TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

IMATİNİB MESİLAT-DİRENÇLİ VE DİRENÇSİZ KRONİK MYELOİD LÖSEMİ HÜCRE HATLARINDA BİM VE BİD PROAPOPTOTİK GENLERİNİN POLİKOMB GRUP PROTEİNLERİ TARAFINDAN EPİGENETİK REGÜLASYONU

Süreyya BOZKURT

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU

2010-ANKARA

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

IMATİNİB MESİLAT-DİRENÇLİ VE DİRENÇSİZ KRONİK MYELOİD LÖSEMİ HÜCRE HATLARINDA BİM VE BİD PROAPOPTOTİK GENLERİNİN POLİKOMB GRUP PROTEİNLERİ TARAFINDAN EPİGENETİK REGÜLASYONU

Süreyya BOZKURT

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU

2010-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Biyoloji Doktora Programı

Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 10 /01 / 2011

Prof. Dr. Hayat ERDEM
Hacettepe Üniversitesi
Jüri Başkanı

Prof. Dr. Çiğdem GÜNGÖR
Ankara Üniversitesi
Raportör

Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU
Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Haluk ATAOĞLU
Ankara Üniversitesi

Yrd. Doç.Dr. O. Sena Aydos
Ankara Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay		ii
İçindekiler		iii
Önsöz		v
Simgeler Ve Kısaltmalar		vi
Şekiller		x
Çizelgeler		xii
1.GİRİŞ		1
1.1.	KML Patogenezi	1
1.1.1.	bcr-abl1-Pozitif Kronik Myeloid Lösemi'nin Moleküler Biyolojisi	2
1.1.2.	Blastik Faza Transformasyon	5
1.1.3.	KML Kök Hücreleri	7
1.2.	Imatinib Tedavisi ve Direnç Mekanizmaları	9
1.3.	Epigenetik Düzenlenmeler	11
1.3.1	DNA Metilasyonu	11
1.3.2.	Polikomb Grup Proteinleri ve Histon Modifikasyonları	12
1.4.	Kanserde Epigenetik Düzenlenmeler	20
1.4.1.	Kanser Genomunda DNA Metilasyonu	20
1.4.2.	Kanserde Polikomb Grup Proteinleri ve Aberan Histon Modifikasyonları	25
2. GEREÇ ve YÖNTEM		30
2.1.	Hücre Kültürü Deneyleri	30
2.1.1.	K- 562 Hücre Hattının Sıvı Azottan Çözdürülmesi	30
2.1.2.	Imatinib Mesilat Dirençli K-562/IMA-3 Hücre Hattının Kültürü	30
2.1.3.	K-562 Hücre Hattının ve K-562/IMA-3 Hücre Hattının Pasajlanması	30
2.2.	K- 562 ve K- 562/IMA-3 Hücre Hatlarının Sitogenetik Analizi	31
2.3.	Moleküler Teknikler	32

2.3.1. Hücre Kültüründen Genomik DNA İzolasyonu 32
2.3.2. Total RNA İzolasyonu 33
2.3.3. RNA'nın DNA Kontaminasyonundan Temizlenmesi 33
2.3.4. RNA ve DNA Miktarlarının Spektrofotometrik Ölçümü 34
2.3.5. Beta-aktin RT-PZR 34
2.3.6. Ters Transkripsiyon (RT) ile cDNA Eldesi 35
2.3.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) 36
2.3.8. Agaroz jel Elektroforezi 38
2.3.9. Eş-Zamanlı PZR 39
2.3.10 Metilasyon Spesifik PZR (MSP) yapılacak DNA örneklerine Bisülfit Modifikasyonu Yapılması: 41
2.3.11. Metilasyon Spesifik PZR (MS-PZR) 42
2.4. Kromatin Immunopresipitasyon Deneyleri (ChIP) 44
2.4.1. Kromatin Immunpresipitasyon (ChIP) Sonrası İmmunpresipite Edilmiş Örneklerin Konvansiyonel PZR 'ı: 49

3. BULGULAR 51

3.1. K-562 Kronik Myeloid Lösemi Hücre hattında ve Imatinib Direnci Geliştirilmiş K-562/IMA-3 Kronik Myeloid Lösemi Hücre Hattında Sitogenetik Analiz Sonuçları 51
3.2. Konvansiyonel PZR Sonuçları 57
3.3. Eş-zamanlı Kıyaslamalı Kantitatif RT-PZR sonuçları 61
3.4 ChIP deneyleri sonrası yapılan PZR sonuçları: 62
3.5 Metilasyon Spesifik PZR sonuçları (MS-PZR) 67

4.TARTIŞMA 70
5.SONUÇ VE ÖNERİLER 83
ÖZET 85
SUMMARY 87
KAYNAKLAR 89
ÖZGEÇMİŞ **99**

ÖNSÖZ

Doktora tez çalışmamın her aşamasında, bilgi ve önerileri ile yardımlarını esirgemeyen sabırlı ve güleryüzlü hocam Sayın Prof. Dr. Asuman Sunguroğlu'na en içten teşekkürlerimi sunarım.

Akademik eğitime başlamam için beni teşvik eden, destekleyen ve her konuda örnek aldığım hocam Sayın Prof. Dr. Emin Kansu'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim boyunca uygun koşulları sağlayarak tezimin tamamlanmasına büyük katkısı olan Sayın Prof. Dr. Dicle Güç'e çok teşekkür ederim.

Değerli katkılarından dolayı çalışma arkadaşlarım Uzm. Dr. Füsun Özmen, Uzm.Bio. Tülin Özkan, Uzm. Dr. Güneş Esendağlı, Uzm. Dr. Hande Canpınar ve Doç. Dr. Yusuf Baran'a teşekkür ederim.

Deneylerim sırasında yardımlarını gördüğüm arkadaşlarım, Biyolog Ayten İnanç ve Yüksek Kimyager Banu Avşar'a teşekkürü borç bilirim.

En yoğun zamanlarımda her zaman yanımda olan Sevgili aileme, eşime ve çocuklarıma da binlerce teşekkürler.

SİMGELER ve KISALTMALAR

ADP	Adenozin tri fosfat
AKT	Serin/Threonin protein kinaz
AML	Akut Myeloid Lösemi
AML1-EV11	Akut Myeloid Lösemi
Bcl-2	B-cell Lenfoma 2
Bç	Baz çifti
Bid	‘’BH3 interacting domain death agonist’’
Bim	‘’Bcl-2 interacting mediator of cell death’’
C	Santigrat
Cbx	chromobox homolog 2
Cdna	Komplementer DNA
CEBP Alfa	CCAAT/enhancer –binding protein alfa
ChIP	‘Chromatin ımmunPresipitation’
CO_2	Karbondioksit
CpG adaları	Sitozin Guanin adaları
CT	Eşik siklus
Der	Derivatif
Dk	Dakika
dH_2O	Distile su
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNMT	DNA metil transferaz
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EED	embryonic ectoderm development
EtOH	Etil alkol
EZH1	Enhancer zeste of homology 1
EZH2	Enhancer zeste of homology 2
FDU	Fluorodeoksi Uridin
G2	‘Gap 2’
GAB2	GRB2-asosiye bağlı protein2 CEBP Alfa

GTG	Giemsa/Tripsin
ERK	Ekstrasellüler Sinyal-Regüle Kinaz ,
FBS	Fetal Bovin serum
G	Gram
HDAC1	Histon deasetilaz 1
HDAC12	Histon deasetilaz 2
H2A	H2A Histon proteini
H2B	H2B Histon proteini
H3	H3 Histon proteini
H4	H34 Histon proteini
H1	H31Histon proteini
HCK	Hemopoietic cell kinase
HOXA9	homeobox A9
IgG	Immunglobulın G
INK4/ARF	ADP-ribosylation factor
Jak2	Janus kinaz 2
Kb	Kilo baz
KCl	Potasyum Klorür
KML	Kronik Myeloid Lösemi
K119	Lizin 119
LYN SRC	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog/v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)
M	Mitoz
M	Molar
Mar	marker
MBD	Metillenmiş-CpG'ye bağlanan domain proteinleri
MeCP1	Metillenmiş bölgeye bağlanan proteinler 1
MeCP2	Metillenmiş bölgeye bağlanan proteinler 2
Ml	Mili litre
MLH1	mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)
mM	Mili Molar

MSP	Metilasyon spesifik PCR
Myc	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
MYT1	myelin transcription factor 1
NAD	Nikotinamid adenin dinükleotid
NaOH	Sodyum hidroksit
NH4SO4	Sodyumsülfat
nm	Nano Metre
NTP	Nükleotid trifosfat
NUP98-	nucleoporin 98kDa
MgCl2	Magnezyum Klorür
OD	Optik dansite
PBS	Phosphor Buffer Saline
PcG	Polikomb Grup Proteinleri
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
(PI3K)/AKT	phosphoinositide-3-kinase/v-akt murine thymoma viral oncogene homolog
pmol	Piko mol
PMSF	phenylmethanesulfonylfluoride or phenylmethylsulfonyl fluoride
PRC1	Polikomb represif komleks 1
PRC2	Polikomb represif komleks 2
PRC4	Polikomb represif komleks 4
PRE	Polikomb cevap elemanı
Ph	Philadelhia Kromozomu
Phc	polyhomeotic homolog
PDGFR Alfa	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü alfa
RASSF1A	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1
Rb	Retinablastom
Ring1	ring finger protein
ROS	Reaktif oksijen Türevleri
RT-PCR	Revers transkripsiyon -PCR
RNA	Ribonükleik Asit

SAM	S-adenozil metionin
Sn	Saniye
Sırt1	NAD-bağlı histon deasetilaz
STAT5	signal transducer and activator of transcription 5A
SUZ 12	suppressor of zeste 12 homolog (Drosophila)
Taq Pol.	Taq polimeraz
TBE	Tris/Borate/EDTA
TdT	Terminal deoksinükleotidil Transferaz
Tyr	Tirozin
Ug	Mikro gram
ul	Mikro Litre
uM	Mikro Molar
UV	Ultraviyole
WNT1	wingless-type MMTV integration site family, member 1

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. BCR ve ABL1 gen yapıları (Cardama ve Cortes., 2009) 3

Şekil 1.2. BCR-ABL proteinin yapısal domainlerinin gösterimi (Cardama ve Cortes., 2009) 3

Şekil 1.3. BCR-ABL pozitif myeloid progenitörlerde moleküler sinyalizasyon (Cardama ve Cortes., 2009). 4

Şekil 1.4. KML'nin teorik modeli (Cardama ve Cortes., 2009) 8

Şekil 1.5. Imatinib mesilat'ın BCR-ABL tirozin kinazın ABL kinaz domain'ine bağlanma modeli (Wei ve ark., 2007) 10

Şekil 1.6. Omurgalı PcG protein kompleksleri. (Kerppola., 2009) 14

Şekil 1.7. EZH2' nin fonksiyonel domainleri (Simon ve Lange., 2008) 16

Şekil 1.8. PcG proteinleri tarafında gerçekleştirilen gen baskılanma modelleri. (Lund ve Lohuizen., 2004) 18

Şekil 1.9. PcG proteinlerinin kromatine hiyerarşik olarak bağlanmasının şematik gösterimi (Spivakov ve Fisher., 2007) 19

Şekil 1.10. Promotor bölge metilasyonunun etkileri (Costello ve Plas., 2001) 22

Şekil 1.11. Kanser hücrelerinde DNA ve Kromatin yapıda meydana gelen değişiklikler (Lopez ve ark., 2009) 24

Şekil 3.1. Karyotip: 63,X,-X,+2,+5,+7,+8,+10,+11,+12,+13,+14,+16,+17,+19, +der (1),+der(14),+der(18),+mar1,+mar2,+mar3 [6] 51

Şekil 3.2. Karyotip: 59,XX,,+2,+5,+6,+7,-9,+10,+11,+12,+16,+16,+17,+19, +der(1),+der(6), +der(15),+der(18) [4] 52

Şekil 3.3. Karyotip: 62,XX,+2,+5,+6,+7,+8,+11,+12,+15,+16,+19,+der(1), +der(14),+ der(15),+der(18),+mar1,+mar2,+mar3 [3] 53

Şekil 3.4. Karyotip: 66,XX,+2,+3,+5,+5,+7,+7,+10,+11,+19,+der(1), +der(14),+ der(15),+mar1,+mar2,+mar3,+mar4,+mar5,+mar6 [6] 54

Şekil 3.5. Karyotip: 66,XX,+2,+3,+5,,+7,+7,+8,,+11,+19,+der(1),+der(14), +der(15),+der(18),+mar1,+mar2,+mar3,+mar4,+mar5,+mar6,+mar7,+mar8,+mar9 [5] 55

Şekil 3.6. Karyotip: 63,XX,+1,+2,+3,+5,+6,+7,+7,+8+10,+11,+12, +19,der(14),+der(15),mar1,+mar2,+mar3,+mar4,+mar5,+mar6,+mar7,+ mar8,+mar9,+mar10 56
Şekil 3.7. EED2 geni PZR ürünü 58
Şekil 3.8. Bid geni PZR ürünü 58
Şekil 3.9. Bim geni PZR ürünü 59
Şekil 3.10. SUZ12 geni PZR ürünü 59
Şekil 3.11. EZH1 geni PZR ürünü 60
Şekil 3.12. SIRT1 geni PZR ürünü 60
Şekil 3.13. EZH2 geni PZR ürünü 61
Şekil 3.14. K-562 Kronik myeloid hücre hattı ve Imatinib mesilat dirençli K-562/IMA-3 Hücre hatlarında kıyaslamalı kantitatif EZH2, SIRT1, EED2, SUZ12, Bid ve Bim genlerinin ifadesi. 62
Şekil 3.15. K-562/IMA-3 hücrelerinin anti-H3K27me3 ile çöktürülmüş ChIP sonrası Bim geni PZR sonucu 63
Şekil 3.16. K-562/IMA-3 hücrelerinin anti-H3K27me3 ile çöktürülmüş ChIP sonrası Bid geni PZR sonucu 64
Şekil 3.17. K-562 ve K-562/IMA-3 hücrelerinin anti-H3K27me3, anti- EZH2 ve anti-Dnmt1 antikoru ile çöktürülmüş ChIP sonrası Bid geni PZR sonucu 65
Şekil 3.18. K-562 hücrelerinin anti-H3K27me3, anti- EZH2ve anti-Dnmt1 antikoru ile çöktürülmüş ChIP sonrası Bim geni PZR sonucu 66
Şekil 3.19. K-562/IMA-3 hücrelerinin anti-H3K27me3, anti- EZH2 ve anti-Dnmt1 antikoru ile çöktürülmüş ChIP sonrası Bim geni PZR sonucu 67
Şekil 3.20. K-562 ve K-562/IMA-3 Hücrelerinde Bim geni MS-PZR sonucu 68
Şekil 3.21. K-562 ve K-562/IMA-3 Hücrelerinde Bid geni MS-PZR sonucu 68

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Beta-aktin PZR reaksiyonu bileşenleri 35
Çizelge 2.2. cDNA sentez reaksiyonu bileşenleri ve koşulları 36
Çizelge 2.3. PZR Reaksiyon Bileşenleri 37
Çizelge 2.4. Genlerin primer dizileri 38
Çizelge 2.5. Eş-Zamanlı PZR reaksiyon bileşenleri 39
Çizelge 2.6. MS-PZR reaksiyon bileşenleri: 43
Çizelge 2.7. Primer Baz dizilimleri 44
Çizelge 2.8. Primer Baz dizilimleri 49
Çizelge 2.9. PZR reaksiyon bileşikleri 50

1.GİRİŞ

1.1. KML Patogenezi

KML (Kronik Myeloid Lösemi) hematopoetik kök hücrelerin klonal myeloproliferatif bir hastalığıdır. 9 ve 22. kromozomlar arasında karşılıklı translokasyon sonucu oluşan Philadelhia kromozomu ile karakterizedir. Bu translokasyonda 22. kromozom üzerinde bulunan BCR geni 9. kromozom üzerinde bulunan abl genine füzyon yapar ve bunun sonucunda oluşan kimerik bcr-abl geninin kodladığı onkoprotein hastalık patogenezi üzerinde rol oynar (Zheng ve ark., 2006).

KML başlangıçta, terminal farklılaşmayı gerçekleştirebilen klonal hematopoezin anormal genişlemesiyle karakterize myeloproliferatif bir hastalıktır. Karakteristik olarak bifazik klinik gelişim gösterir. Başlangıçtaki kronik faz yıllarca sürebilir. Ardından blastik faza geçiş görülür (Cilloni ve Saglio.,2009).

KML'nin kronik fazı, farklılaşabilen ve normal olarak fonksiyon gören, artmış sayıda myeloid hücreler ile karakterizedir. Hastaların % 90-95'i hastalığın bu fazında tanı alır. Kronik fazda kalış süresi ortalama 4 ile 6 yıl arasında değişir. Sonrasında hastalık 'akselere faza' transforme olarak blastik faz olarak bilinen fatal faza ilerler. Hastalığın ilerlemesi moleküler birtakım anomalilerin birikimi ile birlikte gider ve bu birikim lösemik klonun terminal farklılaşmasının progresif olarak kaybına sebep olur (Druker., 2008).

Blastik kriz, kronik fazdan birçok açıdan farklılıklar gösterir. KML'nin ilerlemesinde görülen başlıca fonksiyonel değişiklikler; çoğalma, farklılaşma, apoptoz ve adhezyonda görülen değişikliklerdir (Radich., 2007).

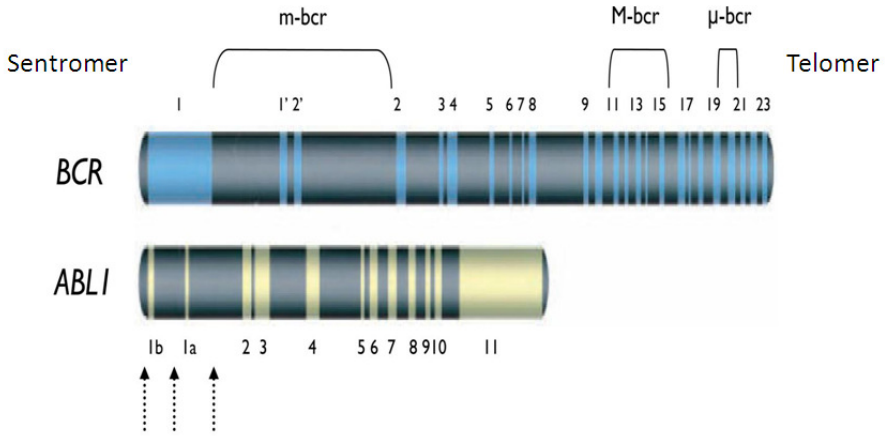
KML'nin blastik fazında, morfolojik olarak akut lösemilerde görülen blastlara benzer blast'ların sayısında artış görülür. Dünya genelinde Blastik faz için klinik kriter, kemik iliği ya da periferik kanda % 30 veya daha fazla blast'ın olması veya ekstramedullar blast hücre hastalığının varlığıdır. Blastik faz KML, myeloid ya da lenfoid olmak üzere genellikle iki tiptir. Ancak bifenotipik veya karışık lenfoblastik-myeloblastik faz da görülebilir. Myeloid blastik kriz vakaların % 60-80'inde görülürken, lenfoid blastik kriz vakaların % 20-30'unda görülmektedir. Myeloid blastik krizde, myeloblastlar myeloperoksidaz boyası ile boyandığından ve CD (Cluster of Diffrerentation)-13, CD-33 ve CD-117 gibi myeloid belirteçleri taşıdığından akut myeloid lösemiyi taklit eder. Lenfoid blast hücreleri TdT (Terminal deoksinükleotidil Transferaz) enzimi içerir. TdT enzimi çok az farklılaşmış normal ve T-hücre ve B-hücre orijinli malign hücrelerde bulunur. Lenfoblastlar sıklıkla B-hücre orijinlidir. Hastaların küçük bir yüzdesinde T-hücreli blastik kriz görülür.

Megakaryoblastik ve eritroblastik transformasyonlar ve bazofili ile işaretlenen blastik fazlar ve yüksek kan histamin seviyeleri de rapor edilmiştir (Silver., 2009).

1.1.1. bcr-abl1-Pozitif Kronik Myeloid Lösemi'nin Moleküler Biyolojisi

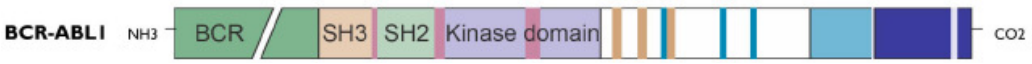
Bugüne kadar yapılan deneysel modeller ve fare modeli çalışmaları, KML patogenezinde 9 ve 22. kromozomların karşılıklı translokasyonu sonucu oluşan BCR-ABL 1 geninin kodladığı onkoproteinin rol aldığını göstermiştir. 22. kromozom üzerinde yer alan bcr geni şekil 1.1'de gösterildiği gibi 23 ekzona sahiptir ve gen üzerinde başlıca 3 kırılma noktası kümesi bölgesi yer alır. Bunlar; m-bcr, M-bcr, μ -bcr'dir. ABL1 geni ise iki alternatif 1. ekzona sahiptir. BCR-ABL1 genleri arasındaki kırılma noktalarının kombinasyonları, farklı moleküler ağırlıklı proteinleri kodlayan farklı füzyon transkriptleri oluşturur. KML hastalarının bir çoğunda BCR geni içerisindeki kırılma noktası e12-e16 (b1-b5) arasında uzanan ve 'majör kırılma noktası kümesi bölgesi' adını taşıyan 5.8 kilobaz'lık bir bölgede yer alır. Alternatif splicing sonucu 210 kdalton'luk protein kodlayan b2a2 yada b3a2 füzyon transkripti oluşur. KML vakalarının az bir kısmında BCR kırılma noktası e2' ve e2 (minör

kırılma noktası kümesi bölgesi) arasında yer alan 54.4 kilobazlık bölgede yer alır. Bunun sonucunda oluşan e1a2 transkripti 190 kilobazlık bir protein kodlar. 3. kırılma noktası kümesi bölgesi ise kronik nötrofilik lösemide bulunan 230 kilodalton'luk bir onkoprotein kodlanmasına sebep olur.



Şekil 1.1. BCR ve ABL1 gen yapıları (Cardama ve Cortes., 2009)

BCR-ABL1 proteini konstitüsyonel olarak tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. Protein bir seri fonksiyonel olarak farklı bölge içeririr (şekil 1.2). Korunmuş bölgeler olan SH3 ve SH2 bölgeleri aşağı doğru sinyal kaskadında yer alan proteinler için bağlanma bölgesi içerir. Ayrıca tirozin kinaz aktivitesine sahip bölgesi, DNA'ya bağlanma bölgesi, nüklear eksport ve lokalizasyonu sağlayan bölgeleri vardır.

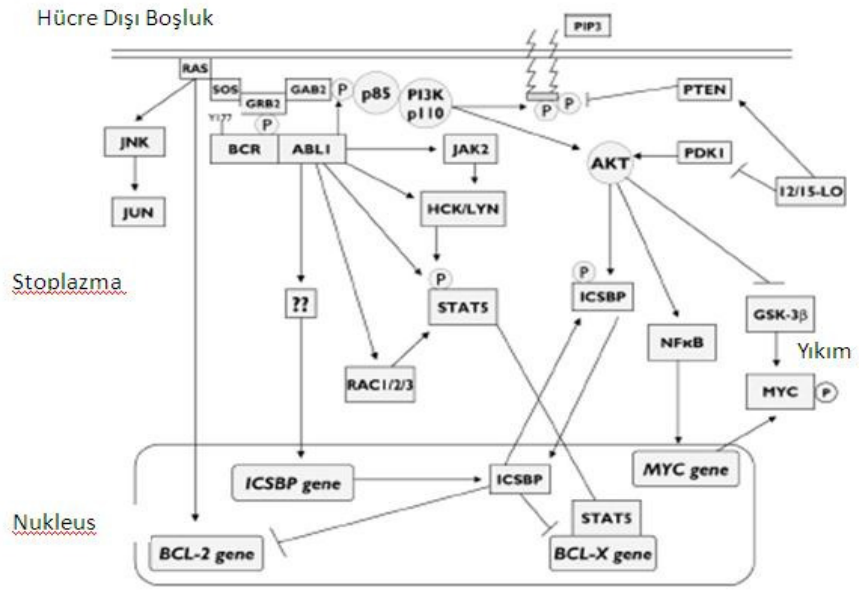


Şekil 1.2. BCR-ABL proteinin yapısal domainlerinin gösterimi (Cardama ve Cortes., 2009)

BCR-ABL1 aşağı doğru bir çok sinyal yolağını aktive eder (şekil 1.3).

BCR Tyr177'den fosforilasyon BCR-ABL aracılı lökomogenez için gereklidir. Bu fosforillenmiş Try177, growth faktör reseptör bağlı protein 2 (GRB2) için bağlanma bölgesi oluşturur. Bu da SOS (son of sevenless) proteinini bölgeye çeker ve RAS ve GAB2 (GRB2-asosiye bağlı protein 2) proteinleri aktive olur. Sonuçta BCR-ABL1 ile indüklenen GRB2/GAB2 aracılığı ile gerçekleşen GAB2 fosforilasyonu, primer KML hücrelerinde Fosfotidilinozitol 3 Kinaz yolağının (PI3K)/AKT ve ekstrasellüler sinyal-regüle kinaz (ERK) yolağının yapısal olarak aktivasyonunu sağlar. AKT aktivasyonu ile Myc onkogeninin transkripsiyonu artar.

BCR-ABL1 ayrıca STAT5'in aktivasyonunu sağlar ki bu da direkt ve indirekt olarak Jak2 ve HCK ve LYN SRC kinazlarının aktivasyonunu sağlar. Tüm aktivasyonların sonucundaki net sonuç BCL-X gen transkripsiyonun artmasıdır. Diğer taraftan BCR-ABL1, 'Interferon konsensus sekans bağlanan protein'in ' (ICSBP) transkripsiyonunu bilinmeyen bir mekanizmayla inaktive eder. Böylece BCL-2 ve BCL-X genlerinin ICSPB aracılı inhibisyonu ortadan kalkar. Sonuçta myeloid progenitörlerin hayatta kalımı artmış olur.



Şekil 1.3. BCR-ABL pozitif myeloid progenitörlerde moleküler sinyalizasyon (Cardama ve Cortes., 2009).

1.1.2. Blastik Faza Transformasyon

KML'nin progresyonu ve transformasyonundan sorumlu olan mekanizmalar komplekstir ve yalnızca kısmen anlaşılabilmiştir. KML-kronik fazdan blastik faza geçişte kritik olan bazı faktörler aydınlatılmıştır. Bunlar şu şekilde özetlenebilir.

BCR-ABL 1 ifadesi: BCR-ABL1 mRNA ve protein seviyeleri blastik fazda kronik fazdan daha yüksek bulunmuştur. BCR-ABL1 transkript seviyeleri daha primitif olan CD34+ progenitörlerde, bu hücrelerin daha fazla farklılaşmış karşılıklarından 200 kat daha yüksek bulunmuştur. İn vitro şartlarda BCR-ABL'nin, direkt olarak gelişme faktörü bağımlılığı, klonojenite, apoptoza karşı korunma ve hareketliliği regüle ettiği gösterilmiştir. Blastik fazda BCR-ABL 1 transkript seviyesinin artış sebebi iyi anlaşılamamış olsa da bunun oldukça yüksek çoğalma kapasitesine sahip az farklılaşmış lösemik klonun genişlemesine yönelik seçici bir baskı yaptığı düşünülmektedir.

Farklılaşmanın engellenmesi: BCR-ABL1, farklılaşmayla ilintili olan bazı genlerin ifadelerini regüle eden transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini modüle eder. Transkripsiyon faktörü CCAAT/enhancer –binding protein alfa (CEBP Alfa) normal granülosit farklılaşması için gereklidir ve normal kemik iliği hücrelerinde ve kronik fazdaki KML hücrelerinde ifade edilir. Aksine CEBP alfa ekspresyonu blastik faz KML'de kaybolmaktadır. CEBP Alfa'nın ifadesinin kaybı BCR-ABL1 aracılığı ile translasyonel seviyede olmaktadır. Böylece blastik fazda farklılaşmanın engellendiği belirtilmektedir. Nadiren de olsa blastik faz KML fenotipin gelişiminde BCR-ABL1'in translokasyonlarla interaksiyonu görülmektedir. Bunun sonucunda NUP98-HOXA9 ya da AML1-EV11 gibi dominant-negatif transkripsiyon faktörleri oluşmaktadır. AML-1 farklılaşmayı bloke ederken, NUP98-HOXA9 simetrik ve asimetrik bölünme arasındaki dengeyi değiştirmekte böylece immatür öncüllerin gelişimini favorize etmektedir.

Genomik kararsızlık ve DNA tamiri: BCR-ABL1'in endojenöz reaktif oksijen türevlerini (ROS) indüklediği gösterilmiştir. Bunun sonucunda kronik oksidatif DNA

hasarı, S ve G2/M hücre siklus fazlarında çift iplik kırıkları ve mutagenez olmaktadır. BCR-ABL1 kinaz aktivitesi sonucu indüklenen çift iplik kırıklarının tamirinde hatalar oluşabilmektedir. Tüm bunların sonucunda BCR-ABL1 aracılı ROS oluşumu DNA tamir yolaklarının aberan regülasyonu ile kombine olduğunda KML hücrelerinde mutator bir fenotipin oluşumuna yol açmaktadır. Sonuçta nokta mutasyonları ve sitogenetik anomaliler ile sonuçlanan genomik kararsızlık oluşmaktadır.

Ek Kromozomal Anomaliler: KML hastalarının yaklaşık olarak %80'i Ph+ hücrelerde birtakım ek anomaliler taşırlar. Bu 'klonal evolüsyon' olarak bilinmektedir ve KML'de ileri faza geçişte görülmektedir. Bu hastalarda en sık görülen ek anomalilerin başında trizomi 8 (%34), izokromozom 17 (%20), Myc onkogeni aşırı ekspresyonu ile ilintili olan dublike Ph kromozomu (%38), 17p kaybı ve BCR-ABL1 sayılabilir. Bu genetik lezyonlar myeloid blastik faz KML'de, lenfoid blastik faz KML'den daha sıklıkla görülmektedir.

Tümör süpresör genlerin inaktivasyonu: KML progresyonu ile ilintili olan mutasyonlar içinde en sıklıkla görüleni p53 tümör süpresör geninde görülen mutasyonlardır. Myeloid blastik fazda bu oran %25 ile %30 arasındadır. Ayrıca lenfoid blastik faz hastalarının %50'sinde INK4/ARF lokusunun 2. ekzonunda mutasyon görülmektedir. Bunun sonucunda p16 ve p14 genlerinde ifade kaybı gözlenmektedir. Sonuçta bu proteinlerin rol aldığı hücre siklusunun G1/S geçişindeki kontrol ortadan kalkmaktadır.

BCR-ABL1 tarafından inhibe edilen bir diğer tümör süpresör gen serin/threonin fosfataz 2A'dır (PP2A). Bu tümör süpresör gen BCR-ABL1'in antagonisti olarak fonksiyon görür. BCR-ABL1 tarafından inhibe edildiğinde ise bu antagonistik etki ortadan kalkar.

