

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**AKUT MİYELOİD LÖSEMİDE SPINK2 GEN
İFADESİNİN ARAŞTIRILMASI**

SÜMBÜL GEZER

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. SEMA SIRMA EKMEKCİ**

**GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK PROGRAMI**

İSTANBUL-2018

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı, Genetik Programında Yüksek Lisans öğrencisi Sümül GEZER tarafından Doç. Dr. Sema SIRMA EKMEKÇİ'nin danışmanlığında hazırlanan “**AKUT Miyeloid Lösemide SPINK2 Gen İfadesinin Araştırılması**” başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 06.08.2018 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Sema SIRMA EKMEKÇİ
İ.Ü. Aziz Sançar DETAE
Genetik Anabilim Dalı

Doç. Dr. Neslihan ABACI
İ.Ü. Aziz Sançar DETAE
Genetik Anabilim Dalı

Doç. Dr. Emel ERGÜL
Kocaeli Üni. Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji A.D.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

SÜMBÜL GEZER (İmza)



İTHAF

EŞİM'e

TEŞEKKÜR

Eğitim hayatımın bu döneminde gösterdiği hoşgörü ve ilgisiyle destek, bilgi ve tecrübesiyle yanımda olan ve yol gösteren, bilim insanı kimliği ve sabrıyla örnek aldığım; tez çalışmamda sağladığı imkanlarla bu çalışmanın tamamlanmasına olanak tanıyan, rehberliğinde çok şey öğrendiğim değerli hocam, tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Sema Sırma EKMEKÇİ ‘ ye,

Bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, desteğini esirgemeyen Sayın hocam Doç. Dr .Neslihan ABACI ‘ya,

Deneylerim boyunca her aşamada en büyük destekçim, her başvurduğumda sağlık durumuna rağmen yardıma hazır olan Sayın Dr. Zeliha EMRENCE ve bebeğine,

Deneylerimde yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen , yaşlarından çok daha bilgili ve tecrübeli genç bilim insanları, arkadaşlarım Uzman Biyolog Melda SARIMAN ve Uzman Biyomühendis Burcu SALMAN’ a;

Yardım ve katkılarından dolayı Uzman Biyomühendis N. Ece BİBEROĞLU’na,

Tez çalışmamda destek ve ilgileri için Dr. Ferda PAÇAL ve Dr . Aris ÇAKİRİS’e,

Ayrıca deneylerimin hazırlık ve yapım aşamasında yanımda olan ve katkılarını esirgemeyen Büşra KARAÇAM , Elif Nur ÖZKAYA BOZDAĞ ‘a,

Desteği için Moleküler Biyolog Atilla Mehmet GÜLER’e ve tez dönemimde yardımlarını esirgemeyen stajyerlerimiz Yusuf ŞEFLEKÇİ ve Berk İLERİ ‘ye,

Haklarını asla ödeyemeyeceğim Anne, Babam’a,

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi eğitimimde de arkamda duran, en büyük destekçim ve yoldaşım, hayat arkadaşım Eşim’e,

Sabırlarıyla ve ilgileriyle beni teşvik edip tezimin tamamlanmasına katkı sağlayan, anlayışlı ve fedakar Canım Oğullarım ‘a,

Bu zamana kadar eğitimimde ve hayatımda bana yol gösteren Sayın Hocalarım’a,

Bana kattıkları herşey için teşekkürü bir borç biliyorum.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 26523

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
ÖZET	xvii
ABSTRACT.....	xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. AKUT MİYELOİD LÖSEMİ.....	4
2.1.1. HEMATOPOEZ.....	4
2.1.2. LÖSEMİ.....	6
2.1.3. TARİHÇE	6
2.1.4. AKUT LÖSEMİLER	8
2.1.5. AKUT MİYELOİD LÖSEMİ.....	10
2.1.5.1. AML'nin Epidemiyolojisi	10
2.1.5.2. AML Sınıflandırılması	10
2.1.5.3. Prognostik Faktörler	13
2.1.5.4. AML'nin Etiyolojisi	15
2.1.5.5. AML KLİNİĞİ.....	18
2.1.5.6. AML TEŞHİS VE TEDAVİSİ.....	19
2.2. SPINK2 (HUSI-II, ISK2 , KAZAL TİP SERİN PROTEAZ İNHİBİTÖRÜ)	21
2.2.1. PROTEAZ İNHİBİTÖRLERİ	21
2.2.2. SERİN PROTEAZ İNHİBİTÖRLERİ SÜPER AİLESİ.....	22
2.2.3. KAZAL TİP SERİN PROTEAZ (SPINK) GEN AİLESİ	25
2.2.3.1. Yapıları.....	25
2.2.3.2. Çeşitleri ve Görevleri	26

2.2.4. SPINK2 (HUSI-II, ISK2).....	28
2.2.4.1. İnsan genomundaki yeri	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
3.1. Gereçler.....	32
3.1.1. Kullanılan Hasta Örnekleri	32
3.1.2. Sağlıklı Örnekler	32
3.1.3. Hücre Soyları	32
3.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler	36
3.1.5. Kullanılan Kitler	36
3.1.6. Kullanılan Cihazlar	37
3.2. Yöntem.....	38
3.2.1. Kalitatif PZR	38
3.2.1.1. Hücrelerden RNA Elde Edilmesi	38
3.2.1.2. RNA’lardan cDNA Sentezi.....	39
3.2.1.3. Kantitatif Eş Zamanlı PZR (qRT-PZR)	40
3.2.2. SPINK2 ekspresyon sevisini tespiti için ELİSA testi	43
3.2.2.1. Hücreleri çözme ve Hücre kültürü hazırlama	43
3.2.2.2. Hücrelerin pasajlanması	43
3.2.2.3. Hücre içinde ve dışına salgılanan SPINK2 protein düzeyinin belirlenmesi için yapılan işlemler	44
3.2.2.4. ELİSA Testi	46
3.3. İstatiksel Analiz	48
1. BULGULAR.....	49
2. TARTIŞMA	63
KAYNAKLAR	70
FORMLAR	81
ETİK KURUL KARARI	84
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	85
ÖZGEÇMİŞ	86

TABLOLAR LİSTESİ

- Tablo 2-1: AML FAB sınıflandırması (52)**
- Tablo 2-2: AML WHO sınıflandırması (54)**
- Tablo 2-3: Sitogenetik ve moleküler profile dayanan prognostik risk sınıflandırması (62)**
- Tablo 2-4: AML ile ilişkili risk faktörleri (66)**
- Tablo 2-5 AML FAB Alt Tipleri İle İmmünolojik Yüzey Markırları İlişkileri (Kızıltaş, 2008: 17) (75)**
- Tablo 2-6 : AML de testler prosedürler (62)**
- Tablo 2-7: SPINK information ailesi (106)**
- Tablo 3-1: PZR karışımı**
- Tablo 3-2: SPINK2 genine ait primerler**
- Tablo 3-3: TBP genine ait primerler**
- Tablo 3-4: qRT-PZR reaksiyon karışımı**
- Tablo 3-5 : Hücrelerin pasajlanması**
- Tablo 3-6 : Hücrelerin ve süpernatanın ELİSA testi için hazırlanması**
- Tablo 3-7: Örneklerin optik yoğunluğunun hesaplanması.**
- Tablo 4-1: Cinsiyete göre AML olgularının dağılımı**
- Tablo 4-2: Çocukluk çağı ve yetişkin AML olgularının cinsiyete göre dağılımı**
- Tablo 4-3: AML olgularında SPINK2 ekspresyonunun kontrole karşılaştırılması**
- Tablo 4-4: AML olgularında yaşa ve cinsiyete bağlı SPINK2 ekspresyonu**
- Tablo 4-5: Tüm AML olgularının SPINK2 ekspresyon düzeyinin kontrole göre kız ve erkek olgularda sayısal dağılım**
- Tablo 4-6: FAB sınıflarına göre SPINK2 ekspresyon ortalaması**
- Tablo 4-7: AML olgularının SPINK2 ekspresyon düzeylerinin FAB sınıflamasına göre dağılımı**
- Tablo 4-8: Çocukluk çağı AML olgularının SPINK2 ekspresyon düzeylerinin FAB sınıflarına göre dağılımı**

Tablo 4-9: Erişkin AML’li olguların SPINK2 ekspresyon düzeylerinin FAB sınıflarına göre dağılımı

Tablo 4-10: SPINK2 ekspresyonunun FAB sınıflarıyla ilişkisi

Tablo 4-11: AML olgularının t(15;17), t(8;21), inv(16) sayı ve oranları

Tablo 4-12: Tüm AML olgularında SPINK2 ekspresyonun t (15;17), t(8;21) ve inv(16) mutasyonları ile ilişkisi

Tablo 4-13: Çocukluk çağı AML olgularında SPINK2 ekspresyonunun t (15;17), t(8;21), inv16 ile ilişkisi

Tablo 4-14: Erişkin AML olgularında SPINK2 ekspresyonunun t (15;17), t(8;21) ve inv(16) ile ilişkisi

Tablo 4-15: Tüm AML’li olgularda t(15;17) translokasyonu varlığına göre SPINK2 ekspresyon düzeylerinin dağılımı

Tablo 4-16: Çocukluk çağı AML olgularının t(15;17) translokasyonu varlığına göre SPINK2 ekspresyon düzeylerinin dağılımı

Tablo 4-17: Erişkin AML olgularının t(15;17) translokasyon varlığına göre SPINK2 ekspresyon düzeylerinin dağılımı

Tablo 4-18: Tüm AML olguların t(8;21) varlığına göre SPINK2 ekspresyon düzeylerinin dağılımı

Tablo 4-19: Çocukluk çağı AML olgularında t(8;21) translokasyonu varlığına göre SPINK2 ekspresyon düzeylerinin dağılımı

Tablo 4-20: Erişkin AML olgularında t(8;21) varlığına göre SPINK2 ekspresyon düzeylerinin dağılımları

Tablo 4-21: Tüm AML olgularının inv(16) varlığına göre SPINK2 ekspresyon düzeylerinin dağılımları

Tablo 4-22: Çocukluk çağı AML olgularının inv(16) varlığına göre SPINK2 ekspresyon düzeylerinin dağılımları

Tablo 4-23: Erişkin AML olgularının inv(16) varlığına göre SPINK2 ekspresyon düzeylerinin

Tablo 4.24: SPINK2 mRNA, SPINK2 hücre içi protein ve SPINK2 salgılanan protein ‘Pearson korelasyon testi’ ile karşılaştırılması

Tablo 4-25: Hücre soylarında SPINK2 ekspresyonlarının kıyaslanması

Tablo 4.26: Hücre soylarında hücre içi ve hücre dışı protein düzeylerinin karşılaştırılması

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1 : Kan hücrelerinin kökeni (29)

Şekil 2-2 : Yaşa bağlı kan üretim bölgeleri değişimi (30)

Şekil 2-3: Lösemili hastaların kan hücrelerinin görünümü (34)

Şekil 2-4: AML hastalarında 1992-2010 yılları arasında yaşa bağlı sağkalım oranları (61)

Şekil 2-5: Serin Proteaz İnhibitörlerin konformasyonel değişikliklerine bağlı patafizyolojik rolleri (85)

Şekil 2-6 : SPI ile hedef proteazın bağlanması sonucu oluşan konformasyonel değişiklik (88)

Şekil 2-6: 4. Kromozomda SPINK2 bulunduğu bölge ve açılımı (122)

Şekil 2-7: *SPINK2* 'nin aminoasit düzeyinde şematik olarak (A) ve üç boyutlu (B) gösterimi(115).

Şekil 2-8: Serin proteaz inhibitör ile tripsin bağlandığında meydana gelen konformasyonel değişiklik (20).

Şekil 2-9: AML hücre soylarında SPINK2 ekspresyonunun göreceli farklılığı (20)

Şekil 3-1: Hücre soyları : a) K562, b) MCF7, c) U87, d) HL60

Şekil 3-2: Real-time kantitatif PCR cihazı (Light Cycler 480-II, Roche)

Şekil 3-3: Hücre canlılık analizatörü (Vi cell, Beckman Coulter)

Şekil 3-4: AML'li olgulara ait real-time kantitatif PCR sonuçları

Şekil 3-5: Sandviç tipi ELISA plate deney sonrası görünümü

Şekil 4-1: AML olgularında SPINK2 mRNA ekspresyon oranları (A),

AML olgularının $\Delta\Delta$ ct değerleri (B)

Şekil 4-2: Hücre soylarında SPINK2 ekspresyonu.

Şekil 4-3: ELISA'da standartlardan elde edilen eğri

Şekil 4-4: Hücre dışına salgılanan protein miktarı

Şekil 4-5: Hücre içindeki protein miktarı

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ABL1	ABL Proto-Onkogen 1
ALL	Akut lenfoid lösemi
AML	Akut miyeloid lösemi
APL	Akut promiyositik lösemi
ASXL1	Additional Sex Combs Like 1
ATCC	American Type Culture Collection
BCR	Breakpoint Cluster Region
CAR	Kimerik antijen reseptörü;
CEBPA	CCAAT/Enhancer-Binding Protein Alpha
CPX	Karboksi peptidaz
CR	Remisyon oranı
DEK	DEK proto onkogen
DNMT3A	DNA-methyltransferase 3A
DOT1L	Epidermal büyüme faktörü
DSMZ	German Collection of Microorganisms and Cell Cultures
ELN	European LeukemiaNet
EORTC	Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Örgütü
FAB	Fransız -Amerikan-İngiliz

FLT3	FMS-like tyrosine kinase 3
GATA2	Endotelyal transkripsiyon faktör 2
HDAC	Histon deasetilaz;
HSCT	Hematopoetik kök hücre nakli
HUSI-II	Human serin proteaz inhibitör II
IDH1/2	Isocitrate dehydrogenase ½
ISK2	Kazal tip serin proteaz inhibitör 2
ITD	İç Ardışık Tekrarlar
KIR	Katil-hücre immünoglobulin benzeri reseptör;
KIT	Protoonkogen reseptör kinaz
KLL	Kronik lenfoid lösemi
KML	Kronik miyeloid lösemi
KMT2A	Lysine Methyltransferase 2A
MDS	Miyodisplastik sendrom
MECOM	Miyelodisplastik Sendromu İlişkili Protein
MKL1	Megakaryoblastic Leukemia (Translocation) 1
ML	Miyeloid lösemi
MLL	Mixed Lineage Leukemia
MLLT3	Süper Uzama Kompleksi Alt Birimi
MMP	Matriks metallo proteaz
mTOR	Rapamisinin mekanik hedefi;

NPM1	Nucleophosmin 1
NUP214	Nucleoporin 214
OD	Optik duyarlılık
OS	Genel sağkalım
PCLBCL	Primer kutanöz büyük B hücreli lenfoma
PD-L1	Programlanmış ölüm ligandı 1;
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinaz;
TCR	T hücre reseptörü.
PIs	Proteaz inhibitörleri
PML	Promyelocytic Leukemia
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
qRT-PZR	Kantitatif Eş zamanlı Polimeraz zincir reaksiyonu
RARA	Retinoik Asit Reseptör Alfa
WHO	World Health Organization
CBFBMYH11	CBFB ve MYH11 genlerinin füzyon geni
CBFB	Çekirdek Bağlama Faktörü Beta Alt Birimi
MYH11	Myosin Ağır Zinciri 11
RAS	RAS proto onkogeni
RBM1	RNA bağlayıcı protein 1
RUNX1	Runt-related transcription factor 1
SERPİN	Serin proteaz inhibitör

SNP	Tek nukleotid polimorfizmi
SPI	Serin proteaz inhibitör
SPINK2	Kazal tip serin proteaz inhibitör
TBP	TATA bağlanma proteini
TCGA	Kanser genom atlas
TCR	T hücreli reseptörle ilişkili proteinkinaz
TET2	Ten-Eleven Translocation 2
TNF	Tümör nekroz faktörü
TP53	Tumor Protein 53
TOR	Rapamisinkinaz hedefi
TRM	Tedaviye bağlı mortalite

ÖZET

Gezer, S. (2018). Akut Miyeloid Lösemide Spink2 Ekspresyonunun Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Akut Miyeloid Lösemi (AML) hematopoez sürecinde farklılaşmanın durması, miyeloblastların aşırı çoğalması ve normal kan hücrelerinin üretiminin bozulması ile sonuçlanan heterojen bir hastalıktır. İnsidansı yaşla beraber artmaktadır. AML’de 5. ve 7. kromozomların bir parçasının veya tamamının kaybı, t(8;21), t(15;17) ve inv(16) gibi kromozomal değişikliklerin yanı sıra tek gen mutasyonları sık görülür. SPINK2 Kazal tip serin proteaz inhibitörleri ailesindendir. Lenfomada, umbilikal cord’tan alınan primitif hematopoietik kök hücrelerde ve bazı lösemi hücrelerinde yüksek seviyede eksprese edildiği gösterilmiştir. AML hastalarında ekspresyonun analiz edildiği bir çalışma daha önce yapılmamıştır. Bu çalışmada amacımız, AML’de SPINK2 ekspresyonunun analizidir. AML olgularında ve 12 hücre soyunda SPINK2 ekspresyonu incelendi. Hücre soylarında hücre içi ve hücre dışına salınan protein düzeyi ELİSA yöntemiyle belirlendi. AML hücre soylarında SPINK2 ekspresyonunu ve salgılanan protein düzeyinin diğer hücre soylarına göre artmış olduğu belirlendi. SPINK2 mRNA düzeyleri ile hücre içindeki ve hücre dışına salınan protein düzeyleri ile arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde korelasyon bulundu ($p=0,00004$ ve $p=0,47$). Erişkin AML’li olgularda kontrole göre SPINK2 ekspresyonu anlamlı dercede artmış bulundu ($p=0,042$). SPINK2 ekspresyonun t(8;21) pozitif olgularda anlamlı düzeyde düşük olduğu ($p=0,000$), inv(16) pozitif olguların hepsinde anlamlı düzeyde yüksek olduğu gösterildi ($p=0,028$). SPINK2’nin AML’de rolünü anlaşılması ve prognostik marker olarak kullanılabilirliğinin belirlenmesi için daha ileri çalışmalar gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Akut Miyeloid Lösemi, Kazal Tip Serin Proteaz, SPINK2, SPINK2 ekspresyonu

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 26523

ABSTRACT

Gezer, S. (2018). The analysis of SPINK2 expression in Acute Myeloid Leukemia (AML). Institute of Medical Sciences, Department of Genetics, Istanbul University. Master's thesis. İstanbul.

Acute Myeloid Leukemia (AML) is a heterogeneous disorder that results in the disruption of differentiation within the process of hematopoiesis, the excessive accumulation of myeloblasts and the deterioration of the production of normal blood cells. Its incidence increases with age. The loss of part or all of chromosomes 5 or 7, chromosomal translocations such as t(8;21), t(15;17) and inv(16) alongside the single gene mutations. SPINK2 is a member of the family of serine protease inhibitors of the Kazal type. It has been shown, in the case of lymphoma, that SPINK2 is highly expressed in primitive hematopoietic cells removed from umbilical cord and in some leukemia cells. However, there is no research where the expression of SPINK2 in patients with AML has been analyzed before. This research has analyzed the expression of SPINK2 mRNA in AML. Both the level of SPINK2 mRNA and of the protein levels have been identified in the 12 cell lines. It has been determined that the expression of SPINK2 expression level in the cell lines of AML increased compared to other cell lines. There has been noticed a correlation between the SPINK2 mRNA and protein levels ($p=0,00004$ and $p=0,47$ respectively). With control, the findings show the SPINK2 expression significantly increased in adult AML ($p=0,042$). The SPINK2 expression in the t(8;21) positive cases is found substantially low ($p=0,000$); however, in the inv(16) positive cases significantly high ($p=0,028$). To perceive the role of SPINK2 in AML and determine its utility as a prognostic marker, further studies are needed.

Key Words : Acute Myeloid Leukemia, the Kazal type serine protease, SPINK2, the SPINK2 expression

This study has been subsidized by the Coordinatorship of Scientific Research Projects in Istanbul University. Project no: 26523

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Lösemiler, DNA'daki somatik mutasyonlar sonucunda oluşur. Kendiliğinden, radyasyona veya karsinojenlere maruz kalınması sonucunda gerçekleşen onkogen aktivasyonu ya da tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonunda etkili mutasyonlar; hücre ölümü, farklılaşma ya da bölünme kontrolünde hasara yol açarak lösemi oluşumuna neden olabilirler (1,2). En sık görülen genetik değişiklikler; kromozomal translokasyonlar, tümör baskılayıcı gen mutasyonları, hücrelerarası sinyal bozuklukları ve hücre döngüsündeki bozukluklardır (2).

Akut Miyeloid Lösemi (AML) hematopoez sürecinde farklılaşmanın durması, miyeloblast olarak adlandırılan olgunlaşmamış hücre popülasyonunun aşırı çoğalması ve normal kan hücrelerinin üretiminin bozulması ile sonuçlanan heterojen bir hastalıktır. Erişkinlerde en sık görülen akut lösemidir. İnsidansı yaşla beraber artmaktadır. Erişkinlerde 100.000 kişide 3,7 sıklıkla görülür. Tüm lösemi tiplerine, erkeklerde daha sık rastlanmaktadır (3,4).

AML genetik, biyolojik ve klinik olarak heterojenlik gösterir. AML'de 5. ve 7. kromozomların bir parçasının veya tamamının kaybı, t(8;21), t(15;17) ve inv(16) gibi kromozomal değişiklikler görülmektedir. Bu kromozomal değişikliklerin yanı sıra en sık görülen mutasyonlar FLT3, NPM1, DNMT3A, KIT, CEBPA, RUNX1, IDH1/2 TET2 ve MLL genlerindeki mutasyonlardır (5,6,7,8,9,10).

Proteazlar hücrelerde; önemli metabolik kontrol noktalarında görev alan enzimlerin yıkılarak ve aktivitelerinin düzenlenerek hücrenin değişen çevre şartlarına ve metabolik ihtiyaçlarına verimli bir şekilde cevap vermesini; proteinlerin besin yetersizliği durumunda enerji ve amino asit kaynağı olarak kullanılmasını ve transkripsiyonel veya translasyonel hatalardan kaynaklanan hasarlı veya işlevsiz proteinlerin uzaklaştırılmasını sağlama görevlerini gerçekleştirirler. Proteazların aktivitelerinin düzenlenmesi hücre için hayati önem taşır. Proteaz aktivitesini, proteaz inhibitörleri düzenler (11).

Proteaz inhibitörleri; kontrol edilemeyen proteolizi önleyerek proteaz aktivitelerinin düzenlenmesinden sorumludur. Serin proteaz inhibitörleri proteaz

inhibitörlerinin en büyük ve en önemli süper ailesidir. Hedef proteazlarına kovalent olarak bağlanarak inaktivasyona yol açan intihar substratlarıdır (12).

Pek çok serin proteaz inhibitör sadece proteazları inhibe etmekle kalmaz, aynı zamanda diğer moleküller ile etkileşimleri sonucunda başka fizyolojik etkilere de sahiptir. Bu etkileşimler, belirli bir fizyolojik cevabı güçlendirir (13,14).

SPINK2 (HUSI-II, ISK2) Kazal tip serin proteaz inhibitörleri ailesinin üyesidir. Akrosin ve tripsin inhibitörü olarak fonksiyon göstermektedir. SPINK2 geni 4q12 bölgesinde bulunmaktadır (15). SPINK2, 84 amino asitli protein ve 23 kalıntı sinyal peptidi içerir. Epididim ve seminal vezikülde ekspresyonunun yüksek olduğu ve fertilité ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (16,17). SPINK2 ekspresyonunun, optik sinir hasarından sonra, retinal ganglion hücrelerinde önemli derecede artış gösterdiği ve apoptotik uyarılara karşı duyarlılığı arttırdığı gösterilmiştir. SPINK2 ekspresyon düzeyindeki aşırı artışın apoptozu indüklediği bildirilmiştir (18). Lenfomada umbilikal cord'tan elde edilen primitif hematopoietik kök hücrelerde ve bazı lösemi hücre hatlarında yüksek seviyede eksprese edildiği gösterilmiştir (19,20,21,22). SPINK2'nin Akut Miyeloid Lösemi (AML) ve diğer lösemi hastalarında ekspresyonu ile ilgili daha önce bir çalışma yapılmamıştır.

Bu tez çalışmasında, AML'de SPINK2 ekspresyonu analiz edildi. Daha önceki bilgilerden de faydalanarak SPINK2 ekspresyon seviyesinin AML'deki değişimi araştırıldı. Daha önce AML hastalarında SPINK2 ekspresyonu ile ilgili bir çalışma yapılmadığından; farklı yaş gruplarındaki kadın ve erkek hastalar arasında SPINK2 ekspresyonlarındaki farklılıklar RT-PCR seviyesinde belirlendi. Hastalarda ifade düzeylerindeki farklılıklar tespit edildi. Farklı AML sınıfları ve farklı prognoza sahip olgularda SPINK2 mRNA ekspresyonunda önemli değişiklikler saptandı. AML olgu gruplarındaki ifade düzeyinde farklılıklar, SPINK2'nin AML için bir prognostik marker adayı olabileceği görüşümüzü kuvvetlendirdi.

AML'nin prognostik markeri olabileceğini düşündüğümüz SPINK2 geninin ekspresyonu, AML hücre soylarında (HL60, NB4 ve THP1), farklı lösemi hücre soylarında (K562, Jurkat, ve Nalm6) ve diğer bazı hücrelerde (MCF7, HeLa ve HUVEC, hFOB, 293T) yine RT-PCR düzeyinde incelendi. Bu hücre soylarında SPINK2 proteinin hücre içindeki seviyesi ve hücre dışına salınan miktarının tespiti için

ELISA testi uygulandı. Hem SPINK2 mRNA düzeyi, hem de hücre içi ve hücre dışına salınan protein düzeyleri belirlenmesi hedeflendi.

Çalışma sonucunda AML patogenezinin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunulması ve AML teşhis ve tedavisi için yeni prognostik markerler ve terapötik hedeflerin bulunması amaçlandı.

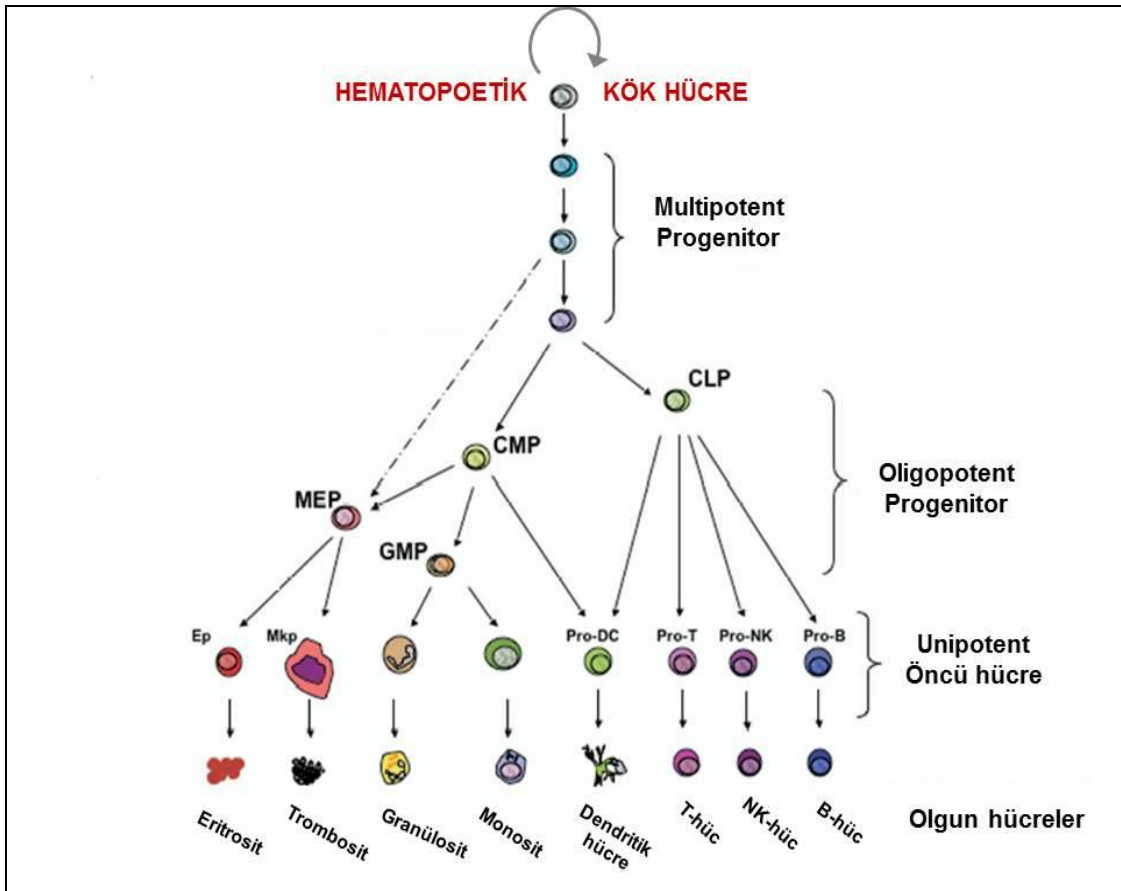
SPINK2 mRNA düzeyleri ile hücre içindeki ve hücre dışına salınan protein düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde korelasyon bulundu ($p=0,00004$ ve $p=0,47$). Erişkin AML’li olgularda kontrole göre SPINK2 ekspresyonunun anlamlı derecede arttığı tespit edildi ($p=0,042$). SPINK2 ekspresyonun t(8;21) pozitif olgularda anlamlı düzeyde düşük olduğu ($p=0,000$), inv(16) pozitif olguların %100’ünde ise anlamlı düzeyde yüksek olduğu gösterildi ($p=0,028$). Yapılan deneylerde, AML olgularının %71’inde SPINK2 geni ekspresyonunun sağlıklı kontrollere göre yüksek olması AML patogenezinde rol oynayabileceğini ve AML için prognostik marker olabileceğini doğrular niteliktedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. AKUT MİYELOİD LÖSEMİ

2.1.1. HEMATOPOEZ

Kan hücrelerinin oluşumu, gelişimi ve farklılaşması dahil olmak üzere tüm kan hücrelerinin üretimidir. Prenatal olarak hemotopoez, yumurta sarısı kesesinden, sonra karaciğerde ve daha sonra da kemik iliğinde gerçekleşir. Normal durumda, yetişkinlerde hematopoez, kemik iliği ve lenfatik dokularda gerçekleşir. Her tür kan hücresi pluripotent olan ilkel hücrelerden türetilmiştir (Şekil 2-1). Hematopoez iki aşamalıdır. Bu aşamalar ilkel dalga ve kesin dalga olarak adlandırılır (23).

