

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

**NÖROFİBROMATOZİS TİP1
İLE İLİŞKİLİ
TÜMÖRLERDE
KORONİN 1A İFADESİNİN
BELİRLENMESİ**

Güzen HOŞGÖR

Tıbbi Biyoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2012

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

**NÖROFİBROMATOZİS TİP1
İLE İLİŞKİLİ
TÜMÖRLERDE
KORONİN 1A İFADESİNİN
BELİRLENMESİ**

Güzen HOŞGÖR

Tıbbi Biyoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Şükriye AYTER

ANKARA

2012

Anabilim Dalı: TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Program: TIBBİ BİYOLOJİ

Tez Başlığı: NÖROFİBROMATOZİS TİP 1 İLE İLİŞKİLİ TÜMÖR
DOKULARINDA KORONİN 1A İFADESİNİN BELİRLENMESİ

Öğrenci Adı-Soyadı: GÜZEN HOŞGÖR

Savunma Sınavı Tarihi: 11.10.2012

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı/ Tez danışmanı:

Prof. Dr. Şükriye AYTER

Hacettepe Üniversitesi



Üye:

Prof. Dr. Figen SÖYLEMEZOĞLU

Hacettepe Üniversitesi



Üye:

Prof. Dr. Nuhan PURALI

Hacettepe Üniversitesi



Üye:

Doç. Dr. Çetin KOCAEFE

Hacettepe Üniversitesi



Üye:

Yrd. Doç. Dr. Banu PEYNERCİOĞLU

Hacettepe Üniversitesi



ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ersin FADILLIOĞLU

Müdür

TEŐEKKÖR

Yüksek lisans öğrenimim ve bu tezin hazırlanmasında süresince gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı çok değerli hocam Prof. Dr. Şükriye AYTER'e ve Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı akademik ve idari personeline teşekkür ederim.

Bu çalışma boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen başta Parisa SHARAFİ olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.

Tüm eğitim hayatım boyunca benden maddi manevi hiçbir yardımı esirgemeyen, Annem Halime HOŞGÖR'e, Ablalarım Aslıhan KORTAK'a , ÖZLEM ÖZDEMİR'e ve her zaman yanımda olan biricik babam Raif Necdet HOŞGÖR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Hoşgör G., Nörofibromatozis Tip 1 İle İlişkili Tümörlerde Koronin 1A İfadesinin Belirlenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2012. Nörofibromatozis Tip 1, deride pigmentasyon bozuklukları, iskelet ve kardiovasküler sistemlerin tutulumlarının yanı sıra sinir sisteminde tümörleşmeye yatkınlıkla karakterize otozomal dominant kalıtılan bir hastalıktır. *Nf1* gen ürünü nörofibromin hücre çoğalması, farklılaşması ve morfogenezini kontrol eden Ras sinyal yolağının negatif düzenleyicisidir. Nörofibromin mutant ise Ras hiperaktiftir ve Ras proteini etkileştiği diğer proteinleri sürekli uyarır. Bu değişiklikler sonucu hücreler kontrolsüz çoğalmaya itilir. Hastalığın karakteristik özelliklerinden biri nörofibromlardır. Dermal ve Pleksiform olmak üzere başlıca iki tip nörofibrom vardır. Nörofibromlar farklı hücre türleri içeren heterojen dokular olmakla beraber bu dokuda bulunan *Nf-/-* Schwann hücrelerinin tümör oluşumundan sorumlu olduğu bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda Koronin protein ailesinin çeşitli tümörlerin oluşumunda rol oynadığı gösterilmiştir. Bu çalışmada Koronin 1A proteininin NF1 ile ilişkili tümörlerdeki ifadesi araştırılmıştır. Bu amaçla nörofibromlardaki Koronin 1A ifade düzeyi ve yerleşimi belirlenmiş ve nörofibromların major hücre grubu insan normal Schwann hücreleri ile karşılaştırılmıştır. Nörofibromlar ve Schwann hücre ifade analizleri karşılaştırılığında; nörofibromlarda Koronin 1A ifadesinde 4,42-57,28 kat, S100 ifadesinde 145,42 – 785,85 kat artış gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Nörofibromatozis Tip 1, Nörofibrom, Koronin 1A, S100

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Kurumunca (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir (111S262).

ABSTRACT

HOŞGÖR G., Detection of Coronin 1A Expression in NF 1 Associated Tumors. Hacettepe University Institute of Health Sciences, MSc. Thesis in Medical Biology, Ankara, 2012. Neurofibromatosis Type 1 (NF1) is an autosomal dominant disorder characterized by pigmentation abnormalities, failure of skeleton and cardiovascular system with predisposition of tumorigenesis. *Nf1* gene product neurofibromin is a negative regulator of Ras protein that controls cell proliferation, differentiation and morphogenesis. Mutant neurofibromin will hyperactivate Ras and stimulate cell proliferation and tumor formation. Neurofibromas, the characteristic features of the disease, have dermal and plexiform types. Neurofibromas are heterogenous according to cell types, but it is known that *Nf1* -/- Schwann cells are responsible for tumorigenic progression. In recent studies Coronin protein family is shown to play a role in various types of tumor progression. In this study, we investigated the expression of Coronin 1A on NF1 related tumors. For this purpose, the expression level and localization of Coronin 1A in neurofibromas detected and compared with the human normal Schwann cells which are predominant cell population of the neurofibromas. When expression analysis of neurofibromas and human normal Schwann cells compared; 4,42-57,28 fold increase in Coronin 1A, and 145,42 – 785,85 fold increase in S100 expression has been detected in neurofibromas

Key Words: Neurofibromatosis Type 1, Neurofibroma, Coronin 1A, S100

This study was supported by The Scientific and Technological Research Council of Turkey (TÜBİTAK) (111S262).

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|---|-------|
| ONAY SAYFASI | III |
| TEŞEKKÜR | IV |
| ÖZET | V |
| ABSTACT | VI |
| İÇİNDEKİLER | VII |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | IX |
| ŞEKİLLER | X |
| TABLOLAR | XII |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİ | 3 |
| 2.1. Nörofibromatosis Tip1 | 3 |
| 2.2. <i>Nf1</i> Geni ve Nörofibromin | 4 |
| 2.3. Nörofibrom ve Oluşumu | 4 |
| 2.3.1. Dermal Nörofibrom | 8 |
| 2.3.2. Pleksiform Nörofibrom | 8 |
| 2.3.3. Astrositom | 8 |
| 2.3.4. Malin Periferik Sinir Kılıfı Tümörü | 9 |
| 2.4. NF1’de Rol Oynayabilecek Aktin ile ilişkili Proteinler | 10 |
| 2.4.1. ARP 2/3 | 10 |
| 2.4.2. Kofilin | 11 |
| 2.4.3. Koronin protein ailesi ve Koronin 1A | 12 |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM | 17 |
| 3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Gereçler ve Çözeltiler | 17 |
| 3.1.1. Hücre kültürü malzemeleri | 17 |
| 3.1.2. İmmünfloresan Boyama malzemeleri | 18 |
| 3.1.3. RNA izolasyonu malzemeleri | 18 |
| 3.1.4. RNA kalite kontrol jeli | 19 |
| 3.1.5. cDNA sentezi | 19 |
| 3.1.6. Gerçek Zamanlı (Real Time) PZR malzemeleri | 19 |
| 3.1.7. Agaroz Jel Elektroforezi Malzemeleri | 20 |

| | |
|--|----|
| 3.2. Çalışmada Kullanılan Yöntemler | 21 |
| 3.2.1. Normal Schwann Hücresinin Elde Edilmesi | 21 |
| 3.2.2. Normal Schwann Hücrelerinin Üretilmesi | 21 |
| 3.2.3. Schwann Hücrenin Üretileceği Kültür Kabı Yüzeylerinin Kaplanması İşlemi | 21 |
| 3.2.4. Schwann Hücrelerinin Pasajlanması | 22 |
| 3.2.5. Hemositometrede Hücre Sayımı | 23 |
| 3.2.6. Hücre Dondurulması | 23 |
| 3.2.7. NF1 Tümör Dokusunun Elde Edilmesi | 23 |
| 3.2.8. Taze Dondurulmuş Doku Kesiti | 24 |
| 3.2.9. İmmü floresan Boyama | 24 |
| 3.2.10. Mikoplazma Boyaması | 26 |
| 3.2.11. RNA İzolasyonu | 27 |
| 3.2.12. Agaroz Jel İle RNA Kalite Kontrolü | 28 |
| 3.2.13. cDNA Sentezi | 29 |
| 3.2.14. Gerçek zamanlı (Real Time) PZR | 30 |
| 3.2.15. Agaroz Jel Elektrofrezisi | 30 |
| 4. BULGULAR | 31 |
| 4.1. Schwann Hücrelerinin Üretilmesi | 31 |
| 4.2. Schwann Hücre Kültüründe ve Nörofibrom Dokusunda Koronin 1A Geninin İfadesinin Nicel Analizi | 32 |
| 4.3. Schwann Hücrelerinde Koronin 1A'nın Varlığı ve Yerleşimi | 38 |
| 4.4. Nörofibrom Dokusundaki Schwann Hücrelerinde Koronin 1A'nın Varlığı ve Yerleşimi | 39 |
| 4.4.A. Hasta 1 | 40 |
| 4.4.B. Hasta 2 | 41 |
| 4.4.C. Hasta 3 | 42 |
| 5. TARTIŞMA | 45 |
| 6. SONUÇ VE ÖNERİLER | 49 |
| KAYNAKLAR | 50 |
| EKLER-ETİK KURUL RAPORU | 57 |

KISALTMALAR

| | |
|----------------------|---|
| ADF | Actin Depolymerizing Factor |
| ALL | Acute Lymphoblastic Leukemia |
| ARP2/3 | Actin Related Protein 2/3 |
| cAMP | Cyclic Adenosine Monophosphate |
| CRMP-2 | Collapsin Response Mediator Protein 2 |
| DEPC | Diethylpyrocarbonate |
| EtBr | Ethidium Bromide |
| EVI2A | Ecotropic Viral Integration Site 2A |
| EVI2B | Ecotropic Viral Integration Site 2B |
| GAP | GTPase Activating Protein |
| GRD | GTPase activating protein)-Related Domain (GRD) |
| GTP | Guanosine Triphosphate |
| JML | Juvenile Myelomonocytic Leukemia |
| LOH | Loss of Heterozygosity |
| MPNST | Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors |
| Na ₂ EDTA | Ethylenediaminetetraacetic acid disodium |
| NCoR | Nuclear Receptor Co-repressor |
| NF1 | Neurofibromatosis type I |
| OMGP | Oligodendrocyte-Myelin Glycoprotein |
| PKC | Protein Kinase C |
| SKP | Skin-Derived Precursor |
| TAE | Tris-acetate-EDTA |

ŞEKİLLER

| | Sayfa |
|---|-------|
| 2.3.A. Normal sinir kılıfı ile nörofibromun karşılaştırılması | 5 |
| 2.3.B. Nörofibrom oluşumu | 6 |
| 2.3.C. Schwann hücrelerinin gelişimi | 7 |
| 2.3.4. MPNST oluşumu | 9 |
| 2.4.1. Koronin 1A'nın ARP2/3 kompleksi ve Kofilin üzerindeki etkisi. | 11 |
| 2.4.2. Kofilin proteininin yapısı | 11 |
| 2.4.3.A. Korunmuş Koronin protein ailesinin filogenetik ağacı | 12 |
| 2.4.3.B. Koronin proteininin yapısı | 13 |
| A) Koronin proteininin β -tabakalı pervane ve C-terminalde "coiled-coil" bölgesi | |
| B) Koronin 1A proteininin oluşturulmuş 3 boyutlu yapısı | |
| 2.4.3.C. Koronin grubundaki Koroninlerin yapısının şematik olarak gösterilmesi | 15 |
| 4.1. İnsan normal Schwann hücrelerinin kültür kabındaki görüntüsü | 31 |
| 4.2.A. Nörofibrom dokusundan elde edilen RNA'ların MOPS jelde kalite kontrolü | 32 |
| 4.2.B. Koronin 1A erime eğrisi | 33 |
| 4.2.C. Koronin 1A amplifikasyon eğrisi | 33 |
| 4.2.D. Koronin 1A standart eğrisi | 34 |
| 4.2.E. Normal Schwann hücrelerinin cDNA sının Koronin 1A primerleri ile RT-PCR'nın agaroz jel elektroforezi görüntüsü | 34 |
| 4.2.F. β -aktin erime eğrisi | 35 |
| 4.2.G. β -aktin amplifikasyon eğrisi | 35 |
| 4.2.H. β -aktin standart eğrisi | 36 |
| 4.2.I. Nörofibrom dokusunun cDNA'sının β -aktin primerleri ile RT-PCR'nın agaroz jel elektroforezi görüntüsü | 36 |
| 4.2.J. S100 erime eğrisi | 37 |

| | | |
|--------|---|----|
| 4.2.K. | S100 amplifikasyon eğrisi | 37 |
| 4.2.L. | S100 standart eğrisi | 38 |
| 4.2.M. | Nörofibrom dokusunun cDNAsının S100 primerleri ile RT-PCR'nın agaroz jel elektroforezi görüntüsü | 38 |
| 4.2.N. | Koronin 1A ifade analizi | 39 |
| 4.2.O. | S100 ifade analizi | 39 |
| 4.2.P. | S100 ve Koronin 1A korele artış grafiği | 40 |
| 4.3. | İnsan Schwann hücrelerinin immünfloresan boyaması | 41 |
| | A) Mavi nükleer DAPI | |
| | B) Koronin 1A ile zayıf granüler boyanma | |
| | C) S100 ile Schwann hücreleri | |
| | D) Çakıştırılmış | |
| 4.4.A. | Hasta 1- İnsan nörofibrom tümör dokusunun (1.örnek) immünfloresan boyaması ve ifade analizi ile yorumlanması | 42 |
| | A) Mavi nükleer DAPI | |
| | B) Koronin 1A ile zayıf granüler boyanma | |
| | C) S100 ile Schwann hücreleri | |
| | D) Çakıştırılmış | |
| 4.4.B. | Hasta 2-İnsan nörofibrom tümör dokusunun (2.örnek) immünfloresan boyaması ve ifade analizi ile yorumlanması | 43 |
| | A) Mavi nükleer DAPI | |
| | B) Koronin 1A ile zayıf granüler boyanma | |
| | C) S100 ile Schwann hücreleri | |
| | D) Çakıştırılmış | |
| 4.4.C. | Hasta 3-İnsan pilositik astrositom dokusunun (3.örnek) immünfloresan boyaması ve ifade analizi ile yorumlanması | 44 |
| | A) Mavi nükleer DAPI | |
| | B) Koronin 1A ile zayıf granüler boyanma | |
| | C) S100 ile Schwann hücreleri | |
| | D) Çakıştırılmış | |

TABLÖLAR

| | Sayfa |
|---|-------|
| 2.1. NF1 klinik tanı kriterleri | 3 |
| 2.4.3. Koronin proteini ailesi üyeleri ve görevleri | 14 |
| 3.2.7. Elde edilen NF1 tümör dokuları | 23 |
| 3.2.9. Çalışmada kullanılan birincil antikorların özellikleri | 25 |

1. GİRİŞ

Nörofibromatozis Tip 1, görülme sıklığı 1/3500 olan, deride pigmentasyon bozuklukları (“Café-au-lait” lekeler, koltuk altı ve kasık bölgelerinde çillenme), iskelet ve kardiyovasküler sistem bozuklukları (skolyoz, hipertansiyon), Lisch nodülü, sinir sisteminde tümörleşmeye yatkınlıkla karakterize, otozomal dominant kalıtılan bir hastalıktır (1,2). Merkezi sinir sistemi (optik gliom) ve periferik sinir sisteminde (nörofibrom) tümörleşmeye sebep olduğu için kansere yatkınlık sendromu olarak da adlandırılır. NF1 hastalarında *Nf1* geninin bir allelindeki mutasyona ek olarak ikinci bir mutasyon sonucu sağlıklı allelin kaybı tümör oluşumuna sebep olur (LOH).

