

EXPERIMED

Volume/Sayı **8** Issue/Cilt **3** **December/Aralık** 2018

- » Methylation Status of Different Genes in Adult and Childhood AML Cases and Investigation of the Expression of DNMTases
Cumhur G. Ekmekçi, Uğur Özbek
- » HEK293 Hücreleri Üzerine Tunikamisinin Etkisi
Muhammed Abdulvahid Kalkan, Burçak Vural, Evrim Kömürcü Bayrak
- » Lösemilerde Timidilat Sentaz Polimorfizmi
Cumhur G. Ekmekçi, Uğur Özbek
- » Polisitemia Vera'da CXCL9-CXCR3 Yolağının Etkisi
Cemil Altunay, Akif Selim Yavuz, Selçuk Sözer Tokdemir



EXPERIMED

EDITORS/EDİTÖR

Erdem Tüzün

Istanbul University,
Aziz Sançar Institute of
Experimental Medicine,
Department of Neuroscience,
Istanbul, Turkey

*Istanbul Üniversitesi,
Aziz Sançar Deneysel
Tıp Araştırma Enstitüsü,
Sinirbilim Anabilim Dalı,
Istanbul, Türkiye*

EDITORS/EDİTÖR KURULU

Ümit Zeybek

Istanbul University,
Aziz Sançar Institute of
Experimental Medicine,
Department of Molecular
Medicine, Istanbul, Turkey

*Istanbul Üniversitesi,
Aziz Sançar Deneysel
Tıp Araştırma Enstitüsü,
Moleküler Tıp Anabilim
Dalı, Istanbul, Türkiye*

Cem İsmail Küçükali

Istanbul University,
Aziz Sançar Institute of
Experimental Medicine,
Department of Neuroscience,
Istanbul, Turkey

*Istanbul Üniversitesi,
Aziz Sançar Deneysel
Tıp Araştırma Enstitüsü,
Sinirbilim Anabilim Dalı,
Istanbul, Türkiye*

Gaye Erten

Istanbul University,
Aziz Sançar Institute of
Experimental Medicine,
Department of Immunology,
Istanbul, Turkey

*Istanbul Üniversitesi,
Aziz Sançar Deneysel
Tıp Araştırma Enstitüsü,
İmmünoloji Anabilim Dalı,
Istanbul, Türkiye*

Sema Sırma Ekmekçi

Istanbul University,
Aziz Sançar Institute of
Experimental Medicine,
Department of Genetics,
Istanbul, Turkey

*Istanbul Üniversitesi,
Aziz Sançar Deneysel Tıp
Araştırma Enstitüsü, Genetik
Anabilim Dalı, Istanbul,
Türkiye*

EDITORIAL BOARD/ YAYIN KURULU

İlhan Yaylım

Istanbul University,
Aziz Sançar Institute of
Experimental Medicine,
Department of Molecular
Medicine, Istanbul, Turkey

*Istanbul Üniversitesi,
Aziz Sançar Deneysel
Tıp Araştırma Enstitüsü,
Moleküler Tıp Anabilim
Dalı, Istanbul, Türkiye*

Esin Aktaş Çetin

Istanbul University,
Aziz Sançar Institute of
Experimental Medicine,
Department of Genetics,
Istanbul, Turkey

*Istanbul Üniversitesi,
Aziz Sançar Deneysel Tıp
Araştırma Enstitüsü, Genetik
Anabilim Dalı, Istanbul,
Türkiye*

Feyza Nur Tuncer

Istanbul University,
Aziz Sançar Institute of
Experimental Medicine,
Department of Genetics,
Istanbul, Turkey

*Istanbul Üniversitesi,
Aziz Sançar Deneysel Tıp
Araştırma Enstitüsü, Genetik
Anabilim Dalı, Istanbul,
Türkiye*

Numan Oezguen

Baylor College of Medicine,
Department of Pathology &
Immunology, Texas, USA

*Baylor Üniversitesi Tıp
Fakültesi, Patoloji ve
İmmünoloji Anabilim Dalı,
Texas, ABD*

Gökçe Toruner

MD Anderson Cancer
Center, Department of
Hematopathology, USA

*MD Anderson Kanser
Merkezi, Hematoloji
Anabilim Dalı, ABD*

Elif Özkök

Istanbul University,
Aziz Sançar Institute of
Experimental Medicine,
Department of Neuroscience,
Istanbul, Turkey

*Istanbul Üniversitesi,
Aziz Sançar Deneysel
Tıp Araştırma Enstitüsü,
Sinirbilim Anabilim Dalı,
Istanbul, Türkiye*

Aydın Çevik

Istanbul University,
Aziz Sançar Institute of
Experimental Medicine,
Department of Laboratory
Animals Science, Istanbul,
Turkey

*Istanbul Üniversitesi,
Aziz Sançar Deneysel
Tıp Araştırma Enstitüsü,
Laboratuvar Hayvanları
Bilimi Anabilim Dalı,
Istanbul, Türkiye*

Abid Hussaini

Columbia University, Taub
Institute, Department of
Pathology and Cell Biology,
New York, USA

*Columbia Üniversitesi, Taub
Enstitüsü, Patoloji ve Hücre
Biyolojisi Anabilim Dalı,
New York, ABD*

Ebba Lohmann

University of Tübingen,
Hertie Institute for Clinical
Brain Research, Department
Of Neurodegenerative
Diseases, Tübingen,
Germany

*Tübingen Üniversitesi,
Hertie Institute for
Clinical Brain Research,
Nörodegeneratif Hastalıklar
Anabilim Dalı, Tübingen,
Almanya*

Çağla Eroğlu

Duke University,
Department of Cell Biology,
North Carolina, USA

*Duke Üniversitesi, Hücre
Biyolojisi Anabilim Dalı,
Kuzey Carolina, ABD*

Gürol Tunçman

Harvard University,
Department of Genetics
and Complex Diseases,
Massachusetts, USA

*Harvard Üniversitesi,
Genetik ve Karmaşık
Hastalıklar Anabilim Dalı,
Massachusetts, ABD*



Publisher
İbrahim KARA

Publication Director
Ali ŞAHİN

Editorial Development
Gizem KAYAN

Finance and Administration
Zeynep YAKIŞIRER ÜREN

Deputy Publication Director
Gökhan ÇİMEN

Publication Coordinators
Betül ÇİMEN
Özlem ÇAKMAK
Okan AYDOĞAN
İrem DELİÇAY
Arzu YILDIRIM

Project Coordinators
Sinem KOZ
Doğan ORUÇ

Graphics Department
Ünal ÖZER
Deniz DURAN
Bezanur KARABULUT

Address: Büyükdere Cad. No:
105/9 34394 Mecidiyeköy, Şişli,
Istanbul-Turkey
Phone: +90 212 217 17 00
Fax: +90 212 217 22 92
E-mail: info@avesyayincilik.com

EXPERIMED

SECTION EDITORS/ BÖLÜM EDITÖRLERİ

Neurology/Sinirbilim

Atay Vural

Koç University School of Medicine,
Department of Neurology, İstanbul,
Turkey

*Koç University School of Medicine,
Department of Neurology, İstanbul,
Turkey*

Medical Biology/ Tıbbi Biyoloji

Duygu Gezen-Ak

İstanbul University Cerrahpaşa
School of Medicine, Department
of Medical Biology, İstanbul, Turkey

*İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp
Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim
Dalı, İstanbul, Türkiye*

Immunology/İmmünoloji

Umut Can Küçüksezer

İstanbul University, Aziz Sancar
Institute of Experimental Medicine,
Department of Immunology,
İstanbul, Turkey

*İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar
Deneyel Tıp Araştırma Enstitüsü,
İmmünoloji Anabilim Dalı, İstanbul,
Türkiye*

Molecular Medicine/ Moleküler Tıp

Bedia Çakmakoğlu

İstanbul University, Aziz Sancar
Institute of Experimental Medicine,
Department of Molecular
Medicine, İstanbul, Turkey

*İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar
Deneyel Tıp Araştırma Enstitüsü,
Moleküler Tıp Anabilim Dalı,
İstanbul, Türkiye*

Genetics/Genetik

Evrım Kömürcü Bayrak

İstanbul University, Aziz Sancar
Institute of Experimental Medicine,
Department of Genetic, İstanbul,
Turkey

*İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar
Deneyel Tıp Araştırma Enstitüsü,
Genetik Anabilim Dalı, İstanbul,
Türkiye*

Laboratory Animals Science/ Laboratuvar Hayvanları

Rivaze Kalaycı

İstanbul University, Aziz Sancar
Institute of Experimental Medicine,
Department of Laboratory Animals
Science, İstanbul, Turkey

*İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar
Deneyel Tıp Araştırma Enstitüsü,
Laboratuvar Hayvanları Bilimi
Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye*

Medical Pharmacology/ Farmakoloji

Ahmet Gökhan Akkan

İstanbul University Cerrahpaşa
School of Medicine, Department
of Medical Pharmacology, İstanbul,
Turkey

*İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa
Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji
Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye*

Physiology/Fizyoloji

Gökhan Metin

İstanbul University Cerrahpaşa
School of Medicine, Department
of Physiology, İstanbul, Turkey

*İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp
Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı,
İstanbul, Türkiye*

Biochemistry/Biyokimya

Güzide Şule Seçkin

İstanbul University İstanbul School
of Medicine, Department of
Medical Biochemistry, İstanbul,
Turkey

*İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp
Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim
Dalı, İstanbul, Türkiye*

Sports Medicine/ Spor Bilimleri

Bülent Bayraktar

İstanbul University İstanbul School
of Medicine, Department of Sports
Medicine, İstanbul, Turkey

*İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp
Fakültesi, Spor Hekimliği Anabilim
Dalı, İstanbul, Türkiye*

Biomedical/Biyomedikal

Olcay Güneş

İstanbul Technical University,
School of Electrical and
Electronics Engineering,
Department of Electronics and
Communication Engineering,
İstanbul, Turkey

*İstanbul Teknik Üniversitesi Elektrik-
Elektronik Fakültesi, Elektronik ve
Haberleşme Mühendisliği Bölümü,
İstanbul, Türkiye*

Internal Medicine/ Dahili Tıp Bilimleri

Esme Ekizoğlu

İstanbul University İstanbul School
of Medicine, Department of
Neurology, İstanbul, Turkey

*İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp
Fakültesi, Nöroloji Anabilim Dalı,
İstanbul, Türkiye*

General Surgery/ Cerrahi Tıp Bilimleri

Nihat Aksakal

İstanbul University İstanbul School
of Medicine, Department of
General Surgery, İstanbul, Turkey

*İstanbul Üniversitesi İstanbul
Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Dalı,
İstanbul, Türkiye*

EXPERIMED

AIMS AND SCOPE

Experimed is an international, scientific, open access periodical published in accordance with independent, unbiased, and double-blinded peer-review principles. The journal is the official publication of İstanbul University Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine and it is published triannually on April, August, and December. The publication languages of the journal are Turkish and English.

Experimed aims to contribute to the literature by publishing manuscripts at the highest scientific level on all fields of basic and clinical medical sciences. The journal publishes original articles, case reports, reviews, and letters to the editor that are prepared in accordance with ethical guidelines.

The scope of the journal includes but not limited to; experimental studies in all fields of medical sciences.

The target audience of the journal includes specialists and professionals working and interested in all disciplines of basic and clinical medical sciences.

The editorial and publication processes of the journal are shaped in accordance with the guidelines of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), World Association of Medical Editors (WAME), Council of Science Editors (CSE), Committee on Publication Ethics (COPE), European Association of Science Editors (EASE), and National Information Standards Organization (NISO). The journal is in conformity with the Principles of Transparency and Best Practice in Scholarly Publishing (doaj.org/bestpractice).

Processing and publication are free of charge with the journal. No fees are requested from the authors at any point throughout the evaluation and publication process. All manuscripts must be submitted via the online submission system, which is available at <http://experimed.istanbul.edu.tr/en/>. The journal guidelines, technical information, and the required forms are available on the journal's web page.

All expenses of the journal are covered by the İstanbul University.

Statements or opinions expressed in the manuscripts published in the journal reflect the views of the author(s) and not the opinions of the İstanbul University Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine, editors, editorial board, and/or publisher; the editors, editorial board, and publisher disclaim any responsibility or liability for such materials.

All published content is available online, free of charge at <http://experimed.istanbul.edu.tr/en/>

İstanbul University holds the international copyright of all the content published in the journal.

Editor in Chief: Prof. Erdem Tüzün

Address: Vakıf Gureba Avenue, İstanbul Medical Faculty Campus, 34093, Fatih, İstanbul, Turkey

Phone: 0212-4142000-33356

Fax: 0212-5324171

E-mail: erdemtuzun@istanbul.edu.tr

Publisher: AVES

Address: Büyükdere Avenue, 105/9 34394 Mecidiyeköy, Şişli, İstanbul, Turkey

Phone: +90 212 217 17 00

Fax: +90 212 217 22 92

E-mail: info@avesyayincilik.com

Web page: avesyayincilik.com

EXPERIMED

AMAÇ VE KAPSAM

Experimed; İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Araştırma Enstitüsü'nün çift-kör hakemli, açık erişimli bilimsel yayın organıdır. Dergi Nisan, Ağustos ve Aralık aylarında olmak üzere, yılda 3 sayı olarak yayınlanır. Derginin yayın dili Türkçe ve İngilizce'dir.

Experimed, temel ve klinik tıp bilimlerinin tüm alanlarında orijinal araştırma, olgu sunumu, derleme ve editöre mektup türlerinde makaleler yayınladığı yüksek bilimsel standartlara sahip makalelerle literatüre katkı sunmaktadır.

Derginin hedef kitlesi, temel ve klinik tıbbi bilimler ile ilgilenen ve araştırma yapan tüm uzmanlar ve araştırmacılarıdır.

Derginin editöryel ve yayın süreçleri International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), World Association of Medical Editors (WAME), Council of Science Editors (CSE), Committee on Publication Ethics (COPE), European Association of Science Editors (EASE) ve National Information Standards Organization (NISO) organizasyonlarının kılavuzlarına uygun olarak biçimlendirilir. Experimed, Principles of Transparency and Best Practice in Scholarly Publishing (doaj.org/bestpractice) ilkelerini benimsemiştir.

Makale değerlendirme ve yayın işlemleri için yazarlardan ücret talep edilmemektedir. Tüm makaleler http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_ sayfasındaki online makale değerlendirme sistemi kullanılarak dergiye gönderilmektedir. Derginin yazım kurallarına, gerekli formlara ve dergiyle ilgili diğer bilgilere web sayfasından erişilebilir.

Derginin tüm masrafları İstanbul Üniversitesi tarafından karşılanmaktadır.

Dergide yayınlanan makalelerde ifade edilen bilgi, fikir ve görüşler İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Baş Editör, Editörler, Yayın Kurulu ve Yayıncı'nın değil, yazar(lar)ın bilgi ve görüşlerini yansıtır. Baş Editör, Editörler, Yayın Kurulu ve Yayıncı, bu gibi yazarlara ait bilgi ve görüşler için hiçbir sorumluluk ya da yükümlülük kabul etmemektedir.

Yayınlanan tüm içeriğe http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_ adresinden ücretsiz olarak erişilebilir.

Dergide yayınlanan içeriğin tüm telif hakları İstanbul Üniversitesi'ne aittir.

Baş Editör: Prof. Dr. Erdem Tüzün
Address: Vakıf Gureba Caddesi, İstanbul Tıp Fakültesi Kampüsü, 34093, Fatih, İstanbul, Türkiye
Phone: 0212-4142000-33356
Fax: 0212-5324171
E-mail: erdemtuzun@istanbul.edu.tr

Publisher: AVES
Address: Büyükdere Avenue, 105/9 34394 Mecidiyeköy, Şişli, İstanbul, Turkey
Phone: +90 212 217 17 00
Fax: +90 212 217 22 92
E-mail: info@avesyayincilik.com
Web page: avesyayincilik.com

EXPERIMED

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Experimed is an international, scientific, open access periodical published in accordance with independent, unbiased, and double-blinded peer-review principles. The journal is the official publication of İstanbul University Aziz Sancar Institute of Experimental Medicine and it is published triannually on April, August, and December. The publication languages of the journal are Turkish and English.

Experimed aims to contribute to the literature by publishing manuscripts at the highest scientific level on all fields of basic and clinical medical sciences. The journal publishes original articles, case reports, reviews, and letters to the editor that are prepared in accordance with ethical guidelines.

The editorial and publication processes of the journal are shaped in accordance with the guidelines of the International Council of Medical Journal Editors (ICMJE), the World Association of Medical Editors (WAME), the Council of Science Editors (CSE), the Committee on Publication Ethics (COPE), the European Association of Science Editors (EASE), and National Information Standards Organization (NISO). The journal conforms to the Principles of Transparency and Best Practice in Scholarly Publishing (doaj.org/bestpractice).

Originality, high scientific quality, and citation potential are the most important criteria for a manuscript to be accepted for publication. Manuscripts submitted for evaluation should not have been previously presented or already published in an electronic or printed medium. The journal should be informed of manuscripts that have been submitted to another journal for evaluation and rejected for publication. The submission of previous reviewer reports will expedite the evaluation process. Manuscripts that have been presented in a meeting should be submitted with detailed information on the organization, including the name, date, and location of the organization.

Manuscripts submitted to Experimed will go through a double-blind peer-review process. Each submission will be reviewed by at least two external, independent peer reviewers who are experts in their fields in order to ensure an unbiased evaluation process. The editorial board will invite an external and independent editor to manage the evaluation processes of manuscripts submitted by editors or by the editorial board members of the journal. The Editor in Chief is the final authority in the decision-making process for all submissions.

An approval of research protocols by the Ethics Committee in accordance with international agreements (World Medical Association Declaration of Helsinki "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects," amended in October 2013, www.wma.net) is required for experimental, clinical, and drug studies and for some case reports. If required, ethics committee reports or an equivalent official document will be requested from the authors. For manuscripts concerning experimental research on humans, a statement should be included that shows that written informed consent of patients and volunteers was obtained following a de-

tailed explanation of the procedures that they may undergo. For studies carried out on animals, the measures taken to prevent pain and suffering of the animals should be stated clearly. Information on patient consent, the name of the ethics committee, and the ethics committee approval number should also be stated in the Materials and Methods section of the manuscript. It is the authors' responsibility to carefully protect the patients' anonymity. For photographs that may reveal the identity of the patients, signed releases of the patient or of their legal representative should be enclosed.

All submissions are screened by a similarity detection software (iThenticate by CrossCheck).

In the event of alleged or suspected research misconduct, e.g., plagiarism, citation manipulation, and data falsification/fabrication, the Editorial Board will follow and act in accordance with COPE guidelines.

Each individual listed as an author should fulfill the authorship criteria recommended by the International Committee of Medical Journal Editors

(ICMJE - www.icmje.org). The ICMJE recommends that authorship be based on the following 4 criteria:

- 1 Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; AND
- 2 Drafting the work or revising it critically for important intellectual content; AND
- 3 Final approval of the version to be published; AND
- 4 Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

In addition to being accountable for the parts of the work he/she has done, an author should be able to identify which co-authors are responsible for specific other parts of the work. In addition, authors should have confidence in the integrity of the contributions of their co-authors.

All those designated as authors should meet all four criteria for authorship, and all who meet the four criteria should be identified as authors. Those who do not meet all four criteria should be acknowledged in the title page of the manuscript.

Experimed requires corresponding authors to submit a signed and scanned version of the authorship contribution form (available for download through <http://experimed.istanbul.edu.tr/en/>) during the initial submission process in order to act appropriately on authorship rights and to prevent ghost or honorary authorship. If the editorial board suspects a case of "gift authorship," the submission will be rejected without further review. As part of the submission of the manuscript, the corresponding author should also send a

EXPERIMED

short statement declaring that he/she accepts to undertake all the responsibility for authorship during the submission and review stages of the manuscript.

Experimed requires and encourages the authors and the individuals involved in the evaluation process of submitted manuscripts to disclose any existing or potential conflicts of interests, including financial, consultant, and institutional, that might lead to potential bias or a conflict of interest. Any financial grants or other support received for a submitted study from individuals or institutions should be disclosed to the Editorial Board. To disclose a potential conflict of interest, the ICMJE Potential Conflict of Interest Disclosure Form should be filled in and submitted by all contributing authors. Cases of a potential conflict of interest of the editors, authors, or reviewers are resolved by the journal's Editorial Board within the scope of COPE and ICMJE guidelines.

The Editorial Board of the journal handles all appeal and complaint cases within the scope of COPE guidelines. In such cases, authors should get in direct contact with the editorial office regarding their appeals and complaints. When needed, an ombudsman may be assigned to resolve cases that cannot be resolved internally. The Editor in Chief is the final authority in the decision-making process for all appeals and complaints.

When submitting a manuscript to Experimed, authors accept to assign the copyright of their manuscript to İstanbul University. If rejected for publication, the copyright of the manuscript will be assigned back to the authors. Experimed requires each submission to be accompanied by a Copyright Transfer Form (available for download at http://experimed.istanbul.edu.tr/en/_). When using previously published content, including figures, tables, or any other material in both print and electronic formats, authors must obtain permission from the copyright holder. Legal, financial and criminal liabilities in this regard belong to the author(s).

Statements or opinions expressed in the manuscripts published in Experimed reflect the views of the author(s) and not the opinions of the editors, the editorial board, or the publisher; the editors, the editorial board, and the publisher disclaim any responsibility or liability for such materials. The final responsibility in regard to the published content rests with the authors.

MANUSCRIPT PREPARATION

The manuscripts should be prepared in accordance with ICMJE-Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing, and Publication of Scholarly Work in Medical Journals (updated in December 2015 - <http://www.icmje.org/icmje-recommendations.pdf>). Authors are required to prepare manuscripts in accordance with the CONSORT guidelines for randomized research studies, STROBE guidelines for observational original research studies, STARD guidelines for studies on diagnostic accuracy, PRISMA guidelines for systematic reviews and meta-analysis, ARRIVE guidelines for experimental animal studies, and TREND guidelines for non-randomized public behavior.

Manuscripts can only be submitted through the journal's online manuscript submission and evaluation system, available at [\[perimed.istanbul.edu.tr/en/_\]\(http://perimed.istanbul.edu.tr/en/_\). Manuscripts submitted via any other medium will not be evaluated.](http://ex-</p></div><div data-bbox=)

Manuscripts submitted to the journal will first go through a technical evaluation process where the editorial office staff will ensure that the manuscript has been prepared and submitted in accordance with the journal's guidelines. Submissions that do not conform to the journal's guidelines will be returned to the submitting author with technical correction requests.

Authors are required to submit the following:

- Copyright Transfer Form,
- Author Contributions Form, and
- ICMJE Potential Conflict of Interest Disclosure Form (should be filled in by all contributing authors)

during the initial submission. These forms are available for download at http://experimed.istanbul.edu.tr/en/_.

Preparation of the Manuscript

Title page: A separate title page should be submitted with all submissions and this page should include:

- The full title of the manuscript as well as a short title (running head) of no more than 50 characters,
- Name(s), affiliations, ORCID IDs and highest academic degree(s) of the author(s),
- Grant information and detailed information on the other sources of support,
- Name, address, telephone (including the mobile phone number) and fax numbers, and email address of the corresponding author,
- Acknowledgment of the individuals who contributed to the preparation of the manuscript but who do not fulfill the authorship criteria.

Abstract: A Turkish and an English abstract should be submitted with all submissions except for Letters to the Editor. Submitting a Turkish abstract is not compulsory for international authors. The abstract of Original Articles should be structured with subheadings (Objective, Material and Method, Results, and Conclusion). Please check Table 1 below for word count specifications.

Keywords: Each submission must be accompanied by a minimum of three to a maximum of six keywords for subject indexing at the end of the abstract. The keywords should be listed in full without abbreviations. The keywords should be selected from the National Library of Medicine, Medical Subject Headings database (<https://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>).

Manuscript Types

Original Articles: This is the most important type of article since it provides new information based on original research. The main text of original articles should be structured with Introduction, Material and Method, Results, and Discussion subheadings. Please check Table 1 for the limitations for Original Articles.

EXPERIMED

Statistical analysis to support conclusions is usually necessary. Statistical analyses must be conducted in accordance with international statistical reporting standards (Altman DG, Gore SM, Gardner MJ, Pocock SJ. Statistical guidelines for contributors to medical journals. *Br Med J* 1983; 7; 1489-93). Information on statistical analyses should be provided with a separate subheading under the Materials and Methods section and the statistical software that was used during the process must be specified.

Units should be prepared in accordance with the International System of Units (SI).

Editorial Comments: Editorial comments aim to provide a brief critical commentary by reviewers with expertise or with high reputation in the topic of the research article published in the journal. Authors are selected and invited by the journal to provide such comments. Abstract, Keywords, and Tables, Figures, Images, and other media are not included.

Review Articles: Reviews prepared by authors who have extensive knowledge on a particular field and whose scientific background has been translated into a high volume of publications with a high citation potential are welcomed. These authors may even be invited by the journal. Reviews should describe, discuss, and evaluate the current level of knowledge of a topic in clinical practice and should guide future studies. The main text should contain Introduction, Clinical and Research Consequences, and Conclusion sections. Please check Table 1 for the limitations for Review Articles.

Case Reports: There is limited space for case reports in the journal and reports on rare cases or conditions that constitute challenges in diagnosis and treatment, those offering new therapies or revealing knowledge not included in the literature, and interesting and educative case reports are accepted for publication. The text should include Introduction, Case Presentation, Discussion, and Conclusion subheadings. Please check Table 1 for the limitations for Case Reports.

Letters to the Editor: This type of manuscript discusses important parts, overlooked aspects, or lacking parts of a previously published article. Articles on subjects within the scope of the journal that might attract the readers' attention, particularly educative cases, may also be submitted in the form of a "Letter to the Editor." Readers can also present their comments on the published manuscripts in the form of a "Letter to the Editor." Abstract, Key-

words, and Tables, Figures, Images, and other media should not be included. The text should be unstructured. The manuscript that is being commented on must be properly cited within this manuscript.

Tables

Tables should be included in the main document, presented after the reference list, and they should be numbered consecutively in the order they are referred to within the main text. A descriptive title must be placed above the tables. Abbreviations used in the tables should be defined below the tables by footnotes (even if they are defined within the main text). Tables should be created using the "insert table" command of the word processing software and they should be arranged clearly to provide easy reading. Data presented in the tables should not be a repetition of the data presented within the main text but should be supporting the main text. Figures and Figure Legends

Figures, graphics, and photographs should be submitted as separate files (in TIFF or JPEG format) through the submission system. The files should not be embedded in a Word document or the main document. When there are figure subunits, the subunits should not be merged to form a single image. Each subunit should be submitted separately through the submission system. Images should not be labeled (a, b, c, etc.) to indicate figure subunits. Thick and thin arrows, arrowheads, stars, asterisks, and similar marks can be used on the images to support figure legends. Like the rest of the submission, the figures too should be blind. Any information within the images that may indicate an individual or institution should be blinded. The minimum resolution of each submitted figure should be 300 DPI. To prevent delays in the evaluation process, all submitted figures should be clear in resolution and large in size (minimum dimensions: 100 × 100 mm). Figure legends should be listed at the end of the main document.

All acronyms and abbreviations used in the manuscript should be defined at first use, both in the abstract and in the main text. The abbreviation should be provided in parentheses following the definition.

When a drug, product, hardware, or software program is mentioned within the main text, product information, including the name of the product, the producer of the product, and city and the country of the company (including the state if in USA), should be provided in parentheses in the following format: "Discovery St PET/CT scanner (General Electric, Milwaukee, WI, USA)"

Table 1. Limitations for each manuscript type

Type of manuscript	Word limit	Abstract word limit	Reference limit	Table limit	Figure limit
Original Article	3500	250 (Structured)	30	6	7 or total of 15 images
Review Article	5000	250	50	6	10 or total of 20 images
Case Report	1000	200	15	No tables	10 or total of 20 images
Letter to the Editor	500	No abstract	5	No tables	No media

EXPERIMED

All references, tables, and figures should be referred to within the main text, and they should be numbered consecutively in the order they are referred to within the main text.

Limitations, drawbacks, and the shortcomings of original articles should be mentioned in the Discussion section before the conclusion paragraph.

References

While citing publications, preference should be given to the latest, most up-to-date publications. If an ahead-of-print publication is cited, the DOI number should be provided. Authors are responsible for the accuracy of references. Journal titles should be abbreviated in accordance with the journal abbreviations in Index Medicus/MEDLINE/PubMed. When there are six or fewer authors, all authors should be listed. If there are seven or more authors, the first six authors should be listed followed by "et al." In the main text of the manuscript, references should be cited using Arabic numbers in parentheses. The reference styles for different types of publications are presented in the following examples.

Journal Article: Rankovic A, Rancic N, Jovanovic M, Ivanovi M, Gajović O, Lazić Z, et al. Impact of imaging diagnostics on the budget – Are we spending too much? *Vojnosanit Pregl* 2013; 70: 709-11.

Book Section: Suh KN, Keystone JS. Malaria and babesiosis. Gorbach SL, Barlett JG, Blacklow NR, editors. *Infectious Diseases*. Philadelphia: Lippincott Williams; 2004.p.290-308.

Books with a Single Author: Sweetman SC. *Martindale the Complete Drug Reference*. 34th ed. London: Pharmaceutical Press; 2005.

Editor(s) as Author: Huizing EH, de Groot JAM, editors. *Functional reconstructive nasal surgery*. Stuttgart-New York: Thieme; 2003.

Conference Proceedings: Bengissson S, Sothemin BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. *MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sept 6-10; Geneva, Switzerland*. Amsterdam: North-Holland; 1992. pp.1561-5.

Scientific or Technical Report: Cusick M, Chew EY, Hoogwerf B, Agrón E, Wu L, Lindley A, et al. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Risk factors for renal replacement therapy in the Early Treatment Diabetic Retinopathy Study (ETDRS), Early Treatment Diabetic Retinopathy Study *Kidney Int*: 2004. Report No: 26.

Thesis: Yılmaz B. Ankara Üniversitesindeki Öğrencilerin Beslenme Durumları, Fiziksel Aktiviteleri ve Beden Kitle İndeksleri Kan Lipidleri Arasındaki İlişkiler. H.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi. 2007.

Manuscripts Accepted for Publication, Not Published Yet: Slots J. The microflora of black stain on human primary teeth. *Scand J Dent Res*. 1974.

Epub Ahead of Print Articles: Cai L, Yeh BM, Westphalen AC, Roberts JP, Wang ZJ. Adult living donor liver imaging. *Diagn Interv Radiol*. 2016 Feb 24. doi: 10.5152/dir.2016.15323. [Epub ahead of print].

Manuscripts Published in Electronic Format: Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* (serial online) 1995 Jan-Mar (cited 1996 June 5): 1(1): (24 screens). Available from: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/cid.htm>.

REVISIONS

When submitting a revised version of a paper, the author must submit a detailed "Response to the reviewers" that states point by point how each issue raised by the reviewers has been covered and where it can be found (each reviewer's comment, followed by the author's reply and line numbers where the changes have been made) as well as an annotated copy of the main document. Revised manuscripts must be submitted within 30 days from the date of the decision letter. If the revised version of the manuscript is not submitted within the allocated time, the revision option may be canceled. If the submitting author(s) believe that additional time is required, they should request this extension before the initial 30-day period is over.

Accepted manuscripts are copy-edited for grammar, punctuation, and format. Once the publication process of a manuscript is completed, it is published online on the journal's webpage as an ahead-of-print publication before it is included in its scheduled issue. A PDF proof of the accepted manuscript is sent to the corresponding author and their publication approval is requested within 2 days of their receipt of the proof.

Editor in Chief: Prof. Erdem Tüzün
Address: Vakıf Gureba Avenue, Istanbul Medical Faculty Campus, 34093, Fatih, İstanbul, Turkey
Phone: 0212-4142000-33356
Fax: 0212-5324171
E-mail: erdemtuzun@istanbul.edu.tr

Publisher: AVES
Address: Büyükdere Cad. 105/9 34394 Mecidiyeköy, Şişli, İstanbul, Turkey
Phone: +90 212 217 17 00
Fax: +90 212 217 22 92
E-mail: info@avesyayincilik.com
avesyayincilik.com

EXPERIMED

YAZARLARA BİLGİ

Experimed; İstanbul Üniversitesi Aziz Sançar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nün çift-kör hakemli açık erişimli bilimsel yayın organıdır. Dergi Nisan, Ağustos ve Aralık aylarında olmak üzere, yılda 3 sayı olarak yayınlanır. Yayın dili Türkçe ve İngilizce'dir.

Experimed, temel ve klinik tıp bilimlerinin tüm alanlarında orijinal araştırma, olgu sunumu, derleme ve editöre mektup türlerinde makaleler yayınlamaktadır.

Derginin editöryel ve yayın süreçleri International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), World Association of Medical Editors (WAME), Council of Science Editors (CSE), Committee on Publication Ethics (COPE), European Association of Science Editors (EASE), ve National Information Standards Organization (NISO) organizasyonlarının kılavuzlarına uygun olarak biçimlendirilmiştir. Experimed'in editöryel ve yayın süreçleri, Principles of Transparency and Best Practice in Scholarly Publishing (doaj.org/bestpractice) ilkelerine uygun olarak yürütülmektedir.

Özgünlük, yüksek bilimsel kalite ve atıf potansiyeli bir makalenin yayına kabulü için en önemli kriterlerdir. Gönderilen yazıların daha önce başka bir elektronik ya da basılı dergide, kitapta veya farklı bir mecrada sunulmamış ya da yayınlanmamış olması gerekir. Daha önce başka bir dergiye gönderilen ancak yayına kabul edilmeyen yazılar hakkında dergi önceden bilgilendirilmelidir. Bu yazıların eski hakem raporlarının Yayın Kuruluna gönderilmesi değerlendirme süresinin hızlanmasını sağlayacaktır. Toplantılarda sunulan çalışmalar için, sunum yapılan organizasyonun tam adı, tarihi, şehri ve ülkesi belirtilmelidir.

Experimed'e gönderilen tüm makaleler çift-kör hakem değerlendirme sürecinden geçmektedir. Tarafsız değerlendirme sürecini sağlamak için her makale alanlarında uzman en az iki dış-bağımsız hakem tarafından değerlendirilir. Dergi Yayın Kurulu üyeleri tarafından gönderilecek makalelerin değerlendirme süreçleri, davet edilecek dış bağımsız editörler tarafından yönetilecektir. Bütün makalelerin karar verme süreçlerinde nihai karar yetkisi Baş Editör'dedir.

Klinik ve deneysel çalışmalar, ilaç araştırmaları ve bazı olgu sunumları için World Medical Association Declaration of Helsinki "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects", (amended in October 2013, www.wma.net) çerçevesinde hazırlanmış Etik Komisyon raporu gerekmektedir. Gerekli görülmesi halinde Etik Komisyon raporu veya eşdeğeri olan resmi bir yazı yazarlardan talep edilebilir. İnsanlar üzerinde yapılmış deneysel çalışmaların sonuçlarını bildiren yazılarda, çalışmanın yapıldığı kişilere uygulanan prosedürlerin niteliği tümüyle açıklandıktan sonra, onaylarının alındığına ilişkin bir açıklamaya metin içinde yer verilmelidir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda ise ağır, acı ve rahatsızlık verilmemesi için yapılmış olanlar açık olarak makalede belirtilmelidir. Hasta onamları, Etik Kurul raporun alındığı kurumun adı, onay belgesinin numarası ve tarihi ana metin dosyasında yer alan Yöntemler başlığı altında yazılmalıdır. Hastaların kimliklerinin gizliliğini korumak yazarların sorumluluğundadır. Hastaların kimliğini açığa çıkarabilecek fotoğraflar için hastadan ya da yasal temsilcilerinden alınan imzalı izinlerin de gönderilmesi gereklidir.