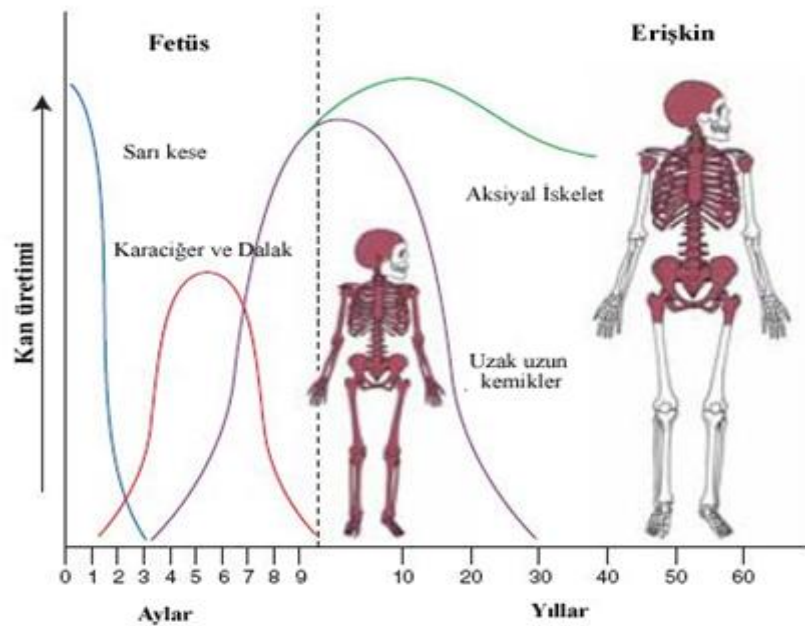


Şekil 2-1 : Kan hücrelerinin kökeni (29)

Eritroid progenitör içeren ilkel dalga, erken embriyonik gelişim sırasında eritrosit ve makrofajları oluşturur (24).

İlkel dalganın birincil amacı, embriyonun hızlı bir şekilde büyümesi nedeniyle artan doku oksijenasyonunu kolaylaştıran kırmızı kan hücreleri üretmektir (25).

Daha sonra, kemikler oluştuğundan, hematopoez kemik iliğinde gerçekleşmeye başlar. Çocukluk çağında, en sık görülen hematopoez bölgeleri, başta femur, tibia ve fibula olmak üzere uzun kemiklerdir. Yetişkinlerde hematopoez, pelvis, sternum, kafatası ve omurgada gerçekleşir (Şekil 2-2). Kemik iliğinde başlayan hematopoez süreci; dalak, timus ve lenf nodları dahil olmak üzere diğer lenfoid organlarda olgunlaşmayla devam eder. Embriyonik evreden uzaklaştıkça, hematopoez, multipotansiyel hematopoietik kök hücrelerin kullanılmasını gerektirir ve kesin hematopoez olarak adlandırılır (26).



Şekil 2-2 : Yaşa bağlı kan üretim bölgeleri değişimi (30)

Hematopoez, dolaşımdaki kan hücrelerinin seviyelerini korumak için sürekli olarak gerçekleşen metabolik bir olaydır. Retikulosit ve eritrositlerden oluşan eritroid seri, lenfositler (B ve T hücreleri) yanı sıra doğal katil hücrelerden oluşan lenfoid seri

ve makrofajlar, dendritik hücreler, granülositler ve megakaryositlerden oluşan myeloid seri olmak üzere üç farklı kan hücresi hattı vardır (27,28).

2.1.2. LÖSEMi

Lösemi, kemik iliğinin hemapoetik kök hücrelerinden kaynaklanan malign bir hastalıktır. Normal hematopoezde, hemapoetik kök hücreler periferik kan hücrelerine (matür lenfosit, granülosit, monosit, eritrositler ve megakaryositler/ trombositler) farklılaşırken, lösemide farklılaşamaz. Olgunlaşamayan hücreler kemik iliğinde çoğalarak normal hemapoetik hücrelerin yerini alır. Lösemide DNA hasarı olduğu düşünülmektedir. Kromozomlardaki yeniden düzenlenmeler, translokasyonlar, delesyonlar, gen amplifikasyonları ve sitogenetik değişiklikler normal hücrenin farklılaşma ve proliferasyonun düzenlenmesini bozmaktadır (31).

Globocan 2012 verilerine göre Türkiye popülasyonunda yetişkin bireylerde lösemiler tüm kanserlerin % 5,8 kadarını oluşturur. Lösemiler, erkeklerde %7,1 görülme sıklığı ve %5,8 ölüm oranı; kadınlarda ise %4,7 görülme sıklığı ve %3,6 ölüm oranı ile tanımlanır. Dünya genelinde ise; yine Globocan 2012 verilerine göre yetişkin bireylerde lösemiler tüm kanserlerin % 4,7'sini oluşturur ve ölüm oranı % 3,4 kadardır. Lösemiler, erkeklerde %5,6 görülme sıklığı ve %4,2 ölüm oranı; kadınlarda ise %3,9 görülme sıklığı ve %2,8 ölüm oranı ile tanımlanır (32).

Lösemiler köken aldıkları hücre tipine göre Lenfoid ve Miyeloid; sağ kalım ve olgunlaşma özelliklerine göre de Akut veya Kronik olarak gruplara ayrılırlar (33).

1-Akut Miyeloid Lösemi (AML)

2-Kronik Miyeloid Lösemi (KML)

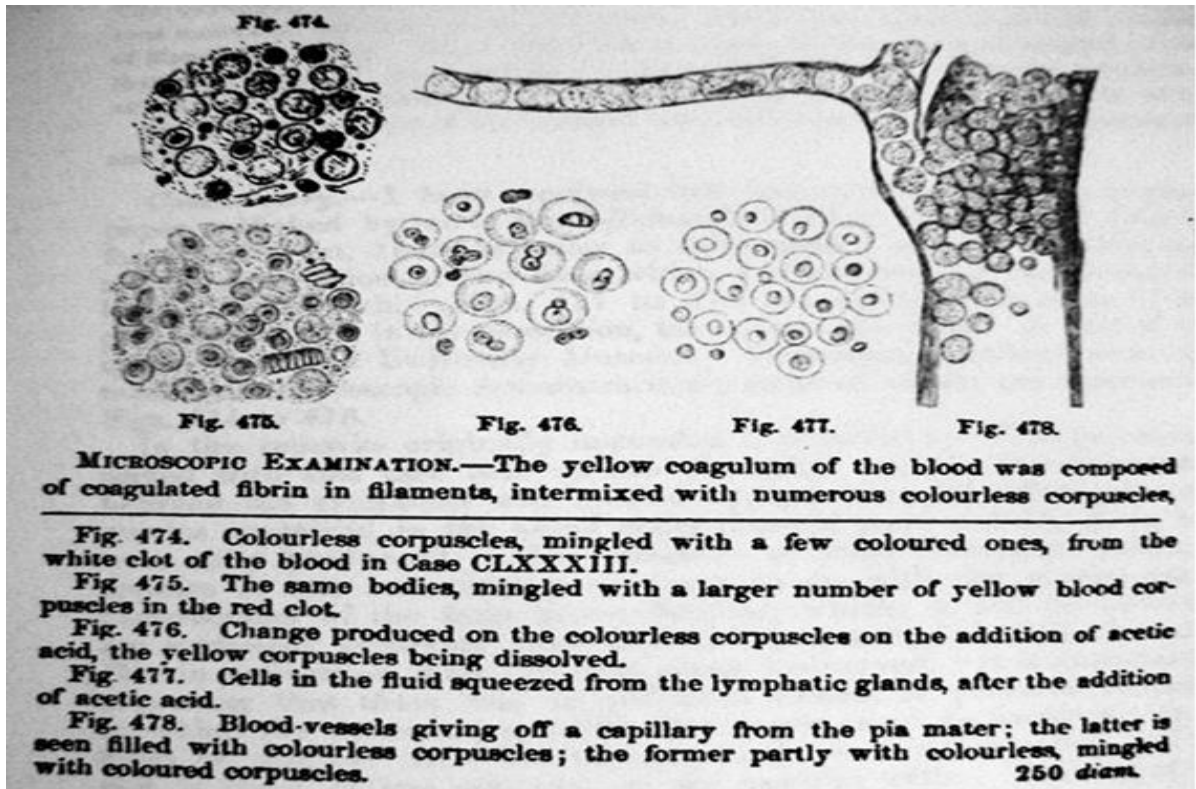
3-Akut Lenfoid Lösemi (ALL)

4-Kronik Lenfoid Lösemi (KLL)

2.1.3. TARİHÇE

‘‘Hematoloji’’terimi ilk kez Thomas Schwenke tarafından 1743’de kullanılmıştır. Ancak löseminin tanımlanması 19. yüzyılda mikroskobun tıp alanında yaygın biçimde kullanılmaya başlamasıyla gerçekleşebilmiştir (34). Lösemi ilk olarak 1827 tarihinde Dameshek ve Gunz tarafından tanımlanmıştır. Ateş, güçsüzlük, karın şişliği olan bir olgunun otopsisinde, dalak ve karaciğerinin normalden çok büyük

olduğu ve kanının kıvamının aşırı yoğun olduğu bildirilmiştir. John Hughes Bennett tarafından 1845 ‘de Edinburg Medical and Surgical Journal’ da “Case of Hypertrophy of the Spleen and Liver in which Death took place from Suppuration of the Blood” adlı bir makale yayınlanmıştır. Bu makalede, Bennett, kanda gözlemlediği değişikliğin iltihap ve enflamasyondan farklı olduğunu belirtmiştir. Kandaki tüm hücrelerin etkilenmiş olduğunu, hücrelerin değişik boylarda olduğunu, asetik asit uygulandığında ise nukleusların ayrıştığını göstermiş ve ilk kez lösemili bir hastanın kan hücrelerinin resmi yayınlanmıştır (Şekil 2-3) (34).



Şekil 2-3: Lösemili hastaların kan hücrelerinin görünümü (34)

Yaşayan hastalarda löseminin mikroskopik tanısını ise, ilk kez Henry Fuller 1846 ‘da gerçekleştirmiştir. Virchow, 1847’de benzer bir olgu raporu yayınlamış ve bu yeni hastalığı tanımlamada “leukemia” (beyaz kan) terimini kullanmıştır. Bennett ise “leucocythaemia” terimini tercih etmiştir (34).

Akut löseminin tanımı, 185’de Nikolaus Friedreich tarafından yapılmıştır. Ernst Neumann, 1870’ de kemik iliğinin kan hücrelerinin yapımında önemli bir yeri olduğunu belirterek löseminin kemik iliğindeki değişikliklerden kaynaklandığını göstermiştir (34,35,36). 1873’te lösemi tedavisinde ilk kez kan transfüzyonu kullanılmıştır.

Paul Ehrlic'in, 1877'de kan hücreleri arasındaki farklılaşmayı gösteren boyama yöntemini bulması, tıpta yeni bir çağı başlatmıştır. 1900 yılında Naegelli, lenfoblastların lenfoid hücre dizisine, miyeloblastların ise miyeloid hücre dizisine ait olduğunu belirtmiştir (35).

İlerleyen yıllarda lösemi patofizyolojisinin incelenmesiyle heterojen özellik gösteren bir hastalık olduğunun anlaşılması, tedavi yöntemlerinin gelişmesine olanak sağlamış ve bu durum lösemi hastalarının yaşam sürelerini uzatmıştır (37,38).

Akut monositer löseminin tanımlanması ise 1913 yılında Dr. Hasan Reşat Sığındım ve Dr. Schilling tarafından yapılmıştır. "Akut monositer lösemi" 1913 yılında Münchener Medizinischer-Wochenschrift dergisinin 36. sayısında yayınlanmıştır (34).

1976 yılında Fransız-Amerikalı ve İngiliz bir grup hematolog tarafından orjinal FAB sınıflaması oluşturulmuş ve aynı sınıflama 1985 yılında yeniden gözden geçirilmiştir. FAB sınıflamasında akut lösemiler, morfolojik ve sitokimyasal boyanma özelliklerine göre gruplandırılmaktadır. Akut lenfoblastik ve Akut myeloblastik lösemi olarak ikiye ayrılmaktadır (34).

FAB sınıflaması, immünofenotipleme, elektron mikroskobu, sitogenetik, moleküler biyolojik teknik yöntemlerini ve nadir lösemi tiplerini içermeyen bir sınıflamadır. Akut lösemide sitogenetik ve moleküler genetik anomalilerin tespiti ve bunların prognostik önem göstermelerinin belirlenmesiyle yeni bir sınıflandırma ihtiyacı olduğu belirlenmiş ve 2001 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından akut lösemiler de dahil olmak üzere hemapoetik ve lenfoid neoplazmaları içeren yeni bir sınıflandırma yapılmıştır. Akut lösemilerin WHO sınıflamasında, morfoloji, immünofenotipleme, sitogenetik ve moleküler biyolojik özellikler göz önüne alınmıştır.

Akut lösemi tanısı için kemik iliğinde blastik hücre sayısı %3'dan %22' ye indirilmiş ayrıca nadir lösemi tipleri de dahil edilmiştir (36,39).

2.1.4. AKUT LÖSEMİLER

Akut lösemiler, hematopoetik sistemin progenitör hücrelerinin klonal ve neoplastik proliferasyonu sonucunda ortaya çıkan heterojen bir hastalık grubudur. Akut lösemilerin klinik bulguları hızla proliferen olan immatur blast hücrelerin kemik iliğinde normal hematopoetik hücrelerin yerini almasıyla ortaya çıkar (40).

Lösemiler, köken aldıkları hücre tipine göre lenfoid ve miyeloid; sağkalım ve olgunlaşma özelliklerine göre de akut veya kronik olarak iki ana gruba ayrılırlar (41).

Akut lösemiler morfolojik, immünofenotipleme, sitogenetik ve moleküler biyolojik özellikler göz önüne alınarak Akut lenfoblastik (ALL) ve Akut myeloblastik lösemi (AML) olmak üzere iki ana gruba ayrılır (42,43).

WHO sınıflamasında akut lösemiler; miyeloid, lenfoid ve serisi belirlenemeyen olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır (44):

Akut miyeloid lösemiler:

- a. Tekrarlayan sitogenetik anomalilerle seyreden AML
- b. Çoğul seri displazi ile seyreden AML
- c. Tedaviye ikincil AML ve MDS
- d. Tanımlanan gruplara girmeyen AML olmak üzere dört gruba ayrılarak değerlendirilmiştir.

Akut lenfoid lösemiler:

- a. Prekürsör B lenfoblastik lösemi/ lenfomalar
 - Rekürren sitogenetik anomalilerle birlikte olanlar
 - Sınıflandırılmayanlar
- b. Prekürsör T lenfoblastik lösemi / lenfomalar

Sınıflandırılmayan (Serisi belirsiz) Akut lösemi

- a. Bifenotipik (Mikst fenotipli) akut lösemi
- b. Farklılaşmamış akut lösemi

Tüm lösemi tiplerine, erkeklerde kadınlara göre daha sık rastlanmaktadır. Tüm populasyonda genel ALL insidansı AML insidansına benzerdir, ancak ALL çocukluk döneminde, AML erişkin dönemde daha sıktır (45).

2.1.5. AKUT MİYELOİD LÖSEMİ

Hızlı ilerleyen bir malign hastalık olan Akut Myeloid Lösemi , kemik iliğinde miyeloid hücrelerin sayısında artış ve olgunlaşmalarında duraksama ile karakterize edilen ve sıklıkla hematopoetik yetersizlikle veya sonuçla ortaya çıkan bir klonal hematopoietik kök hücre bozukluğudur (46).

AML'de dediferansiye edilmiş ve farklılaşmamış hücrelerin yüzdesi fazladır. Yetişkinleri etkileyen en yaygın akut lösemi olup insidansı yaşla birlikte artar (47). AML semptomları, normal kemik iliğinin lösemik hücrelerle değiştirilmesiyle oluşur. Alyuvar, trombosit ve normal akyuvar hücrelerinde düşüşe neden olur. Yorgunluk, nefes darlığı, kolay morarma ve kanama ile artmış enfeksiyon riski görülür. AML'nin gelişimi için çeşitli risk faktörleri belirlenmiştir, ancak spesifik neden henüz tam olarak anlaşılamamıştır (48).

2.1.5.1. AML'nin Epidemiyolojisi

Akut miyeloid lösemi (AML) sık olmamakla birlikte, çok sayıda kansere bağlı ölüme neden olan son derece malign neoplazmdır. Son yıllarda insidansı çok değişmemiştir. Erken çocukluktaki ve yetişkinlikte iki zirve gösterir. Batı dünyasında 100.000 kişide 3.7 insidans ve 100.000 kişide yaşa bağlı ölüm oranı 2.7 ila 18 arasındadır. Bu durumun yaşlı nüfus oranı artışıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. ABD de 65 yaşın altındaki hastalarda 100.000 ~ 1.3'den, 65 yaş üzeri 100.000 nüfus başına 12.2 olgu kadar, AML insidansı yaşla birlikte artmaktadır (47,48).

National Cancer Institute 2010-2014 verilerine göre; son yıllarda akut miyeloid lösemi vaka oranı, her 100.000 erkek ve kadın için yılda 4,2 iken, ölüm oranı her yıl 100.000 erkek ve kadın için 2,8 olarak rapor edilmiştir (49,50).

2.1.5.2. AML Sınıflandırılması

AML'nin alt tipinin belirlenmesi, bazen hem hastanın görünümünü hem de en iyi tedaviyi etkilediğinden çok önemli olabilir. Örneğin, Akut Promyelocytic Lösemi (APL) alt tipi genellikle AML'nin diğer alt türleri için kullanılanlardan farklı ilaçlar kullanılarak tedavi edilir. AML'yi alt tiplere ayırmak için kullanılan ana sistemlerden

ikisi: Fransız-Amerikan-İngiliz (FAB) sınıflandırması ve daha yeni olan Dünya Sağlık Örgütü (WHO) sınıflandırmasıdır (51). Fransız-Amerikan-İngiliz sınıflandırma sistemi, farklı AML türleri arasında ayırım yapmak için geliştirilmiş ilk sınıflandırma sistemidir. 1976 yılında geliştirilen FAB sınıflandırması, lösemik hücrelerin morfolojik ve sitokimyasal özelliklerine dayanarak sekiz alt türü (M0 ile M7 arasında) tanımlar (Tablo 2-1).

Tablo 2-1: AML FAB sınıflandırması (52)

FAB SINIFI	İSİM	SİTOGENETİK
M0	akut miyeloblastik lösemi, minimal farklılaşmış	
M1	olgunlaşmadan akut miyeloblastik lösemi	
M2	granülositik olgunlaşma ile akut miyeloblastik lösemi	t (8; 21) (q22; q22), t (6; 9)
M3	promyelositik veya akut promiyelositik lösemi (APL)	t (15; 17)
M4	akut miyelomonositik lösemi	inv (16) (p13q22), del (16q)
M4eo	kemik iliği eozinofili ile birlikte miyelomonositik	inv (16), t (16; 16)
M5	akut monoblastik lösemi (M5a) veya akut monositik lösemi (M5b)	del (11q), t (9; 11), t (11; 19)
M6	eritrolösemi (M6a) ve çok nadir saf eritroid lösemi (M6b) dahil olmak üzere akut eritroid lösemi	
M7	akut megakaryoblastik lösemi	t (1; 22),

2001 yılında, AML'nin teşhisi ve yönetiminde yapılan ilerlemeleri entegre etme çabalarının bir parçası olarak, Dünya Sağlık Örgütü (WHO), 2008'de revize edilmiş bir versiyonun ardından yeni bir sınıflandırma sistemi uygulamaya koydu (53). AML'nin WHO sınıflandırması, altı ana hastalık varlığını tanımlamak için genetik bilgiyi morfoloji, immünofenotip ve klinik sunumla birleştirerek ayırır (Tablo 2-2) :

Tablo 2-2: AML WHO sınıflandırması (54)

AML WHO sınıflandırması	
Türleri	Genetik anormallikler
Tekrarlayan genetik anormallikleri olan AML	AML, t (8:21) (q22; q22); RUNX1-RUNX1T1
	Inv (16) (p13.1q22) veya t (16; 16) ile AML (p13.1; q22);CBFBMYH11
	PML-RARA - APL
	t(9; 11) ile AML (p21.3; q23.3); MLLT3-KMT2A
	t (6; 9) ile ML (p23; q34.1); DEK-NUP214
	Inv (3) (q21.3q26.2) veya t (3; 3) (q21.3; q26.2); GATA2, MECOM
	AML (megakaryoblastik) ile t (1; 22) (p13.3; q13.3); RBM15-MKL1
	BCR-ABL1’li AML
	NPM1 mutasyonlu AML
	CEBPA'nın bialelik mutasyonları olan AML
	RUNX1 mutasyonlu (geçici varlık) ile AML
Myelodysplasia ile ilgili değişiklikler ile AML	
Terapi ile ilişkili miyeloid neoplazmlar	
	Minimal farklılaşmalı AML
	Olgunlaşma olmayan AML
	Olgunlaşma başlayan ML
	Akut miyelomonositik lösemi
	Akut monoblastik / monositik lösemi
	Akut eritroid lösemi
	Saf eritroid lösemi
	Akut megakaryoblastik lösemi
	Akut bazofilik lösemi
	Miyelofibrozis ile akut panmyelosis
Miyeloid sarkom	
Down sendromuna bağlı miyeloid proliferasyonları	Geçici anormal miyelopoezis
	Down sendromu ile ilişkili AML

Kısaltmalar: AML, akut miyeloid lösemi; APL, akut promiyelositik lösemi; ML, miyeloid lösemi

Ayrıca daha sonra bu sınıflandırmaya serisi bilinmeyen akut lösemi de dahil edilmiştir (55).

2.1.5.3. Prognostik Faktörler

Prognozun doğru bir şekilde değerlendirilmesi AML'nin yönetiminde en önemli noktalardan biridir. Hastaları tedaviye direnç veya tedaviye bağlı mortalite (TRM) risklerine göre sınıflandırmayı sağlayan prognostik faktörler, doktorun standart veya artan tedavi yoğunluğu, konsolidasyon kemoterapisi veya allojenik hematopoietik kök hücre transplantı arasında karar vermesine rehberlik eder.

Son yıllarda, araştırmalar bazı hastaların neden diğerlerinden daha iyi tedavi edilme şansına sahip olduğunu bulmaya odaklanmıştır. Tedaviye cevabı etkileyen olgular (veya lösemiler) arasındaki farklılıklar prognostik faktörler olarak adlandırılır (47,56,57).

Klinik faktörler arasında, artan yaş ve kötü performans durumu, daha düşük tam remisyon oranları (CR) ve genel sağkalım (OS) azalması ile ilişkilidir (58). Klinik faktörlerin tedaviye rehberlik etmede önemli bir rolü olmasına rağmen, sitogenetik değişiklikler AML'de CR ve OS için en güçlü prognostik faktördür. Buna göre, AML vakaları, tek başına sitogenetik profiline göre uygun, orta veya olumsuz prognostik risk gruplarına ayrılabilir (57).

t(8;21), t(15;17) veya inv (16) kromozom yeniden düzenlemeleri, 60 yaşından küçük ve 60 yaşından daha yaşlı olan olgularda sırasıyla 3 yıllık OS % 66 ve % 33 ile iyi bir prognozu gösterir.

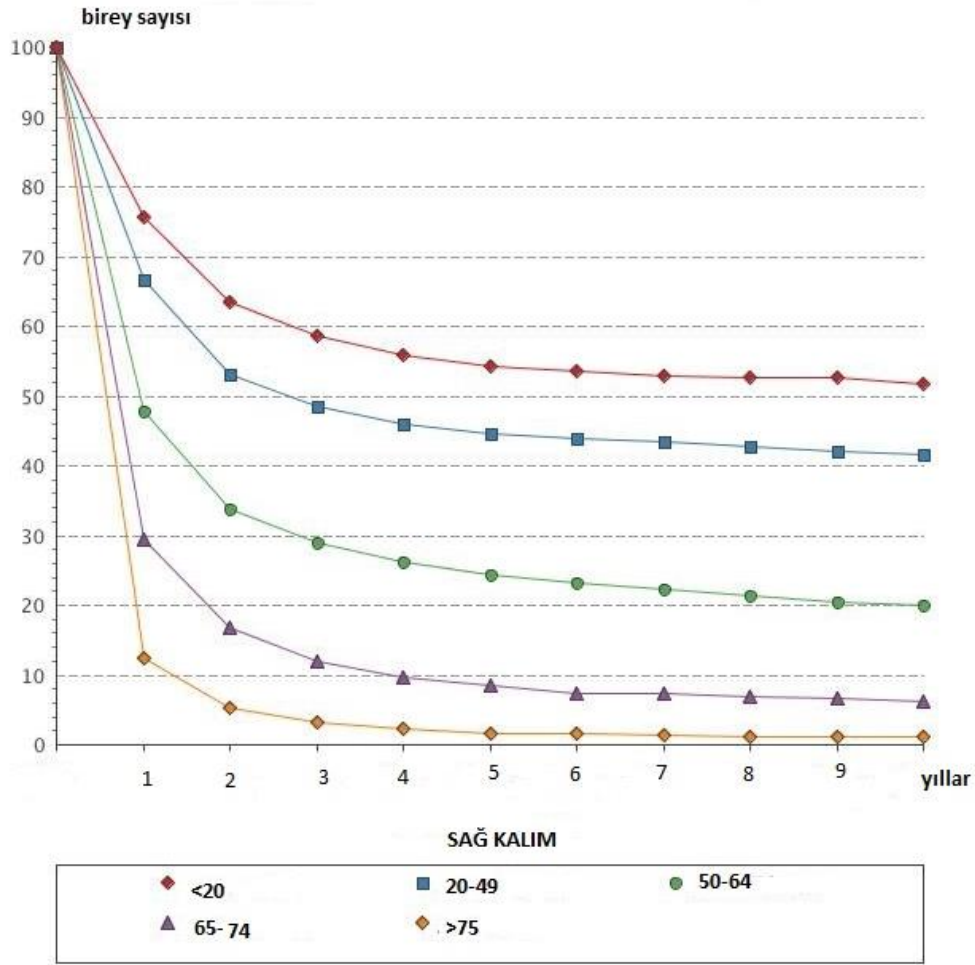
Aksine, kompleks karyotip gibi sitogenetik değişiklikler (yani WHO 2008 sınıflandırmasında tanımlanan tekrarlayan genetik anormalliklerin yokluğunda, üç veya daha fazla kromozom anomalisi), monosomi 5 veya 7, t (6; 9), t (9; 11) dışındaki inv (3) veya 11q değişikliklerinin hepsinde tedavi başarısızlığı ve ölüm riskinin anlamlı derecede yüksek olduğu gösterilmiştir (Tablo 2-3).

