6. **Yıkama işlemi:** Kolon üzerine 500µl “wash buffer” eklenir ve 8000 dev/dk.’da 1 dakika santrifüj edilir ve akan sıvı atılarak kolon aynı tüpe yerleştirilir. Tekrar kolon 13000 dev/dk.’da 30 saniye santrifüj edilir.
7. Kolonlar 1,5 ml’lik tüplere aktarılır ve üzerine 200µl 70°C’ye ısıtılmış “elution buffer” eklenir, 1-2 dakika bekletildikten sonra DNA, filtre kolondan 8000 dev/dk.’da 1 dakika santrifüj edilerek aktılır.  
Elde edilen DNA örnekleri +4°C veya -20°C’de saklanacaktır.

#### 3.3.4. Buffy Coat Eldesi:

1. 2-4ml tam kan 2-4ml izotonik çözelti (PBS) ile 15ml’lik falcon tüplerde karıştırılır.
2. Hazırlanan kan+PBS karışımına, temiz bir falcon tüpte bulunan 4-8ml ficol üzerine hafifçe yayılır.
3. 1500 dev/dk. da tam salınımlı rotor ile 30dk santrifüj yapılır.
4. Üstte kalan süpernatant uzaklaştırılır.
5. İlk katmana temas etmeden ara katmandaki beyaz hücreler steril temiz bir tüpe aktarılır.
6. Örnek hacmi 200µl’den az ise hacmi PBS kullanarak artırılabilir.

#### 3.3.5. Tek Nükleotid Polimorfizmlerinin Belirlenmesi

Tek nükleotid polimorfizmini tespit etmek için hasta ve sağlıklı kontrol grubundan alınan kanlardan elde edilen DNA örnekleri PZR-RFLP yöntemi kullanılarak analiz edildi.

##### 3.3.5.1. SOCS1 geni promotor -1478 CA/del (rs33989964) Tek Nükleotid Polimorfizmi

PZR tekniği ile gen bölgesi önce çoğaltıldı ve daha sonra çoğaltılan bu bölge Hpy 31Ddel enzimi ile kesilerek polimorfizm varlığı araştırıldı. **(Tablo 3.1.)**

**Tablo 3.1.** SOCS1 geni Promotor -1478 CA/del (rs33989964) Tek Nükleotid Polimorfizmi PZR-RFLP yönteminde kullanılan primer dizileri.

<b>Polimorfizm Bölgesi</b>	<b>Primer Adı</b>	<b>Nükleotid dizisi (5'-3')</b>	<b>Uzunluk (bç)</b>
<b>SOCS1</b>	<b>-1478-F</b>	<b>TGTCGTCCAGCTGCACCTC</b>	<b>250</b>
<b>Promotor</b>	<b>-1478-R</b>	<b>ACCACAGGCTTCAGAGGAAC</b>	
<b>-1478CA/del</b>			

PZR karışımı serin ve steril bir ortamda hazırlandı. Toplam son hacim 25µl olacak şekilde nükleaz free distile su, 10X PZR tamponu [KCl'li] (Thermo scientific), MgCl<sub>2</sub> (Thermo scientific), dNTP (Thermo scientific), primerler (-1478-F ve -1478-R), Taq DNA polimeraz (Thermo scientific) dimetilsülfoksit (DMSO) MARKASı ve izole edilen DNA eklenerek hazırlandı. Her bir örnek için reaksiyon karışımı (tablo 3.2.) 'de belirtilmiştir.

**Tablo 3.2.** SOCS1 geni Promotor -1478 CA/del polimorfizmi PZR reaksiyon karışımı

<b>PZR malzemeleri</b>	<b>Miktar</b>
NFDS	10 µl
10X PZR tamponu	2.5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2.5 µl
DMSO	2.5 µl
dNTP mix (10 mM)	1 µl
-1478-F (100 pmol/µl)	0.5 µl
-1478-R (100 pmol/µl)	0.5 µl
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	0.5 µl
Toplam PZR karışımı hacmi	25 µl
DNA	5 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>25 µl</b>

Oluşturulan PZR karışımı vortekste karıştırıldıktan sonra, her bir örneğe ait steril 0,2ml'lik PZR tüplerine 20µl olacak şekilde paylaştırıldı. Her bir örneğe ait tüpe 5µl DNA konulup ısı döngü cihazına yerleştirildi. SOCS1 geni -1478 CA/del polimorfizmi için ısı döngü cihazında PZR koşulları tablo 3.3.'teki gibi uygulanmıştır.

**Tablo 3.3.** SOCS1 geni Promotor -1478 CA/del polimorfizmi amplifikasyonunda kullanılan PZR koşulları

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	5dakika	
Denatürasyon	95	30 saniye	
Primer Bağlanması (Annealing)	58	30saniye	35
Zincir Uzaması (Extension)	72	1 dakika	
Son Uzaması (Extension)	72	5 dakika	
Bekleme	10	∞	∞

Primer spesifik PZR tekniği ile amplifiye edilen 250 bç'lik bölge *DdeI* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesildi. PZR-RFLP yönteminde her bir örnek için reaksiyon karışımı Tablo 3.4.'de belirtilmiştir.

**Tablo 3.4.** SOCS1 geni Promotor -1478 CA/del polimorfizmi RFLP reaksiyon karışımı

RFLP malzemeleri	Miktar
10X Buffer <i>DdeI</i>	2.5 µl
Restriksiyon enzimi ( <i>DdeI</i> )	0.5 µl
PZR ürünü	10 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>13 µl</b>

Hazırlanan RFLP karışımı vortekste karıştırıldıktan sonra, her bir örneğe ait steril 0,2ml'lik PZR tüplerine 3µl olacak şekilde paylaştırıldı. Her bir örneğe ait PZR ürününden 10µl'si enzim ve buffer içeren tüplere ilave edildikten sonra tüpler ısı döngü cihazına yerleştirildi. SOCS1 geni -1478 CA/del polimorfizmi için ısı döngü cihazında RFLP koşulları Tablo 3.5.'deki gibi uygulanmıştır.

**Tablo 3.5.** SOCS1 geni Promotor -1478 CA/del polimorfizmi restriksiyonunda kullanılan RFLP koşulları

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
İnkübasyon	37	16 saat	1
İnaktivasyon	65	20 dakika	1
Bekleme	4	∞	∞

Kesim reaksiyonu tamamlandıktan sonra, örnekler elektroforez uygulanmak üzere +4°C buzdolabına kaldırıldı.

### 3.3.5.2. SOCS1 Geni 1335 G/C (rs11549428) Tek Nükleotid Polimorfizmi

Polimorfizmden sorumlu gen bölgesi önce primer spesifik PZR tekniği (Tablo 3.6.) ile çoğaltılmakta daha sonra çoğaltılan bu bölge *HPY188III* enzimi ile kesilerek polimorfizm varlığı araştırılmaktadır.

**Tablo 3.6.** SOCS1 ekson2 1335 G/C (rs11549428) Tek Nükleotid Polimorfizmi PZR-RFLP yönteminde kullanılan primer dizileri.

Polimorfizm bölgesi	Primer Adı	Nükleotid dizisi (5'-3')	Uzunluk (bç)
<b>SOCS1 Ekson2 1335 G/C</b>	1335 G/C-F	GCTGCTGGAGCACTACGTG	439 bç
	1335 G/C-R	CCAGATACAGTTAAGCTGCTAC	

PZR karışımı steril, temiz kabinlerde hazırlandı. Toplam son hacim 25µl olacak şekilde nükleaz free distile su, 10X PZR tamponu [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>] (Thermo scientific), MgCl<sub>2</sub> (Thermo scientific), dNTP (Thermo scientific), primerler (1335-F ve 1335-R), Taq DNA polimeraz (Thermo scientific) DMSO MARKA ve izole edilen DNA konularak hazırlandı. Her bir örnek için reaksiyon karışımı **Tablo 3.7.**'de belirtilmiştir.