Bütün makalelerin benzerlik tespiti denetimi, iThenticate yazılımı aracılığıyla yapılmaktadır.

Yayın Kurulu, dergimize gönderilen çalışmalar hakkındaki intihal, atıf manipülasyonu ve veri sahteciliği iddia ve şüpheleri karşısında COPE kurallarına uygun olarak hareket edecektir.

Yazar olarak listelenen herkesin ICMJE (www.icmje.org) tarafından önerilen yazarlık kriterlerini karşılaması gerekmektedir. ICMJE, yazarların aşağıdaki kriteri karşılamasını önermektedir:

1. Çalışmanın konseptine/tasarımına; ya da çalışma için verilerin toplanmasına, analiz edilmesine ve yorumlanmasına önemli katkı sağlamış olmak; VE
2. Yazı taslağını hazırlamış ya da önemli fikrinsel içeriğin eleştirel incelemelerini yapmış olmak; VE
3. Yazının yayından önceki son halini gözden geçirmiş ve onaylamış olmak; VE
4. Çalışmanın herhangi bir bölümünün geçerliliği ve doğruluğuna ilişkin soruların uygun şekilde soruşturulduğunun ve çözümlendiğinin garantisini vermek amacıyla çalışmanın her yönünden sorumlu olmayı kabul etmek.

Bir yazar, çalışmada katkı sağladığı kısımların sorumluluğunu almasına ek olarak, diğer yazarların çalışmanın hangi kısımlarından sorumlu olduğunu da teşhis edebilmelidir. Ayrıca, yazarlar birbirlerinin katkılarının bütünlüğüne güven duymalıdır.

Yazar olarak belirtilen her kişi yazarlığın dört kriterini karşılamalıdır ve bu dört kriteri karşılayan her kişi yazar olarak tanımlanmalıdır. Dört kriterin hepsini karşılamayan kişilere makalenin başlık sayfasında teşekkür edilmelidir.

Yazarlık haklarına uygun hareket etmek ve hayalet ya da lütfü yazarlığın önlenmesini sağlamak amacıyla sorumlu yazarlar makale yükleme sürecinde <http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/> adresinden erişilebilen Yazar Katkı Formu'nu imzalamalı ve taranmış versiyonunu yazıyla birlikte göndermelidir. Yayın Kurulu'nun gönderilen bir makalede "lütfü yazarlık" olduğundan şüphelenmesi durumunda söz konusu makale değerlendirme yapılmaksızın reddedilecektir. Makale gönderimi kapsamında; sorumlu yazar makale gönderim ve değerlendirme süreçleri boyunca yazarlık ile ilgili tüm sorumluluğu kabul ettiğini bildiren kısa bir ön yazı göndermelidir.

Experimed; gönderilen makalelerin değerlendirme sürecine dahil olan yazarların ve bireylerin, potansiyel çıkar çatışmasına ya da önyargıya yol açabilecek finansal, kurumsal ve diğer ilişkiler dahil mevcut ya da potansiyel çıkar çatışmalarını beyan etmelerini talep ve teşvik eder.

Bir çalışma için bir birey ya da kurumdan alınan her türlü finansal destek ya da diğer destekler Yayın Kurulu'na beyan edilmeli ve potansiyel çıkar çatışmalarını beyan etmek amacıyla ICMJE Potansiyel Çıkar Çatışmaları Formu katkı sağlayan tüm yazarlar tarafından ayrı ayrı doldurulmalıdır. Editörler, yazarlar ve hakemler ile ilgili potansi-

EXPERIMED

Yer çıkar çatışması vakaları derginin Yayın Kurulu tarafından COPE ve ICMJE rehberleri kapsamında çözülmektedir.

Derginin Yayın Kurulu, itiraz ve şikayet vakalarını, COPE rehberleri kapsamında işleme almaktadır. Yazarlar, itiraz ve şikayetleri için doğrudan Editöryel Ofis ile temasa geçebilirler. İhtiyaç duyulduğunda Yayın Kurulu'nun kendi içinde çözemediği konular için tarafsız bir temsilci atanmaktadır. İtiraz ve şikayetler için karar verme süreçlerinde nihai kararı Baş Editör verecektir.

Experimed'e makale gönderirken yazarlar makalelerinin telif haklarını İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'ne devretmeyi kabul ederler. Reddedilen makalelerin telif hakları yazarlarına geri iade edilecektir. Experimed her makalenin http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_ adresinden erişebileceğiniz Yayın Hakkı Devir Formu ile beraber gönderilmesini talep eder. Yazarlar, basılı ya da elektronik formatta yer alan resimler, tablolar ya da diğer her türlü içerik dahil daha önce yayınlanmış içeriği kullanırken telif hakkı sahibinden izin almalıdırlar. Bu konudaki yasal, mali ve cezai sorumluluk yazarlara aittir.

Dergide yayınlanan makalelerde ifade edilen görüşler ve fikirler Experimed, Baş Editör, Editörler, Yayın Kurulu ve Yayıncı'nın değil, yazar(lar)ın bakış açılarını yansıtır. Baş Editör, Editörler, Yayın Kurulu ve Yayıncı bu gibi durumlar için hiçbir sorumluluk ya da yükümlülük kabul etmemektedir. Yayınlanan içerik ile ilgili tüm sorumluluk yazarlara aittir.

MAKALE HAZIRLAMA

Makaleler, ICMJE-Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals (updated in December 2015 - <http://www.icmje.org/icmje-recommendations.pdf>) ile uyumlu olarak hazırlanmalıdır. Randomize çalışmalar CONSORT, gözlemsel çalışmalar STROBE, tanısıl değerli çalışmalar STARD, sistematik derleme ve meta-analizler PRISMA, hayvan deneyli çalışmalar ARRIVE ve randomize olmayan davranış ve halk sağlığıyla ilgili çalışmalar TREND kılavuzlarına uyumlu olmalıdır.

Makaleler sadece http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_ adresinde yer alan derginin online makale yükleme ve değerlendirme sistemi üzerinden gönderilebilir. Diğer mecralardan gönderilen makaleler değerlendirilmeye alınmayacaktır.

Gönderilen makalelerin dergi yazım kurallarına uygunluğu ilk olarak Editöryel Ofis tarafından kontrol edilecek, dergi yazım kurallarına uygun hazırlanmamış makaleler teknik düzeltme talepleri ile birlikte yazarlarına geri gönderilecektir.

Yazarların; Yayın Hakkı Devir Formu, Yazar Katkı Formu ve ICMJE Potansiyel Çıkar Çatışmaları Formu'nu (bu form, tüm yazarlar tarafından doldurulmalıdır) ilk gönderim sırasında online makale sistemine yüklemeleri gerekmektedir. Bu formlara http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_ adresinden erişilebilmektedir.

Başlık sayfası: Gönderilen tüm makalelerle birlikte ayrı bir başlık sayfası da gönderilmelidir. Bu sayfa;

- Makalenin başlığını ve 50 karakteri geçmeyen kısa başlığını,
- Yazarların isimlerini, kurumlarını, ORCID numaralarını ve eğitim derecelerini,

- Finansal destek bilgisi ve diğer destek kaynakları hakkında detaylı bilgiyi,
- Sorumlu yazarın ismi, adresi, telefonu (cep telefonu dahil ve e-posta adresini),
- Makale hazırlama sürecine katkıda bulunan ama yazarlık kriterlerini karşılamayan bireylerle ilgili bilgileri içermelidir.

Özet: Editöre Mektup türündeki yazılar dışında kalan tüm makalelerin Türkçe ve İngilizce özetleri olmalıdır. rijinal Araştırma makalelerinin özetleri "Amaç", "Gereç ve Yöntem", "Bulgular" ve "Sonuç" alt başlıklarını içerecek biçimde hazırlanmalıdır.

Anahtar Sözcükler: Tüm makaleler en az 3 en fazla 6 anahtar kelimeyle birlikte gönderilmeli, anahtar sözcükler özetin hemen altına yazılmalıdır. Kısaltmalar anahtar sözcük olarak kullanılmamalıdır. Anahtar sözcükler National Library of Medicine (NLM) tarafından hazırlanan Medical Subject Headings (MeSH) veritabanından seçilmelidir.

Makale Türleri

Orijinal Araştırma: Ana metin "Giriş", "Gereç ve Yöntem", "Bulgular" ve "Tartışma" alt başlıklarını içermelidir. Özgün Araştırmalarla ilgili kıstlamalar için lütfen Tablo 1'i inceleyiniz.

Sonucu desteklemek için istatistiksel analiz genellikle gereklidir. İstatistiksel analiz, tıbbi dergilerdeki istatistik verilerini bildirme kurallarına göre yapılmalıdır (Altman DG, Gore SM, Gardner MJ, Pocock SJ. Statistical guidelines for contributors to medical journals. Br Med J 1983; 7; 1489-93). İstatistiksel analiz ile ilgili bilgi, Yöntemler bölümü içinde ayrı bir alt başlık olarak yazılmalı ve kullanılan yazılım kesinlikle tanımlanmalıdır.

Birimler, uluslararası birim sistemi olan International System of Units (SI)'a uygun olarak hazırlanmalıdır.

Editöryel Yorum: Dergide yayınlanan bir araştırmanın, o konunun uzmanı olan veya üst düzeyde değerlendirme yapan bir hakemi tarafından kısaca yorumlanması amacını taşımaktadır. Yazarları, dergi tarafından seçilip davet edilir. Özet, anahtar sözcük, tablo, şekil, resim ve diğer görseller kullanılmaz.

Derleme: Yazının konusunda birikimi olan ve bu birikimleri uluslararası literatüre yayın ve atıf sayısı olarak yansıtmış uzmanlar tarafından hazırlanmış yazılar değerlendirmeye alınır. Yazarları dergi tarafından da davet edilebilir. Bir bilgi ya da konunun klinikte kullanılması için vardığı son düzeyi anlatan, tartışan, değerlendiren ve gelecekte yapılacak olan çalışmalara yön veren bir formatta hazırlanmalıdır. Ana metin "Giriş", "Klinik ve Araştırma Etkileri" ve "Sonuç" bölümlerini içermelidir. Derleme türündeki yazılarla ilgili kısıtlamalar için lütfen Tablo 1'i inceleyiniz.

Olgu Sunumu: Olgu sunumları için sınırlı sayıda yer ayrılmakta ve sadece ender görülen, tanı ve tedavisi güç olan hastalıklarla ilgili, yeni bir yöntem öneren, kitaplarda yer verilmeyen bilgileri yansıtan, ilgi çekici ve öğretici özelliği olan olgular yayına kabul edilmektedir. Ana metin; "Giriş", "Olgu Sunumu", "Tartışma" ve "Sonuç" alt başlıklarını içermelidir. Olgu Sunumlarıyla ilgili kısıtlamalar için lütfen Tablo 1'i inceleyiniz.

EXPERIMED

Editöre Mektup: Dergide daha önce yayınlanan bir yazının önemini, gözden kaçan bir ayrıntısını ya da eksik kısımlarını tartışabilir. Ayrıca derginin kapsamına giren alanlarda okurların ilgisini çekebilecek konular ve özellikle eğitici olgular hakkında da Editöre Mektup formatında yazılar yayınlanabilir. Okuyucular da yayınlanan yazılar hakkında yorum içeren Editöre Mektup formatında yazılarını sunabilirler. Özet, anahtar sözcük, tablo, şekil, resim ve diğer görseller kullanılmaz. Ana metin alt başlıksız olmalıdır. Hakkında mektup yazılan yayına ait cilt, yıl, sayı, sayfa numaraları, yazı başlığı ve yazarların adları açık bir şekilde belirtilmeli, kaynak listesinde yazılması ve metin içinde atıfta bulunulmalıdır.

Tablolar

Tablolar ana dosyaya eklenmeli, kaynak listesi sonrasında sunulmalı, ana metin içerisindeki geçiş sıralarına uygun olarak numaralandırılmaz. Tabloların üzerinde tanımlayıcı bir başlık yer almalı ve tablo içerisinde geçen kısaltmaların açıklamaları tablo altına tanımlanmalıdır. Tablolar Microsoft Office Word dosyası içinde "Tablo Ekle" komutu kullanılarak hazırlanmalı ve kolay okunabilir şekilde düzenlenmelidir. Tablolarda sunulan veriler ana metinde sunulan verilerin tekrarı olmamalı; ana metindeki verileri destekleyici nitelikte olmalılardır.

Resim ve Resim Altyazıları

Resimler, grafikler ve fotoğraflar (TIFF ya da JPEG formatında) ayrı dosyalar halinde sisteme yüklenmelidir. Görseller bir Word dosyası dokümanı ya da ana doküman içerisinde sunulmamalıdır. Alt birimlere ayrılan görseller olduğunda, alt birimler tek bir görsel içerisinde verilmemelidir. Her bir alt birim sisteme ayrı bir dosya olarak yüklenmelidir. Resimler alt birimleri belli etme amacıyla etiketlenmemelidir (a, b, c vb.). Resimlerde altyazıları desteklemek için kalın ve ince oklar, ok başları, yıldızlar, asteriksler ve benzer işaretler kullanılabilir. Makalenin geri kalanında olduğu gibi resimler de kör olmalıdır. Bu sebeple, resimlerde yer alan kişi ve kurum bilgileri de körleştirilmelidir. Görsellerin minimum çözünürlüğü 300DPI olmalıdır. Değerlendirme sürecindeki aksaklıkları önlemek için gönderilen bütün görsellerin çözünürlüğü net ve boyutu büyük (minimum boyutlar 100x100 mm) olmalıdır. Resim altyazıları ana metnin sonunda yer almalıdır.

Makale içerisinde geçen tüm kısaltmalar, ana metin ve özetle ayrı ayrı olmak üzere ilk kez kullanıldıkları yerde tanımlanarak kısaltma tanımının ardından parantez içerisinde verilmelidir.

Ana metin içerisinde cihaz, yazılım, ilaç vb. ürünlerden bahsedildiğinde ürünün ismi, üreticisi, üretildiği şehir ve ülke bilgisini içeren ürün bilgisi parantez içinde verilmelidir; "Discovery St PET/CT scanner (General Electric, Milwaukee, WI, USA)".

Tüm kaynaklar, tablolar ve resimlere ana metin içinde uygun olan yerlerde sırayla numara verilerek atıf yapılmalıdır.

Özgün araştırmaların kısıtlamaları, engelleri ve yetersizliklerinden Sonuç paragrafı öncesi "Tartışma" bölümünde bahsedilmelidir.

Kaynaklar

Atıf yapılırken en son ve en güncel yayınlar tercih edilmelidir. Atıf yapılan erken çevrimiçi makalelerin DOI numaraları mutlaka sağlanmalıdır. Kaynakların doğruluğundan yazarlar sorumludur. Dergi isimleri Index Medicus/Medline/PubMed'de yer alan dergi kısaltmaları ile uyumlu olarak kısaltılmalıdır. Altı ya da daha az yazar olduğunda tüm yazar isimleri listelenmelidir. Eğer 7 ya da daha fazla yazar varsa ilk 6 yazar yazıldıktan sonra "et al" kullanılmalıdır. Ana metinde kaynaklara atıf yapılırken parantez içinde Arapik numaralar kullanılmalıdır. Farklı yayın türleri için kaynak stilleri aşağıdaki örneklerde sunulmuştur:

Dergi makalesi: Blasco V, Colavolpe JC, Antonini F, Zieleskiewicz L, Nafati C, Albanèse J, et al. Long-term outcome in kidney recipients from donors treated with hydroxyethylstarch 130/0.4 and hydroxyethylstarch 200/0.6. *Br J Anaesth* 2015; 115: 797-8.

Kitap bölümü: Sherry S. Detection of thrombi. In: Strauss HE, Pitt B, James AE, editors. *Cardiovascular Medicine*. St Louis: Mosby; 1974.p.273-85.

Tek yazarlı kitap: Cohn PF. *Silent myocardial ischemia and infarction*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker; 1993.

Yazar olarak editör(ler): Norman IJ, Redfern SJ, editors. *Mental health care for elderly people*. New York: Churchill Livingstone; 1996.

Toplantıda sunulan yazı: Bengissson S, Sothemin BG. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun KC, Degoulet P, Piemme TE, Rienhoff O, editors. *MEDINFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics*; 1992 Sept 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North-Holland; 1992.p.1561-5.

Bilimsel veya teknik rapor: Smith P, Golladay K. Payment for durable medical equipment billed during skilled nursing facility stays. Final report. Dallas (TX) Dept. of Health and Human Services (US). Office of Evaluation and Inspections; 1994 Oct. Report No: HHSIGOE 169200860.

Tablo 1. Makale türleri için kısıtlamalar

Makale türü	Sözcük limiti	Özet sözcük limiti	Kaynak limiti	Tablo limiti	Resim limiti
Özgün Araştırma	3500	250 (Alt başlıklı)	30	6	7 ya da toplamda 15 resim
Derleme	5000	250	50	6	10 ya da toplamda 20 resim
Olgu Sunumu	1000	200	15	Tablo yok	10 ya da toplamda 20 resim
Editöre Mektup	500	Uygulanamaz	5	Tablo yok	Resim yok

EXPERIMED

Tez: Kaplan SI. Post-hospital home health care: the elderly access and utilization (dissertation). St. Louis (MO): Washington Univ. 1995.

Yayına kabul edilmiş ancak henüz basılmamış yazılar: Leshner AI. Molecular mechanisms of cocaine addiction. N Engl J Med In press 1997.

Erken Çevrimiçi Yayın: Aksu HU, Ertürk M, Gül M, Uslu N. Successful treatment of a patient with pulmonary embolism and biatrial thrombus. Anadolu Kardiyol Derg 2012 Dec 26. doi: 10.5152/akd.2013.062. [Epub ahead of print]

Elektronik formatta yayınlanan yazı: Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis (serial online) 1995 Jan-Mar (cited 1996 June 5): 1(1): (24 screens). Available from: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/cid.htm>.

REVİZYONLAR

Yazarlar makalelerinin revizyon dosyalarını gönderirken, ana metin üzerinde yaptıkları değişiklikleri işaretlemeli, ek olarak, hakemler tarafından öne sürülen önerilerle ilgili notlarını "Hakemlere Cevap" dosyasında göndermelidir. Hakemlere Cevap dosyasında her hake-min yorumunun ardından yazarın cevabı gelmeli ve değişikliklerin yapıldığı satır numaraları da ayrıca belirtilmelidir. Revize makaleler karar mektubunu takip eden 30 gün içerisinde dergiye gönderil-

melidir. Makalenin revize versiyonu belirtilen süre içerisinde yüklenmezse, revizyon seçeneği iptal olabilir. Yazarların revizyon için ek süreye ihtiyaç duymaları durumunda uzatma taleplerini ilk 30 gün sona ermeden dergiye iletmeleri gerekmektedir.

Yayına kabul edilen makaleler dil bilgisi, noktalama ve biçim açısından kontrol edilir. Yayın süreci tamamlanan makaleler, yayın planına dahil edildikleri sayıyla birlikte yayınlanmadan önce erken çevrimiçi formatında dergi web sitesinde yayına alınır. Kabul edilen makalelerin baskıya hazır PDF dosyaları sorumlu yazarlara iletilir ve yayın onaylarının 2 gün içerisinde dergiye iletilmesi istenir.

Editor in Chief: Prof. Erdem Tüzün

Address: Vakıf Gureba Avenue, Istanbul Medical Faculty Campus, 34093, Fatih, İstanbul, Turkey

Phone: 0212-4142000-33356

Fax: 0212-5324171

E-mail: erdemtuzun@istanbul.edu.tr

Publisher: AVES

Address: Büyükdere Cad. 105/9 34394 Mecidiyeköy, Şişli, İstanbul, Turkey

Phone: +90 212 217 17 00

Fax: +90 212 217 22 92

E-mail: info@avesyayincilik.com

avesyayincilik.com

EXPERIMED

CONTENTS

ORIGINAL ARTICLES

- 62** ER, SOCS1, p15, E-cadherin and RARB are more Likely to be Members of the Methylator Phenotype of Adult and Childhood AML and Their Methylation is Primarily Regulated by an Overexpression of DNMT 3A
Cumhur G. Ekmekçi, Uğur Özbek
- 71** The Effect of Endoplasmic Reticulum Stress Activator-Tunicamycin on HEK293 Cells
Muhammed Abdulvahid Kalkan, Burçak Vural, Evrim Kömürçü Bayrak
- 79** Thymidylate Synthase 2T Gene Polymorphism is a Risk Factor for Acute Leukemia
Cumhur G. Ekmekçi, Uğur Özbek
- 84** Effect of CXCR9-CXCR3 Cytokine Signaling Pathway in Polycythemia Vera
Cemil Altunay, Akif Selim Yavuz, Selçuk Sözer Tokdemir
- S1** X. Abstracts for Aziz Sancar IEM Days 2018

EXPERIMED

İÇİNDEKİLER

ORJİNAL ARAŞTIRMALAR

- 62** Erişkin ve Çocukluk Çağı AML Oluşumunda ER, SOCS1, p15, E-cadherin ve RARB Promoter Metilasyonu Metilatör Fenotip Üyesi Olmaya Aday Genlerdir ve Metilasyondan DNMT 3A Başlıca Sorumlu Enzim Olarak Ön Plana Çıkmaktadır
Cumhur G. Ekmekçi, Uğur Özbek
- 71** HEK293 Hücreleri Üzerine Endoplazmik Retikulum Stresi Uyarını Tunikamisin Etkisi
Muhammed Abdulvahid Kalkan, Burçak Vural, Evrim Kömürçü Bayrak
- 79** Timidilat Sentaz 2T Gen Polimorfizmi Akut Lösemi İçin Bir Risk Faktörüdür
Cumhur G. Ekmekçi, Uğur Özbek
- 84** Polisitemia Vera'da CXCL9-CXCR3 Sitokin Sinyal Yolağının Etkisi
Cemil Altunay, Akif Selim Yavuz, Selçuk Sözer Tokdemir
- S1** **X. Aziz Sancar Detae Günleri 2018**

ER, SOCS1, p15, E-cadherin and RARB are more Likely to be Members of the Methylator Phenotype of Adult and Childhood AML and Their Methylation is Primarily Regulated by an Overexpression of DNMT 3A

Erişkin ve Çocukluk Çağı AML Oluşumunda ER, SOCS1, p15, E-cadherin ve RARB Promoter Metilasyonu Metilatör Fenotip Üyesi Olmaya Aday genlerdir ve Metilasyondan DNMT 3A Başlıca Sorumlu Enzim Olarak Ön Plana Çıkmaktadır

Cumhur G. Ekmekçi¹ , Uğur Özbek²

¹Acıbadem Labgen Genetic Diagnosis Center, İstanbul, Turkey

²Department of Medical Genetics, Acıbadem University, İstanbul, Turkey

Cite this article as: Ekmekçi CG, Özbek U. ER, SOCS1, p15, E-cadherin and RARB are more Likely to be Members of the Methylator Phenotype of Adult and Childhood AML and Their Methylation is Primarily Regulated by an Overexpression of DNMT 3A. Experimed 2018; 8(3): 62-70.

ABSTRACT

Objectives: The hypermethylator phenotype is used as a term for both acute myeloid leukemia (AML) and other tumors. We analyzed the methylation statuses of ten genes (DAP-kinase, SOCS1, ER, p15, Ecadherin, RARβ, p16, GSTP1, HIC1 and p73) and correlated them with the expression of DNA methyltransferases (DNMTs).

Material and Method: We analyzed the methylation profiles using methylation specific PCR and COBRA and the expression of DNMTs (DNMT 1, 3A and 3B) by quantitative RT-PCR in 25 pediatric and 25 adult AML samples.

Results: The ER, SOCS1, p15, E cadherin, and RARB genes methylated together significantly in the same patients and members of the methylator phenotype.

Conclusion: Our study demonstrated that the gene DNMT3A was dramatically upregulated and significantly correlated with the methylator phenotype.

Keywords: Methylator phenotype, MSP, epigenetics, tumor-suppressor genes, acute myeloid leukemia, DNA methyltransferases

ÖZ

Amaç: Hipermetilatör fenotipi, hem akut miyeloid lösemi (AML) hem de diğer tümörler için bir terim olarak kullanılır. On genin metilasyon durumlarını analiz ettik (DAP-kinaz, SOCS1, ER, p15, Ecadherin, RARβ, p16, GSTP1, HIC1 ve p73) ve bunları DNA metil transferazların (DNMT'ler) ifadesiyle korele ettik.

Gereç ve Yöntem: 25 pediatrik ve 25 yetişkin AML örneğinde metilasyon spesifik PCR ve COBRA ve DNMT'lerin (DNMT 1, 3A ve 3B) ekspresyonunu kullanarak metilasyon profillerini analiz ettik.

Bulgular: ER, SOCS1, p15, E cadherin ve RARB genleri, aynı hastalarda ve metilasyon fenotipinin üyeleri arasında önemli ölçüde birlikte metillendi.

Sonuç: Çalışmamız, DNMT3A geninin dramatik bir şekilde yukarı regüle edildiğini ve metilasyon fenotipi ile anlamlı şekilde korele olduğunu gösterdi.

Anahtar Kelimeler: Metilatör fenotipi, MSP, epigenetik, tümör baskılayıcı genler, akut miyeloid lösemi, DNA metiltransferazlar

INTRODUCTION

The disruption of epigenetic regulation during malignant transformation can profoundly alter a cellular phenotype, resulting in aberrant cellular proliferation and survival (1). This major epigenetic modification targets methylation of cytosine (C) bases adjacent to guanin (G) within

the dinucleotide repeats of the CG's. This process is shared by both prokaryotic and eukaryotic cells (2) and is carried out by DNA methyltransferases (DNMTs) (3, 4). Methylated promoters CpG islands make the gene transcriptionally silenced. A change in the methylation profiles of certain genes is known to cause various diseases or developmental abnormalities (5-7). Global hypomethylation in human DNA

Corresponding Author/Sorumlu Yazar: Cumhur G. Ekmekçi **E-mail:** cgekmekci2@yahoo.com

Received Date/Geliş Tarihi: 22.10.2018 **Accepted Date/Kabul Tarihi:** 30.10.2018

© Copyright 2018 by The Istanbul University Faculty of Science • Available online at <http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/>

© Telif Hakkı 2018 İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi • Makale metnine http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_sayfasından ulaşılabilir.

appears to begin early and before the development of tumor formations. A changed equilibrium in cancer cell lines gives rise to hypermethylation of CpG islands - especially the loss of function of critical tumor suppressor genes. The main cause of global hypomethylation followed by hypermethylation of specific genes in tumors is not yet clear. Numerous genes have been shown hypermethylated in various subtypes of cancers (8-12). In various studies a correlation between tumor and hypermethylation has been demonstrated, such as p15 (INK4B) (13), SOCS1 (suppressor of cytokine signaling 1) (14), Dap kinase (15), ER (estrogen receptor) (16) and researchers have tried to prove a relation between hypermethylation of multiple genes and cancer (10, 12, 17). Some human cancers exhibit a hypermethylator phenotype, characterized by concurrent DNA methylation-dependent silencing of multiple genes. The hypermethylator phenotype has been shown in various human neoplasms, such as pancreatic (18), colorectal (19), and gastric cancers (8).

DNMTs have been categorized in three different families DNMT1, DNMT2, and DNMT3. These enzymes are encoded by different genes in mammals (6, 24-26). DNMT3a and DNMT3b are classified as de novo methyltransferases and have been shown to have overlapping functions with DNMT1 (24, 27, 28). While it has been demonstrated that an increased DNA methylation capacity accompanies an increase in DNMT transcripts observed during progressive stages of colon cancer (29), another study reported an opposite result for the same diseases (30). In hematologic malignancies, an overexpression of DNMT1 was shown in 12 leukemia samples including AML, ALL and MDS (31).

In this study, we expanded our previous study population to get improved results to help understand the epigenetic rearrangement in AML tumorigenesis. We analyzed the methylation of tumor suppressor genes previously confirmed to be methylated in AML, including DAP-Kinase, SOCS1, ER, p15 (10, 32-34) and E-Cadherin (10) RAR β (Retinoic acid receptor beta) (32), p73 (35). Our AML patients have a distinct geographical and ethnic background. We also wanted to revisit the pattern of methylation of 3 genes, including p16 (INK4A), GSTP1 (glutathion S transferase P1) and HIC1 (hypermethylated in cancer1), that are rarely methylated in AML (10, 36). After obtaining the methylation profiling of multiple genes then we address the expression level of DNA methyltransferases' importance in the aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes.

MATERIAL AND METHOD

Patients

Fifty DNA samples were obtained from the 25 pediatric and 25 adult AML patients participating in our study. The median age of the pediatric patients was 9 years (ranging from 1.2 to 17) and the median age of the adult patients was 34 years (ranging from 20 to 74). Thirty one patients were males and 19 were females. The diagnosis of AML was made based upon standard clinical and laboratory criteria, including histocytomorpholog-

ic appearance and immunophenotypes. Morphologic subtyping was determined according to FAB classification. The study was approved by the appropriate IRB.

Sodium Bisulfite Treatment of DNA

Genomic DNA was extracted from mononuclear cells using the Puregene DNA isolation kit (Gentra, Minneapolis, MN) and treated with sodium bisulfite as previously described (16). In brief, 5 μ g of DNA were denatured at 42°C for 30 min with 0.4M NaOH, incubated in 10mM hydroquinone, 3M sodium bisulfite (Sigma, St Louis, MO) at 55°C for 16 hours and purified with the GeneClean III kit (Bio 101, Vista, CA). Prior to ethanol precipitation, the DNA was desulfonated in 0.4M NaOH for 15 min at 37°C. The DNA was resuspended in water and stored at -80°C.

Methylation-Specific PCR (MSP) and Restriction Digestion

The bisulfite-treated DNA was used in methylation-specific PCR (MSP) reactions for 9 genes using primers - specific for the methylated and unmethylated forms (31). The amplification reactions contained 25 pmoles of each primer, 200 μ M dNTP, 1U Hotstart Taq polymerase and 1x Q buffer (Qiagen, Valencia, CA) with variable amounts of MgCl₂ and cycling conditions. The methylation of ER was assessed by COBRA as previously described (33). The bisulfite-treated DNA was first amplified with specific primers and the products were subsequently digested with HinfI and run in a 4% agarose gel. PCR products were also cloned and sequenced to correlate methylation at the HinfI site of ER with 9 other neighboring CpG sites. The MSP primers and PCR conditions were the same as in the previous report (31).

RNA Isolation

Total RNA isolation was performed using the RNeasy total RNA purification kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's recommendations. For this purpose, WBC was separated from the bone marrow or a peripheral blood sample of patients. For isolation, the RNA of lysed cells was absorbed in a silica-gel based membrane, DNase treated, and washed and eluted with 30 μ L RNase-free water by centrifugation.

cDNA Synthesis

cDNA synthesis was performed from isolated total RNA by M-MuLV reverse transcriptase (RevertAid M-MuLV reverse transcriptase, Fermentas). The reverse transcription was done as follows: 5 μ g of template total RNA from each sample was annealed with 0.2 μ g random hexamer at 70°C for 5 min and kept in ice. Extension reactions contained 5mM MgCL₂, 50mM KCL, 10mMTris-HCL, 1.0mM final concentration of dNTP mix, 20 unit of RNase inhibitors, 200 units of reverse transcriptase and template mixture. The extension reaction was performed as follows: 60 min at 42°C and the reaction was then stopped by heating at 99°C for 5 minutes.

Quantification of mRNA

For quantification, we used real-time quantitative PCR (Light-Cycler, Roche Diagnostics GmbH, Germany). PCR reactions were performed using Fast Start DNA Syber Green I mix (Roche, Mannheim, Germany), 10 pmol of each forward and reverse primer and 2 μ L cDNA of each sample. For each sample the

Table 1. Primers used for expression analyses

Gene	Name	Primer Sequence
DNMT1	DNMT1-F	5'GCG GAG CCA ACG GAT GAA GC-3'
	DNMT1-R	5'CAC CAG CAT CAG GCC CAG GC-3'
DNMT3A	DNMT3A-F	5'CAG CTT CCA CGT TGC CTT CT-3' 5'-
	DNMT3A-R	CAT CTG CAA GCT GTC TCC CTT T-3'
DNMT3B	DNMT3B-F	5'CCA ACA ACA CGC AAC CAG AG-3'
	DNMT3B-R	5'GCC ACA AGA CAA ACA GCC ATC-3'
Beta-2-microglobulin	B2M-F	5'-TGCCGTGTGAACCATGTGAC-3'
	B2M-R	5'ACCTCCATGATGCTGCTTACA-3'

Table 2. The methylation frequency of genes in pediatric, adult and total AML patients

	P15	SOCS-1	E-CAD	RARB	P16	5-HIC	GSTP-1	DAP-KIN	ER	P73
Pediatric	0.32	0.36	0.08	0.04	0	0	0	0.56	0.42	0.17
Adult	0.36	0.32	0.2	0.2	0	0	0	0.56	0.28	0.18
Total	0.34	0.34	0.14	0.12	0	0	0	0.56	0.35	0.18

amount and the quality of RNA was normalized with the Beta-2 microglobulin gene. The PCR conditions were 60 seconds at 95°C (1 cycle) for denaturation, followed by 45 cycles of 10 seconds at 95°C, 5 seconds at 55°C and 20 seconds at 72°C. After amplification for melting curve analyses 1 cycle of 0 second at 95°C, 10 seconds at 65°C and 0 seconds at 95°C. For preparation of standards we used a serial dilution of DNA and each dilution was used twice. Light Cycler PCR products were also analyzed on agarose gel in order to determine PCR quality. Primers used for expression analyses are shown in Table 1. Beta -2-Microglobulin (B2M) was used as a reference housekeeping gene.

We used peripheral CD34+ hematopoietic stem cell from 5 healthy donor as a control for expression analysis.

Statistical Analysis

All tests were done using SPSS Version 17.0 (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA) and p<0.05 was considered statistically significant with only 2-sided results of the tests. To test if the methylation of one loci was cooperating with the other loci, methylation statuses were analyzed using the Fisher Ki-square test or Pearson test results. We analyzed for a correlation between the methylation of those ten genes, comparing the methylation status of each gene (M or U) with the Wilcoxon rank sum test. The results of the expression analyses were tested by the nonparametric Mann-Whitney U Test. Correlation bivariate analysis was used to compare the expression level of DNMTs and the methylation index.

RESULTS

We analyzed the methylation status of 10 genes in 25 adult AMLs (20-74 years old, median age 34) and in 25 pediatric AMLs

(1.2-17 years old, median age 9). DNA was sufficient to complete analyses of 9 genes and 40/50 samples were analyzed for p73.