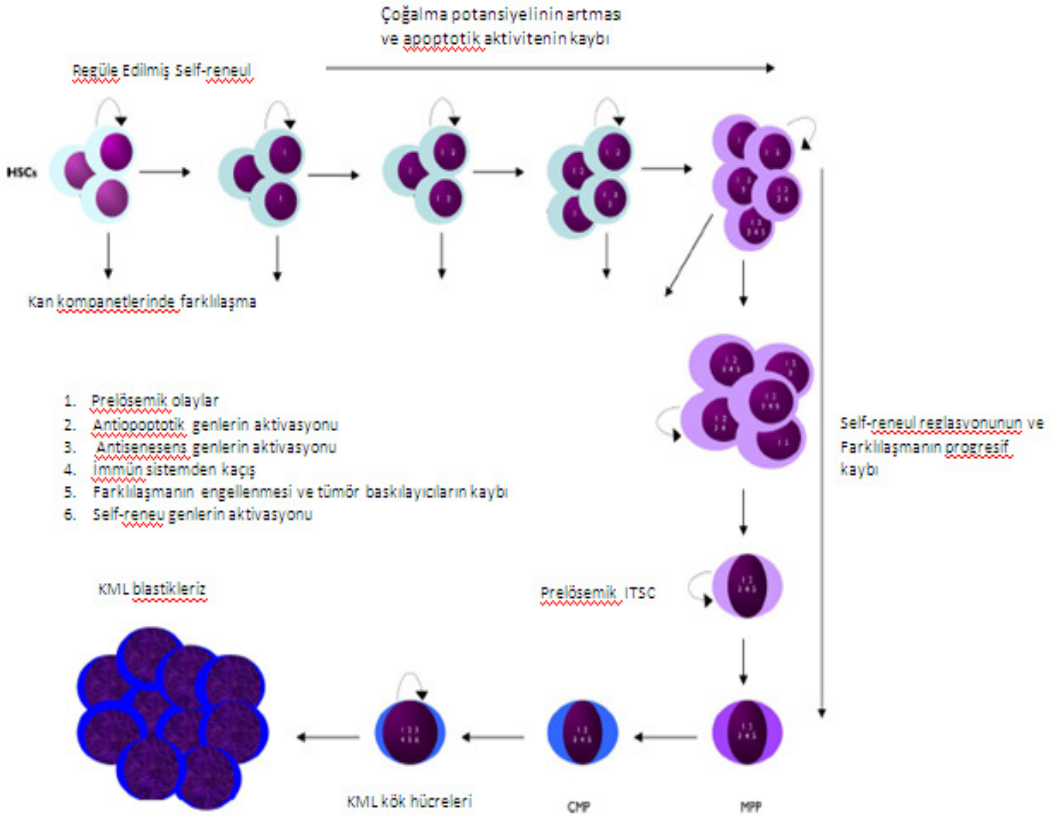
Sonuçta görülmektedir ki; KML blastik fazda görülen hücrelerde hayatta kalımın artması, çoğalma ve farklılaşmanın engellenmesinde BCR-ABL1'in hastalık

ilerlemesi boyunca bir dizi genin regülasyonunun bozulmasında etkili olması ile gerçekleştiği yönündedir.

1.1.3. KML Kök Hücreleri

BCR-ABL1 hematopoetik kök hücreleri (HSC) transforme edebilmekte ancak 'self-renewal' kapasitesinden yoksun olan yönelmiş myeloid progenitörleri transforme edememektedir. KML'de CD34+CD38- Lin- lösemik kök hücreler yüksek seviyede BCR-ABL1 ifade ederler. Kronik fazdan blastik faza geçişte lösemik kök hücreler ek olarak birtakım genetik ve/veya epigenetik anomaliler kazanırlar. Bu anomaliler bu lösemik kök hücrelere hayatta kalma avantajı, programlı hücre ölümüne karşı direnç ve çoğalma avantajı sağlar.

Blastik faz KML'ye progresyonda lösemik kök hücrelerin ekspansiyonu ya da bir grup yönlenmiş progenitörün 'self-renewal' özelliğini kazanması gerekmektedir denmektedir.



Şekil 1.4. KML'nin teorik modeli (Cardama ve Cortes., 2009)

Yukarıdaki şekil 1.4'de KML'nin teorik modeli anlatılmaktadır. Buna göre; BCR-ABL1 self-renewal potansiyeli olmayan hücreleri transforme edememektedir. Bu da kronik faz KML'nin bir hematopoetik kök hücre hastalığı olarak düşünülmesini sağlamaktadır. Hematopoetik kök hücre içinde prelösemik genetik anomalilerin birikmesi (BCR-ABL1 ekspresyonu, BCL-2 aşırı ekspresyonu gibi) bu kök hücrelere çoğalma ve hayatta kalma avantajı sağlamakta ve apoptoza karşı direnç gelişmektedir. BCR-ABL1 taşıyan yönlenmiş myeloid hücrelerde (genel myeliod progenitörler ve granülosit- monosit progenitörler) ileri birtakım genetik ve/veya epigenetik anomalilerin birikimi ve bu hücrelerin 'self-renewal' özelliğini kazanmaları ile myeloid farklılaşma bloke olmakta böylece blastik faz KML'ye geçiş yapan lösemik kök hücre klonu oluşmaktadır (Cardama ve Cortes., 2009).

1.2. Imatinib Tedavisi ve Direnç Mekanizmaları

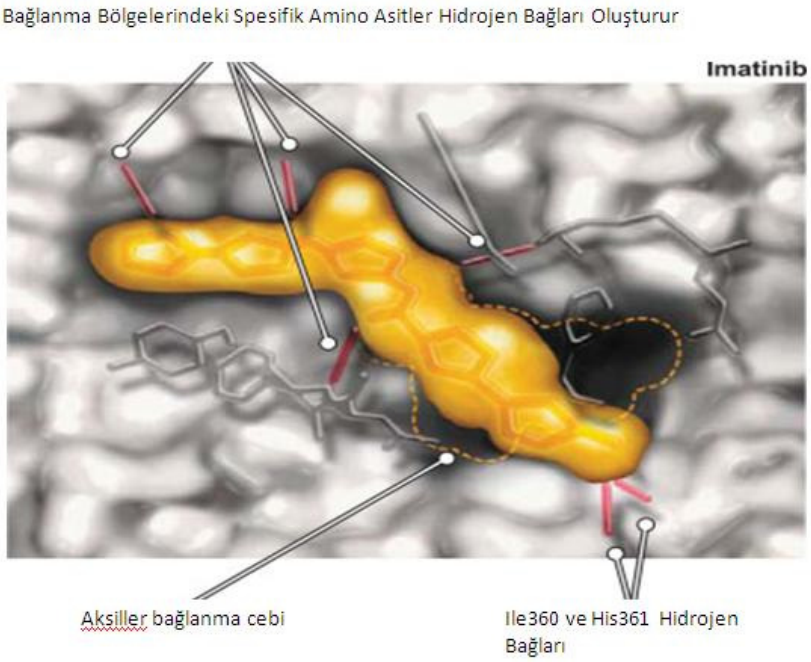
Imatinib bir 2-fenilaminoprimidin bileşiği olup, Brian Ducker ve Basel'de Novartis Farma'da çalışan araştırıcılar tarafından klinikte kullanmak amacıyla geliştirilmiştir (Goldman., 2007).

Imatinib oral yolla alınan bir tirozin kinaz inhibitörüdür (TKI) ve KML'de spesifik olarak BCR-ABL hibrid proteinini hedeflemek üzere tasarlanmış ilk ilaçtır (Breccia ve Alimena., 2009).

Imatinib ABL protein kinazın ATP- bağlanma bölgesinin yapısı kullanılarak oluşturulmuştur. Imatinib mesilat BCR-ABL'nin tüm ATP bağlanma cebini işgal etmek yerine BCR-ABL'nin inaktif formuna bağlanır ve stabilize eder (Mekawa ve ark.,2007).

Imatinib BCR-ABL'nin inaktif formuna kompetitif olarak bağlanarak proteinin aktif formdan inaktif forma geçişini engeller. Böylece BCR-ABL'nin otofosforilasyonu dolayısıyla aktivasyonu ve sinyal transdüksiyonu önlenmiş olur (Breccia ve Alimena., 2009).

Imatinib BCR-ABL proteininin yanında, ABL, ABL ile ilintili gen ürünleri, C-kit reseptör, trombosit kaynaklı büyüme faktörü alfa (PDGFR Alfa) ve PDGFR Beta ile koloni stimüle edici faktör 1 reseptörünü de hedefler. Imatinib daha önceki standart tedavilerle kıyaslandığında yüksek süreli cevap oranı ve tolere edilebilirliği açısından KML tedavisinde standart bir tedavi haline gelmiştir. Imatinib BCR-ABL'nin efektif bir inhibitörü olarak, KML gelişiminde anahtar rol oynayan başlangıç olaylarını inhibe eder. Şekil 1.5'de Imatinib mesilat'ın moleküler modeli görülmektedir (Kantarjıan ve ark., 2010).



Şekil 1.5. Imatinib mesilat'ın BCR-ABL tirozin kinazın ABL kinaz domain'ine bağlanma modeli (Wei ve ark., 2007)

BCR-ABL aktivitesinin inhibisyonu ile Imatinib BCR-ABL aracılı sinyal iletim yolaklarını bloke eder. Böylece iki kooperatif fakat farklı antineoplastik aktiviteyi etkiler. Bunların biri çoğalmanın inhibisyonu bir diğeri ise apoptozun indüklenmesidir (Wei ve ark., 2007).

İmatinib KML'nin kronik fazında en etkindir. Hastaların çoğunda tam sitogenetik remisyon görülür. Hastalığın ileri fazında İmatinib'e cevap daha kısa sürelidir ve hastalar sıklıkla ilaca direnç geliştirirler (Barnes ve Melo., 2006).

İmatinib mesilata karşı geliştirilen ilaç dirençliliği iki grup altında incelenebilir. Bunlardan biri, BCR-ABL'ye bağlı direnç mekanizmaları, diğeri ise BCR-ABL'ye bağlı olmayan direnç mekanizmalarıdır.

BCR-ABL'ye bağlı direnç mekanizmaları; BCR-ABL dublikasyonu ve BCR-ABL mutasyonlarıdır. BCR-ABL'ye bağlı olmayan direnç mekanizmaları ise; İlacın

hücre dışına atılması, ilacın hücre içine alımındaki sorunlar, ilacın hücre içindeki diğer bazı proteinlere bağlanması , ilaç konsantrasyonu ile ilgili sıkıntılar, alternatif sinyal yolaklarının aktivasyonu ve birtakım epigenetik modifikasyonlardır (Frame., 2007; Bixby ve Talpaz., 2009).

1.3. Epigenetik Düzenlenmeler

1.3.1 DNA Metilasyonu

Epigenetik tanımını şu şekilde yapmak mümkündür; DNA dizisinden bağımsız olarak gerçekleşen, gen ekspresyonu ve kromatin organizasyonundaki tüm kalıtsal değişikliklerdir. Bir başka deyişle DNA sekansında herhangi bir değişiklik olmaksızın gen ifadesinin değişmesidir (Herceg., 2007).

DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları iki önemli epigenetik modifikasyondur. DNA metilasyonu memelilerde, genomdaki CG dinükleotidlerinin 5. pozisyonundaki sitozin bazlarına enzimatik olarak bir metil grubunun eklenmesidir. Bu reaksiyon DNA metil transferaz (DNMT) enzimleri aracılığı ile S-adenozil metionin (SAM)'den bir metil grubu alınarak gerçekleştirilir (Smith ve ark., 2007; Fandy ve ark., 2007).

DNA metilasyonunu gerçekleştiren DNMT'lar farklı tiptedir. Bu aileye ait üyelerden DNMT3a ve 3b 'de novo metiltransferazlar' adını alır ve erken embriyonik gelişim boyunca matilasyon modellerinin oluşumundan sorumludur. DNMT1 ve 2 ise DNA replikasyonu sırasında parental ipliğin metilasyon paterninin yeni sentezlenen ipliğe kopyalanmasından sorumludur (Szyf., 2003; Lafon-Huges ve ark., 2008).

Genomda DNA metilasyonunun gerçekleştiği CG dinükleotidlerinin % 75'i 'CpG adaları ' adı verilen G+C içeriği % 50'den fazla ve en az 200 bazçifti

uzunluğunda olan bölgelerde yer alır. İnsan genlerinin yaklaşık yarısı CpG'den zengin promotor bölgeleri içerirler (Frühwald ve Witt., 2008).

Bu promotor bölgelerindeki CpG'ler normalde metillenmemiş durumdadır. Aksine genomda tekrar eden genomik sekanslar içinde yer alan CG dinükleotidleri ise yoğun bir biçimde metillenmiş durumdadır (Costello ve Plass., 2001).

Genlerin promotor bölgelerinde gerçekleşen metilasyon ilgili genin susturulması ile ilintilidir. Transkripsiyonun baskılanması farklı mekanizmalar üzerinden gerçekleşebilir. Bunlardan bir tanesi DNA metilasyonunun genin transkripsiyonunu gerçekleştirecek transkripsiyon faktörlerinin promotor bölgeye bağlanmasına engel olmasıdır. İkinci bir mekanizma, bu metillenmiş bölgeleri spesifik olarak tanıyıp buralara bağlanan proteinler ile gerçekleşir. Bu proteinler 'metillenmiş-CpG'ye bağlanan domain proteinleri ' (MBD 'ler) adını alır. Bu protein ailesinin üyeleri (MBD1,2,3,4, MeCP2 gibi) , histon modifiye edici enzimler (örn histon deasetilazlar gibi) ve histon metiltransferazlar gibi ko-represör kompleksleri metillenmiş bölgelere çekerek inaktif kromatin yapının oluşmasına aracılık ederler. Böylece genin transkripsiyonu baskılanmış olur (Patra ve Szyf., 2008).

Gelişim boyunca oluşturulan DNA metilasyon modelleri tüm erişkin yaşam boyunca somatik hücrelerde stabildir (Reik., 2007). Bu her hücre bölünmesinde, hücreye ait metilasyon bigilerinin doğru bir şekilde yeni hücreye aktarılması yolu ile olur (Spivakov ve Fisher., 2007).

1.3.2. Polikomb Grup Proteinleri ve Histon Modifikasyonları

Ökaryotlarda DNA molekülü nükleozom dizisinden oluşan kromatin yapı içinde paketlenmiştir. Her bir nükleozom, histon oktomeri etrafında dönen 146 baz çifti DNA çift ipliğinden oluşmuştur. Her bir histon oktomeri ise evrimsel olarak korunmuş ikişer molekül H2A, H2B, H3 ve H4 histon proteinlerinden oluşmuştur. Bu nükleozomal dizinler ise bağlayıcı H1 histon proteininin yardımı ile 30 nm

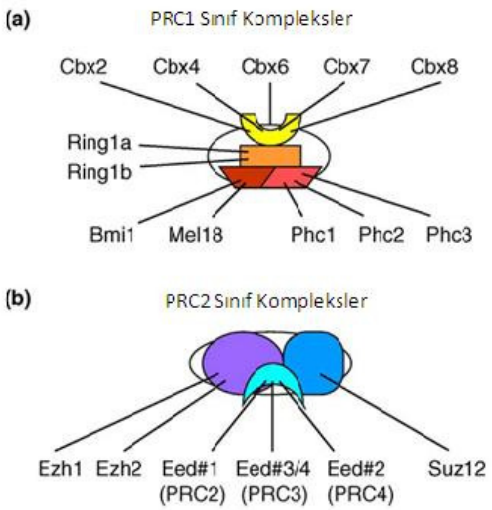
solenoid fiber yapı içine katlanırlar. Daha sonra bu fiberler 'yüksek kromatin yapı' oluşturmak üzere ileri bir katlanmaya maruz kalırlar. DNA replikasyonu, transkripsiyonu, tamir ve rekombinasyonu için bu katlanmış yapının, yapısal bir yeniden organizasyon ile açılması gereklidir. Nükleozom yapısında yer alan Histon proteinlerinin nükleozom dışına uzanan oldukça esnek amino terminal kuyrukları vardır. Bu amino terminal kuyruklar birçok post-transkripsiyonel modifikasyona uğrarlar. Bu modifikasyonlara örnek olarak asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubikitinasyon, sumolasyon, ADP-ribozilasyon sayılabilir. Bu Histon modifikasyonları nükleozomlar içindeki ve arasındaki DNA-histon etkileşimlerini modüle ederler böylece 'yüksek kromatin yapı' yı değiştirirler. Bu sebeple tek bir histon, nükleozom ya da nükleozomal bölge üzerindeki post-transkripsiyonel modifikasyonların kombinasyonları 'Histon kodu' adı verilen spesifik bir kod oluştururlar. Bu spesifik histon modifikasyonlarının bir kısmı ilgili genin aktivasyonu ile ilintili iken bir kısmı da inaktivasyonu ile ilintilidir (Shukla ve ark., 2009). Örneğin genlerin promotor bölgelerinde yer alan H3 histon proteininin 4. Lizin rezidüsüne 3 metil grubunun eklenmesi kromatin yapının transkripsiyonel olarak aktif olması ile ilintilidir. Tersine H3 histon proteininin 9. Lizin rezidüsüne 3 metil grubunun eklenmesi ise kromatin yapının transkripsiyonel olarak inaktif olması ile ilintilidir. Aynı şekilde H3 histon proteinin 27. Lizin rezidüsüne 3 metil grubunun eklenmesi de ilgili genin inaktif olduğuna işaret eder (Martin ve Zhang., 2005; Best ve Carey., 2009).

Polikomb grup proteinleri (PcG) evrimsel olarak korunmuş kromatini modifiye eden enzim gruplarıdır. Gelişim boyunca hücre bölünmeleri sırasında hedef genlerini transkripsiyonel olarak sustururlar. PcG proteinleri en az iki sınıf çok alt üniteli kromatin bağlanma kompleksleri oluştururlar. Bunların bir tanesi Polikomb represif kompleks 1 (PRC1) adını alırken diğeri Polikomb represif kompleks 2 (PRC2) adını alır. PcG komplekslerinin kesin kompozisyonu birbirinden farklılık gösterse de çekirdek komponentleri korunmuştur (Martinez ve Cavalli., 2006).

PRC1 sınıf kompleksler dört çekirdek alt ünite içerirler. Bunlar Cbx**,** Ring1, Phc ve Bmi/Mel18 aileleridir. Bu proteinlerin her birinin omurgalılarda birçok

homologları bulunmaktadır. Farklı fonksiyonlara sahip homolog proteinler farklı kombinasyonlarla bir araya gelebilirler. Memeli hücreleri 5 Cbx ailesi proteinleri içerirler. Bu proteinler kromodomainleri ile H3 histon proteinlerinin 9 ve 27. rezidülerine eklenmiş 3 metil grubunu tanırlar.

PRC2 sınıf kompleksler, omurgalılarda Ezh1/Ezh2, Eed2 ve Suz12 çekirdek proteinlerinden oluşur.



Şekil 1.6. Omurgalı PcG protein kompleksleri. (Kerppola., 2009)

PRC2 kompleksinin nükleozomal substratlarda H3 lizin metiltransferaz aktivitesi vardır. H3 histon proteinlerinin 27. pozisyondaki lizin rezidülerine iki veya üç metil grubu eklerler. Bu modifikasyon PRC1 kompleksindeki Cbx ailesi üyelerinin kromodomainleri ile tanınır bu sebeple PRC1 'in hedef genlere yönlenmesinde bu modifikasyonun gerekli olduğuna dair düşünceler vardır. Ancak PcG proteinlerinin hücre farklılaşması süresince baskılayacağı seçilmiş genlere nasıl ulaştığı bilinmiyor. PcG proteinlerinin genlere spesifik olarak bağlanmasında spesifik DNA dizilerinin etkili olabileceği düşünülüyor. Drozofila'da bazı genlerde 'Polikomb cevap elemanı '(PRE) adı verilen özgün diziler tanımlansa da bunların

memeli karşılığı bilinmemektedir. Ancak bir takım spekülatif modeller vardır (Kerppola., 2009).

PcG proteinleri evrimsel olarak korunmuş proteinlerdir. Bitkilerden memelilere kadar korunmuş homolog sekanslara sahiptirler. Gen ekspresyon profillerinin epigenetik hafızası çok hücreli organizmaların gelişimi için oldukça önemlidir. PcG'ler ilk olarak Drozofila'da keşfedilmişlerdir. Embriyogenezde vücut segmentlerinin gelişiminde spesifik olarak bazı genlerin (Hox gen ailesi) susturulmasında dolayısıyla doğru segment gelişiminde rol alırlar. PcG ayrıca dişilerde X-inaktivasyonunda ve hücresel hafıza işlemlerinde yer almaktadırlar. PRC1 ve PRC2 olmak üzere başlıca iki büyük protein kompleksi tanımlanmasına karşın son zamanlarda taşıdığı Eed altünite izoformuna göre PRC3/4 izoformları tanımlanmıştır. İnsanda, aynı mRNA'dan translasyon başlama bölgesinin farklı alternatifleri kullanılarak sentezlenen dört farklı Eed protein izoformu vardır. Böylece farklı Ezh2 içeren kompleksler oluşur. En uzun izoform Eed1 adını alır ve baskın olarak PRC2 kompleksi içinde yer alır. İki en kısa izoform ise Eed3 ve Eed4 adını alır ve PRC3 kompleksi içinde yer alır. PRC3 kompeksi H3 histon proteinin 27.lizin rezidüsünün metilasyonunu gerçekleştirir ve H1 varlığında aktivitesi inhibe edilir. PRC2 kompleksi de H3 histon proteinin 27.lizin rezidüsünün metilasyonunu gerçekleştirir ancak H1 varlığında aktivitesi inhibe edilmez.

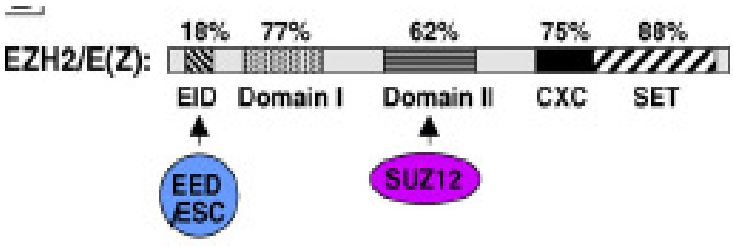
Son zamanlarda karakterize edilen PRC4 protein kompleksi ise Eed2 izoformunu içerir. Diğer PRC2 ve 3 bu Eed izoformunu taşımazlar. PRC4 kompleksinin yalnızca farklılaşmamış pluripotent hücrelerde ve normal regülasyonunu kaybetmiş hücrelerde bulunduğu bildirilmektedir. PRC4'de diğer PRC2 ve 3 komplekslerinde olduğu gibi Ezh ve Suz 12 proteinlerinin yanı sıra bu komplekslerde olmayan NAD-bağlı histon deasetilaz Sırt1 proteinini de taşırlar. PRC3 ve 4, PRC2'nin varyant formları olarak kabul edilmektedir (Negishi ve ark., 2007; Kano ve ark., 2008).

PcG proteinlerinin yapısında yer alan Eed izoformlarının kesin biyokimyasal fonksiyonları tam olarak açıklanamasa bile in vitro yapılan çalışmalarda Eed

izoformlarının PRC2 kompleksinde substrat spesifitesini kontrol ettiği bildirilmiştir. Bu çalışmalara göre en büyük izoformlardan Eed1 ve Eed2'nin EZH2'nin metiltransferaz aktivitesini H1 histonunun 26. lizin rezidüsüne yönelttiği, kısa izoformlar olan Eed3 ve 4'ün ise EZH2'nin metiltransferaz aktivitesini H3 histonunun 27. lizin rezidüsüne yönelttiği belirtilmektedir. Ancak Eed izoformlarının PRC2 kompleksinde substrat spesifitesini kontrol etmediği yönünde de karşıt görüş bildiren çalışmalar vardır. Ayrıca Eed'nin tüm izoformları için geçerli olan başka bir özelliğin de şu olduğu vurgulanmaktadır; Eed izoformları PRC2 kompleksindeki EZH2'nin stabilizasyonu için gereklidir denmektedir. Bu stabilizasyonda Eed proteinlerinin taşıdığı beş adet WD-40 motifinin kritik olduğu belirtilmektedir (Montgomery ve ark., 2007).

Tüm PRC proteinlerinin çekirdek yapısında yer alan EZH2 proteini bir histon metil transferaz'dır. Drozofila'dan insana kadar korunmuş ve yüksek homoloji gösteren 'SET' domaini aracılığı ile metiltransferaz aktivitesini yerine getirmektedir. H3 histon proteinin 27.pozisyondaki lizin rezidülerine metil grupları ekler.

Aşağıdaki şekil 1.7'de EZH2'nin domain organizasyonu görülmektedir. Hem karboksi terminalinde yer alan 'SET' domaini hem de bitişiğindeki sisteince zengin 'CXC' domaini enzimin histon metiltransferaz aktivitesi için gereklidir. Amino terminalinde yer alan 'EID' domaini EED proteinleri için 'domain II' ise suz12 proteini için bağlanma bölgesi oluşturur.



Şekil 1.7. EZH2' nin fonksiyonel domainleri (Simon ve Lange., 2008)

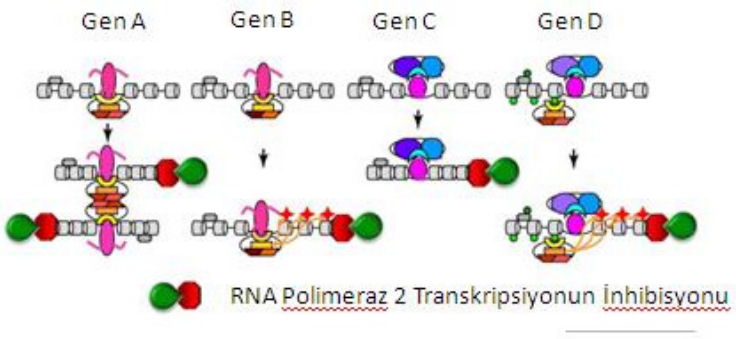
PRC'nin genel biyolojik fonksiyonu, farklı genleri transkripsiyonel olarak susturmaktır. Genom ölçeğinde yapılan çalışmalar göstermiştir ki, PRC'nin hedefleri hücre kaderinin belirlenmesinde anahtar rol oynayan transkripsiyon faktörleri ve sinyalizasyon molekülleridir (Simon ve Lange., 2008).

SUZ 12 de PRC protein komplekslerinin integral bir parçasıdır. Hem kompleksin histon metil transferaz aktivitesi için hem de hedef genlerin baskılanması için gereklidir. Protein 'Ring-Finger' motifine ve karboksi terminalinde 'VESF kutusu' adı verilen korunmuş bir bölgeye sahiptir (Cao ve Zhang., 2004; Gil ve ark., 2005).

PcG proteinleri tarafından gerçekleştirilen histon modifikasyonları (H3K27me3, H3K9me3 gibi) hem erken embriyonik gelişimde birtakım hedef genlerin susturularak pluripotensinin devamının sağlanmasında rol alır. Hem de gelişimin ileri devrelerinde farklılaşmayı takiben pluripotensinin devamının sağlanmasında rol alan genlerin susturulmasında rol alır (Cedar ve Bergman., 2009).

PcG protein komplekslerinin hedef genlerine nasıl toplandığı yönünde bazı spekülatif modeller vardır. Şekil 1.8'de şematize edildiği gibi gen A ve gen C örneğinde görüldüğü üzere PcG proteinleri diziye özgü olarak DNA'ya bağlanan proteinler aracılığı ile hedef genlerin olduğu bölgeye toplanabilirler. Ya da gen B ve gen D örneğinde şematize edildiği gibi kodlayıcı olmayan RNA molekülleri aracılığı ile hedef genlerinin olduğu bölgeye toplanabilirler. Bu kompleksler gen A ve B örneğinde olduğu gibi yalnız PRC1 kompleksini veya gen C örneğinde olduğu gibi PRC2 komleksini bölgeye çekebilir. Ya da gen D örneğinde olduğu gibi ilgili gen bölgesine önce PRC2 kompleksi gelir ardından buraya PRC1 bağlanır. Bu spekülatif bağlanma modellerinde ilgili gen bölgelerine PcG proteinlerinin bağlanmasına öncülük eden bu faktörler Pcg'lerden önce bağlanabileceği gibi, PcG'lerle aynı anda da bağlanma görülebilir. Gen D örneğinde olduğu gibi PRC1'lerin ilgili gen bölgesine bağlanması için PRC2 kompleksi tarafından gerçekleştirilen H3K27 üçlü metilasyonu gerekli olabileceği gibi, PcG proteinlerinin ilk bağlanması için H3K27 üçlü metilasyonu gerekli de olmayabilir.

PcG proteinleri aracılığı ile gerçekleştirilen gen baskılanma mekanizmaları için de öne sürülen birtakım modeller bulunmaktadır. Aşağıdaki şekil 1.8'de şematize edildiği gibi gen A ve gen C örneklerinde görüldüğü gibi PRC1 ve PRC2 protein kompleksleri tarafından gerçekleştirilen kromatin kompaksiyonu, RNA polimeraz II tarafından gerçekleştirilecek olan transkripsiyonun bloke olmasını sağlayan bir kromatin konfigürasyonu oluşturabilir. Alternatif ya da ek olarak gen B örneğinde şematize edildiği gibi PRC1 kompleksi tarafından gerçekleştirilen Histon H2A K119 ubikütinasyonu (şekilde kırmızı yıldız ile şematize edilen) RNA polimeraz II'nin bağlanmasına engel olabilir. Ya da gen D örneğinde şematize edildiği gibine ek olarak PRC2'ninde katkısı ile PRC1 kompleksi tarafından gerçekleştirilen Histon H2A K119 ubikütinasyonu (şekilde kırmızı yıldız ile şematize edilen) RNA polimeraz II'nin bağlanmasına engel olabilir (Kerppola., 2009).

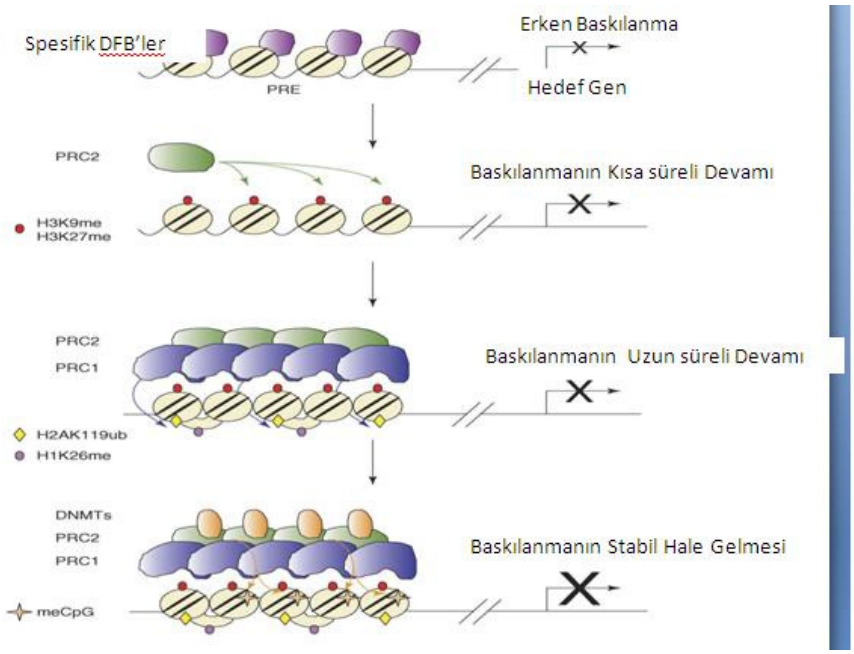


Şekil 1.8. PcG proteinleri tarafında gerçekleştirilen gen baskılanma modelleri (Lund ve Lohuizen., 2004)

Ayrıca PcG proteinleri tarafından gerçekleştirilen gen susturulmasında önerilen bir diğer mekanizma da şudur; Hedef genin PRC2 tarafından gerçekleştirilen H3K27 üçlü metilesyonunun ardından bölgeye bu metilasyonu Cbx proteini aracılığı ile spesifik olarak tanıyıp bağlanan PRC1 protein kompleksi gelir. Bu PRC1 kompleksi Histon deasetilazlar ve Histon metiltransferazlar gibi kromatini yeniden modelleyen faktörlerle ilişki kurar ve bu proteinleri hedef gen bölgelerine çekerler. Histon deasetilazlar enzimleri histon proteinlerinin amino terminal kuyruklarındaki negatif yüklü asetil gruplarını uzaklaştıran enzimlerdir. Böylece kısmi pozitif yükü artan

histon proteinleri negatif yüklü kromatine daha sıkı sarılır böylece bölge daha kompakt hale gelerek buraya gen transkripsiyonu gerçekleştirecek olan enzimlerin bağlanmasına engel olur (Lund ve Lohuizen., 2004).

PcG proteinlerinin kromatine belli bir hiyerarşi ile bağlandığı düşünülüyor. Aşağıda şekil 1.9'da gösterildiği gibi hedef bir genin erken baskılanmasında, DNA'da yer aldığı düşünülen spesifik bölgelere, DNA'ya spesifik olarak bağlanan proteinler öncelikle bağlanabilir. Bu proteinlerin bağlanması ile bölgeye PRC2 kompleksi çekilir. PRC2 kompleksinde yer alan ve histon metil transferaz aktivitesi olan EZH2 enzimi sayesinde ilgili gende H3K27 üçlü metilasyonu ve H3K9 metilasyonu gerçekleşir. Bu modifikasyonlar inaktif kromatin modifikasyonlarıdır. Bölgeye bu modifikasyonları spesifik olarak tanıyıp bağlanan PRC1 protein kompleksini çekerler. PRC1 ise H2A'nın mono übikütinasyonunu gerçekleştirir. En son DNA'yı metilleyen DNA metil transferaz enzimlerinin (DNMT) bölgeye gelip promotor bölge CpG adalarının metilasyonu ile uzun süreli gen susturulması sağlanmış olur (Bantignes ve Cavalli., 2006).