**Tablo 3.7.** SOCS1 geni ekson2 1335 G/C polimorfizmi PZR reaksiyon karışımı

PZR malzemeleri	Miktar
NFDS	8.5 µl
10X PZR tamponu	2.5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2.5 µl
DMSO	2.5 µl
d NTP mix (10 mM)	1 µl
1335G/C-F (100 pmol/µl)	0.5 µl
1335G/C-R (100 pmol/µl)	0.5 µl
Taq DNA polimeraz (5 U/µl)	0.5 µl
Toplam PZR karışımı hacmi	25 µl
DNA	7 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>50 µl</b>

PZR karışımı vortekste karıştırıldıktan sonra, her bir örneğe ait steril 0,2ml'lik PZR tüplerine 18µl olacak şekilde paylaştırıldı. Tüplere 7'şer µl DNA örneği konulup ısı döngü cihazına yerleştirildi. SOCS1 geni ekson2 1355G/C polimorfizmi için ısı döngü cihazında PZR koşulları **Tablo 3.8.**'teki gibi uygulanmıştır.

**Tablo 3.8.** SOCS1 geni ekson2 1335G/C polimorfizmi amplifikasyonunda kullanılan PZR koşulları

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık(°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	6 dakika	
Denatürasyon	95	30 saniye	
Primer Bağlanması (Annealing)	55	30 saniye	35
Zincir Uzaması (Extension)	72	30 saniye	
Son Uzaması (Extension)	72	7 dakika	
Bekleme	10	∞	∞

PZR tekniği ile amplifiye edilen 439 bp'lik bölge *Hpy188III* restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesildi. PZR-RFLP yönteminde her bir örnek için reaksiyon karışımı Tablo 3.9.'de belirtilmiştir

**Tablo 3.9.** SOCS1 geni ekson2 1335G/C polimorfizmi RFLP reaksiyon karışımı

RFLP malzemeleri	Miktar
10X Buffer <i>HPY188III</i>	2,5 µl
Restriksiyon enzimi ( <i>HPY188III</i> )	0.5 µl
PZR ürünü	10 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>13 µl</b>

RFLP karışımı vortekste karıştırıldıktan sonra, her bir örneğe ait steril 0,2ml'lik PZR tüplerine 3µl olacak şekilde paylaştırıldı. Üzerlerine de 10'ar µl PZR ürünü konulup ısı döngü cihazına yerleştirildi. SOCS1 geni ekson2 1335G/C polimorfizmi için ısı döngü cihazında RFLP koşulları **Tablo 3.10.**'daki gibi uygulanmıştır.

**Tablo 3.10.** SOCS1 geni ekson2 1335G/C polimorfizmi restriksiyonunda kullanılan RFLP koşulları

Reaksiyon Aşaması	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
<b>İnkübasyon</b>	<b>37</b>	<b>16 Saat</b>	<b>1</b>
<b>İnaktivasyon</b>	<b>80</b>	<b>20 Dakika</b>	<b>1</b>
<b>Bekleme</b>	<b>10</b>	<b>∞</b>	<b>∞</b>

Kesim reaksiyonu tamamlandıktan sonra, örneklere elektroforez uygulanmak üzere +4°C buzdolabına kaldırıldı.

### 3.3.6. Agaroz Jel Elektroforez İşlemi

PZR yöntemi ile tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen bölgeleri çoğaltıldıktan sonra %0,8'lik agaroz jel etidyum bromid (Et-Br) ile boyandı, amplifikasyon ürünleri 3µl Loading ile pipetaj yapılarak ilk kuyucuga marker olmak üzere sırasıyla jele yüklendi ve elektroforez yapıldı. Jelde yürütülen DNA'ların uzunlukları, moleküler ağırlık standardı ile karşılaştırılarak tespit edildi. Beklenen uzunlukta DNA bulunan amplifikasyon ürünlerine RFLP reaksiyonu ile kesim işlemi yapıldıktan sonra ürünler %2'lik agaroz jelin etidyum bromid (Et-Br) ile boyanmasının ardından jele yüklendi ve elektroforezi yapıldı. Elektroforez tamponu olarak Tris-Borik Asit-Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) [TBE] kullanıldı. 10X TBE tamponu kullanım sırasında 1/10 oranında distile su ile sulandırıldı ve 1X TBE şeklinde kullanıldı.

- **Agaroz Jelin Hazırlanması**

Erlen Mayer içerisine pzs ürünleri için jel konsantrasyonu %0,8 olacak şekilde 0,32gr agaroz ve 40ml 1X TBE solüsyonu eklendi, RFLP ile kesim ürünleri için ise %2'lik olacak şekilde 0,80gr agaroz ve 40ml 1X TBE solüsyonu konularak ve homojen saydam hale gelinceye kadar mikrodalga fırında ısıtıldı. Biraz soğuduktan sonra çeker ocak içerisinde Et-Br'den jel içine 2µl eklendi ve elle homojen dağılması için çalkalandı. Daha sonra jel, tarakların yerleştirildiği jel tepsisine yavaşça döküldü. Katılaşıma kadar (10-15 dakika) oda sıcaklığında çeker ocakta bekletildi.

- **Agaroz jele yükleme yapılması**

Katılaştıran jel elektroforez tankına yerleştirildi. PZR-RFLP reaksiyonları ile amplifiye edilip ardından kesim yapılan ürünlerden 6,5'er µl alınarak parafilm üzerinde 3µl 1X TBE ile hazırlanmış yükleme tamponu (%20 süktroz veya gliserol, %0,25 brom fenol mavisi) ile pipetaj yapılarak karıştırıldı. Daha sonra da elektroforez tankına yerleştirilen jelin kuyucuklarına sırasıyla yüklendi. Tankın kapağı kapatıldıktan sonra güç kaynağı çalıştırıldı. 130mA akımda 50-60 dakika örneklerin jelde yürütmesi yapıldı. Yükleme tamponunun brom fenolden gelen mavi rengi takip edilerek jelin 2/3'lük kısmına gelindiğinde elektroforez işlemi durduruldu. Jel tanktan çıkarılarak 312nm dalga boyunda ışık veren UV-translüminatörü kullanılarak jel görüntüsü bilgisayara kaydedildi.

### 3.3.7. Tek Nükleotid Polimorfizminden Sorumlu Gen Bölgelerinin Tespiti

SOCS1 geni promotor bölgesinde bulunan -1478 CA/ del tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen bölgesi yapılan PZR-RFLP reaksiyonu ile amplifiye edildikten sonra *DdeI* kesim enzimi ile kesildi, jel elektroforezi ardından yapılan görüntüleme neticesinde 250 bç hizasında görülen bantlar hedef bölge olarak değerlendirildi.

SOCS1 geni 2.ekson'da bulunan 1335 G/C tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen bölgesi PZR-RFLP yöntemleriyle amplifiye edildi ve ardından *Hpy188III* kesim enzimiyle kesildi. Jel elektroforezi ardından yapılan görüntüleme neticesinde 439 bç hizasında görülen bantlar hedef bölge olarak değerlendirildi.

### 3.3.8. İstatistiksel Analiz

Hasta ve kontrol gruplarında, genotiplerin ve allellerin ilişkileri incelenmesinde Ki-Kare testi kullanılmıştır. Genotiplerin dengede olup olmadığı Hardy-Weinberg testi ile kontrol edilmiştir. Bütün analizlerde istatistik anlamlılık seviyesi 0,05 olarak alınmıştır ( $p < 0,05$ ).

## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. Hasta ve Sağlıklı Kontrol Gruplarının Genel Özellikleri

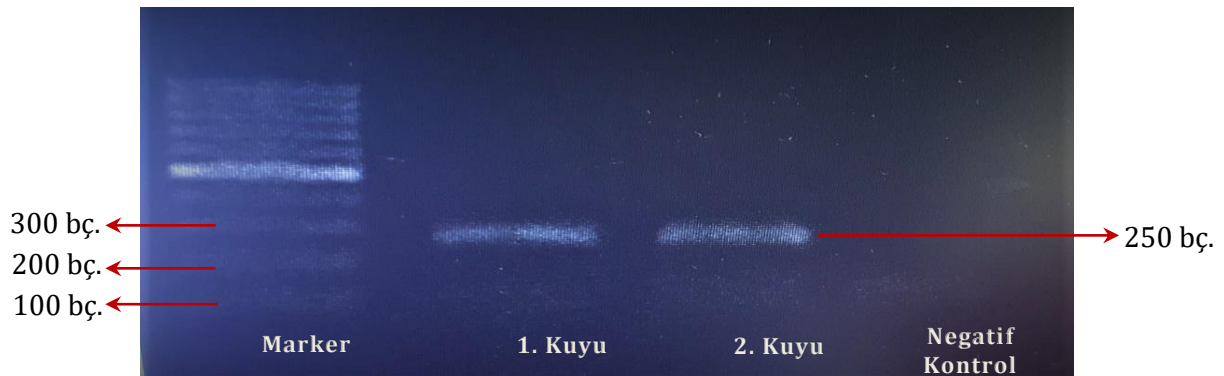
Bu çalışmada Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Anabilim Dalı'ndaki hastalardan alınan kan örneklerinden, elde edilen DNA'lar kullanılmıştır. DNA örneklerinin 70'i OHH ve 70'i Kontrol grubu gönüllülerden alınan örneklerdir.

### 4.2. Tek Nükleotid Polimorfizm Sonuçları

Bölgemiz dahilinde olan OHH hastalarının SOCS geni üzerindeki polimorfizmlerini belirlemek amacıyla yaptığımız bu çalışmada 70 hasta 70 sağlıklı kontrol ile çalışılmış olup, SOCS1 promotor -1478 CA/del ve ekson2'de bulunan 1335 G/C tek nükleotid polimorfizmleri PCR-RFLP yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Literatür taraması sonucunda, Bölgemizde OHH ile SOCS1 gen polimorfizmi ilişkisini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır, bu anlamda yapılan ilk çalışmadır.

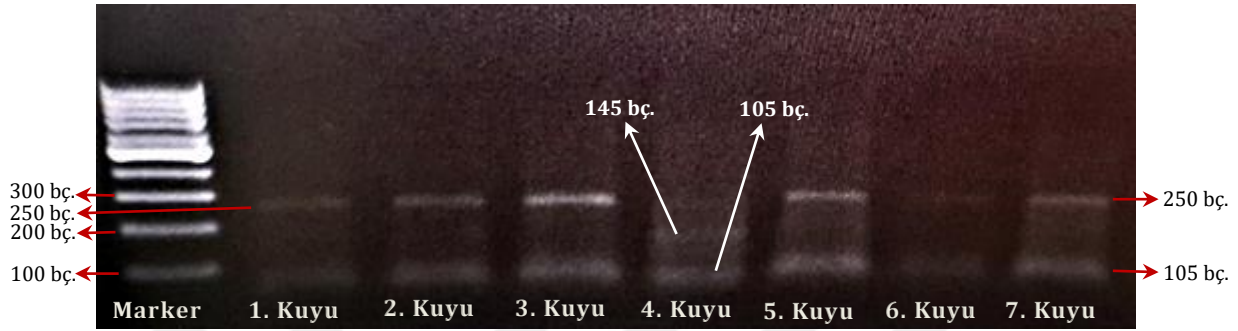
#### 4.2.1. SOCS1 geni promotor -1478 CA/del Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları

Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarından elde edilen ve çalışma zamanına kadar -20°C'de saklanan DNA örneklerinin primer spesifik PZR tekniği ile amplifikasyonu gerçekleştirildi. Amplifikasyon sonrası elde edilen 250 bç'lik PZR ürünlerinin %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü şekil 4.1.'de verilmiştir.

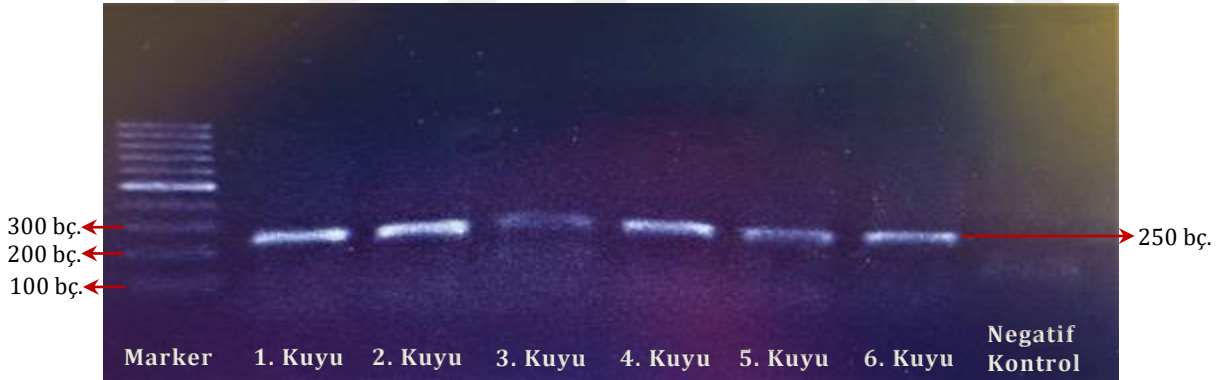


**Şekil 4.1.** SOCS1 geni promotor -1478 CA/del tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen bölgesinin primer spesifik PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 250 bç'lik bölgenin %1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü [Kuyu M: 100 bç DNA moleküler ağırlık standardı (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, SM0241, Thermo Scientific), Kuyu 1, 2: 250 bç'lik amplifikasyon ürünleri]. Kuyu 3, N: Negatif kontrol.

Daha sonra *Ddel* restriksiyon endonükleaz enzimi ile ampliconların kesimi yapılarak polimorfizm varlığı araştırıldı. RFLP sonucunda oluşan fragman uzunlukları %2'lik agaroz jel elektroforezinde 250bç (del/del); 145, 105 ve 250 bç (CA/del); ve 145, 105bç (CA/CA) şeklinde görüldü (Şekil 4.2.).



**Şekil 4.2.** SOCS1 geni promoter -1478 CA/del tek nükleotid polimorfizmi PZR ürünlerinin *Ddel* restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu oluşan fragman uzunluklarının %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. [Kuyu M: 100 bç DNA moleküler ağırlık standardı (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, SM0241, Thermo Scientific), Kuyu 1, 2, 3, 5, 6, 7: CA/del Heterozigot (250 bç+105 bç), Kuyu 4: CA/CA Homozigot (145 bç+105 bç)].



**Şekil 4.3.** SOCS1 geni promoter -1478 CA/del tek nükleotid polimorfizmi PZR ürünlerinin *Ddel* restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu oluşan fragman uzunluklarının %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. [Kuyu M: 100 bç DNA moleküler ağırlık standardı (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, SM0241, Thermo Scientific), Kuyu 1, 2, 3, 4, 5, 6: del/del Homozigot], Kuyu 7, N: Negatif kontrol.

Agaroz jel elektroforez sonrası oluşan bant paternlerinin incelenmesi sonrası hasta ve sağlıklı kontrol gruplarındaki allel ve genotip dağılımı **Tablo 4.1.**'de verilmiştir.