Methylation specific PCR (MSP) was used to determine methylation of p15, p16, E-cadherin, RARβ, SOCS1, GSTP1, p73, DAP-Kinase and HIC1. MSP reactions for each gene were first standardized using in-vitro methylated DNA (IVM), which yielded a positive product with primers for the methylated form (32). Under our experimental MSP conditions a consistent absence of an amplification signal for the methylated form was observed in 20 different DNA samples obtained from peripheral blood mononuclear cells from healthy individuals. This indicated that methylation was tumor specific.

Due to the heterogeneity described in the methylation pattern of the estrogen receptor gene (ER), we used a COBRA approach to determine the status of the ER gene (34). This data was further confirmed by bisulfite-sequencing. Several PCR products that were cloned and sequenced confirmed that not only the CpG site at the Hinfl site was methylated but also 9 other CpG sites were included in the amplification fragment.

The frequency of methylation of each gene notably varied. The frequency of methylation for the pediatric and adult group is shown in Table 2.

The percentage of methylation in the pediatric group of patients was 32% for p15, 36% for SOCS1, 8% for E-cadherin, 4% for RARβ, 56% for DAP-Kinase, 42% for ER, 17% for p73 and in the adult group, 36% for p15, 32% for SOCS1, 20% for E-cadherin, 56% for DAP-Kinase, 28% for ER, and RARβ and 18% for p73.

Three other genes, p16, GSTP1 and HIC1 were unmethylated in all samples (Table 2).

We analyzed the correlation between the pattern and extent of methylation in AML and clinicopathological features, including age and the FAB subclass. We compared the frequency of methylation in each gene between the pediatric group (n=25) and the adult group (n=25), we observed that some genes were varied. While RARβ was more common in adults than in children (20% and 4%, respectively), ER was more common in children than in adults (42% and 28%, respectively). Similarly, the methylation of E-cadherin was more frequent in adults (20%) than in children (8%). Our data clearly shows that AML in pediatric and in young adults tends to have a greater number of methylated genes than in children or older patients.

To quantify the extent of methylation in our series of AML, we calculated a methylation index (MI=ratio between the number

of genes methylated and the number of genes analyzed) for the 7 genes that demonstrated some degree of methylation (Figure 1). The MI for the pediatric group ranged from 0-0.714, with an average of 0.284 corresponding to 1.99 genes/sample and for the adult group this ranged from 0-0.856, with an average of 0.305 corresponding to 2.13 genes/sample. Among all the samples 50% of AMLs (25/50) showed methylation of at least two genes and four or more tumor suppressor genes methylated in 20% of AMLs (4 or more gene methylation frequency was in 6 samples corresponding to 24% in the pediatric group and 4 samples corresponding to 16% in the adult samples). The distribution of methylation index in patients of different ages was shown in Figure 2. There was no statistical difference for the distribution of MI between the pediatric and the adult group (p=0.38).

We analyzed the coexistence of interrelationship between two different loci methylation status to understand whether methylation of one locus is affected by the methylation status of another locus. We performed this for the pediatric and adult groups and also for the total number of patients by the two-sided Pearson X² or Fisher's exact test. We identified a statistical association between ER and E cad (p=0.005), SOCS1 and p15 (p=0.015), SOCS1 and E cad (p=0.037), ER and p15 (p=0.009), E

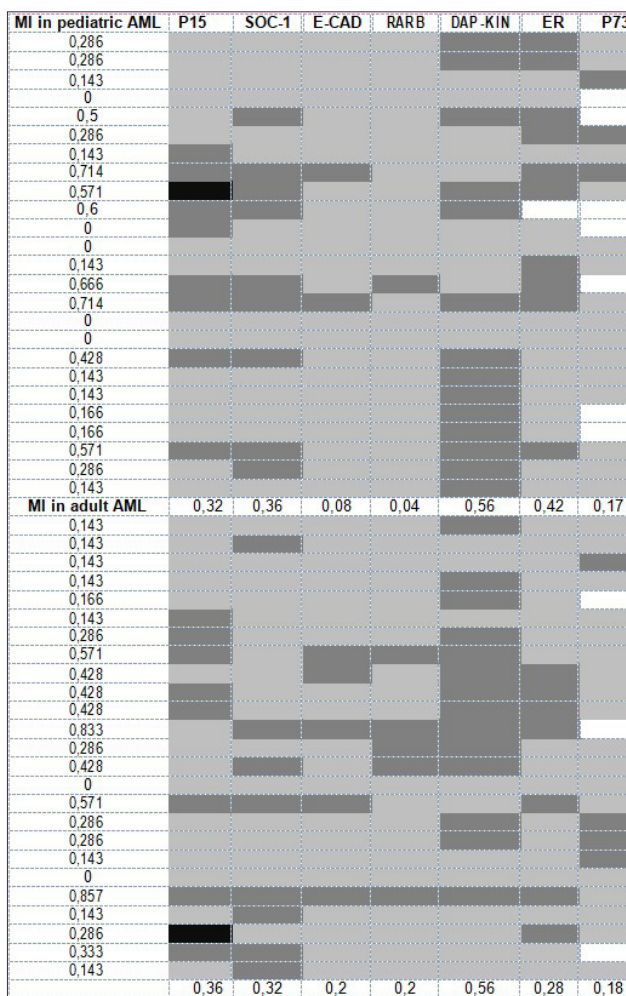


Figure 1. Methylation index (MI) and methylation pattern of genes in pediatric and adult AML patients. Filled grey boxes indicate methylation; hatched boxes indicate unmethylated gene; filled black boxes indicate full methylation and white boxes indicate no data available

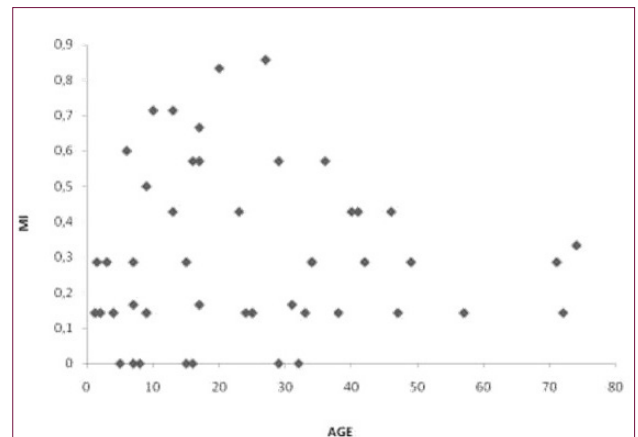


Figure 2. Distribution of methylation index (MI) according to age (years)

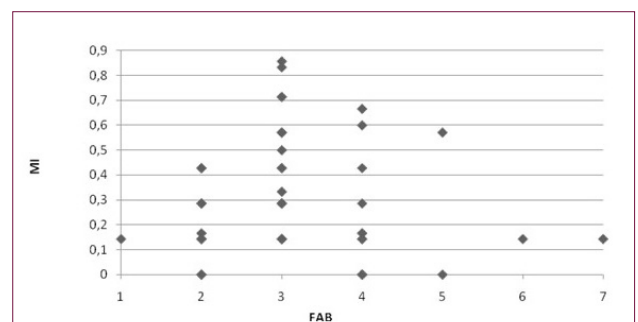


Figure 3. Distribution of methylation index (MI) according to FAB groups

cad and RARB ($p=0.029$), E cad and p15 ($p=0.037$) but did not identify any association between ER and SOCS1 ($P=0.053$). In the pediatric group there was a statistical association between SOCS1 and p15 ($p=0.001$), ER and SOCS1 ($p=0.032$), ER and E cad ($p=0.032$), SOCS1 and E cad ($p=0.049$), Dap-Kin and p73 ($p=0.034$). For only the adult group, we identified an association between p15 and ER ($p=0.021$), E cad and RARB ($p=0.038$), ER and E cad ($p=0.012$), RARB and Dap-kin ($p=0.027$).

We also analyzed the correlation between the methylation of those ten genes, comparing each gene's methylation status (M or U) with the Wilcoxon rank sum test. We calculated the MI for the rest of the loci and we obtained significant results for P15 ($p=0.002$), E cadherin ($p=0.0001$), RAR Beta ($p=0.011$), ER ($p=0.0001$) but no significance was found for DAP kinase ($p=0.106$) and p73 ($p=0.240$).

It is clear that concurrent methylation is also prevalent in pediatric AML and that the subset of genes affected is similar in both age groups, although the frequencies may differ and the number of samples unmethylated in the 10 loci is higher in the pediatric group ($n=5$ and $n=2$ for adult). The extent of methylation also appears to be slightly higher in adults (median $MI=0.305$) than in children (median $MI=0.284$).

Table 3. a, b. The methylation index in pediatric, adult and total AML FAB groups. The median value of methylation index (a); the average methylation index (b)

a	FAB M2	FAB M3	FAB M4
Pediatric	0	0.29	0.23
Adult	0.29	0.43	0.14
Total	0.17	0.33	0.17

b	FAB M2	FAB M3	FAB M4
Pediatric	0.06	0.38	0.29
Adult	0.29	0.43	0.1
Total	0.2	0.41	0.24

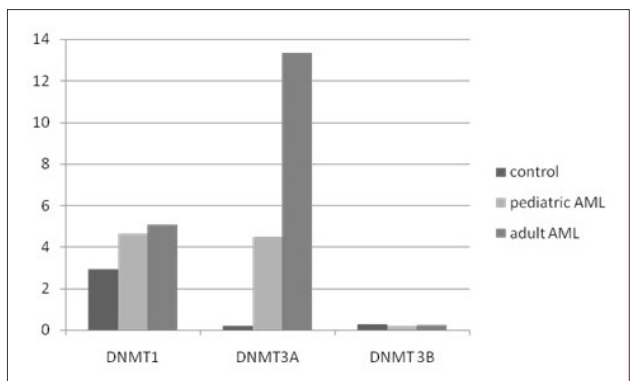


Figure 4. Distribution of methylation index (MI) according to FAB groups

The methylation of RAR β in 18% of cases was almost always accompanied by a significant methylation at other loci. Indeed, the average MI of AML samples with RAR β methylation was 0.67. A similar correlation was found for E-cadherin (the average MI for samples with E-cadherin methylation was 0.65), but not for p73. However, p73 was methylated in only 2/20 samples.

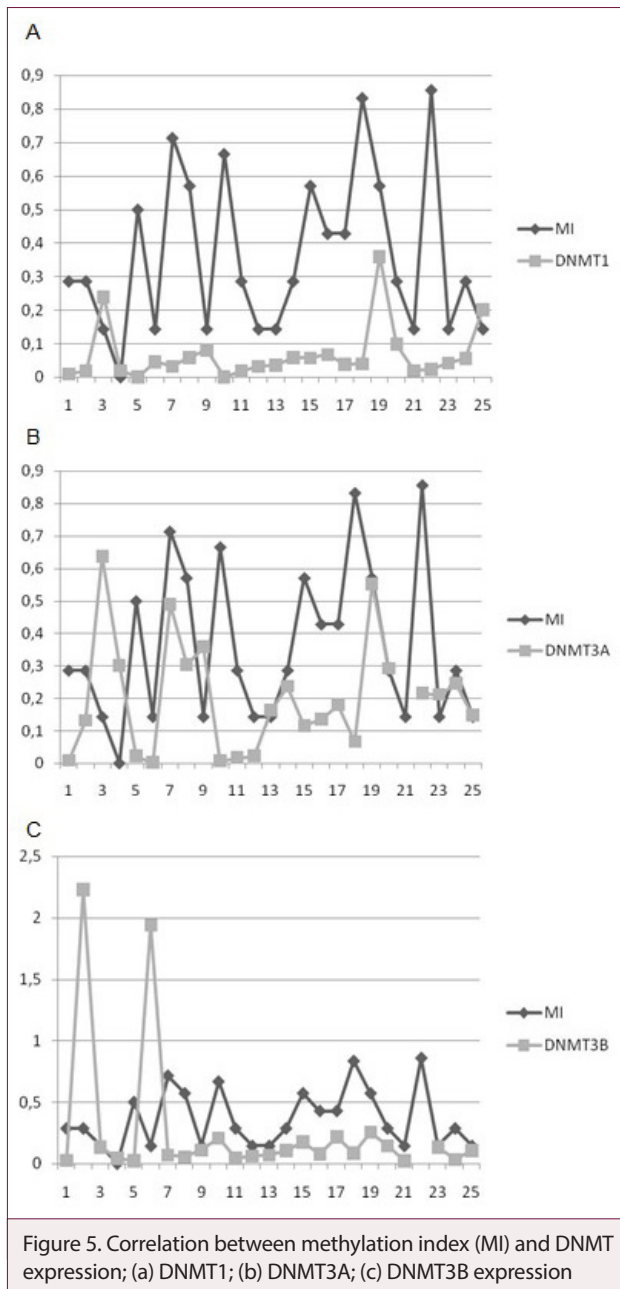
Among AMLs that carried a methylation of DAP-Kinase, methylation of p15 or SOCS1 were equally distributed. However, the methylation of ER occurred more frequently in association with DAP-Kinase. Only a very small proportion of AMLs (1/28, 3%) were unmethylated for these 4 loci (DAP-Kinase, p15, SOCS1 and ER). Since p15 and ER methylation have been recently described to be of prognostic significance, we assessed the fraction of AMLs that carry methylation in these clinically relevant markers. A large fraction of our series (18/28, 64%) had methylation of ER and/or p15.

We also analyzed any possible relation within FAB and MI. The distribution of the methylation index of each sample in the different FAB groups are shown in Figure 3. With respect to FAB classification, there was a general tendency of higher methylation in M3 ($n=21$, median $MI=0.33$, average $MI=0.405$). Table 3. shows the number of affected samples in M2, M3, and M4 with their median and average MI. Unlike the M3 samples, in M2 patients there was a tendency to have less methylation, especially in the pediatric group-unmethylated in 10 loci were 5 samples and 3 of them were M2, 2 of them were M4 patients.

Expression analyses of DNA methyltransferases were carried out on the samples of available cDNA of 12 pediatric (1.2-17 years old, median age 8) and 13 adult (20-72 years old, median age 41) AML samples. Most of the patients were in the FAB3 subclass (pediatric 8, adult 9). Only in one adult patient could the DNMT3A not be analyzed.

We used CD34+ peripheral hematopoietic stem cells from 5 healthy donors and performed the same analyses in order to get a comparison of expression level of DNMT's. In the pediatric vs. control groups, the only significance was in the expression level of DNMT3 ($p=0.006$ for DNMT3A, and $p=0.833$ for DNMT 1; $p=0.916$ for DNMT 3B) but in adult group in addition to DNMT3A ($p=0.003$), there was an increase in the expression of DNMT1 ($p=0.027$), but not in the expression of DNMT 3B ($p=0.171$) (Figure 4). When we compared the total number of patients with the control group, we only observed a difference for DNMT3A ($p=0.002$) but not for DNMT1 ($p=0.254$); DNMT 3B ($p=0.419$). When we compared adult and pediatric groups, the only difference was observed in DNMT1 expression ($p=0.044$, and for DNMT 3A, $p=0.253$, DNMT 3B, $p=0.419$).

When we performed correlation analyses between MI and expression level of DNMT's we observed the relation of DNMT3A and MI ($p=0.045$). But we did not find any correlation between MI and DNMT1 or DNMT3B expression (DNMT1 $p=0.981$, DNMT 3B $p=0.152$). Figure 5. shows the relation DNMT 1, DNMT3A and DNMT3B with MI.



DISCUSSION

We performed methylation analysis at ten different loci and conducted expression analysis of DNMTs (DNMT1, 3A, 3B) in AML patients (25 pediatric and 25 adult). Ten candidate genes that had had epigenetic modification mostly in lymphoid and myeloid malignancies were chosen for methylation analysis. These included p15, p16, p73, ER, SOCS1, E-cadherin, RAR beta, 5-HIC, DAP kinase, GSTP1. Except for the ER gene, all hypermethylation of the 5' regions had been assayed by methylation-specific PCR while we performed COBRA for only ER. In this group of patients, 25 of the samples had cDNA available to analyze the expression level of DNMTs (DNMT1, 3A, and 3B). As

a result, we analyzed methylation and expression of DNMTs in the same sample to research the correlation and affect of DNMTs on methylation patterns in the AML sample group.

Indeed, some AML samples exhibited no aberrant methylation (5 were pediatric, corresponding to 20% and 2 were from the adult group corresponding to 8%-14% in total) we observed that 86% of the samples showed methylation in at least one locus and 23% of the pediatric and 16% of adult samples were methylated in 4 or more loci. Among these ten genes, there was no clear difference between the adult and pediatric form of AML.

P16 is one of the cell's cycle regulatory genes and is considered as a tumor suppressor gene. Similar to p15, rarely has it been found methylated in leukemia (37), but the methylation of p16 has been associated with disease progression in adult T cell leukemia (38). Merki *et al.* (10) indicated that hypermethylation was found to be limited to p15 and did not extend to p16 in AML patients (p15 methylation 68%, p16 methylation 30%). Our results also confirmed that p15 methylation occurred more frequently than p16 methylation in AML. Nevertheless in our study, the methylation ratio was lower than previously reported and we found that 31% of the samples had been methylated in the p15 gene and no methylation in the p16 promoter. Even when we increased the number of samples that we analyzed we could not identify methylation in the p16 genetic region. These results were unlike previous reports (10, 12, 39, 40).

Hypermethylation of the HIC1 has been associated with poor prognosis and disease progression in AML (36, 41, 42). It has been reported that 10% of AML patients were methylated in HIC1 (10). Hypermethylation was observed in 83% of AML patients but these studies included methylation analysis of the intron 2 and exon 3 regions of the gene and intron 2 seem to be more likely related with leukemia in previous reports. In contrast we analyzed the methylation of the 5 prime (5 HIC) gene and we observed no methylation in our patient group.

Methylation of GSTP1 rarely presented itself in hematopoietic cancer but Merki *et al.* (10) found no methylation in 12 samples among adult forms of AML. In our larger series there was no methylation in GSTP1 (neither the adult nor pediatric sample groups).

E cadherin methylation has been found in hematopoietic malignancies, as well as in some solid tumors like prostate and breast cancer (10, 17, 18, 29, 30). Gutierrez *et al.* published that E cadherin methylation was very common in pediatric ALL (17). Merki *et al.* (10) showed extensive methylation of E cadherin in 9 out of 13 sample AML cases. The E cadherin gene methylation pattern was heterogeneous and the degree of methylation was high in the 3' region of the gene. We found only 14% of E cadherin genes were methylated in the total number of patients and this percentage is very low compared with Merki's AML data and Gutierrez's ALL data.

Dap-Kinase had been shown necessary for programmed cell death in the presence of γ interferon (11, 12) and its concor-

dant hypermethylation protects cell from γ interferon induced apoptosis. It has been shown that a loss of expression of Dap-Kinase in lung cancer cells increases the metastatic potential of a tumor. The epigenetic modification of Dap-Kinase has been offered as a marker for B cell malignancies. Dap-kinase methylation was also found related to myelodysplastic syndrome and therapy related AML (15, 45). In our study, we observed the most frequent methylation in DAP Kinase without any difference in the pediatric and adult forms of diseases (56%, 56% respectively). Although we observed DAP Kinase most frequently methylated loci among 10 loci in AML we could not demonstrate any relation with the clinical outcome and any correlation with methylation statuses of other loci.

One of the seven suppressors of the cytokine signaling (SOCS1-7) gene is SOCS1, which has a tumor-suppressor activity. Methylation of this gene has been found very frequent in HCC (hepatocellular carcinoma) (65%). For newly diagnosed AML patients, methylation analysis of the SOCS1 gene was done in a large series (n=89) by Chen *et al* (14). They had observed methylation of this gene in 60% of the patients. SOCS1 methylation seems to be more frequent in the presence of t(15;17) translocation comparing with the t(8;21) (76% vs 11%). In our study we observed the methylation of SOCS1 in 34% of all the samples.

ER methylation (ERM) had been found significantly heterogeneous among the FAB categories by Li *et al*. (44). A decrease in ER methylation with an increase in ageing and a lower ERM had been observed in M4, M5 in a large series of AMLs (44). Similarly Toyato *et al*. (12) studied 14 different loci methylations for 35 adult AMLs and it was found that ERM positively correlated with methylation of all the remaining 13 loci and methylation of ER indicated a positive association with the age of the patient. In contrast to these results ER hypermethylation has been associated with better prognosis in AML (44). Southern blot analysis has shown ER gene methylation in acute and chronic leukemia at around 50-90% (13-21). Interestingly Merki *et al*. (10) found that hypermethylation for each CpG in the ER was smaller than the 50% which was most probably the methylation of only one allele in a small series of patient samples. They also pointed out that a higher ERM had been observed with males and an inverse correlation of a decreasing ERM was present within the increase count of WBC and platelet.

Epigenetic studies revealed that methylation of CpG islands are increased with age. An acceleration in the methylation profiles with ageing is one of the proposals for epigenetic studies. Similar results have been found previously that, in normal appearing colonic epithelium (19, 29, 30) and other tissue ageing, was associated with an increase in ER methylation. We found the methylation of ER was more frequent in the pediatric group (42%) than the adult AML (28%). Our study indicated that there was a tendency to be more frequently methylated in a pediatric group than in an adult group and this was just the opposite of the previous proposal. Also in overall epigenetic modification we could not observe any age dependency. In our patient

group there was no statistical significance between age and MI. There was no significant difference when compared with the adult and pediatric MI results. In our sample group, among the 10 loci for only RARB methylation there was a tendency towards a higher methylation in the adult AML than in pediatric AML. However this was not statistically significant (p=0.189).

According to our observation ER, SOCS1, p15, E cadherin, RARB promoter and methylation are most likely correlated with each other for individual patient samples. These 5 genes were susceptible to methylation in the same patient samples and did not show methylation in others. These genes are more likely to be members of the methylator phenotype for AML. We could not find any correlation between methylation, age and sex in our AML samples.

As multiple genes are frequently methylated in cancer cell lines, this suggests that there is a mechanism which protects these genes from methylation and this mechanism is defective or somehow broken in cancer cells. We also analyzed the expression level of DNA methyltransferases (DNMT1, DNMT3A and DNMT3B) which could be primarily responsible for aberrant methylation in the same AML samples. Our results showed that DNMT3A over-expressed in AML patients and there was a relation between MI and DNMT3A.

Roberson *et al*. (45) showed that in the tumors of different tissues, the expression of DNMT1, 3A, 3B genes and DNMT3B expression in all tumors is markedly increased. However DNMT1 and 3A have increased moderately. Colon, bladder, kidney and pancreas samples were studied and it was observed that while DNMT3B was significantly over-expressed, the expression level of DNMT1 and 3A was modest (4). Langer *et al*. (46) found that DNMT1 and DNMT3A over-expressed in RA and RAEB subtypes in a large series (n=80) of MDS samples. Additionally in RARS subtypes the only differences in DNMT3A were observed with the control group. They used the cyclin D2 gene for normalization and they also observed similar results when the normalization was performed with PCNA (46). Aoki *et al*. (47) observed an over-expression of DNMT1 when normalized with GAPDH but no up-regulation when normalized with histone H4. Mizuno *et al*. (48) observed an increase in the expression of all 3 types of DNMTs when normalized with GAPDH in their 33 AML samples by competitive PCR (5.3-4.4-11.7 fold mean increase in DNMT1, 3A, 3B respectively). Xie *et al*. (49) also reported an increased expression of all 3 DNMTs in several tumor cell lines. Mizuno *et al*. (48) investigated whether the expression levels of DNMTs correlated with aberrant hypermethylation of the p15 INAK4B tumor suppressor gene in AML cases. They showed that the AML patients with methylated p15 INAK4B expressed a higher level of DNMT1, 3B and potentially 3A using competitive PCR assay (48). They suggested that the over-expressed DNMTs played a role in the aberrant regional hypermethylation observed in AML. In our study we observed that the expression level of DNMT3A correlated with aberrant hypermethylation. An over-expression of DNMT3A was also correlated with MI. We could not observe any correlation between the expression level

of DNMT3B and aberrant hypermethylation using quantitative RT-PCR. It was shown that an increased expression of DNMT3B was associated with worse clinical outcomes and a greater genome-wide methylation burden in pediatric AML (49).

A microarray based study to identify subclasses of adult AML by Bullinger *et al.* (51) identified 2 subclasses and in the first subclass a high level of DNMT3A and 3B expression was indicated with GATA2 transcription factor. With this result they emphasized the potential role of aberrant methylation via high expression of DNMTs (51).

Methylation in 5 of the 10 genes examined correlated with each other (ie, five patients had methylation in one patient while another patient did not methylate in these five genes). As such, these genes are candidate genes for the AML methylator phenotype. The expression of DNMT3A was significantly higher where methylation was observed in these 5 than the rest of the samples in Figure 5.

In several expression studies of DNMTs, it was pointed out that over-expression of DNMTs was observed when the level of mRNA normalization was performed with the housekeeping gene. If the procedure repeated with the proliferation marker PCNA gene then these differences disappeared. Mizuno *et al.* (48) showed that the over-expression was cancelled in 3 leukemia cell lines, while in AML samples DNMTs expression level was found increased in AML and leukemia. However none of these studies demonstrated any clear correlation between DNMTs expression and the number of genes methylated. In addition, a two to ten fold increase of expression in this gene was not found related to age or sex of patients (13).

Correlations between the methylation statuses of ER and E cad, SOCS1 and p15, SOCS1 and E cad, ER and p15, E cad and RARB, E cad and p15 were statistically significant. These may indicate that if there is a methylator phenotype for AML, these 5 genes are the most powerful candidates. However, it is not sufficient to emphasize that there is only one methylator phenotype for one cancer type. There could be multiple methylator phenotypes which build up different types of genes in one tumor type.

This data clearly demonstrated that DNMT3A over-expressed in AML patients when compared with the control group. Our results suggest that DNMT3A over-expression is the most important factor for aberrant methylation according to the correlation with MI and DNMT3A.

Ethics Committee Approval: The authors declared that the research was conducted according to the principles of the World Medical Association Declaration of Helsinki "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects", (amended in October 2013).

Informed Consent: Written informed consent was obtained from the patients who participated in this study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - C.G.E., U.Ö.; Supervision - C.G.E., U.Ö.; Resource - C.G.E., U.Ö.; Materials - C.G.E., U.Ö.; Data Collection and/or Processing - C.G.E., U.Ö.; Analysis and/or Interpretation - C.G.E., U.Ö.; Literature Search - C.G.E.; Writing - C.G.E.; Critical Reviews - U.Ö.

Conflict of Interest: The authors have no conflict of interest to declare.

Financial Disclosure: This study was supported by the Research Fund of Istanbul University.

Etik Komite Onayı: Yazarlar çalışmanın World Medical Association Declaration of Helsinki "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects", (amended in October 2013) prensiplerine uygun olarak yapıldığını beyan etmişlerdir.

Hasta Onamı: Yazılı hasta onamı bu çalışmaya katılan hastalardan alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - C.G.E., U.Ö.; Tasarım - C.G.E., U.Ö.; Denetleme - C.G.E., U.Ö.; Kaynaklar - C.G.E., U.Ö.; Gereçler - C.G.E., U.Ö.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - C.G.E., U.Ö.; Analiz ve/veya Yorum - C.G.E., U.Ö.; Literatür Taraması - C.G.E.; Yazan - C.G.E.; Eleştirel İnceleme - U.Ö.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

REFERENCES

1. Figueroe ME, Reimers M, Thompson RF, et al. An integrative genomic and epigenomic approach for the study of transcriptional regulation. *PLoS ONE* 2008; 3: e1882. [\[CrossRef\]](#)
2. Noyer-Weidner M, Trautner TA. Methylation of DNA in Prokaryotes. *EXS* 1993; 64: 39-108. [\[CrossRef\]](#)
3. Robertson KD. DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene* 200; 20: 3139-55. [\[CrossRef\]](#)
4. Gowher, Albert Jeltsch. Mammalian DNA methyltransferases: new discoveries and open questions. *Humaira Biochemical Society Transactions* 2018, 46: 1191-202. [\[CrossRef\]](#)
5. Bird AP, Wolffe AP. Methylation-induced repression: belts, braces, and chromatin. *Cell* 1999; 99: 451-4. [\[CrossRef\]](#)
6. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2395-402. [\[CrossRef\]](#)
7. Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. *Nat Reviews Genetics* 2000; 1: 11-19. [\[CrossRef\]](#)
8. Toyota M, Ahuja N, Suzuki H, et al. Aberrant Methylation in Gastric Cancer Associated with the CpG Island Methylator Phenotype. *Cancer Res* 1999; 59: 5438-42.
9. Yamashita K, Dai T, Dai Y, et al. Genetics supersedes epigenetics in colon cancer phenotype. *Cancer Cell* 2003; 4: 121-31. [\[CrossRef\]](#)
10. Melki JR, Vincent PC, Clark SJ. Concurrent DNA Hypermethylation of Multiple Genes in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Res* 1999; 59: 3730.
11. Rush LJ, Dai Z, Smiraglia DJ, et al. Novel methylation targets in de novo acute myeloid leukemia with prevalence of chromosome 11 loci. *Blood* 2001; 97: 3226-33. [\[CrossRef\]](#)
12. Toyota M, Kopecky KJ, Toyota MO, et al. Methylation profiling in acute myeloid leukemia. *Blood* 2001; 97: 2823-9. [\[CrossRef\]](#)

13. Quesnel B, Guillem G, Vereecque R, et al. Methylation of the p15INK4b Gene in Myelodysplastic Syndromes Is Frequent and Acquired During Disease Progression. *Blood* 1998; 91: 2985-90.
14. Chen CY, Tsay W, Tang JL, et al. SOCS1 methylation in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 37: 300-5. [\[CrossRef\]](#)
15. Voso MT, Scardocci A, Guidi F, et al. Aberrant methylation of DAP-kinase in therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2004; 103: 698-700. [\[CrossRef\]](#)
16. Li Q, Kopecky KJ, Mohan A, et al. Estrogen Receptor Methylation Is Associated with Improved Survival in Adult Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1077.
17. Gutierrez MI, Siraj AK, Bhargava M, et al. Concurrent methylation of multiple genes in childhood ALL: Correlation with phenotype and molecular subgroup. *Leukemia* 2003; 17: 1845-50. [\[CrossRef\]](#)
18. Ueki T, Toyota M, Sohn T, et al. Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 2000; 60: 1835-9.
19. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, et al. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 8681-6. [\[CrossRef\]](#)
20. Carroll WL, Bhojwani D, Min DJ, et al. Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology* 2003; 102-25. [\[CrossRef\]](#)
21. Sather HN. Age at diagnosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 1986; 14: 166-72. [\[CrossRef\]](#)
22. Crist W, Boyett J, Pullen J, et al. Clinical and biologic features predict poor prognosis in acute lymphoid leukemias in children and adolescents: a Pediatric Oncology Group review. *Med Pediatr Oncol* 1986; 14: 135-9. [\[CrossRef\]](#)
23. Smith M, Bleyer A, Crist W et al. Uniform criteria for childhood acute lymphoid leukemia risk classification. *J Clin Oncol* 1996; 14: 680-1. [\[CrossRef\]](#)
24. Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nature Genet* 1998; 19: 219-20. [\[CrossRef\]](#)
25. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999; 99: 247-57. [\[CrossRef\]](#)
26. Hata K, Okano M, Lei H, Li E. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* 2002; 129: 1983-93.
27. Rhee I, Jair KW, Yen RW, et al. CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. *Nature* 2000; 404: 1003-7. [\[CrossRef\]](#)
28. Liang G, Chan MF, Tomigahara Y, et al. Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 480-91. [\[CrossRef\]](#)
29. Issa JP, Vertino PM, Wu J, et al. Increased cytosine DNA-methyltransferase activity during colon cancer progression. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 1235-40. [\[CrossRef\]](#)
30. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, et al. CpG island hypermethylation in human colorectal tumors is not associated with DNA methyltransferase overexpression. *Cancer Res* 1999; 59: 2302-6.
31. Melki JR, Warnecke P, Vincent PC, et al. Increased DNA methyltransferase expression in leukaemia. *Leukemia* 1998; 12: 311-6. [\[CrossRef\]](#)
32. Ekmekci CG, Gutierrez MI, Siraj AK, et al. Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol* 2004; 77: 233-40. [\[CrossRef\]](#)
33. Marcus J, Garin MT, Bies J, et al. Methylation-independent silencing of the tumor suppressor INK4b (p15) by CBFbeta-SMMHC in acute myelogenous leukemia with inv(16). *Cancer Res* 2007; 67: 992-1000. [\[CrossRef\]](#)
34. Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 2532-4. [\[CrossRef\]](#)
35. Stirewalt DL, Clurman B, Appelbaum FR, et al. p73 mutations and expression in adult de novo acute myelogenous leukemia. *Leukemia* 1999; 13: 985-90. [\[CrossRef\]](#)
36. Aggerholm A, Holm MS, Guldborg P, et al. Promoter hypermethylation of p15INK4B, HIC1, CDH1, and ER is frequent in myelodysplastic syndrome and predicts poor prognosis in early-stage patients. *Eur J Haematol* 2006; 76: 23-34. [\[CrossRef\]](#)
37. Herman JG, Civin CI, Issa JP, et al. Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer Res* 1997; 57: 837-41.
38. Nosaka K, Maeda M, Tamiya S, et al. Increasing Methylation of the CDKN2A Gene Is Associated with the Progression of Adult T-Cell Leukemia. *Cancer Res* 2000; 60: 1043-48.
39. Chim CS, Wong AS, Kwong YL. Epigenetic inactivation of INK4/CDK/RB cell cycle pathway in acute leukemias. *Ann Hematol* 2003; 82:738-42. [\[CrossRef\]](#)
40. Guo SX, Taki T, Ohnishi H, et al. Hypermethylation of p16 and p15 genes and RB protein expression in acute leukemia. *Leuk Res* 2000; 24: 39-46. [\[CrossRef\]](#)
41. Issa JJP, Zehnbauser BA, Kaufman S, et al. HIC1 hypermethylation is a late event in hematopoietic neoplasms. *Cancer Res* 1997; 57: 1678-81.
42. Plass C, Yu F, Yu L, et al. Restriction landmark genome scanning for aberrant methylation in primary refractory and relapsed acute myeloid leukemia; involvement of the WIT-1 gene. *Oncogene* 1999; 18: 3159-65. [\[CrossRef\]](#)
43. Uehara E, Takeuchi S, Tasaka T, et al. Aberrant methylation in promoter-associated CpG islands of multiple genes in therapy-related leukemia. *Int J Oncol* 2003; 23: 693-6. [\[CrossRef\]](#)
44. Li Q, Kopecky KJ, Mohan A, et al. Estrogen Receptor Methylation Is Associated with Improved Survival in Adult Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1077-84.
45. Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, et al. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 2291-8. [\[CrossRef\]](#)
46. Langer F, Dingemann J, Kreipe H, Lehmann U. Up-regulation of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 2005; 29: 325-9. [\[CrossRef\]](#)
47. Aoki A, Suetake I, Miyagawa J, et al. Enzymatic properties of de novo-type mouse DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 3506-12. [\[CrossRef\]](#)
48. Mizuno S, Chijiwa T, Okamura T, et al. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood* 2001; 97: 1172-9. [\[CrossRef\]](#)
49. Xie S, Wang Z, Okano M, et al. Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene* 1999; 236: 87-95. [\[CrossRef\]](#)
50. Bullinger L, Döhner K, Bair E, et al. Use of Gene-Expression Profiling to Identify Prognostic Subclasses in Adult Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2004; 350: 1605-16. [\[CrossRef\]](#)

HEK293 Hücreleri Üzerine Endoplazmik Retikulum Stresi Uyararı Tunikamisin'in Etkisi

The Effect of Endoplasmic Reticulum Stress Activator-Tunicamycin on HEK293 Cells

Muhammed Abdulvahid Kalkan , Burçak Vural , Evrim Kömürçü Bayrak 

İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Cite this article as: Kalkan MA, Vural B, Kömürçü Bayrak E. The Effect of Endoplasmic Reticulum Stress Activator-Tunicamycin on HEK293 Cells. Experimed 2018; 8(3): 71-8.