Nörofibromatozis Tip 1 gen ürünü nörofibrominin GTPaz aktive edici bölgesi RAS ile etkileşir. Nörofibromin hücre çoğalması, farklılaşması ve morfogenezini kontrol eden Ras sinyal yolağının negatif regülatörü olması nedeniyle tümör baskılayıcı protein olarak adlandırılır. Nörofibrominin bulunmadığı ya da mutant olduğu durumlarda Ras sinyal yolağı tarafından kontrol edilen diğer proteinlerin işlevleri değişir (3-6).

NF1 hastalığının karakteristik bulgularından biri periferik sinir sistemini tutan nörofibromlardır. Nörofibromlar Schwann, perinöral, mast hücreleri, nöron ve fibroblastlardan oluşan heterojen dokular olmakla birlikte ana bileşeni Schwann hücreleridir (5,7). NF1 hastalarında beyin ve spinal kanal tümör gelişim riski, normal topluma göre 40 kat, optik glioma gelişme riski 1000 kat, yumuşak doku sarkomları riski 50 kat, juvenil miyelomonositik lösemi (JML) gelişme riski 200 kat, akut lenfoblastik lösemi (ALL) riski ise beş kat artmıştır (6). NF1 patogenezinde sinir hücrelerinin aşırı dallanıp büyümesinden yola çıkarak hücre iskeletinde ve morfogenezinde etkili olan proteinlerin ifadesinin ve bu ifadeyi etkileyen faktörlerin klinik tabloyu değiştirebileceği ileri sürülmektedir.

NF1 zemininde gelişmiş tümör dokularında farklılık gösteren proteinlerden bir kısmı nörofibromin ile doğrudan etkileşirken diğer bir kısmı Ras sinyal yolağının elemanları ya da onların düzenlediği proteinlerle etkileşir. Bunlardan CRMP-2

(Collapsin Response Mediator Protein 2) ve Kofilin aktivitesi, Rho kinaz tarafından, Koronin 1A ve 1B ise PKC (Protein Kinase C) tarafından fosforilasyonla düzenlenmektedir (8).

Literatürdeki kanser dokuları çalışmaları Koronin 1A'nın Ras sinyal yolağı hastalığı olan NF1 ile ilişkili kanser türlerinde de etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Tez çalışması sırasında, Koronin 1A'nın varlığı, yerleşimi ve ifadesi normal Schwann hücrelerinde ve NF1 ilişkili tümörlerde araştırıldı ve tümör oluşumundaki rolü açısından değerlendirildi.

Çalışmamızda öncelikle Schwann hücre kültüründe ve dondurulmuş tümör dokusundan alınmış kesitlerde Koronin 1A proteininin varlığı ve yerleşimi immünfloresan boyama yöntemi kullanılarak gösterildi.

Schwann hücre kültürlerinde ve doku kesitlerindeki varlığı gösterilen Koronin 1A'nın ifade düzeyi Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi kullanılarak belirlendi.

Hücre iskeleti proteinleriyle ilişkili olduğu bilinen ve farklı kanser tiplerinde rolü olduğu gösterilen Koronin 1A'nın NF1 ilişkili tümörlerdeki durumunun ortaya konması tümör dokusunun gelişiminin anlaşılmasına katkısı olacaktır.

2. GENEL BİLGİ

2. 1. Nörofibromatozis Tip1

Nörofibromatozis Tip 1 (NF1: MIM # 162.200) insan sinir sistemini etkileyen hastalıklar içerisinde ensık gözlenen tek gen hastalığıdır. Nörofibromatozis Tip 1 (NF1, diğer adı da Von Recklinghausen hastalığı), görölme sıklığı 1/3500 olan, deride pigmentasyon bozuklukları (“Café-au-lait” lekeler, koltuk altı ve kasık bölgelerinde çillenme), iskelet ve kardiyovasküler sistem bozuklukları (skolyoz, hipertansiyon), Lisch nodülü, sinir sisteminde tümörleşmeye yatkınlıkla karakterize, otozomal dominant kalıtılan bir hastalıktır. Merkezi sinir sistemi (optik gliom) ve periferik sinir sisteminde (nörofibrom) tümörleşmeye sebep olduğu için kansere yatkınlık sendromu olarak da adlandırılır. *Nf1* geninde oluşın mutasyonlar ile *Nf1* gen ürünü olan nörofibrominin yapısı değişir ve NF1 hastalığı ortaya çıkar. NF1 hastalarında *Nf1* geninin bir allelindeki mutasyona ek olarak ikinci bir mutasyon sonucu sağlıklı allelin kaybı tümör oluşumuna sebep olur. Nörofibromatozis 1 geni, nörofibromin olarak adlandırılan, GTPazı-aktive eden bir proteini (GAP) kodlar. Sitoplazmik bir protein olan nörofibromin, sinir sisteminde yüksek miktarda bulunan tümör baskılayıcı proteindir (1,2,3,7,9).

NF1 Klinik Tanı Kriterleri

2 ya da daha fazla kriterin varlığı tanı belirleyicidir (4).

(*NIH consensus development conference 1988*)

Tablo 2.1. NF1 klinik tanı kriterleri

| |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">○ 6 veya daha fazla <i>café au lait</i> lekesi<ul style="list-style-type: none">➤ Çocuklarda çapı >0.5 cm➤ Erişkinlerde çapı >1.5 cm |
| <ul style="list-style-type: none">○ 2 veya daha fazla sayıda kütanöz/subkütan nörofibrom ya da 1 tane pleksiform nörofibrom |
| <ul style="list-style-type: none">○ Aksiler veya inguinal çillenme |
| <ul style="list-style-type: none">○ Optik gliom |
| <ul style="list-style-type: none">○ 2 veya daha fazla Lisch nodülü (iris hamartomu) |
| <ul style="list-style-type: none">○ Kemik lezyonları<ul style="list-style-type: none">➤ Sfenoid kemik displazisi➤ Uzun kemiklerde deformateler +/- psödoartroz |
| <ul style="list-style-type: none">○ NF1 tanısı almış birinci derece akraba |

2. 2. *Nf1* Geni ve Nörofibromin

Nörofibromatozis Tip 1 geni 17. kromozomun uzun kolunda perisentrik bölgededir (17q 11,2), 350 kb boyutunda 60 ekzondan oluşur ve 1990'da klonlanmıştır. Tam uzunluktaki mRNA'sı 11-13 kilobazdır ve ekzon 9a, 10a-2, 23a, 48a'da olmak üzere dört farklı alternatif mRNA'sı vardır(4,7,10). *Nf1* geni, intron 27b bölgesinde OMGP (“Oligodendrocyte-myelin Glycoprotein”), EVI2A (“Ecotropic Viral Integration Site 2A”) ve EVI2B (“Ecotropic Viral Integration Site 2B”) olarak adlandırılan ve ters yönde ifade edilen üç gen taşır (9,10).

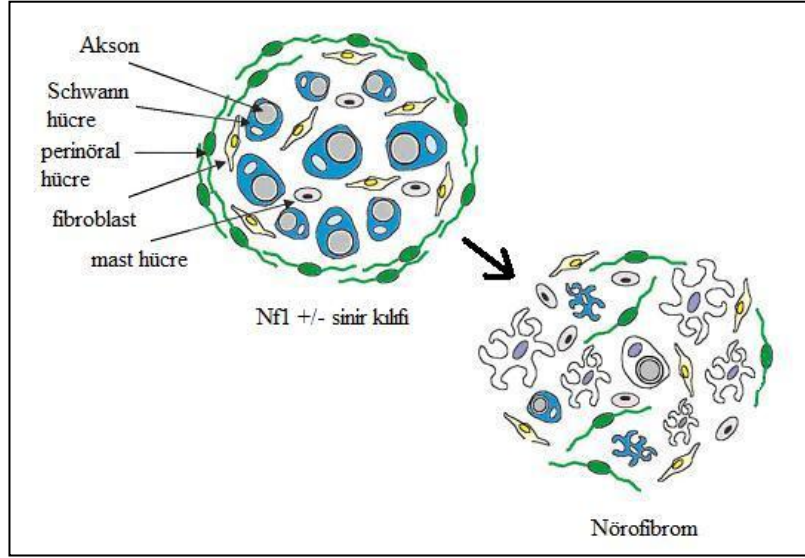
Nf1 gen ürününörofibromin molekülü için çeşitli fonksiyonel bölgeler ve aktiviteler tanımlanmaktadır ancak kesin olarak belirlenmiş olan fonksiyonu RasGAP (GTPase activating protein) aktivitesidir. Bu protein 2818 aminoasitten oluşmakta olup, ekzon 21-27 bölgesinden kodlanan 369 amino asitlik bir santral bölgesi bulunmaktadır [GAP (GTPase activatingprotein)-related domain (GRD)] (7,9,11). Bu bölge GAP'ın katalitik bölgesi ile homoloji gösterir ve RASyolunun inhibisyonunda görev almaktadır. GAP, GTPaz'ı stimüle ederek p21/Ras'ın GTP bağlı aktif formunu inaktif forma çevirir. Bu nedenle hücre bölünmesi ve çoğalmasını kontrol eden Ras sinyal yolağının negatif regülatörüdürvetümör baskılayıcı protein olarak kabul edilmektedir (6,11,12).

NF1 hastalarında sağlıklı allelin kaybı (LOH) buna bağlı olarak nörofibrominin işlevini yerine getirememesi sonucu tümör oluşumu gözlenir (6).

2. 3. Nörofibrom ve Oluşumu

Bir sinirin enine kesitinde en dışta, sinirin bütünü örtün epinöryum tabakası yer alır. Bunun altında pek çok sinir lifi ve Schwann hücreleri gruplar halinde sinir fasikülünü (*nerve bundle*) oluşturur. Bir periferik sinir içinde ortalama 3-5 fasikül bulunur. Her fasikül perinöral hücrelerin konsentrik tabakalarıyla çevrilir. Bu özelleşmiş hücreler perinöryumun elemanlarıdır ve birbirleriyle sıkı bağlantılar kurarlar böylece büyük moleküllerin geçmesini önleyen bir bariyer oluştururlar. Bu hücrelere ek olarak fibroblastlar, endotelial hücreler ve mast hücreleri de sinir

fasikülünde yer alır (Şekil 2.3.A). Gelişim, hareket, sağ kalım, çoğalma, büyümenin durması, farklılaşma gibi hücresel fonksiyonlar sırasında her bir hücre diğerinden gelen sinyale göre davranır (6,13,14).



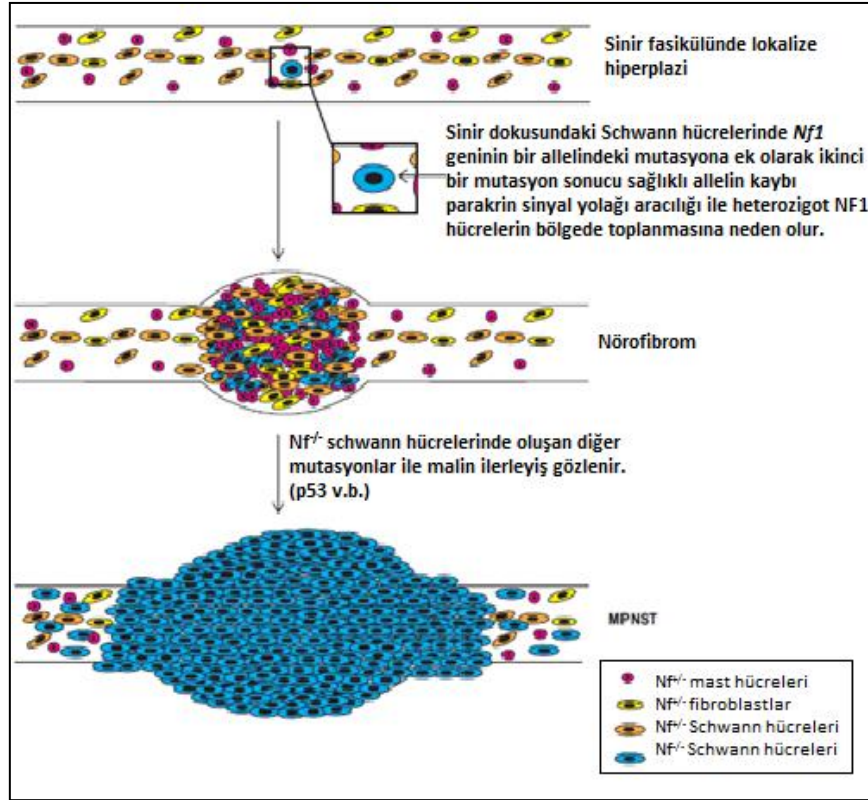
Şekil 2.3.A. Normal sinir kılıfı ile nörofibromun karşılaştırılması (19,22). Nörofibromlar, periferik sinir kılıfında bulunan hücre çeşitlerini ve $Nf^{-/-}$ Schwann hücreleri içerir. Nörofibromdaki Schwann hücreleri sinir kılıfından farklı olarak aksonlardan ayrılmıştır.