**Tablo 4.1.** Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarındaki SOCS1 geni promotör -1478 CA/del genotip ve allel dağılımı

Polimorfizm bölgesi	Hasta Grubu (n=83)	Kontrol Grubu (n=65)	p	OR	%95 GA	p
<b>SOCS1</b>						
<b>-1478 CA/del</b>						
<b>Genotip</b>						
CA/CA	8 (%9,63)	36 (%55,38)	<0,001			
CA/del	64 (%77,10)	27 (%41,53)		10,677	4,387-25,9333	<0,001
del/del	11 (%13,25)	2 (%3,07)		24,750	4566-134,166	<0,001
<b>Allel</b>						
CA	80 (%48,2)	99 (%76,1)	<0,001			
del	86 (%51,8)	31 (%23,9)		3,433	2,071-5,691	<0,001

Hasta grubu SOCS1-1478 CA/del genotipi bakımından Hardy-Weinberg dengesinde değildir ( $p<0,001$ ). Ancak kontrol grubu SOCS1-1478 CA/del genotipi bakımından Hardy-Weinberg dengesindedir ( $p=0,250$ ).

SOCS1-1478 CA/del genotipi ile grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardır ( $p<0,001$ ). Buna göre hasta ve kontrol grubu arasında CA/CA ( $p<0,001$ ), CA/del ( $p<0,001$ ) ve del/del ( $p=0,030$ ) oranları bakımından anlamlı bir fark vardır.

Hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla CA/del genotipi CA/CA genotipine göre 10,677 kat daha fazla görülmektedir ( $p<0,001$ ).

Hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla del/del genotipi CA/CA genotipine göre 24,750 kat daha fazla görülmektedir ( $p<0,001$ ).

SOCS1-1478 CA/del allel frekansları ile grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki vardır ( $p<0,001$ ).

Hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla CA alleli, del allele göre 3,433 kat daha fazla görülmektedir ( $p<0,001$ ).

#### 4.2.2. SOCS1 Geni Ekson2 1335 G/C Tek Nükleotid Polimorfizmi Sonuçları

Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarından elde edilen ve çalışma zamanına kadar -20°C'de saklanan DNA örneklerinin primer spesifik PZR tekniği ile amplifikasyonu gerçekleştirildi. Amplifikasyon sonrası elde edilen 439 bç'lik PCR ürünlerinin %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü (Şekil 4.4.)'de verilmiştir.



**Şekil 4.4.** SOCS1 geni 1335 G/C tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen bölgesinin primer spesifik PZR yöntemi ile amplifikasyonu sonrası oluşan 439 bç'lik bölgenin %1'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü [Kuyu M: 100 bç DNA moleküler ağırlık standardı (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, SM0241, Thermo scientific), Kuyu 1-4: 439 bç'lik amplifikasyon ürünleri, Kuyu 5: Negatif kontrol.

Daha sonra *Hpy188III* restriksiyon endonükleaz enzimi ile ampikonların kesimi yapılarak polimorfizm varlığı araştırıldı. RFLP sonucunda oluşan fragman uzunlukları %2'lik agaroz jel elektroforezinde 185, 180, 74 bç şeklinde görüldü (Şekil 4.5.).



**Şekil 4.5.** SOCS1 geni 1335 G/C tek nükleotid polimorfizminden sorumlu gen bölgesi PZR ürünlerinin *Hpy188III* restriksiyon enzimi ile kesimi sonucu oluşan fragman uzunluklarının %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü. [Kuyu M: 100 bç DNA moleküler ağırlık standardı (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, SM0241, Thermo scientific), kuyu 1-4: C/C homozigot (185 ve 180 bantları birlikte, 74 bantı)].

Agaroz jel elektroforez sonrası oluşan bant paternlerinin incelenmesi sonrası hasta ve sağlıklı kontrol gruplarındaki genotip dağılımı Tablo 4.2.'de verilmiştir.

**Tablo 4.2.** Hasta ve sağlıklı kontrol gruplarındaki SOCS1 geni ekson2 1335 G/C genotip dağılımı

Polimorfizm bölgesi	Hasta Grubu (n=70)	Kontrol Grubu (n=70)
<b>SOCS1 1335 G/C Genotip</b>		
G/G	-	-
G/C	-	-
C/C	70	70

SOCS1 geni ekson2 bölgesinde varlığı araştırılan 1335 G/C tek nükleotid polimorfizmi hem hasta hem de kontrol grubunda C/C genotipinde bulunmuştur. Sitokin üretimine bağlı olarak ortaya çıkan inflamasyonun düzenlenmesinde önemli görevi olan SOCS1 geninde araştırdığımız tek nükleotid polimorfizimlerinin OHH hastalarında hastalığa olan yatkınlık ya da dirençte etkili olduğunu gösterecek herhangi bir veriye rastlanılmamıştır.

#### 4.3. Tartışma

İnflamasyon, yabancı ve zararlı etkilere karşı organizmanın doğal savunma mekanizmasıdır. Bu olaya birçok hücre ve araçlar karışır. Ateroskleroz, miyokard infarktüsü, romatoid artrit, yenidoğan akciğer hastalığı, sepsis, menenjit gibi ciddi hastalıkların patogeneğinde önemli yere sahiptir. İnflamatuvar reaksiyonlarda, o bölgede salınan araçların etkisiyle ısı artışı, kızarıklık, şişlik, ağrı ve fonksiyonlarda azalma semptomları ortaya

çıkılmaktadır. Bu reaksiyonlarda akut faz reaktanları (CRP, SAA, fibrinojen), trombositler ve endotel hücreleri ve nötrofiller, makrofajlar, sitokinler, (IL-1, IL-6, IL-8 ve TNF- $\alpha$  gibi), gibi pek çok aracı rol almaktadır [42].

Bu çalışmada, inflamatuvar bir hastalık olan OHH hastalarında; SOCS1 genindeki SNP'ler incelenmiştir. Bu genlerde meydana gelen polimorfizimler, hastalığın şiddeti ve gelişimiyle ilişkilendirilmiştir.

Bölümümüzde daha önce Hatice SEVGİ tarafından yapılan SOCS proteininin gen ifade düzeyi ile ilgili araştırmada OHH hastalarının CRP düzeylerinin kontrol grubuna göre oldukça arttığı görülmüştür. Akut faz reaktanlarından CRP, inflamasyonun genel bir göstergesi olarak tanımlanır. CRP düzeyindeki artış da daha önce OHH hastalarında bildirilmiştir [43, 44]. Kontrol grubu ve OHH hastalarına göre kriz hastalarının CRP düzeyleri daha fazla artmıştır. Çünkü kriz hastalarında inflamasyon bulguları artmış ve buna bağlı olarak CRP düzeyleri de yükselmiştir. Buradan İnflamatuvar bir hastalık olan OHH hastalarının krize girdiği dönemde CRP düzeylerinin yüksek olduğu sonucuna ulaşılabilir.

Platt ve arkadaşları lökosit sayısının artışının OHH'nın şiddetinde önemli bir risk faktörü olduğunu göstermiştir. OHH olan tüm bireylerin aynı gen mutasyonuna sahip olmasına rağmen, hastalığın klinik şiddeti bireylere göre farklılık gösterir. Hastalığın en yaygın klinik bulgusu ağrılı krizdir ve yılda 10'dan daha fazla tekrarlanabilir [45].

Aynı zamanda lökosit sayısı da hastalığın şiddeti için çok önemli bir risk faktörüdür. Lökosit sayısı yüksek olan hastaların genç yaşta ölme olasılığı daha yüksektir. Lökosit sayısının artışı sessiz beyin infarkt gelişimi için de bir risk faktörüdür [46]. Artan lökosit sayısı devam eden kronik inflamasyonu yansıtır ya da verilen bir uyarana karşı inflamatuvar yanıt geliştirme eğilimi gösterir. Sevgi H.'nin çalışmasında da inflamasyon nedeniyle hastaneye başvuran kriz hastalarının lökosit sayılarının kontrol grubuna göre oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. Orak hücre hastalığında inflamasyon bulgularının artması ve hastalık şiddetinin ilerlemesi durumunda lökosit sayısı artmıştır. Lökosit sayısındaki artış tüm hastalarda aynı oranda gözlenmemiştir. Bu da orak hücre hastalığının şiddetinin bireylere göre değişebileceğini göstermektedir. Buna bağlı olarak, bu durum Platt ve arkadaşlarının çalışmalarındaki bulguları desteklemektedir [45].