ÖZ

Amaç: Endoplazmik Retikulum (ER), protein katlanması ve işlenmesi yanı sıra Ca^{+2} ve glikojen deposu ve hücre membran lipidlerinin biyogenezine gibi fonksiyonlara sahiptir. Hipoksi, viral enfeksiyonlar, yanlış protein katlanmaları, protein birikimleri ve bazı kimyasallar hücrede, ER stresine sebep olarak katlanmamış protein yanıtı (UPR) sistemlerini devreye sokmaktadır. Bu kimyasallardan biri olan Tunikamisin, asparajin-bağlı glikoproteinlerin sentezinin ilk adımında görev alan GPT (GlcNAc fosfotransferaz) enzimini inhibe ederek hücrede ER stresine sebep olan bir antibiyotiktir. Bu çalışmada, ER stresini *in vitro* araştırmak için en uygun deney şartlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: HEK293 hücre hattı uygun kültür koşullarında çoğaltılarak 5 farklı dozda (0,5-1-2-5 ve 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 12 saatlik Tunikamisin uygulanmıştır. 1-2-4-8 ve 12 saatlik sürelerle ışık mikroskopunda morfolojik değerlendirilmeleri yapılmıştır. Normal HEK293 hücreleri ile 0,5 ve 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tunikamisin uygulanan hücrelerden total RNA izolasyonu ve cDNA sentezi yapılmıştır. Tunikamisin uygulamasının ER stres açısından değerlendirilmesi için UPR sisteminde seçilen *CHOP*, *BiP*, *GADD34*, *ATF4*, *EDEM1*, *ASK1*, *XBP1* (spliced, unspliced ve total), *TRAF2*, *HERP*, *PDIA4* genlerinin qRT-PCR yöntemi ile gen ekspresyonları normal hücrelere göre kıyaslanmıştır.

Bulgular: Tunikamisin uygulamasından 1-2-4-8 ve 12 saatlik ışık mikroskopunda HEK293 hücrelerinin morfolojilerinin sadece 0,5 ve 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ konsantrasyonlarda korunduğu gözlenmiştir. Diğer dozlarda ise daha ilk saatten hücrelerin morfolojik yapılarının bozulduğu gözlenmiştir. qRT-PCR yöntemi ile UPR-ilişkili genlerden *BiP*, *ASK1*, *PDIA4*, *s-xBP1*, *us-XBP1*, *t-XBP1*, *HERP* ve *CHOP* rölatif kantitasyon değerlerinde Tunikamisin uygulanmış HEK293 hücrelerin normal hücrelere göre anlamlı bir artış saptanmıştır. *ASK1* ile aynı yoldan olmasına rağmen *TRAF2* geni rölatif kantitasyon değerinde azalma gözlenmiştir.

Sonuç: HEK293 hücrelerinde ER stresinin oluşturulabilmesinde 0,5 ve 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 'lik Tunikamisin uygulaması uygun bulunmuştur. Daha yüksek dozların HEK293 hücrelerini apoptoza yönlendirdiği düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Endoplazmik retikulum stresi, tunikamisin, HEK293 hücreleri, katlanmamış protein yanıtı

ABSTRACT

Objective: Among the functions of the Endoplasmic Reticulum (ER) are many different reactions that include the regulation of protein folding and modifications in the lumen, as well as the use of Ca^{+2} and glycogen storage, the biogenesis of cell membrane lipids. ER homeostasis becomes unbalanced and is recognized as ER stress by the cell. It triggers Unfolded Protein Response (UPR) systems. Hypoxia, viral infections, unfolded protein accumulation, and some chemicals cause ER stress. Among the chemicals, tunicamycin is an antibiotic known to induce ER stress in the cell by inhibiting the enzyme GlcNAc phosphotransferase (GPT), which is involved in the first step of synthesis of asparagine-linked glycoproteins. The aim of this study is to determine the optimal experimental conditions for investigating ER stress *in vitro*.

Material and Method: The HEK293 cells were cultured at the appropriate culture conditions and treated with five different doses (0.5, 1, 2, 5, and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) of tunicamycin for 12 hours. The morphology of the cells was evaluated with a light microscope for 1, 2, 4, 8, and 12 hours. The total RNA isolation and cDNA synthesis were performed from normal and treated HEK293 cells with 0.5 and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of tunicamycin. Expressions of *CHOP*, *BiP*, *GADD34*, *ATF4*, *EDEM1*, *ASK1*, *XBP1* (spliced, unspliced and total), *TRAF2*, *HERP*, and *PDIA4* selected from the UPR system were compared to normal cells for the evaluation of ER stress via tunicamycin application by qRT-PCR

Results: After 1, 2, 4, 8, and 12 hour observations using light microscopy after treatment of tunicamycin, the morphology of HEK293 cells were preserved at concentrations of only 0.5 and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In all other doses, the morphological structures of the cells were observed to be impaired within the first hour. Relative quantitation values of *BiP*, *ASK1*, *PDIA4*, *s-xBP1*, *us-XBP1*, *t-XBP1*, *HERP*, and *CHOP* were increased significantly on HEK293 cells treated with tunicamycin as compared to normal cells. Despite *ASK1* being in the same pathway, a decrease of *TRAF2* relative quantitation was observed.

Conclusion: It was found that the appropriate doses to induce ER stress with tunicamycin utilizing an HEK293 cell culture were 0.5 and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Higher doses are thought to lead to cell apoptosis.

Keywords: Endoplasmic reticulum stress, tunicamycin, HEK293 cells, unfolded protein response

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Evrim Kömürçü Bayrak **E-mail:** ebyrak@istanbul.edu.tr

Geliş Tarihi/Received Date: 08.10.2018 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 15.11.2018

© Copyright 2018 by The Istanbul University Faculty of Science • Available online at <http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/>

© Telif Hakkı 2018 İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi • Makale metnine http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_sayfasından ulaşılabilir.

GİRİŞ

Endoplazmik Retikulum (ER) hücre dışına salgılanan ve membran geçişli proteinlerin sentezini, uygun katlanmasını ve işlenmesini sağlayan organeldir (1). ER lümeni içerisinde homeostazın bozulmasıyla protein katlama sürecinin yavaşlaması ve hataya açık olması hücre tarafından ER stresi olarak algılanmaktadır (2). Bu strese hipoksi, viral enfeksiyonlar, yanlış protein katlanmaları, protein birikimleri ve bazı kimyasallar sebep olmaktadır (3, 4). Tunikamisin, asparajin-bağlı glikoproteinlerin sentezinin ilk adımında görev alan GPT (GlcNAc fosfotransferaz) enzimini inhibe eden bir antibiyotiktir (5). Hücrelere Tunikamisin uygulaması, glikoproteinlerin birikmesine sebep olarak ER stresine yol açarak Katlanmamış Protein Yanıtı (İng., "Unfolded Protein Response", UPR) sistemini devreye sokmaktadır (2). UPR; protein parçalayıcı enzimlerin, transkripsiyon faktörlerinin ve kinazların olduğu IRE1 (İng., "Inositol-Requiring Protein 1"), PERK (İng., "PKR-like ER kinase") ve ATF6 (İng., "Activating Transcription Factor 6") proteinlerince kontrol edilen üç ana sinyal iletim yolağından meydana gelmektedir. Her üç yolak da ise BiP/GRP78 (İmmunoglobulin bağlayıcı protein/Glikoz düzenleyici protein 78) adlı şaperon protein tarafından kontrol edilmektedir. ER stresi olduğunda BiP proteininin baskısı ortadan kalkmakta ve üç ana yolak aktif hale gelmektedir (6).

IRE1, ER stresinde oto-fosforile olarak aktifleşmektedir ve C-terminal ucundaki endoribonükleaz aktivitesi sayesinde XBP1'in (X-kutu bağlayıcı protein 1) kesilerek transkripsiyon faktörüne dönüşmesini sağlamaktadır. XBP1 mRNA'sının kesimi ile protein katlanması veya degradasyonundan sorumlu ERAD (İng. "ER-associated protein degradation") genlerinden EDEM1 (İng., "ER-degradation-enhancing-a-mannidose-like protein 1"), PDIA4 (İng., "Protein Disulfide Isomerase Family A Member 4"), HERP'in (İng., "homocysteine inducible ER protein with ubiquitin like domain 1") transkripsiyonunu artırmaktadır (7). IRE1-TRAF2-ASK1 kompleksi oluşumu ile apoptoz ile ilişkili Bcl proteinleri devreye girmektedir (8). RIDD (İng., "Regulated IRE1-dependent Decay") mekanizması ile IRE1 proteini, miRNA ve XBP1 mRNA'sına benzer bir katlanma gösteren mRNA'ları, CTGCAG dizilerinden kesime uğrattır (3).

Otofosforile olarak aktifleşen PERK, eIF2a'nın fosforillenmesini sağlamaktadır. Fosforile eIF2a; genel translasyonun azalmasını ve ters olarak ATF4'ün (İng., "Activation Transcription Factor 4") translasyonuna sebep olmaktadır (9). ATF4 ise apoptoza yönlendirici CHOP'u (İng. "C/EBP homologous protein, CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein") ve eIF2a'nın fosforile kalmasını sağlayan GADD34'ün (İng., "Growth Arrest And DNA-Damage-Inducible 34") transkripsiyonunu sağlamaktadır (10).

ATF6 (90 kDa) proteini SP1 ve SP2 proteazlarca kesilerek aktifleşmektedir. Kesilen ATF6'nın N-terminal ucu b-ZIP transkripsiyon faktörü olarak nükleusa hareket etmekte (2) ve genom üzerinde CRE, ERSE I ve ERSE II elementlerine bağlanarak CHOP, BiP ve HERP genlerinin transkripsiyonunu artırmaktadır (11).

Bu çalışmada, pek çok hastalık patogenezinin temelinde gelişen ER stresini *in vitro* araştırmak için en uygun deney şartları

nın belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için, HEK293 hücrelerinde Tunikamisin ile oluşturulacak ER stresi için uygun dozun belirlenmesi ve hücrenin ER strese yanıtındaki görev alan genlerin ifade düzeylerinin belirlenmesi planlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

HEK-293 (ATCC® CRL-1573) hücrelerinin kültürü ile yapılan deneysel bir çalışma olduğu için etik kurul onayı alınmamıştır.

Hücre Kültürü

Morfolojisi epitel olan HEK293 hücre hattı 1973 yılında normal insan embriyonik böbrek hücrelerinin Adenovirüs-5 ile transforme edilmesiyle üretilmiştir (12). Hücrelerin ışık mikroskopundaki morfolojisi birbirlerine ağımsız bağlantılar ile bağlanmış yassı adherent tipindedir. HEK293 hücreleri, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) içinde %10'luk fetal sığır serumu (FBS) ve %1'lik Anti-Anti bulunan solüsyonda 37°C ve %5 CO₂ ortam şartlarında kültüre alındı. Tunikamisin (Sigma, T7765) 1 mg/mL DMSO stok içinde çözündürüldü, DMSO'nun etkisini en aza indirmek için ara stok 100 µg/mL'lik konsantrasyonda kültür medyumunda hazırlandı.

Tunikamisin ile ER Stresi Oluşturulması

HEK293 hücreleri 24-kuyulu kültür kaplarına, hücre sayıları yaklaşık 50.000 olacak şekilde ekildi. Medyumda 0.5-1-2-5 ve 10 µg/mL konsantrasyonlarda Tunikamisin olması için 500 µL'lik kültür medyumunda 100 µg/mL'lik Tunikamisin ara stoğundan sırasıyla 2.5-5-10-25 ve 50 µL eklendi. Kültür medyumunu ile bir gün hücrelerin 24-kuyulu plakelere yapışması beklendikten sonra medyum uzaklaştırılarak hücrelere farklı konsantrasyonlarda Tunikamisin içeren kültür medyumunu eklendi. Normal hücrelerde sadece taze kültür medyum değişimi yapıldı. Hücreler 37°C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 12 saat bekletildi. 1-2-4-8 ve 12. saatlerde ışık mikroskopunda boyama yapılmaksızın 4x ve 40x merceklerle morfolojik incelemesi ışık mikroskopunda (Olympus, MSAC Ltd, U.K.) yapıldı.

RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi

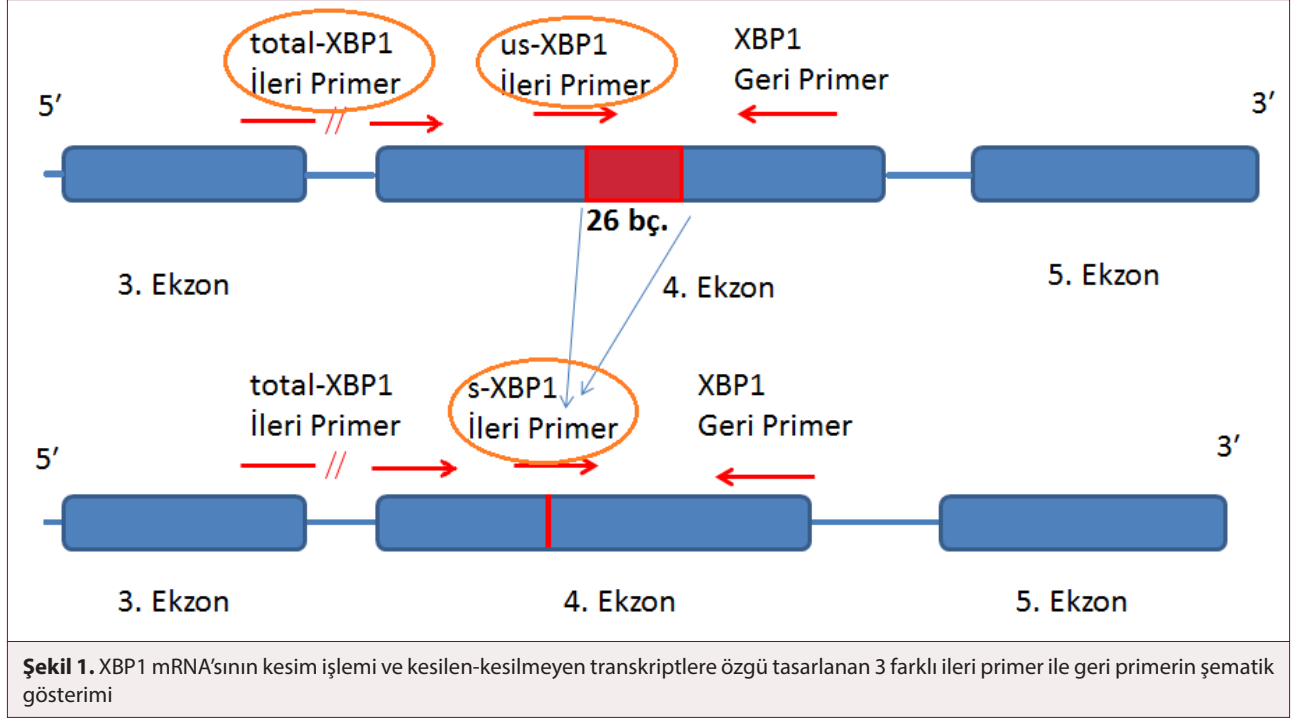
0,5 ve 1 µg/mL konsantrasyonda Tunikamisin uygulanmış hücreler ile normal hücrelerin RNA izolasyonları gerçekleştirildi. İzolasyon, GeneJET RNA Pürifikasyon Kiti (Thermo Fisher Scientific, USA) kullanılarak, minör değişiklikler ile ticari kitin protokolüne göre uygulandı. RNA kalitesi ve miktarı Nano-Drop (Thermo Fisher Scientific, USA) kullanılarak değerlendirildi. cDNA sentezi 100 ng total RNA ve iScript cDNA sentez kiti (Bio-rad, USA) kullanılarak gerçekleştirildi.

Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Yöntemi

UPR sisteminden seçilen CHOP, BiP, GADD34, ATF4, EDEM1, ASK1, XBP1 (spliced, unspliced ve total), TRAF2, HERP, PDIA4 genlerinin 0,5 ve 1 µg/mL Tunikamisin uygulaması yapılmış hücreler ile normal hücrelerindeki ekspresyon seviyeleri kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) yöntemi ile LightCycler 480 (Roche Applied Science) cihazı ve 480 SYBR Green-I Master Kit (Roche, Mannheim, Germany) kullanılarak analiz edildi. XBP1 transkripti ER stresi durumunda IRE1 proteinin endoribonükleaz aktivitesi ile kesime uğrayarak transkripsiyon faktörüne dönüştüğü için bu

genin kırılma varyantı (*s-XBP1*), kesime uğramayan *us-XBP1* ve her iki transkripti tanıyan (*t-XBP1*) ileri primer dizileri, Osowski ve ark. (2) çalışmasındaki gibi sipariş edildi. Şekil 1'de gösterildiği gibi her üç ileri primere aynı geri primer ile PCR yapıldı. *XBP1* primerleri gibi *CHOP* transkriptine özgü primer dizileri de aynı kaynak çalışmadan kullanıldı (2). Diğer genlere ait primerler in-

ternet tabanlı *Universal ProbeLibrary Assay Design Center* (Roche Molecular Systems, Inc., Almanya) programı ile kontrol edilerek belirlendi (13). Her bir primer dizisi internet tabanlı OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies, Inc., ABD) programındaki algoritmalara göre analiz edildi (14). Primer dizileri Tablo 1'de listelendi. Genlerin ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılması için



Şekil 1. XBP1 mRNA'sının kesim işlemi ve kesilen-kesilmeyen transkriptlere özgü tasarlanan 3 farklı ileri primer ile geri primerin şematik gösterimi

Tablo 1. UPR ile ilişkili ve endojen kontrol genlerin ileri ve geri primer dizileri

Transkriptler	İleri Primer	Geri Primer	Ürün Uzunluğu
<i>BIP</i>	gct gag gct tat ttg gga aag	tta ggc cag caa tag ttc cag	112 bç.
<i>CHOP</i>	aga acc agg aaa cgg aaa cag a	tct cct tca tgc gct gct tt	67 bç.
<i>GADD34</i>	gaa acc cct act cat gat ccg	aaa tgg aca gtg acc ttc tcg	83 bç.
<i>ATF4</i>	ggg tct cca gcg aca agg	tcc aac atc caa tct gtc cc	118 bç.
<i>EDEM1</i>	tct acc cac tga gac cag ag	cgt acc cac act tga ctt ttg	135 bç.
<i>PDIA4</i>	gcg agt ttg tca ctg ctt tc	atg gag tca aag gtc ttt ccc	118 bç.
<i>TRAF2</i>	aag att gaa gcc ctg agt agc	cag atg aag acc cca tcg tag	131 bç.
<i>ASK1</i>	cac cat tac cga aga gaa ggg	gcg tag act atc cca taagt c	135 bç.
<i>HERP</i>	ggg tta agg caa agg gaa gttc	aaa gct gaa gcc acc cat ag	142 bç.
<i>s-XBP1</i>	ctg agt ccg aat cag gtg cag	atc cat ggg gag atg ttc ttg	59 bç.
<i>us-XBP1</i>	cag cac tca gac tac gtg ca	atc cat ggg gag atg ttc ttg	76 bç.
<i>t-XBP1</i>	agc caa ggg gaa tga agt gag	atc cat ggg gag atg ttc ttg	123 bç.
<i>GAPDH</i>	tgg gtg tga acc atg aga ag	gag tcc ttc cac gat acc aaa g	125 bç.
<i>β-Aktin</i>	gac cca gat cat gtt tga gac c	tgg tgg tga agc tgt agc c	252 bç.

GAPDH ve β -Aktin endojen kontrol genlerinin ekspresyon seviyelerinin ortalaması kullanıldı. Tunikamisin uygulanmış hücrelerin normal HEK293 hücrelere göre rölatif kantitasyon (değişim katsayısı; "fold change" değerleri) değerleri, 2^{Δ} -Ortalama Delta Delta Ct değeri hesabı ile elde edildi.

Hedef genlerin ifade düzeyleri, 2'li gruplarda "student-t" testi ile istatistiksel olarak SPSS yazılımı Versiyon 21.0 (IBM Corp.; Armonk, NY, USA) kullanılarak karşılaştırıldı. Anlamlılık için $p < 0,05$ değeri alındı.

BULGULAR

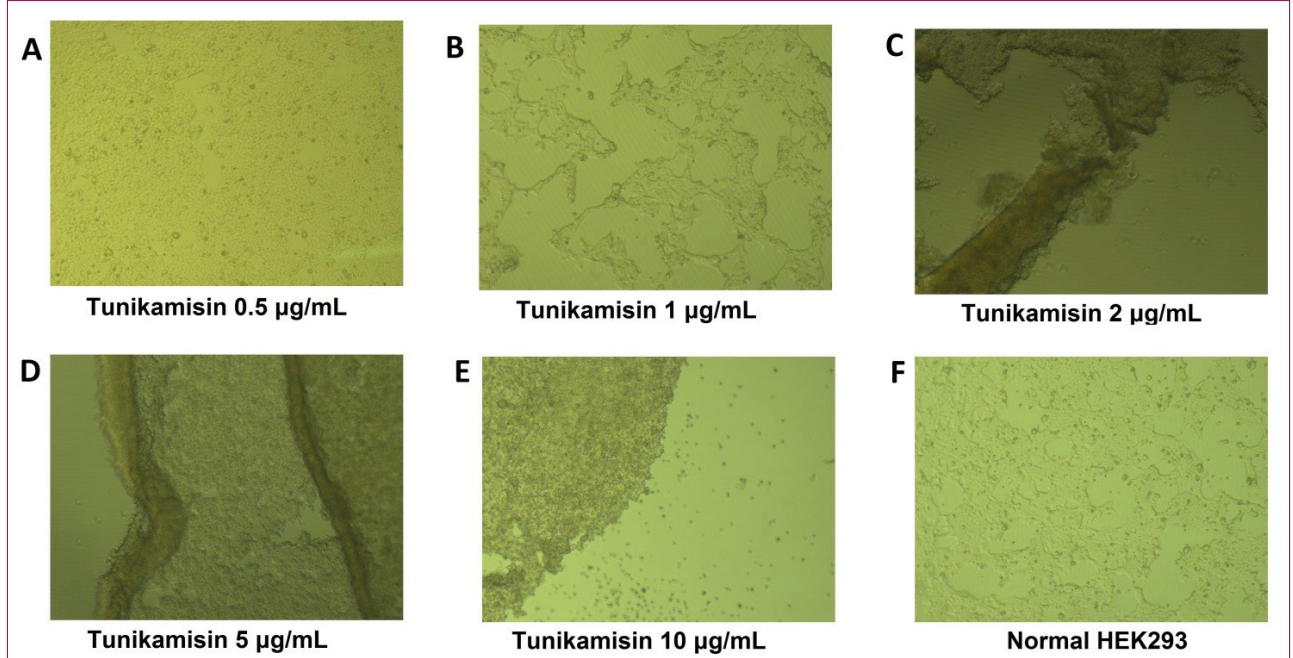
Hücrelerin 1-2-4-8 Saatlik Morfolojik Görüntüleri

Tunikamisin uygulaması yapıldıktan 1 saat sonra alınan ilk görüntülerde yalnızca 0,5 ve 1 μ g/mL dozlarındaki hücrelerin yaşamlarını sürdürdüğü ve HEK293 hücrelerine özgü morfolo-

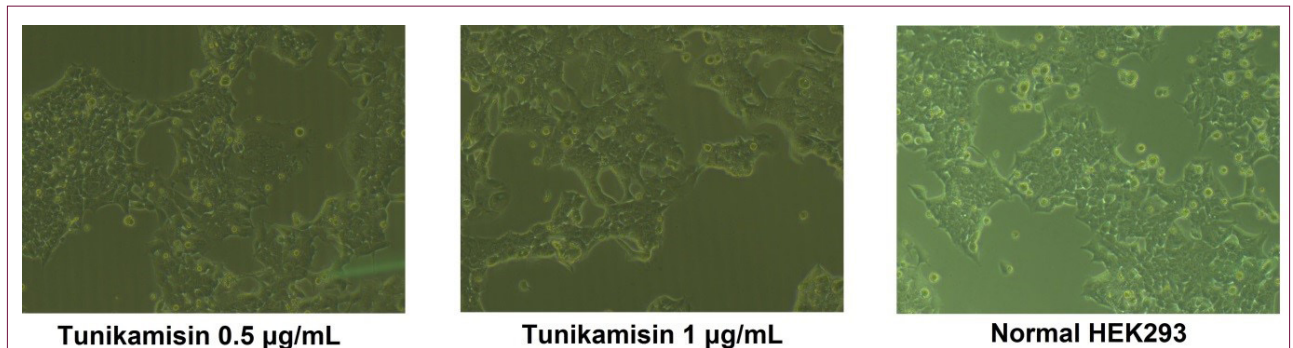
jilerini devam ettirdikleri saptandı (Şekil 2). 2, 4, 8 ve 12 saatlik sürelerde de hücrelerde morfolojik bir değişim saptanmadı. Total RNA izolasyonu için morfolojileri stabil kalan 0,5-1 μ g/mL konsantrasyonlarda Tunikamisin uygulanmış hücreler ile normal HEK293 hücreleri kullanıldı (Şekil 3).

UPR ile İlişkili Genlerin qRT-PCR Yöntemi ile Analizi

Tunikamisin uygulaması ile ER stresi oluşturuldu. Tunikamisin 0,5 ve 1 μ g/mL doz uygulanmış hücrelerin normal hücrelere göre sırayla UPR sistemi genlerinden *BiP* (24 ve 33 kat), *us-XBP1* (7 ve 10 kat), *s-XBP1* (8 ve 14 kat), *t-XBP1* (6 ve 9 kat), *ASK1* (1,5 ve 4 kat), *ATF4* (1 μ g/mL'de 2 kat), *PDIA4* (14 ve 40 kat), *HERP* (14 ve 28 kat) ve *CHOP* (20 ve 112 kat) ifade düzeylerinde artış saptandı. *TRAF2* geni ifade düzeyinde her iki dozda da 5 katlık azalma saptandı (Tablo 2).



Şekil 2. Tunikamisin uygulamasından 1 saat sonra hücrelerin ışık mikroskopundaki 4x büyütmedeki görüntüleri. 0,5 μ g/mL (a) ve 1 μ g/mL (b) Tunikamisin uygulanmış hücrelerde morfolojik değişim gözlenmedi. Diğer dozlarda ise (c, d, e) ise morfolojilerini kaybettikleri ve yüzeye tutunmadıkları gözlemlendi



Şekil 3. Tunikamisin uygulamasından 12 saat sonra RNA izolasyonu için seçilen hücrelerin ışık mikroskopundaki 40x büyütmedeki görüntüleri

Her üç ana yolağın kontrolünü sağlayan BiP geninin mRNA ifade düzeyinde, Tunikamisin uygulaması (0,5 ve 1 µg/mL) yapılmış hücrelerde kontrole göre yaklaşık 25 ve 33 katlık artış saptandı (Şekil 4) (p<0,01).

IRE1 ve ATF6 yollarının kontrolünde bulunan *XBP1* mRNA'sının kesilmemiş (*us-XBP1*), kesilmiş (*s-XBP1*) ve her iki formuna özgü (*t-XBP1*) ifade düzeylerinin her birinde Tunikamisin uygulaması yapılmış hücrelerde (0,5 ve 1 µg/mL) yaklaşık sırasıyla 6-14 kat arasında değişen artış saptandı (p<0.01). *s-XBP1/us-XBP1* mRNA ifade düzeyleri oranında, 1 µg/mL Tunikamisin uygulaması yapılmış hücrelerde kontrole göre yaklaşık 1,5 kat artış saptanırken (p<0,05), 0,5 µg/mL dozda anlamlı bir değişiklik saptanmadı (Şekil 5).

Tablo 2. UPR ile ilişkili genlerin Normal HEK293 hücrelerine göre rölatif ekspresyon değerleri

Normal HEK293 hücrelere göre rölatif kantitasyon değerleri		
Transkriptler	Tunikamisin 0,5 µg/mL	Tunikamisin 1 µg/mL
BiP	24,05**	33,19**
ATF4	1,32	2,21**
ASK-1	1,68*	4,47**
GADD34	1,48	1,16
EDEM1	1,5	2,49
PDIA4	14,47**	40,42**
s-XBP1	8,25**	13,98**
us-XBP1	7,23*	9,76**
t-XBP1	5,80**	8,52**
HERP	13,90**	28,25**
TRAF2	0,25**	0,28**
CHOP	20,45**	112,63**

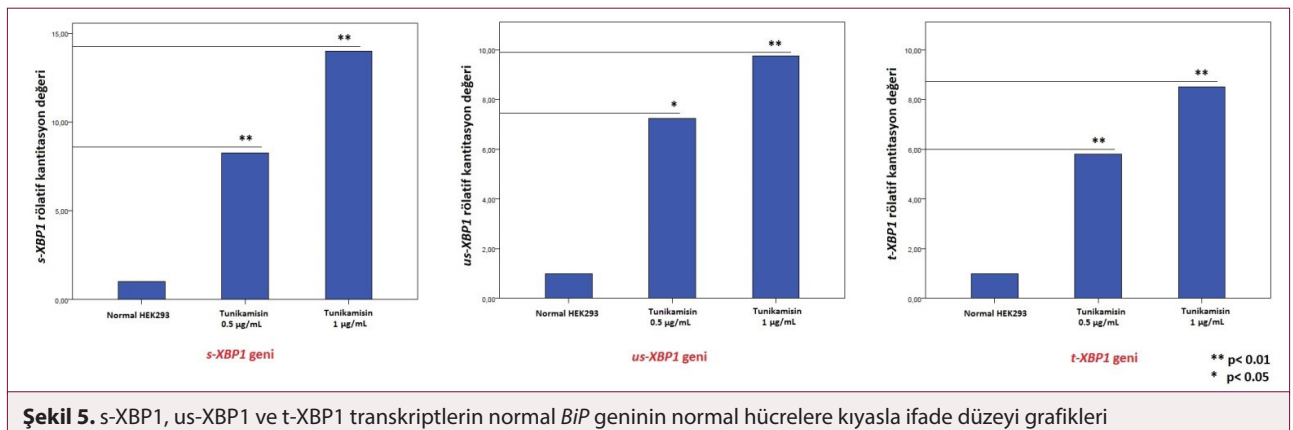
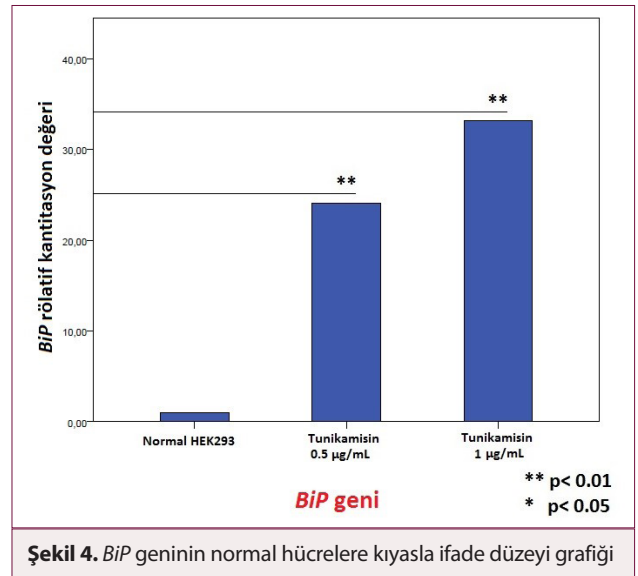
**p<0,01; *p<0,05

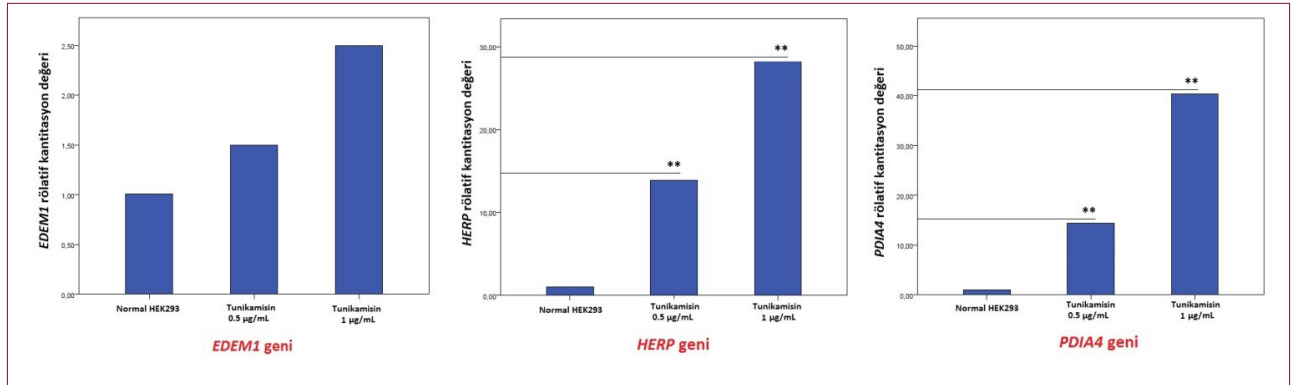
IRE1 yolağından seçilen ERAD mekanizmasında görevli *HERP* ve *PDIA4* mRNA ifade düzeylerinde Tunikamisin dozları ile doğru orantıda yaklaşık 14-28 ve 14-40 katlık artış saptandı (Şekil 6) (p<0,01).

ASK1 mRNA ifade düzeyinde ise Tunikamisin uygulaması (0,5 ve 1 µg/mL) yapılmış HEK293 hücrelerinde kontrole göre yaklaşık 2 ve 5 katlık artış saptandı (sırasıyla p<0,01 ve p<0,05). *ASK1* ile aynı mekanizmada görev alan *TRAF2* mRNA ifade düzeyinde normal hücrelere göre yaklaşık 5 katlık azalma saptandı (Şekil 7) (p<0,01).