Orta derecede prognostik risk taşıyan 24 AML olgusu, genellikle sitogenetiği normal olan (CN-AML) olgulardan oluşmaktadır (58,59,60)

Tablo 2-3: Sitogenetik ve moleküler profile dayanan prognostik risk sınıflandırması(62)

Genetik ile 2017 ELN risk sınıflandırması	
Risk kategorisi	Genetik anormallik
İYİ	t (8; 21) (q22; q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv (16) (p13.1q22) veya t (16; 16) (p13.1;q22); <i>CBFBMYH11</i> FLT3 -ITD veya FLT3 -ITD düşük † ile NPM1 mutasyonu <i>Biallelik CEBPA</i> mutasyonu
ORTA	NPM1 ve FLT3 -ITD mutasyonu FLT3 -ITD'siz veya FLT3 -ITD düşük ve (ters-riskli genetik lezyonlar olmaksızın) vahşi tip NPM1 t (9; 11) (p21.3; q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i> Olumsuz veya olumsuz olarak sınıflandırılmayan sitogenetik anormallikler
KÖTÜ	t (6, 9) (p23; q34.1); <i>DEK - NUP214</i> t (v, 11q23.3); <i>KMT2A</i> yeniden düzenlenmesi t (9; 22) (q34.1; q11.2); <i>BCR - ABL1</i> inv (3) (q21.3q26.2) veya t (3; 3) (q21.3; q26.2); <i>GATA2, MECOM (EVI1)</i> -5 veya del (5q); -7; 17 / abn (17p) Kompleks karyotip, monozomal karyotip Vahşi-tip NPM1 ve FLT3 -ITD yüksek <i>RUNX1</i> mutasyonu <i>ASXL1</i> mutasyonu <i>TP53</i> mutasyonu

AML olgularında yaşa bağlı göreceli sağkalım grafiği verilmiştir. (Şekil 2-4)



Şekil 2-4: AML hastalarında 1992-2010 yılları arasında yaşa bağlı sağkalım oranları (61)

2.1.5.4. AML'nin Etiyolojisi

Kemik iliğini lösemiye teşvik eden genetik mutasyonun nedeni bilinmemekle birlikte akut lösemi gelişimi için birçok çevresel ve genetik risk faktörü tespit edilmiştir. Bunlar arasında yaş, öncül hematolojik hastalıklar ve genetik bozukluklar, virüs enfeksiyonu, radyasyon ve çeşitli kimyasallara maruz kalma gibi etmenler bulunur (47).

Hematopoetik progenitör hücrelerin AML hücrelerine dönüşümü farklı aşamalarda farklı uyarıcı ajanlara duyarlılığını gerektiren çok adımlı bir süreçtir. Yüksek düzeyde radyasyon, benzen gibi etkenler lökemogenezi tetikleyebilir. AML'nin farklı alt türleri, belirli bir moleküler anormallik veya mutasyon ile indükleyici ajan arasında fonksiyonel bir bağ olduğunu düşündüren farklı mekanizmalara sahip olabilir.

AML vakaları, bir ajana maruz kalma olmaksızın de novo olarak da ortaya çıkabilir (Tablo 2-4).

AML, altta yatan hematolojik bozukluğu olan hastalarda veya önceki tedavinin bir sonucu olarak ortaya çıkabilir (örneğin, topoizomera II'ye maruz kalma, alkilleyici ajanlar). AML'nin patogenezi, miyeloid kök hücrelerin klonal popülasyonunun anormal çoğalmasını ve farklılaşmasını içerir. Delesyonlar, kromozomal translokasyonlar ve nokta mutasyonları gibi moleküler değişiklikler AML'nin gelişiminde rol oynamıştır (65).

Tablo 2-4: AML ile ilişkili risk faktörleri (66)

Genetik bozukluklar	Klinefelter sendromu Patau sendromu Ataksi telanjiektazi Shwachman sendromu Kostman sendromu Nörofibromatozis Fanconi anemi Li Fraumeni sendromu
Fiziksel ve kimyasal riskler	Benzen Pipobroman gibi ilaçlar Tarım ilacı Sigara içmek Embalming sıvılar Herbisitler
Radyasyona maruz kalma	Terapötik olmayan, terapötik radyasyon
Kemoterapi	Alkilleyici ajanlar Topoizomera - II inhibitörleri Antrasiklinler Taksanlar

Delesyonlar

AML'de rutin sitogenetik inceleme ile en sık saptanan değişiklikler, 5. ve 7. kromozomların bir parçasının veya tamamının kaybıdır. 5. ve 7. kromozomlardaki bu anormallikler kötü prognoz ile ilişkilidir (6).

Kromozomal Translokasyonlar

AML'de görülen translokasyonların çoğu kimerik füzyon gen ürünleri oluşmasıyla sonuçlanır. AML'de en sık görülen kromozom bozukluğu inv(16) ve t(8;21) translokasyonudur. Bu translokasyonlar CBF genini (core bağlanma faktörü) hedef alır. CBF'nin DNA'ya bağlanarak işlev gören alfa ve DNA'ya bağlanmadan transkripsiyonel aktiviteyi arttıran beta alt birimleri vardır. t(8;21) translokasyonu, 21. kromozomdaki CBF α alt birimini kodlayan bölge ile, 8. kromozomdaki ETO geninin füzyonuna sebep olur. Inv(16) ise 16.kromozomun q kolundaki CBF β alt birimi ile p kolundaki MYH11 geninin füzyonuna sebep olur. AML1-ETO ve CBF β -MYH11 translokasyonları AML'li olguların yaklaşık olarak sırasıyla, %2-12 ve %1-5 kadarında görülür ve her ikisi de iyi prognozla ilişkili olarak hastalığın tanısı ve takibinde belirteç olarak kullanılır (7). AML'de görülen diğer bir translokasyon olan t(15;17), PML ve RAR α (α -retinoik asid reseptörünü kodlayan gen) genlerini kapsar. PML-RAR α füzyon proteini DNA'ya bağlanma ve dimerizasyon yeteneğini yitirmemesine rağmen retinoik aside bağlanma yeteneği etkilenmekte ve hedef genlerin transkripsiyonu bozulmaktadır (8).

Ancak yine CBF'de olduğu gibi, lösemi gelişimi için RAR α mutasyonlarının yanında başka mutasyonların da gerçekleşmesi gerekir (7).

Gen Mutasyonları

AML'de en sık rastlanan nokta mutasyonları N- ve K- RAS genlerinin 12, 13 ya da 61. kodonlarında oluşan RAS gen ailesi mutasyonlarıdır. Yapılan çalışmalarda bu mutasyonlara %25-44 arasında değişen oranlarda rastlandığı belirtilmiş; ayrıca mutasyon varlığının kötü prognozla ilişkili olduğu gösterilmiştir (7). AML olgularının oldukça yaygın bir bölümünde FLT3 ve c-KIT genlerinde aktive edici mutasyonların varlığı gösterilmiştir. FLT3 mutasyonları de novo AML'lerin %20-30'unda görülür (67). Olguların yaklaşık %20-25'inde ITD (İç Ardışık Tekrarlar) adı verilen tekrar sayısında değişiklikler AML olgularının yaklaşık %5-10'unda da c-KIT geninde

proteinin kinaz aktivitesini arttıran mutasyonlar bildirilmiştir. AML1 geni lösemilerde sıklıkla transloke olmakla birlikte, bazı kalıtsal AML olgularının %3-5'lik bölümünde gende fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlar gösterilmiştir. Bunlar daha çok AML1 ve trizomi 21 ile birlikte görülen AML ya da MDS (miyelodisplastik sendrom) olgularıdır. Normal miyeloid hücre gelişimi için gerekli bir faktör olan CEBP α genindeki mutasyonların iyi prognozla ilişkisi olduğu gösterilmiştir (68).

2.1.5.5. AML KLİNİĞİ

Olgular tipik olarak sırasıyla, eritrosit, trombositler veya lökositlerdeki azalmaya bağlı olarak yorgunluk, kanama, enfeksiyon, yüksek ateş semptomları ile başvurmaktadır. AML olgularında anemiyle ilişkili solukluk ve halsizlik yaygın olarak gözlenir. Ayrıca çarpıntı, çabuk yorulma ve nefes darlığı gibi diğer anemi ile ilişkili semptom ve bulgular da ortaya çıkabilir. Trombositopeniye bağlı olarak gelişen peteşi, epistaksis, diş eti kanamaları, konjonktival kanamalar ve deri yaralanmaları sonrası durmayan kanamalar hastalığın erken bulgularındandır ve tanı anında hastaların yaklaşık yarısında bulunur. AML olgularında, ALL olgularından farklı olarak kemik ağrıları sık değildir. Lösemik cilt infiltrasyonları (miyeloid sarkom) hastalığın seyri boyunca hastaların %13'ünde meydana gelir (69). Laboratuar incelemelerinde AML'li olguların kan değerleri büyük farklılıklar gösterir. Kemik iliği örneklerinde AML tanısı konulabilmesi için blast oranının %20'nin üzerinde olması gerekir. Ancak t(15;17), t(8;21), inv (16) veya t(16;16) translokasyonlarının varlığında blast sayısı %20'nin altında olsa da AML tanısı konulabilmektedir (58). AML olgularında prognoz ile ilişkili en önemli parametre sitogenetiktir. Yeni tanı almış erişkin AML olgularının yaklaşık %55'inde kromozom anomalileri tespit edilir (70,71). Serum ürik asit düzeyi AML vakalarının yaklaşık yarısında yüksektir. Ayrıca serum ve idrarda lizozim düzeyi yüksek bulunabilir (72).

AML tedavisi 2 gruba ayrılabilir; ilk grup remisyon indüksiyonu ikinci kısım ise remisyon sonrası tedavidir (73). Retinoik asitlerin tedavide kullanılması ile %90 oranında tam remisyon elde edilmekte ama bu remisyonlar kalıcı olmamaktadır. Önerilen tedavi retinoik asit ve bunu takiben kemoterapidir (74).

Aml de sık kullanılan markerler Tablo 2-5 'te gösterilmiştir.

Tablo 2-5 AML FAB Alt Tipleri İle İmmünolojik Yüzey Markırları İlişkileri (Kızıldaş, 2008: 17) (75)

FAB	HLA-DR	CD11b	CD13	CD14	CD15	CD33	CD34	Glikoforin	CD41	CD42	CD61
M1/M2	+				+	+	+				
M3/M3		+	+		+	+	+				
V											
M4/M5	+	+	+	+	+	+	+				
M6	+		+			+	+	+			
M7	+		+			+	+		+	+	+
M0			+			+	+				

2.1.5.6. AML TEŞHİS VE TEDAVİSİ

AML miyeloid kan hücreleri dizisinden kaynaklanan malignitelerden biridir. Kemik iliğinde biriken ve normal kan hücrelerinin üretimini engelleyen anormal beyaz kan hücrelerinin hızlı büyümesi ile karakterizedir. Erişkinleri etkileyen en yaygın akut lösemi olup, insidansı yaşla birlikte artmaktadır. AML'de çeşitli risk faktörleri ve kromozom anomalileri tespit edilmiştir. AML, uygun tedavi yollarını ve genel prognozu belirleyen çeşitli alt tiplere sahiptir. AML tedavisinde destekleyici bakımdaki gelişmelere rağmen, tedavinin temeli uygun adaylar için allogeneik kök hücre transplantasyonu olan, sitarabin ve antrasiklin bazlı rejimlerin bir kombinasyonu dur. Yaşlı hastalar genellikle bu tür rejimleri tolere edemez ve özellikle kötü prognoz gösterirler (47).

AML, remisyonu başlatmak için başlangıçta kemoterapi ile tedavi edilir. Daha sonra hastalara ek kemoterapi veya hematopoietik kök hücre transplantasyonu yapılabilir. Uygun hastalar ilk önce CR elde etmek için indüksiyon tedavisine gidilir. Genellikle CR'de minimal rezidüel hastalık sıklıkla devam eder ve tedavi kesilirse nüks kaçınılmaz olarak ortaya çıkar. Bu nedenle, herhangi bir rezidüel hastalığı ortadan kaldırmak ve kalıcı remisyona elde etmek için indüksiyon tedavisine olumlu cevabı konsolidasyon tedavisi ile takip edilmelidir. Konsolidasyon için mevcut seçenekler,

kemoterapi ve allojenik hematopoietik kök hücre transplantasyonunu (allo-HSCT) içerir. AML'li yaşlı hastalara optimal bir yaklaşım oluşturulmamıştır. 65 yaşın üzerindeki bireylerin, olumsuz bir sitogenetik risk profili ile ortaya çıkma olasılığı daha yüksektir, kemoterapiye cevap verme olasılıkları daha azdır ve genellikle tedaviye bağlı toksisitelere daha duyarlıdırlar. Bununla birlikte, önemli ölçüde daha kötü prognoza rağmen, indüksiyon tedavisi, 65 yaşın üzerindeki hastalarda destekleyici bakım ve palyatif kemoterapi ile karşılaştırıldığında sağkalımı artırır (47).

Myelodisplastik sendromun (MDS) tedavisinde geleneksel olarak kullanılan hipometile edici ajanlar da AML'li yaşlı hastalarda etkinlik göstermiştir. Terapötik yararın kanıtı, ilk kez WHO sınıflaması altında AML için tanı kriterlerini karşılayan retrospektif olarak MDS'li hastaların *post hoc* analizlerinde gösterilmiştir(76).

AML de yeni yeşhis ve tedavi yaklaşımları Tablo 2-6 da verilmiştir.(62)

Tablo 2-6 : AML de testler prosedürler (62).

Teşhis kurmak için testler	Teşhiste ek testler / prosedürler (devam)
Tam kan sayımı ve diferansiyel sayımı	Komorbiditelerin analizi
Kemik iliği aspirasyonu	Biyokimya, koagülasyon testleri, idrar analizi
Kemik iliği trefin biyopsisi	Serum gebelik testi
İmmünofenotipleme	Oosit ve sperm dondurulması hakkında bilgi
Genetik analizler	Allojenik HCT için uygunluk değerlendirmesi (HLA tiplmesi dahil)
Sitogenetik	Hepatit A, B, C; HIV-1 testi
Dahil gen mutasyonları için tarama	Akciğer grafisi, 12 elektrokardiyogram ve ekokardiyografi veya MUGA (endikasyonda)
<i>NPM1</i> , <i>CEBPA</i> , <i>RUNX1</i> , <i>FLT3</i> , <i>TP53</i> , <i>ASXL1</i>	Lomber ponksiyon
Gen yeniden düzenlemeleri taraması	Biobanking
<i>PML-RARA</i> , <i>CBFB-MYH11</i> , <i>RUNX1-RUNX1T1</i> , <i>BCR-ABL1</i> , diğer füzyon genleri (varsa)	RT-qPCR veya MFC ^d tarafından yanıtın duyarlı değerlendirilmesi
Teşhiste ek testler / prosedürler	RT-QPCR için <i>NPM1</i> mutasyonu, <i>CBFB - MYH11</i> , <i>RUNX1- RUNX1T1</i> , <i>BCR - ABL1</i> , diğer füzyon genleri (varsa)
Demografi ve tıbbi geçmişi	MFC
Detaylı aile hikayesi	
Hasta kanama geçmişi	
Performans durumu (ECOG / WHO skoru)	

2.2. SPINK2 (HUSI-II, ISK2 , KAZAL TİP SERİN PROTEAZ İNHİBİTÖRÜ)

2.2.1. PROTEAZ İNHİBİTÖRLERİ

Proteazlar hücrede, bazı önemli metabolik kontrol noktalarında görev alan enzimlerin yıkılması ve aktivitelerinin düzenlenmesiyle hücrenin değişen çevre şartlarına ve metabolik ihtiyaçlarına verimli bir şekilde cevap vermesini; proteinlerin besin yetersizliği durumunda enerji ve amino asit kaynağı olarak kullanılmasını; transkripsiyonel veya translasyonel hatalardan kaynaklanan hasarlı veya işlevsiz proteinlerin parçalanmasını sağlama görevlerini gerçekleştirirler. Bu yüzden proteazların aktivitesinin düzenlenmesi hücre için hayati önem taşır. Proteaz aktivitesini, proteaz inhibitörleri düzenler (11).

Proteazlar olarak adlandırılan enzimler beş alt kategoriye ayrılır: Matriks Metalloproteaz (MMP), Sistin Proteazlar, Serin Proteazlar, Aspartik Proteazlar ve Treonin Proteazlar (77). Her bir proteaz grubuna özgü inhibitör bulunur.

Proteaz inhibitörleri; kontrol edilemeyen proteolizi önleyerek proteaz aktivitelerinin düzenlenmesinden sorumludur. Serin proteaz inhibitörleri (SPI) proteaz inhibitörlerinin en büyük ve en önemli süper ailesidir. Hedef proteazlarına kovalent olarak bağlanarak inaktivasyona yol açan intihar substratları olarak hareket ederler (12). Pek çok serin proteaz inhibitör sadece proteazları inhibe etmekle kalmaz, diğer moleküller ile etkileşimleri sonucunda başka fizyolojik etkilere de sebep olurlar. Bu etkileşimler, belirli fizyolojik cevapları güçlendirir (13,14).

Proteaz inhibitörleri (PIs) proteolitik enzimlerin katalitik aktivitesini inhibe edebilen proteinler veya peptitlerdir. Tüm hücrelerde ve ayrıca viral genomlarda bulunabilir. Proteazları veya proteaz inhibitörlerini kodlayan genler bir memeli genomunun, %2-%4 'ünü oluşturur, bu da biyolojik süreçlerde proteolizin önemini göstermektedir. Bununla birlikte, hayvan zehirlerinde birçok proteaz inhibitörünün bulunması zehirli hayvanların bu proteinleri / peptidleri biyolojik hayatta kalma sürecinde kullandığını düşündürmektedir (78).

Proteaz inhibitörleri (PIs), hedef proteazların aktivitesini, derin bir konformasyonel değişim kullanarak korunmuş bir yolla inhibe ederler (79).

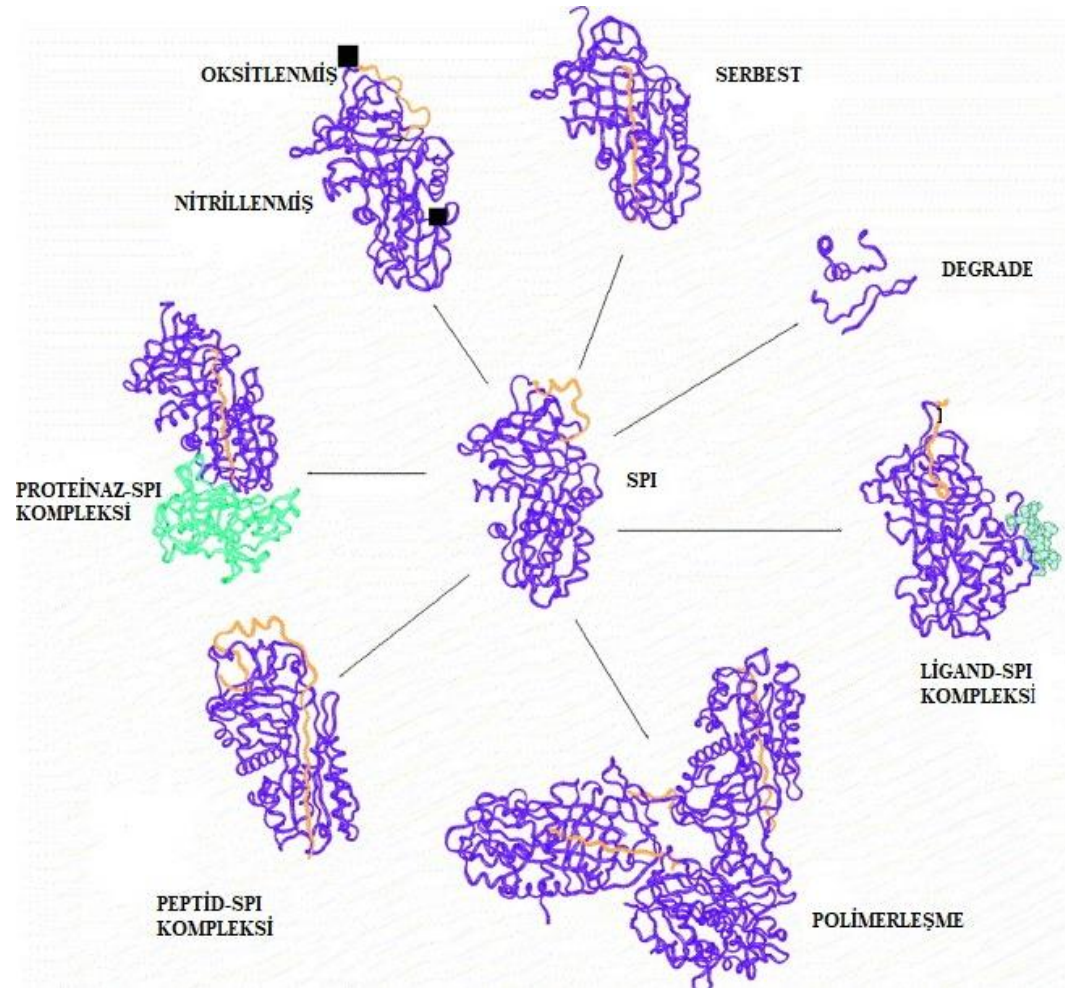
PIs kemoterapiyle birlikte iyileşme sürecini olumlu etkileyeceği düşünülmektedir (80).

Yeni PI'lerin karakterize edilmesine ve fizyolojik öneminin anlaşılmasına olan ilgi, kan pıhtılaşma sistemi, kompleman kaskadı, apoptoz, hücre döngüsü ve hormon işleme yolları gibi tüm yaşam süreçleri için biyolojik önemleri nedeniyle artmıştır (81,82).

Ayrıca, bu enzimlerin düzenlenmesindeki eksiklikler veya değişiklikler, kanser, artrit, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli patolojik durumlara yol açmaktadır (83,84).

2.2.2. SERİN PROTEAZ İNHİBİTÖRLERİ SÜPER AİLESİ

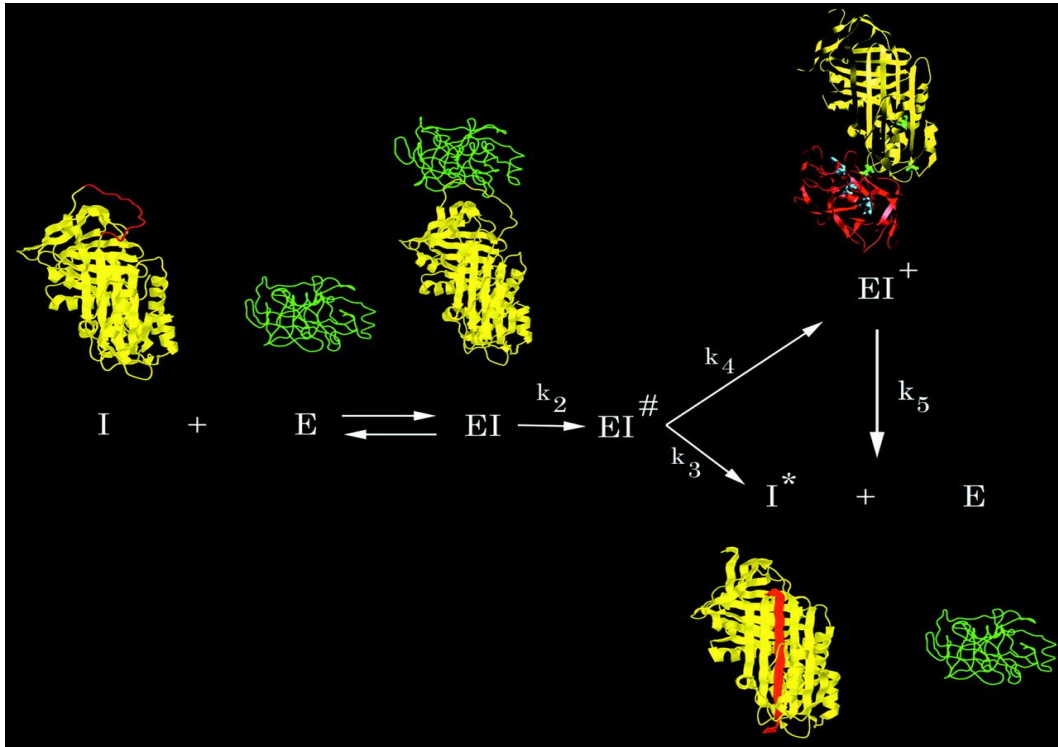
SPI'ler, PI'lerin en büyük ve en yaygın süper familyasıdır. Konformasyonal değişimlere uğrayarak çeşitli fizyolojik yollarda rol alırlar (Şekil 2-5) (85).



Şekil 2-5: Serin Proteaz İnhibitörlerin konformasyonel değişikliklerine bağlı patafizyolojik rolleri (85)

SPI benzeri genler hayvanlar, poksivirüsler, bitkiler, bakteriler ve archaeada tanımlanmıştır ve bugüne kadar bu ailenin 1.500'den fazla üyesi belirlenmiştir (86,87).

SPI' ler hedef enzimleri inhibe etmek için konformasyonel bir değişiklik kullanan geniş biçimde dağıtılmış bir proteaz inhibitörleri ailesidir (88) (Şekil 2-6).



Şekil 2-6 : SPI ile hedef proteazın bağlanması sonucu oluşan konformasyonel değişiklik (88)

(I, inhibitör; E, enzim, EI, enzim-inhibitör kompleksi)

Memeli pıhtılaşma yolları da dahil olmak üzere birçok önemli proteolitik kaskadın kontrolünde merkezi konumdadırlar. SPI'lerin çoğunluğu serin proteazları inhibe eder, ancak kaspazları ve papain benzeri sistein proteazları inhibe eden SPI' ler de tanımlanmıştır. Nadiren inhibitör olmayan bir işlev yaparlar; örneğin, birçok insan SPI'leri, hormon taşıyıcıları, moleküler şaperonlar veya tümör baskılayıcıları olarak işlev görürler (89,90).

Serin proteaz inhibitörleri konformasyonel olarak kararsızdır ve hastalığa neden olan mutasyonlarının bir çoğu yanlış katlanma veya patojenik, inaktif polimerler ile

karakterizedir. Serin proteaz inhibitörleri hayvanlarda, bitkilerde ve mikroorganizmalarda bulunurlar. Modölatörler olarak hareket ederler, çok sayıda serin ve sistein proteazının aktivitelerini düzenlemede kilit rol oynarlar. SPI'ler, kompleman aktivasyonunu ve kan pıhtılaşması, fibrinoliz, enflamasyon, tümör hücre metastazı, apoptoz gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonları kontrol ederler (91,92).

Kan pıhtılaşması, doku yeniden biçimlenmesi ve proteoliz regülasyonu gibi fizyolojik süreçlerde önemli rol oynarlar (93). Serin proteaz inhibitörleri, serin ve diğer proteaz tiplerinin düzenlenmesinde yer alan bir protein sınıfıdır. İnsanlarda, SPI'lerin çoğu, pıhtılaşma, fibrinoliz, enflamasyon, yara iyileşmesi ve doku onarımı dahil olmak üzere vücudun yaralanmaya tepkisine katılan proteazların fonksiyonlarını düzenlemektedir (94,95).

Ayrıca demans ve anjiyogenezle ilgili olduğu düşünülmektedir (96).

SPI'lerin fonksiyonel proteininde bir mutasyon sonucu fonksiyonel bir genin kaybı nedeniyle çeşitli hayvan ve insan patolojilerinin ortaya çıktığı bildirilmiştir. En bilinen örneği antitrombin III örnekleri ilk olarak tanımlanmıştır (97).

Serin proteazların, serin proteaz inhibitörleri ve proteazla aktive olan reseptörlerin periferinde ve koagülasyon, inflamasyon ve sindirim gibi çok çeşitli süreçlerdeki rolleri yoğun olarak araştırılmıştır (98,99,100).

Proteaz inhibitörleri, ulinastatin ve aprotinin gibi tripsin inhibitörleri antiinflamatuvar tedavide klinik olarak kullanılmaktadır (101).

Doğuştan gelen bağışıklık sistemi, patojenlerin istilasına karşı geniş bir dizi savunma mekanizması kullanır. Bunlar, tanıma reseptörlerinin ekspresyonunu, antimikrobiyal moleküllerin salınmasını ve epitelyal bariyerin ve doku bütünlüğünün serin proteaz inhibitörleri tarafından korunmasını kapsar (102).

Başlangıçta serin proteinaz inhibitörleri olarak isimlendirilen grubun, üyelerinin bir bölümü, inhibitörler değil, depolama, taşıma ve diğer rollerde yer alan şaperonlardır. SPI'ler, tüm canlıların genomlarında bulunur. SPI'lerin fonksiyonları ve evrimsel gelişimi hakkında öğrenilecek çok şey vardır. Bu inhibitörlerle ilişkili çeşitli biyolojik fonksiyonlar ve patolojik durumlar nedeniyle, bu proteinlerin yapı ve mekanizmasının daha fazla karakterizasyonu, potansiyel biyobelirteç tanımlama ve terapötik hedefler hakkında bilgi sağlayacaktır (103).

Serin proteaz inhibitörleri; kazal benzeri alanlar, serpinler (serin proteaz inhibitörleri) ve kunitz alanlarını içeren inhibitör olmak üzere sınıflandırılır (104) .