Şekil 1.9. PcG proteinlerinin kromatine hiyerarşik olarak bağlanmasının şematik gösterimi (Spivakov ve Fisher., 2007)

Son zamanlarda elde edilen biyokimyasal bulgular, PCR1 ve PCR2/3/4 protein komplekslerinin çekirdek komponenti olan EZH2'nin DNA metil transferazları (DNMT) spesifik hedef bölgelerine çektiği yönündedir (Spivakov ve Fisher., 2007).

Ayrıca DNMT'ların hem H3K9 metilasyonunu gerçekleştiren spesifik enzimle hemde H3K27 metilasyonunu gerçekleştiren EZH2 enzimi ile fiziksel olarak kontakt kurduğu yönünde bulgular bulunmaktadır. Her iki histon modifikasyonu da inaktif kromatin işaretleridir. Bu çalışmaların şunu vurguladığı bildirilmektedir; DNMT'ların promotorlara hedeflenmesi, spesifik DNA metilasyon modellerinin oluşturulması ve devamının sağlanmasında oldukça önemlidir. EZH2'nin seçici olarak yok edildiği bir çalışmada ,metillenmiş durumdaki hedef bir gendeki DNA metilasyonunun kaybedildiği gözlenmiştir.

Tüm bu bulguların, H3K27 metilasyonunun DNA metilasyonundan önce gerçekleştiği ve hedef bölgeyi DNA metilasyonuna yatkın hale getirdiği hipotezini desteklediği belirtilmektedir (D'Alessio ve Szyf., 2006; Köhler ve Villar., 2008).

Son zamanlarda yapılan çalışmalar H3 Histon proteinlerinde meydana gelen metilasyon modifikasyonunun geri dönüşümlü olabileceğini göstermiştir. H3 histon proteinin 27. lizin rezidüsünden iki ya da üç metil grubunu spesifik olarak uzaklaştıran enzimler tanımlanmıştır. Böylece uzun süreli gen susturulmasında etkili inaktif bir kromatin işareti olan bu modifikasyonun, bazı şartlar oluştuğunda hızla geri çevrilebileceği düşünülmektedir (Scwartz ve Pirrotta., 2008).

1.4. Kanserde Epigenetik Düzenlenmeler

1.4.1. Kanser Genomunda DNA Metilasyonu

Metilasyon modelindeki dengesizlik, insan sporadik kanserlerinde oldukça yaygındır. Bu dengesizlik, tüm genom genelinde görülen hipometilasyon ve promotor CpG adalarının hipermetilasyonu şeklindedir. Her iki durumda tek bir tümörde birarada

bulunabilir. Bu durumda net etki genellikle toplam metilasyon seviyesinin azalması şeklindedir. Hipometilasyon ve hipermetilasyon kanser hücresi genomunda spesifik fakat farklı bölgelerde gerçekleşir. Kanserde genom hipometilasyonu ve CpG adası hipermetilasyonu genel bir mekanizma sonucu oluşup birbiriyle ilintili olabilir ya da her iki dengesizlikte farklı anomaliler sonucu oluşmuş olabilir denmektedir (Szyf., 2003; Miremadi ve ark., 2007; Derya, 2008; Cheung ve ark., 2009).

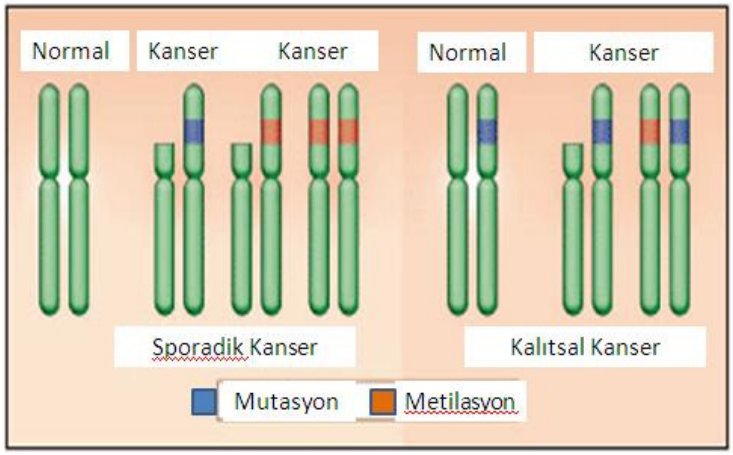
Hipermetilasyon:

Promotor bölgedeki CpG adalarının hipermetilasyonu genin susturulması ile ilintilidir. Metilasyon iki mekanizma ile transkripsiyonu bloke eder.

1. Metilasyon bazı transkripsiyon faktörlerinin CpG içeren tanıma bölgelerine bağlanmalarına engel olur.

2. MeCP2 ve MeCP1 gibi proteinler özgül olarak metillenmiş CpG'lere bağlanarak transkripsiyon faktörlerinin bağlanmalarına engel olurlar. Bu proteinler bağlandıkları bölgelere, HDAC1, HDAC2 ve Rb ile ilintili proteinler olan 46 ve 48'i çeker (Newell-Price ve ark., 2000).

Promotorlardaki CpG adalarının metilasyonu, aşağıda şekil 1.10'da gösterildiği gibi genin her iki allelini inaktive edebilir. Metilasyon nokta mutasyon ya da delesyon gibi genetik mekanizmalarla da bir arada gerçekleşebilir. Bu mekanizmalar sonucu inaktive olan genler çoğunlukla tümör süpresör genlerdir. Örneğin hücre siklus kontrol noktalarında görev alan p15 ve p16 genlerinin promotor hipermetilasyonu yolu ile inaktivasyonu birçok tümör tipinde tespit edilmiştir. Ayrıca DNA tamir genlerinde, invazyon ve metastazı engelleyen proteinleri kodlayan genlerde de hipermetilasyon yoluyla inaktivasyon tespit edilmiştir.



Şekil 1.10. Promotor bölge metilasyonunun etkileri (Costello ve Plas., 2001)

Aberan metilasyon, kanser hücrelerinde imprint genlerin ekspresyonları üzerinede etkilidir. Birçok imprint edilmiş genlerin, metilasyon yoluyla regüle edilen ifadeleri embriyonik gelişimde oldukça önemlidir. CpG adalarının aberan metilasyonu tam anlamıyla malign olmayan hücrelerde de tespit edilmiştir. Maligniteden önce gerçekleştirilen aberan CpG adası metilasyonu in vivo olarak da gösterilmiştir. Örneğin gastrik kanser hastalarında p16 ve E-kaderin promotorlarının tümörlerde ve normal gastrik mukozada metillenmiş durumda olduğu belirlenmiştir. Bazı genler tümör tipine spesifik anlamda aberan metillenebilmektedir.

CpG ada metilasyonu kanser hücrelerinde önce gerçekleşen bir genetik instabilite olabilir. MLH1 DNA mismatch tamir proteinini kodlamaktadır. Genom bütünlüğü için önemli bir gen ve kanserde aberan metilasyon ile sıklıkla suskunlaştırılmaktadır. Kolon kanserinde MLH1'in fonksiyonunun kaybolması, tüm genomda 100 kat artmış mutasyon oranı ile ilişkilidir. Özellikle bu mutasyonlar mikrosatellitlerde olmaktadır. MLH1 promotor metilasyonu ve genin susturulması, mikrosatellit instabiliteleri ile anlamlı bir şekilde koreledir. Tümör hücre dizilerinde deneysel demetilasyon MLH1'in tekrar ekspresyonunu sağlamıştır. MLH1 promoter

metilasyonu, sporadik endometrial kanserde, bazı kalıtsal kolon ve gastrik tümörlerde de görülmektedir.

Çeşitli translokasyonlar ve delesyonlarla, metilasyon arasındaki ilişki tam olarak ortaya konabilmiş değildir. Ancak yapılan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Bunlardan birinde, Damman ve ark. tarafından bulunan Ras efektör homoloğu olan RASSF1A çalışılmış. Bu protein 3p21'de lokalize durumda ve bu bölgenin allelik kaybı, küçük hücreli akciğer kanserlerinin %90'nında ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserlerinimde %80'ninde gözlenmekte. Diğer allel ise sıklıkla ve yoğun bir biçimde promotor bölgeden metile olmaktadır.

Yapılan bir başka çalışmada Ph (+) KML hastalarında 22. kromozom üzerinde yer alan bcr 'de yoğun metilasyon gözlenmiştir (Costello ve Plas.,2001).

Aberan CpG ada metilasyon mekanizmaları hakkında iki model bulunmaktadır:

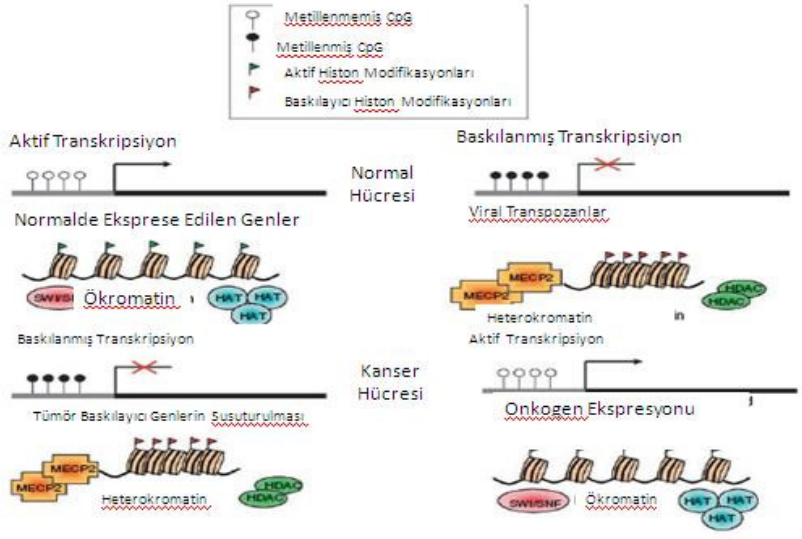
1. Normalde CpG adalarını metilasyondan koruyan faktörlerin kaybolması. Bu koruyucu faktörler, metilasyonu engellemek amacıyla CpG adalarındaki metilasyon bölgeleri için metiltransferazlarla yarışmaya girerler. Koruyucu faktörler, yapısal proteinler ya da transkripsiyon faktörleri olabilir.

2. Aberan CpG ada metilasyonu aktif bir işlemdir ve uygun olmayan gen susturulmasına yol açar (Szyf., 2003).

Son zamanlarda yapılan çalışmalarla tümörlerde, tümöre spesifik metilasyon modellerinin olduğu söylenmektedir (Esteller., 2007). Peki bu metilasyon modelleri nasıl oluşmaktadır? Hipermetilasyon sonucu özel bir fenotipe sahip olan tümörlerin hayatta kalma avantajlarının artması ile klonal bir seçilme avantajına sahip olabilecekleri bildirilmektedir.

Ayrıca bazı grupların yaptığı çalışmalar, kanser hücrelerinde metillenmiş genlerin özellikle H3K27 üçlü metilasyonuna sahip kromatin bölge içine paketlenmiş olduğunu söylemektedir.

Aşağıdaki şekil 1.11'de kanser hücrelerinde DNA ve kromatin yapıda gözlenen bazı değişiklikler özetlenmiştir. Üstteki şekilde sağ tarafta şematize edildiği gibi normal hücrelerde aktif olarak transkribe edilen genlerin promotorları metillenmemiş durumdadır ve ökromatin bölge içerisinde yer alır. Üstte sağ tarafta şematize edildiği gibi normal hücrede ekspresyonu istenmeyen genler ise promotor bölgeleri metillenerek baskılanmıştır ve bu genler heterokromatin bölge içinde yer alırlar. Kanser hücrelerinde bu model tersine dönmüş durumdadır. Alttaki şekilde sağ tarafta şematize edildiği gibi normalde sessiz olması gereken genler global hipometilasyon yolu ile aktifleşirken alttaki şekilde sol tarafta şematize edildiği gibi normal hücrelerde eksprese olan örn. tümör baskılayıcı genler promotor bölge hipermetilasyonu yolu ile susturulmuş durumdadır (Lopez ve ark., 2009).



Şekil 1.11. Kanser hücrelerinde DNA ve Kromatin yapıda meydana gelen değişiklikler (Lopez ve ark., 2009)

1.4.2. Kanserde Polikomb Grup Proteinleri ve Aberan Histon Modifikasyonları

Gelişim boyunca uzun dönem gen transkripsiyonunun baskılayıcıları olarak görev alan PcG'ler in ayrıca stabil hücre farklılaşması, vücut planlarının oluşumu, hücre siklus regülasyonu ve hematopoezde de rol aldığı yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Bazı araştırıcılar göstermiştir ki; PcG proteinlerinin ekspresyon seviyelerindeki bozukluk ile hücrelerin transformasyonları arasında ilinti bulunmaktadır. Ancak PcG'lerin malign transformasyondaki rolleri hakkında kesin bilgiler yoktur.

PcG proteinlerinin PRC2 ve varyant formları olarak tanımlanan PRC3 ve PRC4 protein komplekslerinde yer alan EZH2 enzimi bir seri primer insan tümöründe yüksek bulunmuştur. Örn. B hücreli Hodgkin dışı lenfomalarda yüksek EZH2 protein seviyesi tespit edilmiştir. Ayrıca meme, prostat ve mesane kanserli hastalarda yüksek EZH2 transkript ve protein seviyesi ile kötü klinik seyir arasında ilinti saptanmıştır. EZH2 transkript ve protein seviyesinin invazyon ve metaztaz açısından da belirteç olabileceği yönünde araştırma sonuçları mevcuttur. Diğer yandan birkaç çalışmada gösterildiği üzere EZH2 hücre siklusunda S faza girişte ve G2-M fazları arasındaki geçişin regülasyonunda rol almak üzere hücre siklusun regülasyonunda ve hücre çoğalmasında etkindir. Bu sebeple artmış EZH2 ifadesi neoplastik transformasyonu indüklemek açısından kritik olabilmektedir. Ayrıca EZH2 fonksiyonunun farmakolojik olarak elimine edilmesi ile kanser hücrelerinde apoptozun selektif olarak inhibe edildiği gösterilmiş, aynı sonuç normal hücrelerde elde edilememiştir (Tonini ve ark., 2007).

Yüksek EZH2 transkript seviyesi ayrıca, lenfoma, myeloma, kolorektal kanserler, endometrial kanserler ve lenfomada da tespit edilmiştir. Multiple Myeloma hücrelerinde EZH2'nin ektopik aşırı ifadesi büyüme faktörlerinden bağımsız olarak hücre transformasyonunda ve çoğalmasında etkili olmuştur. Ayrıca prostat kanser hücrelerinde RNA İnterferans tekniği ile EZH2 ifadesinin azaltılması ile tümör gelişiminin durdurulduğu belirtilmiştir (Raaphorst., 2005; Fiskus ve ark., 2006; Wang ve ark., 2007).

Ayrıca EZH2'nin ifadesinin agresif tümör alt gruplarında daha yüksek görüldüğü de belirtilmektedir (Wagener ve ark., 2008).

EZH2'den başka EZH2'nin fonksiyonel komponentleri olan EED ve SUZ12'nin de kolon, meme ve karaciğer gibi bazı insan tümörlerinde aşırı ifade edidiği yönünde çalışma sonuçları vardır. Artmış EED-EZH2 kompleksinin komponentlerinin aşırı ifadelerinin tümör gelişimini nasıl indüklediği, burada rol alan mekanizmaların neler olduğu hakkında bigiler azdır. Ancak çalışmalardan elde edilen bazı bilgiler şu yöndedir; EZH2 ve SUZ12 Rb-E2F yolağının kontrolü altındadır. E2F'nin hedeflediği bazı genler hücre çoğalmasının kontrolünde gerekli olan genlerdir. Dolayısı ile EZH2 ve SUZ12 ekspresyonunda görülen artış, EED-EZH2 hedef genlerinin aberan regülasyonuna ve sonuçta kontrolsüz hücre çoğalmasına yol açabilmektedir (Cao ve Zhang., 2004).

PRC2 varyantı olarak tanımlanan PRC4 protein kompleksinin yalnız embriyonik kök/progenitör hücrelerde ve kanser hücrelerinde eksprese edildiği bildirilmiştir. Bu kompleksde, diğer PRC komplekslerinde yer alan EZH2 ve SUZ12' nin yanında EED2 izoformu ve SIRT1 proteini yer almaktadır (Baylin ve Ohm., 2006).

Yalnız PRC2 protein kompleksinin PRC4 varyantında bulunan Sırtuin 1 sınıf III histon deasetilaz'lardan NAD+'ye bağımlı olarak çalışan Histondeasetilaz (HDAC) enzimidir. SIRT1, metabolizma, nörogenez ve hücrenin hayatta kalımı gibi çeşitli fizyolojik olaylarda hem histon hem de histon olmayan çeşitli proteinlerden asetil gruplarını uzaklaştırma fonksiyonu ile rol alır (Lim., 2006; Zschoernig ve Mahlknecht., 2008; Yamamoto ve ark., 2008).

Son zamanlarda yapılan çalışmaların ışığında SIRT1'in onkogen olarak fonksiyon görüp tümör oluşumunda rol aldığı bildirilmektedir (Yamakuchi ve ark., 2008).

Birçok kanser tipinde SIRT1'in seviyesinin arttığı tespit edilmiştir (Zschoernig ve Mahlknecht., 2008).

Ayrıca hücresel apoptotik yolaklarla ilişkili olduğu ve kanser tedavisi süresince kemodirençlilikte potansiyel bir mediatör olarak fonksiyon gördüğü belirtilmektedir. SIRT1'in kanserle ilintili fonksiyonu, DNMT1 enzimi ile direkt ilişki kurduğunun bulunması ile de desteklenmiştir (Stünkel ve ark., 2007).

PcG genlerinin ve histon modifikasyonlarının kök hücre devamının sağlanmasında ve tümör gelişimindeki temel rollerinden dolayı, BM1 ve EZH2 gibi PcG'lerin onkogenik potansiyelinin kanser kök hücrelerinin de devamında rol alabileceği belirtilmektedir. Gene PcG proteinlerinden biri olan EED-2 izoformu yalnız kanser kök hücrelerinde ve farklılaşmamış embriyonik kök hücrelerde ifade edilirken farklılaşmamış embriyonik kök hücrelerde ifade edilmemektedir. Benzer olarak yüksek SUZ12 seviyesi normal erişkin hücrelerde düşükken tümör hücrelerinde yüksek seviyede bulunmuştur. PcG proteinlerinin hedef genlerinin kanser gelişimi süresince spesifik olarak promotor DNA hipermetilasyonuna uğradığı bildirilmektedir. Prensipte kök hücrelerdeki geri dönüşümlü epigenetik transkripsiyonel susturulma modeli yerini PRC-DNMT aracılı aberan DNA metilasyonuna bırakmaktadır. Bu kanserin kök hücre orijinini destekler şekilde, kök hücrelerin kanser öncü hücreleri haline gelmelerinde rol aldığı belirtilmektedir. Kanserde metillenen birçok gen promotorlarının, öncesinde PRC komponentlerinin aşırı ifadeleri ile H3 histon proteinlerinin 27. lizin rezidüsüne 3 metil grunubun eklendiği belirlenmiştir. Erişkin insan kanser hücrelerinde PcG proteinleri bağlı olan hipermetile genler hem normal embriyonik kök hücrelerde hem de embriyonal karsinoma hücrelerinde metillenmemiş durumdadır. Kanser hücrelerinin aksine embriyonel karsinoma hücreleri her türlü hücre soyuna yönelebilme özelliklerini devam ettirmektedirler. Embriyonik karsinoma hücrelerinde normal histon modifikasyonuna ek olarak görülen H3K9me3 ve H3K9me2 geçiş aşaması olarak görülmektedir. Bu histon işaretlerine H3K27me3'ün eklenmesi ile kök/progenitör hücrelerinin önemli tümör süpresör promotorlarında geçici bir baskılanma sağlandığı, anormal PcG ekspresyon seviyelerinde ise bu histon işaretlerinin kalıcı

olarak bölgeye DNMT'ları çektiği bildirilmektedir. Böylece tümör baskılayıcı genlerin promotorlarının aşırı metilasyonu ve bir takım ek genetik ve epigenetik anomalilerin birikimi ile bu kök hücrelerin kanser kök hücresi haline geldiği speküle edilmektedir (Rajasekhar ve Begemann., 2007; Ohm ve ark., 2007; Widschwendter ve ark., 2007).

Apoptoz fizyolojik bir hücre ölüm biçimidir. Hem gelişim boyunca hem de doku homeoztazında rol alır. Apoptozda kaspaz ailesine ait sistein proteazlar rol alır. Kaspazlar iki farklı yolak ile aktifleşirler. Bunlardan biri ölüm sinyallerinin hücre zarında bulunan reseptörlerle alınıp bir dizi sinyal kaskadı sonunda kaspazların aktifleştiği dışsal yolaktır. Bir diğeri ise mitokondri membranında yer alan Bcl-2 ailesi tarafından kontrol edilen içsel yolaktır. 'BH-3 only' ailesi mitokondriyel yolakta yer alan proapoptotik proteinlerdir. Bid ve Bim proteinleri bu aileye mensup olup apoptozun gerçekleşmesi için diğer apoptoz yanlısı Bcl-2 ailesi üyeleri ile birlikte fonksiyon görürler (Adams ve Cory.2007).

Kanser tedavilerine cevaben gelişen apoptoz hem içsel hem de dışsal yolağın aktivasyonu ile gerçekleşebilir. Örneğin Glivec tedavisini takiben KML hücrelerinde görülen apoptozun özellikle Bim geni üzerinden gittiği bildirilmiştir. Apoptozda fonksiyon gören proteinlerde gerçekleşen genetik veya epigenetik aberasyonların kanser tedavisinde kemodirençliliğe sebep olabileceği belirtilmektedir (Debatin. 2004; Reed.2008).

KML'nin blastik fazı, hastalığın tedaviye yanıtı olmayan, hızlı ve fatal seyirli bir dönemidir. Bu evrede, kronik fazda yüksek oranda tedavi sağlayan imatinib mesilat, hastalığın ilerleyişini durduramamaktadır. İmatinib mesilatın etkin olamamasının sebeplerinden biri tümör progenitör hücrelerini apoptoza götürememesi olarak düşünülmektedir. Bu çalışmada; blastik fazda, Bim ve Bid proapoptotik genlerinin, imatinib mesilat dirençliliğine olan katkısının, epigenetik mekanizmalar aracılığı ile gerçekleşip gerçekleşmediği araştırılmıştır. Bu amaçla imatinib mesilat direnci geliştirilmiş K-562/IMA-3 hücre dizisi ile İmatinib dirençli olmayan K-562 hücre dizilerinde PRC4 kompleksinde yer alan EZH2, EZH1, EED2,

SUZ12, SIRT1 genleri ile proapoototik genler olan Bim ve Bid'in mRNA seviyeleri belirlenmiştir. H3K27 üçlü metilasyonu yapan EZH2'nin, Bim ve Bid genlerine bağlanıp bağlanmadıkları ve bu genlerin H3K27 üçlü metilasyon durumu ChIP deneyi ile araştırılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalar ile özellikle EZH2 ve SIRT1'in bağlandığı bölgeye DNMT enzimlerini çekme yolu ile ilgili genlerin promotor metilasyonuna yol açtığı ve gen ifadelerini epigenetik olarak susturduğu gösterildiğinden, Bim ve Bid genlerinin metilasyon durumlarının MSP-PCR ile belirlenmesi amaçlanmıştır. Sonuçta, KML blastik fazda imatinib mesilat tedavisine rağmen görülen apoptoz dirençliliğinde Bim ve Bid proapoptotik genlerinin metilasyon durumları ve bunda katkısı olabilecek PRC4 kompleks proteinleri üzerinden giden mekanizmanın aydınlatılması amaçlanmıştır. Blastik fazda KML progenitör hücrelerinin apoptoza gidememesinde epigenetik mekanizmaların etkisi söz konusu olduğunda, bu mekanizmaların engellenmesi ile epigenetik modifikasyonların geri dönüştürülmesinin, KML tedavisinde kullanılacak yeni yaklaşımlara ışık tutabileceği düşünülmektedir.

Çalışmada öne sürülen hipotez şudur; KML blastik fazda Imatinib Mesilat'a karşı geliştirilen apoptoz direncinde, Bim ve Bid proapoptotik genlerinin regülasyonlarının bozulması rol oynayabilir. Bu regülasyon bozukluğu ilgili genlerin promotor bölge hipermetilasyonu ve bir takım histon modifikasyonları gibi aberan epigenetik düzenlenmeler üzerinden gerçekleşebilir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Hücre Kültürü Deneyleri

2.1.1. K- 562 Hücre Hattının Sıvı Azottan Çözdürülmesi

Daha önce dondurulup sıvı azota konmuş olan K-562 hücre hattını sıvı azottan çıkarıp çözmek amacıyla önce 100 ml. RPMI (Biological Industries/Israel) üzerine 10,2 FBS (Sigma/A.B.D.), 1,2 Penisillin/Streptomisin (Gibco/ A.B.D. ve 1,2 ml. L-Glutamin (Gibco/ A.B.D.) konarak besiyeri hazırlandı. Ardından 40 ml.'lik bir beherin 1/3'üne kadar distile su kondu. K-562 hücreleri sıvı azottan çıkarılıp hemen bu beher içine alındı. Steril kabin içinde 2 ml. besiyeri bu donmuş hücreler üzerine konarak pipetaj yapıldı ve 15 ml.'lik steril falkon tüp içine alındı. Üstüne 7-8 ml. besiyeri eklenerek 5000 rpm.'de 4 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatan atılarak üzerine 2 ml. besiyeri eklendi, pipetaj yapılarak üzerine tekrar yaklaşık 6 ml. besiyeri eklenerek 37 ^{0}C'de % 5 CO_2'li etüve kaldırıldı.

2.1.2. Imatinib Mesilat Dirençli K-562/IMA-3 Hücre Hattının Kültürü

Imatinib Mesilat direnci geliştirilmiş K-562/IMA-3 Hücreleri üzerine 5 ml. besiyeri eklenerek 37 ^{0}C'de % 5 CO_2' li etüve kaldırıldı.

2.1.3. K-562 Hücre Hattının ve K-562/IMA-3 Hücre Hattının Pasajlanması

Deneylerde kullanmak üzere çoğaltılan K-562 hücre hatlarının pasajlanması şu şekilde yapıldı. Etüvde T-25 flask ve 8 ml. besiyeri içinde bulunan hücreler 15 ml.'lik falkona alınarak 5000 rpm.'de 4 dk. + 4 ^{0}C'de santrifüj edildi ve süpernatanları atıldı. Pelet üzerine yaklaşık 5 ml. besiyeri eklenerek 37 C'de % 5 CO_2'li etüve kaldırıldı.

Etüvde T-25 flask ve 5 ml. besiyeri içinde bulunan bulunan K-562/IMA-3 hücreleri 15 ml.'lik falkona alınarak 5000 rpm.'de 4 dk. + 4 ^{0}C'de santrifüj edildi ve süpernatanları atıldı. Pelet üzerine 5 ml. besiyeri eklendi. Bu hücreler T-25 flask içine alınarak üzerlerine 100 mM Imatinib'den 150 µl kondu. Böylece kültür içinde istediğimiz son Imatinib (Novartis/Basel) konsantrasyonu 3 mM olmuş oldu.

2.2. K- 562 ve K- 562/IMA-3 Hücre Hatlarının Sitogenetik Analizi

K-562 ve K-562/IMA-3 hücre hatlarının sitogenetik analizi GTG (Giemsa/Tripsin) bantlama yöntemine göre yapıldı.

Bunun için önce etüvde bulunan K-562 ve K-562/IMA-3 Hücre kültürlerinden yaklaşık 3'er ml. alınarak T-25 flask içine kondu ve üzerine 8'er ml. besiyeri eklendi. Kültürlere 100'er ul. FDU (Sigma/ A.B.D.) ve 400'er ul Uridin (Sigma/ A.B.D.) eklenerek senkronizasyon yapıldı. Hücreler 37 ^{0}C etüvde bir gece inkübe edildi. Ertesi sabah hücre kültürleri üzerine 100'er ul Timidin (Sigma/ A.B.D.) konarak senkronizasyon işlemi durduruldu. Saat 15:00'da hücreler üzerine 200'er ul kolşisin (Biological Industries / Israel) eklenerek yarım saat inkübe edildi ve ardından hücre çıkarımına başlanıldı.

Hücreler 15 ml.'lik falkon tüplerine alınarak 2000 rpm.'de 5 dk. çevrildi ve süpernatan atıldı. Pelet halindeki hücrelerin üzerine yaklaşık 12 ml 37 ^{0}C'de tutulan Potasyum Klorür (KCl) aynı anda vortekslenerek eklendi ve 37 ^{0}C'lik etüvde 20 dk. inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 2000 rpm.'de 5 dk. santrifüj edilerek süpernatan atıldı. Ardından Carnoby solüsyonu ile (3:1 Metanol/Asetik asit) (Merck/Germany) yıkamalara geçildi. Yaklaşık 5 ml yıkama solüsyonu aynı anda vortekslenerek hücre peleti üzerine damla damla eklendi ve takiben 2000 rpm.'de 5 dk. Sanrifüj edildi ve süpernatan döküldü. Fiksatif solüsyonu ile yıkama işlemine süpernatanın rengi beyaz oluncaya kadar devam edildi. Bu şekilde hazırlanan hücreler 1 gece +4 ^{0}C'de tutularak ertesi sabah hücrelerin lam üzerine alınma işlemine geçildi.

Hücrelerin alınacağı lam'lar bir gün önceden yıkanmış ve distile su içinde +4 ^{0}C'de bekletildi. Hücreler bunların üzerine yüksekten, her lam üzerine yaklaşık 3-4 damla olacak şekilde 3 ml.'lik pastör pipeti ile damlatıldı. Ardında +65 ^{0}C'lik etüvde bir gece yaşlanmaya bırakıldı. Ertesi gün Giemsa/Tripsin metodu ile bantlama işlemine geçildi. Bantlama işleminde kullanılacak tripsin'den (Wisent/ A.B.D.) (%2,5'luk) 1,5 ml alınarak 13,5 ml distile su içine konarak sulandırıldı. Etüvden çıkarılan lam'lar %2,5'luk tripsin ile yaklaşık 13-15 sn. muamele edilerek hemen serum fizyolojik su ile yıkandı. Ardından Giemsa (Biostain/ A.B.D.) boyası ile boyandı. Kuruyunca entellan (Merck/Germany) yardımı ile üzeri lamel ile kapatılarak analize hazır hale getirildi.

2.3. Moleküler Teknikler

2.3.1. Hücre Kültüründen Genomik DNA İzolasyonu

Hücre kültüründen genomik DNA izolasyonu 'QIAMP DNA mini kit' (QIAGEN,A.B.D.) kullanılarak gerçekleştirildi. İşlemler, üretici firmanın kullanım talimatları uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Kısaca; önce genomik DNA elde edilecek hücreler ml.de 1,5 milyon hücre olacak şekilde DNA izolasyonuna başlanıldı. Bu hücreler 1,5 ml.'lik mikrofüj tüpünün içine alındı ve üzerine 20 ul proteinaz K koyuldu. Üzerine 200 ul AL tamponu eklenerek vortekslendi ve 10 dk. 56 ^{0}C'de inkübasyon yapıldı. Ardından kısaca santrifüjlendi.

200 ul saf etanol örneğe eklendi ve vortekslenerek karışması sağlandı. Daha sonra kolon 2 ml toplama tüpü içine yerleştirilerek karışım dikkatlice QIAamp spin kolona aktarıldı, 8000 rpm'de 1dk. Santrifüj edildi. QIAamp spin kolonu yeni bir 2 ml toplama tüpü içine yerleştirilerek eski toplama tüpü atıldı. QIAamp spin kolon boşalıncaya kadar yüksek hızda santrifüj edildi. Kolona 500 ul AW1 tamponu eklendi ve 1 dk. 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Kolon yine temiz bir tüpe geçirilerek 500 ul AW' tamponu eklendi. 13.000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. QIAamp spin kolonu yeni bir tüpe 1,5 ml.'lik mikrofüj tüpüne yerleştiridi. 200 ul AE tamponu eklenip 5 dk. Oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. 1 dk., 8000 rpm'de santrifüj

yapılarak kolondan genomik DNA elüsyonla toplandı. Elde edilen DNA -20 ^{0}C'de saklandı.