Hepatosellüler karsinomada (HCC) SOCS-1 promotor bölgesi hipermetilasyon ile baskılanınca gen ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir [35]. SOCS-1 gen ifadesinin azalması

hipermetilasyon dışında SOCS-1 gen bölgesinde meydana gelen delesyonlar ve mutasyonlar ya da polimorfizmlerle ilişkilendirilebilir.

Ayrıca SOCS-1 ve SOCS-3 gen ifadelerinin hepatosellüler karsinomada (HCC) araştırılması sonucunda HCC hücrelerinde SOCS-1 ifadesinin önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir. Bu durum SOCS-1'in HCC'nin gelişimi ve/veya ilerlemesini engellediğini düşündürmektedir. SOCS-1 ifadesinin azalmasının doku hasarı ve inflamasyonu artırabileceği sonucuna ulaşılmıştır. SOCS-1 ifadesinin arttığı gibi SOCS-3 ifadesinde de HCC hücrelerinde azalma gözlemlenmiştir. SOCS-1 ve SOCS-3 genlerinin malignitelerin gelişimi ve ilerlemesinde yer alabileceği sonucuna ulaşılmıştır [47]. İmmün düzenleyici işlevlerin büyük bir kısmında SOCS-1'in inflamatuvar hastalıkların patolojisinde rol oynadığı görülmektedir [48].

SOCS1, negatif feedback mekanizması ile inflamatuvar hastalıkların sitokin sinyal yollarını düzenler. SOCS1 protein seviyesindeki düşüş bu mekanizmasının bozulmasına ve aşırı inflamasyona neden olabilmektedir. Chan ve ark.'nın Tayvan'da 147 romatoid artritli hasta ve 96 sağlıklı kontrol grubu ile yaptıkları çalışmada, SOCS1 geninin promotör bölgesinde bulunan -1478 CA/del varlığının ve SOCS1 mRNA ekspresyon seviyesinin hastalığa olan yakınlıkla ilişkisi araştırılmıştır. SOCS1 mRNA seviyesi ile hastalık arasında anlamlı ilişki bulunamamıştır. Ayrıca hasta ve kontrol grubunda -1478 CA/del SNP ile romatoid artrit arasında anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir [49].

Japonya'da Inoue ve ark.'nın otoimmün tiroit hastalarıyla yaptıkları bir çalışmada, periferik Th1 oranının Th2 ve Th17'den daha yüksek seviyede olmasından dolayı, hastalığın prognozunda Th1'in önemli olabileceğini varsaymışlardır. SOCS1 knockout CD4+ hücrelerinin, şartlar uygun olsa dahi Th2 ya da Th17 yerine Th1'e farklılaşması ise SOCS1'in Th1 farklılaşması üzerinde inhibitör etkisi olduğunu göstermektedir. Burdan yola çıkılarak SOCS1 promotöründe bulunan -1478 CA/del polimorfizminin bu farklılaşmadaki rolü olabileceği düşünülmüştür. Hashimoto tiroiti ve Graves hastalarıyla, hastalığın gelişimi ve prognozu üzerine polimorfizmin etkisi sağlıklı kontrol grubunda dahil edildiği bir çalışmada incelenmiştir, ancak hasta ve kontrol grubunda anlamlı farklılık görülmediği için SOCS1 promotöründe meydana gelen -1478 CA/del polimorfizminin Th1 farklılaşmasına bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır [50].

Harada ve ark.'nın Japonya'da astımlı hastalarla yaptıkları bir çalışmada, SOCS1 geni üzerinde bulunan -5388 C/T, -3969 C/T ve -1478 CA/del (rs33989964) polimorfizimlerinin sıklığının yüksek olduğu tespit edilmiştir. Astım hastalarının akciğer epitelyal hücrelerindeki

SOCS1 ekspresyon seviyesinin yüksek olduğu ve Promotör bölgesindeki -1478 CA/del polimorfizmin astıma olan duyarlılık ile ilişkili olduğu bulunmuştur [51].

Kahn ve ark.'ları tarafından SOCS gen ekspresyon yollarının, sitokin kaynaklı insülin direncine aracılık ettiği gösterilmiştir [52].

Gül ve ark.'nın yaptığı çalışmada polikistik over sendromu-insülin direnci ilişkisinin SOCS1 -1478 CA/del SNP'i ile ilişkisi araştırılmıştır. Hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla yüksek insülin direnci, obezite ve dislipidemi olduğu tespit edilmiştir. Hasta ve kontrol gruplarının SOCS1 -1478 CA/del polimorfizminin sıklığı bakımından bir farklılık göstermediği belirlenmiştir. Ayrıca SOCS1 -1478 CA/del polimorfizmi ile insülin direnci ve polikistik over sendromu arasında anlamlı bir ilişki olmadığı tespit edilmiştir [53].

Kronik periodental inflamasyon sırasında IL-6, IFN-  $\gamma$  ve TNF- $\alpha$  gibi pro-inflamatuar sitokinlerin ekspresyonu, SOCS1 tarafından düzenlenmektedir. Brezilya'da yapılan bir çalışmada, SOCS1 promotör bölgesinde bulunan -1478 CA/del ve -820 C/A polimorfizimleri ile kronik periodontitis arasındaki ilişki araştırılmıştır. SOCS1 -820 C/A polimorfizmi için A alleli hastalığa karşı duyarlılıkla ilişkili bulunurken, -1478 CA/del polimorfizminin hastalıkla ilişkisi olmadığı tespit edilmiştir [35].

Prolaktin hormonu, Sistemik lupus eritramatozun (SLE) patogeneğinde önemli rol oynar [54]. Mononükleer kan hücrelerindeki SOCS1 ekspresyonunu indüklediği bulunmuştur. Chan ve ark.'ları tarafından Tayvan'da SLE hastalarıyla yapılan bir çalışmada, SOCS1 mRNA ekspresyon seviyesi ve SOCS1 SNP'nin hastalığın gelişimi ve klinik bulguları ile olan ilişkisi araştırılmıştır. SOCS1 mRNA ekspresyon seviyesinin, SLE'li hastalarda sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede arttığı tespit edilmiştir. Araştırılan 1335 G/C ve -1478 CA/del polimorfizmlerinin, SLE'nin klinik belirtileri ile ilişkili olabilirken, SLE'nin gelişiminde etkili olmadığı vurgulanmıştır [55].

Ülseratif kolit (UC) hastalarının kolon mukozasında IL-4 ve IFN-  $\gamma$ 'nın ekspresyonları aşırı inflamasyon nedeniyle, normalden çok daha fazladır ve SOCS1 bu durumu regüle eder [56]. Ülkemizde 2013 yılında yapılan bir çalışmada inflamatuvar bir hastalık olan UC hastalığında SOCS1 promotör -1478 CA/del polimorfizminin hastalığa yatkınlıkla ilişkisinin var olup olmadığı araştırılmıştır. Sonuç olarak -1478 CA/DEL polimorfizminin, UC hastalığına yatkınlıkta ve hastalığın fenotipik yansımada bir etkisinin bulunmadığı belirtilmiştir [57].

Chan ve arkadaşları SOCS1 geninde 1335 G/C polimorfizminin varlığını tespit etmek amacıyla PZR-RFLP yöntemini kullanarak bir çalışma yapmışlar; hasta ve kontrol gruplarının her ikisinde de G allelinin bulunmadığını saptamışlardır. Romatoid artrit ile SOCS1 geni ekson2 bölgesinde bulunan 1335 G/C polimorfizmi arasında bir ilişki bulunamamıştır [58].