Nörofibromlarda normal sinir dokusundaki tüm hücreler bulunur fakat Schwann hücreleri sinirlerden uzaklaşmış ve perinöryum yapısı bozulmuş durumdadır. Hücreler arası bağ zarar görmüştür (Şekil 2.3.A). Bunun sonucunda nöronlar ya da mast hücrelerinin başlatıcı sinyalleriyle büyüme faktörü salınımı artarak tümör dokusundaki hücre gruplarının çoğalması gözlenir (Şekil 2.3.B).

Nörofibromlar Dermal ve Pleksiform nörofibrom olmak üzere 2 farklı alt gruba ayrılır. Dermal (kutanöz) nörofibromlar dermiste gelişir. Pleksiform nörofibromlar major periferik sinirlerin pleksusuna uzanan büyük kitlelerdir. Nörofibromlar Schwann, perinöral, mast hücreleri, nöron ve fibroblastlardan oluşan heterojen dokular olmakla birlikte ana bileşeni Schwann hücreleridir (13,15).

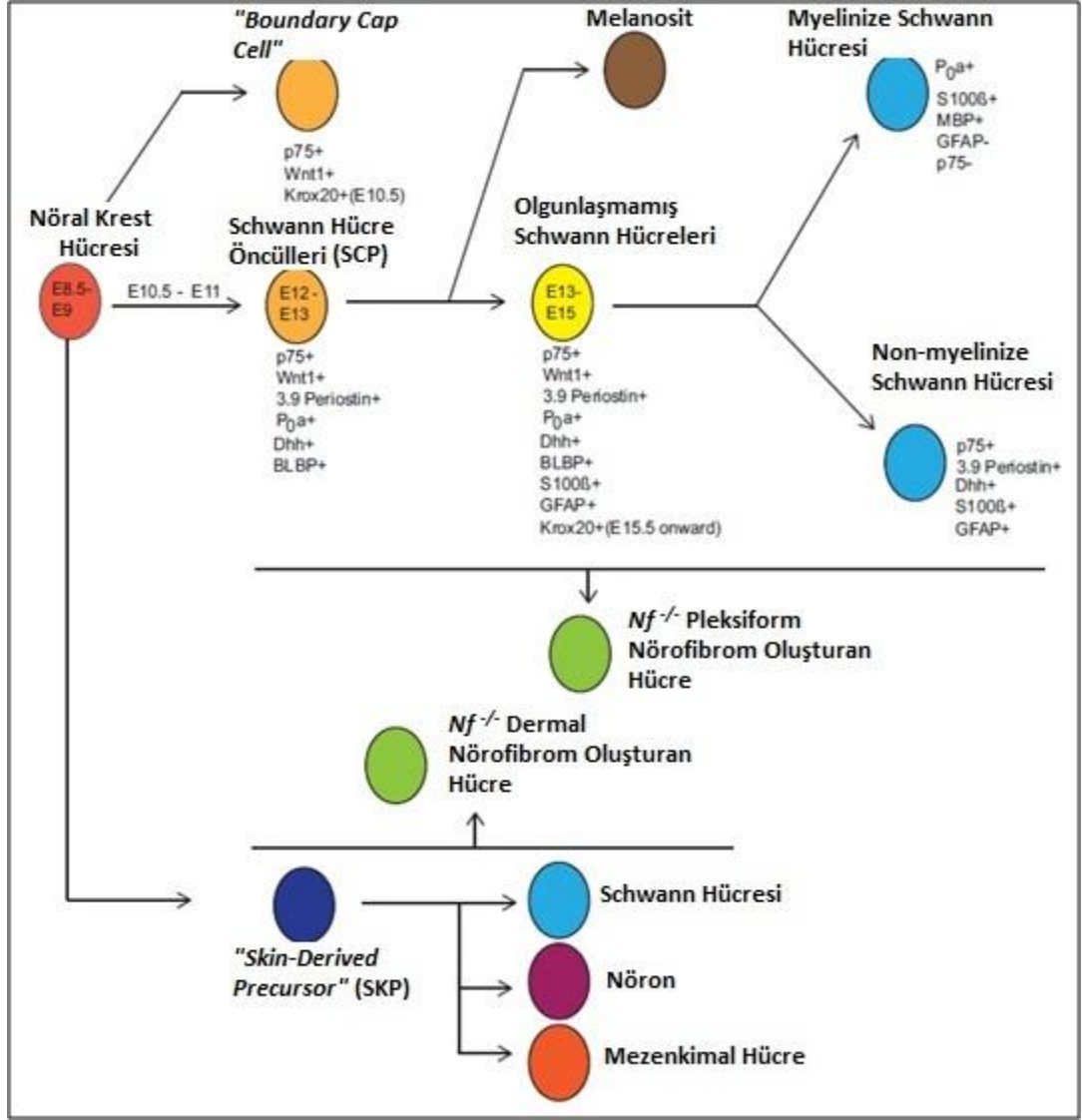
Schwann hücreleri, yüksek düzeyde nörofibromin ifade eden glial hücrelerden biridir. Glial hücreler sinir sisteminin nöronal olmayan, sinir sistemini

destekleyen, besleyen ve homeostazını sağlayan hücre grubudur. Schwann hücreleri, sinir sisteminin temel elemanları olan nöronların fonksiyonları ve devamlılığı için vazgeçilmezdir. Sinaptik uyarıları iletmezler ancak hayatlarının sonuna kadar bölünme yeteneğine sahiptirler. Schwann hücreleri hücre hasarlarının tamiri, akson miyelinizasyonu ve nöronların yönlendirilmesinden sorumludur (16).



Şekil 2.3.B. Nörofibrom oluşumu. Schwann hücrelerinde *Nf1* geninin bir allelindeki mutasyona ek olarak ikinci bir mutasyon sonucu sağlıklı allelin kaybı gözlenmiştir. *Nf1* Schwann hücreleri nörofibrom dokusunda bulunur (17).

Nörofibromlarda bulunan Schwann hücrelerinin kökeni nörofibrom türünde büyük rol oynamaktadır. Nörofibromların neoplastik hücreleri Schwann hücreleri olarak kabul edilmektedir. Hayvan modelleri ile yapılan çalışmalarda dermal nörofibromların kökeninin SKP (“Skin-Derived Precursor”) hücreleri, pleksiform nörofibromların kökeninin ise nöral krest hücrelerinden gelişen Schwann hücreleri olduğunu göstermiştir (Şekil 2.3.C). Bu yüzden dermal ve pleksiform nörofibromlar arasında yapılan transkriptom analizleri başarısızlıkla sonuçlanmıştır (17).



Şekil 2.3.C. Schwann hücrelerinin gelişimi. Schwann hücrelerinin kökenine bağlı olarak nörofibromların türü değişmektedir (17).

Sinir sistemi hücrelerinden özellikle glial hücrelerde yüksek düzeyde bulunan S100 proteini, geni 21q22.3 te lokalize, “helix-loop-helix” yapıda düşük moleküler ağırlıkta (9-13 kDa), 2 adet Ca^{+2} bağlanma bölgesi içeren protein ailesindedir. 1965’te beyin protein fraksiyonunda bulunmuş, sonraki çalışmalarda birbirine çok benzeyen S100A1 ve S100B olmak üzere 2, toplamda ise 21 adet farklı tümör ve epidermal farklılaşmaya spesifik S100 olduğu anlaşılmıştır. Özellikle astrositler olmak üzere glial hücrelerde S100B ifadesi yüksek düzeydedir (18,19). S100B Schwann hücre belirteci olarak kullanılır.

2. 3. 1. Dermal Nörofibrom

Dermal (kutanöz) nörofibromlar sinir lifleri ya da sinir fasikülünden köken alıp dermis ya da epidermiste gelişerek çok çeşitli boyutlarda olabilir. Bunlar iyi huylu tümörlerdir ancak yerleşimine bağlı olarak ağrılı ve kaşıntılı olabilir. Tümör dokusu hücrel heterojenite gösterir (6,10,13,20). Dermal nörofibromların kökeninin SKP olduğu hayvan modelleme ile gösterilmiştir (17).

2. 3. 2. Pleksiform Nörofibrom

Pleksiform nörofibromlar, dermal nörofibromların aksinemajor periferik sinirlerin pleksusuna uzanan büyük kitlelerdir, diffüzdür, sinir boyunca büyürler, birden çok sinir dalı ve pleksusu kaplayabilirler.

Bu tümörler de iyi huylu olmasına rağmen kötü huylu karakter kazanmaya yatkındır. Hücrel yapılanmaları dermal nörofibromlara benzer olmakla birlikte gelişim zamanları, tümörleşme mekanizmaları ve köken aldıkları hücre tipi farklıdır (21).

Literatürde nörofibrom dokusundaki homozigot mutant Schwann hücrelerinin ($Nf^{-/-}$), heterozigot hücrelere ($Nf^{+/-}$) göre daha hızlı çoğaldığını gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. Bu bulgular da nörofibrominin büyümenin negatif düzenleyicisi olduğunu desteklemektedir (22-24).

2. 3. 3. Astrositom

Astrositler beynin içinde ve omurilikte bulunan glial hücrelerdir. Bu hücreler sinir sistemi için besin sağlar, iyon dengesini korur ve herhangi bir kitlesel yaralanma sonrası beyin ve omurilik onarımına yardımcı olur. Astrositomlar, astrositlerden köken alan bir gliomadır, çocuklarda daha siktir, sıklıkla serebellumda gelişir. Erişkinlerde ise tüm primer tümörlerin %10'unu oluşturur ve genellikle serebral hemisferlerde yerleşir (8).

1. Pilositik astrositom (Grade 1): Düşük grade'li glial tümörlerin tipik olarak çocuk ve genç erişkinleri etkileyen, sık bir varyantıdır. Tüm intrakranial glial tümörlerin %4- 5'ini oluşturur.

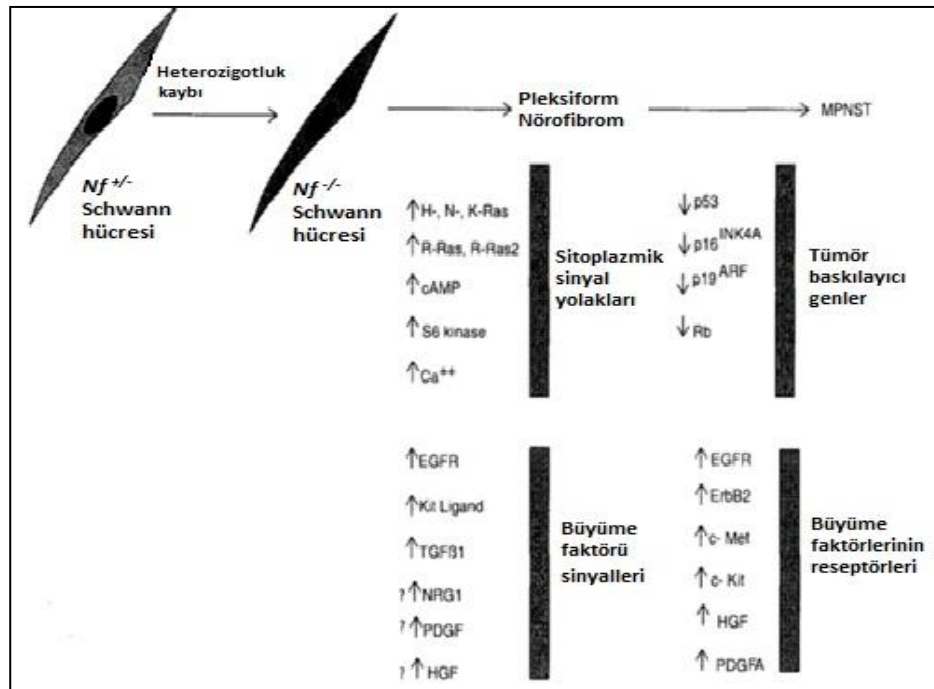
2. Diffüz astrositoma (Grade 2)

3. Anaplastik astrositoma (Grade 3)

4. Glioblastoma (Grade 4)

2. 3. 4. Malin Periferik Sinir Kılıfı Tümörü (MPNST)

Malin periferik sinir kılıfı tümörü ileri derecede agresif malin bir tümördür. NF1'de malin periferik sinir kılıfı tümörü, periferik sinir kılıfından ya da pleksiform nörofibromdan orijin alır (Şekil 2.3.4). İnsidansı normal popülasyonda %0.0001 iken, Nörofibromatozis Tip 1(NF1)'li hastalarda hayatı boyunca malin periferik sinir kılıfı tümörü oluşma olasılığı %4-%5'tir (25,26).

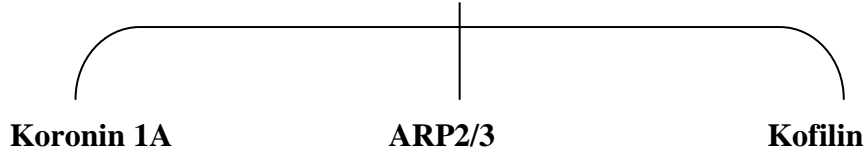


Şekil 2.3.4. MPNST oluşumu. Sitoplazmik sinyal yolları , tümör baskılayıcı genler, büyüme faktörü sinyalleri ve bu büyüme faktörlerinin reseptörlerinin seviyeleri pleksiform nörofibromdan Malign Periferik Sinir Kılıfı Tümörü oluşumunda anahtar rol oynamaktadırlar (25).