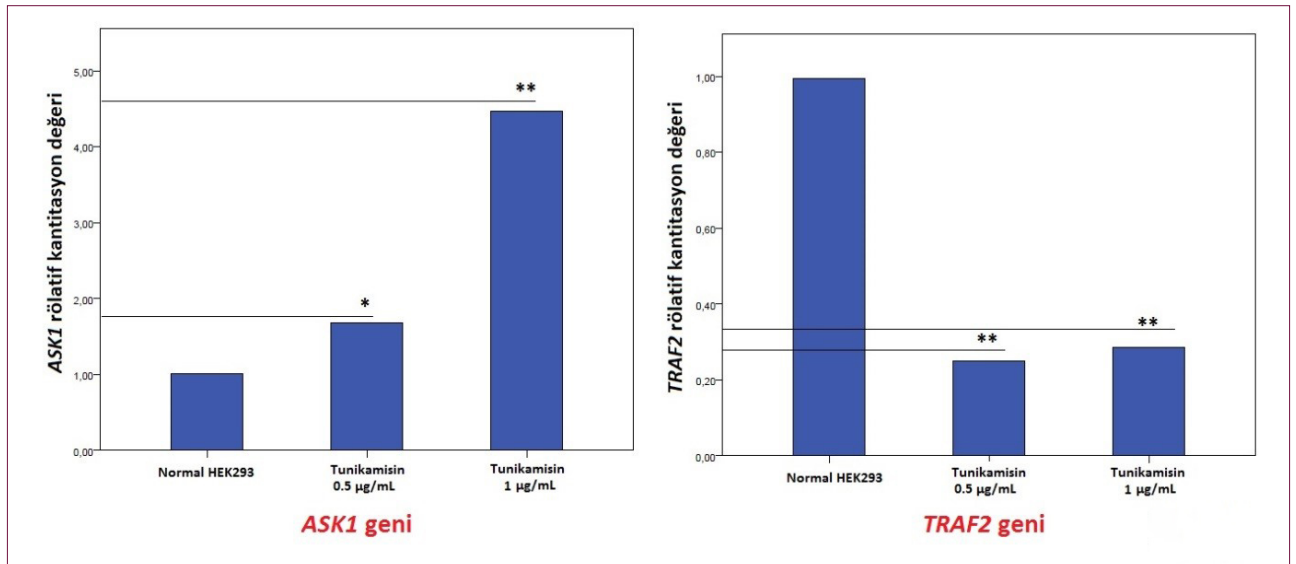
PERK ve ATF6 yolağının kontrolündeki *CHOP* mRNA ifade düzeyinde, Tunikamisin uygulaması (0,5 ve 1 µg/mL) yapılmış hücrelerde kontrole göre yaklaşık 20 ve 112 katlık artış saptandı (Şekil 8) (p<0,01).

EDEM1 ve *GADD34* genlerinin ifade düzeyleri her iki doz Tunikamisin uygulamasında da anlamlı bir değişim oluşturmadığı saptandı (Şekil 6 ve Şekil 8). *ATF4* mRNA ifade düzeyinde, 0,5 µg/mL Tunikamisin uygulanmış HEK293 hücrelerinde anlamlı bir değişim saptanmamışken, 1 µg/mL'lık dozda kontrole göre yaklaşık 2 katlık artış saptandı (Şekil 8) (p<0,01).

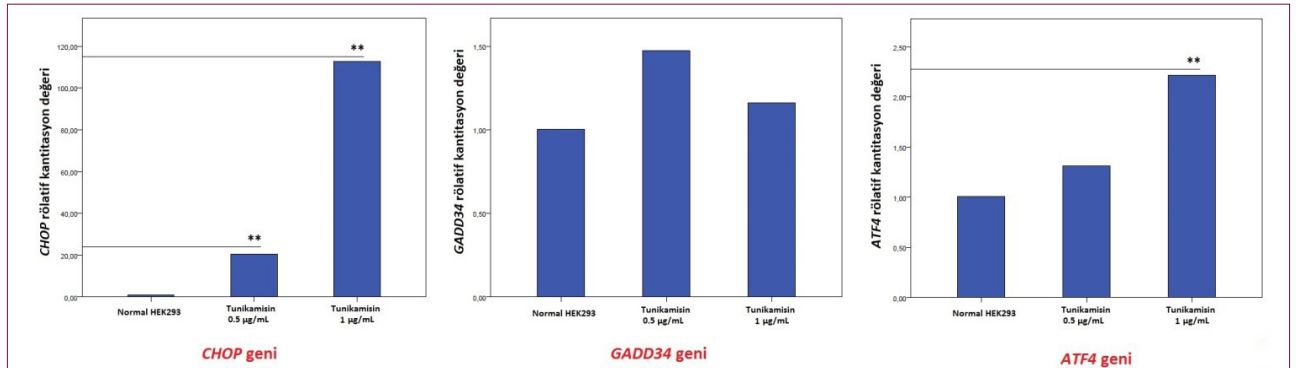




Şekil 6. ERAD genlerinden EDEM1, HERP ve PDIA4 genlerinin normal hücrelere kıyasla ifade düzeyi grafikleri



Şekil 7. IRE1 proteini kontrolündeki ASK1 ve TRAF2 genlerinin normal hücrelere kıyasla ifade düzeyi grafikleri



Şekil 8. PERK proteini kontrolündeki CHOP, GADD34 ve ATF4 genlerinin normal hücrelere kıyasla ifade düzeyi grafikleri

TARTIŞMA

Bu çalışmada tasarlanan *in vitro* modelde, ER stresi aktivatörü olarak kullanılan Tunikamisin uygulamasının (0,5 ve 1 µg/mL) ile HEK293 hücrelerinin ER stresine yanıt verip vermediği kontrol edilmiştir. Bu amaçla yapılan qRT-PCR yöntemi ile UPR-iliş-

kili genlerden *BiP*, *ASK1*, *PDIA4 s-xBP1*, *us-xBP1*, *t-xBP1*, *HERP* ve *CHOP* rölatif kantitasyon değerlerinde Tunikamisin uygulanmış HEK293 hücrelerin normal hücrelere göre anlamlı artışların olduğu saptandı. *ASK1* ile aynı yoldan olmasına rağmen *TRAF2* geni rölatif kantitasyon değerinde azalma gözlenmiştir. *TRAF2*'nin fosforile halinin UPR sistemde rol oynayarak apoptozu indükeldi-

ği bilinmektedir (15). TRAF2'nin transkripsiyonundaki azalmanın ER strese bağımlı apoptozun IRE1-TRAF2-ASK1 yolağı üzerinden gerçekleşmediği düşünülmektedir. Shinjo ve ark. (16) yaptıkları bir araştırmada, Tunikamisin uygulama sonuçlarına göre, 1 µg/mL Tunikamisinin UPR sistemini aktive etmek için yeterli olduğu belirlenmişken, 10 µg/mL konsantrasyonun HEK293 hücreleri için öldürücü olduğu ortaya konmuştur. Neuber ve ark. (17) yaptıkları bir başka çalışmada ise, CHOP ile aynı yoldan olan ATF4 geninin 2,5 µg/mL doz ve 24 saat Tunikamisin uygulaması ile ifade düzeyinde artış gözlemlenmiştir. Dolayısıyla bu çalışmada ise 1 µg/mL ve 12 saatlik Tunikamisin uygulamasında ATF4'ün ifade düzeyinde artış saptanamamasının nedeni, doz ve zamana bağlı olabileceği öngörülmüştür.

Weichert ve ark. (18) yaptıkları çalışmada, XBP1 geninin UPR sistemindeki etkinliğinin hesaplanabilmesi için s-XBP1/us-XBP1 oranlaması yapılmıştır. Bu çalışmada, 0,5 µg/mL dozda s-XBP1/us-XBP1 oranında anlamlı bir değişim olmaması ve 1 µg/mL dozda 1,5 katlık artış (p<0,05) olması ER stresinde XBP1 mRNA'sının kesilmesinin yanı sıra mRNA üretiminin de devam ettiğini göstermektedir. XBP1 mRNA'sının kesim ürünü yanı sıra yeni XBP1 üretiminin devam etmesi ATF6 yolağının aktivasyonunu düşündürmektedir.

2, 5 ve 10 µg/mL konsantrasyonundaki Tunikamisin uygulamasında hücrelerin morfolojik değerlendirmelerinde hücre bütünlüklerinin bozulduğu gözlenmiştir. Ancak bu çalışmanın önemli bir kısıtlılığı, 0,5-1-2-5-10 µg/mL Tunikamisin uygulamasının HEK293 hücrelerinde doz-zaman açısından apoptoz belirleme yöntemlerince (19) değerlendirilememiş olmasıdır.

Sonuç olarak, Tunikamisin maddesi HEK293 hücre hattında 0.5 ve 1 µg/mL konsantrasyonlarında ER strese sebep olmaktadırken 2-5-10 µg/mL konsantrasyonlarında hücre canlılığının sürdürülemediği saptanmıştır. Bu konsantrasyonlardaki Tunikamisine karşı hücrenin verdiği cevapla IRE1 ve PERK yolağını aktive olarak BiP, ATF4, PDIA4, CHOP ve ASK1 genlerinin ifade düzeylerinde doz miktarıyla uyumlu olarak artış olduğu saptanmış ve ER stresini *in vitro* araştırmak için en uygun deney şartları bu çalışma ile gösterilmiştir.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma hücre kültürü çalışması olduğu için etik kurul onayı alınmamıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - E.K., B.V.; Tasarım - E.K.B., B.V., M.A.K.; Denetleme - E.K.B., M.A.K.; Kaynaklar - B.V., E.K.B.; Gereçler - E.K.B., B.V.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - M.A.K., E.K.B.; Analiz ve/veya Yorum - M.A.K., E.K.B., B.V.; Literatür Taraması - M.A.K.; Yazan - M.A.K., E.B.; Eleştirel İnceleme - M.A.K., E.B.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TYL-2017-27803 ve TDP-2017-22581). Ayrıca, kısmi olarak TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (Proje No: 115S137).

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval is not required because of the nature of cell culture study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - E.K., B.V.; E.K.B., B.V., M.A.K.; Supervision - E.K.B., M.A.K.; Resource - B.V., E.K.B.; Materials - E.K.B., B.V.; Data Collection and/or Processing - M.A.K., E.K.B.; Analysis and/or Interpretation - M.A.K., E.K.B., B.V.; Literature Search - M.A.K.; Writing - M.A.K., E.B.; Critical Reviews - M.A.K., E.B.

Conflict of Interest: The authors have no conflict of interest to declare.

Financial Disclosure: This study was supported by the Research Fund of Istanbul University (Project No: TYL-2017-27803 and TDP-2017-22581). Also, it was supported in part by TÜBİTAK (Project No: 115S137).

KAYNAKLAR

1. Schwarz DS, Blower MD. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci* 2016; 73: 79-94. [CrossRef]
2. Osowski CM, Urano F. Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods Enzymol* 2011; 490: 71-92. [CrossRef]
3. Martins AS, Alves I, Helguero L, Domingues MR, Neves BM. The Unfolded Protein Response in Homeostasis and Modulation of Mammalian Immune Cells. *Int Rev Immunol* 2016; 35: 457-76. [CrossRef]
4. Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, et al. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev* 2004; 18: 3066-77. [CrossRef]
5. Takatsuki A, Arima K, Tamura G. Tunicamycin, a new antibiotic. I. Isolation and characterization of tunicamycin. *J Antibiot (Tokyo)* 1971; 24: 215-23. [CrossRef]
6. Yoshida H. ER stress and diseases. *FEBS J* 2007; 274: 630-58. [CrossRef]
7. Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012; 13: 89-102. [CrossRef]
8. Tong Q, Wu L, Jiang T, Ou Z, Zhang Y, Zhu D. Inhibition of endoplasmic reticulum stress-activated IRE1 α -TRAF2-caspase-12 apoptotic pathway is involved in the neuroprotective effects of telmisartan in the rotenone rat model of Parkinson's disease. *Eur J Pharmacol* 2016; 776: 106-15. [CrossRef]
9. Malhotra JD, Kaufman RJ. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin Cell Dev Biol* 2007; 18: 716-31. [CrossRef]
10. Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem* 2005; 74: 739-89. [CrossRef]
11. Wakabayashi S, Yoshida H. The essential biology of the endoplasmic reticulum stress response for structural and computational biologists. *Comput Struct Biotechnol J* 2013; 6: e201303010. [CrossRef]
12. Yirell DL, Roome AP, Darville JM, Ashley CR, Harbour J. Comparison of the continuous cell line 293 with human embryo kidney cells and human embryo fibroblast cells for the cultivation of ocular viruses. *J Clin Pathol* 1983; 36: 996-9. [CrossRef]
13. RocheMolecularSystems. Universal ProbeLibrary Assay Design Center 09.07.2018; Erişim 18.07.2018, <https://lifesci.roche.com>

- science.roche.com/en_tr/brands/universal-probe-library.html#assay-design-center.
14. IntegratedDNATechnologies. OligoAnalyzer 3.1. 01.05.2018; Erişim 18.07.2018, <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>.
 15. Szegezdi E, Logue SE, Gorman AM, Samali A. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep* 2006; 7: 880-5. [\[CrossRef\]](#)
 16. Shinjo S, Mizotani Y, Tashiro E, Imoto M. Comparative analysis of the expression patterns of UPR-target genes caused by UPR-inducing compounds. *Biosci Biotechnol Biochem* 2013; 77: 729-35. [\[CrossRef\]](#)
 17. Neuber C, Uebeler J, Schulze T, Sotoud H, El-Armouche A, Eschenhagen T. Guanabenz interferes with ER stress and exerts protective effects in cardiac myocytes. *PLoS One* 2014; 9: e98893. [\[CrossRef\]](#)
 18. Weichert N, Kaltenborn E, Hector A, Woischnik M, Schams A, Holzinger A, et al. Some ABCA3 mutations elevate ER stress and initiate apoptosis of lung epithelial cells. *Respir Res* 2011; 12: 4. [\[CrossRef\]](#)
 19. Güleş Ö, Eren Ü. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi* 2008; 2: 73-8.

Timidilat Sentaz 2T Gen Polimorfizmi Akut Lösemi İçin Bir Risk Faktörüdür

Thymidylate Synthase 2T Gene Polymorphism is a Risk Factor for Acute Leukemia

Cumhur G. Ekmekçi¹ , Uğur Özbek²

¹Acıbadem Labgen Genetic Diagnosis Center, İstanbul, Turkey

²Department of Medical Genetics, Acıbadem University, İstanbul, Turkey

Cite this article as: Ekmekçi CG, Özbek U. Timidilat Sentaz (TS) 2T Gen Polimorfizmi Akut Lösemi İçin Bir Risk Faktörüdür. Experimed 2018; 8(3): 79-83.

ÖZ

Amaç: Folat metabolizması içerisinde yer alan timidilat sentaz (TS) enzimi, deoksiüridin monofosfatın (dUMP), deoksitimidin monofosfata (dTMP) dönüşümünü katalizlemektedir. Hücre içerisinde DNA sentezi için gerekli olan deoksinükleotidlerin belirli bir denge de bulunmasını sağlamaktadır. Enzimin inhibisyonu sonucu anormal kromozom kırıklarının oluştuğu ve hücre ölümünün gerçekleştiği gösterilmiştir. Çoğalan hücreler için çok gerekli olan enzim aynı zaman da değişik kanser ilaçlarına da hedef olmaktadır. Kromozom 18p11.32 de bulunan TS geni, ATG başlama bölgesinin hemen üzerinde polimorfik tekrar bölgesi içermektedir. 28 bazlık tekrar dizisinin ikili veya üçlü tekrarından oluşan bu polimorfizmin, in vitro ve in vivo olarak gen ekspresyonunda farklılık oluşturduğu gösterilmiştir. Benzeri çalışmalar ile pek çok kanser türü ve kanser ilacı kullanımı ile TS polimorfizmi ilişkisi sorgulanmıştır. Bu çalışmada Türk popülasyonunda akut lösemi etiolojisinde (Akut myeloid lösemi ve Akut lenfoblastik lösemi) TS promoter polimorfizminin rolünün araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntemler: Çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemi (ALL) (n=110) ve çocukluk çağı ve erişkin akut myeloid lösemi (AML) (n=126) olgularından elde edilen DNA'larla bölgeye özgü primerler kullanılarak yapılan PZR sonrası agaroz jel elektroforezi analizi ile iki veya üç tekrardan oluşan TS polimorfik allelleri belirlendi. Sonuçlar sağlıklı kontrol (n=133) olgularının sonuçları ile karşılaştırarak istatistiksel olarak TS gen polimorfizminin bir risk oluşturup oluşturmadığını sorgulandı. İstatistiksel analizler, SPSS programındaki Fisher's exact test kullanılarak yapıldı.

Bulgular: AML olgularında TS promoter polimorfizmi ile ilişki bulunmadı. Çocukluk çağı ALL olgularında 2T/2T genotipi anlamlı düzeyde yüksek bulundu (p=0,048).

Sonuç: Çalışmamız ALL gelişiminde, 2T/2T genotipinin bir risk faktörü olduğunu fakat diğer genotiplerin ALL ve AML oluşumunda bir risk oluşturmadığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Akut lösemi, polimorfizm, timidilat sentaz

ABSTRACT

Objective: The enzyme thymidylate synthase (TS) in the folate metabolism catalyzes the conversion of deoxyuridine monophosphate (dUMP) to deoxythymidine monophosphate (dTMP). It provides a certain balance of deoxynucleotides required for DNA synthesis in the cell. Inhibition of the enzyme showed that abnormal chromosomal breakage and apoptosis occurred. The enzyme, which is necessary for proliferating cells, also targeted different cancer drugs. The TS gene at chromosome 18p11.32 contains the polymorphic repeat region just upstream of the ATG starting site. This polymorphism, consisting of double or triple repeats of the 28-base length sequence, has been shown to differ in gene expression in vitro and in vivo. Similar studies have investigated the relationship between many types of cancer and cancer drug use and TS polymorphism. In this study, the role of TS promoter polymorphism in acute leukemia etiology (acute myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia) in the Turkish population was investigated.

Material and Method: For this purpose, a pediatric acute lymphoblastic leukemia (ALL) case admitted to our unit (n=110) and agarose gel electrophoresis after PCR using region-specific primers with DNA obtained from pediatric and adult acute myeloid leukemia (AML) (n=126) TS polymorphic alleles consisting of two or three repetitions were determined. The results were compared with the results of healthy control (n=133) cases, and we questioned whether TS gene polymorphism is a risk factor.

Results: Statistical analyses were performed using the Fisher exact test in the program SPSS, and the 2T/2T genotype was a risk factor in the formation of ALL (p=0.048).

Conclusion: It was observed that other genotypes did not have a risk for ALL and AML formations.

Keywords: Acute leukemia, polymorphism, thymidylate synthase

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Cumhur G. Ekmekçi **E-mail:** cgekmecki2@yahoo.com

Geliş Tarihi/Received Date: 24.10.2018 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 30.10.2018

© Copyright 2018 by The İstanbul University Faculty of Science • Available online at <http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/>

© Telif Hakkı 2018 İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi • Makale metnine http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_sayfasından ulaşılabilir.

GİRİŞ

Hematolojik maligniteler, iki ana kan hücresi miyeloid ve lenfoid hücre dizileri soyundan herhangi birinden türemektedir. Lenfomalar ve lenfositik lösemiler lenfoid hücre dizileri, akut ve kronik miyeloid lösemiler, myelodisplastik sendromlar ve miyeloproliferatif hastalıklar, miyeloid dizilerden kaynaklanır. Genel olarak, hasta verileri iyi tutulan batılı ülkelerde hematolojik malignite insidansının yıllar içerisinde artmakta olduğu gözlenmektedir. Buna karşın epidemiyolojik davranışlarını tutarlı ve düzenli bir şekilde tanımlamak zordur (1). ABD’de 2010 yılında yeni hematolojik malignite vakalarının sayısı 137.264, hematolojik maligniteler nedeniyle ölümlerin sayısı ise 54.020 olarak bildirilmiştir (2). Lösemilerin oluşumu ile ilgili elimizde daha çok veri olmakla birlikte, moleküler mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılabilir değildir. Hematolojik malignansi etyolojisinde olgularının sadece küçük bir yüzdesinde, DNA’daki yüksek penetrans gösteren kalıtsal mutasyonlar, iyonize radyasyona, benzen veya kemoterapi gibi kimyasallara maruz kalmayla ilişkili olduğu bilinen durumlardır. Olguların daha büyük bir kısmında ise bilinen etkisi daha az olan ama hastalığa yatkınlığa neden olan polimorfizmlerin varlığıdır. Bir hastalık için yatkınlık oluşturan bu varyasyonların belirlenmesi riskli grupları tanımlamada önem arz etmektedir. Yüksek riskli bir fenotipi tanımlamak için protein-protein, gen-gen etkileşimleri, diyet, diğer çevresel maruziyetler ve bireysel immün fonksiyonu, hematolojik malignite duyarlılığında önemli belirleyiciler olabilir (3, 4).

Folat DNA sentezi ve metilasyonu için gerekli olan önemli bir besin maddesidir ve yetersizliği birçok malignite ile ilişkilendirilmiştir. Folat yolunda en az 30 enzim tanımlanmıştır. Bu enzimleri kodlayan genlerdeki çeşitli fonksiyonel polimorfizmler, yetişkin ve çocukluk akut lenfositik lösemi (ALL), akut miyeloid lösemi (AML), kronik miyeloid lösemi (KML) ve non-Hodgkin lenfoma (NHL) dahil olmak üzere çeşitli maligniteler ile ilişkilendirilmiştir (5, 6).

Timidilat sentaz (TS), deoksüridin monofosfatın (dUMP), deoksitimidin monofosfata (dTMP) dönüşümünü katalizlemektedir. Bu enzimin inhibisyonu, deoksitimidin trifosfat tükenmesi ve daha sonra kromozom kırılmaları ve hücre ölümü ile sonuçlanır. Timidilat sentaz, çoğalan hücrelerde önemli bir enzimdir ve bu nedenle metotreksat ve glutamatlar dahil olmak üzere çeşitli antikanser ilaçları için önemli bir hedeftir. Bu enzimi hedef alan ilaçlara karşı direnç başlıca nedeni, inhibisyonun başarısızlığı olarak bilinmektedir (7).

Timidilat sentaz geninin promotör bölgesinde bir tandem-tekrar dizisi tanımlanmıştır (8) İki ya da üç kez tekrarlayan bu 28-bp lik dizinin polimorfik olduğu gösterilmiştir; üç 28-bp tekrarı olan bireyin, iki 28-bp tekrarı olanlardan daha yüksek timidilate sentaz ekspresyonu gerçekleştirdiği bilinmektedir (8) Timidilat sentaz konsantrasyonu, tedavi etkinliğini, ilaca bağlı toksisiteyi veya her ikisini de etkileyebilir, bu tandem-tekrar polimorfizminin test edilmesi ile terapötik cevap tahmin edebilir (7).

Bu çalışmada AML (erişkin ve çocukluk çağı) ve ALL (çocukluk çağı) olgu gruplarında Timidilat Sentaz geninin promotör böl-

gesine ait 28 bp’lik ikili veya üçlü tekrar bölgesinin bu hematolojik kanserlerle ilişkisi, sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırarak belirlendi.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma üç farklı gruptan oluşmaktadır; çocukluk çağı ALL, erişkin ve çocukluk çağında AML olgularına ait örnekler ve tamamen sağlıklı gruba ait örneklerden oluşmaktadır. Çalışma İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Araştırma Enstitüsü Genetik Bilim Dalına yönlendirilen olgulardan hasta onamı alınarak yapılmıştır. Çalışma, Helsinki Deklarasyonu etik kurallarına uygun olarak etik kurul onayı alınarak gerçekleştirilmiştir.

ALL hasta örneği sayısı 110 iken, AML hasta grubunda toplam 126 olgu örneği incelemeye alındı. Bu iki hasta grubunun sonuçlarını toplam 133 örnekten oluşan kontrol grubunun sonucu ile karşılaştırıldı.

Örneklerden, otomatik DNA izolasyon cihazı (MagNA Pure, Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) kullanılarak DNA ekstrakte edildi. İzole edilen DNA’lar inceleme yapılacak olan güne kadar -20° C de saklandı.

TS polimorfizminin belirleneceği her bir DNA örneği konvansiyonel PZR yöntemiyle amplifiye edildi. PZR amplifikasyonu için F primer: 5'- GCT CCG AGC CGG CCA CAG GCA TG ve R primer: 5'- GTG GCT CCT GCG TTT CCC CC dizileri kullanıldı. PZR programımız 34 siklustan oluşmakta idi ve her bir reaksiyonda 50 ng genomik DNA örneği kullanıldı. Bu amaç için kullanılan PZR programı ise; Denatürasyon 94°C’de 1 dk, annealing 58°C’de 1 dk, uzama safhası 72°C’ de 1 dk’da ve son uzama safhası ise 72°C’de 7 dk olarak PZR cihazında (Techne, Staffordshire, İngiltere) gerçekleştirildi. Sonra PZR ürünleri %4 lük agaroz jel elektroforezinde etidyum bromür kullanılarak, UV’de bantlar görüntülenerek değerlendirildi. Örneklerin jel görüntüsü Şekil 1’de verilmiştir. İstatistiksel analizler, SPSS (IBM Corp.; Armonk, NY, USA) programındaki Fisher’s exact test kullanılarak yapıldı.

BULGULAR

Toplam 110 ALL, 126 AML ve 133 sağlıklı örnekten elde edilen genotip sonuçları karşılaştırıldı. Genotip sonuçları Tablo 1 de sunulmuştur.

İstatistiksel analizler, SPSS programındaki Fisher’s exact test kullanılarak yapıldı ve ALL oluşumunda, 2T/2T genotipinin bir risk faktörü olduğu (p=0,048) belirlendi.

Tablo 1. ALL, AML ve kontrol grubunun genotip sayı ve yüzdeleri

Genotip	ALL, n=10	AML, n=126	Kontrol, n=133
2T/2T	22 (%20)	17 (%13,5)	22 (%16,5)
2T/3T	47 (%42,7)	72 (%57,1)	67 (%50,4)
3T/3T	41 (%37,3)	37 (%29,4)	44 (%33,1)



Benzer şekilde yapılan diğer karşılaştırmalar için AML 2T/2T ile kontrol grubu 2T/2T karşılaştırılmış; ALL 2T/3T ile kontrol grubu ve AML 2T/3T ile kontrol grubu ve benzer şekilde ALL 3T/3T ile kontrol 3T/3T ve AML 3T/3T ile kontrol 3T/3T sonuçları karşılaştırılmış istatistiksel anlamlılık belirlenememiştir.

İncelediğimiz olgu grupları için elimizde var olan demografik bilgilere istinaden yapılan analizlerde başka herhangi bir istatistiksel anlamlılık belirlenemedi. Bu amaç için genotipteki çeşitlilik ile hastanın klinik ve hematolojik özellikleriyle ilişki bulunamadı. Sadece 2 li tekrardan oluşan heterozigot olanlar veya sadece üçlü tekrarı olan hastalar arasında cinsiyet ve yaş dağılımı açısından fark yoktu. Ayrıca polimorfizmler arasında WBC ve FAB alt tip dağılımında ilişki bulunamadı.

TARTIŞMA

Folat, DNA sentezi ve onarımında önemli bir rol oynar. Folat eksikliğinde, urasilin DNA yapısına katılımında sorun yaşanmakta ve kromozom kırıkları ile karşılaşmaktadır. Bu da kemik iliği hücrelerinin DNA'sında kromozom hasarı, kırılğan alan oluşumu, mikronükleus oluşumu ve yüksek urasil seviyelerini uyarır (9). Bu bilgi dikkate alındığında, folat metabolizmasında rol oynayan genlerdeki polimorfizmlere bağlı fonksiyonel değişikliklerin kanserlerin gelişimi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bu hipotezle tutarlı olarak folat ilişkili genlerdeki polimorfizmlerin kanser riski ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (10). Folat metabolizmasında ki TS çok önemli bir enzimdir. Reaksiyon için karbon vericisi olarak metilen THF kullanılarak dUMP'nin dTMP'ye dönüşümünü katalize eder ve DNA sentezi ve onarımı için dört öncü nükleotidin dengeli oluşumunu sağlar. TS gen ekspresyonunda ki değişiklik, hematopoietik kök hücreler gibi hızla bölünen hücrelerde bu dengeli beslenmeyi etkileyebilir. TS, 5'-UTR'sinde, iki (2R) veya üç (3R) 28-bp tekrarını içeren polimorfik olduğu bulunan, benzersiz bir 28-bp tekrar dizisi içerir (11). Daha az baskın olan 2R alelinin, in vitro çalışmalarda 3R allelinden 2.6 kat daha düşük gen ekspresyonuna (12) ve TS 2R / 2R bireylerin 3R durumu için homozigot bireylerden tümör dokusunda 3.6 kat daha düşük mRNA ekspresyon seviyelerine neden olduğu gösterilmiştir (13). Bu tandem tekrar dizilerinin, mRNA'nın 5'-UTR'sinde ikincil yapıları oluşturan

arak gen ekspresyonunu düzenlediği varsayılır (14). Çalışmamızda, TS genindeki bu 5'-UTR tandem tekrar polimorfizminin Türk popülasyonunda ALL ve AML gelişimi ile ilişkisi araştırılmıştır. TS genindeki tekrar polimorfizmi, 110 ALL, 126 AML ve 133 kontrol olgusunun kanından elde edilen DNA'nın PCR ile çoğaltılıp ve ardından Jelde yürütülmesi ile değerlendirildi. TS üçlü tandem tekrarı (3R) alleli frekansının kontrollerde % 33.1, ALL olgularında % 37.3 ve AML olgularında %29.4 olarak gözlemledik. Frekanstaki fark, $p>0.05$ ile istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur. TS 2R / 2R genotipi ALL olguların % 20'sinde ve kontrollerin %16.5'inde, bulunarak $p=0.048$ olarak anlamlı fark olarak değerlendirilmiştir. Benzer şekilde 2R/3R ler için yapılan karşılaştırmada anlamlı fark gözlenmemiştir.

TS polimorfizmleri üzerine yapılan birçok çalışmaya göre, üçlü tandem tekrarı, gen ekspresyonu ve prognoz ile ilişkilidir, ancak oldukça zıt sonuçlar vermektedir. In vitro bir çalışma, artan sayıda art arda tekrarlanan TS gen ekspresyonunda adım adım bir artış göstermiştir: üçlü tekrarın varlığı, çift tekrardan 2.6 kat daha fazla TS ifadesi ile sonuçlanmaktadır (12). Retrospektif bir çalışmada, üç tekrarlı homozigotun, çift tekrarlı homozigot ile karşılaştırıldığında 3.6 kat daha yüksek TS mRNA seviyeleri sergilediği bildirilmiştir (13).

Nükleotid sentezi ve metilasyon reaksiyonları için kritik bir koenzim olarak, folat tek bir karbon metabolizmasında merkezi bir role sahiptir ve tek başına folat azalması metil havuzunun bozulması için yeterlidir (15). Yakın zamandaki çalışmalar, yüksek düzeydeki diyet folat alımı ile meme kanseri ve kolorektal kanser dahil olmak üzere birçok yaygın kanser için azalan risk arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir (16, 17). Bir karbon ve folat metabolizmasında rol oynayan kilit bir enzim olan TS, nükleotid biyosentetik yolunda, dUMP'nin metilasyonunu, de novo hücrel timidilat üretiminin anahtar kaynağı olan dTMP'ye dönüştüren önemli bir rol oynar (18). Önceleri, TS'deki fonksiyonel polimorfizmlerin folat metabolizmasında değişikliklere katkıda bulunduğu ve hematolojik malignite riskleri ile bağımsız olarak ilişkili olduğu bulunmuştur (19, 20, 21, 22, 23). 3T formundaki TS'nin, 2T ve dört, beş veya dokuz tekrarlar dahil olmak üzere, varyant formda olanlardan daha yüksek TS tran-

skripsiyonu sergilediği bildirilmiştir. Azalmış mRNA stabilitesi, bir mRNA azalması ve daha düşük TS ekspresyonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (24, 25).

TS geninde var olan 2T/3T polimorfizm beyaz ırkta NHL riskini artırmış, ancak TS, 3'-UTR polimorfizmi (6bp/6bp) ile hematolojik malignite oluşumunda riskin azalmış olduğu gösterilmiştir (26). TS 2T/3T ve TS3'-UTR polimorfizmlerinin fonksiyonel özellikleri kesin olmamasına rağmen, yapılan metaanaliz çalışması ile hematolojik malignitelerin riskleri açısından önemli etkilere işaret etmektedir (26). Bizim verilerimiz sonucuna paralel olarak yapılan bir meta analiz sonucu 2T/3T polimorfizminin ile çocuk hastalarda artmış ALL riski arasında önemli bir ilişki olduğunu doğrulanmış ancak erişkin kişilerde ALL riskinin azaldığı belirlenmiştir. Bu meta-analizde, belirli bir yaş çocuklar veya yetişkinleri sınıflandırmak için kullanılmamışlar her çalışma için aynı yaş grubu referans alınmıştır (26).

ALL, çocukluk çağında en yaygın görülen kanserdir ve gelişmiş ülkelerde tekrarlamadan % 80'lere varan sağkalım oranları bulunmaktadır (27). Çalışmamızda genin göreceli daha az ekspresyonun olduğu 2T/2T taşıyıcılarının çocukluk çağı ALL oluşumunda bir yakınlık oluştururken, bu ve diğer TS genotiplerinin AML'ye bir yakınlık oluşturmadığını belirlemiştir.

Etik Komite Onayı: Yazarlar çalışmanın World Medical Association Declaration of Helsinki "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects", (amended in October 2013) prensiplerine uygun olarak yapıldığını beyan etmişlerdir.

Hasta Onamı: Yazılı hasta onamı bu çalışmaya katılan hastalardan alınmıştır.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - C.G.E., U.Ö.; Tasarım - C.G.E., U.Ö.; Denetleme - C.G.E., U.Ö.; Kaynaklar - C.G.E., U.Ö.; Gereçler - C.G.E., U.Ö.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - C.G.E., U.Ö.; Analiz ve/veya Yorum - C.G.E., U.Ö.; Literatür Taraması - C.G.E.; Yazan - C.G.E.; Eleştirel İnceleme -U.Ö.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 1572/16012001 ve 1554/16012001).

Ethics Committee Approval: The authors declared that the research was conducted according to the principles of the World Medical Association Declaration of Helsinki "Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects", (amended in October 2013).

Informed Consent: Written informed consent was obtained from the patients who participated in this study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - C.G.E., U.Ö.; Supervision - C.G.E., U.Ö.; Resource - C.G.E., U.Ö.; Materials - C.G.E., U.Ö.; Data Collection and/or Processing - C.G.E., U.Ö.; Analysis and/or Interpretation - C.G.E., U.Ö.; Literature Search - C.G.E.; Writing - C.G.E.; Critical Reviews - U.Ö.

Conflict of Interest: The authors have no conflict of interest to declare.

Financial Disclosure: This study was supported by the Research Fund of Istanbul University (Project No: 1572/16012001 and 1554/16012001).