2.3.2. Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu 'Qıagen RNA İzolasyon Kit' (QIAGEN,A.B.D.) prosedürüne göre yapıldı. RNA izolasyonuna ml.'de 500.000 hücre ile başlanıldı. Bu sebeple hücre kültüründen alınan hücreler ml.'de 500.000 olacak şekilde volüm ayarlandı ve 15 ml.'lik falkon tüpüne alındı. 1800 rpm.'de 5 dk. +4 ^{0}C'de santrifüj edildi. Süpernatan dökülerek pelet üzerine 350 ul RLT tamponu eklendi ve vortekslendi. İçerik mor kolonlu tüpe aktarılarak 13.000 rpm.'de 2 dk. santrifüjlendi. DEPC'li bir tüpe lizat (aşağıda kalan sıvı) ve 350 ul % 70'lik etanol ilave edilip pipetaj yapıldı ve karışım beyaz kolonlu tüpe alındı. Ardından 10.000 rpm.'de 20 saniye santrifüj edilerek kolon 2 ml.'lik yeni bir koleksiyon tüpüne aktarıldı. 10 ul DNase1 ve 70 ul Dnase free tampon (RDD) karışımı eklenerek 20-30 dk inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası tüp üzerine 350 ul RWI eklenerek 10.00 rpm.'de 20 saniye santrifüj edildi. Ardından kolon yeni bir tüpe aktarılarak üzerine 500 ul RPE tamponu eklendi ve yeniden 10.00 rpm.'de 20 saniye santrifüj edildi. Kolon tekrar yeni bir tüpe aktarılarak 13.000 rpm.'de 4 dk çevrildi. Yeni bir koleksiyon tüpüne aktarılarak bu kez 13.000 rpm.'de 1 dk. çevrildi. Ardından kolon 1,5 ml.'lik bir koleksiyon tüpüne alınarak 30 ul RNase free su ile RNA'nın çözülmesi sağlandı ve 10.000 rpm.'de 1 dk. çevrilerek -80 ^{0}C'ye kaldırıldı.

Total RNA -80 ^{0}C'de kullanılıncaya kadar saklandı.

2.3.3. RNA'nın DNA Kontaminasyonundan Temizlenmesi

Total RNA, RNaz içermeyen DNaz enzimi ile muamele edildi (DNA-free Kit, Ambion, A.B.D.) ve olabilecek DNA kontaminasyonu uzaklaştırıldı. Bunun için önce total RNA üzerine 0,1 hacimde 10xDNaseI tamponu ve 2 ul rekombinant DNazI (2 u/ul) eklenerek 30 dk süresince 37 ^{0}C'de inkübasyona bırakıldı. Ardından

0,2 hacim DNaz inaktivasyon reajanı eklenerek 2 dk. oda sıcaklığında tutuldu, böylece DNaz inaktivasyonu sağlanmış oldu. 1,5 dk., 13.000 rpm'de 4 ^{0}C'de santrifüj sonrasında içinde RNA olan süpernatan temiz bir tüpe aktarıldı ve -80 ^{0}C'de saklandı.

2.3.4. RNA ve DNA Miktarlarının Spektrofotometrik Ölçümü

İzole edilen RNA ve DNA'nın kalitesi ve konsantrasyonu UV spektrofotometrik olarak (NanoDrop) 260 nm ve 280 nm dalga boylarının kullanıldığı, optik yoğunluk (OD) ölçümleri sonucunda belirlendi. Kalitesi ise, A260/A280 oranı kullanılarak değerlendirildi. A260/A280 oranı saf RNA için normal sınırları 1,9-2,0 olarak kabul edildi. Saf DNA için ise normal sınırlar 1,8-1,9 olarak alındı.

2.3.5. Beta-aktin RT-PZR

Elde edilen RNA'larda DNA kontaminasyonunun olup olmadığını kontrol etmek için Beta-aktin RT-PZR yapıldı.

Beta-aktin PZR reaksiyonu bileşenleri **Çizelge 2.1**'de gösterilmştir.

Master Mix:

Taq buffer (NH4SO4)(10X) = 5 ul
dNTP (2 mM) = 5 ul
MgCl2 (25 mM) = 5 ul
Primer Forward = 2 ul
Primer Reverse = 2 ul
Taq polimeraz = 0,5 ul

Çizelge 2.1. Beta-aktin PZR reaksiyonu bileşenleri

	Pozitif Kontrol	Negatif Kontrol	Örnek
dH2O	29.5 ul	30.5 ul	29.5 ul
Hepg2 cDNA	1 ul	- ul	1 ul RNA
Taq Pol.	0.5 ul	0.5 ul	0.5 ul
Mix.	19.0 ul	19 ul	19 ul

PCR Koşulları:

95 ^{0}C 3 dk.

94 ^{0}C 30 sn.

60 ^{0}C 30 sn.

72 ^{0}C 30 sn.

72 ^{0}C 5 dk. Toplam 35 siklus

2.3.6. Ters Transkripsiyon (RT) ile cDNA Eldesi

Çalışmada araştırılan genlerin ifade düzeylerini belirlemek amacıya reverse tanskripsiyon yöntemi ile RNA'lar komplementer DNA'ya (cDNA) çevrildi. Bu işlem için cDNA sentez kiti kullanıldı. (Fermentas/A.B.D)

Aşağıda **Çizelge 2.2**'de cDNA sentez reaksiyonunun bileşenleri ve tepkime koşulları verilmiştir.

Çizelge 2.2. cDNA sentez reaksiyonu bileşenleri ve koşulları

Bileşen	**Miktar**	**Son Konsantrasyon**
RNA OligodT Primer (10uM) dH_2O	2ug 1ul 12 ul'ye tamamlanır.	0,1 ug/ul 0,5 uM
İnkübasyon		70 ^{0}C, 5dk.
dNTPmix (10mM) RNaz inhibitör (20u/ul) RT Tampon (5x)	2 ul 1 ul 4 ul	1mM 1u/ul 1x
İnkübasyon		37 ^{0}C, 5 dk.
Reverse Transkriptaz	1 ul	10 u/ul
M-MuLV (200u/ul)		
İnkübasyon		42 ^{0}C, 60 dk. Ve 70 ^{0}C,10 dk.
Son Hacim	20 ul	

2.3.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

İfade düzeyleri araştırılacak genlerin eş-zamanlı PZR ile değerlendirilmelerine geçmeden önce, geleneksel PZR ile bu genler çalışılarak hem primerlerin çalışıp çalışmadığı kontrol edildi hem de PZR kondisyonları belirlendi. Buna göre çalışılan EED-2, Bid, SUZ12, SIRT1 ve EZH2 genlerinin primerlerine uygun bağlanma (annealing) derecesi 60 ^{0}C olarak belirlendi. Bim, geninin primerine uygun bağlanma (annealing) derecesi 57 ^{0}C EZH1 geninin primerine uygun bağlanma (annealing) derecesi ise 57 C olarak belirlendi. PCR bileşenleri ise; 10x buffer, $MgCl_2$ (Fermentas, A.B.D.), dNTP (MBI Fermentas, A.B.D.), Taq polimeraz (MBI Fermentas, A.B.D.) kullanıldı.

PZR reaksiyonunda kullanılan bileşenlerin miktarları **Çizelge 2.3** 'de verilmiştir.

Çizelge 2.3. PZR Reaksiyon Bileşenleri

Bileşenler	**Miktar**
10x buffer	5 ul
MgCl2 (25 mM)	5 ul
dNTP mix (2 mM)	5 ul
Primer F (5 pmol/ul)	2 ul
Primer R (5 pmol/ul)	2 ul
ddH2O	27,5 ul
Taq Polimeraz (5u/ul)	0,5 ul
cDNA	3 ul
	Toplam; 50 ul

Çalışılan genlerin primer dizileri **Çizelge 2.4**'de verilmiştir. Bim geni için primer dizisi literatürden alınmış olup (Dimitrios J. ve ark.,2009) diğer primerler tasarlanmıştır.

Çizelge 2.4. Genlerin primer dizileri

Gen	**Primer baz dizilimi (5'-3')**	**PCR ürünü**
EED2	F:CAGCAATCCAGACCTCTCTGG R:TTCCAGGTGCATTTGGCGTG	109 bç
EZH2	F:GCTCAAGAGGTTCAGAAGAGC R:GCACAGGCTGTATCCTTCGCT	121 bç
SUZ12	F:CCTGGAAGTCCTGCTTGTGA R:GGTCAGGATTCAAAGGCACC	221 bç
SIRT	F:CAGGTTGCGGGAATCCAAAG R:CACCTAGGACATCGAGGAAC	141 bç
EZH1	F:CCTGTGAGTGGACACCCTT R:TTGGAGAGGGGACCAGGAA	137 bç
Bim	F:TGTGACAAATCAACACAAACCC R:AGTCGTAAGATAACCATTCGTG	230 bç
Bid	F:AGGAGAAGACCATGCTGGTG R:CTCACGTAGGTGCGTAGGTT	129 bç

PZR koşulları:

95 ^{0}C	3 dk.	
94 ^{0}C	30 sn.	
Bağlanma sıcaklığında	30 sn.	35 siklus
(EZH2, SUZ12, EED2, BİD, SIRT1:60 ^{0}C BİM:57 C EZH1:57 ^{0}C)		
72 ^{0}C	30 sn.	
72 ^{0}C	5 dk.	

2.3.8. Agaroz jel Elektroforezi

PZR ürünlerini görüntülemek için, PZR sonrası ürünler %'2lik agaroz jele yüklendi. Agaroz (Sigma, A.B.D.) 4 g tartılarak üzerine 10xTBE'den 200 ml eklendi ve mikrodalgada 2,45 dk. kaynatılarak agarozun erimesi sağlandı. Bir müddet ılıması beklendikten sonra içine cDNA'ların ultraviyole (UV) ışığı altında görünür hale gelmesini sağlayacak etidyum bromirden 5 ul (5mg/ul) eklendi. Ardından jel

tabağına dökülerek soğumaya bırakıldı. Soğuduktan sonra jel tabağının tarakları çıkarıldı ve elektroforez tabağına yerleştirildi. PZR ürününün her birinden 12 ul alınarak 6x yükleme tamponu ile karıştırıldı (son konsantrasyon 1x) jeldeki kuyucuklara yerleştirildi. DNA'nın büyüklüğünü anlamamızı sağlayan 50 bç DNA ladder ise en baştaki kuyucuğa yerleştirildi. PCR ürünleri 140 V sabit akımda yaklaşık 50 dk. yürütüldü.

Elektorforezin ardından amplifiye olan PZR ürünleri UV translüminatör ile fotoğrafları çekilerek görüntülendi.

2.3.9. Eş-Zamanlı PZR

Geleneksel PZR yöntemi ile primerlerin çalıştıkları belirlendikten sonra eşzamanlı PZR çalışmalarına başlanıldı. Burada K-562 ve K-562/IMA3 hücre hatlarında elde edilen cDNA'lar ile pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere tümörlü kolon ve mide örneklerinden elde edilen cDNA'lardaki EZH2, EZH1, SIRT1, EED2, SUZ12, BİM ve BİD genlerinin mRNA ekspresyon değerleri ölçüldü. Bu ölçümde geleneksel PCR'da kullanılan primerler ile floresan boya olarak Syber-green I ve reaksiyonlar için ise LightCycler-DNA Master SYBER-Green I (Roche Diagnostic, Almanya) kit kullanıldı. Eş-zamanlı PZR bileşenleri aşağıdaki **Çizelge 2.5'** de verilmiştir.

Çizelge 2.5. Eş-Zamanlı PZR reaksiyon bileşenleri

Bileşenler	**Miktar**
10xSYBER GreenI tampon	2 ul
MgCl (25 mM)	1.2 ul
Primer F (2,5 pmol/ul)	1 ul
Primer R (2,5 pmol/ul)	1 ul
ddH20	12,3
cDNA (1/1 dilüe)	2,5 ul
	Toplam:20 ul

Eş-zamanlı PZR reaksiyonunda, Syber Green tampon, MgCl2, forward ve reverse primerler ve distile su bileşenleri karıştırılarak PZR tüplerine 17,5 ul olacak şekilde eşit olarak dağıtıldı. Ardından her bir tüpe cDNA'lar eklendi ve Corbet 6000 (A.B.D.) eş-zamanlı PZR cihazına konarak aşağıda verilen reaksiyon koşullarında analiz edildi. Her örnekten çift çalışılmak üzere 3 bağımsız tekrar yapıldı.

Eş-zamanlı PZR reaksiyon koşulları:

İlk denatürasyon	95 ^{0}C	5 dk.
Denatürasyon	95 ^{0}C	30 sn.
Bağlanma	60 ^{0}C	30 sn.
Uzama	72 ^{0}C	30 sn.
Kısa denatürasyon	81 ^{0}C	5 sn.
Son uzama	72 ^{0}C	10 dk.

Eş-zamanlı PZR sonrası ekspresyon düzeyini hesaplamak için $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodundan yararlanıldı. Örneklerin PZR amplifikasyonu sırasında eksponansiyal faza geçtiği siklus [eşik siklus (Ct)] belirlenerek $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metodundaki formülde yerine kondu. Her örnekten çift çalışıldığı için Ct değeri olarak ortalamaları alınarak K-562 ve K-562/IMA-3 hücre hatları arasında araştırılan gen ekspresyon düzeylerinin nasıl değişim gösterdiği hesaplandı. Bu yöntem iki hücre hattında ilgili gen düzeylerinin kıyaslanmasına olanak veren kantitatif bir yöntemdir. GAPDH geni bir House keeping gendir ve referans gen olarak araştırılan genlerin Ct değerlerinin normalize edilmesinde kullanılmıştır.

$$\mathbf{2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct\ hedef-\ \Delta Ct\ kontrol)}}$$

$$\mathbf{2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[(\Delta Ct\ hedef-\ \Delta Ct\ referans)\ -\ (\Delta Ct\ kontrol\ -\ \Delta Ct\ referans)]}}$$

2.3.10 Metilasyon Spesifik PZR (MSP) yapılacak DNA örneklerine Bisülfit Modifikasyonu Yapılması:

Bisülfit modifikasyon işlemi 'CpGenome Universal Methylated DNA' (Millipore/A.B.D.) kit prosedürüne göre yapıldı.

Modifikasyon protokolünde amaç; metil grubu eklenmemiş sitozin bazlarının urasil bazlarına dönüşümünü sağlamaktır. Bu amaçla yapılan kit prosedüründe önce DNA tek iplikli hale getirildi. Ardından sodyum bisülfit iyonu içeren reaktif 1 kullanılarak metil grubu taşımayan sitozin bazlarının sülfonlanması ve hidrolitik olarak deamine olup urasil sülfonat ara molekülü oluşması sağlandı. Ardından DNA bir mikropartikül taşıyıcısı olan reaktif 3 'e bağlanarak, başka bir tuz olan reaktif 2 varlığında ardı ardına yapılan santrifügasyon ve % 70'lik EtOH resüspansiyonu ile tuzlarından arındırırldı. Metillenmemiş sitozin bazlarının urasile dönüşümü alkalin desülfanasyonu ve % 90'lık EtOH ile gerçekleştirildi. Ardından DNA'nın elüt edilmesiyle bisülfit modifikasyonu tamamlanmış olur. Çalışmada kit prosedürü şu şekilde uygulandı.

İlk önce kit içerisindeki reaktif 1 (– 20) C'den çıkarılarak oda ısısına getirildi. Ardından 500 mg NaOH 4,150 ml distile su ile sulandırılıp 3 M NaOH hazırlandı. Modifiye edilecek her bir örnek için 0,227 g reaktif 1 tartılarak örnek başına 0,571 ml distile su içinde çözdürüldü ve 3 M NaOH'den çalışılacak her bir örnek için 20 ul konarak reaktif 1 kullanıma hazır hale getirildi. Ardından modifiye edilecek DNA'lar 100 ul distile su içerisinde 10ng/ul olacak şekilde sulandırıldı. Bu sulandırılan DNA'lar üzerine 3 M NaOH'den eklenerek pipetaj yapıldı ve 10 dk 50 ^{0}C'lik su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kullanıma hazır hale getirilen reaktif 1'den 550 ul modifiye edilecek DNA örnekleri üzerine kondu, vortekslenerek tüplerin ağzı parafilmle kapatıldı ve 50 ^{0}C'de su banyosunda 16 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonras önce kullanılacak reaktif 3 ve reaktif 2 (– 20) ^{0}C'den çıkarılarak oda ısınsa getirildi. Reaktif 2'den modifiye edilecek her bir örnek için 1,35 g tartıldı ve üzerine yine modifiye edilecek her bir örnek için 750 ul (20 ml distile su+ 1ul beta merkapto etanol) solüsyonundan eklenerek çalışmaya hazır hale

getirildi. Bu şekilde hazırlanan reaktif 2 ve oda ısısına getirilen reaktif 3 vortekslendi. Reaktif 3'den her bir DNA örneği üzerine 5 ul ve ardından reaktif 2'den 750 ul konarak karıştırıldı ve 10 dk oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 8000 rpm.'de 1 dk. santrifüj edildi ve süpernatan atıldı. Takiben 1 ml % 70'lik EtOH eklenerek vortekslendi ve 8000 rpm.'de 1 dk boyunca santrifüj edilerek süperneten atıldı. Bu işlem 3 kez tekrarlandı. En son santrifüjü takiben süpernatan atılarak 2 dk. 13,000 rpm.'de santrifüjlendi. Ardından 20 mM NaOH % 90'lık EtOH solüsyonundan her bir örneğe 50 ul eklenerek vortekslendi ve 5 dk oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 8000 rpm.'de 1 dk. santrifüj edilerek süpernatan atıldı ve örnekler üzerine 1 ml % 90'lık EtOH eklendi ve vortekslenerek 8000 rpm.'de 1 dk. santrifüj edilerek süpernatan atıldı. Bu işlem iki kez tekrar edildi. Ardından 13.000 rpm.'de 3 dk santrifüj edilerek süpernatan atıldı ve 10-20 dk. oda ısısında kurumaya bırakıldı. Her bir örneğe 25 ul distile su eklendi. Böylece 40 ng/ul DNA konsantrasyonu elde edilmiş oldu. Hızlıca vortekslemenin ardından 50-60^{o}C'de su banyosunda 15 dk. inkübe edildi. Böylece DNA elüt edilmiş oldu. İnkübasyon sonrası 3 dk. 13.000 rpm.'de santrifüj edilerek süpernatan yeni bir tüpe alındı ve (-20) ^{0}C'ye kaldırıldı.

2.3.11. Metilasyon Spesifik PZR (MS-PZR)

K-562 ve K-562/IMA-3 hücre hatlarında Bim ve Bid genlerinin promotor bölgelerinin metilasyon durumlarını belirlemek amacıyla MS-PZR yapıldı.(+) kontrol olarak CpGenome Universal Methylated DNA (Millipore, A.B.D.) kullanıldı. MS-PZR 'da bisülfüt modifikasyonu yapılmış örnekler kullanıldı. Modifikasyon protokolünde amaç; metil grubu eklenmemiş sitozin bazlarının urasil bazlarına dönüşümünü sağlamak olduğundan, bisülfit modifikasyonu sonrası araştırılan genlerin promotor bölge 'CpG adalarındaki' metil grubu eklenmemiş sitozinlerin urasil bazına döndüğü kabul edildi. Metillenmiş sitozinlerin ise bu deaminasyona uğramayıp sitozin olarak kaldığı varsayıldı. Her iki olasılığa göre promoter bölgelerine spesifik primerler sentezlenip ayrı PZR tüplerinde çoğaltıldığında ve Agaroz jel elektroforezinde ayrı kuyucuklara yüklenildiğinde ilgili genlerin promotor bölgelerinin metilasyon durumları homozigot ve/veya heterozigot olarak tespit

edilebilmiştir. Bim genine ait primerler literatürdeki bir çalışmadan alınmıştır.(Escorihuela C.M. ve ark. 2007). Bid genine ait primerler tasarlanmıştır.

MS-PZR koşulları aşağıdaki **Çizelge 2.6** 'de verilmiştir.

Primerler aşağıdaki **Çizelge 2.7** 'de verilmiştir.

Çizelge 2.6. MS-PZR reaksiyon bileşenleri:

Bileşen	**Miktar**
10X tampon	2,5 ul
dNTP (2,5 mM)	2,5 ul
MgCl2 ((25 mM)	4 ul
dH2O	8,8 ul
Primer F (10 pmol)	2 ul
Primer R (10 pmol)	2 ul
Taq Polimeraz	0,2 ul
DNA	3 ul
	Toplam :20 ul

Çizelge 2.7. Primer Baz dizilimleri

Gen	**Primer baz dizilimi (5'-3')**	**PCR ürünü**
Bim Metile Forward	AGTATTTTCGGTAAATAATGGGGTC	139 bç
Bim Metile Revers	GAATAAATCAAAAACTCCCAACG	139 bç
Bim UNMetile Forward	GTATTTTTGGTAAATAATGGGGTTG	139 bç
Bim UNMetile Revers	CAAATAAATCAAAAACTCCCAACA	139 bç
Bid Metile Forward	CGTTATAAGGAGGAAGCGGGTAGTC	186 bç
Bid Metile Revers	GAACCCTAAACTCCACGCCG	186 bç
Bid UNMetile Forward	TGTTATAAGGAGGAAGTGGGTAGTT	186 bç
Bid UNMetile Revers	AACAAACCCTAAACTCCACACCA	186 bç

MS-PZR reaksiyon koşulları:

94 ^{0}C 10 dk.
94 ^{0}C 1 dk.
56 ^{0}C 1 dk.
72 ^{0}C 1 dk.
72 ^{0}C 10 dk.

2.4. Kromatin Immunopresipitasyon Deneyleri (ChIP)

Kromatin Immunpresipitasyon, araştırılan genomda, çalışmaya başlanıldığı anda sorgulanan genin promoter bölgesine araştırılan proteinlerin bağlı olup oladığını cevaplayan bir tekniktir. Teknik başlıca şu aşamalardan oluşur;

a. Hücrelerin DNA'ları ile ilişkide olan proteinlerin formaldehit yardımı ile DNA'ya çapraz bağlanmaları. Bu bağlanma DNA bazlarının endosiklik imino grupları ve ekzosiklik amino grupları ile histidin, lizin ve arjininin nitrojenlerinin yan grupları arasında oluşmaktadır.

b. Kromatinin Mikrokokkal nükleaz ve sonikasyon yardımı ile yaklaşık 150-900 bazçifti uzunluğunda fragmanlara ayrılması.

c. Fragmanlara ayrılmış kromatinin sorgulanan proteinlerin antikorları ile çöktürülmesi.

d. ilk adımda gerçekleştirilen proteinlerin DNA'ya çapraz bağlanmasının geri çevrilmesi.

e. DNA'nın pürifikasyonu. (Kuo ve Allis, 1999)

Kromatin Immunopresipitasyon deneyleri 'Simple ChIP Enzimatik Kromatin IP kit' (Manyetik boncuk ayırma yöntemi ile) (Cell Signalling/A.B.D.) prosedürüne göre gerçekleştirildi. Çalışmada bir kromatin preparasyonu için yaklaşık $4x10^7$ hücre kullanıldı. Bu bir kromatin preparasyonu da 10 farklı immunpresipitasyon için kullanıldı. Çalışma altı adımda gerçekleştirildi.

İlk adımda; Çalışma anında hücrelerin DNA'ları üzerinde bulunan proteinlerin çapraz bağlanması ardından da kromatinin parçalanması işlemleri gerçekleştirildi. Çalışmaya başlamadan önce 200x Proteaz Inhibitör Kokteyl, 1M DTT, 0,1 M PMSF ve 10x ChIP tamponu oda ısınsa getirildi. Şu kimyasallar ise buz üzerine konarak çalışma öncesi soğutuldu ve hazırlandı; 10x Glisin, 1x PBS, 1x PBS+ 100 ul PMSF,10 ul 1x Tampon A (2,5 ml 4x tampon A+7,5 ul su)+ 5 ul 1 M DTT+ 50 ul 200x Proteaz Inhibitör Kokteyl (PIC) + 100 ul PMSF,11 ul 1x Tampon B (2,75 ml 4x Tampon B+ 8,25 ml su)+ 5,5 ul 1M DTT, 1 ml 1x ChIP Tampon (100 ul 10x ChIP Tampon+900 ul su) + 5 ul 200 X Proteaz Inhibitör Kokteyl (PIC) + 10 ul PMSF. Proteinleri DNA'ya çapraz bağlamak için; 540 ul %37'lik formaldehit hücreler üzerine eklenerek kısaca karıştırıldı ve 10 dk. Oda ısısında inkübe edildi. Ardından hücrelere 10 ul 10x glisin eklendi. Nazikçe karıştırılarak 5 dk. oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyonun ardından 1500 rpm.'de 5 dk. +4 ^{0}C'de santrifüj edilerek süpernatan atıldı ve pelet 20 ml buz içinde soğutulmuş 1x PBS ile iki kez yıkandı.

Ardından 10 ml buz içinde soğutulmuş 1x PBS+ PMSF eklenerek hücreler resüspanse edildi ve hücreler 15ml.'lik konikal tüplere kondu. Takiben 1500 rpm.'de 5 dk. +4 ^{0}C'de santrifüj edilerek süpernatan atıldı. Hücre peleti üzerine 10 ml buz içerisinde soğutulmuş tampon A+ DDT+PIC+PMSF eklenerek hücreler resüspanse edildi ve 10 dk.buz üzerinde inkübe edildi. İnkübasyon süresince her 3 dk.'da bir tüpler ters-düz edilerek karıştırıldı. İnlübasyonun ardından hücreler 3000 rpm.'de 5 dk. +4 ^{0}C'de santrifüj edilerek süpernatan atıldı ve pelet üzerine 10 ml buz içinde soğutulmuş tampon B+ DDT eklendi. Yeniden santrifüj edilerek süpernatan atıldı ve hücreler üzerine 1 ml. Tampon B+DDT eklenerek karıştırıldı, ardından hücreler 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi. Bu hücreler üzerine bu kez 5 ul mikrokkal nükleaz eklendi. Tüp ters-düz edilerek karıştırıldı, ardından 37 ^{0}C'de 20 dk. İnkübe edildi. İnkübasyon süresince de tüpler ters-düz edilerek karıştırıldı ve böylece hücrelerin DNA'ları yaklaşık 150-900bç uzunluğunda parçalanmış oldu. İnkübasyon sonunda hücreler üzerine 100 ul 0,5 M EDTA eklenerek tüpler buz üzerine alındı ve DNA'nın parçalanma işlemi durduruldu. Ardından 13,000 rpm.'de 1dk. +4 ^{0}C'de satrifüj edilerek süpernatan atıldı. Pelet üzerine 1ml 1xChIP tamponu +PIC+PMSF eklenerek karıştırıldı ve tüp içeriği iki adet 500 ul.'lik tüplere bölünerek 10 dk. Buz üzerinde inkübe edildi. İnkübasyonun ardından her bir tüp içindeki lizat, nüklear membranı parçalamak amacıyla birkaç saniye sonikasyona maruz bırakıldı. Ardından mikrosantrifüjde 10,000 rpm.'de 10 dk. +4 ^{0}C'de santrifüj edilerek süpernatan yeni bir tüpe transfer edildi. Böylece çalışma başında üzerinde bulunan proteinler ile çapraz bağlanmış kromatin preparasyonu elde edilmiş oldu. Bu preparasyondan 50 ul kromatinin uygun uzunlukta parçalanıp parçalanmadığını kontrol etmek için ayrıldı, geri kalan preparasyon deneyin ertesi gün yapılacak 3. adımı için -80 ^{0}C'ye kaldırıldı.

Bu ayrılan 50 ul.'lik preparasyon ile ChIP deneyinin 2. adımı gerçekleştirildi. Yapılması isteğe bağlı olan bu adımda amaç ilk adımda mikrokkal nükleaz ve sonikasyon işlemi ile DNA'yı yaklaşık 150-900 bç arasında parçalara ayırma işleminin doğru bir şekilde yapılıp yapılmadığı kontrol etmekti. Bu amaçla 50 ul kromatin örneği üzerine 100 ul nükleaz-free su 6 ul 5M NaCl ve 2 ul RNaz A eklendi, vortekslenerek 37 ^{0}C'de 30 dk. İnkübe edildi. Ardından 2 ul proteinaz K

eklenerek vortekslendi ve 65 ^{0}C'de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası spinkolon kullanılarak DNA pürifiye edildi. Ardından fragmente olmuş DNA'nın fragman büyüklüğünü belirlemek amacıyla 10 ul örnek % 1'lik agaroz jel içinde 1 kb.'lik marker ile beraber elektroforez yapıldı.

Ertesi gün ChIP prosedürünün 3. adımı olan 'Kromatinin ilgili antikorlar ile çöktürülmesi ' aşamasına geçildi. Bunun için; Bir tüp içerisinde, 1xChIP tampon hazırlanarak buz üzerine kondu. 1xChIP tamponu her bir immunpresipitasyon için 40 ul 10xChIP tamponu+ 360 ul distile su olacak şekilde hazırlandı Ayrıca tampon içine yine her bir immunpresipitasyon için 2 ul proteaz inhibitör kokteyl eklendi. Hazırlanan bu ChIP tamponu üzerine her bir immunpresipitasyon için 100 ul ilk adımda hazırlanan çapraz bağlanmış kromatin preparasyonu eklendi. Bu dilüe edilmiş kromatin örneğinden 10 ul ayrılarak daha sonraki adımda kullanmak üzere (%2'lik input örneği olarak) -20 ^{0}C'ye kaldırıldı. Ardından her bir immünpresipitasyon için 500 ul dilüe edilmiş kromatin mikrosantrifüj tüpüne konarak üzerine ilgili antikorlar (EZH2 Rabbit pAb Active Motif/A.B.D.,DNMT1 Mouse mAb Active Motif/A.B.D, Tri-Methyl-Histone H3 (Lys 27) Rabbit mAb Cell Signalling/A.B.D.) eklendi. (+) kontrol olarak kullanılan histon H3 antikoru için 10 ul immunpresipitasyon örneği, (-) kontrol olarak kullanılan normal tavşan IgG için ise 5 ul immunpresipitasyon örneği eklendi ve örnekler tüm gece +4 ^{0}C'de rotatorda çevrilerek inkübe edildi. İnkübasyonun ardından tüplere 30'ar ul 'ChIP Grade protein G manyetik boncuk'lardan eklenerek 2 saat +4 ^{0}C'de rotatorda çevrilerek inkübe edildi. İnkübasyon sonrası ChIP deneyinin 4. adımı olan 'Immunpresipite edilmiş Kromatinin yıkama aşaması' na geçildi. Çalışmaya başlamadan önce 'düşük tuz yıkama solüsyonu' ile 'yüksek tuz yıkama solüsyonu' hazırlandı. 'Düşük tuz yıkama solüsyonu'; 3 ml 1x ChIP Tamponu (100 ul 10x ChIp Tamponu+ 2,7 ml su). 'Yüksek tuz yıkama solüsyonu'; 1 ml 1X ChIP Tamponu (100 ul 10X ChIP Tamponu + 900 ul su) + 70 ul 5 M NaCl. Bu aşamada önce mikrosantrifüj tüpleri manyetik ayırma düzeneğine kondu. 1-2 dk inkübe edildi. Böylece manyetik boncuklara yapışmış olan kromatin, boncukların düzenekteki mıknatıslara yapışması ile pelet haline getirilmiş oldu. Süpernatan ise dikkatlice atıldı. Ardından tüplere 1 ml düşük tuz yıkama solüsyonu eklendi ve +4 ^{0}C'de 5 dk. çevirerek inkübe edildi.