2. 4. NF1’de Rol Oynayabilecek Aktin ile ilişkili Proteinler

NF1 patogenezinde hücre morfogenezinde etkili olan proteinlerin ifadesinin klinik tabloyu etkileyebileceği ileri sürülmektedir.

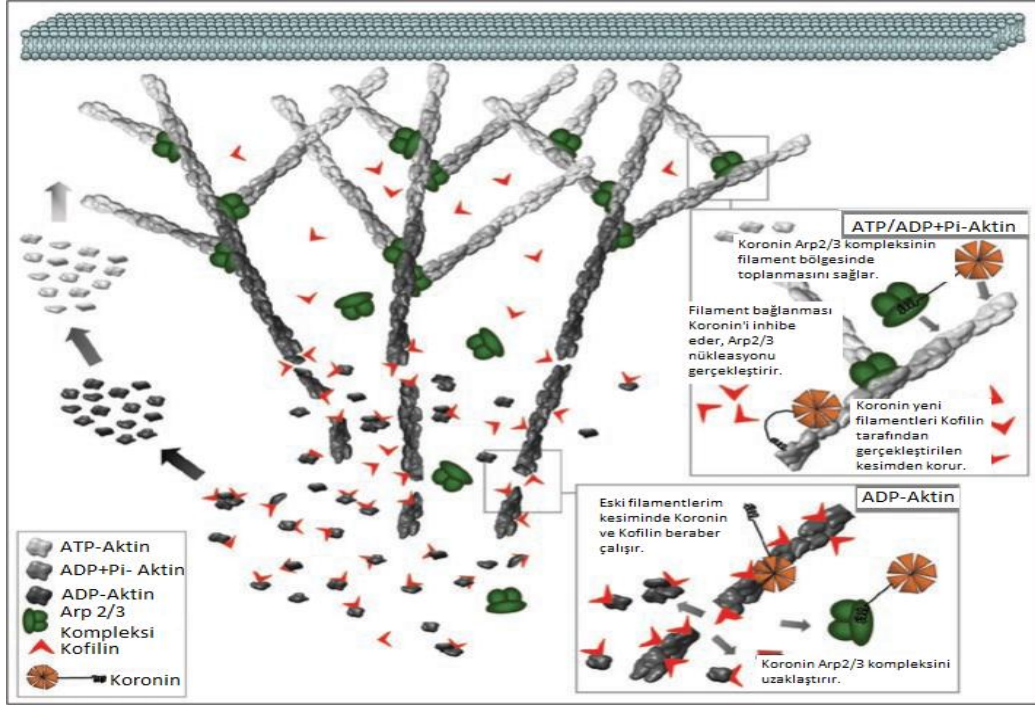
Hücre iskeletinde aktin dinamikleri önemli rol oynar ve aktin dinamiklerini başlıca kontrol eden proteinler



2. 4. 1. ARP2/3 (Actin Related Protein 2/3)

ARP 2/3, dinamik aktin oluşumu olan bölgede lokalize, aktin nükleasyonu ve aktin filamentlerinin dallanmasını sağlayan 7 alt üniteden oluşan, aktin hücre iskeletinin regülasyonundan sorumlu bir protein kompleksidir. ARP 2 ve ARP 3 alt üniteleri monomerik aktin ile etkileşerek yeni aktin filamentleri için nükleasyon bölgesi olarak görev alır. Ayrıca bu kompleks var olan “ana” filamente bağlanır ve “yavru” filamentin 70⁰ açılı ile dallanmasını sağlar (27).

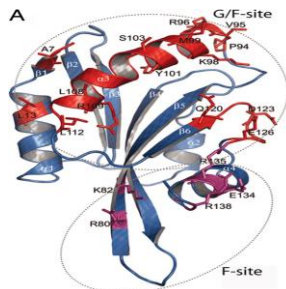
Hücrede aktin filament oluşumu plazma membranına yakın bölgede gerçekleşir. Bu filamentler ATP-Aktin ve ADP+Pi-Aktince zengindir. Koronin’in ATP-Aktin’e afinitesi ADP-Aktinden fazladır. Koronin, β tabakasından ATP-Aktin’e bağlanır. Bu bağlanma ATP-Aktin’i Kofilin tarafından gerçekleştirilen depolimerizasyondan korur. Koronin 1A ARP 2/3 ile etkileşime girerek ARP 2/3 kompleksinin işlev göreceği plazma membranı altında lokalize olmasını sağlar (28) (Şekil 2.4.1).



Şekil 2.4.1. Koronin 1A'nın ARP2/3 kompleksi ve Kofilin üzerindeki etkisi. Koronin 1A, ARP2/3'e bağlanarak filament bölgesinde toplanmasını sağlar (28).

2. 4. 2. Kofilin

Aktif Kofilin, aktin filamentlerini depolimerize etmekte, birbirinden ayırmaktadır. Eski filamentler ADP-Aktinden oluşup hücre korteksinin distalinde bulunur. Kofilin bu filamentlerin kesim ve depolimerizasyonunu gerçekleştirir (29,30) (Şekil 2.4.2). Kofilin ve ADF (Actin depolymerizing factor) proteinleri aktin filamentlerinin depolimerize olan ucundan monomerlerine ayrılmasını sağlar. Serin amino asidinden fosforlanan Kofilin aktin sarmalının monomerlerinin arasındaki etkileşimi azaltır ve filament yıkımını başlatır (31). Aktin ile ilişkisi hücrenin pH düzeyinden etkilenir (32).



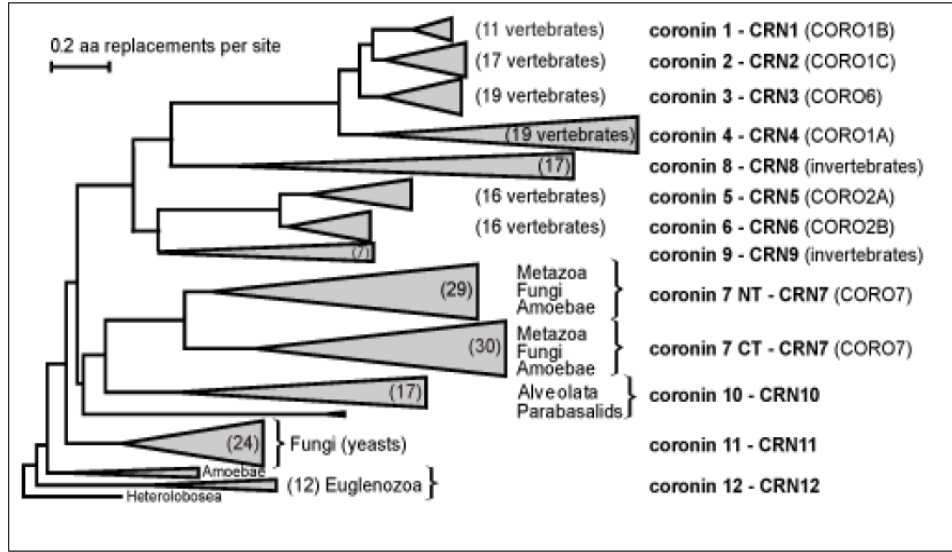
Şekil 2.4.2. Kofilin proteininin yapısı (29).

G/F-site: G- aktin ve F-aktin bağlanma bölgesi.

F-site: F-aktin bağlanma bölgesi.

2. 4. 3. Koronin protein ailesi ve Koronin 1A

Koroninler ilk olarak 1991'de *Dictyostelium discoideum*'da daha sonra 1998'de insan ve fare gibi omurgalılarda bulunmuştur ve bitkiler dışında tüm ökaryot canlılarda varlığı gösterilmiştir. Koronin ailesi proteinleri amip, öğlena gibi ilkel omurgasız canlılarda da görülen ve evrim sürecinde korunmuş olan proteinlerdir (33) (Şekil 2.4.3.A).

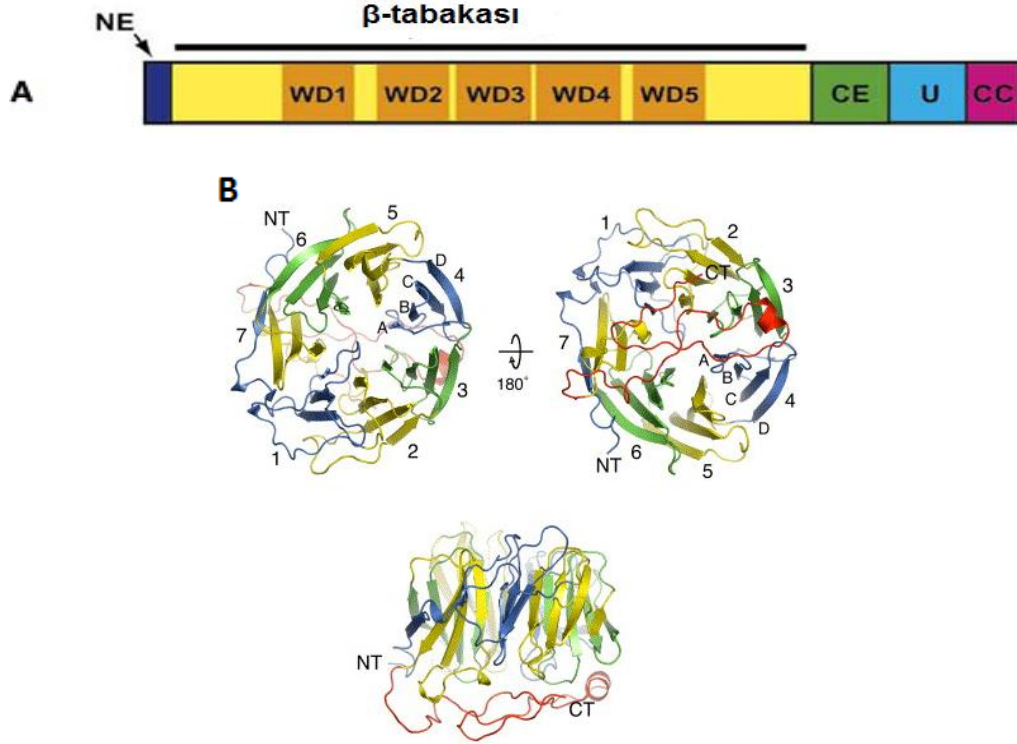


Şekil 2.4.3.A. Korunmuş Koronin protein ailesinin filogenetik ağacı (34).

Koronin, evrimsel olarak korunmuş ve WD (triptofan-aspartik asit) tekrarları içeren aktine bağlanan homodimerik protein ailesidir (Şekil 2.4.3.B).

Koronin ailesinin proteinleri, N-terminalinin ardından beş standart WD40 tekrarları, korunmuş bir C-terminali sonrasında yerleşim gösteren U bölgesi ve C-terminal sonunda "coiled-coil" (CC) bölgesi içerir (35) (Şekil 2.4.3.B). CC bölgesi ise lösin fermuar motifi taşır, koronin proteinlerinin oligomerizasyonu, aktin filamentlerine tutunması ve aktin filamentlerinin organizasyonu için önemlidir (34, 36). WD40 tekrarları aktin filamentlere bağlanmada, PKC ile fosforlanmada, aktinden bağımsız olarak hücre zarına bağlanmada önemli rol oynar. Koronin 1 proteini biri N terminal, diğeri WD tekrar bölgeleri olmak üzere iki bölgesinden aktine bağlanır (37). Koroninler göç eden hücrelerin ön taraflarında yoğunlaşan aktin ağı ve

fagositik cebi oluşturan aktin örtü ile birlikte yerleşip, bu yapıların oluşmasında itici bir güç olarak çalışır (38-40).



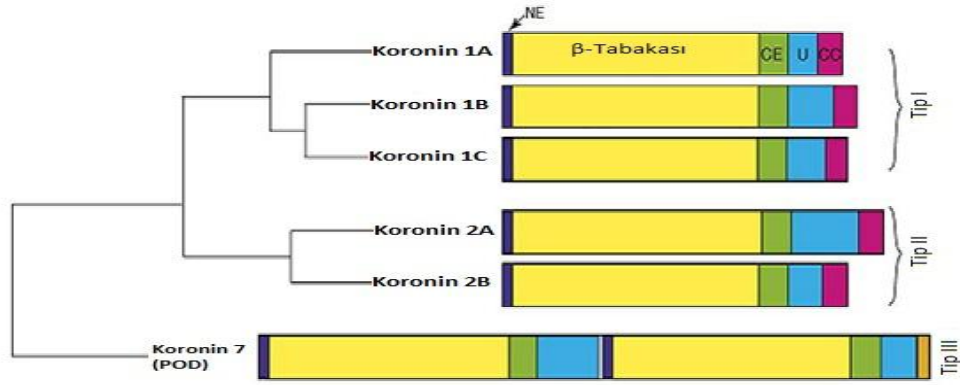
Şekil 2.4.3.B. Koronin proteininin yapısı A) Koronin proteininin β -tabakalı pervane ve C-terminalde “coiled-coil” bölgesi (34, 36). B) Koronin 1A proteininin oluşturulmuş 3 boyutlu yapısı (33).

Koroninler Arp2/3, Kofilin gibi hücre iskeleti oluşumunda rol alan proteinlerin işlevini kontrol eder (41). Aktin polimerizasyonunda hız sınırlayıcı basamak olan nükleolizasyondan sorumlu olan Arp2/3, Koronin 1A ile birlikte aktin dinamiklerini kontrol eder (28, 42) (Şekil 2.4.1). İnsan nötrofil preparatlarında Koronin ve Arp2/3’ün bir arada bulunması birlikte aktini kontrol ettiğini destekler (43). Koroninin Arp2/3 ile ilişkisi PKC tarafından fosforilasyonu sonucu baskılanır (44-47).