Ülseratif kolitli hastaların iltihaplı kolon mukozasıyla ilgili yapılan araştırmada, SOCS1 promotör -1478 CA/del polimorfizmi için Tayvan, Japonya ve içinde Türk kökenli hastalarında bulunduğu değişik hasta grupları ve sağlıklı kontrol grupları ile çalışılmıştır. Sağlıklı deneklerin bu ülkelerin popülasyonunu temsil ettiğini düşündüğümüzde polimorfizmin, ülkelerin popülasyonlarındaki genotipik dağılımında farklılıklar olduğu dikkat çekmektedir. Bizim grubumuzda daha önce yapılan Ersoy L.'nin çalışmasında, yine Hartavi [56] ve Gül [52]'ün çalışmalarında kontrol gruplarındaki "del" allel sıklığının Tayvan ve Japon popülasyonlarına kıyasla daha yüksek olduğu görülmektedir. Yine bu araştırmalar neticesinde Japon ve Tayvanlı kontrol deneklerinin "CA" allel sıklığı ülkemizde çalışılan kontrol gruplarındaki CA alleli sıklığından önemli derecede yüksek olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar, bize SOCS1 genotip dağılımında etnik ve coğrafik farklılıkların olabileceğini göstermektedir.

Polonya'da idiyopatik nefrotik sendrom (İNS)'lu hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada, SOCS1, SOCS3 ve SOCS5 genlerinde bulunan çeşitli polimorfizmlerin hastalığın tedavisinde etkin olan steroid yanıtıyla ilişkisi araştırılmıştır. İnflamatuar etkileri de olan sitokinlerin antijen-spesifik immun yanıtı ve glomerül hasarını başlattığı düşünülmektedir. Bu çalışmada, Sanger dizileme yöntemi kullanılarak 1335 G/C polimorfizmi çalışılmış olup SOCS gen bölgelerinde bulunan polimorfizmlerin allel ve genotip dağılımları bakımından kontrol ve hasta grubunda önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Steroid dirençli grupta 1335 G/C SNP'de C allelinin oranı daha yüksek bulunmuştur [59].

Ersoy L.'nin, TB'ye yatkınlık ile SOCS1 gen polimorfizmleri arasındaki ilişkiyi araştırdığı tez çalışması bu çalışmayla, SOCS1 promotör bölgesinde bulunan ve fonksiyonel etkinliği tespit edilmiş olan -1478 CA/del SNP'si ve ekson2 bölgesinde bulunan 1335 G/C SNP'nin varlığı araştırılmış ancak sonuç olarak hastalığa yatkınlıkla bu SNP'ler arasında anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir [60].

İnflamatuar hastalıklarda önemli rol oynayan SOCS proteinlerinin gen polimorfizmlerinin OHH'a yatkınlık ile arasındaki ilişkiyi araştırılan bu tez çalışmasında, SOCS1 promotör bölgesinde bulunan ve fonksiyonel etkinliği tespit edilmiş olan -1478 CA/del SNP'si ile anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir. Daha öncede Yoshikawa'nın Hepatosellüler karsinomada

SOCS1 promotor gen bölgesinin hipermetilasyon ile baskılanarak SOCS1 ekspresyonu üzerindeki etkisi gözlemlenmiş ve sonuç olarak bu bölgedeki ekspresyonun azaldığı tespit edilmiştir [35]. Bu tez çalışmasında da promotor bölgesinde meydana gelen delesyon, hasta gruplarında anlamlı bir şekilde kontrol gruplarından daha fazla çıkmıştır. Bu da promotor bölgesinde bulunan -1478 CA/del polimorfizminin hastalığın şiddeti ve seyrinde etkili olabileceği ve etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde yol gösterici bir bilgi olabileceğini düşündürmektedir.

Ancak, ekson2 bölgesinde bulunan 1335 G/C SNP'nin varlığı tespit edilememiş olup hastalığa yatkınlıkla bu SNP'nin hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir ilişkisi tespit edilememiştir.

İncelenen literatür çalışmasına göre; daha önce bölgemizde OHH'lı hastalarda yapılmış SOCS1 gen polimorfizmiyle ilişkili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez çalışması, bu anlamda yapılmış ilk çalışma olma özelliğini göstermektedir.

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada OHH'lı 83 hasta ve 65 kontrol grubu bireylerin SOCS1 gen bölgesinde promotör bölgesinde bulunan -1478 CA/del ve ekson2'de bulunan 1335 G/C tek nükleotit polimorfizmi araştırılmış olup hastalığa yatkınlıkta etkili olup olmadıkları, PCR-RFLP yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır. Sonuç olarak SOCS1 promotör bölgesinde bulunan ve fonksiyonel etkinliği tespit edilmiş olan -1478 CA/del SNP'si ile anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir. Ancak ekson2 bölgesinde bulunan 1335 G/C SNP'nin varlığı tespit edilememiş olup hastalığa yatkınlıkla bu SNP'nin arasında anlamlı bir ilişkisi tespit edilememiştir.

İnflamatuar hastalıklarda önemli rol oynayan SOCS proteinlerinin gen polimorfizmlerinin OHH'a yatkınlık ile arasındaki ilişkiyi araştırdığımız çalışmamızda, SOCS1 promotör bölgesinde bulunan ve fonksiyonel etkinliği tespit edilmiş olan -1478 CA/del SNP'si ile anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir. Daha öncede Yoshikawa'nın Hepatosellüler karsinomada SOCS-1 promotör gen bölgesinin hipermetilasyon ile baskılanarak SOCS-1 ekspresyonu üzerindeki etkisi gözlemlenmiş ve sonuç olarak bu bölgedeki ekspresyonun azaldığı tespit edilmiştir [35]. Bu tez çalışmasında da promotör bölgesinde meydana gelen delesyon hasta gruplarında anlamlı bir şekilde kontrol gruplarından daha fazla çıkmıştır. Bu da promotör bölgesinde bulunan -1478 CA/del polimorfizminin hastalığın şiddeti ve seyrinde etkili olabileceği ve etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde yol gösterici bir bilgi olabileceğini düşündürmektedir.

Ülseratif kolitli hastaların iltihaplı kolon mukozasıyla ilgili yapılan araştırmada, SOCS1 promotör -1478 CA/del polimorfizmi Tayvan, Japonya ve içinde Türk kökenli hastanında bulunduğu değişik hasta grupları ile çalışılmıştır. Yine Leyla ERSOY'un çalışmasında ve bu tez çalışmasında elde edilen veriler birbirlerini desteklemekte olup "CA" allel sıklığının Japon ve Tayvan'lı kontrol deneklerinin "CA" allel sıklığından önemli dercede düşük olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar, SOCS1 genotip dağılımında etnik ve coğrafik farklılıkların olabileceğini göstermektedir.

OHH da günümüzde yapılan gen tedavisi yöntemi (KIT) Kemik İliği Transplantasyonu büyük olmasına karşın bu tedavi yöntemi düşük gen ekspresyonu nedeni ile yavaş ilerlemektedir. Bu tedavi yaklaşımının promotör bölgesindeki -1478 CA/del ve diğer SNP'ler de dikkate alınarak geliştirilmesi açısından önemli olabileceğini düşünmekteyiz.

Bu tez çalışmasıyla SOCS1 Tek Nükleotit Polimorfizmi-OHH arasındaki ilişki ilk kez araştırılmış olup, ileride yapılacak çalışmalar için literatüre katkı sağlamış olacaktır.