İnkübasyon sonrası tüpler yeniden manyetik ayırma düzeneğine konarak 1-2 dk beklenildi. Pelet toplanınca süpernatan atıldı. Tekrar tüplere 1 ml düşük tuz yıkama solüsyonu eklendi ve +4 ^{0}C'de 5 dk. çevirerek inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüpler yeniden manyetik ayırma düzeneğine konarak 1-2 dk beklenildi. Pelet toplanınca süpernatan atıldı. Bu işlem bir kez daha tekrar edildi. Ardından 1 ml yüksek tuz yıkama solüsyonu eklendi ve +4 ^{0}C'de 5 dk. çevirerek inkübe edildi. Ve hemen deneyin 5 adımına geçildi. Bu adımda kromatin antikor/ protein G boncuklarından elüt edilmesi ve ilk adımda gerçekleştirilen proteinlerin DNA'ya çapraz bağlanmasının geri çevrilmesi amaçlandı. Çalışmaya başlamadan önce 150 ul. 1X ChIP Elüsyon Tamponu hazırlandı (75 ul 2X ChIp elüsyon tampon+ 75 ul su). Bunun için önce 150 ul 1xChIP elüsyon tamponu %2'lik input üzerine konarak bir kenra ayrıldı. Bir önceki aşamada yüksek tuz yıkama solüsyonu eklenmiş olan tüpler yeniden manyetik ayırma düzeneğine kondu ve 1-2 dk.'lık inkübe edildi. Peletin oluşmasının ardından süpernatan uzaklaştırıldı. Ardından her bir tüpe 150 ul 1X ChIP tamponu eklendi. Kromatin 30 dk. 65 ^{0}C'de nazikçe vortekslenerek, antikor/manyetik boncuklardan elüt edildi. Ardından tüpler yeniden manyetik separasyon düzeneğine yerleştirilerek 1-2 dk. nkübe edilidi ve pelet oluşumunun ardından bu kez kromatinin içinde bulunduğu süpernatan yeni bir tüpe alındı. %2'lik input örneğinin bulunduğu tüpte dahil tüm tüplere 6 ul 5 M NaCl ve 2 ul proteinaz K eklenerek 2 saat 65 ^{0}C'de inkübe edildi. Ardından son aşama olan Spin kolon kullanılarak DNA'nın pürifikasyon aşamasına geçildi. Bu aşamada önce her bir tüpteki DNA örneği üzerine 750 ul DNA'ya bağlanan tampon eklenerek kısaca vortekslendi. Ardından koleksiyon tüp içindeki DNA spin kolona 450 ul pürifiye edilecek DNA örneği transfer edilerek mikrosantrifüjde 30 sn. 14,000 rpm.'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası spin kolon koleksiyon tüpünden uzaklaştırıldı ve sıvı kısım atıldı. Spin kolon koleksiyon tüpüne yeniden yerleştirlip kalan 450 ul. örnek koleksiyon tüpü içindeki spin kolona transfer edildi ve yeniden mikrosantrifüjde 30 sn. 14,000 rpm.'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası spin kolon koleksiyon tüpünden uzaklaştırıldı ve sıvı kısım atıldı. Spin kolon koleksiyon tüpüne yeniden yerleştirldi. Koleksiyon tüpündeki spin kolona 750 ul DNA yıkama tamponu eklendi ve 30 sn. 14,000 rpm.'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası spin kolon koleksiyon tüpünden uzaklaştırıldı ve sıvı kısım atıldı. Yeniden 30 sn. 14,000

rpm.'de santrifüj edildi. Ardından spin kolona dokunmadan koleksiyon tüpü ve sıvısı uzaklaştırıldı. Her bir spin kolona 50 ul DNA elüsyon tamponu konarak temiz bir 1.5 ul.'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi. DNA'yı elüt etmek için sn. 14,000 rpm.'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası DNA spin kolon atıldı. Ve DNA kullanılıncaya kadar -20 ^{0}C'de saklandı.

2.4.1. Kromatin Immunpresipitasyon (ChIP) Sonrası İmmunpresipite Edilmiş Örneklerin Konvansiyonel PZR 'ı:

Bim ve Bid genlerinin promoter bölgelerine EZH2, Dnmt1 proteinlerinin bağlı olup olmadığının ve bu genlerin promotor bölgelerinde bulunan H3 histon proteinlerinin 27. Lizin rezidüsüne 3 metil grubunun eklenip eklenmediğinin araştırılması için ChIP sonrası konvansiyonel PZR yapıldı. PZR ' Simple ChIP Enzimatik Kromatin IP kit' in (Manyetik boncuk ayırma yöntemi ile) (Cell Signalling/A.B.D.) önerdiği şartlarda yapıldı. % 2 input örneği Bim genine spesifik primerlerle çoğaltıldı. (+) kontrol olarak kullanılan Histon 3, kit içinden çıkan RLP 30 primerleri ile çoğaltıldı. (-) kontrol olarak kullanılan normal tavşan IgG ise kit içinden çıkan fare RLP kontrol primerleri ile çoğaltıldı. Bim ve Bid genlerinin promoter bölgelerine spesifik primer dizisi aşağıda **Çizelge 2.8** 'de verilmiştir. Bim genine spesifik primer literatürden alınmış olup (Paschos K. ve ark., 2009), Bid genine spesifik primer tasarlanmıştır.

Çizelge 2.8. Primer Baz dizilimleri

Gen	**Primer baz dizilimi (5'-3')**	**PCR ürünü**
Bim Forward	CTGGTCTGCAGTTTGTTGGA	117 bç
Bim Reverse	GGTGGCTGCAAGAATCAAGT	117 bç
Bid Forward	GGCTTTGTTGTGTCCTCTCC	184 bç
Bid Reverse	TGTCTGCGGTGCTGGAAA	184 bç

PZR reaksiyon bileşikleri aşağıdaki **Çizelge 2.9** 'de verilmiştir.

Çizelge 2.9. PZR reaksiyon bileşikleri

Bileşen	**Miktar**
10X tampon	2 ul
dNTP (25 mM)	3,2 ul
MgCl2 (50 mM)	1,5 ul
Taq DNA polimeraz (hot start)	0,2 ul
DNA	2 ul
dH2O	9,1 ul
Primer forward	1 ul
Primer revers	1 ul

PZR Reaksiyon şartları:

95 ^{0}C 5 dk.

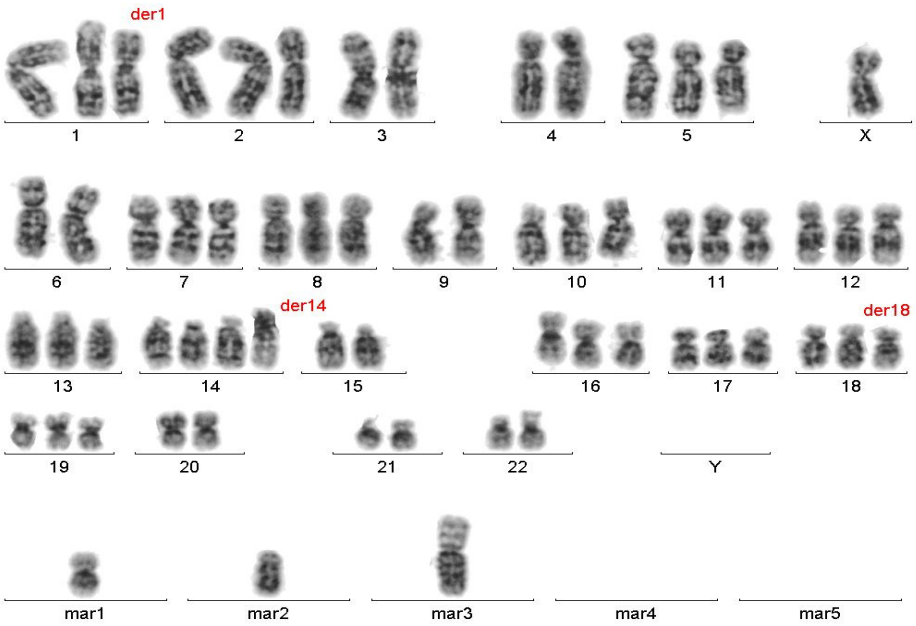
95 ^{0}C 30 sn.
Bağlanma sıcaklığı 30 sn.
(55 ^{0}C Bim)) (60 ^{0}C Bid)
72 ^{0}C 30 sn.
72 ^{0}C 5 dk.

PZR ürünleri % 2'lik jelde yürütüldü.

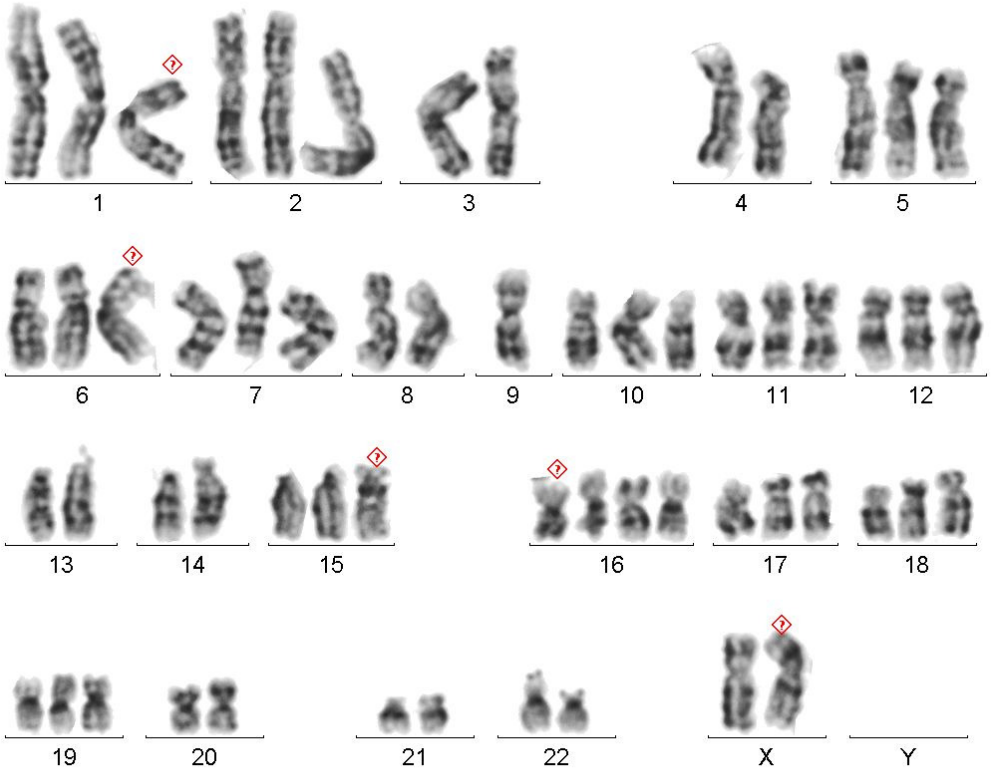
3. BULGULAR

3.1. K-562 Kronik Myeloid Lösemi Hücre hattında ve Imatinib Direnci Geliştirilmiş K-562/IMA-3 Kronik Myeloid Lösemi Hücre Hattında Sitogenetik Analiz Sonuçları:

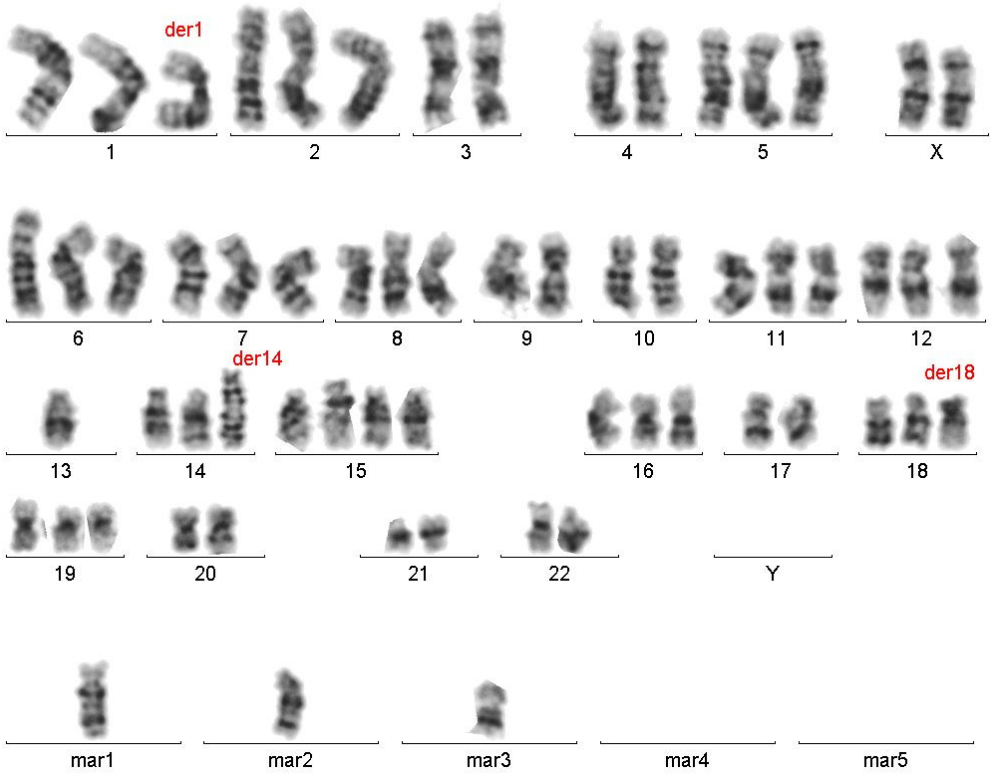
K-562 Kronik Myeloid Lösemi Hücre hattında ve Imatinib direnci geliştirilmiş K-562/IMA-3 Kronik Myeloid Lösemi Hücre hattında var olan klonal sitogenetik anomalilerin belirlenmesi ve Imatinib dirençli olmayan hücre hattı ile Imatinib direnci geliştirilmiş hücre hattı arasında olabilecek sitogenetik anomali faklılıklarının belirlenebilmesi amacıyla konvansiyonel sitogenetik yapıldı. Aşağıda Şekil 3.1, 3.2 ve 3.3 'de K-562 Kronik Myeloid Lösemi Hücre hattına ait karyotiplendirme sonuçları görülmektedir.



Şekil 3.1. Karyotip: 63,X,-X,+2,+5,+7,+8,+10,+11,+12,+13,+14,+16,+17,+19, +der (1),+der(14),+der(18),+mar1,+mar2,+mar3 [6]

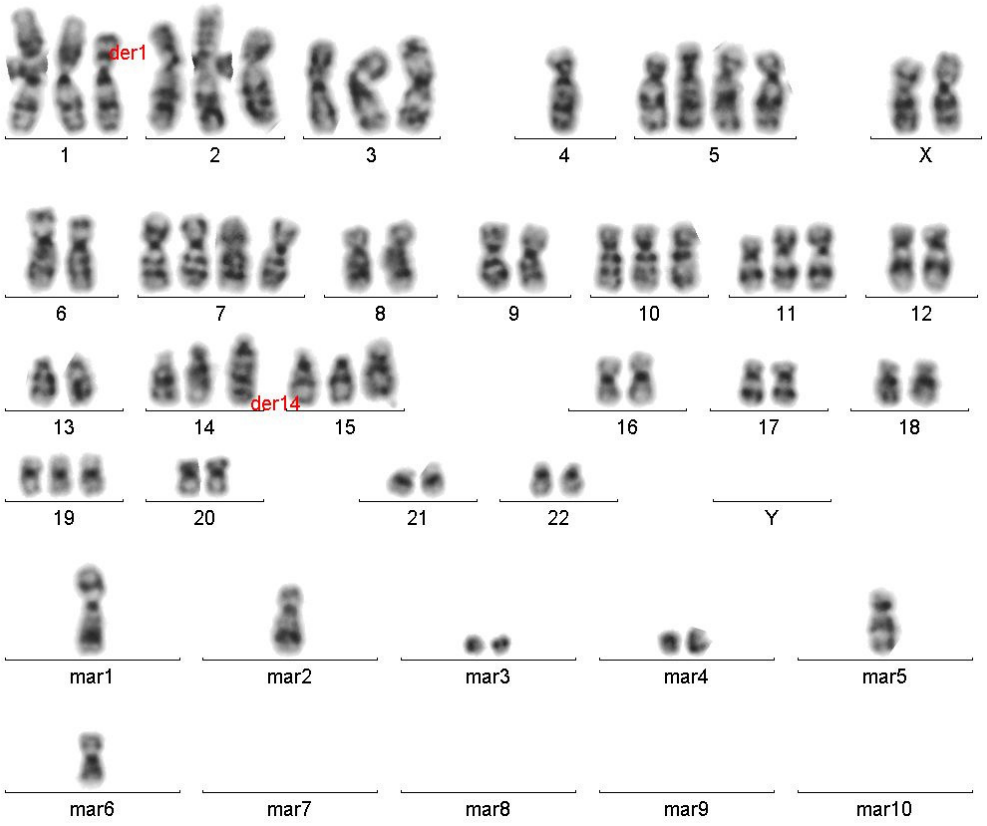


Şekil 3.2. Karyotip: 59,XX,,+2,+5,+6,+7,-9,+10,+11,+12,+16,+16,+17,+19, +der(1),+der(6), +der(15),+der(18) [4]

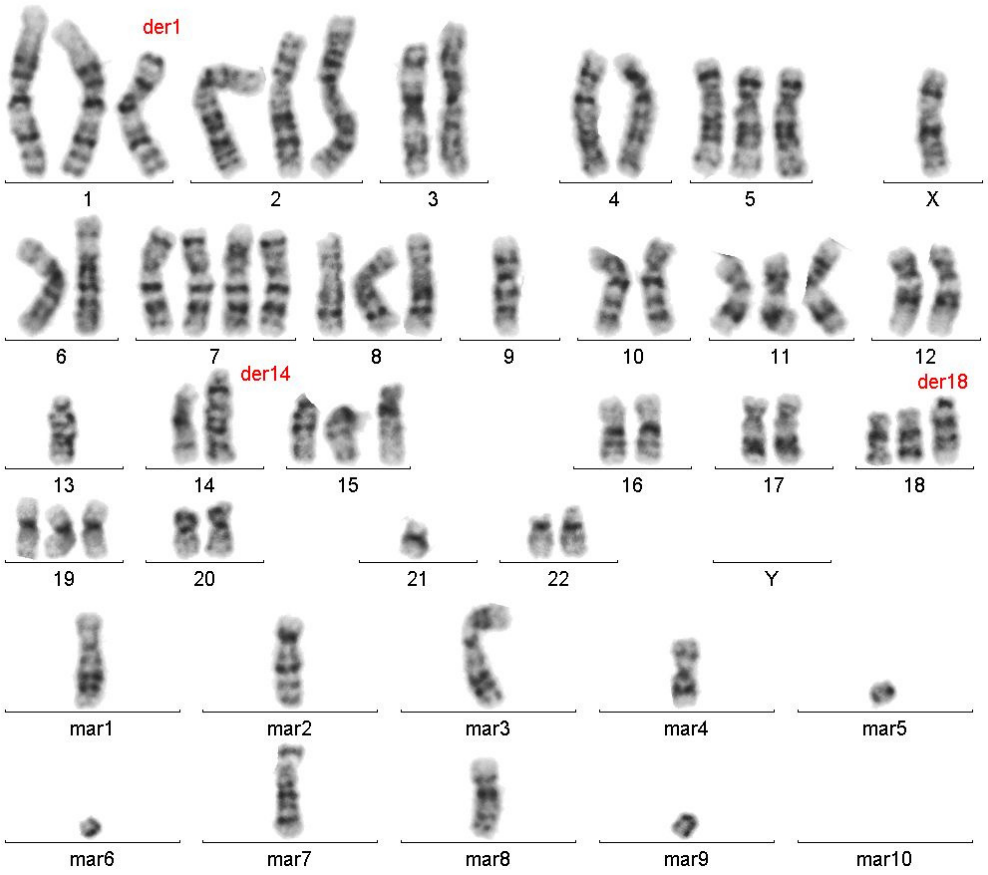


Şekil 3.3. Karyotip: 62,XX,+2,+5,+6,+7,+8,+11,+12,+15,+16,+19,+der(1),+der(14),+ der(15),+der(18),+mar1,+mar2,+mar3 [3]

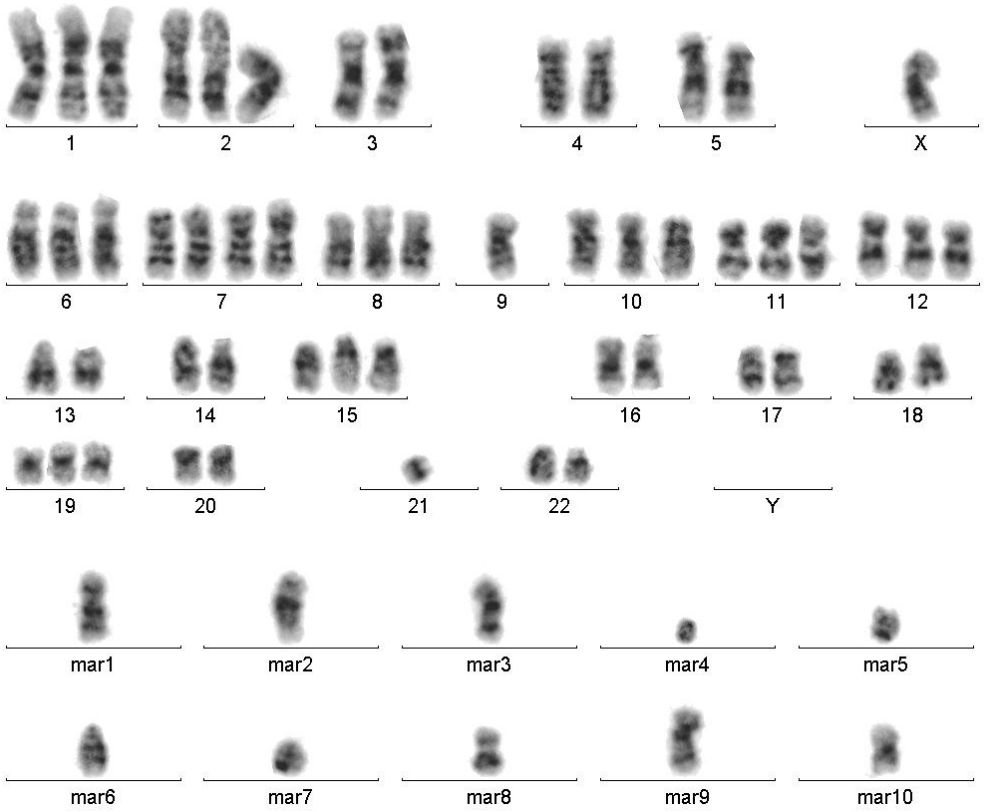
Aşağıda şekil 3.4, 3.5 ve 3.6'da Imatinib direnci geliştirilmiş K-562/IMA-3 Kronik Myeloid Lösemi Hücre hattına ait karyotiplendirme sonuçları görülmektedir.



Şekil 3.4. Karyotip: 66,XX,+2,+3,+5,+5,+7,+7,+10,+11,+19,+der(1), +der(14),+ der(15),+mar1,+mar2,+mar3,+mar4,+mar5,+mar6 [6]



Şekil 3.5. Karyotip: 66,XX,+2,+3,+5,,+7,+7,+8,,+11,+19,+der(1),+der(14),+der(15),+der(18),+mar1,+mar2,+mar3,+mar4,+mar5,+mar6,+mar7,+mar8,+mar9 [5]



Şekil 3.6. Karyotip: 63,XX,+1,+2,+3,+5,+6,+7,+7,+8+10,+11,+12, +19,der(14),+der(15),mar1,+mar2,+mar3,+mar4,+mar5,+mar6,+mar7,+mar8,+ mar9,+mar10 [3]

Karyotip sonuçlarına bakıldığında, K-562 hücre hattında kompleks karyotip tespit edildiği görülmektedir. Hem sayısal hem de yapısal sitogenetik anomaliler bulunmuştur. Analiz edilen 3 farklı karyotipte ortak olarak 5, 7, 10, 11, 12, 16 ve 19. kromozomların klonal artışı belirlenmiştir. Ayrıca derive 14, derive 15 ve derive 18 tespit edilmiştir. Bunun yanında 2 karyotipte tanımlanamayan 3 adet marker kromozom bulunmuştur.

K-562 Kronik Myeloid Lösemi hücre hattının İmatinib mesilat direnci geliştirilmiş hücre hattı olan K-562/IMA-3 hücrelerinin sitogenetik analizi sonucunda kompleks karyotip saptanmıştır. K-562/IMA-3 hücrelerinde, K-562 hücrelerinde olduğu gibi ortak olarak 5, 7, 10, 11, 12, 16 ve 19. kromozomların

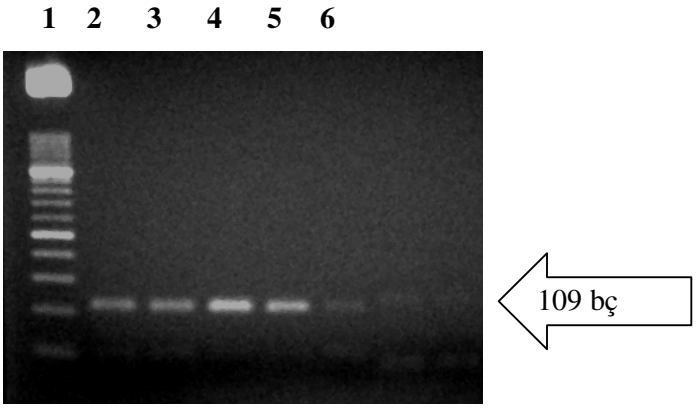
klonal artışı belirlenmiştir. Bundan başka yapısal olarak benzer şekilde derive 14, derive 15 ve derive 18 tespit edilmiştir. Imatinib direnci geliştirilmiş K-562/IMA-3 hücrelerinde, K-562'lerden farklı olarak tanımlanamayan marker kromozom sayısının bir karyotipte 2, diğer iki karyotipte ise 3 katına çıktığı belirlenmiştir.

Bu karyotip sonuçlarına bakılarak Imatinib Mesilat dirençli K-562/IMA-3 hücrelerinde sitogenetik anomalilerin, K-562 hücre hattına göre daha kompleks hale geldiği söylenebilmektedir.

3.2. Konvansiyonel PZR Sonuçları

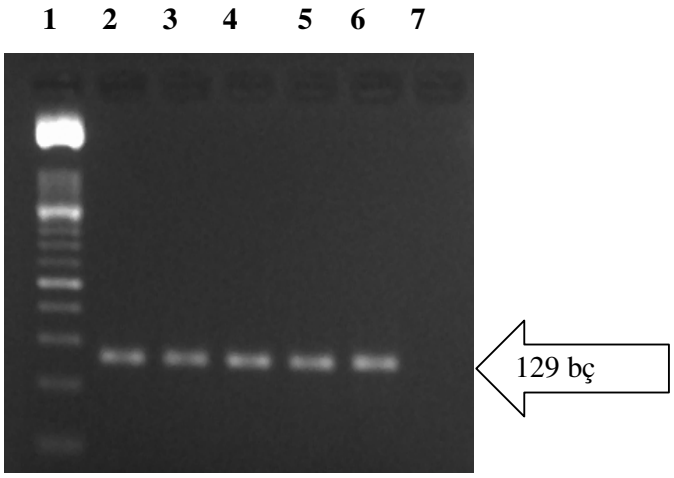
Myeloid Lösemi hücre hatlarında, araştırılan polikomb grup (PcG) proteinlerinin eş-zamanlı PCR yöntemi ile çalışılmasına başlanılmadan önce bu genlerin bu hücre hatlarında ifade edilip edilmedikleri konvansiyonel PZR ile çalışıldı. Amaç; ekspresyonları araştırılan polikomb grup (PcG) proteinlerinin PRC4 alt grubunda yer alan EZH1, EZH2, SUZ12, SIRT1, EED2 genleri ve proapoptotik genler olan Bim ve Bid genleri primerlerinin çalışıp çalışmadığını belirlemek, ayrıca primerlerin bağlanma sıcaklıkları, $MgCl_2$ düzeyleri gibi PZR koşullarının optimize etmekti. Bu amaçla araştırılan her gen için konvansiyonel PZR yapılarak optimal koşullar belirlendi.

PZR sonuçlarına göre hem K-562 Kronik Myeloid Lösemi ve hem de Imatinib Mesilat dirençli K-562/IMA-3 göre hem Kronik Myeloid Lösemi hücrelerinde araştırılan EZH1, EZH2, SUZ12, SIRT1, EED2 genlerinin ve proapoptotik genler olan Bim ve Bid genlerinin ifade edildikleri belirlenmiştir. PCR sonuçları aşağıda **Şekil 3.7 ile 3.13**'de verilmektedir.