Memelilerde altı farklı Koronin proteini bulunur. (Tablo 2.4.3) (Şekil 2.4.3.C)

Tablo 2.4.3. Koronin proteini ailesi üyeleri ve görevleri

| TİP 1 KORONİNLER | |
|-------------------------|---|
| Koronin 1A | Temel olarak hematopoiyetik doku ve hücrelerde ve nöronal dokularda ifade edilmektedir. Mononükleer fagositik hücrelerden mikroglia hücreleri merkezi sinir sisteminde bulunur ve sistemin savunmasında rol oynar. Mikroglia hücrelerinde de Koronin 1A'nın ifade edildiği ve hücreyel belirteç olduğu gösterilmiştir (48). |
| Koronin 1B | Birçok dokuda yüksek düzeyde ifade olmaktadır ve omurilik hasarı sonrasında ifade düzeyinin arttığı gösterilmiştir (49). |
| Koronin 1C | Koronin 1B'ye benzer şekilde birçok dokuda ifade edilmektedir, ancak ifade düzeyinin daha düşük olduğu bilinmektedir. Koronin 1A ya yapısal olarak benzerlik gösteren Koronin 3 ün (Koronin 1C) malin diffüze glioma tiplerinde ifadesinin iyi huylu diffüze glioma tiplerinden daha yüksek olduğu bulunmuş ve kanser ciddiyetinde rol aldığı düşünülmüştür (50). |
| TİP 2 KORONİNLER | |
| Koronin 2A | Testislerde, over, uterus ve beyinde ifade olduğu gösterilmiştir (51). Kemik iliğinden elde edilmiş makrofajların nükleusunda NCoR (nuclear receptor co-repressor) kompleksinin bir parçası olduğu ve inflamasyonda görev aldığı da gösterilmiştir (52). |
| Koronin 2B | Genel olarak beyinde ifade olmakla birlikte diğer birçok dokuda da düşük düzeyde ifade olduğu gösterilmiştir (51). |
| TİP 3 KORONİN | |
| Koronin 7 | Beyin, böbrek, timüs ve dalakta yüksek olmak üzere diğer birçok organda ifade olduğu gösterilmiştir. |



Şekil 2.4.3.C. Koronin grubundaki Koroninlerin yapısının şematik olarak gösterilmesi Koroninlerin N-terminalinde yedi WD40 tekrarından oluşan β -tabakalı pervane şeklindeki bölgesi (β -*propeller*) ve C-terminaldeki “coiled-coil” (sarmal) bölgesi bulunur (47).

Son yıllarda Koronin protein ailesinin tümör dokularındaki durumu ile ilgili literatürde birbirinden bağımsız çalışmalar bulunmaktadır.

Giovanni ve arkadaşları tarafından, nöronal plastisitede görev alan yeni moleküllerin tanımlanması amacı ile oligonükleotid “*microarray*” kullanılarak yapılan çalışmada hücre adezyonunda, sinaptik plastisitede ve hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesinde görevli Rab13 ve Koronin 1B adlı iki protein tanımlanmıştır. Rab13 küçük GTPaz ailesi üyesi bir proteindir. Koronin 1B ise aktin ile ilişkili bir proteindir ve F aktin ile ilişki içinde olduğu gösterilmiştir. *In vivo* ve *in vitro*'da yapılan çalışmalar sonucunda Koronin 1B ve Rab13'ün aksonal plastisitede etkili olan iki protein olduğu gösterilmiştir (49,53).

Biase ve grubunun 2005 yılında yaptıkları çalışmalarında, sıçanlar üzerinde deneysel olarak bir omurilik hasarı oluşturulmuş ve gen ifade profilindeki değişim oligonükleotid “*microarray*” yöntemi ile incelenmiştir. Bu çalışmada, nörona özgül genlerin ve transkripsiyon faktörlerinin daha önceki “*microarray*” çalışmalarından farklı bir yaklaşım ile gruplandırıldığı, bu nedenle önceki çalışmalara oranla daha etkin bir analiz yapıldığı belirtilmektedir. Bu çalışmada, deneysel olarak oluşturulan hasar sonrasında hasar bölgesinde aktin hücre iskeleti ile ilişkili olan Koronin 1B ve Koronin 1A'in ifadesinin 7. gün sonunda sırası ile 2,11 ve 5,05 kat artış gösterdiği

belirlenmiştir. Koronin 1B'nin aksonal plastisitede etkili olan bir protein olduğu daha önce gösterilmiştir (54).

Bu çalışmalar; Koronin protein ailesi üyelerinden Koronin 1A ve Koronin 1B'nin aksonal plastisitede etkili olan iki protein olduğunu göstermiştir. Rejenerasyon ve kanser patogenezi benzerlik gösteren olaylardır.

Yanagisawa ve arkadaşlarının çalışmasında immun yetmezliği olan farelerde primer diffüz ve solid lenfoma dokuları oluşturulmuş, daha sonra bu dokulardan hücre kültürleri kurulmuştur. Hücre kültürlerinden alınan örnekler "*microarray*" teknikleriyle analiz edildiğinde 26 654 gen içinde 105 genin ifadesi diffüz ve solid lenfomalar arasında farklı bulunmuştur. Bunlardan biri olan Koronin 1A'nın solid lenfomalardaki ifadesinin diffüz lenfomalara göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Aynı çalışmanın ikinci basamağında 12 insan solid tümör örneği de incelenmiş ve Koronin 1A ifadesinin farelerde yapılan çalışmaya benzer olduğu belirtilmiştir (55).

Koronin 1A'nın tümörlerde farklılık gösteren proteinler arasında yer alması tümör oluşumunda rol alabileceğini işaret etmektedir. İnsan odontojenik tümör dokularıyla yapılan bir diğer "*microarray*" çalışmasında da 19000 gen içinde 506 genin tümör dokularında değişiklik gösterdiği bulunmuştur. Değişiklik gözlenen genlerden biri Koronin 1A'dır ve kötü huylu tümör dokularındaki ifadesi iyi huylu tümör dokularından daha yüksek bulunmuştur (56).

NF1 hastalarında beyin ve spinal tümör gelişim riski, normal topluma göre 40 kat, optik gliom gelişme riski 1000 kat, yumuşak doku sarkomları riski 50 kat, juvenil miyelomonositik lösemi (JML) gelişme riski 200 kat, akut lenfoblastik lösemi (ALL) riski ise beş kat artmıştır (6).NF1 patogenezinde hücre morfogenezinde etkili olan proteinlerin ifadesinin klinik tabloyu etkileyebileceği ileri sürülmekte olup bu konunun yeni çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. Bu nedenle Koronin1A'nın çeşitli hücrelerde, özellikle NF1 tümörlerinin baskın hücre grubunu oluşturan Schwann hücrelerinde ifadesinin gösterilmesi bu çalışmalara katkı sağlayacaktır.

Tümör dokusunun hücresel kökenine göre Koronin ailesi üyelerinin etkiside farklı olmaktadır. Bu tez çalışmasının amacı Nörofibromatozis Tip 1 ile ilişkili tümörlerde Koronin 1A ifadesindeki farklılıkları ortaya koymaktır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3. 1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Gereçler ve Çözeltiler

3. 1. 1. Hücre kültürü

- Schwann hücresi (Patrick M. Wood, “*The Miami Project to Cure Paralysis and the Department of Neurological Surgery, School of Medicine, Miami, Florida*”)
- İnsan Schwann hücreleri (Sciencell Cat. No.:1700)

Hücre Kültür Malzemeleri

- FCS (Fötal Dana Serumu) (Gibco/Invitrogen)
- DMEM (Dulbecco’s modified Eagle’s medium) (Gibco/Invitrogen)
- Penisilin / streptomisin (Biochrom) (1 mg/ml)
- IBMX (3-izobütil-1-metil-ksantin) (Sigma) (50 mM)
- β – heregulin (R&D Systems EUROPE Ltd) (10 μ g/ml)
- Forskolin (Sigma) (2 mM)
- İnsülin (Sigma) (500 μ g/ml)
- 1XPBS (Phosphate buffer saline) (Sigma)
- Poli-L-lizin (Sigma) (1 mg/ml)
- Laminin (Gibco/Invitrogen) (16 μ g/ml)
- Tripsin EDTA (Gibco/Invitrogen)
- Versene (Gibco/Invitrogen)

Kültür Ortamı İçeriği

DMEM

| | | |
|---------------------|---|-------------|
| FCS | : | % 10 |
| 1XPBS | : | % 1 |
| IBMX | : | 0,5 mM |
| β – heregulin | : | 10 nM |
| Forskolin | : | 0,5 μ M |
| L-Glutamin | : | % 1 |

Besin ortamına 500µg/ml konsantrasyona sahip insülin'den 5 µl/1ml, her besleme sırasında taze olarak eklendi.

- Ticari olarak satın alınan hücrelerde İnsan Schwann Hücre Kültür Ortamı kullanıldı (Cat. No.:1704).

3. 1. 2. İmmü Floresan Boyama malzemeleri

1XPBS (Phosphate buffer saline) (Sigma)

Triton X-100 (Sigma) : 0,2% / PBS(v/v)

Keçi Serum (Sigma) : 10% / PBS (v/v)

Sığır serum albumini (Sigma) : 10% / PBS (w/v)

Tween 20 : 0,1% / PBS (v/v)

Birincil Antikorlar : Tavşan anti-S100 poliklonal antikor (DAKO)

Fare anti-Koronin1A monoklonal antikor (Novus)

Floresan İşaretli İkincil Antikorlar : Anti-tavşan Alexa Fluor 568 (Molecular Probes)

Anti-goat Alexa Fluor 488 (Molecular Probes)

DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Sigma)

ProLong Antifade Kit (Invitrogen / Molecular Probes)

PAP-PEN

3. 1. 3. RNA izolasyonu malzemeleri

Trizol (Invitrogen)

Kloroform (Invitrogen)

İzopropanol (Applichem)

Etanol (Riedel-de Haen)

DEPC (Dietyl pirokarbonat) (Sigma)

3. 1. 4. RNA kalite kontrol jeli

% 1 Agaroz jel:

Agaroz (RNA grade) (Prona)
DEPC'li su (%0,1v/v) (Sigma)
10xMOPS (Sigma)
Formaldehit (%37) (Applichem)

Yükleme tamponu:

Formaldehit (Applichem)
Formamit (Sigma)
Gliserol (Sigma)
Na₂EDTA (1mM) (Applichem)
BPB(brom-fenol mavisi)
DEPC'li su (Sigma)
EtBr (10 mg/ml distile H₂O) (Sigma)

3. 1. 5. cDNA sentezi

QuantiTect Reverse Transcription Kit:
(Qiagen)

gDNA Wipeout Buffer (7X),
Quantiscript Reverse Transcriptase,
Quantiscript RT Buffer,
RT Primer Karışımı,
RNaz içermeyen distile su

3. 1. 6. Gerçek Zamanlı (Real Time) PZR malzemeleri

“Corbett Rotor Gene 6000” cihazı

- *Syber-GreenJump-start Taq Readmix (2X)* :20 mM tris-HCL, pH 8,3
100 mM KCL, 0.4 mM dATP,
0.4 mM dTTP, 0,4 mM dGTP,
0.4 mM dCTP, 0.4 mM dATP,
Stabilizatör,
0.05 u/μl taq DNA polimeraz,
Jump Start Taq Antibody,
SYBER Green boyası

- MgCl₂ (Sigma) 25 mM

10 µM insan Koronin 1A, s100, β-aktin primerleri

- 10 µM insan Koronin 1A primerleri (metabion)
 - Koronin 1A forward primeri 5'-GCTGCACGAGCGGAGGTGTG-3'
 - Koronin 1A reverse primeri 5'-ATCCGAGCTGGGAGTGCCAC-3'
- 10 µM insan β-aktin primerleri (Iontek)
 - β-aktin forward primeri 5'-CGCAAAGACCTGTACGCCAAC-3'
 - β-aktin reverse primeri 5'-GAGCCGCCGATCCACACG-3'
- 10 µM insan S100 primerleri (metabion)
 - S100forward primeri 5'-GGATGTCTGAGCTGGAGAAGGCC-3'
 - S100reverse primeri 5'-TTGTTGATGAGCTCCTTGAGTTCGG-3'

3. 1. 7. Agaroz Jel Elektroforezi Malzemeleri

| | | |
|---------------------------------|--|---------|
| Agaroz | Moleküler biyoloji kullanımı saflığında (Prona) | |
| Tris-asetat tamponu (pH 8,0) | Tris baz (Merck) | 2 M |
| | Glasiyal asetik asit (Merck) | 1,14 ml |
| | Na ₂ EDTA | 0,5 M |
| Yükleme tamponu | Gliserol (Merck) | 5,5 ml |
| | 1XTAE tamponu | 4,5 ml |
| | <i>Orange G</i> boya (Merck) | 0,01 gr |
| EtBr | 10 mg/ml distile H ₂ O | |
| Moleküler ağırlık belirleyicisi | 50 bp DNA ladder (Fermentas) | |

3. 2. Çalışmada Kullanılan Yöntemler

3. 2. 1. Normal Schwann Hücresinin Elde Edilmesi

İnsan sural sinir dokusundan alınan örnekten Schwann hücresinin izole edilmesiyle elde edilir. Bu çalışmada kullanılan Schwann hücreleri Amerika Birleşik Devletleri Miami Üniversitesi “*The Miami Project to Cure Paralysis and the Department of Neurological Surgery, School of Medicine, Miami, Florida*” ‘dan Dr. Patrick M. Wood tarafından gönderilmiştir. Hücreler yeterli olmayınca Sciencell firmasından katalog numarası 1700 olan insan Schwann hücreleri satın alınmıştır.

3. 2. 2. Normal Schwann Hücrelerinin Üretilmesi

İnsan Schwann hücreleri ile insan Schwann hücre kültür ortamı kullanıldı. Kültür ortam içeriği firma tarafından belirlenmiştir.

- Hücreler % 5 CO₂ içeren 37 °C etüvde üretildi.

3. 2. 3. Schwann Hücrenin Üretileceği Kültür Kabı Yüzeylerinin Kaplanması İşlemi

Kültür kapları Schwann hücrelerinin yüzeye tutunmasını kolaylaştırmak ve böylece daha çabuk üremeye başlamalarını sağlamak amacıyla poli-L-lizin (4 µg/ml) ve laminin (16 µg/ml) ile kaplandı.