## KAYNAKLAR

- [1] Wang, W. C. 2009. Sickle cell anemia and other sickling syndromes. In: Greer JP, Foerster J, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, Arber DA, Means RT (eds). Wintrobe's Clinical Hematology. Philadelphia: Lippincot Williams and Wilkins, 1038-82.
- [2] Embury, S. H. (2000). Sickle cell anemia and associated hemoglobinopathies, 21sted. (Editör: Goldman, L., Bennett, J. C.), Cecil Textbook of Medicine, Philadelphia: WB Saunders Company, 893-905.
- [3] Hope, C. C., Walters, M. C. (2001). Bone marrow transplantation in sickle cell anemia. Cur Opin Oncol, 13(5): 85-90.
- [4] Orak hücre hastalığında eritrositlerin elektron mikroskopik görünümü. 1 Haziran 2019 tarihinde, <http://tipwiki.blogspot.com/2015/10/kan-hucreleri.html> adresinden erişildi.
- [5] Orak hücre hastalığında nokta mutasyonu. 20 Haziran 2019 tarihinde <http://www.biyolojidefteri.com/index.php/kromozom-yapisindaki-degisimler> adresinden erişildi.
- [6] Mary, E. E. (2000). Hereditary hemolytic anemias. In: (Tintinalli, J. E., Kelen, G. D., Stapczynski, J. S. eds), Emergency Medicine, A Comprehensive Stuy Guide, 5th. North Carolina: McGraw Hill Companies Inc, 1382-1387.
- [7] Zaorska, K., Ostalska-Nowicka D., Kempisty B., Nowicki, M., Zabel, M. (2000). Association of SOCS 1, SOCS 3 and SOCS 5 Polymorphisms and Steroid Response in Children With İdiopathic Nephrotic Syndrome JNRT 6(3)2014:13-26 North arolina: McGraw Hill Companies Inc, 1382-1387.
- [8] Aksoy, M., Lekin, E. W., Maurant, A. E., Lehman, H. (1958). Blood groups hemoglobins and thalasemia in Southern Turkey and Eti Turks. Brit, Med. J, 2: 937.
- [9] Arcasoy, A., Canatan, D. (2003). Dünyada ve Türkiye'de talasemi ve hemoglobinopatiler. Ulusal Hemoglobinopati Konseyi-Sağlık Bakanlığı, 2. Baskı, Antalya-Türkiye, 11-19.
- [10] Canatan, D., Köse, M. R., Üstündağ, M., Haznedaroğlu, D., Özbag, S. (2006). Hemoglobinopathy Control Program in Turkey. Community Genet, 9: 124- 126.
- [11] Eraslan, S. (2005). Beta Talaseminin Moleküler Tanısı. Düzen Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi, Ankara-Türkiye.
- [12] Styles, L. A., Vichinsky, E. (1994). Effects of a long-term transfusion regimen on sickle cell-related illnesses. J Pediatrics, 125: 909-11.
- [13] Emmel, V. E. (1917). A study of the erythrocytes in a case of severe anemia with elongated and sickle shaped red blood corpuscles. Archives of Internal Medicine, 20: 586-98.

- [14] Talasemi (Akdeniz Anemisi). 20 Haziran 2019 tarihinde <https://manisaism.saglik.gov.tr/yazdir?0E23172FA72C6A1887C10A92819E12E3> adresinden erişildi.
- [15] Charache, S., Terin, M. L., Moore, R. D. (1995). Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. *N Eng J Med*, 332: 1317.
- [16] Vermynen, C., Cornu, G. (1994). Bone marrow transplantation for sickle cell disease: The European experience. *Am J Pediatr Hematology Oncol*, 16: 18.
- [17] Allison, A. C. (1954). The distribution of sickle cell trait in East Africa and elsewhere, and its apparent relationship to the incidence of subtertian malaria. *Transactions of Royal Society Of Tropical Medicine and Hygiene*, 48: 312-318.
- [18] Okpala, I. (2002). Management of pain in sickle cell disease. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 95: 456-58.
- [19] Arcasoy, A., Canatan, D., Sinav, B., Kutlay, L., Oğuz, N., Şen, M., Bengü, A. (2001). Serum zinc levels and zinc binding capacity in thalassemia. *J Trace Elem Med Biol*, 15: 85-87.
- [20] Sevgi, H., Özçimen, A. A., Özdemir, Ö., Aymak, F., Umut, G., Kaçar, Y., Oral, H. B. (2012). The investigation of suppressor of cytokine signaling (SOCS-1 and SOCS-3) gene expression in sickle cell anemia. *Molekular Immunology and Immunogenetics Congress*, pp131 (p40) April 27-29, Antalya-TURKEY.
- [21] Andus, T., Bauer, J., Gerok, W. (1991). Effects of cytokines on the liver. *Hepatology*, 13: 364-375.
- [22] Campbell, I. L. (2005). Cytokine-mediated inflammation, tumorigenesis, and disease associated JAK/STAT/SOCS signaling circuits in the CNS", *Brain Research Reviews*, 48: 166-177.
- [23] Güneş, H. (1999). Sitokinlerin Hücre Döngüsü Üzerinde Etkileri. *Tr. J. of Biology, TÜBİTAK*, 23: 283-292.
- [24] Redding-Lallinger, R., Knoll, C. (2006). Sickle cell disease-pathophysiology and treatment. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, 36(10): 346-376.
- [25] Chim, C. S., Wong, A. S. Y., Kwong, Y. L. (2004). Epigenetic dysregulation of the JAK/STAT pathway by frequent aberrant methylation of SHP1 but not SOCS-1 in acute leukaemias. *Ann Hematol*, 83: 527-532.
- [26] Watanabe, D., Ezoe, S., Fujimoto, M., Kimura, A., Saito, Y., Nagai, H., Tachibana, I., Matsumura, I., Tanaka, T., Kanegane, H., Miyawaki, T., Emi, M., Kanakura, Y., Kawase, I., Naka, T., Kishimoto, T. (2004). Suppressor of cytokine signalling-1 gene silencing in acute myeloid leukaemia and human haematopoietic cell lines. *British Journal of Haematology*, 126: 726-735.
- [27] Okochi, O., Hibi, K., Sakai, M., Inoue, S., Takeda, S., Kaneko T., Nakao, A. (2003). Methylation-mediated silencing of SOCS-1 gene in hepatocellular carcinoma derived from cirrhosis. *Clinical Cancer Research*, 9: 5295-5298.

- [28] Johan, M. F., Bowen, T., Frew, M. E., Goodeve, A. C., Reilly, T. (2005). Aberrant methylation of the negative regulators RASSF1A, SHP-1 and SOCS-1 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *British Journal of Haematology*, 129: 60-65.
- [29] Zhou, H., Miki, R., Eeva, M., Fike, F. M., Seligson, D., Yang, L., Yoshimura, A., Teitell M. A., Jamieson, C. M. A., Cacalano, N. A. (2007). Reciprocal regulation of SOCS1 and SOCS3 enhances resistance to ionizing radiation in glioblastoma multiforme. *Clinical Cancer Research*, 13(8), 2344–2353.
- [30] Valentino, L., Pierre, J. (2006). JAK/STAT signal transduction: Regulators and implication in hematological malignancies. *Biochemical pharmacology*, 71: 713-721.
- [31] Greenhalgh, C. J., Alexander, W. S. (2004). Suppressors of cytokine signalling and regulation of growth hormone action. *Growth Horm IGF Res*, 14: 200-206.
- [32] Larsen, L., Ropke, C. (2002). Suppressors of cytokine signalling: SOCS. *APMIS*, 110: 833-844.
- [33] Park, C., Li, S., Cha, E., Schindler, C. (2000). Immune response in Stat2 knockout mice. *Immunity*, 13(6), 795–804.
- [34] Hanada, T., Yoshimura, A. (2002). Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 13: 413–421.
- [35] Yoshikawa, H., Matsubara, K., Qian, G. S., Jackson, P., Groopman, J. D., Manning, J. E., Harris, C. C., Herman, J. G. (2001). SOCS-1, a negative regulator of the JAK/STAT pathway, is silenced by methylation in human hepatocellular carcinoma and show growth-suppression activity. *Nature Genetics*, 28: 29-35.
- [36] Egan, P. J., Lawlor, K. E., Alexander, W. S., Wicks, I. P. (2003). Suppressor of cytokine signaling-1 regulates acute inflammatory arthritis and t cell activation. *Journal of Clinical Investigation*, 111(6), 915–924.
- [37] Sasi, W., Sharma, A. K., Mokbel, K. (2014). The Role of Suppressors of Cytokine Signalling in Human Neoplasms. *Molecular Biology International*, 2014(Table 1), 1–24.
- [38] Whyte, C. S., Bishop, E. T., Ruckerl, D., Gaspar-Pereira, S., Barker, R. N., Allen, J. E., Rees, A. J., Wilson, H. M. (2011). Suppressor of cytokine signaling (SOCS)1 is a key determinant of differential macrophage activation and function. *Journal of Leukocyte Biology*, 90(5), 845–854.
- [39] De Sepulveda, P., Okkenhaug, K., La Rose, J., Hawley, R. G., Dubreuil, P., Rottapel, R. (1999). Socs1 binds to multiple signalling proteins and suppresses Steel factor-dependent proliferation. *EMBO Journal*, 18(4), 904–915.
- [40] Rui, L., Yuan, M., Frantz, D., Shoelson, S., White, M. F. (2002). SOCS-1 and SOCS-3 block Insulin signaling by ubiquitin-mediated degradation of IRS1 and IRS2. *Journal of Biological Chemistry*, 277(44), 42394–42398.