Kazal - tipi inhibitörler; Bu inhibitörler yaşamın tüm önemli noktalarında yaygın olarak bulunur. Kazal tip inhibitörlerin reaktif bölgesi son derece değişkendir fakat yapısal olarak korunur. Kazal tipi alan, spesifik bir desene göre disülfür bağları ile bağlanan altı sistein kalıntısı içerir

Literatürde kazal benzeri inhibitörlerin kuvvetli antibakteriyel aktivitesini gösteren bazı veriler bulunmaktadır. Bu gibi inhibitörlerin, bir metazoan olan Hidrada antibakteriyel aktivitesi ile ilişkisi belirtilmiştir. (Augustin ve ark ., 2009). Dahası, kabuklularda hemolenfteki kazal tip serin proteinaz inhibitörlerinin konak-savunma reaksiyonlarının düzenleyicileri olarak işlev gördüklerine, aynı zamanda mikroorganizmalardan korunmayı sağladığı da düşünülmektedir. (Li *et al.*, 2009).

Serpinler , hedefe yönelik serin proteazlarla etkileşime giren bir C-terminali reaktif bölge-döngüsü içeren bir proteinler grubudur. Proteaz ve serpin, kovalent olarak bağlanır ve proteazın inhibe edildiği konformasyonel bir yeniden düzenlemeye maruz kalır (Silverman ve ark ., 2001). Serpinler, iyi tanımlanmış kalıntıların bir kısmından oluşan özel bir imza ile birlikte ortak yapısal özellikleri paylaşırlar. Bu protein ailesi aynı zamanda inhibitör aktivitesi olmayan (ov-serpin) serpinler de içerir.

Pankreatik tripsin inhibitörü (Kunitz) familyası, serin proteinaz inhibitörleri ailesindendir. Üç disülfid bağı ile sınırlanan kısa proteinlerdir .Bu inhibitörler yumurta akı, yumurta kabuğu ve yumurta sarısında tanımlanmıştır

2.2.3. KAZAL TİP SERİN PROTEAZ (SPINK) GEN AİLESİ

2.2.3.1. Yapıları

SPINK proteinleri, enzimatik aktivitelerini bloke ettikleri proteazların katalitik alanlarıyla doğrudan etkileşen bir veya birkaç Kazal alan içeren serin proteaz inhibitörleridir(105).

Kazal etki alanı yapısı, yüksek derecede korunan üç disülfür bağı içerir. Farklı SPINK proteinleri farklı dokularda spesifik olarak eksprese edilir ve pankreasta salınan tripsin, spermdeki akrosin veya derideki kallikrein gibi bazı serin proteazları inhibe ederler. SPINK proteinlerinin aktivitesinin azaltılması, kronik pankreatit ve Netherton sendromu gibi ciddi patolojilere yol açar.

SPINK ailesi üyeleri farklı büyüklükte ve ekzon yapısına sahiptir. SPINK 1, 2 ve 4, tek bir Kazal tip serin proteaz inhibitörü alanı ile 4 ekson için kodlanmış karşılaştırılabilir bir büyüklüğe ve yapıya sahiptir iken SPINK5 , 15 engelleyici alanı kodlayan 33 ekson içerir. Her dört SPINK üyesinin epitelyal ve mukozal dokuların proteolitik yıkıma karşı korumaya dahil olduğu düşünülmektedir (16).

2.2.3.2. Çeşitleri ve Görevleri

SPINK gen ailesi, insanlarda dört gruptan (SPINK1 , SPINK2 , SPINK4 ve SPINK5) oluşan Kazal tipi bir proteinin üretiminden sorumludur. Son zamanlarda, SPINK1 ve SPINK5'i içeren 5q32 kromozomundaki bir SPINK gen kümesinin bir parçası olarak, daha distal olarak bulunan beş yeni SPINK benzeri üye tanımlanmıştır: sırasıyla SPINK5L2 , SPINK6 , SPINK5L3 , SPINK7 ve SPINK9 (Tablo 2-7) . Bununla birlikte, bu yeni üyelerin işlevsel rolü tam olarak bilinmemektedir (16).

Tablo 2-7: SPINK gen ailesi (106)

Sembol	Ad	Diğer adları	Kromozom
SPINK1	serine peptidase inhibitor, Kazal type 1	Spink3, PCTT, PSTI, TATI	5q32
SPINK2	serine peptidase inhibitor, Kazal type 2	HUSI-II	4q12
SPINK4	serine peptidase inhibitor, Kazal type 4	PEC-60, MGC133107	9p13.3
SPINK5	serine peptidase inhibitor, Kazal type 5	VAKTI, LEKTI, LETKI, NETS, NS, FLJ21544, FLJ97536, FLJ97596, FLJ99794, DKFZp686K19184	5q32
SPINK6	serine peptidase inhibitor, Kazal type 6	MGC21394, UNQ844, BUSI2	5q32
SPINK7	serine peptidase inhibitor, Kazal type 7 (putative)	ECG2, ECRG2	5q32
SPINK8	serine peptidase inhibitor, Kazal type 8 (putative)		3p21.31
SPINK9	serine peptidase inhibitor, Kazal type 9		5q32
SPINK13	serine peptidase inhibitor, Kazal type 13 (putative)	SPINK5L3, LiESP6, HESPINTOR, MGC149260	5q32
SPINK14	serine peptidase inhibitor, Kazal type 14 (putative)	SPINK5L2	5q32

Pankreasta tripsin, hücre hasarını önlemek için aktif olmayan bir zimojen olarak üretilir, ancak tripsinogen zaman zaman otomatik olarak aktiveleşebilir. Bu proteaz aktivitesi daha sonra SPINK1 tarafından bloke edilir. Kronik pankreatit , tripsin inhibitörü işlevini azaltan ya da bastıran ve hücre hasarına neden olan SPINK1

mutasyonları tarafından tetiklenebilir. SPINK1 pankreas ve gastrointestinal sistemde eksprese edilir ve bu gendeki mutasyonlar çeşitli pankreatit formlarında bildirilir (107).

SPINK2 (4q12'de yer alır), testis, epididim ve seminal vezikül içinde ifade edilir, burada antimikrobiyal fonksiyon, doğurganlığın korunmasında rol oynayabilir. SPINK2'nin yokluğunun, ciddi infertilite fenotipi olan azoospermiyi teşvik ettiği ısıtlanmıştır (108). SPINK2 ekspresyonunun, optik sinir hasarından sonra, retinal ganglion hücrelerinde önemli derecede artış gösterdiği ve apoptotik uyarılara karşı duyarlılığı arttırdığı gösterilmiştir (18). Lenfomada umbilikal cord'tan elde edilen primitif hematopoietik kök hücrelerde ve bazı lösemi hücre hatlarında yüksek seviyede eksprese edildiği gösterilmiştir (19,20,21,22)

SPINK4 başlangıçta domuz bağırsağından izole edilmiş ve Lieberkühn kriptlerinde insan ve domuz goblet hücrelerinde ekspresyonun yüksek olduğu, ayrıca monositlerde ve merkezi sinir sisteminde de bulunduğu gösterilmiştir (109).

SPINK5, timus, vajinal epitelyum, Bartolin bezleri, oral mukoza, bademcikler ve paratiroid bezlerinde eksprese edildiği bildirilmiştir(110). SPINK5'teki mutasyonlar, iktiyoz, kıl şaft kusurları, atopi, deri bariyer defektleri ve tekrarlayan bakteriyel enfeksiyonlarla karakterize ölümcül bir cilt hastalığı olan Netherton sendromundan sorumludur (111).

Ayrıca SPINK5' in astım ve atopik dermatit ile de ilişkili olduğu bilinmektedir (112).

SPINK6 ve SPINK9 da ciltte ifade edilir ve değişmiş ekspresyon seviyeleri atopik dermatit veya sedef hastalığı ile ilişkilidir (113).

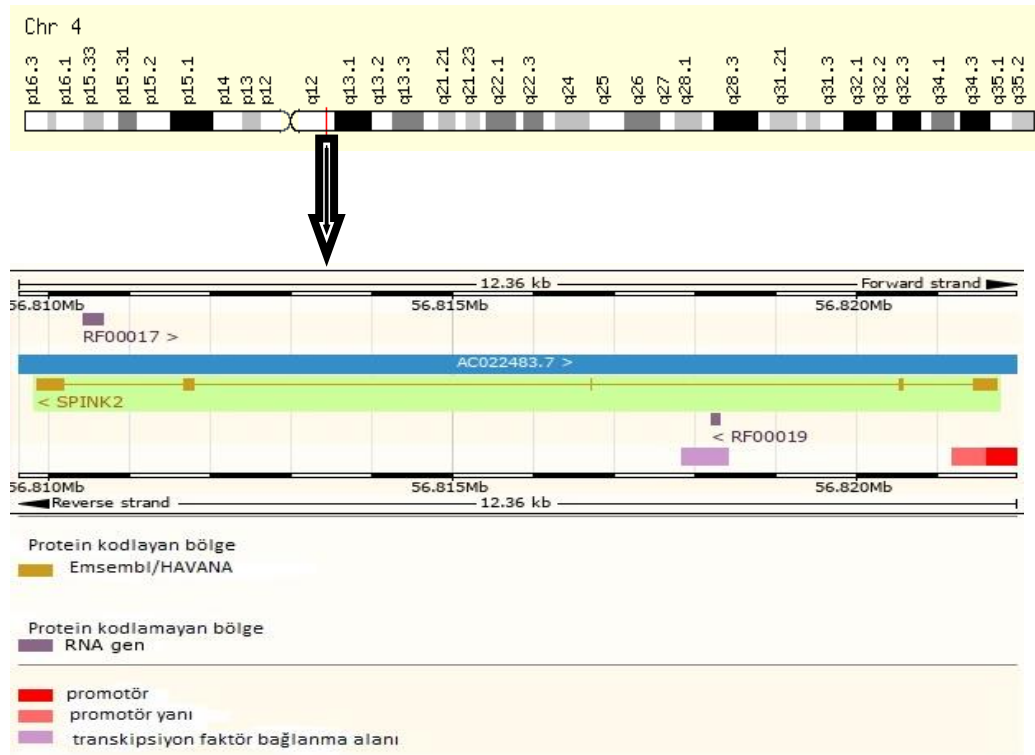
SPINK13 ekspresyonunun azaltılması, kalsiyum mobilizasyonu ve in vitro ve in vivo olarak azaltılmış sperm fertilitesi ile sonuçlanan akrozom aktivitesini hızlandırdığı tespit edilmiştir (114)

SPINK2 de dahil olmak üzere SPINK ailesinin diğer üyeleri henüz bir insan patolojisi ile doğrudan ilişkilendirilmemiştir. Sonuç olarak SPINK üyeleri, kontrol edilemeyen proteolizi önleyerek serin proteaz aktivitelerinin düzenlenmesinden sorumludur.

2.2.4. SPINK2 (HUSI-II, ISK2)

2.2.4.1. İnsan genomundaki yeri

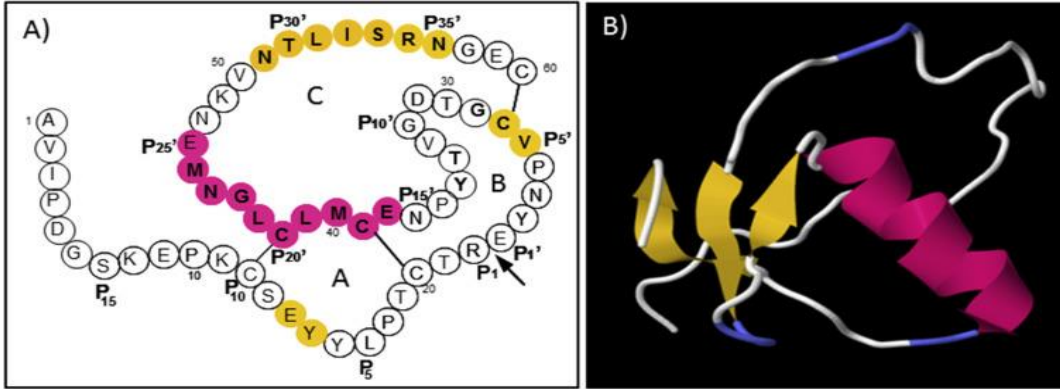
SPINK2 geni 4q12 bölgesinde bulunmaktadır (Şekil 2-6) (15).



Şekil 2-6: 4. Kromozomda SPINK2 bulunduğu bölge ve açılımı (122)

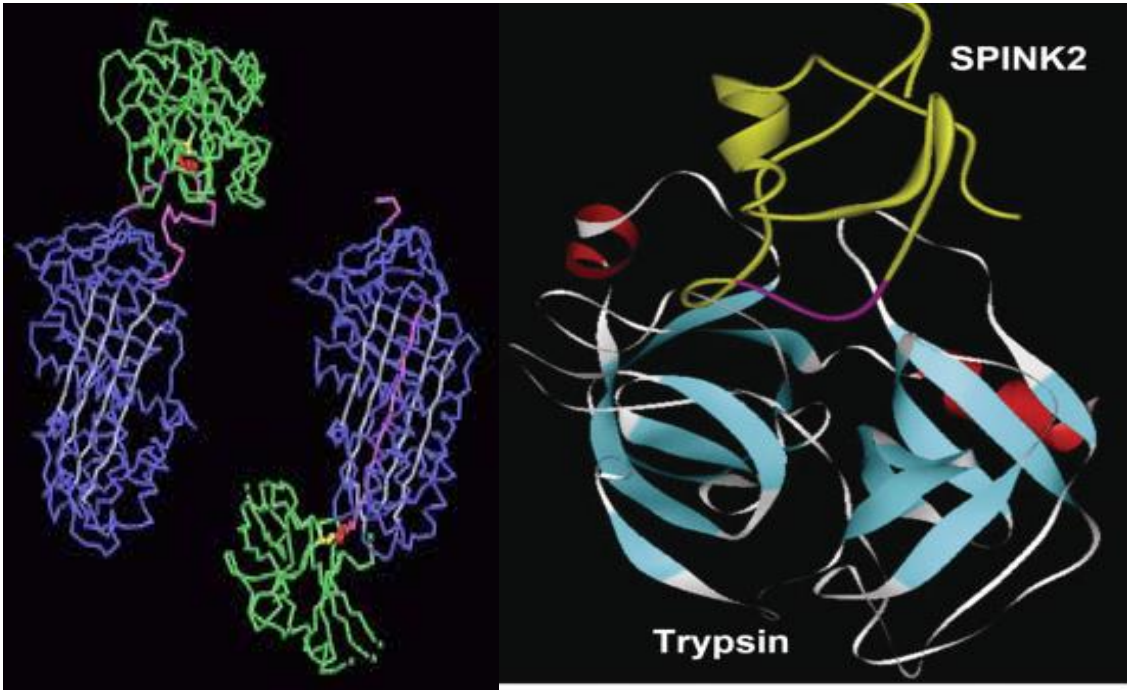
SPINK2 proteini hücre içi ve hücre dışında bulunur. SPINK2'nin yapısı Şekil 2-7' de gösterilmiştir(115). Kazal tip serin proteaz inhibitörleri ailesinin üyesi olan SPINK2 akrosin-tripsin inhibitörü olarak fonksiyon göstermektedir. SPINK2 dört ekson içerir, 84 amino asitli 9.291 kDa 'luk bir protein kodlar ve 23 kalıntı sinyal peptidi

içerir. Ensembl veri tabanı dört transkript varlığını tahmin etmektedir (122).



Şekil 2-7:SPINK2 ‘nin aminoasit düzeyinde şematik olarak (A) ve üç boyutlu (B) gösterimi(115).

SPINK2 ile Tripsin bağlandığında meydana gelen konformasyonel değişiklik Şekil 2-8 ‘de gösterilmiştir.



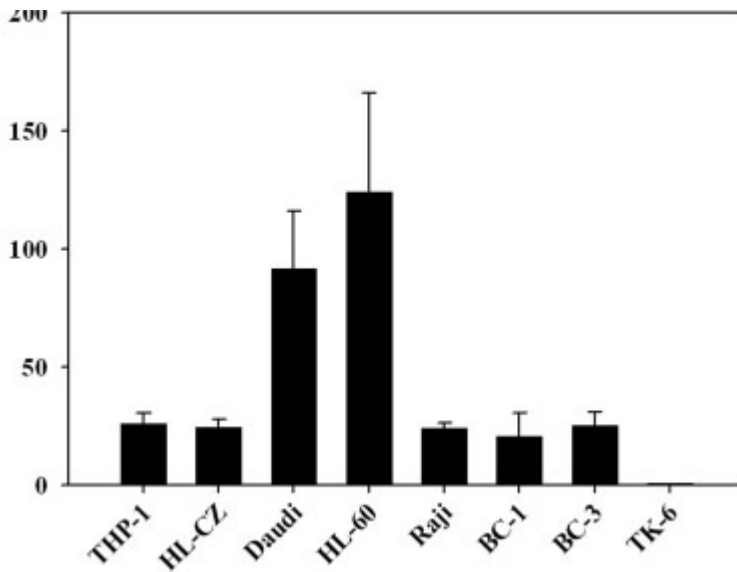
Şekil 2-8: Serin proteaz inhibitör ile tripsin bağlandığında meydana gelen konformasyonel değişiklik (20).

Epидidim ve seminal vezikülde ekspresyonunun yüksek olduğu ve fertilité ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (16,17). SPINK2 ekspresyonunun, optik sinir hasarından sonra retinal ganglion hücrelerinde önemli derecede artış gösterdiği ve apoptotik uyarılara karşı duyarlılığı arttırdığını gösterilmiştir. SPINK2 ekspresyon düzeyindeki

aşırı artışın apoptozu indüklediği bildirilmiştir (19). Protein, lenfomaların ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir.

Avrupa Kanser Araştırma ve Tedavi Örgütü (EORTC) sınıflandırmasında bulunan 2 tip primer kutanöz büyük B-hücreli lenfoma (PCLBCL) sınıfı vardır: birincil kutanöz folikül merkezi hücre lenfomaları (PCFCCL) ve ikincil PCLBCL'si . Bu iki grup arasındaki fark, prognozdeki farklılıklardır. 5 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %95 ten ve %52 den büyüktür. PCFCCLs grubu içinde, *SPINK2* transkriptinin genellikle çok yüksek ekspresyona sahip olduğu, PCLBCL de ise tüm örneklerinde çok düşük ya da hiç ekspresyon olmadığı tespit edilmiştir (21). Lenfomada ve umbilikal cord'tan elde edilen primitif hematopoietik kök hücrelerde ve bazı lösemi hücre hatlarında yüksek seviyede eksprese edildiği gösterilmiştir. Kordon kanından elde ettikleri CD34+, CD133+ hematopoietik progenitör kök hücreleri CD34+'lerden arındırılmış hücrelerle karşılaştırdıklarında *SPINK2*'nin ekspresyonunun farklılık gösterdiği; CD34+, CD38-, Lin- hücreleri CD34+, CD38++, Lin++ hücrelerle karşılaştırdıklarında *SPINK2* ekspresyonunda artış olduğu, bu artışın en belirgin olarak kemik iliği CD34+, CD38-, Lin- hücrelerinde olduğu farklı çalışmalarda gösterilmiştir .(22).

SPINK2 ekspresyonunu bazı AML hücre soylarında ekspresyonunun yüksek olduğu gösterilmiştir(20) (Şekil 2-9).



Şekil 2-9: AML hücre soylarında *SPINK2* ekspresyonunun göreceli farklılığı (20)

Miyodisplastik atipik bir olgunun AML ye dönüşümü sırasında ekspresyonunun arttığı transkriptozom ve serum sitokin analizi ile tespit edilmiştir (116) .

SPINK2 insan ve fare olgun spermatozoanın akrozomunda mevcut olduğu bildirilmiştir. Homozigot *Spink2* KO erkek farelerde azospermi gözlemlenmiştir. Heterozigot erkek farelerde, normal doğurganlığa rağmen, yüksek oranda morfolojik anormal spermatozoa ve düşük sperm motilitesi saptanmıştır. Diğer analizler SPINK2'nin yokluğunda proteazın indüklediği stresin Golgi fragmentasyonunu başlattığını ve spermatid farklılaşma tutukluğuna yol açan akrozom biyojenezini önlediğini göstermiştir. SPINK2'nin akrozomda yer aldığını ve yokluğunun akrozom biyojenezini önlediği gösterilmiştir. SPINK2 yokluğu golgi tarafından oluşturulması gereken dev proakrozomal molükülün oluşumunu engelleyerek daha küçük kesecikler oluşmasına , sonuçta da golgide degradasyona ve mikrootofajiye neden olur. SPINK2 eksikliğinin en çarpıcı etkilerinden biri, protein işleme ve translokasyonda, özellikle membran proteinleri için önemli bir organel olan Golgi aparatının parçalanmasıdır. Germinal epitelyumun kayda değer güçlü bir şekilde deskuamasyonu, kusurlu bir Golgi aparatı fonksiyonundan kaynaklanan membran protein kompozisyonundaki ciddi değişikliklere bağlı olabilir. HEK hücrelerinde akrozin aşırı ekspresyonunun zararlı bir etkisi de gözlemlenmiştir, bu durum SPINK 2' nin akrosin inhibitörü olarak rolünü doğrularken; SPINK 2 'nin ko- ekspresyonu ile hafifletilmiştir. Bu sonuçlar SPINK2'nin akrozoma karşı hücresel geçişi sırasında proteazları nötralize etmek için gerekli olduğunu. SPINK2'nin yokluğunun, germ hücrelerinde mikrootofaji benzeri bir yol oluşturduğunu ve böylece bu hipotezi desteklediğini göstermektedir (117).

İnfertil erkek bireylerde azospermi ve oligospermi durumlarında SPINK2 ekspresyon eksikliği yeni nesil dizileme ile gösterilmiştir (118).

375.000 kişinin meta analizini içeren araştırmada SPINK2 de meydana gelen bir SNP'nin migrenle ilgili 38 lokustan biri olabileceği ortaya konmuş , ayrıca menstrual migren ile SPINK2'deki SNP (SNP numarası : rs1708768, SNP pozisyonu chr4:57,690,713) nin ilişkili olduğu bildirilmiştir (119).

Prostat tümörü ve Kanser Genom Atlas (TCGA) da belirtilen Malign olmayan olgularda ekspresyonu azalan 20 gen arasındadır (120).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Hasta Örnekleri

Tez çalışmamızda 2013-2016 yılları arasında Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırmalar Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı'na başvuran ve translokasyon analizi için kan veya kemik iliği örneği ‘‘Hasta Onam Formu’’ eşliğinde alınmış olan AML tanısı kesinleşmiş ve RNA örneği bulunan 1- 85 yaş arasındaki hastalar çalışmaya dahil edildi. Hastalardan herhangi bir örnek alınmadı, mevcut RNA materyalleri kullanıldı. Bu tez çalışması için ‘‘İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu’’ onayı alındı. Olguların %50’sini (n=45) kadın, %50’ini (n=45) erkek olgular oluşturmaktadır. Bu olgular içinde kız çocuk oranı 13 (%14), erkek çocuk oranı 8 (%9), erişkin kadın oranı 32 (%36), erişkin erkek oranı 37 (%41) olarak belirlenmiştir.

3.1.2. Sağlıklı Örnekler

Çalışmamızda Human Bone Marrow Total RNA CLONTECH, USA cT NO:636591 kullanıldı. 0-80 yaş aralığındaki Asyalı kadın ve erkek sağlıklı bireylerin SPINK2 ekspresyon ortalaması alındı. Ortalama 0,3 olarak tespit edildi.

3.1.3. Hücre Soyları

Enstitümüzde bulunan, ATCC ve DSMZ’den temin edilmiş olan ve sıvı azot tankında (-196C⁰) dondurulmuş olarak bekletilen hücreler kullanıldı.

KULLANILAN HÜCRE SOYLARI

Hücre Soyları

HL60 : Akut Promiyelositik Lösemili (FAB M3) bir hastanın periferik kanından elde edilmiş edilmiştir. İlk olarak insan promiyeloblast hücre soyu olarak bildirilmiş daha sonra hücrelerin karakterizasyonu için yapılan çalışmalarda miyeloblastik (M2) hücre soyu olduğunu göstermiştir (123).

%10 FBS, 2mM L-glutamin, 100 unite/ml penisilin ve 100ug/ml streptomisin içeren RPMI medyumda süspanse kültüre edildi.

%5 CO₂ ve 37°C'lik inkübatörde çoğaltıldı.

% 5 konsantrasyonda DMSO içeren medyumda donduruldu.

NB4 : İnsan promyelositik hücre dizisidir. İlk olarak 1989 yılında ikinci kez nükseden Akut Promyelositik Lösemili (APL) 23 yaşında bir kadının kemik iliğinden alınmıştır.

%20 FBS içeren 2mM L-glutamin, 100 unite/ml penisilin ve 100ug/ml streptomisin içeren RPMI medyumda süspanse kültüre edildi.

%5 CO₂ ve 37°C'lik inkübatörde çoğaltıldı.

% 5 konsantrasyonda DMSO içeren medyumda donduruldu.

THP1 : Bir yaşında Akut Monositik Lösemi hastası erkek çocuğun periferik kanından izole edilen monositik hücre dizisidir.

%10 FBS 2mM L-glutamin, 100 unite/ml penisilin ve 100ug/ml streptomisin içeren RPMI medyumda süspanse kültüre edildi.

%5 CO₂ ve 37°C'lik inkübatörde çoğaltıldı.

% 5 konsantrasyonda DMSO içeren medyumda donduruldu.

K562 : Kronik Miyeloid Lösemili 53 yaşındaki bir kadın hastanın kemik iliğinden elde edilmiş lenfoblast hücre dizisidir.

%10 FBS, 2mM L-glutamin, 100 unite/ml penisilin ve 100ug/ml streptomisin içeren RPMI medyumda süspanse kültüre edildi.

%5 CO₂ ve 37°C'lik inkübatörde çoğaltıldı.

% 5 konsantrasyonda DMSO içeren medyumda donduruldu.

Jurkat : Akut T hücreli lösemili 14 yaşındaki bir erkek çocuğun periferik kanından izole edilmiş T lenfosit hücre dizisidir.

%10 FBS, 2mM L-glutamin, 100 unite/ml penisilin ve 100ug/ml streptomisin içeren RPMI medyumda süspanse kültüre edildi.

%5 CO₂ ve 37°C'lik inkübatörde çoğaltıldı.

% 5 konsantrasyonda DMSO içeren medyumda donduruldu.

Nalm6 : Akut Lenfoblastik Lösemili 19 yaşındaki bir erkeğin periferik kanından elde edilmiş insan lenfosit hücre hattıdır.

%10 FBS, 2mM L-glutamin, 100 unite/ml penisilin ve 100ug/ml streptomisin içeren RPMI medyumda süspanse kültüre edildi.

%5 CO₂ ve 37°C'lik inkübatörde çoğaltıldı.

% 5 konsantrasyonda DMSO içeren medyumda donduruldu.

MCF7 : Adenokarsinomlu 69 yaşındaki bir kadın hastadan elde edilmiş, meme bezi metastatik bölgeden elde edilen epitelyal hücre soyudur.

%10 FBS, 2mM L-glutamin, 100 unite/ml penisilin, 100ug/ml streptomisin ve 0.01 mg / ml insan rekombinant insülini içeren DMEM medyumda kültüre edildi.

%5 CO₂ ve 37°C'lik inkübatörde çoğaltıldı.

% 5 konsantrasyonda DMSO içeren medyumda donduruldu.

HeLa : Adenokarsinomlu 31 yaşındaki bir kadın hastadan elde edilmiş, serviks epitelyal hücresidir.

%10 FBS, 2mM L-glutamin, 100 unite/ml penisilin ve 100ug/ml streptomisin içeren DMEM medyumda kültüre edildi.

%5 CO₂ ve 37°C'lik inkübatörde çoğaltıldı.

% 5 konsantrasyonda DMSO içeren medyumda donduruldu.

HUVEC : İnsan Umbilikal Kord'dan elde edilen endotelyal hücre dizisidir. İlk olarak yenidoğandan elde edilmiştir.

%10 FBS, 2mM L-glutamin, 100 unite/ml penisilin ve 100ug/ml streptomisin içeren DMEM medyumda kültüre edildi.

%5 CO₂ ve 37°C'lik inkübatörde çoğaltıldı.

% 5 konsantrasyonda DMSO içeren medyumda donduruldu.

hFOB : İnsan kemik osteoblast hücre hattıdır. İlk olarak fetustan elde edilmiştir.

%10 FBS, 2mM L-glutamin, 100 unite/ml penisilin ve 100ug/ml streptomisin içeren DMEM F12 medyumda kültüre edildi.

%5 CO₂ ve 37°C'lik inkübatörde çoğaltıldı.

% 5 konsantrasyonda DMSO içeren medyumda donduruldu.

293T : İnsan embriyonik böbrek epitelyal hücresidir. İlk olarak fetustan elde edilmiştir.

%10 FBS, 2mM L-glutamin, 100 unite/ml penisilin ve 100ug/ml streptomisin DMEM medyumda kültüre edildi.

%5 CO₂ ve 37°C'lik inkübatörde çoğaltıldı.