Şekil 3.7. EED2 geni PZR ürünü

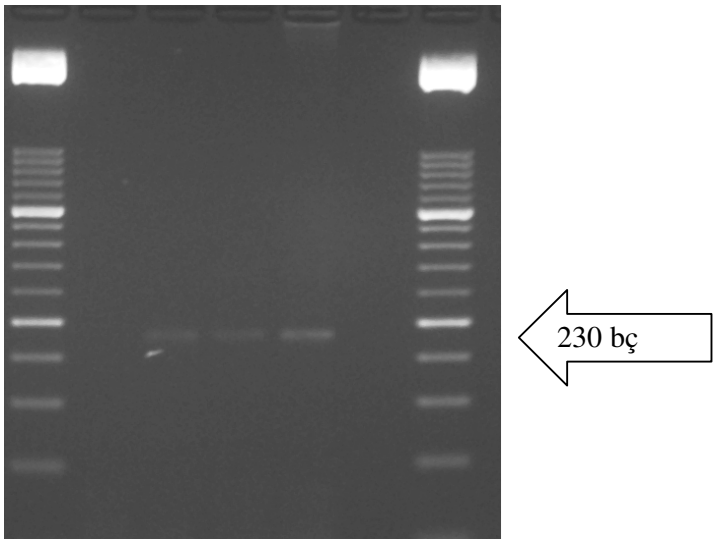
Kuyu 1) ladder (50 bç) **2)** Tümörlü kolon (+ kontrol) **3)** HL-60 hücre hattı (+) Kontrol) **4)** K-562 hücre hattı **5)** K-562/IMA-3 hücre hattı **6)** Negatif



Şekil 3.8. Bid geni PZR ürünü

Kuyu 1) ladder (50 bç) **2)** Tümörlü kolon (+kontrol) **3)** Tümörlü kolon (+ kontrol) **4)** HL-60 hücre hattı (+kontrol) **5)** K-562 hücre Hattı **6)** K-562/IMA-3 hücre hattı **7)** Negatif kontrol

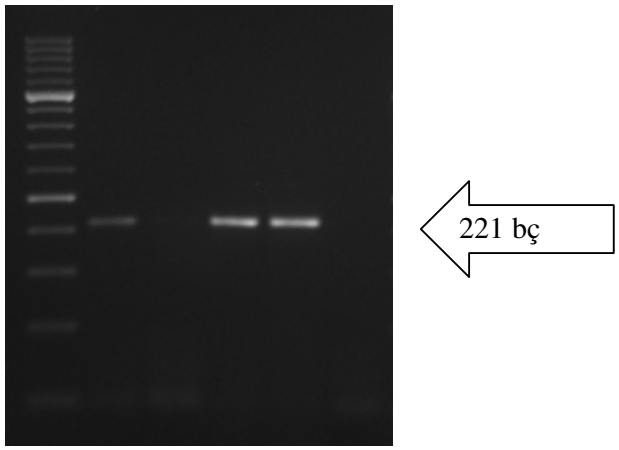
1 2 3 4 5 6



Şekil 3.9. Bim geni PZR ürünü

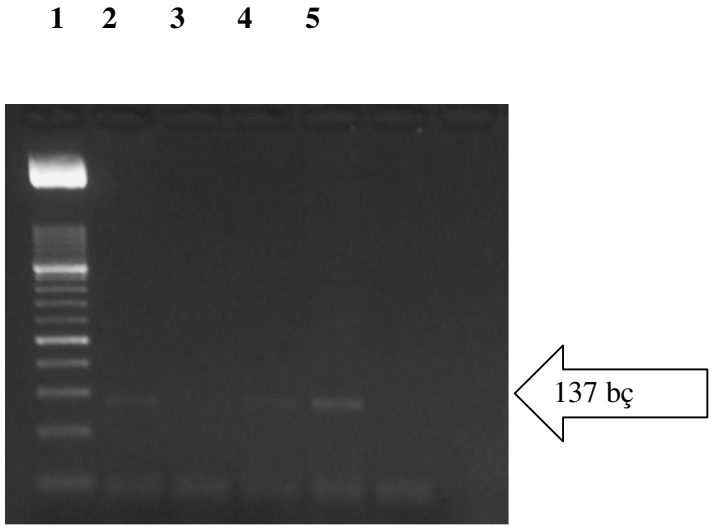
Kuyu 1) ladder (50 bç) Tümörlü kolon (+kontrol) **3)** K-562 hücre hattı **4)** K-562/IMA-3 hücre Hattı **5)** Tümörlü kolon (+kontrol) **6)** Negatif kontrol

1 2 3 4 5



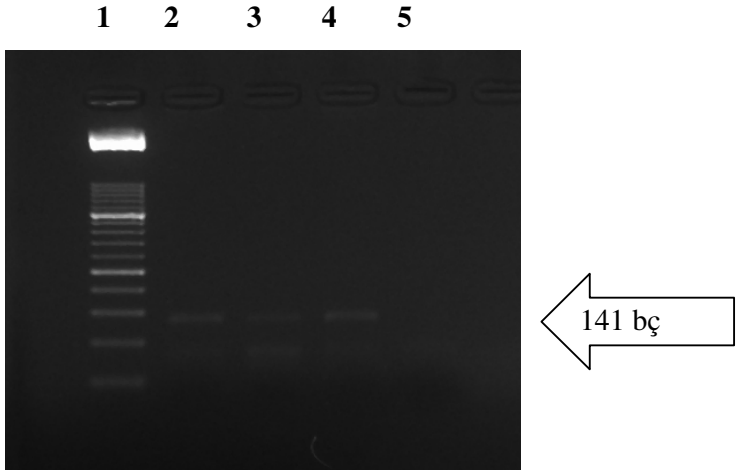
Şekil 3.10. SUZ12 geni PZR ürünü

Kuyu 1) ladder(50 bç) **2)**Tümörlü kolon (+) kontrol **3)** Negatif Kontrol **4)** K-562 hücre hattı **5)** K-562/IMA-3 hücre hattı



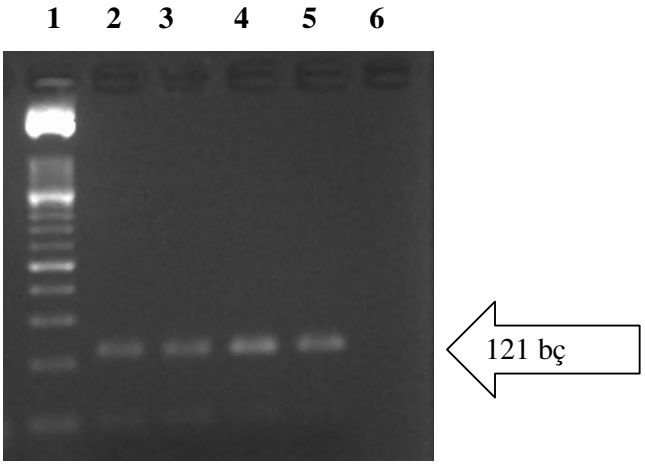
Şekil 3.11. EZH1 geni PZR ürünü

Kuyu 1) ladder(50 bç) **2)**Tümörlü kolon (+) kontrol **3)** Negatif kontrol **4)** K-562 Hücre hattı **5)** K-562/IMA-3 Hücre hattı



Şekil 3.12. SIRT1 geni PZR ürünü

Kuyu 1) ladder(50 bç) **2)**K-562 Hücre hattı **3)** K-562/IMA-3 Hücre **4)** Tümörlü kolon (+) kontrol **5)** Negatif kontrol



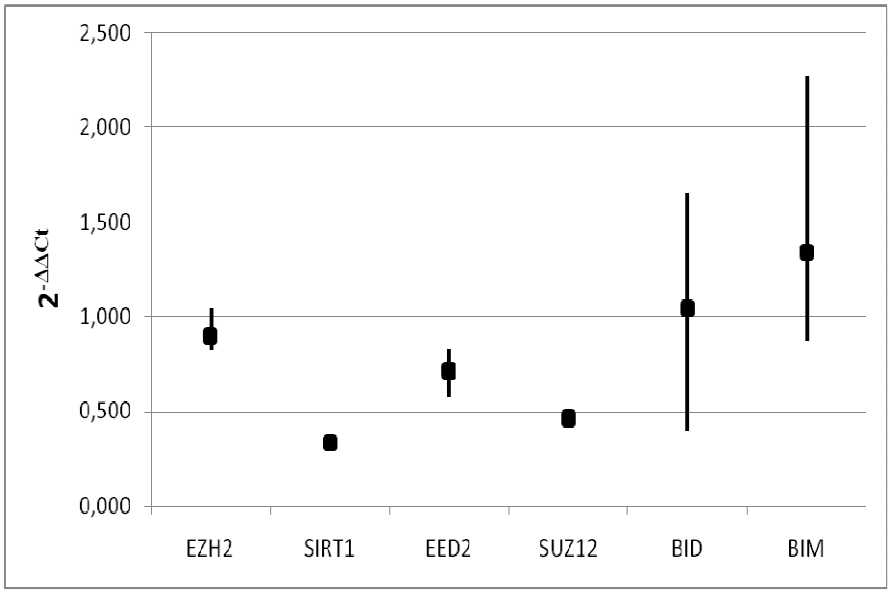
Şekil 3.13. EZH2 geni PZR ürünü

Kuyu1) ladder (50 bç) **2-3)** Tümörlü kolon (+) kontrol **4)** K-562 Hattı **5)** K-562/IMA-3 Hücre hattı **6)** Negatif kontrol

3.3. Eş-zamanlı Kıyaslamalı Kantitatif RT-PZR sonuçları

K-562 Kronik myeloid hücre dizisi ile Imatinib mesilat direnci geliştirilmiş K-562/IMA-3 hücre dizisi'nde direnç gelişiminde rol oynatıp oynamadıkları araştırılan PcG proteinlerinin PRC4 alt grubuna dahil EZH2, EED2, SIRT1,SUZ12 ve proapoptotik genler olan Bim ve Bid genlerinin, her iki hücre dizisinde de ifade edildiği konvansiyonel PZR ile gösterildikten sonra gen ifade düzeyleri kıyaslamalı kantitatif RT-PCR yöntemi ile belirlendi.

Kıyaslamalı kantitatif RT-PZR yönteminde kullanılan hesaplamalarda K-562 hücre hattından elde edilen veriler normal olarak alındı ve K-562/IMA-3 hücre hattındaki gen ifade farklılıklarını ortaya çıkarmakta kullanıldı. Aşağıda şekil 3.14'de EZH2, EED2, SIRT1, SUZ12 ve Bim ile Bid genlerine ait gen ifade farkını göstere $\mathbf{2^{-\Delta\Delta Ct}}$ değerleri verilmektedir.



Şekil 3.14. K-562 Kronik myeloid hücre hattı ve Imatinib mesilat dirençli K-562/IMA-3 Hücre hatlarında kıyaslamalı kantitatif EZH2, SIRT1, EED2, SUZ12, Bid ve Bim genlerinin ifadesi.

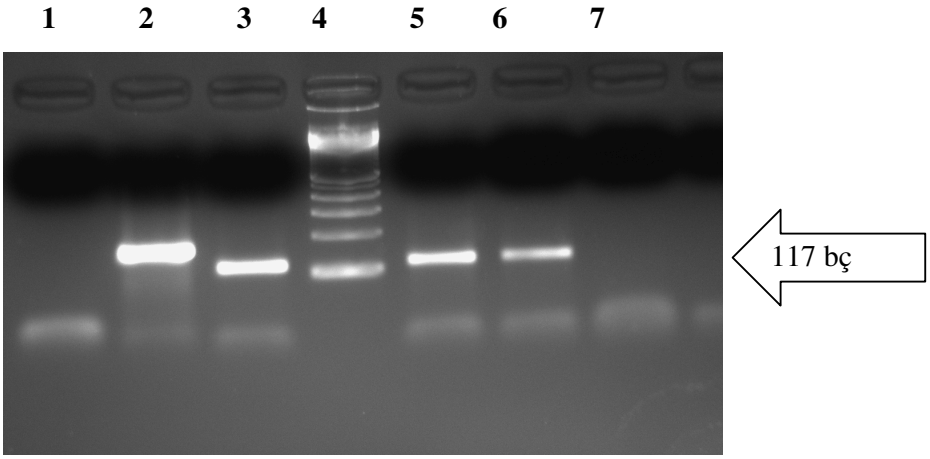
Eş-zamanlı Kıyaslamalı Kantitatif RT-PZR sonuçlarına göre, Imatinib mesilat direnci geliştirilmiş K-562/IMA-3 hücre hattında, PRC4 grubuna ait olan ve histonların epigenetik modifikasyonunda rol alan EZH2, SIRT1, EED2 ve SUZ12 genlerinin K-562 hücrelerine oranla daha düşük seviyede ifade edildiği, proapoptotik genler olan Bid ve Bim genlerinin ise daha yüksek miktarda ifade edildiği saptanmıştır.

3.4 ChIP deneyleri sonrası yapılan PZR sonuçları:

ChIP deneyleri K-562 Kronik Myeloid lösemi ve bu hücre hattının İmatinib mesilat direncine sahip karşılığı olan K-562/IMA-3 hücreleri ile yapıldı. ChIP deneyleri bu hücrelerin Bim ve Bid genlerinin promotor bölgelerine bir histon metil transferaz olan EZH2 proteinin ve bir DNA metil transferaz enzimi olan DNMT proteininin bağlı olup olmadığını tespit etmek amacıyla yapıldı. EZH2 proteini histon 3 proteinin 27. lizin rezidüsüne 3 metil grubu ekleyen bir enzim olduğundan dolayı araştırılan genlerin promotor bölgelerinde EZH2 enziminin varlığının yanı sıra bu bölgedeki

histon 3 proteinin 27. Lizin rezidüsüne 3 metil grubunun ekli olup olmadığı da ChIP deneylerinde H3K27me3'e spesifik antikorlar ile belirlenmiştir.

İlk olarak Imatinib mesilat dirençli K-562/IMA-3 hücreleri alınarak, H3K27me3'e spesifik antikor ile kromatin immunpresipitasyon yapılmış ve ardından Bim geni promotor bölgesine spesifik primerler ile konvansiyonel PZR yapılarak hedef bölge çoğaltılmıştır. PZR sonucuna göre, Imatinib mesilat dirençli K-562/IMA-3 hücrelerinin Bim geninin promotor bölgesinde yer alan Histon H3 proteinlerinin 27. lizin rezidüsüne 3 metil grubu bağlı bulunmuştur. PZR sonucu aşağıda **Şekil 3.15**'de verilmektedir.

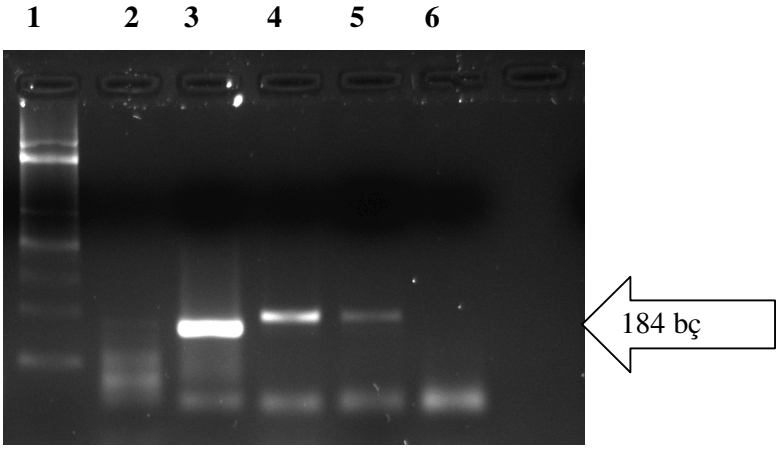


Şekil 3.15. K-562/IMA-3 hücrelerinin anti-H3K27me3 ile çöktürülmüş ChIP sonrası Bim geni PZR sonucu

Kuyu 1) (–) kontrol **2)** (+) kontrol **3)** % 2'lik input DNA **4)** 50 bç marker **5)** K-562/IMA-3 1no'lu örnek **6)** K-562/IMA-3 2 no'lu örnek **7)** No DNA

Ardından tekrar K-562/IMA-3 hücreleri alınarak H3K27me3'e spesifik antikor ile kromatin ımmunpresipitasyon yapılmış ve bu kez Bid geni promotor bölgesine spesifik primerler ile konvansiyonel PZR yapılarak hedef bölge çoğaltılmıştır. PZR sonucuna göre, Imatinib mesilat dirençli K-562/IMA-3 hücreleri' nin Bid geninin

promotor bölgesinde yer alan Histon 3 proteinlerinin 27. lizin rezidüsüne 3 metil grubu bağlı bulunmuştur. PZR sonucu aşağıda **Şekil 3.16**'da verimektedir.



Şekil 3.16. K-562/IMA-3 hücrelerinin anti-H3K27me3 ile çöktürülmüş ChIP sonrası Bid geni PZR sonucu

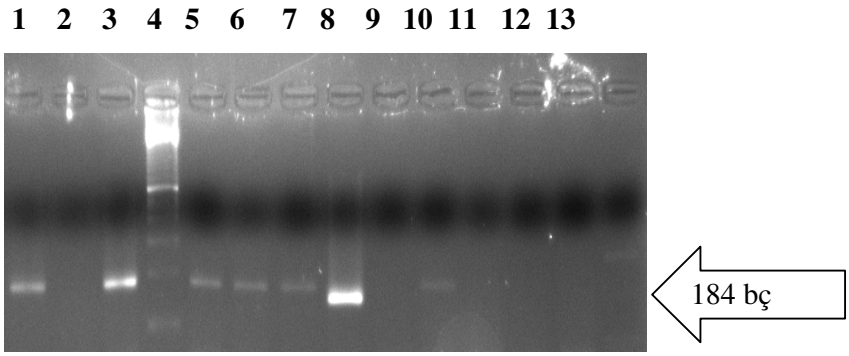
Kuyu 1) 50 bç marker **2) (**–) kontrol **3)** (+) kontrol **4)** % 2'lik input DNA **5)** K-562/IMA-3 DNA örneği **6)** No DNA

Imatinib mesilat dirençli K-562/IMA-3 hücrelerinin Bid geninin promotor bölgesinde EZH2 ve DNMT1 proteinlerinin varlığını araştırmak amacıyla hücreler bu kez anti-EZH2 ve anti DNMT1 antikorları kullanılarak ChIP yapılmış ve ardından konvansiyonel PZR ile hedef bölge çoğaltılmıştır. PCR sonucuna göre; K-562/IMA-3 hücrelerinin Bid geninin promotor bölgesinde EZH2 ve DNMT1 proteinlerinin bağlı olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 3.17).

Ardından K-562 kronik myeloid lösemi hücrelerinin Bid geninin promotor bölgesinde EZH2 ve DNMT1 proteinlerinin varlığını araştırmak ve promotor bölgedeki H3 histon proteinlerinin 27. Lizin rezidülerine 3 metil grubunun bağlı olup olmadığının belirlemek amacıyla hücreler bu kez anti-EZH2, anti DNMT1 ve antiH3K27me3 antikorları kullanılarak ChIP yapılmış ve takiben konvansiyonel PZR

yapılmıştır. Çalışma sonunda; K-562 kronik myeloid lösemi hücrelerinin Bid geninin promotor bölgesinde EZH2 ve DNMT1 proteinlerinin bağlı olduğu ayrıca bu bölgedeki H3 histon proteinlerinin 27. lizin rezidülerine 3 metil grubunun eklenmiş olduğu tespit edilmiştir.

PZR jel görüntüsü aşağıda **Şekil 3.17**'de verilmektedir.

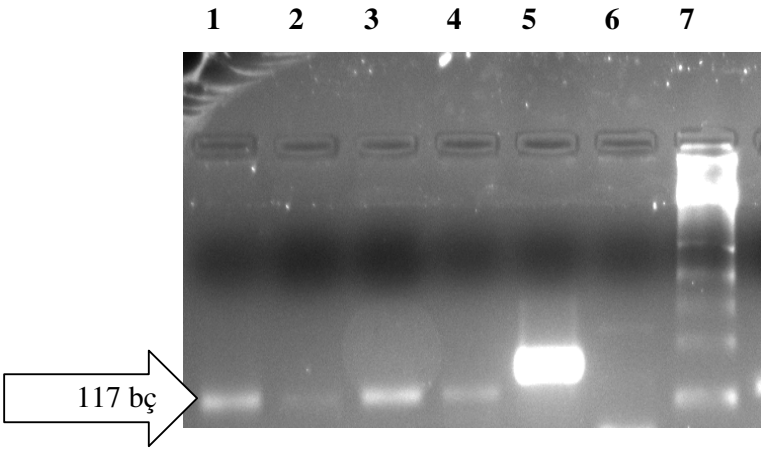


Şekil 3.17. K-562 ve K-562/IMA-3 hücrelerinin anti-H3K27me3, anti- EZH2 ve anti-Dnmt1 antikoru ile çöktürülmüş ChIP sonrası Bid geni PZR sonucu

Kuyu 1) K-562 Bid (+) kontrol **2)** K-562 Bid (-) kontrol **3)** K-562 Bid % 2'lik İnput DNA **4)** 50 bç marker **5)** K-562 EZH2 Bid **6)** K-562 Dnmt1 Bid **7)** K-562 H3K27me3 Bid **8)** K-562/IMA-3 Bid (+) kontrol **9)** K-562/IMA-3 Bid (-) kontrol **10)** K-562/IMA- 3 Bid % 2'lik input DNA **11)** K-562/IMA-3 EZH2 Bid **12)** K-562/IMA-3 Dnmt1 Bid **13)** No DNA

K-562 kronik myeloid lösemi hücrelerinin Bim geninin promotor bölgesine EZH2 ve DNMT1 proteinlerinin bağlı olup olmadığını belirlemek ve promotor bölgedeki H3 histon proteinlerinin 27. Lizin rezidülerine 3 metil grubunun eklenmiş olup olmadığını araştırmak amacıyla hücreler bu kez anti-EZH2, anti-DNMT1 ve anti-H3K27me3 antikorları ile ChIP yapılmış ve ardından konvansiyonel PZR yapılmıştır. Çalışma sonunda; Imatinib mesilat dirençli K-562 hücrelerinin Bim

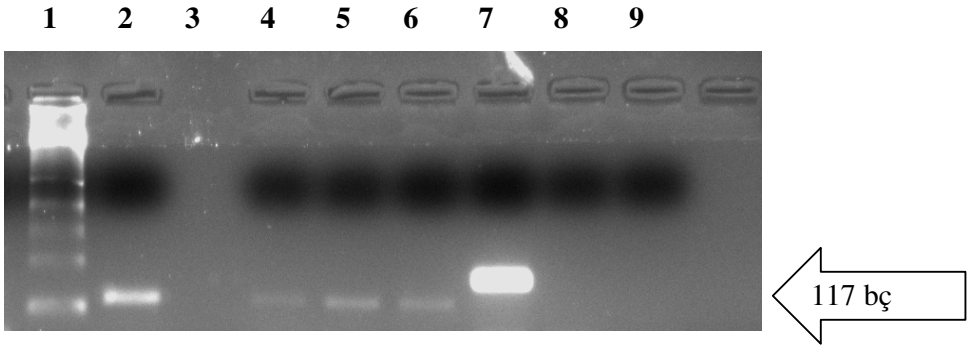
geninin promotor bölgesinde EZH2 ve DNMT1 proteinlerinin bağlı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca K-562 kronik myeloid lösemi hücrelerinin Bim geninin promotor bölgesinde yer alan H3 Histon proteinlerinin 27. Lizin rezidüsüne 3 metil grubunun eklenmiş olduğu belirlenmiştir. PZR jel görüntüsü aşağıda **Şekil 3.18**' de verilmektedir.



Şekil 3.18. K-562 hücrelerinin anti-H3K27me3, anti- EZH2ve anti-Dnmt1 antikoru ile çöktürülmüş ChIP sonrası Bim geni PZR sonucu

Kuyu 1) K-562 Bid % 2'lik İnput DNA **2)** K-562 Dnmt1 Bim **3)** K-562 EZH2 Bim **4)** K-562 H3K27me3 Bim **5)** K-562 Bim (+) Kontrol **6)** K-562 Bim (-)Kontrol **7)** 100 bç marker

Imatinib mesilat direnci geliştirilmiş K-562/IMA-3 hücrelerinin Bim geninin promotor bölgesine EZH2 ve DNMT1 proteinlerinin bağlı olup olmadığının araştırılması için hücreler bu kez anti-EZH2 ve anti DNMT1 antikorları kullanılarak ChIP yapılmış ve ardından konvansiyonel PZR yapılmıştır. PZR sonucuna göre; K-562/IMA-3 hücrelerinin Bim geninin promotor bölgesinde EZH2 ve DNMT1 proteinlerinin bağlı olduğu tespit edilmiştir. ChIP sonrası yapılan konvansiyonel PZR sonucu aşağıda **Şekil 3.19**'da verilmiştir.



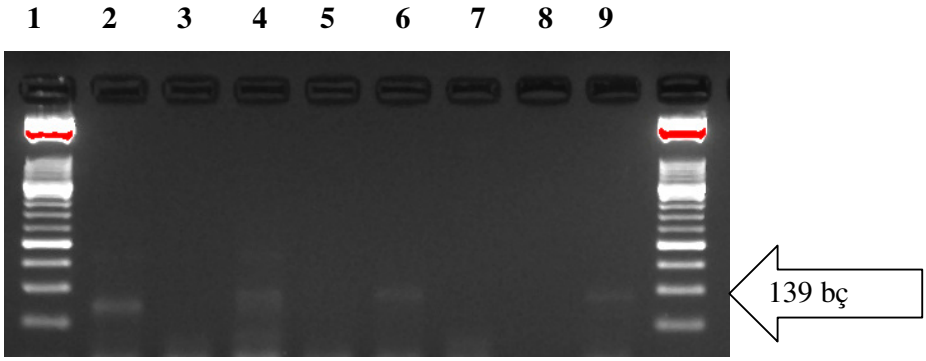
Şekil 3.19. K-562/IMA-3 hücrelerinin anti-H3K27me3, anti- EZH2 ve anti-Dnmt1 antikoru ile çöktürülmüş ChIP sonrası Bim geni PZR sonucu

Kuyu 1) 100 bç ladder **2)** K-562 /IMA-3 Bim % 2'lik İnput DNA **3)** Boş kuyu **4)** K-562/IMA-3 Dnmt1 Bim **5)** K-562/IMA-3 EZH2 Bim **6)** K-562/IMA-3 H3K27me3 Bim **7)** K-562/IMA-3 Bim (+) kontrol **8)** K-562/IMA-3 Bim (-)Kontrol **9)** No DNA

3.5 Metilasyon Spesifik PZR sonuçları (MS-PZR)

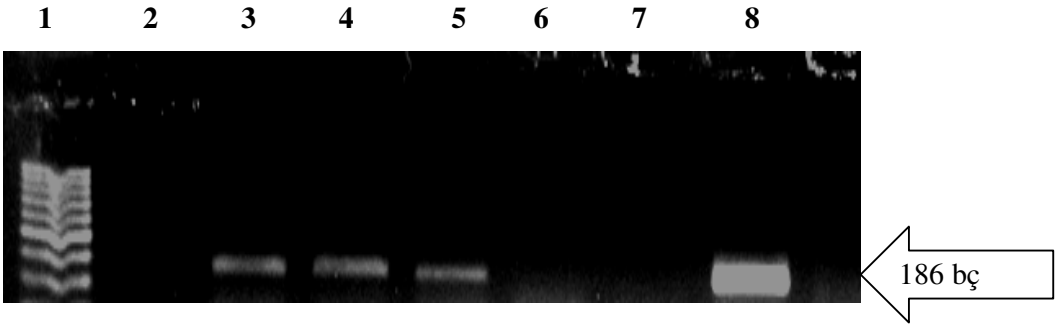
K-562 Kronik myeloid lösemi ve Imatinib mesilat dirençli K-562/IMA-3 Kronik myeloid lösemi hücre hatlarında Bim ve Bid proapoptotik genlerinin promotor bölgesine DNA'yı metilleyen enzim olan DNMT1'in varlığının ChIP deneyi ile sorgulanmasının ardından Bim ve Bid genlerinin promotor bölgesinin metilasyon durumu Metilasyon Spesifik PZR ile araştırıldı.

Her iki hücre hattından elde edilen DNA'ların bisülfüt modifikasyonunun ardından Bim ve Bid genlerinin promotor bölgesine spesifik primerlerle metilasyon spesifik PZR gerçekleştirildi. PZR ürünlerinin % 2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmesinin ardından elde edilen sonuca göre hem K-562 hem de K-562/IMA-3 hücre hattında Bim ve Bid geninin promotor bölgesinde bulunan CpG adası sitozinleri metillenmemiş bulundu. Jel görüntüleri aşağıdaki **Şekil 3.20** ve **3.21** 'de verilmektedir.



Şekil 3.20. K-562 ve K-562/IMA-3 Hücrelerinde Bim geni MS-PZR sonucu

Kuyu 1) 50 bç marker **2)** K-562 Bim unmetile band **3)** K-562 Bim metile primerlerle çoğaltılan örnek **4)** K-562/IMA-3 Bim unmetile band **5)** K-562/IMA-3 Bim metile primerlerle çoğaltılan örnek **6)** Periferik kan Bim unmetile band **7)** Periferik kan Bim metile primerlerle çoğaltılan örnek **8)** (+) kontrol Bim unmetile primerlerle çoğaltılan örnek **9)** (+) kontrol Bim metile band



Şekil 3.21. K-562 ve K-562/IMA-3 Hücrelerinde Bid geni MS-PZR sonucu

Kuyu 1) 50 bç marker **2)** Unmetile negatif kontrol **3)** K-562 Bid unmetile band **4)** K-562 /IMA Bid unmetil band **5)** Unmetile pozitif kontrol **6)**K-562 Bid metile primerlerle çoğaltılan örnek **7)** K-562/IMA-3 Bid metile primerlerle çoğaltılan örnek **8)** Metile pozitif kontrol

Çalışmada ilk olarak K-562 Kronik Myeloid lösemi hücre hattında ve Imatinib mesilat direnci geliştirilmiş K-562/IMA-3 Kronik Myeloid lösemi hücre hattında DNA'yı ve Histon proteinlerini modifiye eden Polikomb grup (PcG) genlerinin ifade

edidiği hem konvansiyonel hem de eş zamanlı PZR ile belirlendi. Ardından her iki hücre hattında Bim ve Bid proapototik genlerinin promotor bölgesinde, polikomb grup proteinleri içinde yer alan ve H3 histon proteininin 27. lizin rezidüsüne 3 metil grubunun eklenmesi reaksiyonunu gerçekleştiren EZH2 enziminin varlığı ChIP deneyi ile gösterildi. Ardından gene her iki hücre hattında Bim ve Bid genlerinin promotor bölgesinde yer alan H3 histon proteinlerinin 27. Lizin rezidülerine 3 metil grubunun bağlı olup olmadığı ChIP deneyi ile gösterildi. Ayrıca DNA'daki sitozin bazları metilleyen DNMT1 enziminin Bim ve Bid genlerinin ptomotor bölgesinde bulunup bulunmadığı da gene ChIP deneyi ile gösterildi.

4. TARTIŞMA

Polikomb grup proteinleri (PcG) çok hücreli organizmalarda normal gelişim için temel olan proteinlerdir. Bunlar evrimsel olarak yüksek derecede korunmuş regülatörlerdir ve çoklu protein kompleksleri oluşturarak fonksiyon görürler. Gelişim süresince farklılaşma yolaklarını kontrol eden birkaç bin genin transkripsiyonel baskılayıcısıdırlar.

PcG proteinlerinin transkripsiyonel baskılayıcı olarak nasıl fonksiyon gördükleri tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile PcG'lerin çeşitli hücresel işlemlerde rol aldıkları belirlenmiştir. Bunlar; Hücre döngüsü kontrolü, kanser, hücre senesensi, X-inaktivasyonu, hücre kaderinin belirlenmesi ve kök hücre farklılaşması şeklinde sıralanabilir.

Tanımlanmış üç tip polikomb baskılayıcı kompleks vardır.

1.Grup; PRC1 adını alır. 2.Grup; PRC2/3 adını alır. 2. Grubu oluşturan proteinler; EED (Embriyonic-ectoderm-development), Histon metil transferazların EZH ailesi üyeleri ve SUZ 12 (Suppressor of zeste 12) 'dir. 3.Grup ise; PRC4 adını alır. PCR4 grubu proteinler özellikle embriyonik kök hücrelerde, farklılaşmamış pluripotent hücrelerde ve kanser hücrelerinde ifade edilirler. Bu grupta yer alan proteinler ise; EZH1, EZH2 Histon metil transferazları, EED'nin EED2 izoformu, SUZ12 ve SIRT1 (stress-sensing protein)'dir. EED proteinlerinin EED2 izoformu ve SIRT1 PRC4'e spesifik proteinlerdir.

PRC2/3 ve PRC4 protein komplekslerinde yer alan EZH2 enzimi bir metil transferazdır ve H3 Histon proteinlerinin 27. Pozisyonundaki lizin rezidüsüne 2 veya 3 metil grubu ekler. Ancak bu fonksiyonunu gerçekleştirebilmesi için kompleksde yer alan SUZ12 ve EED proteinlerine ihtiyaç duymaktadır. H3 Histon proteinine 3 metil grubunun eklenmesi inaktive edici bir kromatin modifikasyonudur. Modifikasyonun gerçekleştiği genin promotor bölgesine genin ifadesini engelleyen

bir takım modifikasyonları gerçekleştirecek enzimlerin çekilmesi ile gen ifadesi engellenmiş olur (Raaphorst, 2005; Morey ve Helin, 2010).

Bu tez çalışmasında; KML blastik fazda Imatinib mesilat'a karşı geliştirilen ilaç dirençliliğinde, PcG proteinlerinin PRC4 alt grubunun aberan ekspresyonu ve bunların proapoptoptik proteinler olan Bim ve Bid proteinleri üzerinde gerçekleştirdikleri düşünülen epigenetik modifikasyonların olası rolü araştırılmıştır.

Bu amaçla Imatinibe duyarlı olan K-562 hücre dizisi ile dirençli olan K-562/IMA-3 hücre dizisinde PRC4 protein kompleksinde yer alan proteinlerin ifade edilip edilmediği konvansiyonel PZR ile araştırılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda her iki hücre dizisinde de PRC4 alt grubunda yer alan EZH2, SUZ12, EED2 ve SIRT1'in ifade edildiği belirlendi. EED proteinlerinin EED2 izoformu ile bir histon deasetilaz olan SIRT1, PRC4'e spesifik olduğundan; Imatinib duyarlı K-562 ve dirençli K-562/IMA-3 hücre dizilerinde PcG proteinlerinin PRC4 alt grubunun ifade edildiği gösterilmiştir. Ayrıca PRC4 protein kompleksinin yalnız embriyonik kök/progenitör hücrelerde ve kanser hücrelerinde ifade edildiği belirtilmektedir. PRC4'e spesifik olan EED2 izoformu normal ve farklılaşmış embriyonik kök hücrelerde ifade edilmediği bildirilmektedir (Baylin ve Ohm., 2006).

Biz de çalışmamızda EZH2, SUZ12'nin ifadesinin yanı sıra yalnız PRC4 kompleksinde yer alan EED2 ve SIRT1'in bu hücre dizilerinde ifade edildiğini dolayısı ile Imatinib duyarlı ve dirençli kronik myeloid lösemi kanser hücrelerinde PRC4 protein kompleksinin ifade edildiğini göstermiş olduk. Literatüre uyumlu olarak çıkan bu sonucumuz Imatinib duyarlı ve dirençli Kronik Myeloid Lösemi hücrelerinde ilk defa PRC4 kompleksi proteinlerinin ifade edildiğini gösteren bir çalışmadır.

Literatürde çalıştığımız PRC4 proteinleri ile ilgili yapılan çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin Kuzmichev ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, PRC4 alt grubunda yer alan proteinlerin ifadelerinin kanser süresince ve hücrelerin farklılaşması süresince düzenlendiğini gözlemlemişlerdir. Transforme olmuş hücreler

kısmi olarak yeniden farklılaşma gösterdikleri için, araştırıcılar hücresel farklılaşma durumunun bir fonksiyonu olarak birkaç PRC komponentinin seviyelerini karşılaştırmışlar. Fare embriyonik kök hücrelerinde in vitro farklılaşma süresince PRC2/3/4 alt grupları ile ilintili olarak EED proteinlerinin farklı izoformlarının ifade edildiklerini belirlemişlerdir.

PRC4'e spesifik olan EED2 izoformunun farklılaşmamış fare embriyonik kök hücrelerde yüksek seviyede ifade edildiği, farklılaşmanın indüklenmesi ile EED2 izoformunun daha düşük ifade edildiğini belirlemişlerdir (Kuzmichev ve ark., 2005).