KAYNAKLAR

- Rodriguez-Abreu D, Bordoni A, Zucca E. Epidemiology of hematological malignancies. *Ann Oncol* 2007;18 (Suppl. 1): i3 -i8. [CrossRef]
- Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; 60: 277- 300. [CrossRef]
- Descatha A, Jenabian A, Conso F, et al. Occupational exposures and haematological malignancies: overview on human recent data. *Cancer Causes Control* 2005; 16: 939-53. [CrossRef]
- Irigaray P, Newby JA, Clapp R, et al. Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview. *Biomed Pharmacother* 2007; 61: 640-58. [CrossRef]
- Skibola CF, Curry JD, Nieters A. Genetic susceptibility to lymphoma. *Haematologica* 2007; 92: 960- 9 69.
- Koppen IJ, Hermans FJ, Kaspers GJ. Folate related gene [6] polymorphisms and susceptibility to develop childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2010; 148: 3-14. [CrossRef]
- Krajinovic M, Costea I, Chiasson S. Polymorphism of the thymidylate synthase gene and outcome of acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2002; 359: 1033-34. [CrossRef]
- Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, Takeishi K. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct Funct* 1995; 20: 191-7. [CrossRef]
- Hori T, Ayusawa D, Shimizu K, Koyama H, et al. Chromosome breakage induced by thymidylate stress in thymidylate synthase-negative mutants of mouse FM3A cells. *Cancer Res.* 1984; 44: 703-9.
- Kim YI. Folate and carcinogenesis: evidence, mechanisms, and implications. *J Nutr Biochem* 1999;10: 66-88. [CrossRef]
- Hishida A, Matsuo K, Hamajima N, Ito H, et al. Associations between polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and susceptibility to malignant lymphoma. *Haematologica* 2003; 88: 159-66.
- Horie N, Aiba H, Oguro K, Hojo H, et al. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5'-terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct Funct* 1995; 20: 191-7. [CrossRef]
- Pullarkat ST, Stoehlmacher J, Ghaderi V, Xiong YP, et al. Thymidylate synthase gene polymorphism determines response and toxicity of 5-FU chemotherapy. *Pharmacogenomics J* 2001; 1: 65-70. [CrossRef]
- Kawakami K, Omura K, Kanehira E and Watanabe Y. Polymorphic tandem repeats in the thymidylate synthase gene is associated with its protein expression in human gastrointestinal cancers. *Anticancer Res* 1999; 19: 3249-52.
- Duthie SJ. Folate and cancer: how DNA damage, repair and methylation impact on colon carcinogenesis. *J Inherit Metab Dis* 2011; 34: 101-9. [CrossRef]

16. McCullough ML, Giovannucci EL. Diet and cancer prevention. *Oncogene* 2004; 23: 6349-64. [\[CrossRef\]](#)
17. Sauer J, Mason JB, Choi SW. Too much folate: a risk factor for cancer and cardiovascular disease? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009; 12: 30-6. [\[CrossRef\]](#)
18. Lehman NL. Future potential of thymidylate synthase inhibitors in cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 2002; 11: 1775-87. [\[CrossRef\]](#)
19. Lightfoot TJ, Skibola CF, Willett EV, et al. Risk of non-Hodgkin lymphoma associated with polymorphisms in folate-metabolizing genes. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 2999-3003. [\[CrossRef\]](#)
20. Hishida A, Matsuo K, Hamajima N, et al. Associations between polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and susceptibility to malignant lymphoma. *Haematologica* 2003; 88: 159-66.
21. Skibola CF, Smith MT, Hubbard A, et al. Polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and risk of adult acute lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 99: 3786-91. [\[CrossRef\]](#)
22. De Jonge R, Hooijberg JH, van Zelst BD, et al. Effect of polymorphisms in folate-related genes on in vitro methotrexate sensitivity in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2005; 106: 717-20. [\[CrossRef\]](#)
23. Skibola CF, Forrest MS, Coppede F, et al. Polymorphisms and haplotypes in folate-metabolizing genes and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 2004; 104: 2155-62. [\[CrossRef\]](#)
24. Mandola MV, Stoehlmacher J, Zhang W, et al. A 6 bp polymorphism in the thymidylate synthase gene causes message instability and is associated with decreased intratumoral TS mRNA levels. *Pharmacogenetics* 2004; 14: 319-27. [\[CrossRef\]](#)
25. Lincz LF, Scorgie FE, Garg MB, et al. Identification of a novel single nucleotide polymorphism in the first tandem repeat sequence of the thymidylate synthase 2R allele. *Int J Cancer* 2007; 120: 1930-4. [\[CrossRef\]](#)
26. Yu Weng, Jun Zhang, Xue Tang, Xinyou Xie, Guangdi Chen. Thymidylate synthase polymorphisms and hematological cancer risk: a meta-analysis. *Leuk Lymphoma* 2012; 53: 1345-51. [\[CrossRef\]](#)
27. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 2008; 371: 1030-43. [\[CrossRef\]](#)

Polisitemia Vera'da CXCL9-CXCR3 Sitokin Sinyal Yolağının Etkisi

Effect of CXCL9-CXCR3 Cytokine Signaling Pathway in Polycytemia Vera

Cemil Altunay¹, Akif Selim Yavuz², Selçuk Sözer Tokdemir¹

¹Istanbul Üniversitesi, Aziz Sançar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²Istanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Cite this article as: Altunay C, Yavuz AS, Sözer Tokdemir S. Effect of CXCL9-CXCR3 Cytokine Signaling Pathway in Polycytemia Vera. Experimed 2018; 8(3): 84-92.

ÖZ

Amaç: Miyeloproliferatif Neoplaziler (MPN), miyeloproliferatif bozukluklar arasında en sık görülen hastalıklardandır. Tamamen işlevsel olan ve son aşamaya kadar farklılaşmış kan hücrelerinin aşırı üretimi ile karakterize edilirler. Önceki çalışmalarda Granülosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktörün (GM-CSF) sağlıklı hematopoietik kök hücreler (HKH)'de proliferasyon kontrolünden sorumlu CXCR3 ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmanın amacı, CXCL9-CXCR3 sinyal yolağının MPN progresyonunda etkisinin araştırılmasıdır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada, MPN ve sağlıklı insan perifer kan mononükleer hücrelerinde (MNH) ve kanser HKH de CXCL9 kemokini ve bunun reseptörü olan CXCR3'ün iki izoformunun (CXCR3A ve CXCR3B) gen ifade seviyeleri, MNH yüzeyinde ise CXCR3 reseptör varlığı incelenmiştir. Ekspresyon seviyelerini araştırmak amacıyla kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), hücre yüzey reseptör durumunun incelenmesi içinse akım ölçer metotları kullanılmıştır. GM-CSF'in MNH ve CD34+ hücrelerinde uygulamasının ardından CXCR3 ekspresyonu değerlendirilmiştir.

Bulgular: MNH'de CXCR3A ifadesinin hastalarda sağlıklılara göre istatistiksel olarak anlamlı arttığı bulunmuştur. Hasta ve sağlıklı kontrol grupları arasında CXCR3B ve CXCL9 ifade seviyeleri kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir. CXCR3 Hücre yüzey reseptör durumuna bakıldığında ise hastalardan elde edilen MNH'deki anlatımda sağlıklı gruptan elde edilenlere göre anlamlı bir azalma olduğu görülmüştür.

Sonuç: Bu sonuçlar MPN'de CXCR3A/CXCR3B dengesi ile bu reseptörlere özgün olarak bağlanan kemokinler CXCL9, CXCL10 ve CXCL11'in inflamasyon ve kanser progresyonu ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Myeloproliferatif neoplaziler, JAK2V617F, CXCR9-CXCL3

GİRİŞ

Myeloproliferatif neoplaziler (MPN) Miyelofibroz (MF), Polisitemia vera (PV) ve Esansiyel trombositemi'den (ET) oluşur (1, 2). BCR-ABL-negatif MPN'ler olarak da adlandırılan klasik MPN'ler, miyeloproliferatif bozukluklar arasında en sık görülen hastalıklardır (3). MPN'ler, tamamen işlevsel olan, son aşamaya kadar farklılaşmış kan hücrelerinin aşırı üretimi ile karakterize edilir. Bu hematopoietik hücre bozuklukları, miyeloid soy hücre tiplerinin (≥ 1) klonal proliferasyonu ile karakterize edilir (1, 2, 4). Çoğunlukla Janus kinaz 2 (JAK2), kalretikülün (CALR) veya trombopoietin reseptörü (MPL) gen-

ABSTRACT

Objective: Myeloproliferative neoplasms (MPNs) are among the most common myeloproliferative disorders. MPNs are characterized by excessive production of terminally differentiated blood cells. The expression of CXCR3, responsible for regulating the proliferation of healthy hematopoietic stem cells, is known to be induced by granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF). The aim of this study is to investigate the role of CXCL9-CXCR3 signaling pathway in the progression of MPN.

Material and Method: We determined the expression of CXCL9 and two isoforms of the CXCR3 receptor (CXCR3A and CXCR3B) on the surface of human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and cancer stem cells. Real-time polymerase chain reaction (qPCR) was used to measure expression levels, and flow cytometry was used to examine the presence of cell surface receptors. In addition, qPCR was used to quantify CXCR3 expression after GM-CSF application in cell culture. In PBMC and CD34+ cells, the mRNA level of CXCR3A expression was found to be elevated in patients with MPN.

Results: There was no statistically significant difference in mRNA expression of CXCR3B and CXCL9 between patients and healthy controls. There was significant reduction in cell surface expression of the CXCR3 receptor in PBMC obtained from patients. T

Conclusion: Thus, these results indicate that imbalance in the expression of CXCR3A/CXCR3B isoforms and chemokines CXCL9, CXCL10 and CXCL11 that bind to these receptors, may mediate inflammation and cancer progression in MPN.

Keywords: Myeloproliferative disorders, JAK2V617F, CXCL9-CXCR3

Sorumlu Yazar/Corresponding Author: Selçuk Sözer Tokdemir **E-mail:** ssozer@istanbul.edu.tr

Geliş Tarihi/Received Date: 27.11.2018 **Kabul Tarihi/Accepted Date:** 18.12.2018

© Copyright 2018 by The Istanbul University Faculty of Science • Available online at <http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/>

© Telif Hakkı 2018 İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi • Makale metnine http://experimed.istanbul.edu.tr/tr/_sayfasından ulaşılabilir.

lerindeki mutasyonlarla ilişkilidir (5-11). Klinik bulgular MPN alt tipine göre değişebilir. Bunlar arasında polisitemi, anemi, lökositoz, trombositoz, yorgunluk ve hepatosplenomegali bulunur (5, 12, 13). Genel olarak, hastalar trombotik ve tromboembolik olaylarda artmış risk taşırlar ve genel popülasyona göre daha yüksek mortalite riskine sahiptirler (14-29). MF'ye (PV veya ET olanlar için) veya akut miyeloid lösemiye ilerlemeler hastalar arasında büyük bir endişe kaynağı olmaya devam etmektedir (5, 20). MPN'ler, çoğu hasta için genellikle düşük yaşam kalitesine yol açan hastalıklardır (20-24). Semptomlar kaşıntı, gece terlemeleri, mikrovasküler belirtiler, splenomegali ve splenomegali ile ilişkili bulguları (örn; karın ağrısı, erken tokluk) içerebilir ve yorgunluk en şiddetli göstergelerden biridir (12, 21-23).

Enflamatuvar sitokinlerin, kemokinlerin ve büyüme faktörlerinin hücrel kaynakları çoktur. Bu kaynaklar, MPN alt tipine ve ilişkili komplikasyonlara (tromboz ve kemik iliği fibrozu) bağlı olarak değişir. ET, PMF ve PV hastalarında, sağlıklı bireylere kıyasla, çeşitli sitokinlerin plazma seviyelerinde yükselme saptanmıştır (25). Bu bulgu, inflamatuvar bir sürecin MPN'nin fizyopatolojisine dahil olabileceğini, kemokinlerin otokrin, parakrin ve endokrin davranışlarında rol oynayabileceğini ve hatta hematopoietik nişi etkileyebileceğini göstermektedir. MPN hastaları ile yapılan çalışmalarda sağlıklı bireylere kıyasla yüksek kemokin üretim sıklığı ile karakterize olan işlevsiz kemokin üretimi gösterilmiştir. Ayrıca, kemokin seviyeleri ve hematolojik parametreler arasındaki korelasyon, bağışıklık düzensizliğinin hematolojik hücrelerin üretimini etkileyebileceğini ve şiddetle çoğalmasını desteklediğini göstermektedir. Bulgular ayrıca MPN hastalarında kemokinlerin aşırı prodüksiyonunu, bunun proinflamatuvar bir durumla sonuçlandığını vurgulamaktadır (25). Yapılan bir çalışmada, Granülosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktörün (GM-CSF) sağlıklı hematopoietik kök hücrelerde proliferasyon kontrolünden sorumlu CXCR3 ekspresyonunu arttırdığı gösterilmiştir.

Bu gelişmeler ışığında, CXCL9-CXCR3 sinyal yolağı MPN progresyonunda etkili olup olmadığı önem kazanmaktadır. Çalışmamızın amaçları MPN'de önemli oldukları düşünülen CXCL9 kemokininin ve reseptörü CXCR3'ün MPN hasta ve kontrol MNC'lerinde, kanser kök hücrelerinde ve CXCR3'ün MNC hücre yüzey anlatım düzeylerinin araştırılmasıdır.

Çalışmamızın hedefi, MPN prognoz ve tedavi süreçlerinin kolaylaştırılmasına katkı sağlamaktır. Bulgular bilimsel çalışmaları yeni kemokin ve kemokin reseptörlerini de prognoz ve tedavi süreçlerinde etkili olmaları açısından aday hale getirebilecektir. MPN'de kemokin ve kemokin reseptörlerinin hastalık süreçlerine etkisini gösteren herhangi bir bilimsel çalışma mevcut değildir. Çalışmamızda elde edilen veriler MPN'nin yanında diğer MPN'lere ve farklı kanser türlerine katkı sağlayabilecek potansiyelindedir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Mononükleer Hücre İzolasyonu ve Hücre Çözme

İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi Hematoloji Polikliniğinde teşhis konulmuş olan MPN tanısı almış ve onam formu

imzalatılmış toplam 32 hastada flebetomi uygulanarak toplanan perifer kan mononükleer hücreleri (MNH) ve kontrol olarak kullanılan gönüllü olarak çalışmaya katılan 10 sağlıklı erişkinden elde edilen perifer kan MNH'leri, fikal gradient santrifüj yöntemi ile ayrıştırıldı ve toplandı. Toplanan bu MNH'ler daha sonra yüzey belirteçlerine göre izole edilerek DNA ve RNA izolasyonunda kullanıldı.

Sağlıklı kontrol kanlarından elde edilen MNH'ler dondurulmadan direkt olarak deneylerde kullanıldı. Bu nedenle bu grup için hücre çözme işlemi uygulanmadı.

Hasta kanından MNH izolasyonundan sonra kalan MNH'ler sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere donduruldu. Hücrelerin çalışmalarda kullanılması gerektiğinde hücreler azot tankından alındı ve hücre çözme protokolü uygulandı. Çalışma, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Hücre Ayrımı

Kök hücre ayrımı için iki farklı popülasyon hedeflenmiştir. Bunlar CD34⁺ ve CD34⁺Lineage⁻ popülasyonlarıdır. İlk olarak, CD34⁺ hücreler 'CD34 MicroBeads' ile manyetik olarak işaretlendi. Daha sonra, hücre süspansiyonu bir 'MACS Ayrıcı'nın manyetik alanına yerleştirilen 'MACS® Kolona' yüklendi. Manyetik olarak işaretlenmiş CD34⁺ hücreler, kolonun içerisinde tutunurlar. Kolonu manyetik alandan çıkardıktan sonra, tutunmuş olan CD34⁺ hücreler pozitif seçilmiş hücreler olarak saflaştırıldı. Manyetik ayırmadan sonra saflık analizi yapıldı. Bunun için bir miktar hücre alınıp CD34 PE Antikor ile boyandıktan sonra akım hücre ölçer cihazında analiz edildi.

Kök hücrelerin izolasyonu, iki aşamalı bir prosedürde gerçekleştirildi. İlk olarak, Lin⁺ hücreler (CD2, CD3, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD61 ve CD235a (Glikopin A)), spesifik antijenlere ve Anti-Biotin MicroBeads'e karşı biyotin-konjuge antikorların bir kokteyli ile manyetik olarak işaretlendi. Hücreler manyetik alanına yerleştirilen bir kolon üzerinde manyetik olarak ayrıldılar, işaretlenmemiş Lin⁻ hücreler akıp geçerken manyetik olarak etiketlenmiş Lin⁺ hücreler kolon içinde kalır. İkinci adımda, Lin⁻ kök hücreler doğrudan CD34 işaretleyici ile etiketlendi. Ardından bir manyetik ayırma daha yapıldı ve CD34⁺ kök hücreler, kolonun manyetik alandan çıkarılmasından sonra elde edildi. Prosedür elde edilen PBMC sayısı belirlendikten sonra uygulandı.

Hücrelerden DNA İzolasyonu

Sağlıklı bireylerden ve MPN hastalarından toplanan perifer kanlardan izole edilen MNH'ler ve iki farklı kit kullanılarak, hücre ayırıcı ile ayrımı sağlanmış CD34⁺, CD34⁻ hücreler için DNA izolasyonu yapıldı. DNA, uzun süreli saklama için -20°C'de, kısa süre içinde kullanılacağına +4°C'de saklandı.

İki Aşamalı Allel Spesifik PZR

İki aşamalı veya iç içe polimeraz zincir reaksiyonu (allel spesifik PZR), spesifik olmayan bağlanmayı azaltarak istenmeyen ürünlerin oluşmasını engelleyen bir polimeraz zincir reaksiyon

modifikasyonudur. İki faklı primer seti gerektirir. İlk primer seti ile mutasyonu içeren bölge çoğaltılır. İlk aşamadan sonra jelde 521 bç'lik DNA parçaları görülür. İlk aşama sonunda mutant ve yabanil tipteki JAK2 geni ayırt edilememektedir. PZR işleminin 2. aşamasında mutasyon bölgesine özgü farklı primer setleri kullanılır. Bu şekilde sadece istenilen bölgenin çoğaltılması sağlanarak spesifik bantlar elde edilir. Reaksiyon sonrasında örnekler agaroz jelde yürütüldü ve görüntüleri alındı. Jele yüklenen örneğin mutant alleli (JAK2V617F) taşıması durumunda 279 bç uzunluğunda bir bant görülür, yabanil tip allel taşıması durumunda ise 229 bç uzunluğunda bir bant görülür. Allel spesifik nested PZR'da kullanılan primerler başka çalışmada belirtilmiştir.

RNA İzolasyonu ve Gerçek Zamanlı Kantitatif PZR (q-PCR)

Sağlıklı kontrollerden ve MPN hastalarından alınan perifer kanlardan izole edilen MNH'lerden, CD34⁺ ve CD34⁻ hücrelerden RNA elde etmek amacıyla 'Jena Bioscience - Total RNA Purification Kit' kullanıldı.

Sağlıklı ve hasta MNH'lerden ve CD34⁺ ve CD34⁻ kök hücrelerden izole edilen RNA örneklerinden komplementer DNA (cDNA) elde edildi. cDNA elde etmek amacıyla "Script cDNA Sentez Kiti (Jena Bioscience)" kullanıldı.

CXCR3A, CXCR3B ve CXCL9 genlerinin Polisitemia Vera prognozunda etkili olduğu düşünüldüğünden, bu genlerin olası ekspresyon değişimlerinin hastalıkla ilişkisini incelemek amacıyla gen ifade analizleri yapıldı. Gerçek zamanlı kantitatif PZR ile karşılaştırmalı ölçümler SYBR Green kullanılarak elde edilmiştir ve referans gen olarak GAPDH kullanıldı. CXCR3A geni için, ENST00000373693.3 kodlu transkript varyantı kullanıldı. Varyantın boyu 1624 bp olup 368 amino asitlik bir proteini kodlamaktadır. CXCR3A gen dizisi 5' ACCCAGCAGC-CAGAGCAC 3' ve 5' TCATAGGAAGAGCTGAAGTTCTCCA 3' primerler kullanıldı. CXCR3B geni için, ENST00000373691.4 kodlu transkript varyantı kullanıldı. Varyantın boyu 1861 bp olup 415 amino asitlik bir proteini kodlamaktadır. Amplikon boyutu 111 nükleotittir. CXCR3B gen 5' CAACCACAAGCACCA-AAGC 3' ve 5' TCTTCTGCGTGATCCCATC 3' primerler kullanıldı. CXCL9 geni için, ENST00000264888.5 kodlu transkript varyantı kullanıldı. Varyantın boyu 2740 bp olup 125 amino asitlik bir proteini kodlamaktadır. Amplikon boyutu 73 nükleotittir. CXCL9 gen 5' CCTTAAACAATTTGCCCAAG 3' ve 5' TTGAATC-CATTCTTCAGTGTAGC 3' primerler kullanıldı. GAPDH geni için, ENST00000229239.9 kodlu transkript varyantı kullanıldı. Varyantın boyu 1875 bp olup 335 amino asitlik bir proteini kodlamaktadır. Amplikon boyutu 66 nükleotittir. GAPDH için 5' AGCCACATCGCTCAGACAC 3' ve 5' GCCCAATACGCCAAATCC 3' primerleri kullanıldı.

Akım Sitometri Cihazında Hücre Yüzey Analizi

Sağlıklı kontrollerden ve hastalardan elde edilen MNH, CD34⁺ ve CD34⁻ hücre gruplarının yüzeylerinde CXCR3 reseptörünün durumu incelendi. İşlem için her bir tüpte 50 000 - 100 000 hücre kullanıldı.

CD34⁺ ve CD34⁺Lin⁻ Hücrelere GM-CSF Uygulaması

Literatürde GM-CSF'in (Granülosit-Makrofaj Koloni Stimulasyon Faktörü) sağlıklı CD34⁺ hücrelerde CXCR3 gen ifadesini arttırdığı bilinmektedir (26). MPN hastalarında elde edilen CD34⁺ ve CD34⁺Lin⁻ hücreler 2 gün boyunca GM-CSF ile muamele edilmiştir. Uygulanan GM-CSF konsantrasyonu 10 ng/ml'dir. Besi yeri olarak IMDM-%20 FBS kullanılmıştır. 6-kuyulu tabağın her bir kuyusuna 3 mL besiyeri içinde 100 000-150 000 hücre eklenecek şekilde uygulandı. 2 gün sonunda toplanan hücrelerden sırasıyla RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve kantitatif PZR işlemleri uygulandı. Bu işlem ayrıca hasta MNC ve kordon kanı hücreleri için uygulandı.

Ekspresyon analizi amacıyla uygulanan qPCR'de her bir örnek için triplike çalışma gerçekleştirildi. PZR verimi 2 olarak belirlendi.

Ekspresyon Verilerinin İstatistiksel Analizi

CXCR3A, CXCR3B ve CXCL9 gen ekspresyon düzeyleri GAPDH referans geni kullanılarak araştırıldı. $2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(Ct_{Hasta} - Ct_{Referans}) - (Ct_{Sağlıklı} - Ct_{Referans})}$ yöntemi ile hesaplandı (27). Grafikleri oluşturma ve istatistiksel analizler için GraphPad Prism 5.0 yazılımı kullanıldı. Sağlıklı ve hasta örneklerin karşılaştırmalı mRNA düzeylerini incelemek için Mann-Whitney U testi uygulandı. Mann-Whitney U testi, aynı popülasyondan gelen iki örneği karşılaştırmak için kullanılan ve iki örneğin eşit olup olmadığını test etmek için kullanılan, parametrik olmayan bir testtir.

BULGULAR

İki Aşamalı Allel Spesifik PZR Sonuçları

Tüm hastalarda mononükleer hücre (MNH) DNA 'larından JAK-2V617F mutasyon durumunu tespit etmek amacıyla allel spesifik nested PZR yapıldı. Çalışmada kullanılan MPN hasta örneklerinden 17 hastanın JAK2V617F heterozygot allel taşıdığı, 15 hastanın ise JAK2 yabanil tip allel taşıdığı tespit edilmiştir (Tablo 1).

Gen İfadesi Sonuçları

Yapılan gen ifadesi çalışmaları öncelikle hasta ve kontrol toplam mononükleer hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Literatürde belirtildiği üzere CXCR3'ün toplam MNH ve lenfosit ekspresyonları arasında rölatif bir fark olmadığından (28) lenfosit izolasyonu yapılmayıp ifade toplam MNH'de tespit edilmiştir.

Yapılan gen ifadesi analizlerinde mononükleer hücrelerden elde edilen RNA'lar kullanılarak CXCR3B geni için: 27 hasta, 10 kontrol (Şekil 1a); CXCR3A geni için: 27 hasta, 10 kontrol (Şekil 1b) ve CXCL9 geni için ise 26 hasta 9 kontrol (Şekil 1c) kullanılarak mononükleer hücre RNA'larında gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar p değerleriyle birlikte gösterilmiştir.

Ardından kanser kök hücrelerinde CXCR3 ve CXCL9 gen ifadesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Toplam 4 hastadan elde edilen CD34⁺ ve CD34⁺Lin⁻ gruplarına ait hücreler kullanılmıştır. Bu hücre gruplarında CXCL9 ve CXCR3 anlatım seviyesi tespit edilememiştir.

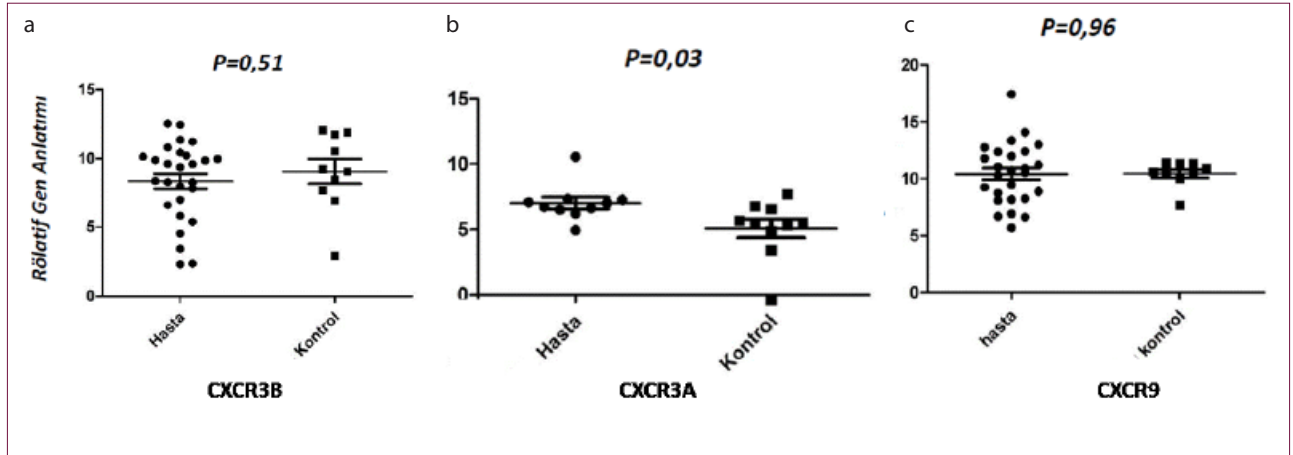
Hücre Yüzey CXCR3 Reseptör Anlatımı

CXCR3 reseptörünün hücre yüzeyindeki durumu akım ölçer cihazıyla elde edilen verilerin analizi ile tespit edilmiştir.

Tablo 1. Çalışmaya katılan hastaların yaş, aldıkları tedavi ve JAK2V617F durumu

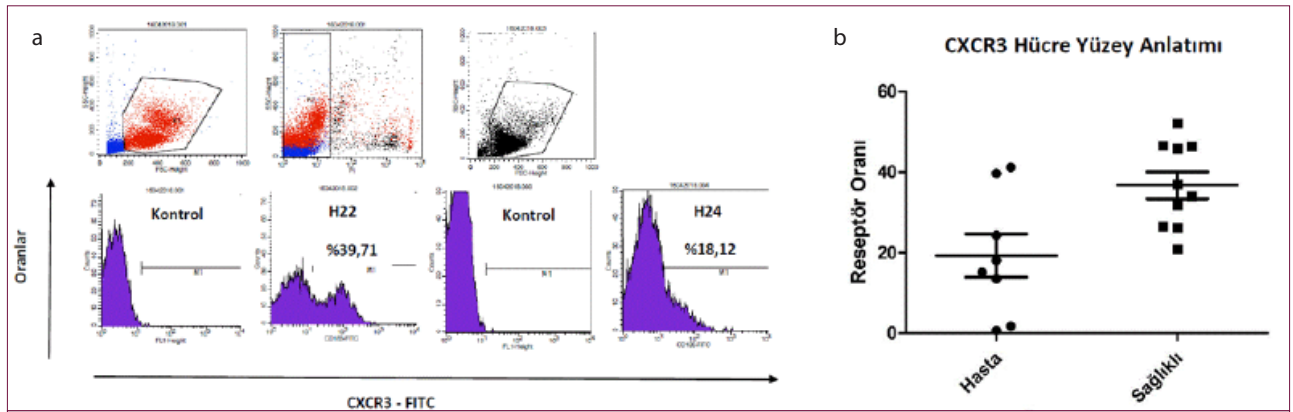
Hasta Numarası	Hasta Yaşı	Tanı Yaşı	Mutasyon Durumu	Aldığı Tedavi
H8	62	50	JAK2V617F Heterozigot allel	F
H11	27	-	JAK2V617F Heterozigot allel	F-H-R-A-İ
H9	29	-	JAK2 Yabani Tip	F
H12	66	59	JAK2V617F Heterozigot allel	F-A-Ü
H15	36	27	JAK2V617F Heterozigot allel	F-H-A-Ü
H17	54	44	JAK2 Yabani Tip	F-A
H18	52	46	JAK2 Yabani Tip	F-H-A-L-At-S
H19	68	63	JAK2V617F Heterozigot allel	F-H-C-Ü
H20	62	-	JAK2 Yabani Tip	F
H23	31	27	JAK2V617F Heterozigot allel	F-H-V
H25	48	41	JAK2 Yabani Tip	F
H28	83	75	JAK2V617F Heterozigot allel	F-H-Ü
H29	32	-	JAK2V617F Heterozigot allel	F-H-A-Ü
H34	56	43	JAK2 Yabani Tip	F
H35	70	66	JAK2V617F Heterozigot allel	F
H37	53	35	JAK2 Yabani Tip	F-A
H38	63	54	JAK2V617F Heterozigot allel	F-A-Ü-H
H39	39	-	JAK2V617F Heterozigot allel	F-H-A
H43	59	45	JAK2V617F Heterozigot allel	F-H-A-Ü
H10	56	48	JAK2 Yabani Tip	F
H14	92	64	JAK2 Yabani Tip	F
H16	58	--	JAK2 Yabani Tip	F
H24	71	-	JAK2 Yabani Tip	F-A-C
H36	71	63	JAK2 Yabani Tip	F-Ko-Cl
H56	55	49	JAK2 Yabani Tip	F-A
H13	69	52	JAK2V617F Heterozigot allel	F-A-H
H21	48	41	JAK2V617F Heterozigot allel	F-A-Ü
H22	65	54	JAK2 Yabani Tip	F-A-H-Ü
H26	55	45	JAK2V617F Heterozigot allel	F-H-T-Ü-A
H46	55	53	JAK2V617F Heterozigot allel	F-H-A
H54	55	55	JAK2V617F Heterozigot allel	F-A
H57	55	-	JAK2 Yabani Tip	F

Tabloda Kullanılan Kısaltmalar: F: Flebetomi, H: Hidroksiüre, T: Tromboredüktin, Ü: Ürikoliz, A: Asetilsalisilik Asit, R: Ruxolitinib, L: Larcadip, At: Ator, S: Saneloc, C: Coraspin, Ko: Kordexa, Cl: Clexane



Şekil 1. CXCR3A, CXCR3B ve CXCR9 gen ifadeleri

CXCR3B: Hasta ve kontrol sütunları için "ortalama \pm standart sapma" değerleri sırasıyla 8.366 ± 0.5493 n=27 ve 9.06 ± 0.88 'dir. Toplam Örnek Sayısı (n)=27 hasta, n=10 kontrol'dür. p=0,51'dir (a); CXCR3A: 7.02 ± 0.44 n=10 ve " 5.08 ± 0.71 n=27 hasta, n=10 kontrol , p=0,03'tür (b); CXCR9: 10.42 ± 0.53 n=26 ve 10.46 ± 0.37 . n=26 hasta, n=9 kontrol , p=0,96'dır (c)



Şekil 2. CXCR3 'ün mononükleer hücre yüzeı değerlendirilmesi

Akım Ölçer analizinde kullanılan kapılama özellikleri ve örnek olarak sunulmuş Hasta 22 ve 24 analiz sonuçları (a); hasta ve kontrol sütunları için "ortalama \pm standart sapma" değerleri sırasıyla 19.33 ± 5.39 'dir. Toplam hasta sayısı=8 ve 36.78 ± 3.35 toplam sağlıklı kontrol sayısı=10'dür. p=0,01'dir (b)

Örneklem olarak, 22 ve 24 numaralı hasta MNH hücreleri için elde edilen sonuçlar Şekil 2'te gösterilmiştir. Öncelikle ana hücre popülasyonunun bulunduğu canlı hücre grubunun bulunduğu bölge seçilmiştir. Ardından propidium iodür (PI) ile boyanmamış olan canlı hücrelerin popülasyonunu oluşturan bölge seçilerek bu hücrelerin CXCR3 antikoruyla ifade göre CXCR3 reseptör pozitif/negatif oranları elde edilmiştir. Şekil 2.A'da örnek olarak gösterilmiş H22 CXCR3 reseptörü için %39,71; H24 ise %18,12 oranlarında pozitif ifade tespit edilmiştir.

Toplamda 8 hasta ve 10 sağlıklı kontrol kullanılarak akımölçer analizleri tamamlanmıştır. Verilerin istatistiksel analizi Şekil 2-B'da gösterilmiştir.

CD34+ ve CD34+Lin- Hücrelere GM-CSF Uygulaması Sonuçları

Amaç CD34+ hücrelerde normal şartlarda var olmayan CXCR3 gen ifadesinin MPN hastalarında GM-CSF uygulaması ile artıp artmadığını incelemektir. Perifer kandan elde edilen MNH'lerden CD34+ ve CD34+Lin- hücre popülasyonları GM-CSF ile mu-

mele edildikten sonra RNA izolasyonları ve kantitatif PZR işlemi gerçekleştirildi. Bu deneyler 4 hastada ve sağlıklı kontrol olarak kordon kanı kullanılarak gerçekleştirildi. Yapılan çalışmalarda CD34+ ve CD34+Lin- kök hücre popülasyonlarında CXCR3 anlatımı tespit edilememiştir. GM-CSF uygulamasının da bu anlatımı istatistiksel olarak değiştirmedığı görülmüştür.

Tüm bu çalışmalara ek olarak kullanılmış olan hücre izolasyon ve dondurma tekniklerinin bir artefaktı sonucu CXCR3 gen anlatımında bir farklılık olabileceği test edilmiştir. Bu çalışma için yeni izole edilmiş ve dondurulmuş hücrelerle yapılan deney sonuçları karşılaştırılmış ve taze veya dondurulmuş hücrelerden elde edilen CXCR3 ve CXCL9 gen anlatım sonuçları arasında istatistiksel olarak herhangi bir fark tespit edilmemiştir.

TARTIŞMA

Kemokinler, lenfosit yüzeylerinde bulunan spesifik reseptörler aracılığıyla sinyallerini iletirler (29). MPN hastalarında, sağlıklı bireylere kıyasla, çeşitli sitokin ve kemokinlerin plazma seviyel-

erinde yükselme saptanmıştır. Bu bulgu, inflamatuvar bir sürecin MPN'nin fizyopatolojisine dahil olabileceğini, kemokinlerin rol oynayabileceğini ve hatta hematopoietik nişi etkileyebileceğini göstermektedir. Çalışmamızda, hasta ve sağlıklı kontrol örneklerinden elde edilen periferik kan mononükleer hücrelerde (PBMC) CXCR3A gen ifadesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir ($p=0,03$). Bunun yanında CXCR3B izoformu ve CXCL9 için gen ifadelerinde hasta ve sağlıklılar arasında anlamlı bir farkın mevcut olmadığı sonucu elde edilmiştir (p değerleri sırasıyla 0,96 ve 0,51).