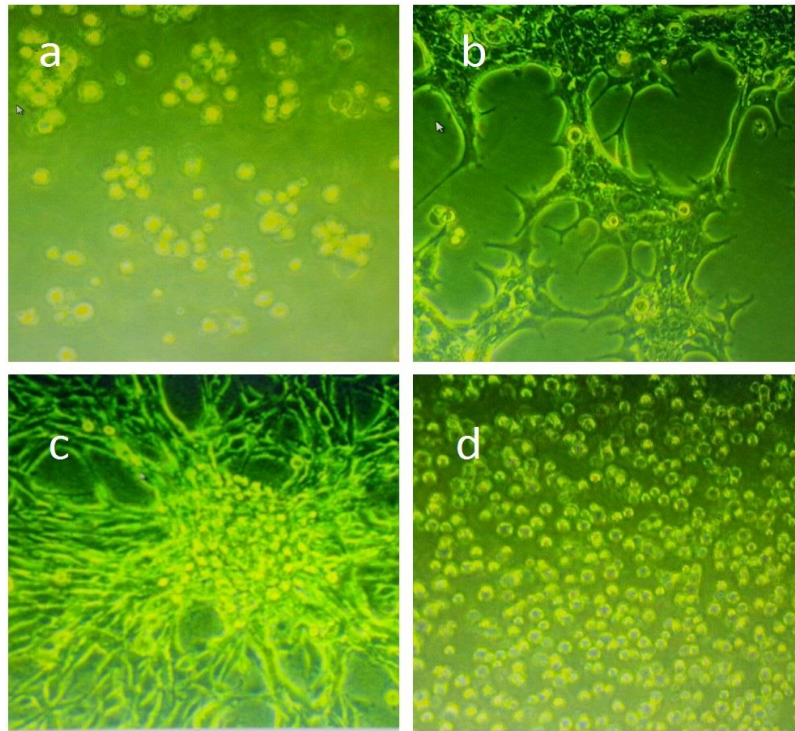
% 5 konsantrasyonda DMSO içeren medyumda donduruldu.

U87: İnsan beyin epitelyal hücre dizisidir. İlk olarak yaşı bilinmeyen glioblastoma hastası erkek bireyden elde edilmiştir.

%10 FBS, 2mM L-glutamin, 100 unite/ml penisilin ve 100ug/ml streptomisin içeren MEM medyumda kültüre edildi.

%5 CO₂ ve 37°C'lik inkübatörde çoğaltıldı.

% 5 konsantrasyonda DMSO içeren medyumda donduruldu.



Şekil 3-1: Hücre soyları : a) K562, b) MCF7, c) U87, d) HL60

3.1.4. Kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler

- DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)(Gibco)
- DMEM /F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) (Gibco)
- Etil alkol
- EDTA
- EGTA
- PBS (Fosfat tampon çözeltisi)
- MEM medyum (Minimum Essential Medium) (Gibco)
- RPMI (1640 Medyumu) (Gibco)
- Sodyum dedodesil sülfat
- Sodyum klorid
- Streptomisin
- Tripan mavisi
- Tris baz
- Tripsin (Gibco, 15050065)
- Triton X-100
- Sodyum deoksalat
- NaCl
- FBS
- Penisilin/streptomisin
- Esansial aminoasit

3.1.5. Kullanılan Kitler

- *'Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit'....* (Roche, 05081955001)
- *'LightCycler 480 SYBR Green I Master '....* (Roche, 04707516001)
- *'PureLink, RNA Mini Kit '....* (İnvitrogen,1762380)

3.1.6. Kullanılan Cihazlar

- Buz Makinası (Cornelius)
- Buzdolabı -80 °C (Thermo Scientific)
- Buzdolabı +4 °C/-20 °C (Beko)
- Distile Su Cihazı (Milipore)
- Hassas Terazı (Kern)
- İnkübatör (Thermo Electron Corporation)
- Laminar Akışlı Steril Kabin (Nuanre)
- Mikrodalga Fırın (Arçelik)
- Mikroskop (Olympus)
- Nanodrop 2000 Spektrofotometre (Thermo Scientific)
- Otoklav (Sümer)
- Pipet Seti (Gilson)
- PZR Cihazı (Eppendorf, Mastercycler)
- Real Time PZR (Light Cycler 480-II, Roche) (Şekil 3-2)



Şekil 3-2: Real-time kantitatif PCR cihazı (Light Cycler 480-II, Roche)

- Santrifüj (Hettich)
- Sıvı azot tankı (StateBourne)
- Soğutmalı Masaüstü Santrifüj (Hettich)
- Su Banyosu (Memmert)
- Vorteks (Stuart)
- Vi cell hücre canlılık analizatörü (Beckman Coulter) (Şekil 3-3)



Şekil 3-3: Hücre canlılık analizatörü (Vi cell, Beckman Coulter)

3.2. Yöntem

3.2.1. Kalitatif PZR

Araştırmaya dahil edilen AML olgularında ve hücre soylarında SPINK2 varyantının olup olmadığını belirlemek için öncelikle hasta örneklerinin RNA'larından ve kültüre edilmiş hücrelerin RNA'larından cDNA elde edildi. Bunun için önce, Solüsyon D'de bulunan bazı hasta örneklerinin RNA'ları izole edildi ve bu RNA'lar kullanılarak cDNA'lar sentezlendi. Hücre soylarından cDNA sentezi için daha önceden izole edilmiş RNA'lar kullanıldı.

3.2.1.1. Hücrelerden RNA Elde Edilmesi

Solüsyon D'de bulunan hücrelerden RNA izolasyonu '*PureLink, RNA Mini Kit* (İnvitrogen)' kullanılarak kitin protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi:

1. -80°C 'de dondurulmuş olan örnekler çözüldükten sonra, solüsyon D'de bulunan hücrenin mililitresine göre hücre miktarına eşit olacak şekilde %70'lik etanol eklendi. Homojenliği sağlamak için karıştırıldı ve vortekslendi.

2. Karışım mini spin kolonlara aktarıldı, oda ısısında 12.000g'de 15 saniye santrifüj edilerek RNA'nın filtreye bağlanması amaçlandı.
3. Santrifüjden sonra altta kalan sıvı uzaklaştırıldı. Kolonun üzerine 700 ml '*Wash Buffer I*' eklenerek tekrar 12.000g'de 15 saniye santrifüj edildi.
4. Santrifüjden sonra altta kalan sıvı uzaklaştırıldı. Kolonun üzerine 500 ml '*Wash Buffer II*' eklenerek 12.000g'de 15 saniye santrifüj edildi. Santrifüjden sonra bu yıkama işlemi bir kez daha yapıldı.
5. RNA bağlanmış filtreyi kurutmak için 12.000g'de 2 dakika santrifüj edildi.
6. Filtre yeni tüpe aktarıldı. Üzerine filtrenin tam ortasına gelecek şekilde 30 µl RNaz içermeyen steril su koyuldu.
7. 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 12.000 g'de 2 dakika santrifüj edildi.
8. RNA'nın suda çözünerek filtreden ayrılıp tüpe geçmesi sağlandı.
9. Elde edilen RNA'ların miktarı '*Nanodrop-2000*' cihazıyla ölçüldü. RNA tüpleri -80°C'de saklandı.

3.2.1.2. RNA'lardan cDNA Sentezi

RNA'dan cDNA sentezi '*Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit* (Roche)' kullanılarak aşağıdaki prosedüre uygun olarak yapıldı.

1. 1 µg Total RNA 9 µl olacak şekilde sulandırıldı.
2. RNA-Su karışımının üzerine 2 µl *random hexamer* ve 1 µl dNTP eklendi. İyice karıştırıldıktan sonra 70°C'de 10 dakika inkübe edildi ve buza alındı.
3. Üzerine; 4 µl 5X Tampon çözelti, 2 µl 0,1M Dithiothreitol (DTT), 1 µl RNaz İnhibitör (40U/µl), 1 µl *Reverse Transcriptase* ile hazırlanmış karışımdan 8 µl eklendi.
4. PZR koşulları 37°C'de 1 saat ve 94°C'de 5 dakika olacak şekilde ayarlanarak uygulandı ve cDNA elde edildi.
5. cDNA örneklerinin miktarı '*Nanodrop-2000*' cihazı kullanılarak belirlendi.

6. Örnekler -20°C’de saklandı.

Tablo 3-1: PZR karışımı

RNA	1 µl
<i>Random hexamer</i>	2 µl
dNTP	1 µl
5X Tampon çözelti	4 µl
0,1M Dithiothreitol (DTT)	2 µl
RNaz İnhibitör (40U/µl)	1 µl
<i>Reverse Transcriptase</i>	1 µl

Kalitatif PZR reaksiyonları 25 µl hacminde; içeren karışımla ‘Eppendorf, Mastercycler’ PZR cihazına konuldu.

PZR koşulları; 94°C’de 2 dakika (1 döngü) ön denatürasyondan sonra,

- 94°C’de 30 saniye,
- 57°C’de 30 saniye
- 72°C’de 30 saniye (35 döngü)
- 72°C’de 5 dakika olacak şekilde uygulandı.

3.2.1.3. Kantitatif Eş Zamanlı PZR (qRT-PZR)

Hastalara ait RNA örneklerinden ve hücrelerden elde edilen cDNA’lardan qRT-PZR yöntemiyle SPINK2 genlerinin ekspresyon düzeyleri belirlendi. Kantitasyon için eş zamanlı kantitatif PZR ‘*LightCycler 480* cihazı ve *Light Cycler 480 SYBR Green I*’ kiti kullanıldı.

Örneklerdeki RNA kalite ve miktarının normalizasyonu için kontrol geni olarak, TATA binding protein (TBP) genleri kullanıldı. Kantitatif PZR için SPINK2 hedef genine spesifik HPLC primerler dizayn edildi.

SPINK2 ve TBP genlerine spesifik primerlerin dizileri Tablo 3-2 ve Tablo 3-3’de gösterilmiştir.

Tablo 3-2: SPINK2 genine ait primerler

GEN ADI	PRİMERLER
SPINK2-Forward	ACCAGGATGTCCCAGACACT
SPINK2-Reverse	GCCAGTGAAGGTGGTCTCTC

Tablo 3-3: TBP genine ait primerler

GEN ADI	PRİMERLER
TBP-Forward	ACTTGACCTAAAGACCATTGCAC
TBP-Reverse	CTTGAAGTCCAAGAAGCTTAGCTGG

qRT-PZR reaksiyonunu için karışım içeriği her gen için; 5 µl *SYBER Green I*, 1 µl primer F, 1 µl primer R, 1 µl H₂O ve 2 µl cDNA olarak hazırlandı. Tablo 3-4 te qRT-PZR karışımı verilmiştir.

Tablo 3-4: qRT-PZR reaksiyon karışımı;

<i>SYBER Green</i>	5 µl
primer F	1 µl
primer R	1 µl
H ₂ O	1 µl
cDNA	2 µl

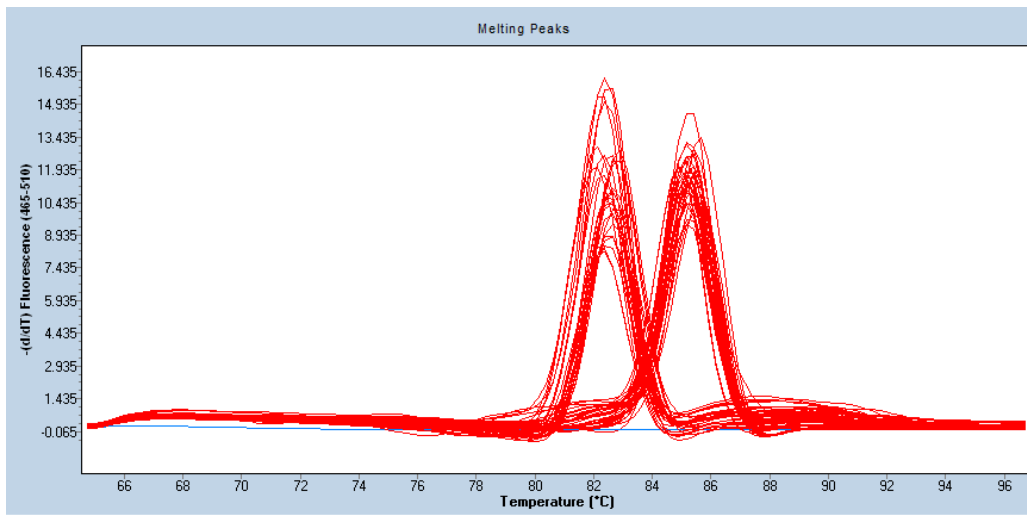
qRT-PCR koşulları;

- Ön denatürasyon: 95°C’de 60 saniye (1 döngü)
- Amplifikasyon: 95°C’de 10 saniye, 68°C’de 20 saniye ve 72°C’de 10 saniye (45 döngü)
- Melting Curve analizi: 95°C’de 5 saniye, 65°C’de 1 dakika ve 95°C de 1 döngü
- Soğutma: 4°C’de 30 saniye olacak şekilde uygulandı.

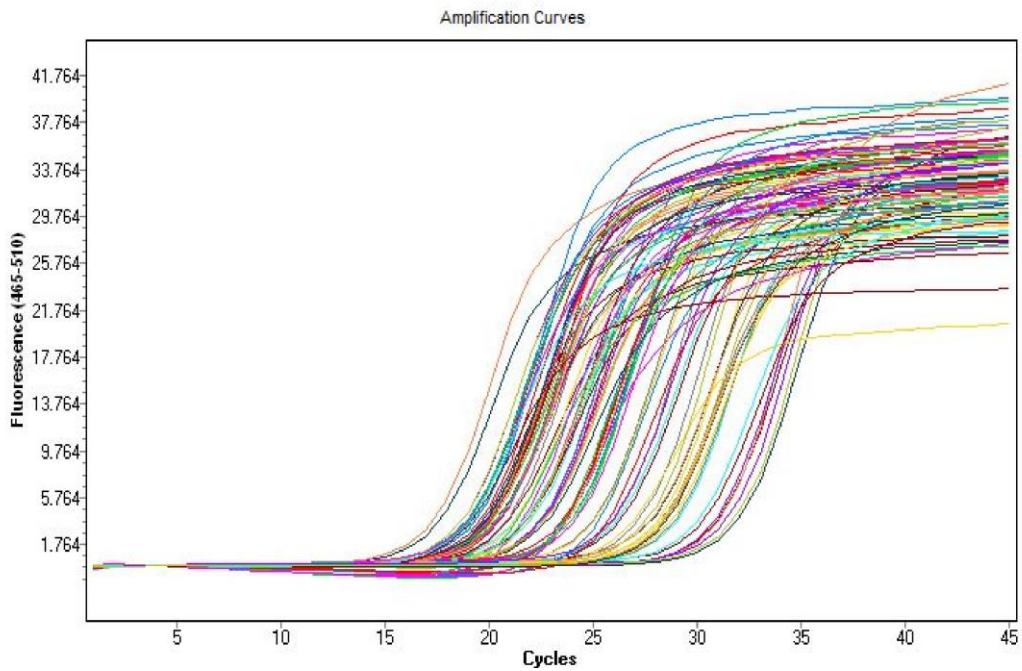
Her PZR reaksiyonu için negatif kontrol olarak cDNA yerine su kullanıldı. Standartlar için TBP'nin seri dilusyonları hazırlanarak, her dilüsyon, her örnek ve negatif kontroller çift olarak çalışıldı. Hedef genlerin ekspresyon değerleri referans gen değerlerine bölünerek normalize edildi.

Hastaların SPINK2 ekspresyon değerleri belirlendi ve sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldı. Örneklerle ve TBP genine ait melting ve amplifikasyon eğrileri ile TBP genine ait standard eğriler Şekil 3-4'de verilmiştir.

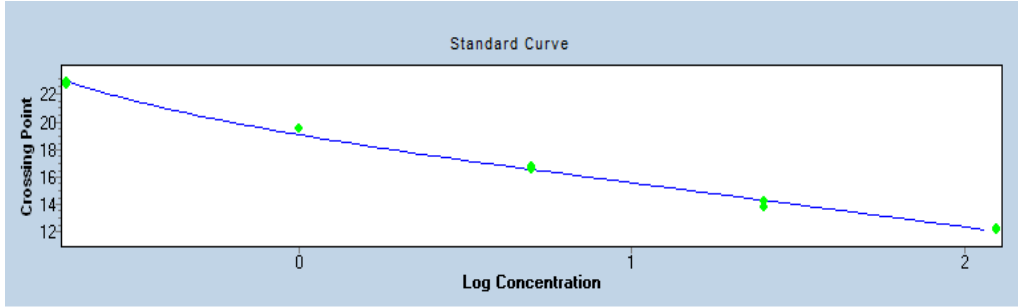
A)



B)



C)



Şekil 3-4: AML’li olgulara ait real-time kantitatif PCR sonuçları

A) Melting Curve Analizi B) Amplifikasyon Eğrileri C) TBP Standart Eğrileri

3.2.2. SPINK2 ekspresyon sevisini tespiti için ELİSA testi

3.2.2.1. Hücreleri çözme ve Hücre kültürü hazırlama

ATCC ve DSMZ’den temin edilmiş olan ve sıvı azot tankında ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$) dondurulmuş olan hücreleri içeren ependorf tüpler, önce 37°C ’lik su banyosunda hızlı bir şekilde çözündürüldü. Her bir hücre soyu 5 ml lik medium içinde santrifüj tüplerine alındı. 1500 rpm’da 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet hücre soyuna uygun 5 ml medyumla çözüldükten sonra T25’ lik flasklara hücre ekimi yapıldı. Hücreler $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ’de, %5 CO_2 ’li inkübatörde inkübe edildi.

Hücrelere uygun olarak kullandığımız medyumlar ;

HL60, THP1, K562, Jurkat, ve Nalm6 için % 10 FBS içeren RPMI medium,

NB4 hücreleri için %20 FBS içeren RPMI medium,

MCF7, HeLa, HUVEC, 293T hücreleri için % 10 FBS içeren DMEM medium,

hFOB için % 10 FBS içeren F12 DMEM medium ve

U87 için %10 FBSLI % 1 aminoasit içeren MEM medium kullanıldı.

Tüm medyumlara hazırlık safhasında % 1 antibiyotik (penisilin streptomisin) ilave edildi.

3.2.2.2. Hücrelerin pasajlanması

Hücreler , hem RT-PZR ile SPINK2 ekspresyon tayini için, hem de hücre içinde tutulan ve dışarı salgılanan SPINK2 protein miktarı tespiti için çoğaltılmak amacıyla

uygun medyumlarla kültüre edildi. Hücrelere bir gün arayla Tablo 3-5'deki işlemler uygulandı.

Tablo 3-5 : Hücrelerin pasajlanması

MONOLAYER HÜCRELER	SÜSPANSE HÜCRELER
Önce süpernatant uzaklaştırıldı. PBS ile yıkama yapılarak medyum kalıntısı temizlendi. 2-3 ml Trypsin ile muamele edildi. 1-3 dk arası inkübatörde bekletildi. Trypsin etkisini gidermek için 2-3 ml. medyum ilave edildi. Hücreler serolojik pipetle toplandı. 1500 rpm de 5 dk. Santrifüj edildi Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet uygun medyumla çözüldü.	Hücreler toplandı. 1500 rpm de 5 dk. Santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet uygun medyumla çözüldü.

T25 'lik flakslara ekim yapıldı. Hücreler 37C⁰'de %5 CO₂'li ortamda inkübe edildi.

3.2.2.3. Hücre içinde ve dışına salgılanan SPINK2 protein düzeyinin belirlenmesi için yapılan işlemler

➤ Hücreleri parçalamak için ekstraksiyon çözeltisinin hazırlanması ;

- 100 mM Tris, pH 7,4
- 150 mM NaCl
- 1mM EDTA
- 1mM EGTA
- Triton X-100
- Sodyum deoksalat

Çözelti ve tamponlar 15 ml lik falkonda birleştirildi. Oda sıcaklığında tutuldu.

➤ Hücrelerin ve süpernatantların deneye hazırlanması

Tablo 3-6 : Hücrelerin ve süpernatanın ELİSA testi için hazırlanması

MONOLAYER HÜCRELER	SÜSPANSE HÜCRELER
Kültüre edilmiş hücreler monolayer hücre pasajlama kurallarına göre santrifüj tüplerine alınıp santrifüj edildi ve Vicell cihazı ile sayıldı. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet hücre türüne uygun medyumun %0,2 FBS li konsantrasyonuna sonuçta 2 milyon hücre ve 4 milyon hücre olacak şekilde ayrı ayrı flasklara ekildi.* Ekim sırasında medyum miktarlarının eşit olması sağlandı. 48 saat sonra 2 milyon ve 4 milyon olan hücrelerin süpernatantları hızlı bir şekilde ayrı ayrı toplandı. 2 milyon ve 4 milyonluk hücreler monolayer hücre pasajlama kurallarına göre ayrı ayrı santrifüj tüplerine toplanıp 1500 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Pelletlerden her birine 150 ul soğuk PBS ilave edildi. +4 °C lik santrifüjde 2000 rpm de 10 dk santrifüj edildi. Oluşan süperneyan uzaklaştırıldı. Medyum ve PBS ten arınmış hücreler 200 ul ekstraksiyon çözeltisi ile parçalanma tamamlanana kadar pipetlendi. Parçalanmış hücreler ve süpernatantlar daha sonra kullanılmak üzere 1,5 ml lik ependorf tüplere alınıp -80 °C de saklandı. Protein degradasyonunu önlemek için çalışma sırasında örnekler +4 °C sıcaklıkta tutuldu.	Kültüre edilmiş hücreler süspanse kültür kurallarına göre santrifüj tüplerine alınıp santrifüj edildi ve Vicell cihazıyla sayıldı. Süpernatantlar uzaklaştırıldı. Pellet hücre türüne uygun medyumun %0,2 FBS li konsantrasyonuna sonuçta 2 milyon hücre ve 4 milyon hücre olacak şekilde ayrı ayrı flasklara ekildi. Ekim sırasında medyum miktarlarının eşit olması sağlandı 48 saat sonra 2 milyon ve 4 milyon olan hücreler ayrı ayrı santrifüj tüplerine alınıp 1500 rpm de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatantlar santrifüj tüpüne alınıp +4 °C de bekletildi. Pelletlerden her birine 150 ul soğuk PBS ilave edildi. +4 °C lik santrifüjde 2000 rpm de 10 dk santrifüj edildi. Oluşan süperneyan uzaklaştırıldı. Medyum ve PBS ten arınmış hücreler 200 ul ekstraksiyon çözeltisi ile parçalanma tamamlanana kadar pipetlendi. Parçalanmış hücreler ve süpernatantlar daha sonra kullanılmak üzere 1,5 ml lik ependorf tüplere alınıp -80 °C de saklandı. Protein degradasyonunu önlemek için çalışma sırasında örnekler +4 °C sıcaklıkta tutuldu.

(*: MCF7 hücreleri % 0,2'lik medyum konsantrasyonda canlılıklarını kaybettikleri için % 10' luk konsantrasyonları kullanıldı.)

3.2.2.4. ELİSA Testi

“MyBiosource Human Serine Protease Inhibitor Kazal Type 2 (SPINK2) ELISA Kit ” (Katolog Numarası: MBS9339182) protokolüne göre örneklerle Elisa testi uygulandı.

Elisa kiti sandviç elisa kit özelliğindedir. *SPINK2* antikorları platde bulunmaktadır.

Kitin hassasiyeti 20 ng/ml-0.625 ng/ml arasındadır.

ELİSA kitinin içinde bulunan malzemeler:

- 96’lı mikroelisa stripplate
- 6 farklı standart (standart konsantrasyonları: 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 ng/ml)
- Sulandırıcı
- HRP- konjugat reaktifi
- 20X yıkama solusyonu
- Durdurucu solusyon
- Kromotojen solusyon A
- Kromotojen solusyon B
- Plate kapatıcı membran

Standartlar, hücre sürpernetanları ve medyumlar (kontrol grubu olarak kullanıldı) çift olarak çalışıldı.

Çalışmada aşağıdaki basamaklar takip edildi.

1. Tüm malzemeler 30 dk oda sıcaklığında bekletildi.
2. Örnek ve reaktifleri çözmek için düşük hızda santrifüj yapıldı.
3. 96’lı mikroelisa stripplate in her bir kuyusuna 100 µl HRP- konjugat reaktifi eklendi ve membranla kapatıldı.
4. 60 dk 37 C⁰ de inkübe edildi.

5. 96'lı mikroelisa stripplate 4 kez yıkandı. Yıkama işlem için her kuyunun içi boşaltıldı. Kuyular yıkama solusyonuyla dolduruldu. 1 dk beklendi. Kurulandı.(Bu işlem 4 kez tekrarlandı.)
6. Her kuyuya 50 µl ul kromojen çözeltisi A ve 50 µl kromojen solusyonu B eklendi ve ışık görmemesi sağlandı.
7. 37 C⁰ de 15 dk. Inkübe edildi. Her kuyuya 50 µl durdurucu solusyon eklendi. (Renk maviden sarıya dönüştü.)
8. Durdurma solusyonu eklendikten sonra 15 dk içinde ELİSA okuyucuyu kullanarak 450 nm/dk ' de okundu.(En iyi sonucu elde etmek için ilk 5 dk en uygun zaman.)

Sonuçların hesaplanması

Her standart, kontrol ve numune çift olarak çalışıldı. Hesaplama için bu çiftlerin ortalaması alındı (V). Örneklerin optik yoğunluğunu hesaplamak için ;

$$\text{Örneğin optik yoğunluğu} = \text{Örneğin ortalama değeri} - \text{Kontrolün ortalama değeri}$$

formülü kullanıldı.

Tablo 3-7: Örneklerin optik yoğunluğunun hesaplanması.

(Human Serine Protease Inhibitor Kazal Type 2 SPINK2 ELISA Kit protokolüne göre)

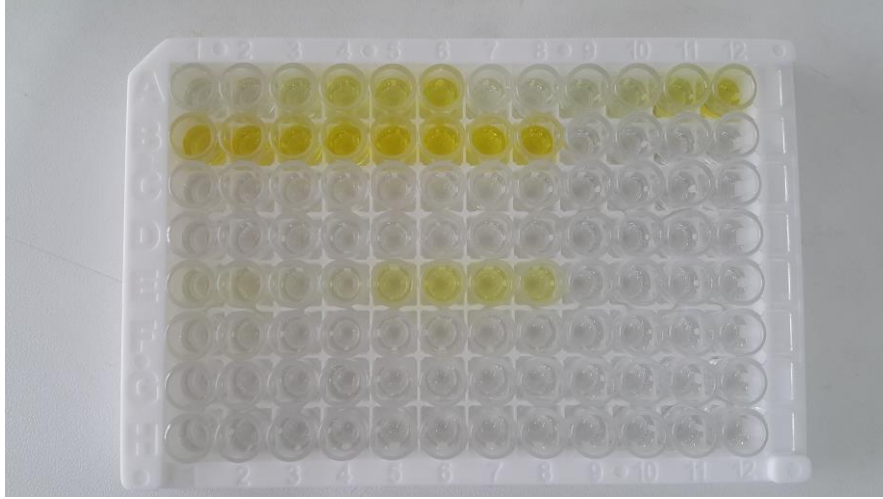
Standartlar	0	SI	SII	SIII	SIV	SV	SVI
Ortalama O.D. (450nm)	VB/C	V1	V2	V3	V4	V5	V6
Düzeltilme	0	V1-VB/C	V1-VB/C	V1-VB/C	V1-VB/C	V1-VB/C	V1-VB/C

S= standart

O.D= Optik yoğunluk

VB/C= Blank/Kontrol

'Human Serine Protease Inhibitor Kazal Type 2 SPINK2 ELISA Kit' platenin deney sonunda görüntüsü Şekil 3-5'te verilmiştir.



Şekil 3-5: Sandviç tipi ELISA plate deney sonrası görünümü

3.3. İstatiksel Analiz

Veriler SPSS'20 istatistik programı ile analiz edildi. Bulgular ortalama ve yüzde (%) olarak tablolarda gösterildi. Verilerin karşılaştırmasında, parametrik veriler için *independent sample T testi* ile parametrik olmayan verilerin karşılaştırmasında non-parametrik test yöntemlerinden *Kruskal Wallis* ve *Mann Whitney U testleri* kullanıldı. Veriler arasındaki korelasyonu araştırmak amacıyla, *Pearson* ve *Spearman's* testi, nitel verilerin karşılaştırmasında korelasyon ve *Ki-Kare* testi uygulandı. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Elde edilen veriler tablolar ile gösterilmiştir.

1. BULGULAR

Bu tez çalışması İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Genetik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Örnek alımı sırasında 'Gönüllü Onam Formu' alınmış olan AML tanısı konulmuş hastalardan elde edilen kemik iliği ve kandan izole edilen RNA örnekleri kullanıldı. Ayrıca gen ekspresyon ve protein düzeylerinin tespiti için yine İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nde bulunan, ATCC ve DSMZ den temin edilmiş ve sıvı azot tanklarında dondurulmuş hücreler kullanıldı.

SPINK2 geninin ekspresyon analizi yapılan olgulardan % 50'si kadın (n=45) , % 50'si erkektir (n=45) (Tablo 4-1).