Bizim de çalışmamızda kullandığımız K-562 hücre serisi blastik faz myeloid lösemi hücrelerini içeren bir seridir ve hücreler kronik faza göre daha az farklılaşma gösterirler. Dolayısı ile bu daha az farklılaşmış hücrelerde bulduğumuz EED2 izoformunu içeren PRC4 protein kompleksinin ifade edilmesi literatür ile uyumluluk göstermektedir. Ayrıca kronik faza göre daha az farklılaşmış KML blastik faz hücrelerinde ifade edildiğni saptadığımız bir diğer PRC4 komponenti olan EZH2 proteini de literatürde farklı kanser tiplerinin farklılaşması bloke olmuş hücrelerinde, farklılaşan hücrelere göre daha yüksek seviyede bulunmuştur. Hepatosellüler karsinoma hücrelerinde yapılan bir çalışmada hücre farklılaşması arttıkça EZH2 seviyesinin düştüğü tespit edilmiştir (Sasaki ve ark., 2008). Yapılan bir diğer çalışmada ise mürin hepatik kök hücrelerde EZH2'nin farklılaşma ve çoğalmayı düzenlediği gösterilmiştir (Aoki ve ark.,2010).

Çalışmamızda her iki hücre serisinde de ifade edildiğini gösterdiğimiz bir histon metil transferaz enzimi olan EZH2 proteinin bir çok çalışmada farklı kanser tiplerinde aşırı ifade edildiği gösterilmiştir. Bu çalışmalara dair örnekler şu şekilde sıralanabilir. Ding ve Kleer adlı araştırıcılar yaptıkları bir çalışmada EZH2 ifadesinin, meme kanseri hastalarında özellikle meme kanser metastazlarında artış gösterdiğini belirlemişler. Ayrıca bu artışın kötü prognoz ile ilintili olduğunu bulmuşlar. Artmış EZH2 ifadesinin meme tümörlerinde yüksek hücre çoğalma oranı ile pozitif olarak ilintili bulmuşlar. Araştırıcılar bunun mekanizmasının tam olarak bilinmediğini, ancak EZH2'nin EED2 ile birlikte RB-E2F hücre siklus kontrol

yolağını regüle ederek hücre çoğalmasında etkili olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (Ding ve Kleer,2006).

Meme kanseri ile yapılan bir diğer çalışmada EZH2 agresif meme kanserinin invazif özellikleri ile ilişkillendirilmiştir. Ayrıca tümör hücre çoğalması ve metastaz ile de anlamlı bir şekilde ilintili bulunmuş. Bu sebeple araştırıcılar EZH2'nin agresif meme kanserinin bir işareti olabileceğini söylemektedirler (Collet ve ark.,2006; Zeidler ve Kleer.,2006; Bachmann ve ark., 2006).

EZH2 aşırı ifadesinin belirlendiği bir diğer kanser tipi de prostat kanserleridir.

Yu ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, yaygın insan prostat kanser dokularında EZH2 enziminin gerçekleştirdiği H3 lizin 27 metilasyonu genom kapsamında araştırılmış. Metastatik tümörlerde PcG proteinlerinin 14 direkt hedef geni belirlenerek bu genler 'polikomb baskılama imzası' şeklinde tanımlanmıştır. Ayrıca embriyonik kök hücrelerde bu PcG'lerin bazı hedef genlerinin metastatik kanserdekiler ile ortak olduğu bulunmuştur (Yu ve ark., 2007).

Ayrıca prostat kanser hücre dizileri ile yapılan bir başka çalışmada EZH2'nin hücrelerin davranışları üzerine olan etkileri incelenmiş. Prostat kanser hücreleri çoğalma, invazyon ve 3 boyutlu koloni oluşturma açısından değerlendirilmiş. EZH2'nin aşırı ifade edildiği prostat kanser hücrelerinin bu özellikler açısından daha agresif davrandığı gözlenmiştir (Karanikolas ve ark., 2010). Yapılan bir diğer çalışmada metastatik prostat kanser hücrelerinde EZH2 seviyeleri ile H3K27me3 seviyesi artmış olarak bulunmuştur. Ayrıca bu ifade artışı ile hastalarda tedavide başarısızlık ve relaps ile korelasyon olduğu bildirilmektedir (Berezovska ve ark., 2006; Cooper ve Foster., 2009).

Yapılan bir diğer çalışma sonuçlarına göre EZH2'nin insan gastrik kanserlerinin onkogenezi ve gelişiminde rol alabileceği belirtilmektedir. Çalışmada insan gastrik kanser dokusunda ve gastrik kanser hücre dizilerinde EZH2 mRNA

ekspresyon seviyesi kanser olmayan gastrik mukozaya göre oldukça yüksek saptanmıştır. Ayrıca EZH2 ekspresyon seviyesi ile tümör büyüklüğü, damar invazyonu, lenf nodu metastazı ve klinik evre ile oldukça ilintili bulunmuştur. EZH2'yi daha yüksek seviyede ifade eden hastaların düşük ifadelilere göre prognozlarının daha kötü olduğu tespit edilmiştir. Bu sebeple EZH2 ifadesinin gastrik kanserlerin prognozunun tahmininde yeni bir biyobelirteç olabileceği belirtilmektedir (Matsukawa ve ark.,2006; Choı ve rak.,2009).

EZH2 aşırı ifadesi yukarıda örnekleri verilen kanser tiplerinden başka Lenfoma'larda (Martinez Garcia ve Licht., 2010), Melanoma'larda (McHugh ve ark., 2007), renal cell karsinomlarında (Wagener ve ark.,2008; Hinz ve ark., 2009) ve pankreatik tümör hücrelerinde gösterilmiştir (Ougolkov ve ark., 2008).

Yaptığımız çalışmada KML'nin akselere fazı olan blastik fazdaki hücre serilerinde EZH2 'nin ifade edildiği belirlendi. Bir sonraki adımda KML kronik faz hastalarında EZH2 ifadesinin, KML için akselere faza geçişte bir biyobelirteç olup olamayacağını değerlendirilmek üzere araştırılması planlanmıştır.

Çalıştığımız her iki hücre dizisinde de ifade edildiğini gösterdiğimiz SUZ12 ve EED2 proteinleri PRC4 protein kompleksindeki EZH2 histon metil transferaz enziminin çalışabilmesi için gerekli olan komponentlerdir. Biz yaptığımız ChIP deneyleri ile araştırılan Bim ve Bid proapoptotik genlerinin promotor dizilerine EZH2'nin bağlı olduğunu ve promotor bölgedeki H3 Histon proteinin 27.lizin rezidülerine 3 metil grubunun eklenmiş olduğunu gösterdik. Çalışmamızda PRC4 protein kompleksindeki temel komponentlerin tümünün ifade edildiğini ve EZH2 enziminin H3K27me3 'nunu gerçekleştirdiğini gösterdiğimizden dolayı, SUZ12 ve EED2'nin, EZH2 enzimini çalışabilmesi için gerekli olduğu düşüncesine dolaylı da olsa katkıda bulunmuş olduğumuzu düşünüyoruz.

EZH2 enziminin fonksiyon görmesi için gerekli olan bir diğer PRC4 komponenti EED proteinidir. Yapılan bir çalışmada EED'nin H3K27me3'e bağlanmakta önemli rol oynadığı ve EZH2'nin histonmetiltransferaz fonksiyonunu

indüklediğini belirtiyorlar. Böylece aktifleşen ve kromatinde H2K27me3 işaretinin olduğu bölgeye bağlanan PRC proteinlerinin , bu bölge yakınındaki kromatinde de H3K27me3 yaparak, inaktif kromatin yapının genişlemesine sebep olduğunu belirtiyorlar (Margueron ve ark., 2009).

Literatürde yapılan bir çalışmada PcG proteinlerinin fonksiyonları incelenmiş sonuçta histon metil transferaz aktivitesi için minimum EZH2-EED2-SUZ12 komponentlerine ihtiyaç olduğu bulunmuştur. Çalışmada stabil olarak SUZ12 geni çalışmayan hücre dizisinde hücre gelişim bozuklukları ve H3K27 metilasyonunda genom boyuca değişiklikler gözlenmiş ve araştırıcılar SUZ12'nin EZH2 tarafından katalizlenen H3K27me3'nunda kritik rolü olabileceğini bildirmişlerdir (Cao ve Zhang., 2004).

Yaptığımız çalışmada hem Imatinib dirençli K-562/IMA3 KML blastik faz hücre dizisinde hem de Imatinib duyarlı K-562 KML blastik faz hücre dizinde SUZ12 'nin ifade edildiğini tespit ettik. Yapılan bir başka çalışma sonucu bizim bulgumuzu desteklemektedir. Bu çalışmada KML hastalarına ait hem kronik hem de blastik faz örneklerinde SUZ12 ifadesi araştırılmış ve blastik fazda bulunan hastalarda SUZ12 ifadesi artmış bulunmuştur. Buna karşılık normal donörlerden elde edilen kemik iliği mononükleer hücrelerde ve KML kronik faz örneklerinde SUZ12 tespit edilememiştir. Bu sebeple araştırıcılar SUZ12'nin transformasyon potansiyeli olabileceğini belirtmektedirler (Pizzatti ve ark., 2009).

SUZ12'nin ayrıca, kolon, meme , karaciğer ve mesane gibi farklı tümör tiplerinde de aşırı ifade edildiği gösterilmiştir (Kirmizis ve ark., 2003; Hinz ve ark., 2008).

Çalıştığımız her iki hücre dizisinde de ifade edildiğini gösterdiğimiz bir diğer protein PRC4'e spesifik olan SIRT1'dir. Bu protein Sırtuin ailesi içinde yer alan sınıf III Histon deasetilazdır ve NAD+'ye bağımlı olarak fonksiyon görmektedir (Brooks ve Gu., 2009). SIRT1 çeşitli hücresel streslerde hayatta kalımın önemli düzenleyicilerinden biridir. Bu proteinin aşırı ifade edildiği tümörlerde artan SIRT1

ifadesi ile tümör baskılayıcı genlerin susturulması ve kemoterapiye dirençlilik arasında korelasyon gösterilmiştir (Sun ve ark., 2007).

Ayrıca SIRT1'in tümör hücrelerinde, tümörün başlama, gelişim ve ilaç dirençliliğinde, hücre senesensini ve apoptozu bloke ederek kritik bir rol alabileceğine dair düşünceler mevcuttur (Liu ve ark., 2009; Kwon ve Ott., 2008).

Biz de çalışmamızda çoğalma kapasitesi artmış ve apotoza dirençli hücrelerin ağırlıkta olduğu KML blastik fazda SIRT1 'in ifade edildiğini saptadık. Dolayısı ile bu hücrelerde SIRT1'in ifade edilmesi hücrelerin apotozunu bloke eden faktörlerden biri olabilir şeklinde yorumladık.

Ancak çalıştığımız hem Imatinib duyarlı K-562 hemde dirençli K-562/IMA-3 hücrelerinin her ikisinde de SIRT1 geninin ifade edildiğinin saptanması, SIRT1'in K-562 hücre dizisinde Imatinib mesilat'a karşı geliştirilen ilaç dirençliliğinde major rol oynama olasılığını desteklemektedir.

Bu çalışmadaki hipotez; Tedaviye yanıtın olmadığı hızlı ve fatal seyirli bir dönem olan KML blastik fazda bozulmuş epigenetik regülasyon ve bunun sonucunda Bim ve Bid proapoptotik genlerin metilasyon yolu ile susturulması Imatinib mesilat'a karşı geliştirilen apoptoz dirençliliğine yol açabilir mi? İdi. Burada bozulmuş epigenetik regülasyondan kasıt; Imatinib mesilat dirençli K-562/IMA-3 hücrelerinde PRC4 proreinlerinin ifade edilmesi ve EZH2 enziminin Bim ve Bid proapoptotik genlerinde inaktif bir histon işareti olan H3K27me3 modifikasyonu gerçekleştirmesidir. Bu soruyu Bim ve Bid apoptotik genleri üzerinden sormamızın sebebi daha önce literatürde yer alan çalışma sonuçları idi. Bu çalışmaların birinde K-562 ve BV173 insan lösemi hücre hatlarında Imatinib'in Bim ifadesini arttırdığı bulunmuştur. Ayrıca bu BCR/ABL(+) lösemik hücre hatlarında, Imatinib ile indüklenen hücre ölümünde Bim'in kritik rol oynadığı tespit edilmiştir (Kuroda ve ark., 2006).

Diğer çalışmada da aynı şekilde K-562 lösemik hücre dizilerinde Bim'in hücre ölümünde önemli role sahip olduğu belirtilmektedir.(Mc Garvey ve ark, 2007)

Bir başka çalışmada da KML hücrelerinde Imatinib'in özellikle Bim-EL varyantını indükleyerek hücreleri ölüme götürdüğü belirtilmektedir (Belloc ve ark., 2007).

Bu sebeple çalışmamızda hem Imatinib'e duyarlı hem de direnç geliştirilmiş K-562 KML hücre hatlarında, yalnız farklılaşmamış embriyonal kök hücre ve kanser hücrelerinde ifade edildiği belirtilen PRC4 polikomb grup proteinlerin, Bim ve Bid proapoptotik genlerin metilasyonuna yol açıp açmadığı ve apoptoz direncine bu yolla katkı sağlayıp sağlamadığı araştırıldı. PRC4 grup proteinlerinden EZH2'nin Bim ve Bid genlerinin promotor bölgelerindeki H3 histonlarının 27. Lizin rezidüsünüe 3 metil grubu eklemek kaydı ile inaktif kromatin işareti oluşturup oluşturmadığı ve bu yolla bölgeye Bim ve Bid genlerinin promotorlarını metilleyecek DNMT enzimini çekip çekmediği sorgulanmıştır. Daha önce yapılan çalışmalarda H3K27me3 histon işaretinin kalıcı olarak bölgeye DNMT'ları çektiği öne sürülmektedir (Widschwendter ve ark., 2007). Hipotezimizi sorgulamak amacıyla yaptığımız ilk deneylerle önce kanser hücrelerinde spesifik olarak ifade edildiği bildirilen PRC4 protein kompleksinde yer alan proteinlerin hem Imatinib duyarlı hem de direnç geliştirilmiş K-562 hücre hatlarında ifade edildiğini belirledik. Ardından Imatinib mesilat'a direnç geliştirilmiş K-562/IMA-3 hücre hattında, Imatinib duyarlı K-562 hücre hattına kıyasla PRC4 proteinlerinin ifadelerinde herhangi bir artış olup olmadığını sorgulamak amacıyla eş-zamanlı PZR deneylerini yaptık. Sonuçta Imatinib mesilat direnci geliştirilmiş K-562/IMA-3 hücre hattında, PRC4 grubuna ait olan ve histonların epigenetik modifikasyonunda rol alan EZH2, SIRT1, EED2 ve SUZ12 genlerinin, K-562 hücrelerine oranla daha düşük seviyede ifade edildiği bulduk. Biz kurduğumuz hipotez doğrultusunda Imatinib mesilat direnci geliştirilmiş K-562/IMA-3 hücre hattında, PRC4 grup proteinlerini, Imatinib duyarlı olan K-562 hücrelerine göre daha yüksek seviyede olabileceğini bekliyorduk. Ardından bir histon metil transferaz enzimi olan EZH2'nin her iki hücre hattında Bim ve Bid proapoptotik genlerinin promotor bölgelerine bağlanıp bağlanmadığı ve bu genlerin

promotor bölgedeki kromatinde yer alan H3 Histon proteinlerin 27.lizin rezidülerine 3 metil grubu eklemek yolu ile modifiye edip etmediği yapılan ChIP deneyleri araştırıldı. Ayrıca EZH2 tarafından genlerin promotor bölgelerine çekilebileceği düşünülen ve genlerin promotor bölgelerini metilleyerek, inaktif hale gelmesinde rol oynayan DNMT1 enzimininde bu genlerin promotor bölgelerine bağlı olup olmadığı da yapılan ChIP deneyleri araştırıldı.

Deneyler sonucunda Imatinib mesilat dirençli K-562/IMA-3 hücrelerinde, EZH2 ve DNMT1 enzimleri Bim geninin promotor bölgesine bağlı bulundu. Ayrıca Bim geninin promotor bölgesinde EZH2 tarafından yapıldığı düşünülen H3K27me3 modifikasyonu tespit edildi. Buna karşın aynı hücre hattında Bid geninin promotor bölgesine EZH2 ve DNMT1 enzimlerinin bağlı olmadığı gözlenirken, Bid geni kromatin bölgesinde H3K27me3 tespit edildi. K-562/IMA-3 hücrelerinde Bim geninin promotor bölgesine EZH2'nin bağlı bulunması ve genin promotor bölgesinde H3K27me3 modifikasyonunun bulunması, bu modifikasyonun EZH2 tarafından yapıldığı düşüncesini desteklemektedir. Ancak Bid geninin promotoruna EZH2 bağlı bulunmamasına karşın genin promotor bölgesinde H3K27me3 modifikasyonunun bulunması, bu modifikasyonun deneyin yapıldığı andan daha önce buraya bağlı EZH2 enzimi tarafından yapıldığı düşüncesini aklımıza getirmiştir. Çünkü ChIP deneyleri deneyin yapıldığı anda canlı hücrede ilgilenilen gen bölgesine hangi protein bağlı ise onu gösteren bir tekniktir. Sonuçta Bid geninin de promotor bölgesindeki H3 Histon proteinlerinin 27. Lizin rezidüsüne 3 metil grubunun bağlı olduğu belirlenmiş oldu.

Aynı şekilde Imatinib duyarlı K-562 hücrelerinde de yapılan ChIP deneyleri sonucu, EZH2 ve DNMT1 enzimleri Bim geninin promotor bölgesine bağlı bulundu. Ayrıca Bim geninin promotor bölgesindeki H3K27me3 modifikasyonu belirlendi. Aynı hücre hattında Bid geni promotor bölgesine yönelik yapılan deneyler sonucunda ise araştırılan EZH2 ve DNMT1 enzimleri Bid promotoruna bağlı bulundu ve Bid promotorunda H3K27me3 tespit edildi.

Biz yaptığımız çalışmada K-562/IMA-3 hücrelerinde Imatinib mesilat'a karşı geliştirilen dirençte, hücrelerin apoptoza yönelmemesinin etkili olabileceği bununda EZH2 tarafından proapoptotik genler olan Bid ve Bim genlerinin promotorlarına inaktif histon modifikasyonu olan H3K27me3 gerçekleştirilmesi ve bölgeye DNMT1 enzimini çekilerek genlerin metillenmesi yolu ile susturulmasının etkili olabileceğini araştırmıştık. Yaptığımız deneyler sonucunda hem İmatinib duyarlı hem de dirençli olan KML hücre hatlarında Bim geninde EZH2 ve DNMT1 enzimlerini bağlı ve de kromatin bölgede H3K27me3 inaktif histon işaretini bulmamıza rağmen her iki hücre hattında Bim genine yönelik metilasyon spesifik PCR yaptığımızda Bim geninin promotor bölgesini metillenmemiş bulduk. Her iki hücre hattında Bid genine yönelik yapılan ChIP deneylerinde ise dirençli KML hücre hattında Bid geninin promotor bölgesinde EZH2 ve DNMT1 enzimlerinin bağlı olmadığı ancak genin kromatin bölgesinde H3K27 üçlü metilasyon modifikasyonu olduğu bulundu. Imatinib duyarlı KML hücre serisinde ise EZH2 ve DNMT1 enzimlerinin Bid geninin promotoruna bağlı olduğu ve kromatinin de H3K27 üçlü metilasyon modifikasyonunu taşıdığı gözlendi. Ancak her iki hücre serisinde de Bid genini inaktive edici H3K27me3 modifikasyonunu bulunmasına rağmen Bid genine yönelik metilasyon spesifik PCR deneyleri sonucunda da Bim genindeki gibi promotor bölgesi metillenmemiş bulundu. Bu sonuçların ışığında H3K27me3 histon modifikasyonunun gen promotor metilasyonu için yeterli olmayabileceği sonucuna varıldı. Yani her iki hücre hattında da DNMT1 tarafında gerçekleştirilen promotor bölge CpG adaları metilasyonu yolu ile genin inaktifleştirilmesi söz konusu değil idi. Zaten yaptığımız eş-zamanlı PCR sonucunda da her iki hücre hattında da Bim ve Bid genlerinin ifadeleri tespit edilmiş idi. Hatta Imatinib duyarlı K-562/IMA-3 hücre hattında beklediğimizin tersine Imatinib duyarlı olan K-562'ye göre Bim ve Bid genlerinin ifadeleri artmış olarak tespit edilmişti.

Bu bulgularımıza dayanarak geri dönüşümlü Imatinib mesilat direnci geliştirilmiş K-562/IMA-3 hücre hattında ilaç dirençliliğinde rol oynadığını düşündüğümüz apoptoz direncinde Bim ve Bid genlerinin üzerinde bir epigenetik düzenlenme olduğunu ve ancak genlerin epigenetik olarak susturulmadığını söyleyebiliriz.

Yapılan bir başka çalışmada da bizim sonucumuzu destekler nitelikte K-562 hücrelerinde Bim geni promotorunda metilasyon tespit edilmemiştir. İlginç olarak bu K-562 hücrelerinde Bim geni ifadesi düşük seviyede bulunmuş. Araştırıcılar bu sunuca dayanarak Bim geni ifadesinin düzenlenmesinde farklı mekanizmaların rol oynayabileceğini belirtmektedirler (Jose-Eneriz ve ark., 2009).

EZH2 tarafından kromatinde gerçekleştirilen H3K27me3 modifikasyonu inaktif bir histon işaretidir. Yapılan çalışmaların bir kısmında EZH2, H3K27me3 kromatin modifikasyonu ile DNMT enzimleri ve DNA metilasyonu arasında bir ilişki bulunmuşken birtakım araştırmalar da bizim bulugularımıza benzer biçimde, bu modifikasyonun gerçekleştiği genlerde DNA metilasyonuna rastlanmamıştır. Örneğin primer kolon kanser hücrelerinde ve kolon kanser hücre dizisinde (Caco-2) yapılan bir çalışmada H3K27me3 modifikasyonunun genlerin promotor bölgelerindeki CpG adacıklarını metilleyecek DNMT enzimlerinin bağlanması için bir işaret olduğunu belirtmektedirler (Chlesnger ve ark., 2007).

Literatürde H3K27me3 modifikasyonu ile DNA metilasyonu arasında bizim bulgularımıza benzer sonuçların elde edildiği ve değişik kanser tipleri ile yapılmış çalışmalar da mevcuttur. Hücre hatlarında yapılan bir çalışmada MLH1, p16, MYT1 ve WNT1 genleri araştırılmıştır. Çalışma sonunda bu genlerin transkripsiyonel olarak susturulmasında ve yoğun promotor metilasyonunun devamında EZH2'nin gerekli olmadığı sonucuna varılmıştır. Araştırıcılar çalışma sonunda EZH2'nin DNA metilasyonunun rölatif olarak olmadığı durumda, genleri düşük bazal seviyede tuttuğu ve tümör baskılayıcı genleri yoğun DNA metilasyon durumunda tutarak baskılanmasının devamından sorumlu olmadığı yorumunu yapmaktadırlar (McGarvey ve ark., 2007). Yapılan bir başka çalışma sonucunda da polikomb grup proteinleri aracılığı ile gerçekleşen baskılanma ile metilasyona duyarlılık arasında güçlü bir ilişki olmasına rağmen, tek başına PcG proreinlerinin kanserde CpG adalarında görülen tüm DNA metilasyon olaylarını açıklamaya yetmemektedir yorumu yapılmıştır. Araştırıcılar PcG proteinlerden başka faktörlerin de DNA metilasyonunda rol alabileceğini belirtmektedirler. (McKabe ve ark., 2009)(104). Bizim bulgularımızla uyuşan bir başka çalışmada, HL-60 ve OCI-AML3 lösemi

hücre hatları ile yapılmıştır. Çalışma sonunda H3K27me3 inaktif histon işareti taşıyan ve ifadesi susturulmuş olan genlerin promotor DNA metilasyonu taşımadığı gösterilmiştir (Fiskus ve ark., 2009).

Prostat kanser hücreleri ile normal prostat hücrelerinin kıyaslandığı bir başka çalışmada ise, araştırılan genlerin %5'nin H3K27me3 modifikasyonuna sahip olduğu ve bu genlerin düşük DNA metilasyonu seviyesine sahip olmalarına karşın prostat kanserlerinde spesifik olarak susturulduğu sonucuna varılmıştır. Araştırıcılar EZH2 enzimini etkisiz hale getirdiklerinde H3K27me3' nuna sahip genlerin ifadelerinin, promotor bölge DNA metilasyonuna etki etmeksizin yeniden düzenlendiğini gözlemlemişlerdir. Araştırıcılar bu bilginin kanserde tümör baskılayıcı genlerin EZH2-H3K27me3 aracılı susturulmasının, promotor DNA metilasyonundan bağımsız olduğunu gösterdiğini belirtmektedirler (Kondo ve ark., 2008).

Sonuçta H3K27me3 gibi inaktif histon işaretlerinin olmasının geni DNA metilasyonu açısından yatkın hale getirse de genlerde her zaman de novo DNA metilasyonuna yol açmayacağı bildirilmektedir (Kondo Y., 2009).

Sonuç olarak hem Imatinib duyarlı K-562 hem de direnç geliştirilmiş olan K-562/IMA-3 kronik myeloid lösemi hücre hatlarında yalnız embriyonik kök hücrelerde, farklılaşmamış pluripotent hücrelerde ve kanser hücrelerinde ifade edilen PRC4 alt grubu üyelerinin ifade edildiği eş-zamanlı PCR ile gösterildi. Kurduğumuz hipotez doğrultusunda Imatinib dirençli K-562/IMA-3 hücrelerinde PRC4 proteinlerinin, Imatinib duyarlı olan K-562 hücrelerine göre daha yüksek oranda ifade edilmesini beklerken, bu proteinler Imatinib dirençli olan K-562/IMA-3 hücrelerinde daha düşük gözlendi. Diğer yandan dirençli hücre hattında proapoptotik proteinler olan Bim ve Bid ifadesini ise Imatinib dirençli hücrelerde daha düşük bekliyorduk. Burada beklentimizin tersine Imatinib dirençli hücrelerde bu iki proapoptotik genin ifadesi duyarlı K-562'lere göre daha yüksek çıktı. Her iki hücre hattında Bim geninin promotorundaki kromatin bölgede PRC4 grubu üyesi olan EZH2 enziminin ve DNMT1 enziminin bağlı olduğu tespit edildi. Ayrıca bu bölgede EZH2 tarafından yapıldığı düşünülen H3K27me3 modifikasyonu da belirlendi.

Ancak Bim geninin promotorunda EZH2 bağlı bulunmasına H3K27me3 modifikasyonu tespit edilmesine ve EZH2 tarafından bölgeye çekildiği düşünülen DNMT1 enziminin bağlı bulunmasına rağmen, Bim geni promotor bölgesi metillenmemiş bulundu.

Bu sonuçlar diğer kanserlerde elde edilen verilere uygun olarak, DNA promotor metilasyonunun, EZH2-H3K27me3 'dan bağımsız gerçekleştiği düşüncesini desteklemektedir.

Imatinib duyarlı K-562 hücrelerinde Bid geni promotor bölgesine yönelik yapılan deneyler sonucunda ise araştırılan EZH2 ve DNMT1 enzimleri Bid promotoruna bağlı bulundu ve Bid promotorunda H3K27me3 tespit edildi.

Imatinib mesilat direnci geliştirilen K-562/IMA-3 hücrelerinde ise Bid geni promotoruna EZH2 ve DNMT'i bağlı bulmazken bu genin kromatin bölgesinde H3K27me3 modifikasyonunu tespit ettik.

Bu bulgularımızın ışığında geri dönüşümlü olarak Imatinib mesilat direnci geliştirilmiş K-562/IMA-3 hücre hattında ilaç direncinde rol oynadığını düşündüğümüz Imatinib ile indüklenen apoptoza karşı gelişen direncin Bim ve Bid genlerinin epigenetik olarak susturulması yolu ile gerçekleşmediği sonucuna varılmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmanın sonuçları;

- Hem Imatinib duyarlı K-562 hem de dirençli olan K-562/IMA-3 Kronik Myeloid Lösemi hücre hatlarında PRC4 alt grubu üyelerinin ifade edildiğini eş-zamanlı PZR ile gösterilmiştir.

- Hipotezimizin tersine Imatinib direnci geliştirilmiş K-562/IMA-3 hücrelerinde PRC4 proteinlerinin, Imatinib duyarlı olan K-562 hücrelerine göre daha düşük olarak ifade edildiği saptandı.

- Hipotezimiz doğrultusunda beklediğimizin aksine Imatinib direnci geliştirilmiş K-562/IMA-3 hücrelerinde Bim ve Bid proapoptotik genlerinin, Imatinib duyarlı olan K-562 hücrelerine göre daha yüksek olarak ifade edildiğini saptadık.

- Yaptığımız ChIP deneyleri sonucu her iki hücre hattında Bim geninin promotoruna PRC4 grubu üyesi olan EZH2 enziminin ve DNMT1 enziminin bağlı olduğu tespit edildi. Ayrıca bu bölgede EZH2 tarafından gerçekleştirildiği düşünülen H3K27me3 modifikasyonu da belirlendi.

- Imatinib duyarlı K-562 hücrelerinde Bid geni promotor bölgesine yönelik yapılan deneyler sonucunda EZH2 ve DNMT1 enzimleri Bid promotoruna bağlı bulundu ve Bid promotorunda H3K27me3 modifikasyonu tespit edildi.

- Imatinib mesilat dirençli K-562/IMA-3 hücrelerinde ise Bid geni promotoruna EZH2 ve DNMT'i bağlı bulunmazken bu genin promotor bölgesindeki H3 histon proteinlerinin 27. Lizin rezidisünde 3 metilasyon grubunun varlığı tespit edildi.

- Araştırılan her iki hücre hattında Bim geninin promotorunda EZH2 ve DNMT1 enzimleri bağlı bulunmasına ve H3K27me3 modifikasyonu tespit edilmesine rağmen, Bim geni promotor bölgesi metillenmemiş bulundu.

- Elde ettiğimiz sonuçlar DNA promotor metilasyonunun, EZH2-H3K27me3 'dan bağımsız gerçekleştiği düşüncesini desteklemektedir.

- Geri dönüşümlü olarak Imatinib mesilat direnci geliştirilmiş K-562/IMA-3 hücre hattında ilaç direncinde rol oynadığını düşündüğümüz Imatinib ile indüklenen apoptoza karşı gelişen direncin Bim ve Bid genlerinin epigenetik olarak susturulması yolu ile gerçekleşmediği sonucuna varıldı.

- Bu çalışma hücre serilerinde yapıldığı için in vitro ortamda test etmek üzere hem kronik faz hem de blastik faz primer KML hasta grubunda PRC4 ifade düzeylerinin araştırılması planlandı.

- Hem kronik hem de blastik faz primer KML hasta grubunda Bim ve Bid genlerinin epigenetik olarak regüle edilip edilmediğinin araştırılması planlandı.

- PRC4 protein kompleksinde yer alan proteinlerin, hem KML oluşumunda hem de blastik faza geçişte oynadıkları roller araştırılması önerilmektedir.

ÖZET

Imatinib Mesilat-Dirençli ve Dirençsiz Kronik Myeloid Lösemi Hücre Hatlarında Bim ve Bid Proapoptotik Genlerinin Polikomb Grup Proteinleri Tarafından Epigenetik Regülasyonu

Bu projenin amacı; KML blastik fazda görülen imatinib mesilat dirençliliği üzerine Bim ve Bid proapoptotik genlerinin etkilerinin araştırılmasıdır. Bu sebeple Bim ve Bid genlerinin epigenetik olarak regüle edilip edilmediği incelenmiştir. Bim ve Bid proapoptotik genlerinin promotor metilasyon durumları ve bunun üzerine PRC4 kompleks proteinlerinin etkileri araştırılmıştır.

Çalışmada imatinib mesilat dirençli K-562/IMA-3 hücre dizisi ile İmatinib dirençli olmayan K-562 hücre dizilerinde PRC4 kompleksinde yer alan EZH2, EED2, SUZ12, SIRT1 genleri ile proapoptotik genler olan Bim ve Bid'in mRNA seviyeleri belirlenmiştir. H3K27 üçlü metilasyonu yapan EZH2'nin, Bim ve Bid genlerine bağlanıp bağlanmadıkları ve bu genlerin H3K27 üçlü metilasyon modifikasyonu ChIP deneyi ile araştırılmıştır. Daha önce yapılan çalışmalar ile özellikle EZH2 ve SIRT1'in bağlandığı bölgeye DNMT enzimlerini çekme yolu ile ilgili genlerin promotor metilasyonuna yol açtığı ve gen ifadelerini epigenetik olarak susturduğu gösterildiğinden, Bim ve Bid genlerinin metilasyon durumu MSP-PZR ile belirlenmiştir. Ayrıca her iki hücre dizisinin taşıdığı sitogenetik anomaliler Giemsa bantlama (GTG) metodu ile belirlenmiş ve karşılaştırılmıştır.