Mevcut literatüre göre, CXCR3A hücre proliferasyonundan ve kemotaksiden sorumluyken CXCR3B'nin büyümeyi inhibe ettiği gösterilmiştir (30-32). Tümör oluşumunda, PBMC'nin proliferasyonu ve migrasyonu engellendiğinde bu hücrelerin istenmeyen ölümü meydana gelmiştir. Bu senaryo, tümör hücrelerinde metastaz için proliferasyon ve migrasyonun bu hücrelerin fizyolojik ölüm sinyallerinden kaçışı ile desteklendiği görüşünü tersine çevrilmiştir. Bu ortamı tümör büyümesi lehine korumak için, CXCR3A ve CXCR3B'nin ifadesi PBMC ve tümör hücrelerinde farklı şekillerde düzenlenmektedir (33).

CXCR3A ekspresyonunun hastalarda artması ve CXCR3B ekspresyonunun değişmemesi MPN'de kemokin aracılı göç sinyalinin hatalı olmasına, MPN-PBMC'nin aşırı derecede artmış kemotaksisine neden olabilir. CXCR3A varyantının, tümör bölgesine sitotoksik T hücresi/Doğal öldürücü hücreler (NK)/Doğal öldürücü T hücrelerinin daha fazla migrasyonunu sağlamak için kemokinleri ile daha fazla etkileşerek uyarılmak üzere gen ifade artışı gösterdiği kanıtlanmıştır (34).

CXCR3 gen ifade profilindeki değişiklikler, kanser gelişiminin başlangıç aşamaları veya metastatik hastalığa ilerlemesi ile ilişkili olabilir. CXCR3A, prostat, yumurtalık, meme ve böbrek kanserinde tümör ilerlemesiyle ilişkilendirilmiştir (35-37). Ayrıca, CXCL9, CXCL10 ve CXCL11'in, seçici olarak CXCR3A'yı eksprese eden insan mast hücre hattı üzerinde proliferasyonu uyardığı gösterilmiştir (38, 39).

MPN'de inflamasyon sıklıkla görülen bir komplikasyondur. Kemokinlerin ve reseptörlerinin tümör mikroçevresindeki habis transformasyondaki rolü hala tartışmalıdır. Kronik inflamasyon, proliferasyona uğrayan hücrelerde, neoplastik transformasyona yol açan DNA hasarına neden olur (40-42). İnflamasyon, kanserde CXCR3'ün artmış ekspresyonuna; promotör demetilasyonunu veya intron CpG bölgelerinin demetilasyonunu uyurarak neden olabilir (43-45). Bu kalıcı inflamasyonun ve CXCL10'un sürekli salgılanmasının, yapısal CXCR3A-kemokin (CXCL10) sinyalleme yoluyla malign neoplastik transformasyonu destekleyen epitel hücrelerde CXCR3A ifadesini artırabileceği gösterilmiştir (46). Bu nedenle çalışmamızda CXCL9'dan sonra CXCL10'un da MPN'deki durumunu araştırmak yeni kapılar açabilir.

MPN'de dikkat çeken önemli semptomlardan bir diğeri kendini ciltte gösterir. Özellikle sıcak bir duşun ardından olmak üzere hastalarda rahatsız edici düzeyde bir kaşıntı semptomu

görülmektedir. IL-29'un CXCR3A taşıyan immün hücrelerin sedef hastalıklı deriye gitmesine katkıda bulunduğu kanıtlanmıştır. IL-29, insan cildindeki hedef hücreler olan keratinositlerde ve melanositlerde CXCR3A'nın ligandları CXCL9, CXCL10 ve CXCL11'in ekspresyonunu uyarmaktadır. CXCL9 uyarımı oldukça zayıfken, CXCL10 indüksiyonu biraz daha kuvvetlidir, IL-29 ile muamele edilmiş keratinositlerde CXCL11'in ekspresyon artışı en kuvvetli şekilde gözlenmiştir. Fare derisine enjekte edildiğinde, IL-29'un mürin karşılığı, T-hücrelerinin lokal infiltrasyonuna, T-hücresinin sitokin ekspresyonuna ve indüklenen iltihaplanma sonucunda deri kalınlaşmasına neden olmuştur. Sedef hastalıklı ciltte CXCR3A ligand ekspresyonu, CXCL11 kan plazma düzeylerinde anlamlı artış ile ve artmış CXCL10 seviyeleri ile ilişkiliyken, IL-29 ile en düşük uyarımlı ligandın (CXCL9) kan konsantrasyonları değiştirilmemiştir. Bu nedenle CXCL11'in kandaki seviyesi, IL-29 ve IFN- γ 'nın lokal aktivitesi için bir biyobelirteç olabilir (47). CXCL9'un çalışmamızda da değişmediği sonucuyla paralel olmasıyla beraber, bu bilgiler birlikte düşünüldüğünde, çalışmamızda CXCR3A ekspresyonunun hastalarda sağlıklı bireylere göre artmış olması ve CXCL9 ekspresyonunun değişmemiş olması CXCL11 ve CXCL10 ligandlarının ilişkili olabileceğine ve araştırılmaları gerektiğine işaret etmektedir.

MPN'de diğer bir semptom hepatomegalidir. Hepatomegali ile hepatik fibroz arasındaki ilişki önceki çalışmalarda kanıtlanmıştır (48). CXCR3; fibroblastlar, epitel ve endotel hücreler, düz kas hücreleri, aktive olmuş T lenfositleri ve dendritik hücreler üzerinde ifade edilir. Bu hücreler ya CXCR3A'yı ya varyantı olan CXCR3B'yı ya da her ikisinin dengeli bir kombinasyonunu ifade eder (49). CXCL4-CXCR3 yolağının uyarılması, karaciğer fibrogenezine katkıda bulunan kemokinlerin de kaynağı olan karaciğer hücrelerinin proliferasyonunu ve aktivasyonunu artırır (50). CXCL4 shRNA'sının, karaciğer hücrelerinde fibroz ile ilişkili proteinlerin (CXCR3, EGFR, JAK2, STAT3 ve Collagen IV) ekspresyonunu anlamlı ölçüde azalttığı bulunmuştur (51). Bu durum, hastalarda CXCR3A ekspresyon artışının MPN hastalarında hepatomegaliye katkı sağlıyor olabileceğini göstermektedir.

Hücre yüzey reseptör ekspresyonu sonuçlarımız CXCR3A ve CXCR3B mRNA seviyesindeki ekspresyon sonucumuzun tam tersi çıkmıştır. Yani CXCR3A mRNA seviyesini hastalarda artmış durumda tespit edilmiş ancak CXCR3 hücre yüzey reseptörünün hastalarda azalmış durumda olduğu sonucu elde edilmiştir. mRNA sonuç olarak proteine çevrildiği için, genellikle mRNA ve protein seviyeleri arasında bir tür korelasyon olduğu varsayılır. Ancak, genellikle mRNA düzeyi ve protein seviyesi arasında tespit edilen zayıf korelasyonların nedenleri vardır ve bunlar karşılıklı olarak uyumlu olmayabilir. İlk olarak, henüz yeterince tanımlanmamış olan ve mRNA'yı proteine çevirmeyle ilişkili çok sayıda, karmaşık ve çeşitli post-transkripsiyonel mekanizmalar vardır. Ayrıca proteinler in vivo yarı ömürlerinde büyük ölçüde farklılık gösterebilirler. Son olarak hem protein hem de mRNA deneylerinde teknik olarak net bir sonuç elde etme yeteneğimizi sınırlandıran önemli miktarda hatalar ve arka plan parazitleri mevcuttur (52, 53).

Çalışmamızda, CXCR3 mRNA ve protein düzeylerinde ifade seviyelerinin ters çıkmasının daha olası bir sebebi reseptör internalizasyonudur. GPCR'nin internalizasyonu ve geri dönüşüm mekanizmaları hakkında elde edilen bilgiler son zamanlarda artmıştır. Internalizasyon bir kez gerçekleştiğinde, bir GPCR için iki durumdan biri mümkündür; ligandın ayrılması ve fonksiyonel reseptörün plazma membranına geri dönüşü veya bozunuşu gerçekleşebilir. Bir transfeksiyon sistemiyle CXCR3'ün CXCL11 ile indüklenmiş internalizasyonunun meydana geldiği bulunmuştur (54). PBMC'ler ile yapılan bir çalışmada CXCL11'in taze izole edilmiş hücreler üzerindeki etkinliğinin CXCL9 ve CXCL10'a göre daha yüksek olduğu belirgin bir şekilde tespit edilmiştir. Yani, CXCL11 CXCR3'ün internalizasyonunu önemli bir şekilde uyarmıştır (55). Bu durum, çalışma sonuçlarımıza göre, CXCL11 ekspresyonunun MPN'de artmış olabileceği şüphesini doğurmaktadır.

CXCR3B ifadesinin azalması tümör ilişkili-anjiyogenezde azalmayla ve tümöre bağımlı immünite ile ilişkilidir. CXCR3B, anti-migrasyon ve anti-anjiyogenez durumlarını sağladığı için her iki izoformu değil de CXCR3A'nın biyobelirteç olarak hedeflenmesinin tercih edilebileceği ifade edilmiştir (56).

Bu çalışma MPN hastalığında CXCR3A/CXCR3B dengesinin bozulmuş olduğunu gösteren ilk çalışmadır. Çalışma, bu reseptörlere özgün olarak bağlanan kemokinlerden CXCL10 ve CXCL11'in de MPN progresyonunda etkili olabileceğine işaret etmektedir.

Sonuç olarak, MPN'de de CXCR3A/CXCR3B dengesi, inflamasyon ve kanser progresyonu ile ilişkili olabilir. MPN'de artmış CXCR3A ekspresyonunun ve CXCR3B ekspresyon durumunun altında yatan mekanizma ile kanser gelişimi ve progresyonundaki rollerini anlamak için ilave çalışmalar gerekmektedir.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan alınmıştır (Karar Sayısı: 13; Karar Tarihi 11/08/2017).

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - C.A., S.S.T.; Tasarım - C.A., S.S.T.; Denetleme - C.A., A.S.Y., S.S.T.; Kaynaklar - A.S.Y., S.S.T.; Gereçler - S.S.T.; Veri Toplanması ve/veya İşlemesi - C.A., S.S.T.; Analiz ve/veya Yorum - C.A., S.S.T.; Literatür Taraması - C.A.; Yazan - C.A., S.S.T.; Eleştirel İnceleme - S.S.T., A.S.Y.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje No: 27338). Ayrıca, kısmi olarak TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (Proje No: 112S483).

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the Clinical Research Ethics Committee of Istanbul

University Istanbul School of Medicine (Decision Number: 13; Decision Date: 08/11/2017).

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author Contributions: Concept - C.A., S.S.T.; Design - C.A., S.S.T.; Supervision - C.A., A.S.Y., S.S.T.; Resource - A.S.Y., S.S.T.; Materials - S.S.T.; Data Collection and/or Processing - C.A., S.S.T.; Analysis and/or Interpretation - C.A., S.S.T.; Literature Search - C.A.; Writing - C.A., S.S.T.; Critical Reviews - S.S.T., A.S.Y.

Conflict of Interest: The authors have no conflict of interest to declare.

Financial Disclosure: This study was supported by grant from Istanbul University Scientific Research Project Council (Project No: 27338) and some parts from The Scientific and Technological Research Council of Turkey (Project No: 112S483)

KAYNAKLAR

1. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114: 937-51. [\[CrossRef\]](#)
2. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127: 2391-405. [\[CrossRef\]](#)
3. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2017; 129: 667-79. [\[CrossRef\]](#)
4. Geyer J, Orazi A. Myeloproliferative neoplasms (BCR-ABL1 negative) and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms: current diagnostic principles and upcoming updates. *Int J Lab Hematol* 2016; 38: 12-9. [\[CrossRef\]](#)
5. Kaplan JB, Stein BL, McMahan B, Giles FJ, Plataniotis LC. Evolving therapeutic strategies for the classic Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *EBio Med* 2016; 3: 17-25. [\[CrossRef\]](#)
6. Geyer HL, Mesa RA. Therapy for myeloproliferative neoplasms: when, which agent, and how? *Blood* 2014; 124: 3529-37. [\[CrossRef\]](#)
7. Tefferi A. Mutations galore in myeloproliferative neoplasms: would the real Spartacus please stand up? : Nature Publishing Group; 2011.
8. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *New Eng J Med* 2013; 369: 2379-90. [\[CrossRef\]](#)
9. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *New Eng J Med* 2013; 369: 2391-405. [\[CrossRef\]](#)
10. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 2006; 3: e270. [\[CrossRef\]](#)

11. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006; 108: 3472-6. [\[CrossRef\]](#)
12. Emanuel RM, Dueck AC, Geyer HL, Kiladjian J-J, Slot S, Zweegman S, et al. Myeloproliferative neoplasm (MPN) symptom assessment form total symptom score: prospective international assessment of an abbreviated symptom burden scoring system among patients with MPNs. *J Clin Oncol* 2012; 30: 4098. [\[CrossRef\]](#)
13. Geyer HL, Scherber RM, Dueck AC, Kiladjian J-J, Xiao Z, Slot S, et al. Distinct clustering of symptomatic burden among myeloproliferative neoplasm patients: retrospective assessment in 1470 patients. *Blood* 2014; 123: 3803-10. [\[CrossRef\]](#)
14. Barbui T, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Boveri E, Ruggeri M, et al. Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. *J Clin Oncol* 2011; 29: 3179-84. [\[CrossRef\]](#)
15. Tefferi A, Rumi E, Finazzi G, Gisslinger H, Vannucchi A, Rodeghiero F, et al. Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. *Leukemia* 2013; 27: 1874. [\[CrossRef\]](#)
16. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, George G, Begna K, Schwager S, et al. DIPSS-plus: DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. *J Clin Oncol* 2011; 29: 392-7. [\[CrossRef\]](#)
17. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, Morra E, Rumi E, Pereira A, et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood* 2010; 115: 1703-8. [\[CrossRef\]](#)
18. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, Passamonti F, Reilly JT, Morra E, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood* 2009; 113: 2895-901. [\[CrossRef\]](#)
19. Kaifia A, Kirschner M, Wolf D, Maintz C, Hänel M, Gattermann N, et al. Bleeding, thrombosis, and anticoagulation in myeloproliferative neoplasms (MPN): analysis from the German SAL-MPN-registry. *J Hematol Oncol* 2016; 9: 18. [\[CrossRef\]](#)
20. Mesa R, Miller CB, Thyne M, Mangan J, Goldberger S, Fazal S, et al. Myeloproliferative neoplasms (MPNs) have a significant impact on patients' overall health and productivity: the MPN Landmark survey. *BMC Cancer* 2016; 16: 167. [\[CrossRef\]](#)
21. Scherber R, Dueck AC, Johansson P, Barbui T, Barosi G, Vannucchi AM, et al. The Myeloproliferative Neoplasm Symptom Assessment Form (MPN-SAF): international prospective validation and reliability trial in 402 patients. *Blood* 2011; 118: 401-8. [\[CrossRef\]](#)
22. Johansson P, Mesa R, Scherber R, Abellsson J, Samuelsson J, Birgegård G, et al. Association between quality of life and clinical parameters in patients with myeloproliferative neoplasms. *Leuk Lymphoma* 2012; 53: 441-4. [\[CrossRef\]](#)
23. Abellsson J, Andréasson B, Samuelsson J, Hultcrantz M, Ejerblad E, Johansson B, et al. Patients with polycythemia vera have worst impairment of quality of life among patients with newly diagnosed myeloproliferative neoplasms. *Leuk Lymphoma* 2013; 54: 2226-30. [\[CrossRef\]](#)
25. Mesa RA, Niblack J, Wadleigh M, Verstovsek S, Camoriano J, Barnes S, et al. The burden of fatigue and quality of life in myeloproliferative disorders (MPDs). *Cancer* 2007; 109: 68-76. [\[CrossRef\]](#)
26. da Costa Cacemiro M, Cominal JG, Tognon R, de Souza Nunes N, Simões BP, de Figueiredo-Pontes LL, et al. Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms as disorders marked by cytokine modulation. *Hematol Transfus Cell Ther* 2018.
27. Jinquan T, Quan S, Jacobi HH, Jing C, Millner A, Jensen B, et al. CXC chemokine receptor 3 expression on CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: chemotaxis and adhesion induced by its ligands, interferon γ -inducible protein 10 and monokine induced by interferon γ . *Blood* 2000; 96: 1230-8.
28. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 2001; 25: 402-8. [\[CrossRef\]](#)
29. Callahan MK, Williams KA, Kivisäkk P, Pearce D, Stins MF, Ransohoff RM. CXCR3 marks CD4+ memory T lymphocytes that are competent to migrate across a human brain microvascular endothelial cell layer. *J Neuroimmunol* 2004; 153: 150-7. [\[CrossRef\]](#)
30. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994; 76: 301-14. [\[CrossRef\]](#)
31. Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998; 392: 565. [\[CrossRef\]](#)
32. Glaser J, Gonzalez R, Perreau VM, Cotman CW, Keirstead HS. Neutralization of the chemokine CXCL10 enhances tissue sparing and angiogenesis following spinal cord injury. *J Neurosci Res* 2004; 77: 701-8. [\[CrossRef\]](#)
33. Kelsen SG, Aksoy MO, Yang Y, Shahabuddin S, Litvin J, Safadi F, et al. The chemokine receptor CXCR3 and its splice variant are expressed in human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287: L584-91. [\[CrossRef\]](#)
34. Chakraborty K, Bose A, Pal S, Chattopadhyay U, Baral R. Interferon- α 2b Restores the Impaired Chemotactic Activity of Peripheral Blood Mononuclear Cells from Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients by Modulating CXC Receptor Ligand Interaction. *J Interferon Cytokine Res* 2007; 28: 487-500. [\[CrossRef\]](#)
35. Chakraborty K, Bose A, Pal S, Sarkar K, Goswami S, Ghosh D, et al. Neem leaf glycoprotein restores the impaired chemotactic activity of peripheral blood mononuclear cells

- from head and neck squamous cell carcinoma patients by maintaining CXCR3/CXCL10 balance. *Int Immunopharmacol* 2008; 8: 330-40. [\[CrossRef\]](#)
36. Furuya M, Yoneyama T, Miyagi E, Tanaka R, Nagahama K, Miyagi Y, et al. Differential expression patterns of CXCR3 variants and corresponding CXC chemokines in clear cell ovarian cancers and endometriosis. *Gynecol Oncol* 2011; 122: 648-55. [\[CrossRef\]](#)
 37. Wu Q, Dhir R, Wells A. Altered CXCR3 isoform expression regulates prostate cancer cell migration and invasion. *Mol Cancer* 2012; 11: 3. [\[CrossRef\]](#)
 38. Datta D, Contreras AG, Grimm M, Waaga-Gasser AM, Briscoe DM, Pal S. Calcineurin inhibitors modulate CXCR3 splice variant expression and mediate renal cancer progression. *J American Soc Nephrol* 2008; 19: 2437-46. [\[CrossRef\]](#)
 39. Romagnani P, Beltrame C, Annunziato F, Lasagni L, Luconi M, Galli G, et al. Role for interactions between IP-10/Mig and CXCR3 in proliferative glomerulonephritis. *J American Soc Nephrol* 1999; 10: 2518-26.
 40. Romagnani P, Lazzeri E, Lasagni L, Mavilia C, Beltrame C, Francalanci M, et al. IP-10 and Mig production by glomerular cells in human proliferative glomerulonephritis and regulation by nitric oxide. *J American Soc Nephrol* 2002; 13: 53-64.
 41. Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res* 2006; 4: 221-33. [\[CrossRef\]](#)
 42. Perwez Hussain S, Harris CC. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer* 2007; 121: 2373-80. [\[CrossRef\]](#)
 43. Maeda H, Akaike T. Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry* 1998; 63: 854-65.
 44. Ma B, Khazali A, Wells A. CXCR3 in carcinoma progression. *Histol Histopathol* 2015; 30: 781.
 45. Lleo A, Zhang W, Zhao M, Tan Y, Bernuzzi F, Zhu B, et al. DNA methylation profiling of the X chromosome reveals an aberrant demethylation on CXCR3 promoter in primary biliary cirrhosis. *Clin Epigenetics* 2015; 7: 61. [\[CrossRef\]](#)
 46. Kumar DSS, Wells A. CXCR3 epigenome switches splice variants in prostate cancer. *AACR*; 2013.
 47. Urrea S, Fischer MC, Martínez JR, Véliz L, Orellana P, Solar A, et al. Differential expression profile of CXCR3 splicing variants is associated with thyroid neoplasia. Potential role in papillary thyroid carcinoma oncogenesis? *Oncotarget* 2018; 9: 2445. [\[CrossRef\]](#)
 48. Witte E, Kokolakis G, Witte K, Warszawska K, Friedrich M, Christou D, et al. Interleukin-29 induces epithelial production of CXCR3A ligands and T-cell infiltration. *J Mol Med* 2016; 94: 391-400. [\[CrossRef\]](#)
 49. Walters JH, Mc GI. The mechanism of malarial hepatomegaly and its relationship to hepatic fibrosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1960; 54: 135-45. [\[CrossRef\]](#)
 50. Van Raemdonck K, Van den Steen PE, Liekens S, Van Damme J, Struyf S. CXCR3 ligands in disease and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev* 2015; 26: 311-27. [\[CrossRef\]](#)
 51. Wasmuth H, Weiskirchen R. Pathogenesis of liver fibrosis: modulation of stellate cells by chemokines. *Zeitschrift fur Gastroenterologie* 2010; 48: 38-45. [\[CrossRef\]](#)
 52. Li J, Liu B, Shi Y, Xie K-L, Yin H-F, Yan L-n, et al. CXCL4 Contributes to the Pathogenesis of Chronic Liver Allograft Dysfunction. *J Immunol Res* 2016; 2016: 9276986. [\[CrossRef\]](#)
 53. Baldi P, Long AD. A Bayesian framework for the analysis of microarray expression data: regularized t-test and statistical inferences of gene changes. *Bioinformatics* 2001; 17: 509-19. [\[CrossRef\]](#)
 54. Szallasi Z. Genetic network analysis in light of massively parallel biological data acquisition. *Pac Symp Biocomput* 1999; 5-16.
 55. Colvin RA, Campanella GS, Sun J, Luster AD. Intracellular domains of CXCR3 that mediate CXCL9, CXCL10, and CXCL11 function. *J Biol Chem* 2004; 279: 30219-27. [\[CrossRef\]](#)
 56. Meiser A, Mueller A, Wise EL, McDonagh EM, Petit SJ, Saran N, et al. The chemokine receptor CXCR3 is degraded following internalization and is replenished at the cell surface by de novo synthesis of receptor. *J Immunol* 2008; 180: 6713-24. [\[CrossRef\]](#)
 57. Wu Q, Dhir R, Wells A. Altered CXCR3 isoform expression regulates prostate cancer cell migration and invasion. *Mol Cancer* 2012; 11: 3. [\[CrossRef\]](#)

X. AZİZ SANCAR DETAE GÜNLERİ

İmmün Sistem Yetersizlikleri ve Aşılar

29-30 Kasım 2018

Sözlü Bildiriler

SB-01: Erken Evre Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanseri Olgularında Video Yardımlı Mediastinoskopik Lenfadenektomi Uygulamasının Sitotoksik T Lenfositlerinde Sitokin Salınımı ve İmmün Kontrol Noktası Reseptör Ekspresyonlarına Etkisi

Ayşe Engin¹, Akif Turna², Fehim Esen^{1,3}, Melek Ağkoç⁴, Günnur Deniz¹, Esin Aktaş Çetin¹

¹İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, İmmünoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

³İstanbul Medeniyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Göz Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁴İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye

Amaç: Akciğer kanseri kansere bağlı ölümler arasında ilk sırada yer almaktadır. Mediastinal lenf nodlarının (LN) tamamen çıkarıldığı video yardımlı mediastinoskopik lenfadenektomi (VAMLA) yönteminin standart mediastinoskopiye göre sağkalımı arttırdığı gösterilmiştir. Bu çalışmada VAMLA uygulanan küçük hücre dışı akciğer kanseri (KHDAK) hastalarında CD8⁺ sitotoksik T (Tc) lenfositlerinin mediastinal LN ve periferik kan sitokin salınımları, sitotoksik fonksiyonları ve immün kontrol noktası reseptör ekspresyonlarındaki değişimler incelenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamıza VAMLA uygulanan T1-4N0-2M0 KHDAK hastaları (n=17, yaş: 64 ±7 yıl) dahil edildi. VAMLA öncesi periferik kan ve LN, lenfadenektomi sonrası 2. haftada (n=12) periferik kan Tc lenfositlerinde PD1, CTLA-4 ve CD28 ekspresyonları, hücre içi TNF-α & IFN-γ salınımları ve sitotoksik aktiviteleri akan hücre ölçer ile analiz edildi.

Bulgular: CD8⁺ T hücre alt grupları incelendiğinde LN CD8⁺CD28⁻ hücre oranının kana kıyasla arttığı (p=0.021), CD8⁺CD28⁺ hücre oranının ise azaldığı (p=0.014) izlenmiştir. VAMLA yapılması Tc hücre CD28 ekspresyonlarını etkilememiştir. İnhibitör kontrol noktası reseptörlerinden CTLA-4 ve PD-1'ün LN Tc'lerde kandan daha yüksek oranda eksprese edildiği saptanmıştır (p<0.001). VAMLA sonrası kanda CD8⁺PD-1⁺ (p=0.01) ve CD8⁺CTLA-4⁺ (p=0.006) yüzdeleri azalmıştır. Sitotoksikite analizlerinde LN Tc granzim ekspresyonlarında kana göre azalma (p=0.003) saptanırken VAMLA sonrası kanda farklılık bulunmamıştır. Sitokin sekresyonu açısından LN Tc lenfositlerinin TNF-α ekspresyonlarının periferik kana göre anlamlı olarak düştüğü (p=0.003), IFN-γ salınımları ise kan ile benzer düzeylerde olduğu bulunmuştur. VAMLA sonrası Tc sitokin salınımlarında anlamlı farklılık saptanmamıştır.

Tartışma: Tümörü drene eden LN CD8⁺ Tc hücrelerinin efektör fonksiyonlarında azalma, baskılayıcı fenotiplerinde ise artış saptanmıştır. VAMLA sonrasında immün kontrol noktası reseptörlerinden PD-1 ve CTLA-4'teki azalmaya paralel olarak Tc hücre fonksiyon kaybının düzelebileceği ve VAMLA uygulamasının Tc hücreler üzerindeki bu etkisinin sağ kalımda rol oynayabileceği düşünülmektedir.

SB-02: Dermatomiyoit Hastalarının Kas Dokularında Yükselmış IL-4 ve IFN-γ Düzeyleri

Murat Giriş¹, Erdem Tüzün¹

¹İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Sinirbilim Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Amaç: Dermatomiyoit (DM), çizgili kasların inflamasyonu, kas ve deri iltihabı ve artmış kreatin kinaz seviyeleri ile karakterize otoimmün bir hastalıktır. Kas patolojisinde, inflamatuvar hücreler [çoğunlukla B and CD4⁺ T-helper (Th) hücreleri], vaskülit ve perifasi-küler atrofi görülmektedir. DM'ye bağlı vaskülit; membran atağı, kompleks birikimler, endotelial nekroz ve kapiller kayıp ile karakterizedir. Çeşitli çalışmalarda DM'li hastaların kas biyopsi örneklerinde bulunan ve interferon (IFN)-γ, interlökin (IL)-4 ve IL-17 üreten infiltre olan lenfositlerin; hastalıkta çeşitli T-helper(Th) tiplerinin rol oynadığını göstermektedir. Miyositler ve endotelial hücrelerin, özellikle inflamatuvar koşullar altında sitokinler ürettiği ve inflamatuvar sitokinlere maruz kaldığında hücre ölümüne gittiği bilinmektedir. Ancak, DM'de kas dokusunda sitokin üretimi çok az incelenmiştir.

DM oluşumunda kas dokusunun rolünün araştırılması için kas biyopsi örneklerinde, Th1 (IFN-γ), Th2 (IL-4) ve Th17 (IL-17) tipi immü-niteye ait sitokin ve kas zayıflığı arasındaki potansiyel korelasyon araştırıldı.

Gereç ve Yöntem: DM'li 10 hastanın deltoid kas biyopsi örneklerinden ve patolojik miyopati belirtileri olmayan sekiz sağlıklı kontrolden kas homojenatları hazırlandı. Interlökin (IL) -4, interferon (IFN) - γ ve IL-17 düzeyleri enzim bağlantılı immüno-sorbent assay (ELISA) ve Western Blot(WB) analizi ile değerlendirildi. Tüm hasta ve kontrol grubu kas gücü dereceleri kaydedildi.

Bulgular: DM'li kas homojenatlarıyla yapılan WB ve ELISA sonuçlarına göre, IL-4 ve IFN- γ seviyeleri kontrollere göre anlamlı artış gösterirken, IL-17 seviyeleri arasında anlamlı bir fark bulunmadı. DM kas örneklerinde IL-4(p=0.003)ve IFN- γ (p=0.014) seviyeleri kas zaafiyeti ile pozitif korelasyon gösterirken; IL-17(p=0.527) ve diğer iki sitokin arasında korelasyon gözlenmemiştir. IL-4 ve IFN- γ seviyeleri,deltoid kas gücü zaafiyeti ile anlamlı derecede negatif korelasyon gösterildi.

Sonuç: Çalışmamızda, DM patogenezinde Th1 tipi ve Th2 tipi immünitenin rol oynayabileceği gösterilmiştir. Kas dokusunun inflammatuar sitokinler üreterek DM'deki kas güçsüzlüğüne katkıda bulunabileceği düşünölmek ile birlikte, IL-4 ve IFN- γ 'nin kas hücresi sağ kalımına ve fonksiyonunda doğrudan etkisi üzerinde daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Dermatomiyozi, ELISA, interlökin-17, interferon-gamma, interlökin-4

SB-03: Erişkin Primer İmmün Yetersizlikli Hastalarda Genetik Tanı

Hülya Yılmaz¹, Sinem Fırtına³, Özden Hatırnaz Ng⁴, Yuk Yin Ng⁵, Deniz Özmen², Dilek Keskin², Tuğrul Elverdi², Ayşe Salihoğlu², Ahmet Emre Eşkazan², Şeniz Öngören², Teoman Soysal², Zafer Başlar², Müge Sayitoğlu³, Muhlis Cem Ar²

¹İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

³İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar DETAE, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁴Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁵İstanbul Bilgi Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, İstanbul, Türkiye

Amaç: Erişkin yaşta klinik önemi olan ve en sık görölen primer immün yetersizlik, yaygın değişken immün yetersizliktir (YDİY). Yeni nesil dizileme sistemleri ile aynı anda hastalık ile ilişkili birden çok gen taranarak hastalara kısa sürede tanı konulabilmektedir. Çalışmamızda 16 erişkin PAY'li olgu, Uluslararası İmmünoloji Dernekleri Birlięi (İUIS) tarafından belirlenmiş, bu fenotipe neden olabilecek 22 gen ile oluşturulan bir yeni nesil dizileme (YND) paneli ile dizilenmiş ve olgularda genotip-fenotip ilişkisi araştırılmıştır.

Gereç ve Yöntem: İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Hematoloji polikliniğinde takip edilen 16 PAY tanılı hasta, oluşturulan panel (*BTK, IGHM, IGLL1, CD79ALFA, CD79BETA, BLNK, PIK3R1, TCF3, ICOS, CD19, CD81, CD20(MS4A1), CD21(CR2), TACI, LRBA, TNFRSF13C, TWEAK, NFKB2, CD40LG, CD40, AICDA, UNG*) ile dizilenmiş ve aday varyantlar klasik dizileme yöntemi ile valide edilmiştir.

Bulgular: Çalışmaya YDİY (n=14) ve HİGM sendromlu (n=2) 16 hasta dahil edilmiştir. Hastaların ortanca tanı yaşı 30.5 yıl (9-60), kadın-erkek oranı 7'ye 9 idi. İlk olguda (PAY1) aktivasyonla indüklenen sitidin deaminaz (*AICDA*) geninde c.278_288delATGTG-GCCGAC delesyonu saptanmıştır. İkinci olguda (PAY2), urasil N-glikozilaz (*UNG*) geninde c.924_925insGG insersiyon varyantı saptanmıştır.

Tartışma: Otozomal resesif (OR) HİGM sendromlarının sıklığı ve kliniği net olarak bilinmemektedir. PAY1, HİGM-2 olup literatürde beklenenin aksine otoimmünite veya lenfoid hiperplazi geliştirmemiştir. PAY2 ise HİGM-5 olup, tip 1 diyabet tanısı almıştır, ancak lenfoid hiperplazi tespit edilmemiştir.

Sonuç: Erişkin yaşta PAY tanısında gecikme morbidite ve mortalitede artışa sebep olmaktadır. YND sistemleri ile oluşturulan paneller ile hastalara daha kısa sürede, düşük maliyetle ve kesin tanı konulabilmekte. Çalışmamız ilave yeni olguların panel taramaları ve panelde negatif çıkan olgularda ekzom dizilemesi ile devam etmektedir.

Anahtar Kelimeler: YDİY, yeni nesil dizileme, primer immün yetersizlik, HİGM

SB-04: Primer İmmün Yetmezlik Hastalarında TREC/KREC analizi ile T ve B Gelişimi Kontrolü

Gizem Şentürk¹, Yuk Yin NG², Ayça Kıyıkım³, Ahmet Özen⁴, Sinem Fırtına¹, Hülya Yılmaz⁵, Elif Aydın⁴, Safa Barış⁴, Cem Ar⁵, Yıldız Camcıoğlu⁵, Sinem Şişko¹, Tuğçe Sudutan¹, Özden Hatırnaz NG⁶, Müge Sayitoğlu¹

¹İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²İstanbul Bilgi Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik, İstanbul, Türkiye

³İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Alerji ve İmmünoloji Bölümü, İstanbul, Türkiye

⁴Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Alerji ve İmmünoloji Bölümü, İstanbul, Türkiye

⁵İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁶Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Amaç: Primer immün yetmezlik (PİY) bağışıklık sisteminin işlevini bozan nadir genetik bir hastalık grubudur. Ülkemizde akraba evlilikleri oranının yüksek olması nedeni ile T ve B hücre gelişiminin PİY tanısı açısından incelenmesi önem teşkil etmektedir. T ve B hücre gelişimi somatik rekombinasyonları esnasında oluşan 'TREC' (T cell reseptör excision circle) ve 'KREC' (kappa-deleting excision circle) T ve B hücrelerinin halkasal, hücrelerde kalıcı DNA parçalarıdır. Bu yüzden PİY için T ve B hücre gelişimini anlamada biyobelirteç olarak kullanılabilirler. Bu çalışmanın amacı; PİY ön tanısı almış pediatrik ve yetişkin hastalarda TREC/KREC kopyalarını tespit ederek T ve B hücre gelişimini kontrol etmek, mutasyon saptanan hastalarda moleküler genetik varyasyonların T ve B hücre gelişimi üzerindeki etkilerini ortaya koymak, PİY taramaları için bir yöntem oturtmaktır.