Tablo 4-1: Cinsiyete göre AML olgularının dağılımı

Cinsiyet	N (Sayı) Oran(%)
Kadın	45 (%50)
Erkek	45 (%50)
Toplam	90 (%100)

Olguların yaş aralığı 1-85'tir. Kız çocuk (n=11) %14 ,erkek çocuk (n=9) %10 , yetişkin kadın (n=34) %36, yetişkin erkek (n=36) %40 oranındadır (Tablo 4-2).

Tablo 4-2: Çocukluk çağı ve yetişkin AML olgularının cinsiyete göre dağılımı

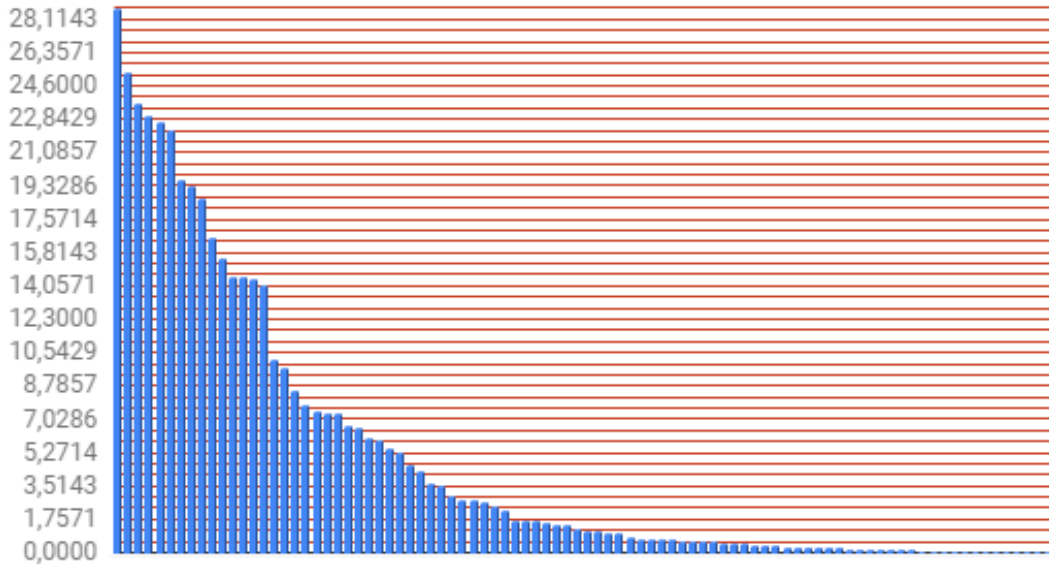
Cinsiyet	N(Sayı)-Oran(%)
Kız Çocuk	11 (%12)
Erkek Çocuk	9 (%10)
Erişkin Kadın	34 (%38)
Yetişkin Erkek	36 (%40)
Toplam	90 (%100)

Çalışmamızda Human Bone Marrow Total RNA (CLONTECH, USA ct no:636591) kullanıldı.

0-80 yaş aralığındaki Asyalı kadın ve erkek sağlıklı bireylerin SPINK2 ekspresyon ortalaması alındı. Ortalama 0,3 olarak tespit edildi. AML olgularının tamamındaki SPINK2 mRNA düzeyi RT-PZR ile analiz edildi ve AML olgularının $\Delta\Delta$ ct değerleri hesaplandı. Sonuçlar Şekil 4-1'deki grafikte gösterilmiştir.

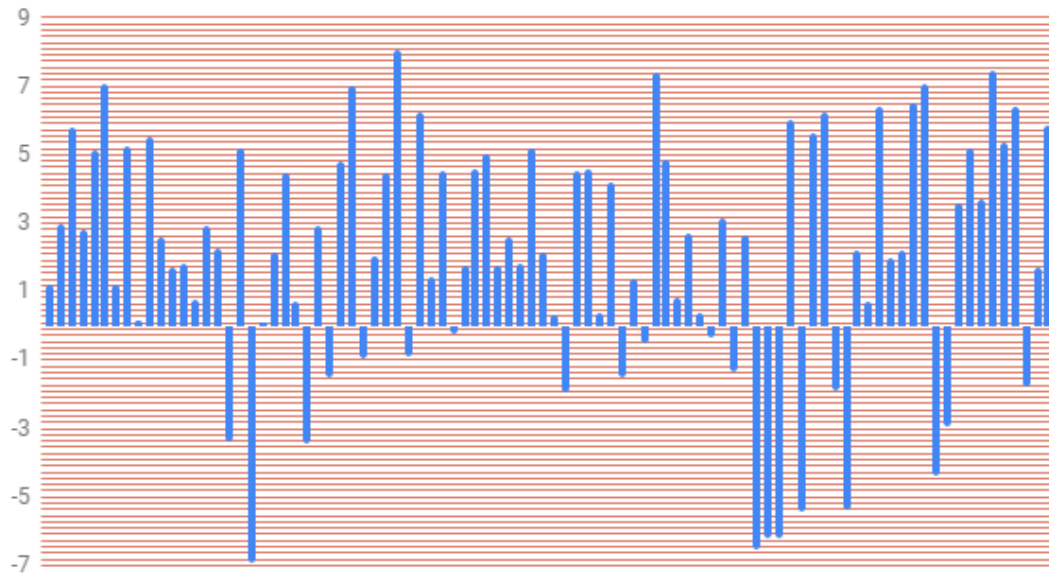
A)

AML OLGULARI SPINK2 EKSPRESYONU



B)

AML olgularının $\Delta\Delta$ ct değerleri



Şekil 4-1: AML olgularında SPINK2 mRNA ekspresyon oranları (A), AML olgularının $\Delta\Delta$ ct değerleri (B)

SPINK2 ekspresyonu ortalamasının üstünde olan olgular yüksek ekspresyon, ortalamasının altında olanlar düşük ekspresyon olarak sınıflandırıldı ve istatistiksel analizler buna göre yapıldı. Tüm AML olgularında SPINK2 ekspresyonu kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık görülmedi ($p=0,593$). Tablo 4-3’ de Mann Whitney U testi sonuçları verilmiştir. Erişkin AML olgularında SPINK2 ekspresyonu kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış bulundu ($p=0,042$). Çocukluk çağı AML olgularında SPINK2 ekspresyonunda kontrole göre farklılık görülmedi ($p=0,60$). ($p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.)

Tablo 4-3: AML olgularında SPINK2 ekspresyonunun kontrolle karşılaştırılması

Spink2 ekspresyonu	Test türü	Sonuç (p değeri)	Bulgu
Çocuk	Mann Whitney U testi	0,600	Anlamlı değil
Erişkin	Mann Whitney U testi	0,042	Anlamlı
Tüm AML olguları	Mann Whitney U testi	0,593	Anlamlı değil

AML’li tüm bireylerin yaş ve cinsiyete bağlı SPINK2 ekspresyon oranları ‘Mann Whitney U’ testi ile analiz edilmiş ve sonuçlar Tablo 4-4’ de verilmiştir. Yaşa bağlı SPINK2 ekspresyonu ve cinsiyete bağlı SPINK2 ekspresyonlarının değerlendirilmesiyle her ikisinden elde edilen sonuçlar doğrultusunda SPINK2 ekspresyonu-cinsiyet ve SPINK2 ekspresyonu-yaş arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı tespit edildi (sırasıyla $p=0,768$ ve $p=0,679$).

Tablo 4-4: AML olgularında yaşa ve cinsiyete bağlı SPINK2 ekspresyonu

	Test türü	Sonuç (p değeri)	Bulgu
Spink2 ekspresyonu-cinsiyet	Mann Whitney U testi	0,768	Anlamlı değil
Spink2 ekspresyonu-yaş	Mann Whitney U testi	0,679	Anlamlı değil

AML olgularında SPINK2 ekspresyonunun kontrole (sağlıklı bireylerin havuzundan elde edilen ekspresyon değeri) göre dağılımları olgu sayısı ve yüzde olarak Tablo 4-5’de verilmiştir. SPINK2 ekspresyonu kontrolün altında olanlar düşük ekspresyon, kontrolün üstünde olanlar yüksek ekspresyon olarak gruplandırıldı. Olguların % 71 ‘inde kontrole göre yüksek ekspresyon tespit edildi.

Tablo 4-5: Tüm AML olgularının SPINK2 ekspresyon düzeyinin kontrole göre kız ve erkek olgularda sayısal dağılım

		Kız çocuk N (%)	Erkek çocuk N (%)	Erişkin kadın N (%)	Erişkin erkek N (%)	Toplam N (%)
Kontrol SPINK2 ortalaması (0.3)	Düşük ekspresyon	2 (%18)	3 (%33)	10 (%29)	11 (%31)	26 (%29)
	Yüksek ekspresyon	9 (%82)	6 (%77)	24 (%71)	25 (%69)	64 (%71)
	Toplam	11 (%100)	9 (%100)	34 (%100)	36 (%100)	90 (%100)

AML olguları arasında FAB sınıflandırması bilinen 47 olgunun SPINK2 ekspresyon ortalamaları Tablo 4-6’da gösterilmiştir. FAB sınıflarının tamamında SPINK2 ekspresyonu ortalaması kontrole (sağlıklı) göre yüksek bulundu.

Tablo 4-6: FAB sınıflarına göre SPINK2 ekspresyon ortalaması

[Analize FAB sınıfı bilinen 47 birey (% 46,1) dahil edilmiştir]

FAB No	Ortalama	Birey sayısı-yüzdesi N (%)	Standart sapma
M0	13,9184335693693	3 (%6)	11,86165290577668
M1	7,1047199843572	4 (%9)	12,21395568337853
M2	3,2575835603262	11 (%23)	6,79243863888484
M3	3,9019607119800	10 (%21)	5,93836578953262
M4	7,3232598432025	13 (%28)	7,17959450936642
M5	9,1904384584676	4 (%9)	7,52695821137476
M7	3,8350032320622	2 (%4)	3,12393102522276
Toplam	6,0566243657139	47 (%100)	7,65905090563787

AML olguları arasında FAB sınıflandırması bilinenlerin SPINK2 ekspresyonlarının kontrolün üstünde (yüksek ekspresyon) ve kontrolün altında (düşük ekspresyon) olan olgu sayıları çapraz tablo yöntemi ile tespit edildi. Olgu sayısı ve yüzdeleri Tablo 4-7 de verilmiştir.

Tablo 4-7: AML olgularının SPINK2 ekspresyon düzeylerinin FAB sınıflamasına göre dağılımı

		FAB SINIFLARI							TOPLAM
		M0 N (%)	M1 N (%)	M2 N (%)	M3 N (%)	M4 N (%)	M5 N (%)	M7 N (%)	
Spink2 ortalama	Düşük ekspresyon	0 (%0)	1 (%25)	4 (%36)	2 (%20)	2 (%15)	0 (%0)	0 (%0)	9 (%19)
	Yüksek ekspresyon	3(%100)	3 (%75)	7 (%64)	8 (%80)	11(%85)	4(%100)	2(%100)	38 (%81)
Toplam		3(%100)	4(%100)	11(%100)	10(%100)	13(%100)	4(%100)	2(%100)	47(%100)

Çocukluk çağı AML’li olgulardan FAB sınıfı bilinen 13 olgunun FAB sınıflarına göre dağılımı çapraz tablo analizi ile Tablo 4-8’ de gösterilmiştir. Sadece M2, M3 ve M4 sınıfından olgular bulunmaktadır.

Tablo 4-8: Çocukluk çağı AML olgularının SPINK2 ekspresyon düzeylerinin FAB sınıflarına göre dağılımı

ÇOCUK		FAB SINIFLARI			TOPLAM N (%)
		M2 N (%)	M3 N (%)	M4 N (%)	
Spink2 ortalama	Düşük ekspresyon	1 (%50)	1 (%17)	1 (%17)	3 (%21)
	Yüksek ekspresyon	1 (%50)	5 (%83)	5 (%83)	11 (%79)
Toplam		2 (%100)	6 (%100)	6 (%100)	14 (%100)

FAB sınıfı bilinen 34 AML’li erişkin olgunun SPINK2 ekspresyon düzeylerinin FAB sınıflarına göre dağılımı çapraz tablo yöntemi ile belirlendi. Sonuçlar Tablo 4-9’da gösterildi.

Tablo 4-9: Erişkin AML’li olguların SPINK2 ekspresyon düzeylerinin FAB sınıflarına göre dağılımı

ERİŞKİN		FAB SINIFLARI							TOPLAM N (%)
		M0 N(%)	M1 N (%)	M2 N (%)	M3 N (%)	M4 N (%)	M5 N (%)	M7 N (%)	
SPINK2	Düşük ekspresyon	0 (%0)	1 (%25)	3 (%33)	1 (%25)	1 (%14)	0 (%0)	0 (%0)	6 (%18)
	Yüksek ekspresyon	3 (%100)	3 (%75)	6 (%67)	3 (%75)	6 (%86)	4 (%100)	2 (%100)	27 (%82)
Toplam		3 (%100)	4 (%100)	9 (%100)	4 (%100)	7 (%100)	4 (%100)	2 (%100)	33 (%100)

Mann-Whitney U Test’’ yöntemi ile SPINK2 ekspresyonunun tüm FAB sınıflarına göre değişimi belirlendi ve FAB sınıfları ile SPINK2 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmadı (Tablo 4-10).

Tablo 4-10: SPINK2 ekspresyonunun FAB sınıflarıyla ilişkisi

	Test	Sonuç (p değeri)	Bulgu
Spink2 ekspresyonunun farklı FAB gruplarına göre değişimi	Indepented samples mann-whitney U Test	0,331	Anlamlı değil

Çalışmamızda yer alan AML olgularının t(15;17), t(8;21) ve inv(16) mutasyonuna sahip olgu sayı ve oranları tespit edilmiş ve Tablo 4-11’de verilmiştir.

Tablo 4-11: AML olgularının t(15;17), t(8;21), inv(16) sayı ve oranları

	Pozitif Sayı (N)-Oran (%)	Negatif Sayı (N)-Oran (%)	Toplam(N)-Oran(%)
t(15;17)	11 (%13)	76 (%87)	87 (%100)
t(8;21)	11 (%13)	77 (%87)	88 (%100)
inv(16)	6 (%7)	81 (%93)	87 (%100)

Çalışmamızda yer alan tüm AML olguları arasında t(15;17), t(8;21), inv(16) mutasyonlarının varlığı ile SPINK2 ekspresyonlar arasındaki ilişki Mann Whitney U testi ile analiz edilmiş ve sonuçlar Tablo 4-12’de gösterilmiştir. t(8;21) ve inv(16) ile SPINK2 ekspresyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu tespit edildi (sırasıyla $p=0,000$ ve $p=0,028$).

Tablo 4-12: Tüm AML olgularında SPINK2 ekspresyonunun t (15;17), t(8;21) ve inv(16) mutasyonları ile ilişkisi

Mutasyon türü	Test türü	Sonuç (p değeri)	Bulgu
t (15;17)	Mann Whitney U testi	0,649	Anlamli değil
t(8;21)	Mann Whitney U testi	0,000	Anlamli
inv(16)	Mann Whitney U testi	0,028	Anlamli

Çocukluk çağı AML’li olguların t(15;17), t(8;21) ve inv16 mutasyonlarının SPINK2 ekspresyonu ile ilişkisi Mann Whitney U testi ile belirlenmiş ve sonuçlar Tablo 4-13 de gösterilmiştir. Çocukluk çağı olgularında t(8;21), inv16 ile SPINK2 arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulundu (sırasıyla $p=0,039$ ve $p=0,015$).

Tablo 4-13: Çocukluk çağı AML olgularında SPINK2 ekspresyonunun t (15;17), t(8;21), inv16 ile ilişkisi

Mutasyon türü	Test türü	Sonuç (p değeri)	Bulgu
t(15;17)	Mann Whitney U testi	0,79	Anlamli değil
t(8;21)	Mann Whitney U testi	0,039	Anlamli
inv(16)	Mann Whitney U testi	0,015	Anlamli

Erişkin AML olgularında t(15;17), t(8;21), inv16 mutasyonlarının SPINK2 ekspresyonu ile ilişkisi Tablo 4-14 te gösterilmiştir. t(8;21) ile SPINK2 arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulunmuştur ($p=0,000$).

Tablo 4-14: Erişkin AML olgularında SPINK2 ekspresyonunun t (15;17), t(8;21) ve inv(16) ile ilişkisi

Mutasyon türü	Test türü	Sonuç (p değeri)	Bulgu
t(15;17)	Mann Whitney U testi	0,902	Anlamsız
t(8;21)	Mann Whitney U testi	0,000	Anlamli
inv(16)	Mann Whitney U testi	0,244	Anlamli değil

t(15;17) translokasyonu varlığına göre SPINK2 ekspresyon düzeyleri tüm olgular (Tablo 4-15), çocuk olgular (Tablo 4-16) ve erişkin olgular (Tablo 4-17) olmak üzere ayrı ayrı tablolarda gösterilmiştir.

Tablo 4-15: Tüm AML’li olgularda t(15;17) translokasyonu varlığına göre SPINK2 ekspresyon düzeylerinin dağılımı

		t(15;17) pozitif N (%)	t(15;17) negatif N (%)	TOPLAM N (%)
SPINK2	Düşük ekspresyon	3 (%25)	21 (%28)	24 (%28)
	Yüksek ekspresyon	9 (%75)	54 (%72)	63 (%72)
Toplam		12 (%100)	75 (%100)	87 (%100)

Tüm AML olgularından t(15;17) pozitiflerin %75’inde SPINK2 ekspresyonu yüksek, %25’inde düşük bulundu. t(15;17) negatif olguların ise %72’sinde yüksek, %28’inde düşük bulundu.

Tablo 4-16: Çocukluk çağı AML olgularının t(15;17) translokasyonu varlığına göre SPINK2 ekspresyon düzeylerinin dağılımı

		t(15;17) pozitif N (%)	t(15;17) negatif N (%)	TOPLAM N (%)
SPINK2	Düşük ekspresyon	0 (%0)	3(%23)	3 (%17)
	Yüksek ekspresyon	5 (%100)	10 (%77)	15 (%83)
Toplam		5 (%100)	13 (%100)	18 (%100)

Çocukluk çağı AML olgularından t(15;17) pozitiflerin hepsinde SPINK2 ekspresyonu yüksek bulundu. t(15;17) negatif olguların ise %77’sinde yüksek, %23’ünde düşük bulundu.

Tablo 4-17: Erişkin AML olgularının t(15;17) translokasyon varlığına göre SPINK2 ekspresyon düzeylerinin dağılımı

		t(15;17) pozitif N (%)	t(15;17) negatif N (%)	TOPLAM N (%)
SPINK2	Düşük ekspresyon	3 (%43)	18 (%29)	21 (%30)
	Yüksek ekspresyon	4 (%57)	44 (%71)	48 (%70)
Toplam		7 (%100)	62 (%100)	69 (%100)

Erişkin AML olgularından t(15;17) pozitiflerin %57’inde SPINK2 ekspresyonu yüksek, %43’ünde düşük bulundu. t(15;17) negatif olguların ise %71’inde yüksek, %29’unda düşük bulundu.

t(8;21) translokasyonu varlığına göre SPINK2 ekspresyon düzeyleri tüm AML olguları (Tablo 4-18), çocukluk çağı (Tablo 4-19) ve erişkin olgular (Tablo 4-20) olmak üzere ayrı ayrı tablolarda gösterilmiştir.

Tablo 4-18: Tüm AML olguların t(8;21) varlığına göre SPINK2 ekspresyon düzeylerinin dağılımı

		t(8;21) pozitif N (%)	t(8;21) negatif N (%)	TOPLAM N (%)
SPINK2	Düşük ekspresyon	9 (%82)	17 (%22)	26 (%30)
	Yüksek ekspresyon	2 (%18)	60 (%78)	62 (%70)
Toplam		11 (%100)	77 (%100)	88 (%100)

Tüm AML olgularından t(8;21) pozitiflerin %18’inde SPINK2 ekspresyonu yüksek, %82’sinde düşük bulundu. t(8;21) negatif olguların ise %78’inde yüksek %22’sinde düşük bulundu.

Tablo 4-19: Çocukluk çağı AML olgularında t(8;21) translokasyonu varlığına göre SPINK2 ekspresyon düzeylerinin dağılımı

		t(8;21) pozitif N (%)	t(8;21) negatif N (%)	TOPLAM N (%)
SPINK2	Düşük ekspresyon	2 (%67)	3 (%19)	5 (%26)
	Yüksek ekspresyon	1 (%33)	13 (%81)	14 (%74)
Toplam		3 (%100)	16 (%100)	19 (%100)

Çocukluk çağı AML olgularından t(8;21) pozitiflerin %33’ünde SPINK2 ekspresyonu yüksek, %67’sinde düşük bulundu. t(8;21) negatif olguların ise %81’inde yüksek, %19’unda düşük bulundu.

Tablo 4-20: Erişkin AML olgularında t(8;21) varlığına göre SPINK2 ekspresyon düzeylerinin dağılımları

		t(8;21) pozitif N (%)	t(8;21) negatif N (%)	TOPLAM N (%)
SPINK2	Düşük ekspresyon	7 (%88)	14 (%23)	21 (%30)
	Yüksek ekspresyon	1 (%12)	47 (%77)	48 (%70)
Toplam		8 (%100)	61 (%100)	69 (%100)

Erişkin AML olgularından t(8;21) pozitiflerin %12’sinde SPINK2 ekspresyonu yüksek, %88’inde düşük bulundu. t(8;21) negatif olguların ise %77’sinde yüksek, %23’ünde düşük bulundu.

inv(16) varlığına göre SPINK2 ekspresyon düzeyleri tüm olgular (Tablo 4-21), çocukluk çağı olguları (Tablo 4-22) ve erişkin olgular (Tablo 4-23) olmak üzere ayrı ayrı tablolarda gösterilmiştir.

Tablo 4-21: Tüm AML olgularının inv(16) varlığına göre SPINK2 ekspresyon düzeylerinin dağılımları

		İnv(16) pozitif N (%)	İnv(16) negatif N (%)	TOPLAM N (%)
SPINK2	Düşük ekspresyon	0 (%0)	25 (%30)	25 (%29)
	Yüksek ekspresyon	6 (%100)	57 (%70)	63 (%71)
Toplam		6 (%100)	82 (%100)	88 (%100)

Tüm AML olgularından inv(16) pozitif olguların hepsinde SPINK2 ekspresyonu yüksek bulundu. inv(16) negatif olguların ise %70’inde yüksek, %30’unda düşük bulundu.

Tablo 4-22: Çocukluk çağı AML olgularının inv(16) varlığına göre SPINK2 ekspresyon düzeylerinin dağılımları

		İnv(16) pozitif N (%)	İnv(16) negatif N (%)	TOPLAM N (%)
SPINK2	Düşük ekspresyon	0 (%0)	5 (%33)	5 (%28)
	Yüksek ekspresyon	3 (%100)	10 (%77)	13 (%72)
Toplam		3 (%100)	15 (%100)	18 (%100)

Çocukluk çağı AML olgularından inv(16) pozitif olguların hepsinde SPINK2 ekspresyonu yüksek bulundu. inv(16) negatif olguların ise %77’sinde yüksek, %33’ünde düşük bulundu.

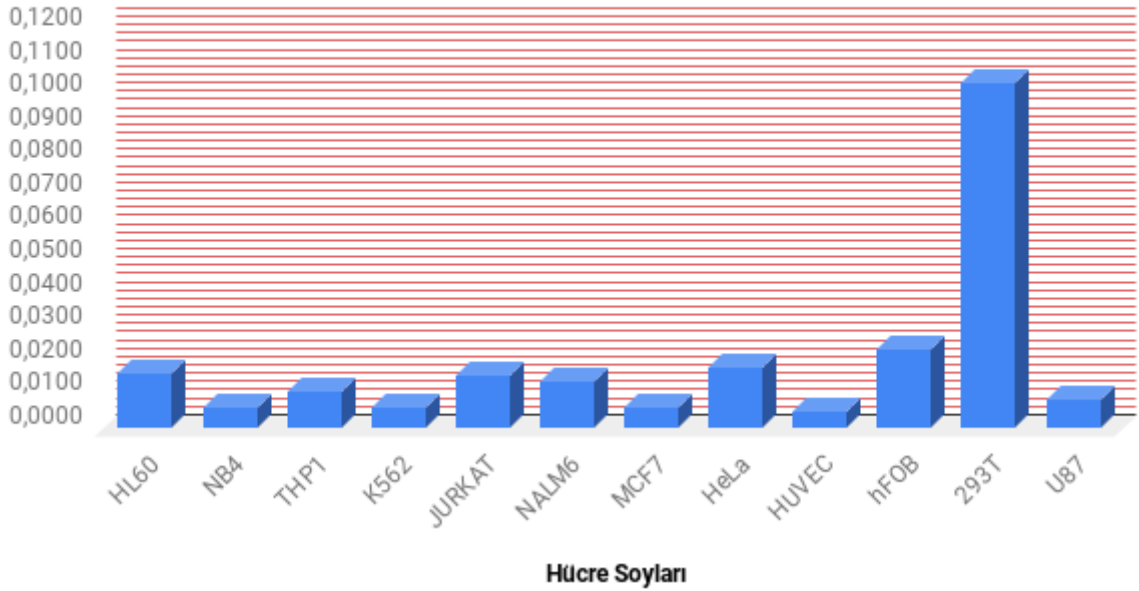
Tablo 4-23: Erişkin AML olgularının inv(16) varlığına göre SPINK2 ekspresyon düzeylerinin dağılımları

		İnv(16) pozitif N (%)	İnv(16)) negatif N (%)	TOPLAM N (%)
SPINK2	Düşük ekspresyon	0 (%0)	20 (%30)	20 (%29)
	Yüksek ekspresyon	3 (%100)	47 (%70)	50 (%71)
Toplam		3(%100)	67 (%100)	70 (%100)

Erişkin AML olgularından inv(16) pozitif olguların hepsinde SPINK2 ekspresyonu yüksek bulundu. inv(16) negatif olguların ise %70’inde yüksek, %30’unda düşük bulundu.

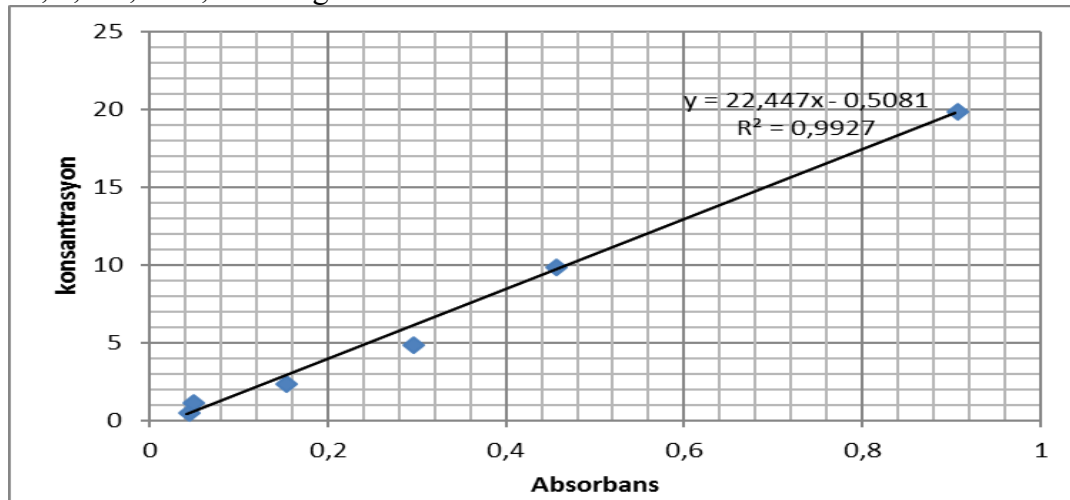
Bu tez çalışmasında bazı hücre soylarındaki SPINK2 ekspresyon seviyelerini belirlemek için de RT-PZR yapıldı. RT-PZR sonuçlarına göre Şekil 4-2'deki grafik elde edildi. Hücre soylarında SPINK2 ekspresyon ortalaması 0,03 olarak bulundu.

Hücre Soyları RT-PZR Sonuçları



Şekil 4-2: Hücre soylarında SPINK2 ekspresyonu. (Grafikteki her çizgi aralığı 0,067 değerindedir.)