Araştırma sonunda PRC4 grubuna ait proteinlerin iki hücre hattında da ifade edildiği eş-zamanlı PZR ile belirlendi. Ancak beklenilenin tersine K-562/IMA-3 hücrelerinde Imatinib duyarlı olan K-562 hücrelerine göre PRC4 genlerinin ifadeleri daha düşük, Bim ve Bid genlerinin ifadeleri ise daha yüksek bulundu.

ChIP deneyleri sonucunda ise her iki hücre hattında Bim geninin promotorunun kromatin bölgesinde PRC4 protein grubu üyesi olan EZH2 enziminin ve DNMT1 enziminin bağlı olduğu bulundu. Ayrıca her iki hücre hattında EZH2 tarafından yapıldığı düşünülen H3K27me3 modifikasyonu da belirlendi. Imatinib duyarlı K-562 hücrelerinde yapılan ChIP deneyleri sonucunda ise Bid geni promotor bölgesine EZH2 ve DNMT1 enzimleri bağlı bulundu ve Bid promotorunda H3K27me3 modifikasyonu tespit edildi.

Imatinib mesilat direnci geliştirilmiş K-562/IMA-3 hücrelerinde ise Bid geni promotoruna EZH2 ve DNMT1 enzimleri bağlı bulunmadı. Ve genin kromatin bölgesinde ise H3K27me3 modifikasyonunu tespit edildi. Bir diğer ChIP deneyi sonucuna göre ise Imatinib mesilat direnci geliştirilmiş K-562/IMA-3 hücrelerinde Bim geninin promotoruna EZH2 ve DNMT1 bağlı bulundu. ve H3K27me3 modifikasyonu tespit edildi. Yapılan MS-PZR deneyleri sonucunda ise Bim ve Bid genlerinin promotor bölgesi homozigot olarak metillenmemiş bulundu.

Bu araştırmada yapılan deneyler sonucunda Imatinib mesilat direnci geliştirilmiş K-562/IMA-3 hücre hattında ilaç dirençliliğinde rol oynadığını düşündüğümüz apoptoz

direncinde Bim ve Bid genlerinin epigenetik olarak modifiye edilmelerine rağmen direkt olarak bir rol oynamadığını söyleyebiliriz.

Anahtar Sözcükler: DNA metilasyonu, Histon modifikasyonları, kanser epigenetiği, KML, PcG proteinleri.

SUMMARY

Epigenetic Regulation Of Bim and Bid Proapoptotic Genes by Polycomb Group Proteins In Imatınıb Mesylate Resistant and Non-Resistant Chronic Myeloid Leukemia Cell Lines.

The aim of this study is to investigate the effects of the Bim and Bid proapoptotic genes on Imatinib mesilat resistance in which seen CML blastic phases. For this purpose, it was investigated that whether Bim and Bid genes are regulated as epigenetically. The promoter methylation status of the Bim and Bid proapoptotic genes and the effects of the PRC4 protein complex on it were investigated.

In this study, mRNA levels of EZH2, EED2, SUZ12, SIRT1 genes which belongs to PRC4 complex and Bim and Bid proapoptotic genes were determined in the Imatinib mesilate resistant K-562/IMA-3 cell lines and the non-resistant K-562 cell lines. Additionally, whether EZH2 protein which cause H3K27 trimethylation bind to Bim and Bid genes or not and H3K27 trimethylation modification of this genes were searched by ChIP assays.

It was shown that the EZH2 and SIRT1 may cause promotor methylation of related genes via taking the enzyme of the DNMT to its bounded region and cause to silence of the genes as epigenetically in the previous studies. For that reason the methylation status of the Bim and Bid genes were determined by specific PCR technique. Cytogenetic anomalies of the cell lines were determined by the Giemsa banding tecnique (GTG) and compared with each other.

It was detected that the proteins that belong to group of the PCR4 expressed in the both cell lines by the real time PCR technique. Despite to our expectation the expression of the PRC4 genes were deteced at lower level and the expression of the Bim and Bid genes were detected at higher lever in the K-562/IMA-3 cells than imatinib non-resistant K-562 cells.

It was founded from CHIP experiment that the E2H2 enzyme which is belong to PRC4 protein family bounded to the DNMT1 enzyme in the promoter region of the BİD genes in the both cell lines. Furthermore, the modification of H3K27me3, thought ınduced by the EZH2 have been detected in the both cell lines. Additionally the modification of the H3K27me3 in the promoter region of Bid genes and linkage between the EZH2 and DBNT1 enzymes and the promoter region of the the Bid was detected at the end of the study.

The EZH2 and DNMT1 enzymes were not founded as bounded to the promoter region of the Bid gene in the imatinib resistant K-562/IMA-3 cell lines. And a H3K27me3 type modification was detected in the promoter region of the gene. Beside this, according to result of CHıP experiment, The EZH2 and DNMT1 enzymes were not founded as bounded to the promoter region of the Bim gene in the imatinib resistant K-562/IMA-3 cell lines. And a

H3K27me3 type modification was detected. As a result of RT-PCR experiments the promoter region of the Bid and Bim genes were founded as homozygous methylated.

As a result of experiments made it can be postulated that the Bid and Bim genes are not take a role in the resistance of apoptosis which lead to drug resistance in the imatinib resistant K-562/IMA-3 cell lines.

Key Words: Cancer epigenetics, CML, DNA methylation, histon modifications, PcG proteins

KAYNAKLAR

ADAMS, J.M., CORY, S. (2007). Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Current Opinion in Immunulogy*. **19:** 488-496.

AOKI, R., CHIBA, T., MIYAGI, S., NEGISHI, M., KONUMA, T., TANIGUCHI, H., OGAWA, M., YOKOSUKA, A., IWAMA, A. (2010). The Policomb group gene product Ezh2 regulates proliferation and differentiation of murin hepatic stem/progenitor cells. *Journal of Hepatology*. **52**: 854-863.

BAHMANN, I.M., HALVERSEN, O.J., COLLET, K., STEFANSON, I.M, STRAUME, O., HAUKAAS, S.A., SALVESEN, H.B., OTTE, A.P., AKSLEN, L.A. (2006). EZH2 Expression Is Asociated wwth High Proliferation Rate and Aggressive Subgroups in Cutaneous Melanoma and Cancers of the Endometrium Prostat and Breast. *Journal of Clinically Oncology*. **24**: 268-272.

BANTINIES, F., CAVALLI, G. (2006). Cellular memory and dynamic regulation of Polycomb Group Proteins. *Current Opinion in Cell Biology*. **18**: 275-283.

BARNES, D.J., MELO, J.V. (2006). Primitive, Quiescent and Diffucult to kill. *Cell Cycle*. **5**: 2862-2866.

BAYLİN, S.B., OHM, J.E. (2006). Epigenetic gene silencing in cancer a mechanism for early oncogenic pathway addiction?. *Nature reviews*. **6**:107-116.

BELLOC, F., MOREAU-GAUDRY, F., UHALDE, M., CAZALIS, L., JEANNETEAU, M., LACOMBE, F., PRALORAN, V., MAHON, F.X. (2007). Imatınıb and Nilotinib Induce Apoptosis of Chronic Myeloid Leukemia Cells Through a Bim-Dependant Pathway Modulated by Cytokines. *Cancer Biology and Therapy*. **6**: 912-919

BERZOVSKA, O.P., GLINSKİİ, A.B., YUNG, Z., LI, X.M., HOFFMAN, R.B., GLINSKY, G.V. (2006). Esential role for Activation of the Polycomb Group (PcG) Protein Chromatin Silencing Pathway in Metastatic Prostate Cancer. *Cell Cycle*. **5**: 1886-1901.

BEST, J.D., CAREY, N. (2010). Epigenetic covalent modifications of DNA and chromatin proteins strongly effect gene expression and cellular activity, and epigenetic misregulation occurs in severai diseases, especially cancer. *Drug Discovary Today*. **15**: 65-70.

BİXBY, D., TALPAZ, M. (2009). Mechanism of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia recent therapeutic strategies to overcome resistance. *American Society of Hematology*. 461-476.

BRECCI, M., ALIMENA, G. (2009). The metabolic consequnce of imatinib mesylate: Changes on glucose, lypidic and bone metabolism. **33**:871-875.

BROOKS, C.L., GU, W. (2009). How does SIRT1 affect metabolism, senesence and cancer?. Nat. Rev. *Cancer.* **9**: 123-128.

CAO, R., ZHANG Y. (2004). Suz12 Is Required for Both the Histone Methyltransferase Activity and the Silencing Function of the EED-EZH2 Complex. *Molecular Cell*. **15**:57-67.

CAO, R., ZHANG, Y. (2004). SUZ12 Is Required for Both the Histone Methyltransferase Activity and the Silencing Function of the EED-EZH2 Complex. *Moılecular Cell.* **15**:57-67.

CAO, R., ZHANG, Y. (2004).The funtions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Current Opinion in Genetics and Development.* **14**: 155-164.

CARDAMA, A.Q., CORTES, J. (2009). Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood.* **113**:1619-1630.

CEDAR, H., BERGMAN, Y. (2009). Linking DNA Methylation and histone modification: pattern and paradigms. *Nature Reviwes Genetics*. **10**: 295-302.

CHEUNG, H.H, LEE, T.L, RENNERT, O.M, CHAN, W.Y. (2009). DNA Methylation of Cancer Genome. *Birth Defects Research*. **87**: 335-350.

CHOI, J.H., SONG, Y.S., YOON, J.S., SONG, K.W., LEE, Y.Y. (2010). Enhancer of Zeste Homologue 2 is Expression with tumor cell proliferating and metastasis in gastric cancer. *Apmıs.* **118**: 196-22.

CIILIONI, D., SAGLIO, G. (2009). CML:a model for targeted Therapy. *Best Practise and Research Clinical Haematology*. **22**: 285-294.

COLLET, K., EİDE, G.E., ARNES, J., STEFANSSON, I.M., EIDE, J., BRAATEN, A., AAS, T., OTTE, A.P., AKSLEN, L.A. (2006). Expression of Enhancer of Zeste Homologue 2 Is significantly Associated with Increased Tumor Cell proliferatin and Is a marker of aggressive Breast Cancer. *Cli. Cancer Res.* **12**: 1168-1174.

COOPER, C.S., FOSTER, C.S. (2009). Concept of epigenetics in prostat cancer development. *British Journal of Cancer*. **100**: 240-245.

COSTELLO, J.F., PLASS, C. (2001). Methylation Matter. **38**: 285-303.

D'ALESSIO, A.C, SZYF, M.(2006). Epigenetic tete-a-tete:the bilateral relationship between chromatin modifications and DNA methylation. *Biochem. Cell Biol*. **84:** 463-476.

DEPATIN, K.M. (2004). Apoptosis pathways in cancer and cancer tyerapy. *Cancer Immunol Immunother* **53**:153-159.

DERYA, B., (2008). Metinasyon ve Kanser, Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi, **28**: 513-524

DING, L., KLEER, C.G. (2006). Enhancer of Zeste 2 as a Marker of Preneoplastic Progression in the Breast. *Cancer Res.* **66**: 9352-9355.

DRUKER, B. T. (2008). Translation of the Phıladelphia chromosome into therapy for CML. *Blood.* **112**: 4808-4817.

ESTELLER, M. (2007). Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Human Molecular Genetics*. **16**: 50-59.

FANDY, T.E., CARRAWAY, H.,GORE, S.D. (2007). DNADemethylating Agents and Histone Deacetylase Inhibitors in Hematologic malignancies. *Rhe Cancer Journal*. **13**: 40-44.

FISKUS, f., WANG, Y., SREEKUMAR, A., BUICKLEY, K.M., SHI, H., JILLELLA, A., USTUN, C., RAO,R., FERNANDEZ, P., CHEN,J., BALUSU, R., KOUI, S., ATADJA, P., MARQUEZ, V.E., BHALLA, K.N. (2009). Combined epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A and the histone deacetylase inhibitor panobinostat against human AML cells. *Blood*. **114:** 2733-2743.

FISKUS, W., PRANPAT, M., BALASIS, M., HERGER, B., RAO, R., GHINNAIYAN, A., ATADJA, P., BHALLA, K. (2006). Histone deasetilase inhibitors deplete enhancer of zeste 2 and associated polycomb repressive comlex 2 proteins in human acute leukemia cells. *Mol Cancer Ther.* **5**: 3096-3104.

FRAME D. (2007). New Strategies in Controlling Drug Resistance. *JMCP*. 13-17.

FRÜHWALD, M.C., WİTT, O. (2008). The Epigenetic of Cancer in Chidren. *Klin Padiatr*. **220**: 333-341.

GARATE, L., FRESQUET, V.,CERVANTES, F., MARTINEZ-CLIMENT, J.A., HEINIGER, A., TORRES A., PROSPER, F., ROMAN-GOMEZ, J. (2009). Epigenetic down-regulation of BIM expression is associated with reduced optimal responses to imatinib treatment in chronic myeloid leukemia. *European Journal of Cancer.* **45**:1877-1889.

GARCIA, E.M., LICHT, J.D. (2010). Deregulatin of H3K27 methylation in cancer. *Nature Genetics*. **42**: 100-101.

Mc Garvey, K. M., Greene, E., Fahner, J.A., Jenuwen T., Baylin B. S., (2007). DNA methylation and complete transcriptional silencer of cancer genes persist after depletion of EZH 2. *Cancer Research.* **67: 5097-5102.**

GIL, J., BERNARD, D., PETERS, G. (2005). Role of Polycomb Group Proteins in Stem Cell Self-Renewal and Cancer. *DNA and Cell Biology*. **24**: 117-125.

GOLDMAN, J. M. (2007). How I treat chronic myeloid leukemia in Imatinib era. **Blood. 110**:2828-2837.

HERCEG, Z. (2007). Epigenetics and cancer: towards an evalution of the impact of environmental and dietary factors.Mutagenesis. 22: 91103.

HINZ, S., KEMPKENSTEFFEN, C., CHRISTOPH, F., KRAUSE, H., SCHRADER, M., SCHOSTAK, M., MILLER, K., WEIKERT, S. (2008). Expression parameters of the Polycomb Group Protein BMI1, SUZ12, RING1 and CBX7 in Urothelia Carcinoma of the Bladder and Their Prognostic Revelance. *Tumor Biology*. **29**: 323-329.

HINZ, S., WEIKERT, S., MAGHELI, A., HOFFMAN, M., ENGERS, R., MILLER, K., KEMPKENSTEFFEN, C. (2009). Expression Profile of the Polycomb Group Protein Enhancer of Zeste Homologue 2 and its prognostic Relevence in Renal Cell Carcinoma. *The journal of Urology*. **182**: 2920-2924.

HUGHES, L.L, DI TOMASO, M.D., MENDEZ-ACUNA, L., MARTINEZ-LOPEZ, W. (2008). Chromatin-remodelling mechanism in cancer. *Mutation Research.* **658:** 191-214.

JOSE-ENERİZ, E., AGİRRE, X., JİMENEZ-VELASCO, A., CORDEU, L., MARTİN, V., ARQUEROS, V. (2009). Epigenetic down-regulation of B.M. expression is associated with reduced optimal responses to imatinib

treatment in chronic myeloid leukemia. *European Journal of Cancer,* (2009). **45:1877-1889.**

KANNO, R, JANAKIRAMAN, H., KANNO, M. (2008). Epigenetic regulator Polycomb Group Protein Complexes control cell fate and cancer. *Cancer Sci.* **99**: 1077-1084

KANTARJIAN, H.M., CORTES, J., ROSEE, L.P., HOCHHAUS, A. (2010). Optimazing Therapy for Patients With Chronic Myelogenous Leukemia in Chronic Phase. *Cancer.* 1419-1430.

KARANIKOLAS, B.D.W., FIGUEIREDO, M., WU, L. (2010). Comprehensive Evalution of the role of EZH2 in the Growth, Invasion, and Aggression of a panel of Prostate Cancer Cell Lines. *The Prostate*. **70**: 675-688.

KERPPOLA, T.M. (2009). Polycomb Group Complex- many combinations, many functions. *Cell*. **19**:692-704.

KIRMIZIS, A., BARTLEY, S.M., FARNHAM, P.J. (2003). Identification of the Polycomb Group Protein SU(Z)12 as a Potential Molecular Target for Human Cancer Therapy. *Molecular Cancer Therapeutics*. **2**:113-121.

KOHLER, C., VILLAR, C.B.R. (2008). Programming of gene expression by Polycomb Group Proteins. *Trend in Cell Biology*. **18**: 236-243.

KONDO, Y. (2009). Epigenetic cross-talk between DNA methylation and Histone Modification in Human Cancers. *Yonsei Med. J.* **50**:455-463.

KONDO, Y., SHEN, L., CHENG, A.S., AHMAD, S., BOUMBER, Y., CHARO, C., YAMOCHİ, T., URANO, T., FURUKAWA, K., KWABI-ADDO, B., GOLD, D., SEKIDO, Y., HUANG, T.H.M., ISSA, J.P. (2008). Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. *Nature Genetics*. **40**:741-750.

KURADO, J., PUTHALAKT, H., CRAGG, M.S., KELLY, P.N., BUOLLET, P., HUANG, D.C.S., KIMURA, S., OTTMANN, O.G., DRUKER, B.J., VILLUNGER, A., ROBERTS, A.W.. (2006). Bim and Bad mediate imatinib-induced killing of BcrIAbl+ leukemic cells, and resistance due to their loss is overcome by a BH3 mimetic. *PNAS*. **103**:14907-14912.

KUZMICHEV, A., MARGUERON, R., VAGUERO, A., PREISSNER, T.S., SCHER, M., KIRMIZIS, A., OUYANG, X., BROCKKDORFF, N., ABATE-SHEN, C., FARNHAM, P., REINBERG, D. (2005). Composition and histone substrates of polycomb repressive group complexes change during cellular differentiation. *PNAS*. **102**: 1859-1864.

KWON, H.S., OTT, M. (2008). The ups and downs of SIRT1. *Trends in Biochemical Sciences*. **33**: 517-525.

LİM, C.S. (2006): SIRT 1: Tumor promoter or tumor suppressor?. *Medical Hypothesis*. **67**: 341-344.

LOPEZ, J., PERCHARDE, M., COLEY, HM., WEBB, A., CROOK, T. (2009).The contex and potential of epigenetics in oncology. British Journal of Cancer. 100:571-577.

LUI, T., IİU, P.Y., MARSHALL, M. (2009). The Critical Roleof the Class III Histone Deacetylase SIRT1 in Cancer. *Cancer Res.* **69**: 1702-1705.

LUND, A.H., LHUIZEN, M. V. (2004). Polycomb Complexes and Silencing mechanisms. *Current Opinion in Cell Biology*. **16:** 239-246.

MAEKAWA, T., ASHIHARA, E., KIMURA, S. (2007). The Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitor İmatinib and promising new agents against Philadelphia chromosome-positive leukemias. *Int J Clin Oncol.* **12**: 327-340.

MARGUERON, R., JUSTIN, N., OHNO, K., SHARPE, M.L., SON, J., DRURY, D.J, VOİGT, P., MARTIN, S.R., TAYLOR, W.R., MARCO, V.D., PIRROTTA, V., REINBERG, D., GAMBLIN, S.J. (2009). Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone Marks. *Nature.* **461**:762-766.

MARTIN, C., ZHANG, Y. (2005). The Diverse Functions of Histon Lysne Methylation. *Nature Reviwes*. **6**:838-847.

MARTINEZ, A.M, CAVALLI, G. (2006). The Role of Polycomb Group Proteins in Cell Cycle Regulation. *Cell Cycle.* **5**: 1189-1197.

MATSUKAWA, Y., SEMBA, S., KATO, H., ITO, A., YANAGIHARA, K., YOKOZAKI, H. (2006). Expression of the Enhancer of Zeste Homologue 2 is corrolated with poor prognosis in human gastric cancer. *Cancer Sci*. **97**: 484-491.

MCCABE, M.T., LEE, E.K., VERTINO, P.M.(2009) AMultifactorial Signature of DNA Sequence and Polycomb Binding Predicts Aberrant CpG Island Methylation. *Cancer Research.* **69**: 282-290.

McGARVEY, K.M., GREENE, E., FAHRENER, J.A., JENUWEIN, T., BAYLIN, S.B.(2007). DNA Methylation and Complete Transcriptional Silenging of Cancer Genes Persist after Depletion of EZH2. *Cancer Research* . **67:** 5097-5102.

McHUGH, B.J., FULLEN, D.R., MA, L., KLEER, C.G., SI, L.D. (2007). Expression of Polycomb Group Protein EZH2 in nevi and melanoma. *Journal of Cutaneous Pathology.* **34**: 597-600.

MESTRE-ESCORIHUELA, C., RUBIO-MOSCARDO, F., RICHTER, J.A., SIEBERT, R., CLIMENT, J., FRESQUET, V., BELTRAN, E., AGIRRE, X., MARUGAN, I., MARIN, M., ROSENWALD, A., SUGIMOTO, K.J., WHEAT, L.M., KARRAN, E.L., GARCIA, J.F., SANCHEZ, L., PROSPER, F., STAUDT, L.M., PINKEL,D., DYER, M.J.S., MARTINEZ-CLIMENT, J.A. (2007). Homozygous deletions localize novel tumor spuppressor genes in B-cell lymphomas. *Blood. 209*: 271-280.

MIREMADI, A., OESTERGAAD, M.Z., PHAROAH, P.D.P., CALDAS, C. (2007) Cancer genetics snd epigenetic genes. *Human Molecular Genetics*. **16:** 28-49.

MONTGOMERY, N.D, YEE, D., MONTGOMERY, S.A, MAGNUSON, T. (2007). Molecular and Functional Mapping of EED Motifs Required for PRC2-Dependent Histone Methylation. *JMB*. **374**: 1145-1157.

MOREY, L., HELİN, K. (2010). Polycomb Group Protein-mediated repression of transcription. *Trends in Biochemical Sciences*. **35**: 323-332.

NEGISHI, M.,SARAYA, A., MIYAGI, S., NAGAO, K., INAGAKI, Y., NISHIKAWA, M., TAJIMA, S., KOSEKI, H., TSUDA, H., TAKASAKI, Y., NAKAUCHI, H., IWAMA, A. (2007). BMİ1 cooperates with Dnmt1-associated protein 1 in gene silencing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **353**: 992-998.

OHM, J.E., McGARVEY, K.M., YU, X., CHENG, L., SCHUEBEL, K.E., COPE, L., MOHAMMAD, H.P., CHEN, W., DANIEL, V.C., YU, W., BERMAN, D.M., JENUWEIN, T., PRUITT, K., SHARKIS, S.J., WATKINS, D.N., HERMAN, J.G., BAYLIN, S.B. (2007). A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nature Gnetics*. **39**: 237242.

OUGOLKOV, A.V., BILIM, V.N., BILLADEAU, D.D. (2008). Regulation of Pancreatic Tumor cell Proliferation and Chemoresistance by the Histone Methyltransferase EZH2. *Clin. Cancer Res*.**14**: 6790- 6796.

PATRA, S.K., SZYF, M. (2008). DNA methylation-mediated nucleosome Dynamics and oncogenic Ras signalling insighs from FAS, *FAS ligand and RASSF1A . FEBs Journal*. **275**: 5217-5235.

PIZZATI, L., BINATO, R., COFRE, J., GOMES, B.E., DOBBIN, J., HAUSSMANN, M.E., D'AZAMBUJA, D.,BOUZAS, L.F., ABDELHAY, E. (2010). SUZ!' Is a Canditate Target of the Non-canonical WNT Pathway in the Progression of Chronic Myeloid Leukemia. Genes, *Chromosomes and Cancer.* **49**: 107-118.

RAAPHORST, F.M. (2005).Deregulated expression of Policomb-group oncogenes in human malignant lymphomas and epitheliel tumors. *Human Molecular Genetics*. **14:**93-100.

RAAPHORST, F.M.(2005). Deregulated expression of Polikomb-group oncogenes in human malignant lymphomas and epithelial tumors. *Human Molecular Genetics*. **14**: 93-100.

RADICH, J.(2007). The Biology of CML Blast Crisis. *American Society of Hematology*. 384-391.

RADICH, J.P. (2007). The Biology of CML Blast Crisis. *Hematology.* 384-391.

RAJASEKHAr, v.k., BEGEMANN, M. (2007). Concise Review: Role of Polycomb Group Proteins in Development and Disease: A Stem Cell Perspective. *Stem Cells*. **25**: 2498-2510.

REED, J.C. (2008). Bcl-2-family proteins and hematologic malignancies:history and future prospects. *Blood*. **111**: 33223329.

REIK, W. (2007). Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*. **447**:425-432.

SCHWARTZ, Y.B., PIRROTTA, V. (2008). Polycomb complexes and epigenetic states. *Current opinion in Cell Biology*. **20**:266-273.

SCLESNGER, Y., STRAUSSMAN, R., KESHET, I., FARKASH, S., HECHT, M., ZIMMERMAN, J., EDEN, E., YAKHN, Z., BEN-SHUSHAN, E., REUBNOFF, B.E., BERGMAN, Y., SMON, I., CEDAR, H. (2007). Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nature Genetics.* **39**:232-236

SHUKLA, A., CHAURASIA, P., BHAIMIK, S.R. (2009). Histone methylation and ubiquitination with their cross-talk and roles in gene expression and stability. *Cell.Mol.Life Sci.* **66**: 1419-1433.

SIMON, J.A, LANGE, C.A. (2008). Roles of the EZH3 Histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutation Research*. **647**:21-29.

SİLVER, R.T. (2009). The blast phase of chronic myeloid leukemia. *Best Practise and Research Clinical Haematology*. **22**: 387-394.

SMİTH, L.T., OTTERSON, G.A., PLASS, C. (2007).Unraveling the epigenetic code of cancer for therapy. *Trends in Genetics*. **23**: 449-456.

SPIVAKOV, M., FISHER, A.G. (2007). Epigenetic signature of stem-cell identity. *Nature Reviwes*. **8**: 263-271.

SPIVAKOV, M., FISHER, A.G. (2007). Epigenetic signatures of stem-cell identity. *Nature Reviews*. **8**:263-267.

STRAVOPODIS, D.J., KARKOULIS, P.K., KONSTANTAKOU, E.G., MELACHROINOU, S., LAMPIDONIS, A.D., ANASTASIOU, D., KACHRILAS, S., MESSINI-NIKOLAKI, M., PAPASSIDER, I.S., ARAVANTINOS, G., MARGARITIS , L.H., VOUTSINAS, E.G.(2009). Grade-dependent effects on cell cycle progression and apoptosis in response to doxorubicin in human bladder cancer cell lines. *International journal of Oncology*. **34**: 137-160.

STUNKEL, W., PEH, B.K., TAN, Y.C., NAYAGAM, V.M., WANG, X., SALTO-TELLEZ, M., NI, B., ENTZEROTH, M., WOOD, J. (2007). Funtion of the SIRT 1 protein deacetylase in cancer. *Biotechnology Journal*. 2: 1360-1368.

SUN, Y., SUN, D., LI, F., TIAN, L., LI, C., LI, L., LIN, R., WANG, S. (2007). Downrwgulation of Sirt1 by antisense oligonucleotides induces apoptosis and enhances radiation sensitization in A549 lung cancer cells. *Lung Cancer*. **58**: 21-29.

SZYF, M. (2003). Targeting DNA methlation in cancer. *Ageing Research Reviews*. **2**: 299-328.

TONINI, T., D'ANDRILLI, G., FUCITO, A., GASPA, L., BAGELLA, L. (2007). Importence of Ezh2 Polycomb Protein in Tumorigenesis Process Interfering With the Pathway of Growth Suppressive Key Elements. *Journal of Cellular Physiology*. **214**: 295-300.

WAGENER, N., HOLLAND, D., BULKESCHER, J., MERTENS, I.C., SEYLER, K.H., ZENTGRAF, H., PRITSCH, M., BUSE, S., PFITZENMAIER, J., HAFERKAMP, A., HOHENFELNER, A., SEYLER, F.H. (2008). The enhancer of zeste homolog 2 gene contrıbutes to cell proliferation and apoptosos resistance in renal cell carcinoma cells. *Int.J. Cancer*. **123**:1545-1550.

WANG, G.G., ALLIS, C.D, CHI, P. (2007). Chromatin remodeling and cancer, Part I : covalent histone modifications. *Trends in Molecular medicine.***13**: 363-372.

WEİ, Y., STOCKEJBERG, D., HULBERG, S., RICKSTEN, A., WADENVIK, H. (2007). Changes in Expression of Apoptosis-Related Genes Are Linked to the Molecular Response to Imatinib Treatment in Chronic-Phase Myelod Leukemia Patients. *Acta Haematol*. **17**: 83-90.

WIDSCWENDTER, M., FIEGL, H., EGLE, D., MUELLER-HOLZNER, E., SPIZZO, G., MARTH, C., WEISENBERGER, D.J., CAMPAN, M., YOUNG, J., JACOBS, I., LAIRD, P.W. (2007). Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nature Genetics*. **39**: 157-158.

YAMAKUCHI, M., FERLITO, M., LOWENSTEIN, C.J. (2008). mİR-34a repression if SIRT 1 regulates apoptosis. *PNAS.* **105**: 13421-13426.

YAMAMOTO, H., SCHOOJANS, K., AUWERX, J. (2008). Sırtuin Functions in Health and Disease. *Molecular Endocrinology*. **8**:1745-1755.

YU, J., YU, J., RHODES, D.R., TOMLINS, S.A., CAO, X., CHEN, G., MEHRA, R.,WANG, X., GHOS, D., SHAH R.B., VARAMBALLY, S., PIENTA, K.J., CHINNAIYAN, A.M. (2007). A Polikomb Repression Signature in Metastatic Prostat Cancer Predicts Cancer Outcome. *Cancer Res.* **67**: 10657-10662.

ZEIDLER, M., KLEER, C.G. (2006). The Policomb group PROTEİN Enhancer of Zeste 2: links to DNA repair and breast cancer. *J.Mol.Hist*. **37**: 219-223.

ZHENG, C., HAAK, M., BRORS, B., FRANK, O., GIEHL, M., FABARIUS, A., SCHATZ, M., WEISSER, A., LORENTZ, C., GRETZ, N., HEHLMANN, R., HOCHHAUS, A.,SEİFART, W. (2006). Gene expression profiling of CD33+ cells identifies a molecular signature of chronic myeloid leukemia blast crisis. *Leukemia*. **20**: 1028-1034.

ZSCHOERNİG, B., MAHLKNECHT, U. (2008). SIRTUIN 1: Regulating the regulator. *Biochemical and Biopyisical Research Communications.* **376(2):** 251-255.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Süreyya BOZKURT

Hacettepe - 07/09/1970

T.C.

Evli

Hacettepe Onkoloji Hastanesi Temel Onkoloji A.B.D. Sıhhiye/ANKARA

II- Eğitimi

- 2007 - … Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.B.D. Doktora Programı
- 2005 – Montpellier Üniversitesi Tıp Fakültesi (Fransa) Avrupa Moleküler Sitogenetik Diploması
- 2003 – 2005 Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Temel Biyoteknoloji A.B.D. Yüksek Lisans Eğitimi
- 1987 – 1991 Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

III- Unvanları

- Biyolog
- Uzman Biyoloji

IV- Mesleki Deneyimi

1993 – Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji A.B.D. ; Biyolog

2000 – Çevre Bakanlığı Doğal Hayat Karum Şubesi; Biyolog

2000 – Hacettepe Üniversitesi Temel Onkoloji A.B.D. ; Biyolog

V- Bilimsel İlgi Alanları

Losemi Sitogenetik

Moleküler Sitogenetik

Kanser Epigenetik

VI- Bilimsel Etkinlikleri

- Türkiye Bilimler Akademisi 4. Kök Hücre Sempozyumu
- European Cytogeneticists Association 6. European Cytogenetics Conference
- 4. Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Sempozyumu
- II. Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumu

- European School Of Genetic Medicine Hybird Course in İntegration of Cytogenetics, Microarrays and Mussine sequency in Biomedical and Clinical Research (2008)