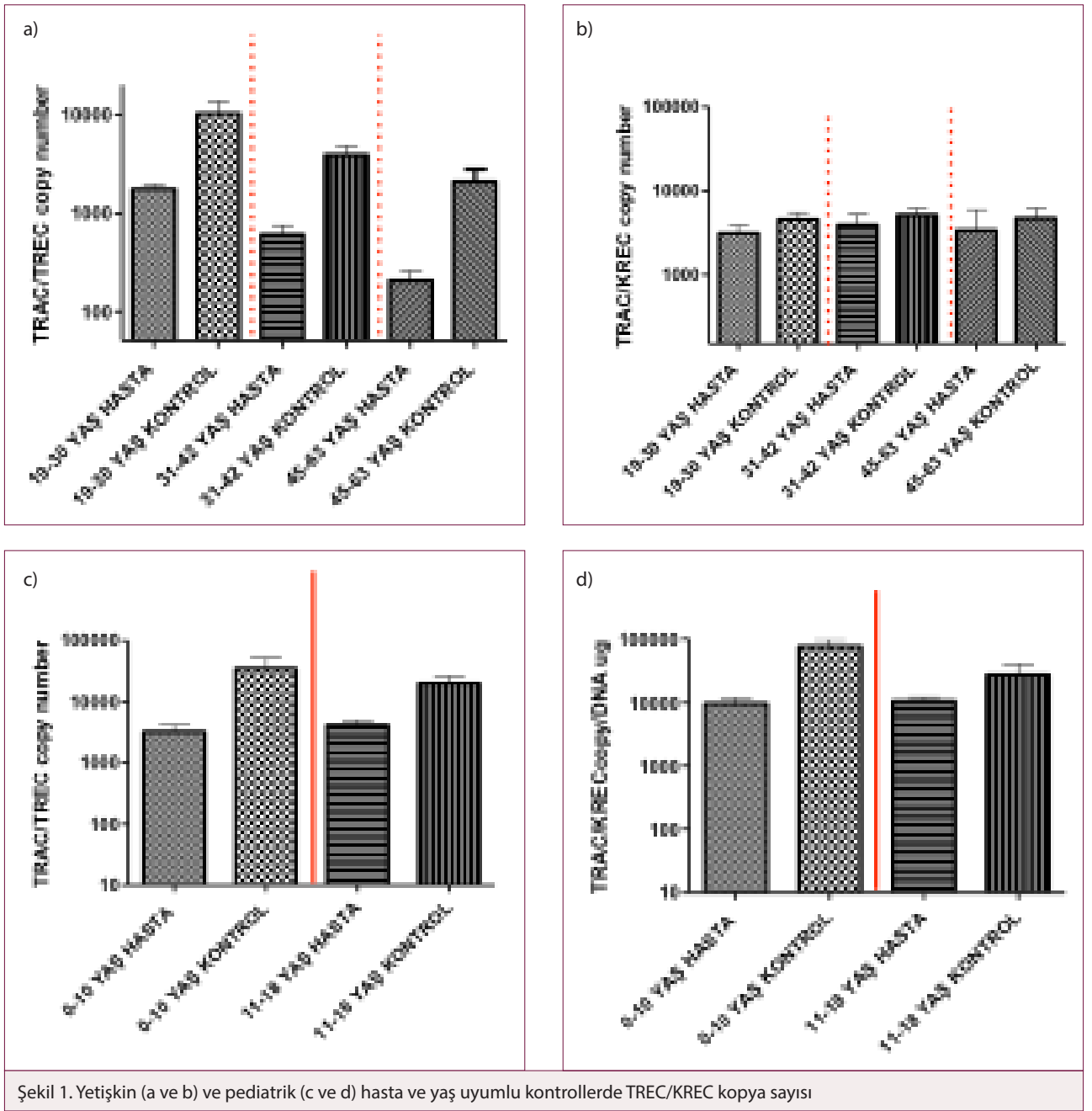
Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada, hastalardan alınan periferik kandan DNA izolasyonu yapılmıştır. Plazmid üretimi için içine referans gen TRAC ile birlikte hedef genler TREC/KREC genleri klonlanmış vektör DHS-alfa konağı içerisine transfer edilmiş ve seri dilüsyonlar (10^1 - 10^6) ile standartlar oluşturulmuştur. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PZR) ile hastalarda TREC/KREC kopya sayısı analizi yapılmıştır. Kontrol grubu olarak immün yetersizlik ve hematolojik hastalıklar dışındaki sebeplerle biyokimya birimine başvuran 29 yetişkin ve 16 pediatrik hasta sağlıklı referans değerini belirlemek için kullanılmıştır (Tablo 1).

Hasta Grubu	Yaş ortanca (min.-maks.)	Cinsiyet Dağılımı
Pediatrik	11 (1-18)	E:32/K:25
Yetişkin	33 (19-63)	E:14/K:15
Hasta Grubu		
Pediatrik	9 (1-18)	E:9/K:7
Yetişkin	34 (19-51)	E:19/K:10

Bulgular: Yetişkin PİY hastalarının kontrol grubuna göre TREC kopya sayısı bakımından anlamlı derecede daha az seviyelerde olduğu görülmüştür (t-test $p<0.0001$). Buna karşın KREC kopya sayısında anlamlı olmamakla beraber kontrol grubuna göre daha az seviyelerde olduğu görülmüştür (t test $p=0.1461$). Pediatrik PİY hastalarında TREC/KREC kopya sayılarının ise anlamlı derecede düşük kopya sayısına sahip olduğu gözlenmiştir (t test $p<0.0001$) (Tablo 2a-b).

	TRAC Kopya Sayısı Ortanca	TREC Kopya Sayısı Ortanca	KREC Kopya Sayısı Ortanca
a) YETİŞKİN HASTA	72500	1020	1830
KONTROL	151000	3850	3800
b) PEDIATRİK HASTA	58300	2110	5620
KONTROL	18900	17400	37200

Yaş gruplarına ayrıldığında hastaların TREC kopya sayısının anlamlı derecede zamanla azaldığı, KREC kopya sayısının anlamlı olmamakla beraber yaşa bağlı değişmediği belirlenmiştir (Şekil 1). Buna karşın hastalarda cinsiyete bağlı değişim gözlenmiştir.



Şekil 1. Yetişkin (a ve b) ve pediatrik (c ve d) hasta ve yaş uyumlu kontrollerde TREC/KREC kopya sayısı

Sonuç: İmmün yetmezlik ve mutasyonlu bireylerde T ve B hücrelerinin fonksiyonel olamaması veya olgunlaşmamasından dolayı *TREC/KREC* kopya sayılarının kontrollere göre daha az kopya sayısı içerdiği tespit edilmiştir. Yaşa bağlı değişimlerde timik aktivitenin zamanla azalması *TREC* kopya sayısının zamanla azalmasına sebep olmuştur. Mutasyona sahip olan hastaların mutasyonlarının etkileriyle uyumlu olarak T ve B hücrelerini etkilediği gösterilmiştir. Mutasyon saptanan hastalarda moleküler genetik varyasyonların T ve B hücre gelişimi üzerindeki etkileri böylece ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Primer immün yetersizlikler, *TREC*, *KREC*, T hücre gelişimi, B hücre gelişimi

SB-05: İlginç Bir Olgu: CD4 Eksikliği ve Şiloptizi Birlikteliği

Can Tuzer¹, Nail Paksoy¹, Metin Yusuf Gelmez², Pelin Karadağ¹, Müge Olgaç³, Safa Barış⁴, Erdoğan Çetinkaya⁵, Züleyha Bingöl⁶, Semra Demir⁷, Suzan Çınar², Bahaddin Çolakoğlu¹, Suna Buyukozturk¹, Aslı Gelincik¹

¹İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İmmünoloji ve Allerji Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²İstanbul Üniversitesi, Aziz Sançar Deneysel Tıp Araştırması Enstitüsü, İmmünoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

³SBÜ Şişli Etfal Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, İmmünoloji Ve Allerji Hastalıkları Polikliniği, İstanbul, Türkiye

⁴Marmara Üniversitesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Çocuk Allerji-İmmünoloji Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁵SBÜ Yedikule Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁶İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Göğüs Hastalıkları Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁷Sağlık Bilimleri Üniversitesi, İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İmmunoloji ve Allerji Hastalıkları Polikliniği, İstanbul, Türkiye

Amaç: İdiopatik CD4 eksikliği, herhangi bir enfeksiyöz etken veya sekonder sebeplerin bulunmadığı heterojenik bir sendromdur. Tekrarlayan akciğer komplikasyonlarıyla seyreden CD4 eksikliği olgusunu sunuyoruz.

Olgu Sunumu: Kokain kullanım öyküsü olan 19 yaşında kadın hasta öksürük, beyaz kıvamlı balgam şikayeti nedeniyle Yedikule Göğüs hastalıkları Hastanesi' ne yatırılmış, enfeksiyöz etkenler açısından araştırılmış, immun yetmezlik şüphesiyle tarafımıza yönlendirilmişti. Akciğer tomografisinde sağ alt lobda buzlu cam görüntüleri, sağda santral bronşektazileri, subplevral noduler konsolidasyonları ve peribronşial kalınlaşmaları mevcuttu. Nitroblue tetrazolium, CH50, immunoglobulin düzeyleri, otoimmun belirteçler, galaktomannan, HIV RNA ve anti-hiv normal bulundu. CD4 düzeyi, %21 ve 210/uL bulundu. Hasta iki ay sonra bronkoskopi esnasında ARDS gelişmesi üzerine Yoğun bakımda mekanik ventilasyona alındı. 1000 mg metilprednisolon başlandı ve 1gr/kg başına ile devam edildi. Trakeal aspiratta karbapenem rezistant acinetobakter üremesi üzerine Kolistin ve trimetropim-sülfo-metaksazol verildi. Kanda CMV yüksek kopya olması üzerine gansiklovir başlandı. Bronkoalveoler lavajda lenfosit ağırlıklı sitoloji raporlanmasıyla lenfositik alveolitis düşünüldü. Lenfosit alt düzeyi tekrarlandı ve CD4 düzeyi %9,83, 90/uL olduğu görüldü. CD4+ düzeyinin derinleşmesi ve dirençli akciğer enfeksiyonları nedeniyle IVIG tedavisi başlandı. Oral steroid, profilaktik antibiyotik, anti-fungalle taburcu edildi. Solunum şikayetlerinin artmasıyla Yedikule Göğüs Hastalıkları Servisi'ne başvurdu. Bronkoskopide yüksek trigliserid düzeyi nedeniyle şiloptizis tanısı düşünülerek ductus torasikus tamiri için opere oldu. Patolojisinde kronik nekrotizan granülomatoz inflamasyon ve mycobacterium absesus bulundu. Hasta yoğun bakım takibi sırasında exitus oldu.

Sonuç: Fatal sonlanan bu olguda CD4 eksikliğinin idyopatik bir immun yetersizlik mi, yoksa geç tanı alan şiloptiziye sekonder mi olduğu sorusu yanıtlanamamıştır. Durumun aydınlatılması için genetik inceleme planlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: CD4 Eksikliği, şiloptizi, lenfositik alveolit

SB-06: Paratiroid Hücrelerinin Mikroenkapsülasyonu ve Nakli Yöntemi

Beyza Göncü¹, Emrah Yücesan², Harun Başoğlu³, Erhan Aysan⁴

¹Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi, Paratiroid Nakil Laboratuvarı, İstanbul, Türkiye

²Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Enstitüsü, İstanbul, Türkiye

³Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁴Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Amaç: Kalıcı Hipoparatiroidinin tek küratif tedavisi paratiroid naklidir. Nakil başarısında immün sistemin etkilerini azaltmak amacıyla birçok yöntem denenmektedir; immünsüpresyon rejimi, uzun süreli hücre kültürü, farklı polimerik materyaller ile kapsülasyon/mikroenkapsülasyon gibi. Kahverengi algden elde edilen ultrasaf aljinat biyoyoumluluğu en yüksek biyopolimerdir. Paratiroid hücrelerinin ultrasaf aljinat ile mikroenkapsüle edilmesiyle nakil reddinin önüne geçilmeye çalışılmaktadır. Bu çalışma da paratiroid hücrelerinin mikroenkapsüle edilme tekniği, nakil sürecinde izlenen metod ve takip sonuçları verilmektedir.

Gereç ve Yöntem: Enzimatik yöntemle paratiroid hücre izolasyonu tamamlandı. Hücreler üç gün kültüre edildi. Kültür tamamlanmasını takiben ultrasaf aljinat kullanılarak, paratiroid hücreleri kapsüle edildi. Kapsülasyon aşamasında; hücre süspansiyonu miktarı ve ultrasaf aljinat oranı %38 olarak ayarlandı. Kapsül formasyonu için 300mOsm CaCl₂ kullanıldı. Yaklaşık 600 mikroenkapsül (200x10⁶ hücre içeren) 10mL serum fizyolojik içerisinde omentum dokusu üzerine nakil işlemi yapıldı. Alıcı nakil sonrasında 7 ay boyunca serum kalsiyum ve parathormon açısından takip edildi.

Bulgular: Alıcının nakilden on gün sonra, kalıcı hipoparatiroidiye bağlı semptomları azaldı. 25 gün sonrasında kalıcı hipoparatiroidiye bağlı ilaç kullanımına devam etmedi. Yedi aylık takip sürecinde serum parathormon miktarı artış gösterdi ve kalsiyum seviyesi normal aralıkta seyretti.

Sonuç: Kalıcı hipoparatiroidinin tedavisinde nakil süreçlerine ait değişken başarı oranları, rejeksiyonun gelişmesini takiben yeneden kalıcı hipoparatiroidiye bağlı semptomların ortaya çıkışı bu alanda yeni tekniklere ihtiyaç oluşturmaktadır. Biyoyoumlu polimerlerin bu alanda kullanılması ve tekniklerin geliştirilmesi ile immün rejeksiyonun önüne geçilmesinde ümit vaad etmektedir. Bu çalışma ultrasaf aljinat ile oluşturulan mikroenkapsüle paratiroid hücre nakli açısından literatürdeki ilk vakadır.

Anahtar Kelimeler: Kalıcı hipoparatiroidi, paratiroid nakli, mikroenkapsülasyon, ultrasaf aljinat

SB-07: Kadavra Vericiden Alınan Taze Dokunun İmmünsüpresyonsuz Paratiroid Allotransplantasyonu: 3 Yıllık Takibi

Ebru Kanımdan¹, Beyza Göncü², Burcu Özdemir², Emrah Yücesan³, Erhan Ayşan⁴

¹İstanbul Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul, Türkiye

²Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi, İstanbul, Türkiye

³Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji Enstitüsü, İstanbul, Türkiye

⁴Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Amaç: Kalıcı hipoparatiroidinin tedavisinde çeşitli paratiroid allotransplantasyon teknikleri geliştirilmiştir. Bu çalışma, immünsupresyon kullanılmadan, kadavra vericisinin taze dokusu kullanılarak yapılan paratiroid allotransplantasyonunu gerçekleştiren ilk yayındır.

Gereç ve Yöntem: 13 yaşındaki erkek verici kadavradan taze paratiroid dokusu alındı ve semptomatik kalıcı hipoparatiroidisi olan 41 yaşındaki kadın alıcıya, herhangi bir laboratuvar işlemi veya immünsupresyon uygulanmadan, intramüsküler enjeksiyon yoluyla deltoid kasa nakledildi. Alıcı ve verici arasında, insan lökosit antijeni uyumu sıfırdı.

Bulgular: İşlem sonrası ilk gün, hastanın parathormon seviyesi 15 pg/mL idi ve hipokalsemi için kullanılan ilaç adım adım kesildi. 24 ay sonra, hastanın parathormon seviyesi 42 pg/mL idi ve hastanın ilaç kullanmaya ihtiyacı kalmadı.

Sonuç: Kadavradan alınan taze dokunun, immünsupresyonsuz paratiroid allotransplantasyonu, kolay uygulanan ve insan lökosit antijeni uyumu gerektirmeyen hızlı etkili, ucuz bir tekniktir. Bu tekniğin yaygın uygulama potansiyelini değerlendirmek için daha çok klinik serilere ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Paratiroid allotransplantasyonu, insan lökosit uyumu, verici kadavra

SB-08: Lepralı Hastalarda DXA ve D Vitamini Ölçümleri ile Osteoporoz Değerlendirilmesi

Mualla Biçer Gençbay

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Kliniği, İstanbul, Türkiye

Amaç: Lepra, Mycobacterium leprae tarafından enfekte edilen, deri ve sinirleri tutan, çeşitli organlarda hasar yapan kronik, latent ve nüksedebilen bir hastalıktır. Bu çalışmanın amacı, lepralı hastaların osteoporozla ilişkisini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada İstanbul Bakırköy Lepra Deri ve Zührevi Hastalıkları Hastanesi'nde yatarak tedavi gören 87 lepra hastası ile benzer demografik özellikleri olan 85 sağlıklı kontrolün osteoporoz açısından kemik yoğunlukları Dual-Enerji X-Ray Absorbsiyometri (DXA) ile değerlendirildi. Ayrıca 26 lepralı hastanın 25OH Vitamin D, kalsiyum ve fosfor düzeyleri venöz kan örneklerinden cobas c501 (Roche-Almanya) analizöründe ölçüldü. İstatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007&PASS (Güç analizi ve Örnek büyüklüğü) 2008 Statistical Software (Utah, Amerika) programı kullanıldı. Sonuçlar %95'lik güven aralığında ve $p < 0.05$ istatistiksel anlamlılık olarak değerlendirildi.

Bulgular: Lepralı hastaların yaş ortalaması 64.930 ± 14.51 , kontrol grubunun yaş ortalaması 60.884 ± 8.71 olarak bulundu. DXA ölçümlerindeki T skorlarına göre hem lomber hem de femoral bölgedeki osteoporotik değişiklikler, lepralı hasta grubunda lepra olmayan hastalara göre daha fazla olmuştur (sırasıyla lomber bölge; lepra 38 hasta 24 kontrol, femoral bölge; 25 hasta 12 kontrol). Lepralı hastaların osteopeni yaşı 27 iken, kontrol grubunda 42 olarak bulunmuştur. Kalsiyum ve vitamin D düzeyleri lepralı hastalarda anlamlı derecede düşüktür ($p < 0.01$), ancak fosfor düzeyleri iki grup arasında anlamlı farklı değildir ($p > 0.05$).

Sonuç: Lepralı hastalarda osteoporotik değişiklikler daha fazladır ve daha erken yaşta ortaya çıkmaktadır. DXA ve D vitamini ölçümü sonrası erken tedavi ile lepralı hastaların osteoporoz nedenli sağlık problemleri azaltılarak yaşam kaliteleri artırılabilir. Lepra gibi immün sistemi etkileyen hastalıkların erken dönemlerinde osteoporoz açısından değerlendirilmesi ve dolayısıyla komplikasyonların önlenmesinde etkili olduğu kanısına vardık.

Anahtar Kelimeler: Lepra, DXA, osteopeni, osteoporoz

Poster Bildirileri

PB-01: Alkol Bağımlılığının İnsan Beyin Dokusundaki miR-124,125b,206 ve 339-5p Ekspresyonları Üzerine Etkisi

Bekir Erdoğan¹, Erdoğan Kara², Hani Alsadoni¹, Hasan H. Eker³, Halime Pençe³, Sadrettin Pençe³

¹İstanbul Üniversitesi, Aziz Sançar DETAE, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²Adli Tıp Kurumu, İstanbul, Türkiye

³Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İstanbul, Türkiye

Amaç: Alkol bağımlı erkek bireylerin frontal korteks bölgesindeki miR-124, 125b, 206 ve 339-5p'nin anlatım seviyelerini kontrol grubu ile karşılaştırarak alkol bağımlılığının bu miRNA'ların anlatım seviyelerini etkileyip etkilemediğini veya hangi yönde etkilediğini real-time-PCR teknolojisi ile tespit etmek.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda alkol kullanım bozukluğu olan ve kontrol grubu olan erkek bireylerin frontal kortekslerinden manuel izolasyon teknikleri ile total RNA izolasyonu yapıldı. Daha sonra miR-124, 125b, 206 ve 339-5p'nin anlatım seviyeleri real-time PCR cihazında SYBR-Green ışımaya tabii ile analiz edildi. Son olarak Ct değerleri "sabiosciences QIAGEN" web portalında PCR data analizi istatistiksel hesaplamaları yapıldı.

Bulgular: Analiz sonucunda miR-124, 125b ve 399 anlatım seviyeleri alkol kullanım bozukluğu olan bireylerde istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük çıktı. Ancak miR-206 için iki grup arasında anlamlı bir fark görülmemiştir.

Sonuç: miR-124, 125b ve 399 anlatım seviyelerinin düşük çıkması ilgili oldukları yollar da dikkate alındığında alkol bağımlılığının miRNA seviyesini değiştirerek Alzheimer Hastalığı, glioblastoma ve epilepsi gibi nörodejeneratif hastalıklara yol açabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: miR-124, miR-125b, miR-206, miR-339, alkolizm

PB-02: Malign Melanomda ING2 Gen Ekspresyonu Seviyeleri

Royal Khankishiyev¹, Hani Alsaadoni², Burcu Çaykara², Sadrettin Pençe², Halime Hanım Pençe³, Arif Türkmen¹

¹İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²İstanbul Üniversitesi, Aziz Sanca DETAE, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

³Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Amaç: Malign melanom melanositlerin malign transformasyonu sonucu gelişen bir neoplazidir. Büyüme proteini inhibitör (ING) gen ailesi tümör supressor olarak tanılanmaktadır ve tüm major formları p53'ü aktive etmektedir. Araştırmamızda lenf metastazı olan hastalarda büyüme proteini 2 inhibitörü (ING2) ve malign melanom arasındaki ilişkinin araştırılması hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamıza primer tümör, sağlam deri dokusu, metastatik lenf nodu ve metastaz olmayan lenf noduna ait dokulardan her grupta 21 adet olmak üzere toplam 84 örnek dâhil edildi. Doku örneklerinden total RNA izolasyonu yapılarak cDNA ve kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlenen gen ekspresyon seviyeleri 2^{-ΔΔCt} metoduna göre analiz edildi. SPSS 21 data analizi için kullanıldı ve normal dağılım gösterenler için Paired Samples t testi ve normal dağılım göstermeyenler için Wilcoxon Signed Ranks testi kullanıldı. Korelasyon analizi için Spearman korelasyon testi kullanıldı ve p <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular: Normal doku örnekleri ile primer tümör doku örnekleri karşılaştırıldığında ekspresyon seviyeleri arasında anlamlı farklılık gözlenirken (p=0,033), tümör grubunda ING2 gen ekspresyonunun 4,56 kat daha fazla eksprese olduğu belirlendi. Normal lenf nodu örnekleri ile tümörlü lenf nodu doku örnekleri karşılaştırıldığında tümörlü lenf doku örneklerinde ING2 gen ekspresyonunun ortalama 5,34 kat fazla eksprese edildiği bulundu (p>0,05). Tümör lenf nodu ile normal lenf nodu doku örneklerinin ekspresyon seviyeleri ile Breslow kalınlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptanmadı (p>0,05).

Sonuç: Çalışmamızda primer tümör ve metastatik lenf nodunda ING2 gen ekspresyon seviyelerinin arttığı belirlenmiş olsa da ekspresyon seviyeleri ile Breslow kalınlıkları arasında bir korelasyonun olmadığı gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: ING2, gen ekspresyonu, malign melanom

PB-03: Mide Kanserli Hastalarda miRNA Seviyelerinin Belirlenmesi

Hani Alsaadoni¹, Burcu Çaykara¹, Sadrettin Pençe¹, Sibel Şabançelebi¹, Halime Hanım Pençe², Süleyman Bademler³

¹İstanbul Üniversitesi, Aziz Sanca DETAE, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

³İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Genel Cerrahi Ana Bilim Dalı, İstanbul, Türkiye

Amaç: Dünyada en yaygın görülen kanserlerden biri olan mide kanseri çevresel ve genetik faktörlerin rol oynadığı multifaktöryel bir hastalıktır. Çalışmamızda kromozom 14q32 üzerinde bulunan dört miRNA'yı (miR127-5p, miR-544a, miR-369-3p ve miR-655-3p) mide kanserinde biyomarker olarak değerlendirmeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışma kapsamında 66 mide kanserli ve 66 sağlıklı bireyden alınan kan örneklerinden total RNA izolasyonu yapıldı. cDNA ve kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile belirlenen gen ekspresyon seviyeleri 2^{-ΔΔCt} metoduna

göre analiz edildi. Kolmogorov Smirnov ve Mann-Whitney U test data analizi için kullanıldı ve $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Bulgular: miR-127-5p (kat değişimi: 588, $p < 0.001$), miR-369-3p (kat değişimi: 1,6, $p = 0.054$) ve miR-655-3p'nin (kat değişimi: 97, $p < 0.001$) mide kanseri grubunda kontrole göre daha az oranda eksprese edildiği bulundu. miR-544a'nın ise hasta grubunda kontrole oranla yaklaşık 15,5 kat fazla oranda eksprese edildiği bulundu (kat değişimi: 15,47, $p < 0.001$).

Sonuç: 14q32 üzerinde bulunan miR127-5p, miR-544a, ve miR-655-3p'nin mide kanserinde biyomarker olarak değerlendirilebileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: miR127-5p, miR-544a, miR-369-3p, miR-655-3p, gen ekspresyonu, mide kanseri

PB-04: Miyokard Enfarktüsü Geçirmiş Erkek Hastalarda Kodlamayan RNA BAT5 İfade Düzeyleri

Hilal Şentürk¹, Doğan Okşen², Deniz Özsoy³, Ekrem Bilal Karaayvaz⁴, Cenk Eray Yıldız³, Mustafa Yıldız², Evrim Kömürcü-Bayrak¹

¹İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²İstanbul Üniversitesi Kardiyoloji Enstitüsü Kardiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

³İstanbul Üniversitesi Kardiyoloji Enstitüsü, Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁴Bağcılar Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kardiyoloji Kliniği, İstanbul, Türkiye

Amaç: Akut miyokard enfarktüsü (AMI), genellikle koroner ateroskleroz sonucu görülen ve ölümlü sonuçlanabilen bir hastalıktır. Nükleotit sayısı 200'den daha uzun kodlamayan RNA'lar uzun kodlamayan RNA (lncRNA) olarak tanımlanmaktadır. Son yıllardaki çalışmalar, lncRNA'ların kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli kompleks hastalıklarla ilişkili olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda AMI tanısı alan erkek hastalarda, akut dönemde hastalığın tanı ve takibinde kullanılabilecek yeni biyobelirteç niteliğinde, BAT5 adlı lncRNA'nın ifade düzeyinin belirlenerek değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Araştırmaya 3 ayrı merkezden 169 hasta dahil edilmiştir. Miyokard enfarktüsü geçirmiş ($n=106$) erkek bireyler AMI grubunu, anjina pectoris olup MI geçirmemiş erkek bireyler ($n=49$) non-MI grubunu oluşturmaktadır. Kontrol grubunu ise kalp kapakçık ameliyatı olan ve Gensini ve SYNTAX skoru 8 ve 8'in altında olan ($n=14$) erkek bireyler oluşturmaktadır. Periferik kandaki lökositlerden total RNA izolasyonu yapıldı. Seçilen aday lncRNA'nın (BAT5) ifade düzeyi kantitatif eş-zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ile belirlendi. İstatistiksel analiz yapıldı.

Bulgular: Gruplar arasında, BAT5 adlı lncRNA'ların ifade düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlılık belirlendi ($p=0,008$). BAT5 kodlamayan RNA transkriptinin ifade düzeyi, MI geçirmiş erkek hastalarda ve MI geçirmemiş erkek hastalarda kontrol grubuna göre 2.55 kat arttığı belirlendi.

Sonuç: Çalışmamızda aday lncRNA olarak BAT5 transkriptinin ifade düzeyinin erkek MI hastalarında kontrol grubuna göre arttığı belirlendi. Literatürde, MI ve lncRNA ifade düzeyleri ile ilişkinin araştırıldığı çalışmalar halen sınırlı sayıda olup cinsiyete göre değerlendirilen bir çalışma mevcut değildir. lncRNA'ların, ateroskleroz ile ilişkili hastalıkların ve miyokard enfarktüsünün tanı ve takibinde kullanılabilecek yeni biyobelirteç adayları arasında değerlendirilebileceği öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Akut miyokard enfarktüsü, uzun kodlamayan RNA, BAT5 ifade düzeyi

PB-05: Mutant Hücrelerde Er Stres Cevabında Rol Alan BiP ve XBP1 Genlerinin in vitro Analizi

Muhammed Abdulvahid KALKAN¹, Burçak VURAL¹, Ayşe Evrim BAYRAK¹

¹İstanbul Üniversitesi, Aziz Sançar DETAE, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Turkey

Amaç: ER stresinde UPR sistemi devreye girerek BiP transkripsiyon artışına ve XBP1 mRNA kesimine sebep olur. AMPK önemli bir hücre enerji sensörüdür. AMPK'nın altbirimi olan PRKAG2 genindeki E506K, E506Q ve R531G yanlış anlamlı mutasyonlar sonucu, yanlış katlanmış proteine bağlı hücre ER stresinin olabileceği öngörülmüştür. Bu çalışmada, PRKAG2 kardiyomiyopatisine sebep olan PRKAG2 genindeki E506K, E506Q ve R531G mutasyonlarına bağlı gelişebileceği öngörülen ER stresinin incelemesi amaçlandı. Bu sebeple, doğal-tip, mutant ve tunikamisin uygulanmış hücrelerde BiP ve XBP1 genlerinin transkripsiyonel düzeyleri kantitatif RT-PCR (qPZR) yöntemi ile analiz edildi.

Gereç ve Yöntem: HEK293 hücrelerine 2 farklı dozda (0.5 ve 1 µg/mL), 12 saatlik Tunikamisin uygulandı. Yönlendirilmiş mutageniz tekniği ile oluşturulan doğal-tip ve mutant PRKAG2b transkriptleri, HEK293 hücrelerine lipofektamin ile transfekte edildi. RNA izolasyonlarının ardından cDNA sentezi yapılarak BiP ve XBP1 (unspliced-spliced ve total) transkriptlerinin ifade düzeyleri RT-PCR ile analiz edildi.

Bulgular: Tunikamisin uygulaması (0.5 ve 1 µg/mL) ile BiP mRNA ifade düzeyinde yaklaşık 25 ve 33 katlık artış saptanmıştır (p<0.01). Buna karşılık mutant hücreler ile doğal-tip hücreler arasında BiP geni anlatımında anlamlı bir değişim saptanamamıştır. *XBP1* mRNA'sının kesilmemiş (*us-XBP1*), kesilmiş (*s-XBP1*) ve her iki formuna özgü (*t-XBP1*) ifade düzeylerinin her birinde Tunikamisin uygulaması yapılmış hücrelerde (0.5 ve 1 µg/mL) yaklaşık sırasıyla 6-14 kat arasında değişen artış saptanırken mutant hücrelerde anlamlı bir artış saptanamamıştır.

Sonuç: Sonuç olarak, *in vitro* deney şartlarında tunikamisin ile hücre kültüründe başarılı şekilde ER stresi oluşturulabilmiştir. Mutant hücrelerde ise doğal-tip hücrelere göre yapılan kıyaslamada belirgin bir ER stresinin oluşmadığı saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: ER stresi, Katlanmamış Protein Cevabı, AMPK, PRKAG2 Kardiyomiyopatisi, E506K mutasyonu

PB-06: Uzun Zincirli Yağ Asidi Metabolizması Yönünden Bir Örnek Olarak FABP-1 Gen Anlatım Düzeylerinin Bazı Kolorektal Kanseri Olgularında Histopatolojik Parametrelere Göre Değerlendirilmesi

Cem Horzoğlu¹⁻³, Şeyda Ercan²⁻³, Öncü Koç Erbaşoğlu³, Soykan Arıkan⁴, Canan Kelten Talu⁵, Özlem Küçükhüseyin³, İlhan Yaylım³

¹İstanbul Gelişim Üniversitesi, Tıbbi Teknikler ve Hizmetler Bölümü, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Programı, İstanbul, Türkiye

²İstanbul Biruni Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, İstanbul, Türkiye

³İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Moleküler Tıp Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

⁴İstanbul Eğitim Araştırma Hastanesi, Genel Cerrahi Kliniği, İstanbul, Türkiye,

⁵İstanbul Eğitim Araştırma Hastanesi, Patoloji Kliniği, İstanbul, Türkiye

Amaç: Yağ asidi bağlayıcı protein 1 (FABP1), uzun zincirli yağlı asitlerin taşınmasından sorumlu bir hücre içi proteindir. Lipid metabolizması ve hücrel farklılaşma fonksiyonlarının yanı sıra FABP1, peroksizom proliferatör aktive reseptörler (PPARs) ile etkileşimi yoluyla inflamasyonda da rol oynar. Yapılan çalışmalarda farklı gastrointestinal kanserlerde değişken FABP1 gen anlatımı düzeylerine ait veriler olası bir potansiyel biyomarker olarak değerlendirilmektedir. Çalışmamızda FABP1'in gen anlatım düzeylerinin kolorektal kanserli vakalarda tespit edilmesi ve olası düzey farkının histopatolojik parametreler açısından değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: 31 hastanın tümör ve kontrol dokusu RNA ekstraksiyonu sonrasında RT-PCR ile gen anlatım düzeyleri saptanmıştır. Histopatolojik değerlendirilmesi yapılabilen 21 hastanın ise FABP1 gen anlatım düzeyleri arasındaki korelasyon incelenmiştir.

Bulgular: Hastaların %45.1'inde (n=14) FABP-1 gen anlatım düzeylerinin düşük regülasyon, %44,9'unda (n=17) ise yüksek regülasyon gösterdiği saptanmıştır. Kontrol dokusunda tümör dokusuna göre FABP1 gen anlatım düzeyinin çok hafif düzeyde daha yüksek olduğunu (1.2 kat) gözlemlemeye karşın tümör dokusuna göre bu değişim istatistiksel olarak anlamlı değildir (p=0,74). İleri tümör evresinde erken tümör evresinde göre FABP1 gen anlatım düzeyi 3,4 kat daha yüksek (p=0,61); Lenf nodu metastazı bulgusuna göre metastaz olanlarda olmayanlara göre FABP1 gen anlatım düzeyi 7,3 kat daha yüksek (p=0,14); uzak organ metastazı bulgusuna göre ise metastaz olanlarda ise metastaz olmayanlara göre 5 kat yüksek (p=0,66) olarak tespit edilmiştir.

Sonuç: Histopatolojik olarak ele aldığımız tüm kötü prognoza ile ilişkilendirilebilecek ileri tümöral değişimlerde istatistiksel bir farklılık saptamamıza karşın, FABP1 düzeyinin erken evrelere göre yüksek olduğu görülmektedir. Devam eden çalışmamızda vaka artışı ve diğer lipid metabolizması gen gruplarının incelenmesi sonrasında FABP1'in potansiyel rolünün daha net anlaşılabilirliğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: FABP1, RT-PCR, uzun zincirli yağ asidi metabolizması, PPARs, tümör histopatolojisi