- [41] Ghosh, A., Pahan, K. (2012). Gemfibrozil, a Lipid-lowering Drug, Induces Suppressor of Cytokine Signaling 3 in Glial Cells: Implications For Neurodegenerative Disorders. *Journal of Biological Chemistry*, 287(32), 27189–27203.
- [42] Gannong, F. W. *Tıbbi Fizyoloji*. 19.baskıdan çeviri, Barış Kitabevi, Ankara, (1999):550-552.
- [43] Bourantas, K. L., Dalekos, G. N., Makis, A., Chaidos, A., Tsiara, S., Mavridis, A. (1998). Acute phase proteins and interleukins in steady state sickle cell disease. *Eur J Haematol*, 61: 49–54.
- [44] Hedo, C. C., Aken“ova, Y. A., Okpala, I. E., Durojaiye, A. O., Salimonu, L. S. (1993). Acute phase reactants and severity of homozygous sickle cell disease. *J Intern Med*, 233: 467–470.
- [45] Platt, O.S., Thorington, B. D., Brambilla, D. J., Milner, P. F., Rosse, W. F., Vichinsky, E., and Kinney, T. R. (1991). Pain in sickle cell disease. Rates and risk Factors. *N. Engl. J. Med*, 325(1): 11–16.
- [46] Kinney, T. R., Sleeper, L. A., Wang, W. C., Zimmerman, R. A., Pegelow, C. H., Ohene-Frempong, K., Wethers, D. L., Bello, J. A., Vichinsky, E. P., Moser, F. G., Gallagher, D. M., DeBaun, M. R., Platt, O. S., Miller, S. T. (1999). Silent cerebral infarcts in sickle cell anemia: a risk factor analysis. The cooperative study of sickle cell disease. *Pediatrics*, 103(3): 640–645.
- [47] Yoshimura, A. (2006). Signal transduction of inflammatory cytokines and tumor development. *Cancer Sci*, 97(6): 439–447.
- [48] Yoshimura, A., Nishinakamura, H., Matsumura, Y., Hanada, T. (2005). Negative regulation of cytokine signaling and immune responses by SOCS proteins. *Arthritis Res Ther*, 7(3): 100-10.
- [49] Chan, H. C., Ke, L. Y., Liu, C. C., Chang, L. L., Tsai, W. C., Liu, H. W., & Yen, J. H. (2010). Increased expression of suppressor of cytokine signaling 1 mRNA in patients with rheumatoid arthritis. *The Kaohsiung journal of medical sciences*, 26(6), 290-298.
- [50] Inoue, N., Watanabe, M., Nakaguchi, A., Ueda, D., Kawaguti, H., Hidaka, Y., Iwatani, Y. (2017). Functional polymorphisms affecting Th1 differentiation are associated with the severity of autoimmune thyroid diseases. *Endocrine journal*, 64(7), 695-703.
- [51] Harada, M., Nakashima, K., Hirota, T., Shimizu, M., Doi, S., Fujita, K., Shirakawa, T., Enomoto, T., Yoshikawa, M., Moriyama, H., Matsumoto, K., Saito, H., Suzuki, Y., Nakamura, Y., Tamari, M. (2007). Functional polymorphism in the suppressor of cytokine signaling 1 gene associated with adult asthma. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 36(4), 491-496.
- [52] Kahn, S. E., Hull, R. L., Utzschneider, K. M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 444(7121), 840.
- [53] Oz Gul, O., Cander, S., Gul, C. B., Budak, F., Oral, B., & Ersoy, C. (2017). Cytokine signal suppressor (SOCS) 1-1478 CA/del gene polymorphism in Turkish patients with polycystic ovary syndrome. *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 37(7), 896-901.

- [54] Guedes, R. A., Planello, A. C., Andia, D. C., De Oliveira, N. F., & de Souza, A. P. (2015). Association of SOCS1- 820 (rs33977706) gene polymorphism with chronic periodontitis: A case-control study in Brazilians. *Meta gene*, 5, 124-128.
- [55] Lahita, R. G. (1999). The role of sex hormones in systemic lupus erythematosus. *Current opinion in rheumatology*, 11(5), 352-356.
- [56] Chan, H. C., Ke, L. Y., Chang, L. L., Liu, C. C., Hung, Y. H., Lin, C. H., ... & Yen, J. H. (2010). Suppressor of cytokine signaling 1 gene expression and polymorphisms in systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 19(6), 696-702.
- [57] Piganis, R. A., De Weerd, N. A., Gould, J. A., Schindler, C. W., Mansell, A., Nicholson, S. E., Hertzog, P. J. (2011). Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 1 inhibits type I interferon (IFN) signaling via the interferon  $\alpha$  receptor (IFNAR1)-associated tyrosine kinase Tyk2. *Journal of biological chemistry*, 286(39), 33811-33818.
- [58] Hartavi, M., Nak, S. G., Oral, B., & Deligönül, A. (2014). No association between the SOCS-1-1478CA/del polymorphism and ulcerative colitis in Turkish subjects. *Molecular biology reports*, 41(10), 6505-6508.
- [59] Zaorska, K., Ostalska-Nowicka, D., Kempisty, B., Nowicki, M., Zabel, M. (2014). Association of SOCS1, SOCS3 and SOCS5 polymorphisms and steroid response in children with idiopathic nephrotic syndrome. *Journal of Nephrology and Renal Transplantation*, 6(1), 13-26.
- [60] Ersoy, L. (2019). Tüberküloz Hastalarında SOCS1 Gen Polimorfizmlerinin Araştırılması. *Biyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. Mersin Üniversitesi. Mersin.*

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı ve Soyadı** : Yeşim TAVŞANOĞLU

**Doğum Tarihi** : 20/07/1978

**E-mail** : yesimtavsanoğlu@gmail.com

**Öğrenim Durumu** :

Derece	Bölüm/Program	Okul/Üniversite	Yıl
Lise	FEN BİLİMLERİ	ANTAKYA LİSESİ	1996
Ön Lisans	GÜMRÜK İŞLETME	MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ	1998
Lisans	İŞLETME	ANADOLU ÜNİVERSİTESİ	2004
Lisans	BİYOLOJİ	MERSİN ÜNİVERSİTESİ	2014
Formasyon	EĞİTİM BİLİMLERİ	MERSİN ÜNİVERSİTESİ	2014
İş Güvenliği Uzmanı			2015
Yüksek Lisans			
Doktora			

**Görevler** :

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl

## ESERLER (Makaleler ve Bildiriler)

- 1.
- 2.
- 3.