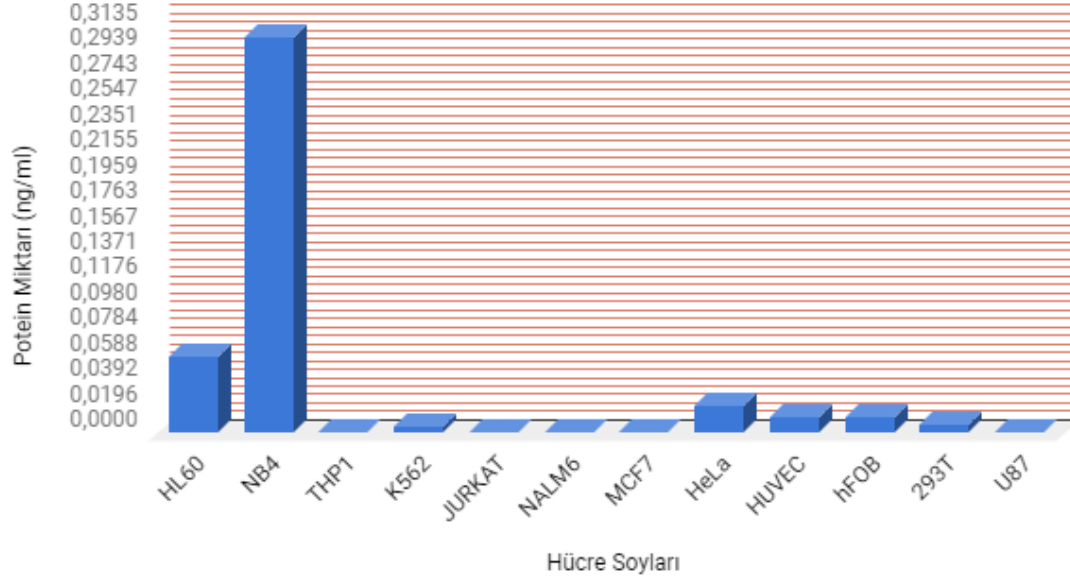
Hücre soylarında hücre içinde bulunan ve medyuma salınan *SPINK2* protein düzeyleri Elisa yöntemiyle tespit edildi. Bunun için “*Human Serine Protease Inhibitor Kazal Type 2 (SPINK2) ELİSA Kit*” kullanıldı. Kitin içeriğinde bulunan standartlardan elde ettiğimiz eğriye ait grafik Şekil 4-6’da verilmiştir. Standard konsantrasyonları 20, 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625 ng/ml’dir.



Şekil 4-3: ELİSA’da standartlardan elde edilen eğri

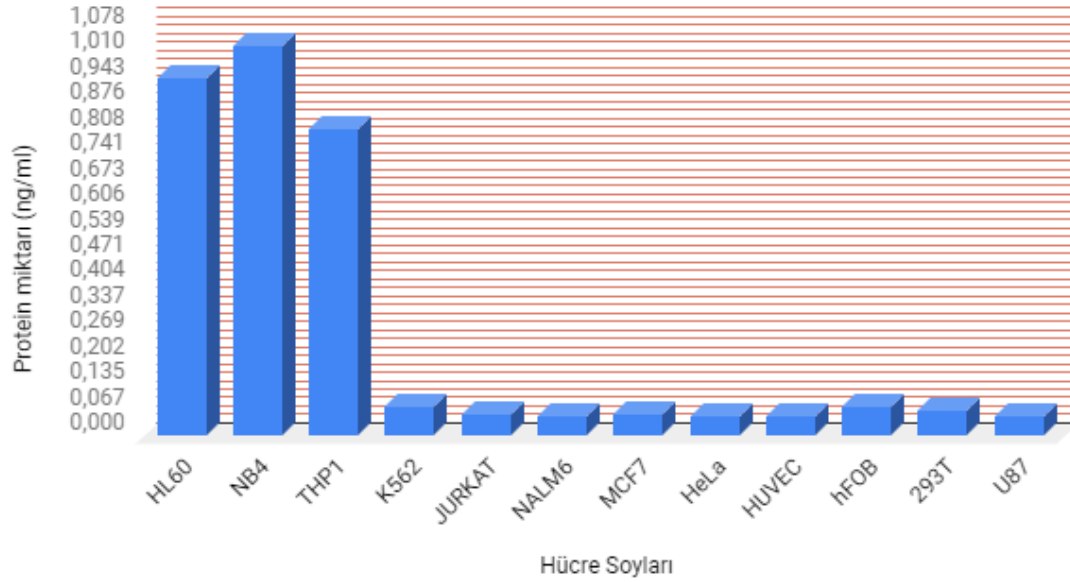
“MyBiosource Human Serine Protease Inhibitor Kazal Type 2 (SPINK2) ELİSA Kit ” kullanılarak yapılan ELİSA testinde hücre dışına salgılanan SPINK2 protein miktarı Şekil 4-7’de hücre içindeki protein miktarları Şekil 4-8’de ng/ml cinsinden verilmiştir.

HÜCRE DIŞINA SALGILANAN SPINK2 PROTEİN MİKTARI



Şekil 4-4: Hücre dışına salgılanan protein miktarı

HÜCRE İÇİNDEKİ SPINK2 PROTEİN MİKTARI



Şekil 4-5: Hücre içindeki protein miktarı

On iki hücre soyundaki SPINK2 mRNA düzeyini belirlemek için RT-RZR, hücre içinde sentezlenen ve hücre dışına salgılanan protein seviyesini tespit etmek için ise ELİSA yöntemi kullanıldı. SPINK2 mRNA, SPINK2 hücre içi protein ve SPINK2 salgılanan protein miktarları arasında ilişki olup olmadığı korelasyon testi ile belirlendi (Tablo 4-24).

Salgılanan protein ve hücre içinde bulunan protein arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulundu ($p=0,015$). Hücre içindeki protein miktarı ile SPINK2 mRNA düzeyi arasındaki ileri ileri derecede anlamlı ilişki bulundu ($p=0,00004$). SPINK2 mRNA düzeyi ile hücre dışına salgılanan protein düzeyi arasında istatistiksel olarak yine anlamlı ilişki olduğu gösterildi ($p=0,047$).

Tablo 4.24: SPINK2 mRNA, SPINK2 hücre içi protein ve SPINK2 salgılanan protein ‘Pearson korelasyon testi’ ile karşılaştırılması

		Salgılanan Protein Miktarı	Hücre İçindeki Protein Miktarı	SPINK2 mRNA Düzeyi
Salgılanan Protein Miktarı	Pearson Korelasyon Analizi	1	,681	,583
	Sonuç		,015	,047
	Hücre Soyu Sayısı	12	12	12
Hücre İçindeki Protein Miktarı	Pearson Korelasyon Analizi	,681	1	,926
	Sonuç	,015		,00004
	Hücre Soyu Sayısı	12	12	12
SPINK2 mRNA Düzeyi	Pearson Korelasyon Analizi	,583	,926	1
	Sonuç	,047	,00004	
	Hücre Soyu Sayısı	12	12	12

AML hücre soylarındaki SPINK2 mRNA ekspresyonu diğer hücre soylarıyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış bulundu ($p=0,009$). Tüm lösemi hücre soylarındaki SPINK2 ekspresyonu yine lösemi dışı hücre soylarıyla kıyaslandığında anlamlı derecede artmış bulundu ($p=0,041$). Sonuçlar Tablo 4-25 'de verilmiştir.

Tablo 4-25: Hücre soylarında SPINK2 ekspresyonlarının kıyaslanması

Spink2 ekspresyonu	Test türü	Sonuç (p değeri)	Bulgu
AML hücre soyları	Mann Whitney U testi	0,009	Anlamlı
Lösemi hücre soyları	Mann Whitney U testi	0,041	Anlamlı

SPINK2 hücre içi protein düzeyi AML hücre soylarında diğer hücre soylarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış bulundu ($p=0,009$). Hücre dışına salgılanan SPINK2 protein düzeyi ise AML hücre soylarında diğer hücre soylarıyla kıyaslandığında istatistiksel olarak farklılık bulunmadı ($p=0,282$).

Sonuçlar Tablo 4-26’da gösterilmiştir.

Tablo 4.26: Hücre soylarında hücre içi ve hücre dışı protein düzeylerinin karşılaştırılması

Spink2 ekspresyonu	Test türü	Sonuç (p değeri)	Bulgu
Hücre içi protein düzeyi	Mann Whitney U testi	0,009	Anlamlı
Hücre dışı protein düzeyi	Mann Whitney U testi	0,282	Anlamlı değil

2. TARTIŞMA

Hematopoietik kök hücreleri AML'ye teşvik eden genetik mutasyonun nedeni bilinmemekle birlikte akut lösemi gelişimi için birçok çevresel ve genetik risk faktörü tespit edilmiştir. Bunlar arasında yaş, öncül hematolojik hastalıklar ve genetik bozukluklar, virüs enfeksiyonu, radyasyon ve çeşitli kimyasallara maruz kalma gibi etmenler bulunur (47). AML, erişkinlerde en sık görülen akut lösemidir. İnsidansı yaşla beraber artmaktadır. Erişkinlerde 100.000 kişide 3,7 sıklıkla görülür. Erkeklerde kadınlara oranla daha sık rastlanmaktadır (3,4). “*National Cancer Institute*” 2010-2014 verilerine göre; son yıllarda akut miyeloid lösemi vaka oranı, her 100.000 erkek ve kadın için yılda 4.2 iken, ölüm oranı her yıl 100.000 erkek ve kadın için 2.8 olarak rapor edilmiştir (49, 50). *American Cancer Society*' nin 2015 yılı verilerine göre yaklaşık 20.830 yeni vaka tespit edilmiş ve 10.000'den fazlası ölümlle sonuçlanmıştır (16). Tanı yaşı ortalama 66 olan ve daha yaşlı AML olguları için sağkalım oranı % 10'dan azdır ve tedavi yanıtı son otuz yıl içinde önemli ölçüde değişmemiştir. Genç hastalarda remisyon oranları daha umut verici olsa da bu grupta da, hastaların remisyonunun ilk 5 yılında %50'sinde nüks görülmektedir (85).

AML heterojen bir hastalıktır, hastaların prognozu ve tedaviye cevabı farklılık göstermektedir. Hastaların sınıflandırılması için çeşitli mutasyon varlığı prognostik faktör olarak kullanılmasına rağmen halen mutasyon bulunmayan risk grubu doğru belirlenemeyen hastalar bulunmaktadır. Bu durum AML ile ilgili daha önce kullanılmamış biyobelirteçler arama ihtiyacı doğurmaktadır.

Proteaz inhibitörleri (PI) kontrol edilemeyen proteolizi önleyerek, proteaz aktivitelerinin düzenlenmesinden sorumludur. PI'ler tüm hücrelerde ve ayrıca viral genomlarda bulunan genler tarafından kodlanır. Bu genlerin bir memeli genomunun, %2-% 4' ünü oluşturduğu düşünüldüğünde biyolojik süreçlerde proteolizin önemi daha iyi anlaşılmaktadır. PI'lerin bir çok türünün hayvan zehirlerinde mevcut olması zehirli hayvanların bu proteinleri / peptidleri biyolojik hayatta kalma sürecinde kullandığını düşündürmektedir (78). Bu durum protein-proteoliz dengesinin hayatta kalmada kilit rol aldığını ve PI konsantrasyon veya işlevinde değişikliğin hücrelerde sağkalımı doğrudan etkileyebileceğini düşündürmektedir.

Proteaz inhibitörlerinin kemoterapiyle birlikte iyileşme sürecini olumlu etkileyeceği düşünülmektedir (80). Metaztaz ve anjiyogenez sürecinde proteazların aktif rol aldığı özellikle serin proteazların tümör invazyonu ve yayılmasında önemli rol aldığı bildirilmiştir. SPI'lerin ekspresyonunun artması serin proteazların aktivitesini engelleyerek, diğer tedavilerle birlikte remisyona katkı sağlayabilir.

Yeni PI'lerin karakterize edilmesine ve fizyolojik öneminin anlaşılmasına olan ilgi, kan pıhtılaşma sistemi, kompleman kaskadı, apoptoz, hücre döngüsü ve hormon işleme yolları gibi tüm yaşam süreçleri için biyolojik önemi nedeniyle artmıştır (81, 82). Bu enzimlerin düzenlenmesindeki eksiklikler veya değişiklikler, kanser, artritis, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli patolojik durumlara yol açmaktadır (83, 84).

Serin proteaz inhibitörleri (SPI), proteaz inhibitörlerinin en büyük ve en önemli süper ailesidir. Hedef proteazlarına kovalent olarak bağlanarak inaktivasyona yol açan intihar substratları olarak hareket ederler (12). SPI'ler aynı zamanda diğer moleküller ile etkileşimleri sonucunda başka fizyolojik etkilere de sahiptir ve bu etkileşimler, belirli fizyolojik cevapları güçlendirir (13,14). Memeli pıhtılaşma yolları da dahil olmak üzere birçok önemli proteolitik kaskadın kontrolünde merkezi konumdadırlar. İnhibitör olmayan işlevle de yaparlar; hormon taşıyıcı, moleküler şaperon veya tümör baskılayıcı olarak işlev gören çeşitleri vardır (89,90). SPI, kompleman aktivasyonu ve kan pıhtılaşması, fibrinoliz, inflamasyon, tümör hücre metastazı, apoptoz, yara iyileşmesi ve doku onarımı gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonları kontrol eder (91, 92). Ayrıca demans ve anjiyogenezle ilgili olduğu düşünülmektedir (96).

SPI'ler konformasyonel olarak kararsızdır ve hastalığa neden olan mutasyonlarının birçoğu yanlış katlanma veya patojenik, inaktif polimerler ile karakterizedir. Kazal tip serin proteaz inhibitörleri ailesinin üyesi olan SPINK2 akrosin-tripsin inhibitörü olarak fonksiyon göstermektedir. SPINK2 dört ekson içerir, 84 amino asitli 9.291 kDa'luk bir protein kodlar ve protein 23 kalıntı sinyal peptidi içerir.

Epididim ve seminal vezikülde ekspresyonunun yüksek olduğu ve fertilité ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (16, 17). SPINK2 ekspresyonunun, optik sinir hasarından sonra retinal ganglion hücrelerinde önemli derecede artış gösterdiği ve apoptotik

uyarılar karşı duyarlılığı arttırdığını gösterilmiştir. SPINK2 ekspresyon düzeyindeki aşırı artışın apoptozu indüklediği bildirilmiştir (19).

SPINK2 proteini daha önceki çalışmalarda, lenfomaların ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir. Lenfomada ve umbilikal cord'tan elde edilen primitif hematopoietik kök hücrelerde ve bazı lösemi hücre hatlarında yüksek seviyede eksprese edildiği gösterilmiştir. Kordon kanından elde ettikleri hematopoietik progenitör kök hücrelerde SPINK2'nin ekspresyonunun artış gösterdiği farklı çalışmalarda rapor edilmiştir (22).

Bu çalışmada, AML olgularında SPINK2 mRNA ekspresyonu analiz edildi. Analiz için AML tanısı kesinleşmiş olgulara ait RNA örnekleri kullanıldı. Ancak SPINK2 protein düzeyini belirlemek için elimizde olgulara ait kan veya plazma örneği bulunmamaktadır. Bu nedenle mRNA düzeyinde analiz edilen SPINK2'nin protein olarak ne kadar ifade edilebildiğini araştırmak amacıyla lösemi hücre soylarında (HL60, NB4 ve THP1, K562, Jurkat ve Nalm6) ve diğer bazı hücre soylarında (MCF7, HeLa, HUVEC, hFOB, 293T, U87) hem SPINK2 mRNA düzeyi, hem de hücre içi ve hücre dışına salınan protein düzeyi ELISA yöntemiyle belirlendi.

Avrupa Kanseri Araştırma ve Tedavi Örgütü (EORTC) sınıflandırmasına göre birincil kutanöz folikül merkezi hücre lenfomaları (PCFCCL) ve ikincil PCLBCL'si olmak üzere 2 tip primer kutanöz büyük B-hücreli lenfoma (PCLBCL) sınıfı vardır. Bu iki grup arasındaki fark, prognozdeki farklılıklardır. 5 yıllık sağkalım oranları sırasıyla %95' ten ve %52' den büyüktür. PCFCCLs grubu içinde, *SPINK2* transkriptinin genellikle çok yüksek ekspresyona sahip olduğu, PCLBCL de ise tüm örneklerinde çok düşük ya da hiç ekspresyon olmadığı tespit edilmiştir. Lenfomada ve umbilikal cord'tan elde edilen primitif hematopoietik kök hücrelerde ve bazı lösemi hücre hatlarında yüksek seviyede eksprese edildiği tespit edilmiştir. Kordon kanından elde edilen CD34+, CD133+ hematopoietik progenitör kök hücreleri CD34+'lerden arındırılmış hücrelerle karşılaştırdıklarında SPINK2'nin ekspresyonunun farklılık gösterdiği; CD34+, CD38-, Lin- hücreleri CD34+, CD38++, Lin++ hücrelerle karşılaştırdıklarında SPINK2 ekspresyonunda artış olduğu, bu artışın en belirgin olarak kemik iliği CD34+, CD38-, Lin- hücrelerinde olduğu farklı çalışmalarda gösterilmiştir (21,22). SPINK2 ekspresyonunun prognoz ve remisyonla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Çalışmalarda daha uzun süre sağkalım oranına sahip olgularda SPINK2 ekspresyonunun yüksek olması bu düşüncüyü

kuvvetlendirmektedir. İyi prognoz gösteren olgularda ekspresyonun yüksek olması sağkalım süresini uzatması ile ilişkili olabileceğini desteklemektedir.

Miyelodisplastik atipik bir olgunun AML'ye dönüşümü sırasında ekspresyonunun arttığı transkriptozom ve serum sitokin analizi ile tespit edilmiştir (116). Bu durum, MDS gibi öncül hematolojik hastalıklardan AML'ye dönüşüm ile ilgili markerlar arasında SPINK2'nin de bulunmasının olguya teşhis yönünde fayda sağlayabileceğini düşündürmüştür. Olgularda periyodik olarak SPINK2'nin mRNA ve protein düzeyinde ifade değişiminin analiz edilmesi, öncül hematolojik hastalıklardan AML'ye dönüşüm gerçekleşmeden ya da dönüşümün çok erken evrelerinde teşhisine olanak sağlayacağından tedavi ve sağkalımın artırılması açısından faydalı olabilir.

İnsan ve farelerde SPINK2 fertilite arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada analizler SPINK2' nin yokluğunda proteazın indüklediği stresin Golgi fragmentasyonunu başlattığını ve spermatid farklılaşma tutukluğuna yol açan akrozom biyojenezini önlediğini göstermiştir. SPINK2 yokluğu golgi tarafından oluşturulması gereken dev proakrozomal molekülün oluşumunu engelleyerek daha küçük kesecikler oluşmasına, sonuçta da golgide degradasyona ve mikrootofajiye neden olduğu gösterilmiştir. SPINK2 eksikliğinin en çarpıcı etkilerinden biri, protein işleme ve translokasyon için, özellikle membran proteinleri için önemli bir organel olan Golgi aparatının parçalanmasıdır. HEK (293T) hücrelerinde SPINK2 yokluğunda akrozin aşırı ekspresyonunun zararlı bir etkisini de gözlemlenmiştir, bu durum SPINK 2' nin akrosin inhibitörü olarak rolünü doğrularken; SPINK 2'nin ko- ekspresyonu ile hafifletilmiştir. Bu sonuçlar SPINK2' nin akrozoma karşı hücre sel geçişi sırasında proteazları nötralize etmek için gerekli olduğunu, SPINK2'nin yokluğunun, germ hücrelerinde mikrootofaji benzeri bir yol oluşturduğunu ve böylece bu hipotezi desteklediğini göstermektedir (117). Bu bulgular ışığında hücre içi proteinlerin ve membran proteinin işlenmesinde çok önemli bir role sahip olan Golginin SPINK2 azlığında zarar görmesine bağlı olarak kanserle ilgili bir çok yolağın çalışmasını ve ayrıca metaztazı etkileyebileceğini düşündürmektedir. SPINK2 azlığının AML ve diğer lösemilerde de hücrelerin farklılaşamaması ve dolaşımdaki farklılaşmamış hücre miktarının artışına neden olabileceği tahmin edilmektedir.

375.000 kişinin meta analizini içeren araştırmada SPINK2’de meydana gelen bir SNP’nin migrenle ilgili 38 lokustan biri olabileceği ortaya konulmuş, ayrıca menstrual migren ile SPINK2 deki SNP (SNP Numarası: rs1708768, SNP pozisyonu chr4:57,690,713) nin ilişkili olduğu bildirilmiştir (119). AML’de de SPINK2’deki farklı SNP’lerin hastalık gelişimi ile ilişkisi olabilir.

Bu tez çalışmasında kız çocuk 20 çocukluk çağı AML olgusu ve 70 erişkin AML olgusuna ait örnekler kullanılmıştır. Sağlıklı kontrol olarak Human Bone Marrow Total RNA havuzu (CLONTECH, USA ct no:636591) kullanılmıştır. 0-80 yaş aralığındaki asyalı kadın ve erkek sağlıklı bireylerin SPINK2 ekspresyon ortalaması 0,312 olarak tespit edilmiştir.

Değerlendirmeler sağlıklı kontrol SPINK2 ortalamalarına göre yapılmış ve AML olgularına ait örneklerle yapılan RT-PZR analizlerinde olguların %71 inde SPINK2 ekspresyonunun ortalamanın üstünde olduğu tespit edilmiştir. Erişkin AML olgularında SPINK2 ekspresyonu kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış bulunmasına ($p=0,042$) rağmen, çocukluk çağı AML olgularında kontrole göre farklılık bulunmadı ($p=0,60$). AML olgularındaki bu oranlar; çocuklar olgularda %75 iken erişkin olgularda % 70 ‘dir. Tüm olguların % 71 de SPINK2 ekspresyonu yüksek bulunmuştur. AML’li olguların çoğunda SPINK2’nin artmış olması biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşüncesini doğurmaktadır. AML de yaş ve cinsiyete bağlı teşhis ve tedavi ile ilgili SPINK2’nin olumlu katkı sağlayacağı değerlendirilmektedir. İleride daha geniş gruplarla yapılacak sağkalım analizleriyle SPINK2 ekspresyon farklılığının nedenleri prognoza ve remisyona etkisinin araştırılması düşünülmektedir. SPINK2’nin biyobelirteç olarak kullanılabileceği doğrulandığı taktirde doğrudan hasta kanlarından ya da vücut sıvılarından SPINK2 proteinin varlığı ve miktarının tespit edilmesi ile hastalığın teşhis ve tedavisine katkı sağlayabileceği düşünülebilir.

Mann Whitney U testi testi ile çocuk ve erişkin hastalarda $t(15;17)$, $t(8;21)$ ve $inv(16)$ mutasyonlarının SPINK2 ekspresyonu ile korelasyonu araştırılmış ve $t(8;21)$ ($p=0.000$) ve $inv(16)$ ($p=0.028$) ile SPINK2 arasında anlamlı bir korelasyon olduğu görülmüştür. Çocukluk çağı AML olgularında hem $t(8;21)$ ($p=0.039$) ve hem de $inv(16)$ ($p=0.015$) ile anlamlı korelasyon gösterilmiş olmasına rağmen, erişkin AML olgularında $t(8;21)$ ($p=0.000$) ile anlamlı korelasyon gösterirken ve $inv(16)$ ($p=0.244$) ile ilişkili bulunmamıştır.

SPINK2 kontrole göre yüksek ve düşük eksprese eden olgular t(8;21), t(15;17) ve inv(16) varlığına göre kıyaslandı. t(15;17) pozitif olgular için tüm bireylerin %75'inde SPINK2 ekspresyonu ortalamanın üstündedir. Bu oran çocuklarda %100, erişkinlerde %57 tir. Tüm AML olgularından t(8;21) pozitiflerin %18'inde SPINK2 ekspresyonu yüksek bulundu. Çocukluk çağı AML olgularından t(8;21) pozitiflerin %33'ünde ve erişkin AML olgularından t(8;21) pozitiflerin %12'sinde SPINK2 ekspresyonu yüksek bulundu. inv(16) pozitif tüm olgularda SPINK2 ekspresyonu yüksek bulundu.

t(8;21) pozitif olgularda SPINK2 ekspresyonu azalmış, inv(16) pozitif olgularda ise artmıştır. Bu iki translokasyon da CBF transkripsiyon faktörü ile ilişkilidir. t(8;21) translokasyonunda 21. kromozomda bulunan CBFalfa2 (AML1, RUNX1) geni 8. kromozomda bulunan ETO geni ile füzyon oluşturur. İnv(16) sonucunda ise CBFbeta ile MYH11 füzyon geni oluşmaktadır. CBFalfa ve CBFbeta alt üniteleri bir araya gelerek fonksiyonel olan CBF transkripsiyon faktörünü oluşturmaktadır. SPINK2'nin hem CBFalfa2 altünitesini ilgilendiren t(8;21) hem de CBFbeta altünitesini ilgilendiren inv(16)'lı olgularda SPINK2'nin ekspresyonun değişmesi CBF'nin normal fonksiyonunun değişimine bağlı olabileceğini düşündürür. Normal durumda SPINK2 CBF transkripsiyon faktörü tarafından düzenleniyor olabilir. İnv(16) varlığında oluşan füzyon protein SPINK2 ekspresyonunu arttırıcı ve t(8;21) sonucu oluşan füzyon protein ise SPINK2'nin ekspresyonunu azaltıcı etki gösteriyor olabilir.

Toplam 14 çocukluk çağı AML olgusunun FAB sınıfı bilinmektedir. Bu olgulardan M2'li olguların %50'sinde, M3 olan olguların % 83 ünde ve M4 olan olguların %83 ünde SPINK2 ekspresyonu artmıştır. Erişkin AML olgularından M0 olan olguların %100'ü, M1 olan olguların %75, M2 olan olguların %67, M3 olan olguların %75, M4 olan olguların %86, M5 olan olguların %100 ve M7 olan olguların %100 oranında SPINK2 ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir. FAB sınıfları ile SPINK2 ekspresyonu arasında Mann-Whitney U testi ile anlamlı bir korelasyon tespit edilememiştir ($p=0,331$).

HL60, NB4, THP1, K562, Jurkat, Nalm6 , MCF7, HeLa, HUVEC, hFOB, 293T ve U87 hücre soylarında SPINK2 ekspresyonu kantitatif RT-PZR seviyesinde

incelenmiştir. AML hücre soylarındaki SPINK2 mRNA ekspresyonu diğer hücre soylarıyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış bulundu ($p=0,009$). AML ile birlikte lösemi hücre soylarındaki SPINK2 ekspresyonu yine lösemi dışı hücre soylarıyla kıyaslandığında anlamlı derecede artmış bulundu ($p=0,041$). SPINK2 hücre içi protein düzeyi AML hücre soylarında, diğer hücre soylarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış bulundu ($p=0,009$). Hücre dışına salgılanan SPINK2 protein düzeyi ise AML hücre soylarında diğer hücre soylarıyla kıyaslandığında istatistiksel olarak farklılık bulunmadı ($p=0,282$). Daha önceden yapılmış çalışmalarda Lenfomada ve umbilikal cord'tan elde edilen primitif hematopoietik kök hücrelerde ve bazı lösemi hücre hatlarında yüksek seviyede eksprese edildiği bildirilmiştir (12,22). Sonuçlarımız bu yönden literatür ile uyumlu bulunmuştur.

AML olgularına ait serum ve protein elde edilebilecek hücre örnekleri bulunmadığı için hücre soylarında SPINK2 protein düzeyi ELİSA yöntemiyle analiz edildi. mRNA düzeyindeki farklılıkların hücre içindeki ve hücre dışına salgılanan SPINK2 protein miktarına ne kadar etki ettiğinin tespit edilmesi hedeflendi. SPINK2 mRNA düzeyi ile hücre içi protein düzeyi ve hücre dışına salgılanan protein düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulundu (sırasıyla $p=0,00004$ ve $p=0,047$). Hücre içi protein düzeyi ile salgılanan protein düzeyi arasında yine istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulundu ($p=0,015$). Hücrede mRNA transkripsiyonu sonrası (posttranskripsiyonel) ve protein sentezi sonrası (posttranslasyonel) protein düzeyi kontrol edildiği için her zaman sentezlenen mRNA protein ürüne dönüşmeyebilir veya sentezlenen proteinler işlenerek fonksiyon kazanmayabilir. SPINK2 mRNA düzeyi ile hücre içi protein düzeyi arasında güçlü bir korelasyon olması mRNA düzeyindeki değişimlerin direk protein düzeyine yansıdığını göstermektedir. Ayrıca hücre içindeki SPINK2 protein düzeyi ile salgılanan protein düzeyi arasında anlamlı korelasyon olması sentezlenen proteinlerin işlenerek, salgılandığını ve fonksiyonel olduğunu göstermektedir.

İncelenen AML olgularının %71'inde RT-PZR ile SPINK2 mRNA düzeyinin kontrole göre artmış bulunmuştur. Erişkin AML'de anlamlı düzeyde artmıştır ($p=0,042$). AML ve SPINK2 arasındaki ilişkinin çözülebilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu görülmektedir. Bu tez çalışması AML hastalarında SPINK2 ekspresyonun analiz edildiği ilk çalışma olup, bu alandaki çalışmaların başlangıcı niteliğindedir.