Kaplama protokolü

• 1 mg/ml ara stok poli-L-lizin 1:10 oranında seyreltilerek elde edilen 100 µg/ml Poli-L-lizin 25cm² lik kültür kabına 5 ml ilave edildi. Hücre boyamalarını verimli bir şekilde yapabilmek için 4 kuyucuklu “*chamber slide*” kültür kapları kullanıldı. Her kuyucuğa 500µl 1:10 oranında seyreltilmiş Poli-L-lizin ilave edildi.

- En az 30 dakika olmak üzere 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
- Solüsyonun fazlası pipet yardımıyla alındı. 1XPBS ile üç kez yıkandı.

- Laminin 16 µg/ml ara stoktan 4 µg/ml çözelti hazırlanarak 25 cm² lik kültür kabı için 5 ml, “*chamber slide*”ın her kuyucuğu için 500µl ilave edildi. +4 °C de bir gece boyu ya da 37 °C de 1 saat inkübe edildi.

- Tekrar 1 – 3 kez 1XPBS ile yıkandı. Kaplanan malzemeler hemen kullanılmayacak ise 1XPBS ilave edildi ve +4 °C de saklandı. Yeni hazırlanmış kültür kapları ile çalışılması tercih edildi.

Kaplama işlemi sırasında yüzeye değmemeye özen gösterildi. Kaplamanın çizilen, bozulan bölgesinde fibroblastlar üreyerek Schwann hücrelerinin üremesini baskılayabilir.

3. 2. 4. Schwann Hücrelerinin Pasajlanması

Normal hücreler belirli bir alanı kapladıktan sonra kontak inhibisyon ile çevredeki hücrelerin çoğalmasını baskılayıcı faktörler salgırlar. Bunun yanı sıra kültür kabında biriken hücresel atıklar ortamı asitleştirir ve hücrelerin ölmesine yol açar. Bu nedenlerle hücrelerin düzenli aralıklarla yeni kültür kaplarına aktarılması işlemine hücre pasajlanması denir.

- Pasaj işlemine başlarken kültür kabının içindeki ortam uzaklaştırıldı, önce 1XPBS ile ardından 25 cm² kültür kabı için 1 ml Versene ile yıkandı.
- 3 – 5 dakika tripsin ile muamele edildi, bulanıklaşan Tripsinden hücrelerin kalkması takip edildi.
- Tripsinin iki katı hacminde kültür ortamı ile tripsin inaktive edildi. Pipetaj yardımıyla kültür kabının tüm yüzeyindeki hücrelerin kalkması sağlandı.
- Kültür kabındaki hücre süspansiyonu falkon tüpe aktarıldı.

- Hemositometrede hücre sayımı yapıldı. Hücre süspansiyonu 2000 rpm’de 10 dakika santrifüj (Hettich Zentrifugen D78532) edildi ve hücrelerin çökmesi sağlandı.
- Hücre sayımı sonucuna göre 300.000 hücre/ 5 ml olacak şekilde kültür kabına dağıtıldı.

3. 2. 5. Hemositometrede hücre sayımı

Hücre sayımı için hemositometre (LEVY and LEVY-HAUSSER, Corpuscule Counting Chamber) kullanıldı.

$$\text{HÜCRE SAYISI} = \text{Ortalama Hücre Sayısı} \times \text{Sulandırım faktörü} \times \text{Hacim} \times 10^4$$

3. 2. 6. Hücre Dondurulması

Dondurulma ortamı

| | | |
|------|---|------|
| DMEM | : | % 80 |
| FCS | : | % 10 |
| DMSO | : | % 10 |

Her bir vialde 1 ml aldı, buna göre dondurulma ortamı hazırladı.

3. 2. 7. NF1 tümör dokusunun elde edilmesi

NF1 tanısı ile Hacettepe Üniversitesi çeşitli ünitelerde izlenen hastaların, periferik sinir tümöründen örneklenen 2 cm³’lük taze dokuları vasat (serumsuz DMEM) içine alınarak, sıvı azotta dondurulup, – 80 °C de saklandı. Dokunun patolojik tanısı elde edildi.

Tablo 3.2.7. Elde edilen NF1 tümör dokuları.

| | |
|---------|-----------------------|
| HASTA 1 | Dermal nörofibrom |
| HASTA 2 | Pleksiform nörofibrom |
| HASTA 3 | Pilositik Astrositom |

3. 2. 8. Taze dondurulmuş doku kesiti

Doku -80 °C'den çıkarılıp çözünmeden ortasından parça kesildi geri kalanı -80 °C'de saklanmaya devam edildi. Doku parçasını krayo tüpe yerleştirmek için doku dondurma ortamına gömüldü. “Shandon SME Cryotome Cryostat” ile 4-6 µm kalınlığında kesitler yüzeye daha iyi tutunması için “ISOTHERM positive charged” lamalar üzerine alındı. 4 gün içerisinde immünfloresan boyama yapıldı.

3. 2. 9. İmmünfloresan Boyama

Floresan boyama, doku ve hücrelerdeki moleküllerin florokrom olarak adlandırılan renk veren kimyasal maddelerle işaretlenmeleri ile görünür hale getirilmesi tekniğidir.

- Doku kesitlerinin bulunduğu lamalar 30 dakika oda sıcaklığında kurutuldu. PAP-PEN ile doku kesitinin sınırları belirlendi. (Hücreler ise boyamadan önce poli-L-lizin ve laminin ile kaplanmış “*chamber slide*” üzerinde üretildi. Boyama sırasında kültür ortamı pipet ile uzaklaştırıldı. 1XPBS ile yıkandı.)
- PBS'te çözünmüş %4 oranında seyreltilmiş paraformaldehit ile doku 15 dakika boyunca fikse edildi. (Hücreler ise PBS'te çözünmüş %4 oranında seyreltilmiş paraformaldehit ile 30 dakika boyunca fikse edildi.)
- 1-3 kez 5 dakika 1 XPBS ile yıkandı.
- PBS'te çözünmüş % 0,2 Triton X çözeltisi ile dokudaki hücrelerin zarlarının geçirgenliği arttırıldı.
- 1-3 kez 5 dakika 1 XPBS ile yıkandı.
- Doku kesitleri, %10 keçi serumu, %10 sığır serum albumin ve %0.1 *Tween* 20/ PBS solüsyonu ile bloke edildi.

- Birincil antikorlar, Koronin1A monoklonal anti-fare için 1/50, S100 poliklonal anti-tavşan için 1/3000 seyreltim ile kullanıldı ve 16-18 saat süreyle +4°C'de inkübe edildi.
- 1-3 kez 5 dakika 1 XPBS ile yıkandı.
- İkincil antikor olarak anti-tavşan AF 568 1:500 ve anti-fare AF 488 1:500 seyreltme oranı ile kullanıldı. 1 saat süre ile oda ısısında inkübe edildi.
- 1-3 kez 5 dakika 1 XPBS ile yıkandı.
- Birincil ve ikincil antikor bağlanması sonrası hücre çekirdeklerinin görünür hale getirilmesi için DAPI (ana stok 1µg/ml 1/1000 oranında dH₂O ile seyreltilir) ile 1 dakika inkübe edildi.
- 1-3 kez 5 dakika 1 XPBS ile yıkandı.
- Lamaların üzerine solmayı geciktirmek üzere “*ProLong Antifade Kit*” kaplama ortamı damlatıldı ve lamel ile kapatıldı.
- Leica DMIL floresan mikroskop ile görüntülendi.

Tablo 3.2.9. Çalışmada kullanılan birincil antikorların özellikleri

| Tanımlanan Hücre / Protein | Antikor | Antijen tanıma | Antikorun sentezlendiği organizma | Antikorun tanıdığı antijen | Ticari firma Katalog numarası |
|----------------------------|------------|----------------|-----------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| Schwann hücresi | S100 | poliklonal | Tavşan | İnsan | Dako Z 0311 |
| Koronin 1A proteini | Koronin 1A | monoklonal | Fare | İnsan | Novus H000111 51-M01 |

3. 2. 10. Mikoplazma boyaması

Amerika “*The Miami Project to Cure Paralysis and the Department of Neurological Surgery, School of Medicine, Miami, Florida*”dan Dr. Wood’un laboratuvarından ve ScienCell firmasından gelen hücrenin kontamine olmadığından emin olmak için önlem olarak mikoplazma varlığı kontrol edildi.

- Lameller üzerinde yetiştirilen hücreler 1XPBS ile yıkandı.
- % 4 lük PFA ile fikse edildi.
- %0,2 TritonX100 ile permabilize edildi.
- 6 kuyucuklu hücre kültür kabı üzerine parafin gerildi ve uygulanacak solüsyonlar parafin üzerine damlatıldı.
- %10 keçi serumu, %10 sığır serum albumin ve %0.1 *Tween* 20/ PBS solüsyonu ile bloke edildi.
- Çekirdeği boyayan DAPI (ana stok 1µg/ml 1/1000 oranında dH₂O ile seyreltilir) ile 1 dakika inkübe edildi.
- “*ProLong Antifade Kit*” kaplama ortamı lama damlatıldı ve lamel üzerine kapatıldı.
- Leica DMIL floresan mikroskop ile görüntülendi.

Mikroskopik incelemesi sonucu mikoplazma (hücre içi paraziti) taşımadığı anlaşılan hücrelerle çalışmaya devam edildi. İmmünfloresan boyanan mikoplazma çekirdekleri diğer hücrelerden daha küçük görünür ve yaygın olarak boyanır.

3. 2. 11. RNA izolasyonu

Hücre kültüründen TRIzol içerisinde – 20 °C’de dondurulan hücreler ve çıkartıldığında 1ml TRIzol bulunan tüplere konarak parçalanıp -80°C saklanan +4 °C buz üzerinde çözüldükten sonra standart TRIzol izolasyon protokolü kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı.

- Buz üzerinde çözünen süspansiyona her 1ml trizol için 200µl kloroform eklendi, ters-düz edilerek iyice karıştırıldı.
- 4°C de 15dk 12.000g’de santrifüj (BOECO CENTRIFUGES U-320 / U-320R) edilerek faz oluşumu sağlandı. Üstte su ile RNA, altta fenol ve kloroform ile DNA ve protein fazı oluşturuldu.
- Üst faz başka tüpe aktarıldı, üzerine başlangıçtaki trizolün %75’i olacak şekilde (1ml trizolün içine 0.75ml etanol) absolu etanol eklendi . 5-6 kez ters-düz edildi. –20 °C’de30dkbuzdolabında inkübe edildi.
- 4°C’de 10dk 12.000g’de santrifüj edilerek RNA nın tüp tabanına çökmesi sağlandı.
- Süpernatant atıldı, pellet %75’lik etanol ile yıkandı(her başlangıç 1ml trizol için 1ml %75’lik etanol) , hafifçe vortekslendi.
- 7.500g’de 4°C’de 5dk santrifüjlendi.
- Süpernatant atıldı,pellet kurutuldu, her bir pelletin üzerine 20µl nükleaz içermeyen su eklendi.
- Bir saat buzda bekletilip konsantrasyonu ölçüldü ve –80 °C de saklandı.

Dokudan RNA edebilmek için;

- Doku içindeki hücrelerin mekanik olarak parçalanması sağlandı. Dokudan alınan parça altı düz steril bir ependorf tüpe aktarıldı ve 250 µl trizol eklendi, homojenizatör ile parçalandı.
- 750 µl trizol daha eklendi.

Sonra standart TRIzol izolasyon protokolü kullanılarak RNA izolasyonu yapıldı.

3. 2. 12. Agaroz jel ile RNA kalite kontrolü

150 ml %1 Agaroz jel:

- RNA kantitasyonu agaroz jel ile elektroforez ile yapıldı. Agaroz jel, denatüran nitelikte olmalıdır, jel içine EtBr konulmamalıdır.

| | |
|----------------------|----------|
| Agaroz (RNA grade) : | 1,5 gr |
| DEPC'li su : | 127,5 ml |
| 10xMOPS : | 15 ml |
| Formaldehyde (%37) : | 8,1 ml |

- Agaroz, su ve MOPS; DEPC'li sudan geçirmiş bir kapta eritildi, ılık kıvama geldikten sonra formaldehit ilave edildi.

Yükleme tamponu:

| | |
|----------------------------------|--------|
| Gliserol(%50) : | 5 ml |
| Na ₂ EDTA (1mM) : | 0,37g |
| BPB(brom-fenol mavisi) (%0.25) : | 0,04 g |

DEPC'li su ile 10 ml'ye tamamlandı, üzerine 1:10 oranında EtBr eklendi.

Agaroz jel ile kalite kontrolü:

| | | |
|--------------------|---|--------|
| RNA | : | 1-5 µg |
| Formaldehyde (%37) | : | 1,5 µl |
| Formamide | : | 4,5 µl |

DEPC'li su ile 10 µl'ye tamamlandı.

- 60°C ye ısıtıldı, 8-10 dakika bekletilip, hızlıca buza alındı,
- Santrifüj edildi, 2 µl yükleme tamponu ve EtBr eklendi,
- Jele yükle, BPB boya jelin 2/3'üne gelene dek 100 Volta yürütüldü.

3. 2. 13. cDNA sentezi

İzole edilmiş RNA molekülünden cDNA elde etmek için “QuantiTect Reverse Transcription Kit” kullanıldı. RNA – 80 °C'den alındı ve RNA'nın zarar görmemesi için buz üzerinde çözülmesi beklendi. RNA konsantrasyonu 1 µg/ml olacak şekilde reaksiyon karışımı hesaplandı.

Reaksiyon karışımı

| | | |
|---------------------------------|---|-------|
| RNAz içermeyen su | : | 11 µl |
| <i>gDNA Wipeout</i> tampon (7X) | : | 2 µl |
| Kalıp RNA (1µg total) | : | 1 µl |

- 42 °C 5 dakika “Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700” cihazında inkübe edildi.
- Reaksiyon bitince tüp buz üzerine alınarak “master mix” eklendi.

“Master Mix”

| | | |
|--|---|-------------|
| Quantiscript RT tampon | : | 4 µl |
| Quantiscript ters Transkriptaz | : | 1 µl |
| <u><i>RealTime Primer</i> karışımı</u> | : | <u>1 µl</u> |
| TOPLAM HACİM | | 20 µl |

- 42°C 30 dakika Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700” cihazında inkübe edildi.
- 95°C 5 dakika Ters Transkriptaz enzimi inaktive edildi.
- cDNA'lar kullanılabileceği kadar – 20 °C'de saklandı.