KAYNAKLAR

1. Houlston RS, Catovsky D, Yuille MR. Genetic susceptibility to chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. (2002);**16**:1008-1014.
2. O'Brien S, del Giglio A, Keating M. Advances in the biology and treatment of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. (1995);**85**:307-318.
3. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med*. (1985);**103**:620-625.
4. Shipley JL, Butera JN. Acute myelogenous leukemia. *Exp Hematol*. (2009);**37**:649-658
5. Shafat MS, Gnaneswaran B, Bowles KM, Rushworth SA. The bone marrow microenvironment - Home of the leukemic blasts. *Blood Rev*. (2017 Mar 12). pii: S0268-960X(16)30073-X. doi: 10.1016/j.blre.2017.03.004.
6. Özkalemkaş F. Akut lösemiler, *İç Hastalıkları Kitabı*. (2005) İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi;.
7. Sayitoğlu M, Sırma S, Özbek U. Akut lösemilerde moleküler genetik. *Türkiye Klinikleri Hematoloji Onkoloji*. (2007);**2**:9-11.
8. Rabbitts TH, Appert A, Chung G, et al. Mouse models of human chromosomal translocations and approaches to cancer therapy. *Blood Cells Mol Dis*. (2001) ;**27**:249-259.
9. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, Kantarjian HM. Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy. *Ann Intern Med*. (1999);**131**:207-219.
10. Vardiman J.W., Thiele J., Arber D.A., Brunning R.D., Borowitz M.J., Porwit A., Harris N.L., le Beau M.M., Hellstrom-Lindberg E., Tefferi 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**:937–951
11. Yerlikaya aA., Dokudur H., Protein Yıkımının Önemi, (2009), *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 35 (2) 93-99, 2009 93
12. Gettins P. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem. Rev*. (2002); **102** :4751–4803.

13. Davis AE, III, Mejia P, Lu F. Biological activities of C1 inhibitor. *Mol. Immunol.* (2008); **45** :4057–4063.
14. Jiang CJ, Hao ZY, Zeng R, Shen PH, Li JF, Wu B. Characterization of a novel serine protease inhibitor gene from a marine metagenome. *Mar Drugs.* (2011);9(9):1487-501. doi: 10.3390/md9091487. Epub 2011 Sep 5. PMID: 22131953
15. Mrozek K., Marcucci G., Paschka P., Whitman S. P. & Bloomfield C. D. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification. *Blood* (2007); **109**, 431–448.
16. Wapenaar MC, Monsuur AJ, Poell J, et al. (2007). "The SPINK gene family and celiac disease susceptibility.". *Immunogenetics.* **59** (5): 349–57.
17. Lee B., Park I., Jin S., Choi H., Kwon J. T., Kim J., Jeong J., Cho BN., Eddy EM., Cho C. Impaired spermatogenesis and fertility in mice carrying a mutation in the Spink2 gene expressed predominantly in testes. *J. Biol. Chem.* **286**: 29108-29117, (2011)
18. Moritz A., Grzeschik KH., Wingender E., Fink E. Organization and sequence of the gene encoding the human acrosin-trypsin inhibitor (HUSI-II). *Gene* **123**: 277-281, (1993).
19. Joel A. Dietz, Margaret E. Maes, Shuang Huang, Brian S. Yandell, Cassandra L. Schlamp, Angela D. Montgomery, R. Rand Allingham, Michael A. Hauser, and Robert W. Nickells. Spink2 Modulates Apoptotic Susceptibility and Is a Candidate Gene in the Rgcs1 QTL That Affects Retinal Ganglion Cell Death after Optic Nerve Damage. *PLoS One.* (2014); **9**(4): e93564.
20. Ting Chen, Tian-Ren Lee, Wei-Guang Liang, Wun-Shaing Wayne Chang and Ping-Chiang Lyu, Identification of trypsin-inhibitory site and structure determination of human SPINK2 serine proteinase inhibitor. *Proteins* (2009); **77**:209–219.
21. Hoefnagel JJ, Dijkman R, Basso K, Jansen PM, Hallermann C, Willemze R, Tensen CP, Vermeer MH. Distinct types of primary cutaneous large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Blood.* (2005 May 1);**105**(9):3671-8. Epub 2004 Aug 12,
22. He X, Gonzalez V, Tsang A, Thompson J, Tsang TC, Harris DT. Differential gene expression profiling of CD34+ CD133+ umbilical cord blood hematopoietic stem progenitor cells. *Stem Cells Dev.*(2005 Apr);**14**(2):188-98.

23. Galloway JL, Zon LI ., Ontogeny of hematopoiesis: examining the emergence of hematopoietic cells in the vertebrate embryo. *Curr Top Dev Biol.* (2003);**53**:139-58. Review. PMID: 12510667.
24. Palis J, Yoder MC., Yolk-sac hematopoiesis: the first blood cells of mouse and man *Exp Hematol.* (2001 Aug);**29**(8):927-36. Review. PMID: 11495698.
25. Orkin SH, Zon LI , Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell.* (2008 Feb) **32**(4):631-44. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.025. PMID: 18295580.
26. Jagannathan-Bogdan M and Zon L. (2013). Hematopoiesis. *Development.* **140**(12): 2463–2467.
27. de Bruijn MF, Ma X, Robin C, Ottersbach K, Sanchez MJ, Dzierzak E, Hematopoietic stem cells localize to the endothelial cell layer in the midgestation mouse aorta., *Immunity.* (2002 May);**16**(5):673-83. PMID: 12049719
28. Dzierzak E. (2005),The emergence of definitive hematopoietic stem cells in the mammal. *Curr Opin Hematol.* 2005 May;**12**(3):197-202
29. Weissman IL, Shizuru JA. *Blood.* 2008 Nov 1;**112**(9):3543-53. doi: 10.1182/blood-2008-08-078220. Review. PMID:18948588
30. Ciesla,(2007) , Hematopoiesis. Sumber : Hematology in Practice. Halaman 16, Gbr. 2.1
31. Vardiman, J.W., 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**(5): p. 937-51.
32. <http://www.iarc.fr/>.
33. Franks LM, Teich NM. Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer. 3rd ed. New York: *Oxford University Pres, Inc.*; 2001.
34. Piller, G., Leukaemia - a brief historical review from ancient times to 1950. *Br J Haematol*, 2001. **112**(2): p. 282-92.
35. Al-Lamki Z, Wali YA, Wasifuddin SM, ve ark. Identification of prognosis markers in pediatric high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol.* 2005;**22**:629-643.
36. Dohner H, Fischer K, Bentz M, ve ark. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic B-cell leukemias. *Blood.* 1995;**85**:1580-1589.

37. Dordelmann M, Schrappe M, Reiter A, et al., Down's syndrome in childhood acute lymphoblastic leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in four consecutive BFM trials. Berlin-Frankfurt-Munster Group. *Leukemia*. 1998;**12**:645-651.
38. Lanzkowsky P. Manual of Pediatric Hematology and Oncology. New York: *Churchill Livinstone*; 2000.
39. Mario C, (2016) Introduction to a review series : the 2016 revision of the WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. *Blood* . 2016 **127**:2361-2364; doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2016-03-657379>
40. Beutler E, Lichtman MA, Collier BC, Kipps TJ, Lichtman MA., Acute myelogenous leukemia. In: *Williams Hematology*, Eds: New York: McGraw-Hill Co, 1995:272-98.
41. Franks LM, Teich NM. Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer. 3rd ed. New York: *Oxford University Press*, Inc.; 2001.
42. Dündar S, Sağduyu K. (1987). Akut Lösemiler. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences* 1987;**(4)**:351-360.
43. Greer JP, Foerster J, Lukenks JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B, (2004) Head DR. Classification and differentiation of the acute leukemias. In: Wintrobe's Clinical Hematology, Eds: Philadelphia: *Lippincott Williams&Wilkins*, 2004:2063-76.
44. E.C. Steven H.Swerdlow, Nancy Lee Harris, Elaine S.Jaffe, Stefano A.Pileri, Editor. 2008, *International Agency for Research on cancer (IARC)*: Lyon. p. 18-30.
45. Ali R. Akut Lösemiler WHO Sınıflaması ve Nadir Akut Lösemi Tipleri. *Türk Hematoloji Derneği* 2006; 7-10
46. Sill H, Olipitz W, Zebisch A, Schulz E, Wolfler A. Therapy-related myeloid neoplasms: Pathobiology and clinical characteristics. *Br J Pharmacol* 2011; **162**: 792-805.
47. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. 2016; **6**(7): e441.
48. Granfeldt Østgård LS, Medeiros BC, Sengeløv H, et al. Epidemiology and Clinical Significance of Secondary and Therapy-Related Acute Myeloid Leukemia: A National Population-Based Cohort Study. *J Clin Oncol* 2015; **33**(31): 3641-9.
49. <https://www.cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/about/key-statistics.html>

50. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>
51. Hasserjian RP. Acute myeloid leukemia: advances in diagnosis and classification. *Int J Lab Hematol* 2013; **35**(3): 358-66.
52. Seiter, Karen; Jules, E Harris (20 May 2011). "Acute Myeloid Leukemia Staging". Retrieved 26 August 2011.
53. 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** :. 937–951.
54. Wandt H, Haferlach T, Thiede C, Ehninger G, (2010);WHO classification of myeloid neoplasms and leukemia *Blood* 2010 115:748-749; doi: <https://doi.org/10.1182/blood-2009-10-249664>
55. 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** : 2391-2405.
56. Shah A, Andersson TM, Rachet B, Bjorkholm M, Lambert PC. Survival and cure of acute myeloid leukaemia in England, 1971-2006: a population-based study. *Br J Haematol* 2013; **162**: 509–516.
57. Kantarjian H, O'Brien S, Cortes J, Giles F, Faderl S, Jabbour E et al. Results of intensive chemotherapy in 998 patients age 65 years or older with acute myeloid leukemia or high-risk myelodysplastic syndrome: predictive prognostic models for outcome. *Cancer* 2006; **106**: 1090–1098.
58. Dohner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Burnett AK et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010; **115**: 453–474.
59. Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2014 update on risk-stratification and management. *Am J Hematol* 2014; **89**: 1063–1081.
60. Mrozek K, Marcucci G, Nicolet D, Maharry KS, Becker H, Whitman SP et al. Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2012; **30**: 4515–4523.
61. <http://see.cancer.gov/faststats/selections.php.series=age>

62. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Dombret H, Ebert BL, Fenaux P, Larson RA, Levine RL, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz M, Sierra J, Tallman MS, Tien HF, Wei AH, Löwenberg B, Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. Bloomfield CD. *Blood*. 2017 Jan 26;**129**(4):424-447. doi: 10.1182/blood-2016-08-733196. Epub 2016 Nov 28. Review.PMID: 27895058
63. Biberoğlu N.E, (2018); Akut Miyeloid Lösemi Hastalarında Katlanmamış ya da Yanlış Katlanmış Protein Cevabının Xbp-1 Geni Üzerinden Etkisinin Araştırılması , İstanbul Üniversitesi , Sağlık Bilimleri Enstitüsü , Yüksek Lisans Tezi ,İstanbul-2018
64. Rampal R, Mascarenhas J. Pathogenesis and management of acute myeloid leukemia that has evolved from a myeloproliferative neoplasm. *Curr Opin Hematol* 2014; **21**(2): 65-71.
65. Tallarico M, Odenike O. Secondary acute myeloid leukemias arising from Philadelphia chromosome negative myeloproliferative neoplasms: pathogenesis, risk factors, and therapeutic strategies. *Curr Hematol Malig Rep* 2015; **10**(2): 112-7.
66. Deschler, B., Lübbert, M. (2006). Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer*, **107**(9), 2099-2107.
67. Kottaridis PD, Gale RE, Linch DC. Flt3 mutations and leukaemia. *Br J Haematol*. 2003;**122**:523-538
68. Frohling S, Dohner H. Disruption of C/EBPalpha function in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2004;**351**:2370-2372.
69. Meyers CA, Albitar M, Estey E. Cognitive impairment, fatigue, and cytokine levels in patients with acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. *Cancer*. 2005;**104**:788-793.
70. Grimwade D. The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2001;**14**:497-529.
71. Mrozek K, Heerema NA, Bloomfield CD. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Rev*. 2004;**18**:115-136.
72. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, ve ark. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. 1995;**9**:1783-1786.
73. Susman E. NCCN issues first guidelines for deep vein thrombosis treatment in cancer patients. *J Natl Cancer Inst*. 2006;**98**:515

74. Tallman MS, Gilliland DG, Rowe JM. Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood*. 2005;106:1154-1163
75. Kızıltaş, A.(2008). Çocukluk Çağı Akut Lösemilerde Serum Fas Ve Fas Ligand Düzeyleri ,Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Adana,2008. RENGİN TEZ
76. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Gattermann N, Germing U et al. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2010; 28: 562–569.
77. Sanman LE, Bogyo M , Activity-based profiling of proteases. *Annu Rev Biochem*. 2014;83:249-73. doi: 10.1146/annurev-biochem-060713-035352. Review. PMID:24905783
78. Hakim and Yang, J *Proteomics Bioinform* 2016, 9:4<http://dx.doi.org/10.4172/jpb.10003951>
79. Ricagno S, Caccia S, Sorrentino G, Antonini G, Bolognesi M (2009) Human neuroserpin: structure and time-dependent inhibition. *J Mol Biol* **388**: 109-121.
80. Potential Roles of Protease Inhibitors in Cancer Progression.Yang P, Li ZY, Li HQ.*Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;**16**(18):8047-52.
81. Choo YM, Lee KS, Yoon HJ, Qiu Y, Wan H, et al. (2012) Antifibrinolytic role of a bee venom serine protease inhibitor that acts as a plasmin inhibitor. *PLoS One* 7: e32269.
82. Salvador LA, Taori K, Biggs JS, Jakoncic J, Ostrov DA, et al. (2013) Potent elastase inhibitors from cyanobacteria: Structural basis and mechanisms mediating cytoprotective and anti-inflammatory effects in bronchial epithelial cells. *J Med Chem* **56**: 1276-1295.
83. Kennedy AR (1998) Chemopreventive agents: protease inhibitors. *Pharmacol Ther* **78**: 167-209.
- 84.Turk B (2006) Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov* **5**: 785-799.
85. Janciauskiene S et al , Conformational properties of serine proteinase inhibitors (serpins) confer multiple pathophysiological roles. *Biochim Biophys Acta*. (2001)
86. Di Cera E (2009) Serine proteases. *IUBMB Life* **61**: 510-515.

87. Hedstrom L (2002) Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev* **102**: 4501-4524.
88. Gary A. Silverman et al. *J. Biol. Chem.* 2001;**276**:33293-33296
89. Gettins P. Serpin structure, mechanism, and function. *Chem. Rev.* 2002; **102** :4751–4803.
90. Gettins PGW, Olson ST. Exosite determinants of serpin specificity. *J. Biol. Chem.* 2009; **284** :20441–20445.
91. Belorgey D, Hägglöf P, Karlsson-Li S, Lomas DA. Protein misfolding and the serpinopathies. *Prion*.2007; **1** :15–20.
92. Gooptu B, Lomas DA. Conformational pathology of the serpins: Themes, variations, and therapeutic strategies. *Annu. Rev. Biochem.* 2009; **78** :147–176.
93. Ahnström J, Andersson HM, Hockey V, Meng Y, McKinnon TA, et al. (2012) Identification of functionally important residues in TFPI Kunitz domain 3 required for the enhancement of its activity by protein S. *Blood* **120**: 5059-5062.
94. van Gent D, Sharp P, Morgan K, Kalsheker N (2003) Serpins: structure, function and molecular evolution. *Int J Biochem Cell Biol* **35**: 1536-1547.
95. Zhao Y, Sun W, Zhang P, Chi H, Zhang MJ, et al. (2012) Nematode sperm maturation triggered by protease involves sperm-secreted serine protease inhibitor (serpin). *Proc Natl Acad Sci USA* **109**: 1542-1547.
96. Heit C, Jackson BC, McAndrews M, Wright MW, Thompson DC, Silverman GA, Nebert DW, Vasiliou V. Update of the human and mouse SERPIN gene superfamily. *Hum Genomics*. 2013 Oct **30**;7:22. doi: 10.1186/1479-7364-7-22
97. Chen ZY, Hu YT, Yang WS, He YW, Feng J, et al. (2012) Hg, novel peptide inhibitor specific for kv1.3 channels from first scorpion kunitz-type potassium channel toxin family. *Journal of biological chemistry* **287**: 13813-13821.
98. Di Cera E (2009) Serine proteases. *IUBMB Life* **61**: 510-515.
99. Coughlin SR (2000) Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* **407**: 258-264.
100. Molinari F, Meskanaite V, Munnich A, Sonderegger P, Colleaux L (2003) Extracellular proteases and their inhibitors in genetic diseases of the central nervous system. *Hum Mol Genet* **12**: R195-R200
101. Hoogerwerf WA (2005) Pharmacological management of pancreatitis. *Curr Opin Pharmacol* **5**: 578-582

102. Kimbrell DA, Beutler B (2001) The evolution and genetics of innate immunity. *Nat Rev Genet* **2**:256–267
103. Irving JA1, Pike RN, Lesk AM, Whisstock JC. Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function. *Genome Res.* 2000 Dec;**10**(12):1845-64.
104. S. Réhault-Godbert, .M. Hincke, Molecules involved in chemical defence of the chicken egg in Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products: Egg Chemistry, *Production and Consumption*, 2011 9.4.1
105. Rawlings ND, Tolle DP, Barrett AJ (2004) Evolutionary families of peptidase inhibitors. *Biochem J* **378**: 705–716
106. .HUGO Gene Nomenclature Committee. hgnc@genenames.org
107. Pfutzer RH, Whitcomb DC (2001) SPINK1 mutations are associated with multiple phenotypes. *Pancreatology* **1**:457–460
108. Rockett JC, Patrizio P, Schmid JE et al (2004) Gene expression patterns associated with infertility in humans and rodent models. *Mutat Res* **549**:225–240
109. Norberg A, Gruber S, Angelucci F et al (2003) Identification of the bioactive peptide PEC-60 in brain. *Cell Mol Life Sci* **60**:378–381
110. Magert HJ, Standker L, Kreutzmann P et al (1999) LEKTI, a novel 15-domain type of human serine proteinase inhibitor. *J Biol Chem* **274**:21499–21502
111. Furio L, Hovnanian A. Netherton syndrome: defective kallikrein inhibition in the skin leads to skin inflammation and allergy. *Biol Chem.* 2014 Sep;**395**(9):945-58. doi: 10.1515/hsz-2014-0137. Review.PMID:25153381
112. Blumenthal MN. The role of genetics in the development of asthma and atopy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2005 Apr;**5**(2):141-5.
113. Redelfs L, Fischer J, Weber C, Wu Z, Meyer-Hoffert U. The serine protease inhibitor of Kazal-type 9 (SPINK9) is expressed in lichen simplex chronicus, actinic keratosis and squamous cell carcinoma. *Arch Dermatol Res.* 2016 Mar;**308**(2):133-7. doi: 10.1007/s00403-015-1616-5. Epub 2016 Jan 8.PMID:26746658 , 2016).
114. Ma, L., Yu, H., Ni, Z., Hu, S., Ma, W., Chu, C., Liu, Q., Zhang, Y. Spink13, an epididymis-specific gene of the Kazal-type serine protease inhibitor (SPINK) family,

- is essential for the acrosomal integrity and male fertility. *J. Biol. Chem.* **288**: 10154-10165, 2013.
115. Dietrich MA, Słowińska M, Karol H, Adamek M, Steinhagen D, Hejmej A, Bilińska B, Ciereszko A. Serine protease inhibitor Kazal-type 2 is expressed in the male reproductive tract of carp with a possible role in antimicrobial protection. *Fish Shellfish Immunol.* 2017 Jan; **60**:150-163. doi: 10.1016/j.fsi.2016.11.041. Epub 2016 Nov 17. PMID:27867114
 116. Mahadevan D¹, DiMento J, Croce KD, Riley C, George B, Fuchs D, Mathews T, Wilson C, Lobell M. Transcriptosome and Serum Cytokine Profiling of An Atypical Case Of Myelodysplastic Syndrome with Progression To Acute Myelogenous Leukemia. *Am J Hematol.* 2006 Oct;**81**(10):779-86.
 117. Kherraf ZE, Christou-Kent M, Karaouzene T, Amiri-Yekta A, Martinez G, Vargas AS, Lambert E, Borel C, Dorphin B, Aknin-Seifer I, Mitchell MJ, Metzler-Guillemain C, Escoffier J, Nef S, Grepillat M, Thierry-Mieg N, Satre V, Bailly M, Boitrelle F, Pernet-Gallay K, Hennebicq S, Fauré J, Bottari SP, Coutton C, Ray PF, Arnoult C. SPINK2 deficiency causes infertility by inducing sperm defects in heterozygotes and azoospermia in homozygotes. *EMBO Mol Med.* 2017 Aug;**9**(8):1132-1149. doi: 10.15252/emmm.201607461.PMID:28554943
 118. Amal Robay, Saleha Abbasi, Ammira Akil, Haitham El-Bardisi, Mohamed Arafa, Ronald G. Crystal, Khalid A. A systematic review on the genetics of male infertility in the era of next-generation sequencing *Fakhro Arab J Urol.* 2018 Mar; **16**(1): 53–64. Published online 2018 Feb 14. doi: 10.1016/j.aju.2017.12.003 PMCID: PMC5922186
 119. E. Pollock, Heidi G. Sutherland, Bridget H. Maher, Rodney A. Lea, Larisa M. Haupt, Alison Frith, E. Anne MacGregor, Lyn R. Griffiths J Headache The *NRP1* migraine risk variant shows evidence of association with menstrual migraine *Charmaine Pain.* 2018; 19(1): 31. Published online 2018 Apr 18. doi: 10.1186/s10194-018-0857-PMCID: PMC5906416
 120. Jennifer S. Myers, Ariana K. von Lersner, Charles J. Robbins, Differentially Expressed Genes and Signature Pathways of Human Prostate Cancer Qing-Xiang Amy Sang *PLoS One.* 2015; 10(12): e0145322. Published online 2015 Dec 18. doi: 10.1371/journal.pone.0145322 PMCID: PMC4687717

121. Molecule of the Month of May 2004 Molecule of the Month by David S. Goodsell
translated by Mauro Tonellat PDB (Protein Data Bank)
122. www.ensembl.org
123. Lanotte M, Martin-Thouvenin V, Najman S, Balerini P, Valensi F, and Berger R.
NB4, a Maturation Inducible Cell Line With t(15;17) Marker Isolated From a Human
Acute Promyelocytic Leukemia (M3). *Blood*, Vol77, No 5 (March 1). 1991:1080-
1086).

FORMLAR

GENETİK TANI AMAÇLI BAŞVURAN HASTALAR İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

Burada attığım imza ile genetik testlerimin yapılması, materyalimin saklanması ve gereği halinde kimlik bilgilerim saklı kalmak koşulu ile elde edilen verilerin İ.Ü. DETAE Genetik AD tarafından organize edilen veya desteklenen bilimsel çalışmalarda kullanılmasını kabul ediyorum ve bu onayı verirken aşağıdaki bilgileri okuduğumu, anladığımı ve kabul ettiğimi de tasdik ediyorum.

(Bu belge 1 sayfadan oluşmaktadır)

NOT:

Zihinsel özürlü kişiler, bilinci kapalı olanlar ve reşit olmayan çocuklar için bu belge velisi veya vasisi tarafından doldurulacaktır. Kararınızdan önce aşağıdaki bilgileri lütfen okuyunuz.

Formu Okuyup İmzalayan Kişinin;

Adı ve Soyadı:

Hastaya Yakınlık Derecesi:

İletişim Bilgileri:

Tarih:

İmza:

Bilgilendiren Kişinin;

Adı ve Soyadı:

Tarih:

İmza

1. Kolunuzdan 10 (1 tüp) ml. kan alınması gerekmektedir. Bu kandan, DNA/RNA/ hücre elde edilecektir. Bu aşamada başarısız olduğunda bir kez daha kan vermeniz istenebilir. Kan alma işlemi ile ilgili riskler arasında bayılma, ağrı ve/veya kan alma bölgesinde morarma sayılabilir. Ender durumlarda iğne deliğinin yerinde enfeksiyon ya da küçük bir kan pıhtısı olabilir. Olası bir soruna karşı gerekli tedbirler tarafımızdan alınacaktır.

2.Tanı örneğiniz bölümümüze ulaştıktan sonra kayıt edilip, numaralandırılarak, kişisel bilgileriniz gizli tutulacak şekilde saklanmaktadır. Örneğin tanı amaçlı kullanımını;

Kabul ediyorum ☐

Kabul etmiyorum ☐

3. Alınan biyolojik örneklerden DNA/RNA/hücre materyaliniz izole edilerek saklanacaktır. Oluşturulan bu arşivde kişi isimleri kullanılmayacak, örnekler numaralı olarak korunacaktır.

4. Tanı örneğinizde istenen tetkikler tamamlandıktan ve yasal süre boyunca saklanacak şekilde arşivlenecektir. Tanı amaçlı yapılan analizler raporlandıktan sonra artan materyal hastalıkların genetiğini aydınlatmak ve tedaviye yönelik yeni hedeflerin belirlenmesini amaçlayan ve DETAE’de gerçekleştirilen bilimsel araştırma projelerinde kullanılabilir. Örneğinizin bilimsel çalışmalara dahil edilmesini

Kabul ediyorum ☐

Kabul etmiyorum ☐

5. Çalışma sonucunda tedaviye yönelik bir cevap elde edilmeyebilir. Ancak arzu ederseniz kişisel bulgularınıza ulaşma hakkına sahipsiniz. Örneğimde belirlenen bulguları öğrenmek

İstiyorum ☐

İstemiyorum ☐

6. Elde edilen genetik bilgiler şifre korumalı bir bilgisayar programında korunacaktır. Kişisel ve tıbbi bilgileriniz işyeri, eğitim kurumu ve sigorta şirketi gibi üçüncü şahıslara aktarılmayacaktır.

7. Araştırma sırasında genetik test sonuçlarının sizi ve ailenizi psikolojik veya diğer bir yönden etkileyeceğini düşünmeniz durumunda, araştırmadan isteğiniz üzere ayrılabilirsiniz.

8. Bu çalışmada sizden maddi bir beklentimiz olmadığı gibi size maddi bir katkısı da olmayacaktır.

9. Bu çalışmaya katılmayı reddedebilir ya da herhangi bir aşamada vazgeçebilirsiniz. Bu talebiniz, gelecekteki takip ve tedaviniz üzerine olumsuz etkisi olmayacaktır.
10. Gönüllü rızasına bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma harici bırakılabilirsiniz.



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi



Konu: Yürürlüğe Giren Proje Öneriniz

Tarih
15.09.2017

Sayın Doç.Dr. Sema SİRMA EKMEKÇİ

Aşağıda bilgileri özetlenen proje önerinize yönelik değerlendirme süreci tamamlanmış ve BAP Komisyonu tarafından desteklenmesi uygun görülen projeniz, proje sözleşmesinin Rektörlük Makamı tarafından onaylanmasıyla yürürlüğe girmiş bulunmaktadır.

Tebrik eder, çalışmalarınızda başarılar dilerim.

Saygılarımla,

Prof.Dr. Ahmet YEŞİL
Koordinatör

Proje Başlığı: AKUT MİYELOİD LÖSEMİDE SPINK 2 EXPRESYONUNUN ARAŞTIRILMASI

Proje No: TYL-2017-26523

Proje Türü: Y.Lisans

Süresi: 12 ay

Başlama Tarihi: 15.09.2017

Onaylanan Bütçesi: 6.999,06 TL

Proje Yürütücüsü: Doç.Dr. Sema SİRMA EKMEKÇİ

Araştırmacı(lar): SÜMBÜL GEZER

ETİK KURUL KARARI



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU**



Sayı : 537

Tarih : 24.05.2017

Konu: Doç. Dr. Sema Sırma EKMEKÇİ hk.

**Sayın Doç. Dr. Sema Sırma EKMEKÇİ
Genetik**

İlgi : Genetik Anabilim Dalının 19/04/2017 gün ve 150450 sayılı yazısı

Sorumlu araştırmacılığını üstlendiğiniz ve Dr. Sümbül GEZER' in yürüteceği 2017/438 dosya numaralı "Akut Miyeloid Lösemide Spink 2 Ekspresyonunun Araştırılması" başlıklı çalışma kurulumuzun 12/05/2017 gün ve 09 sayılı toplantısında görüşülerek etik yönden uygun bulunmuş olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. A.Yağız ÜRESİN

**İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar
Etik Kurul Başkanı**

Eki: İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Araştırmaları Etik Kurulu Karar Formu

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI**AKUT MİYELOİD LÖSEMİDE SPINK2 GEN İFADESİNİN
ARAŞTIRILMASI**

ORIJINALLIK RAPORU

%13

BENZERLİK ENDEKSİ

%9İNTERNET
KAYNAKLARI**%6**

YAYINLAR

%6

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	SÜMBÜL	Soyadı	GEZER
Doğ.Yeri	İSTANBUL	Doğ.Tar.	10.05.1979
Uyruğu	T.C	TC Kim No	33577743100
Email	Sumbulgezer34@gmail.com	Tel	05357288773

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ, FEN FAKÜLTESİ, BİYOLOJİ BÖLÜMÜ	2000
Lise	EYÜP ALİBEYKÖY LİSESİ	1995

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	A SINIFI İŞ GÜVENLİĞİ UZMANI	AKADEMİK OSGB	2015-2017
2.	BİYOLOJİ ÖĞRETMENİ	KÜLTÜR DERSANELERİ	2000-2010
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İNGİLİZCE	İYİ	ORTA	ORTA		

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	71,14318	69,96757	64,70814
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