3. 2. 14. Gerçek Zamanlı (Real Time) PZR

Gerçek zamanlı PZR bir genin ilgili örnekteki ifade düzeyinin nicel ölçümü için uygulanan bir yöntemdir. Her dokuda bazal düzeyde ifade edilen *house keeping* gen ile ilgilenilen genin ifadesi karşılaştırılarak yorum yapılır. *House keeping* gen olarak tümör dokularında ifadesinin bazal düzeyde olduğu bilinen B-Aktin geni kullanılmıştır.

RT-PCR karışımı

| | |
|---|---------------|
| <i>Jump-start Syber-Green</i> karışımı (2X) : | 5 µl |
| MgCl ₂ 25mM : | 1,2 µl |
| <i>Forward Primer</i> (10 pmol/ µl) : | 0,4 µl |
| <i>Reverse Primer</i> (10 pmol/ µl) : | 0,4 µl |
| dH ₂ O : | 1,5 µl |
| <u>cDNA</u> : | <u>1,5 µl</u> |
| TOPLAM HACİM | 10 µl |

- Her örnek için tek reaksiyonda üç/dört tekrar yapıldı.
- “Corbett Rotor Gene 6000” cihazında reaksiyon gerçekleştirildi.

RT-PCR koşulları

| | <u>β-Aktin</u> | <u>S100</u> | | <u>Koronin 1A</u> |
|-------|----------------|-------------|------------|-------------------|
| 94 °C | 2 dakika | 2 dakika | | 94 °C 1 dakika |
| 94 °C | 1 saniye | 1 saniye | } 40 Döngü | 94 °C 1 saniye |
| 61 °C | 15 saniye | 15 saniye | | 60 °C 15 saniye |

3. 2. 15. Agaroz jel elektroforezi

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu kullanarak amplifiye edilen örneklerin baz çifti büyüklüklerinin doğrulanması ve gösterilmesi için % 3'lük Agaroz jel elektroforezi uygulandı.

% 3 Agaroz /TAE (w/v) çözeltisi hazırlanır. DNA bantlarının görünür hale gelebilmesi için Etidium Bromür eklendi.

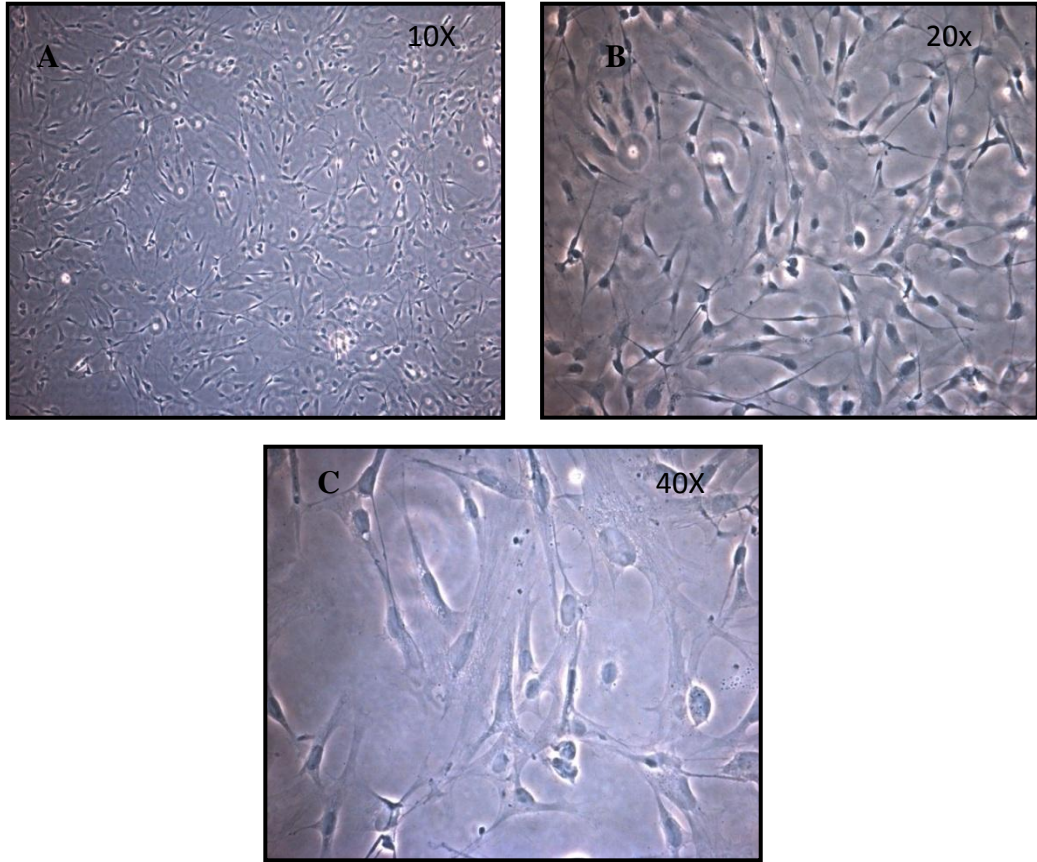
Bant büyüklüklerini anlayabilmek için moleküler ağırlık belirleyicisi kullanıldı. Deneyimizde “50 bp Fermentas DNA ladder” kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Schwann Hücrelerinin Üretilmesi

Kültür ortamına insülin eklenerek Schwann hücrelerinin daha hızlı bölünmesi sağlandı. 3-4 günde bir ortam değiştirildi (57).

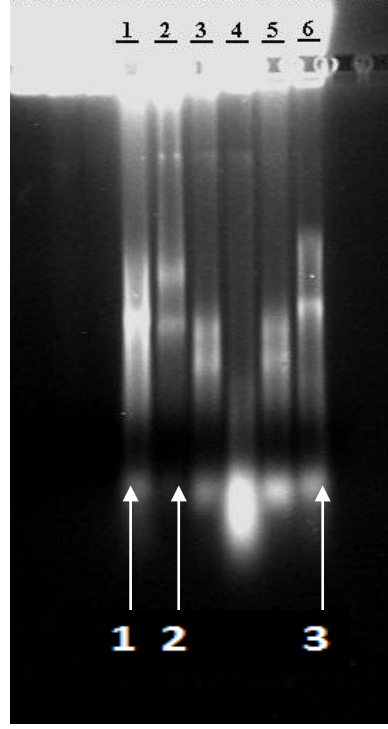
ScienCell firmasından temin edilen hücreler ise üç günde 25 cm² kültür kabını tam doldurdu. Kültür ortamındaki görüntüleri Şekil 4.1.'de verilmiştir.



Şekil 4.1. İnsan normal Schwann hücrelerinin kültür kabındaki görüntüsü.
İnsan normal Schwann hücre kültürünün faz-kontrast mikroskop görüntüsü (A) 10X (B) 20X (C) 40 X

4. 2. Schwann Hücre Kültüründe ve Nörofibrom Dokusunda Koronin 1A Geninin İfadesinin Nicel Analizi

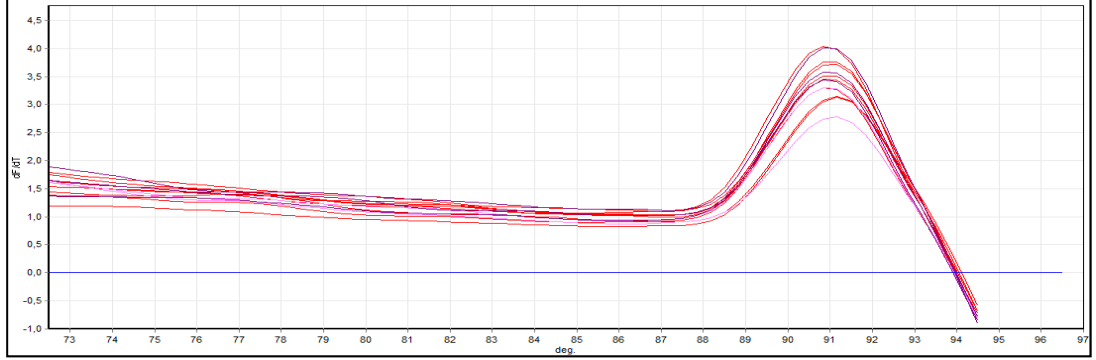
Nörofibrom dokusundan elde edilen RNA'ların kalite kontrolü.



Şekil 4.2.A. Nörofibrom dokusundan izole edilen mRNA örnekleri %1 denatüran agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Agaroz jel elektroforezi sonucunda örnekler için 28S ve 18S rRNA bantları gözlemlendi. Total RNA miktarı spektrofotometrik yöntemle analiz edildi; 260, 280 ve 230nm dalga boylarında absorbans ölçümleri yapıldı, tüm örneklerin 260/280 oranlarının 1,80 ile 1,95, 260/230 oranı ölçümünün 2 ila 2,2 arasında olduğu gözlemlendi. Kaliteli mRNA'lardan cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Schwann hücre kültüründen ve nörofibrom dokusundan elde edilen cDNA'lar bir arada analiz edildi. Bulguların yorumunda Koronin 1A ifade değeri, β -aktin ifade değerine normalize edildi. Koronin 1A'nın nicel analizi için gerekli olan regresyon eğrisi standart dilüsyonlar kullanılarak çizildi.

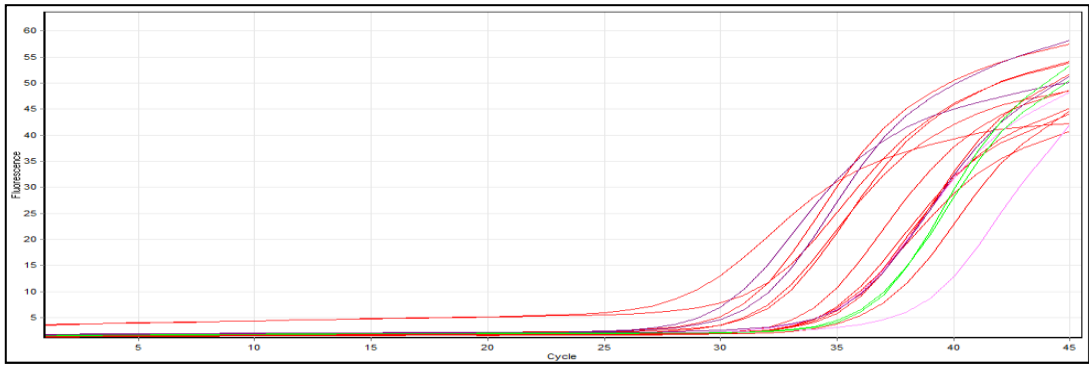
Nicel analiz bulgularına ait amplifikasyon eğrisi, erime eğrisi ve agaroz jel görüntüleri aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.2.B. Koronin 1A erime eğrisi

| |
|---------------------------|
| Kırmızı - Schwann hücresi |
| Pembe-1 |
| Mor - Çıkartıldı |
| Mavi - 2 |
| Yeşil - 3 |
| Siyah - NK |

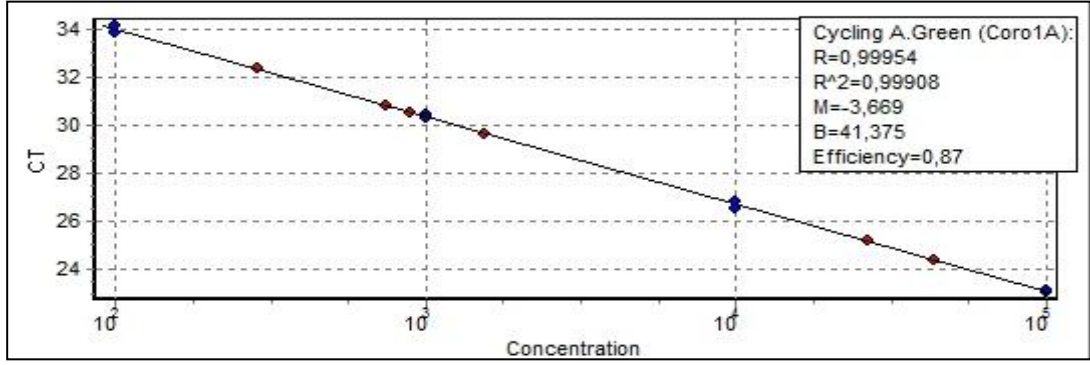
Kırmızı eğriler kontrol olarak kullanılan normal Schwann hücre kültüründen ve pembe, mavi, yeşil eğriler nörofibrom dokusundan elde edilen cDNA'lara aittir. Erime eğrilerinin en üst noktalarının aynı değerde olması reaksiyonun özgül olduğunu gösterdi.



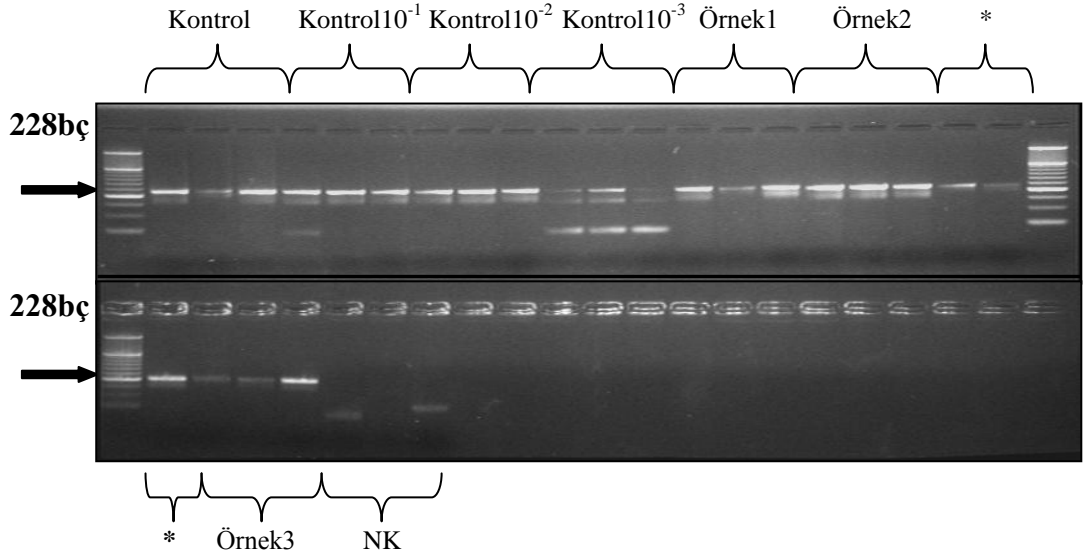
Şekil 4.2.C. Koronin 1A amplifikasyon eğrisi

| |
|---------------------------|
| Kırmızı - Schwann hücresi |
| Pembe-1 |
| Mor - Çıkartıldı |
| Mavi - 2 |
| Yeşil - 3 |
| Siyah - NK |

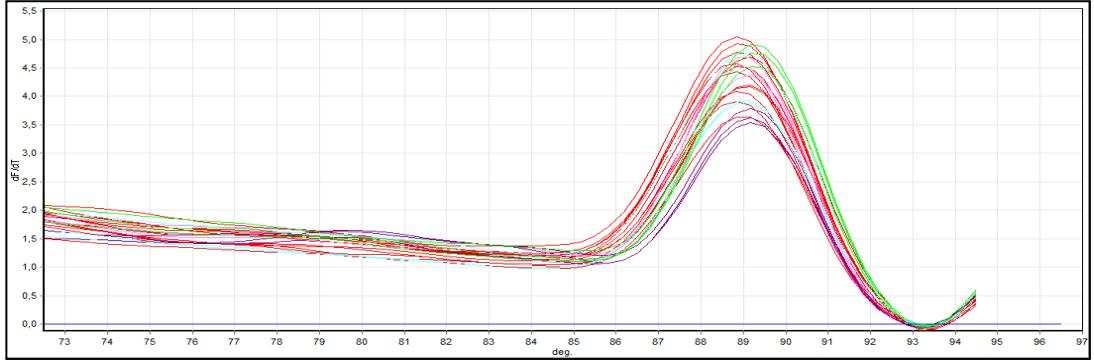
Kırmızı eğriler kontrol olarak kullanılan normal Schwann hücre kültüründen ve pembe, mavi, yeşil eğriler nörofibrom dokusundan elde edilen cDNA'lara aittir. Eşit amplikon sayısına ulaşılan noktalar ile reaksiyon eşiği (threshold) belirlendi.



Şekil 4.2.D. Koronin 1A standart eğrisi. Verimliliği 0,87 olmasına rağmen örnekler standart eğri üzerinde ve standartların arasında olduğundan ($R^2=0,99908$) reaksiyon değerlendirilebilir bulunmuştur.



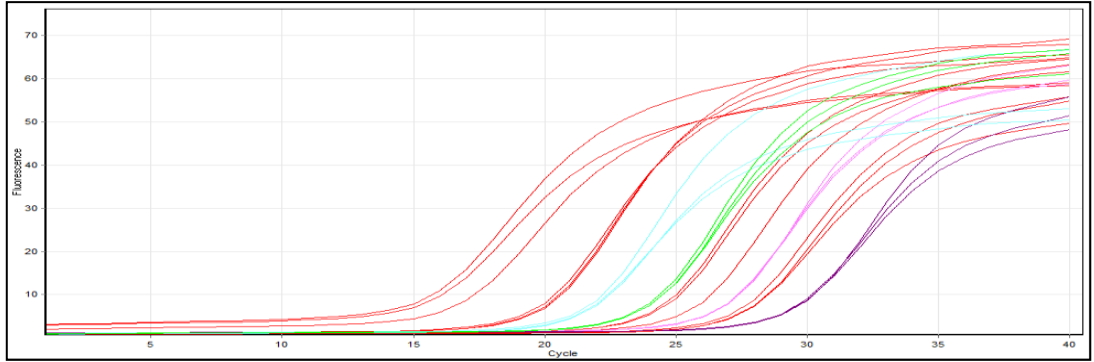
Şekil 4.2.E. Normal Schwann hücrelerinin cDNAsının Koronin 1A primerleri ile RT-PCR'nın agaroz jel elektroforezi görüntüsü; Kontrol olarak kullanılan Schwann hücrelerinden elde edilen cDNA azalan konsantrasyonlarda, nörofibrom dokusundan elde edilen cDNA üç tekrar yapılarak amplifiye edildi. (* çalışmadan çıkartıldı)



Şekil 4.2.F. β -aktin erime eğrisi

| |
|-------------------------|
| Kırmızı - Schwann hücre |
| Pembe-1 |
| Mor - * -Çıkartıldı |
| Mavi - 2 |
| Yeşil - 3 |
| Siyah - NK |

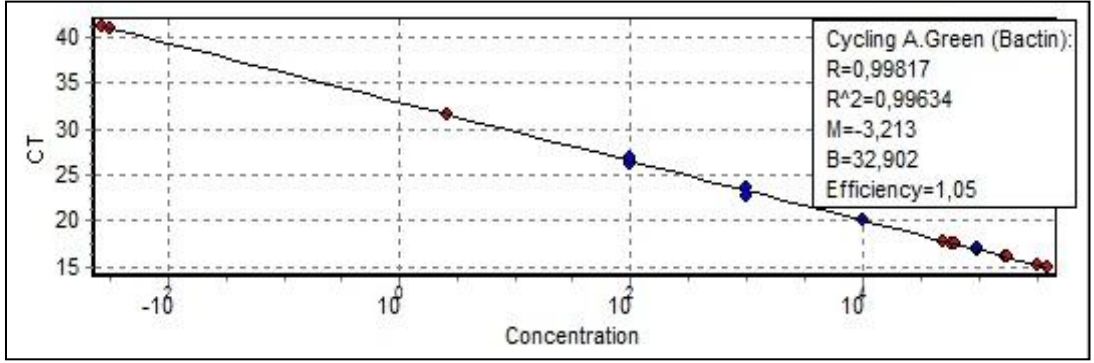
Kırmızı eğriler kontrol olarak kullanılan normal Schwann hücre kültüründen ve pembe, mavi, yeşil eğriler nörofibrom dokusundan elde edilen cDNA'lara aittir. Erime eğrilerinin en üst noktalarının aynı değerde olması reaksiyonun özgül olduğunu gösterdi.



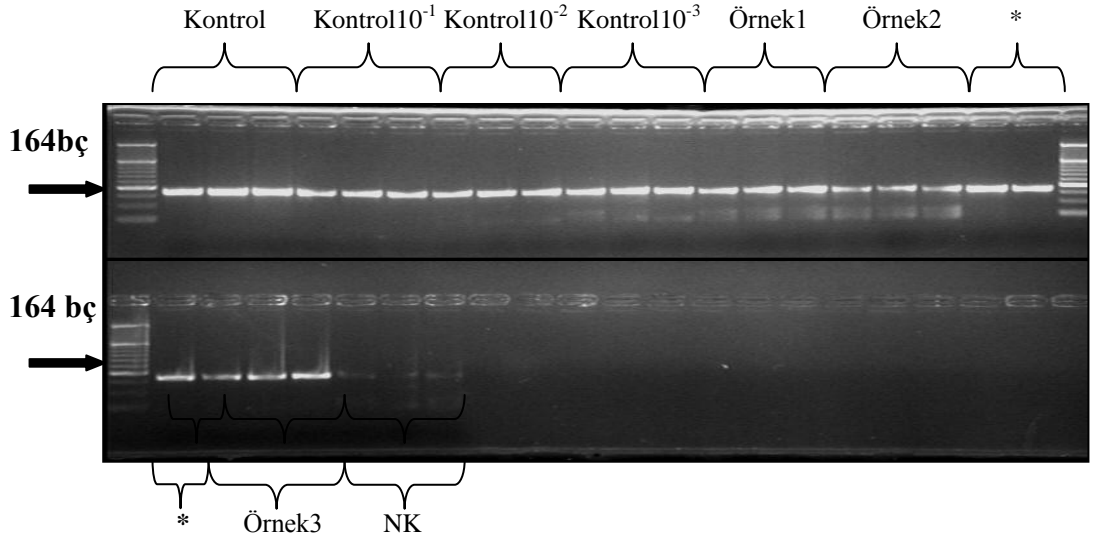
Şekil 4.2.G. β -aktin amplifikasyon eğrisi

| |
|-------------------------|
| Kırmızı - Schwann hücre |
| Pembe-1 |
| Mor - * -Çıkartıldı |
| Mavi - 2 |
| Yeşil - 3 |
| Siyah - NK |

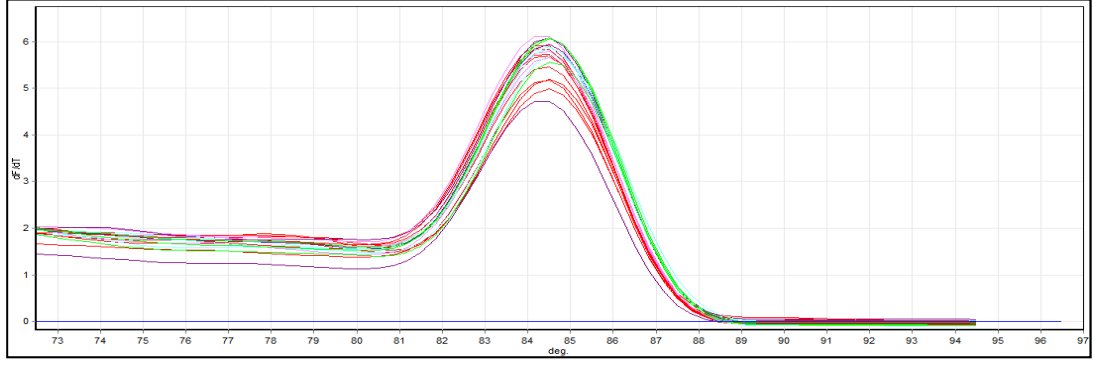
Kırmızı eğriler kontrol olarak kullanılan normal Schwann hücre kültüründen ve pembe, mavi, yeşil eğriler nörofibrom dokusundan elde edilen cDNA'lara aittir. Eşit ampikon sayısına ulaşılan noktalar ile reaksiyon eşiği (threshold) belirlendi. Eşik düzeye önce nörofibrom dokusu cDNA'ları, yaklaşık 5 döngü sonra normal Schwann hücrelerinin cDNA'ları ulaştı. β -aktin ile Koronin 1A ifade farkı karşılaştırılarak ilgili genin ifade düzeyi anlaşıldı.



Şekil 4.2.H. β -aktin standart eğrisi Verimliliği 1,05 , $R^2=0.99817$,örnekler standart eğri üzerinde ve standartların arasında olduğundan reaksiyon değerlendirilebilir bulunmuştur.



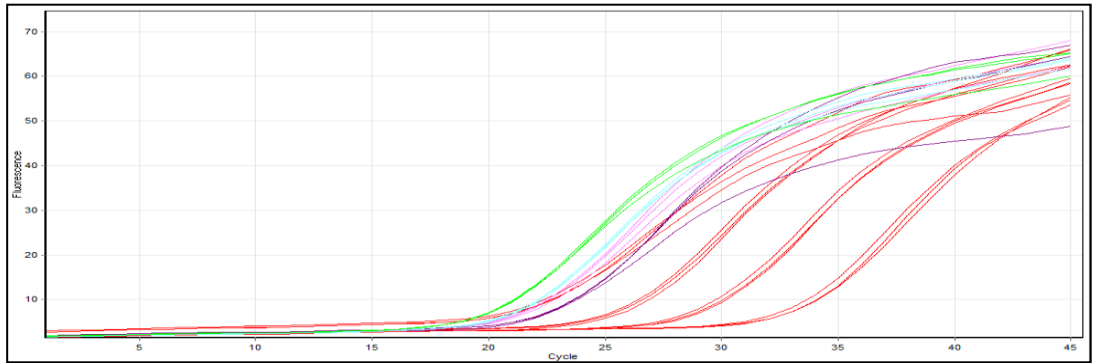
Şekil 4.2.I.Nörofibrom dokusunun cDNAsının β -aktin primerleri ile RT-PCR'nın agaroz jel elektroforezi görüntüsü; Kontrol olarak kullanılan Schwann hücrelerinden elde edilen cDNA azalan konsantrasyonlarda, nörofibrom dokusundan elde edilen cDNA üç tekrar yapılarak amplifiye edildi. (* çalışmadan çıkartıldı)



Şekil 4.2.J. S100 erime eğrisi

| |
|------------------------|
| Kırmızı -Schwann hücre |
| Pembe-1 |
| Mor - * -Çıkartıldı |
| Mavi - 2 |
| Yeşil - 3 |
| Siyah - NK |

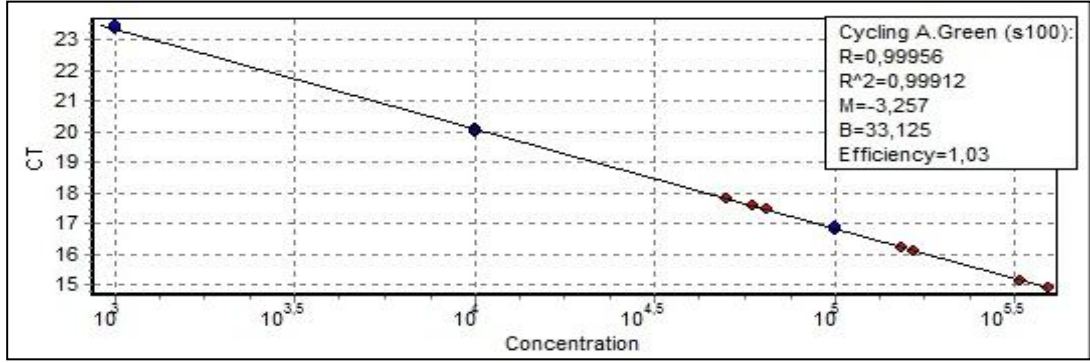
Kırmızı eğriler kontrol olarak kullanılan normal Schwann hücre kültüründen ve pembe, mavi, yeşil eğriler nörofibrom dokusundan elde edilen cDNA'lara aittir. Erime eğrilerinin en üst noktalarının aynı değerde olması reaksiyonun özgül olduğunu gösterdi.



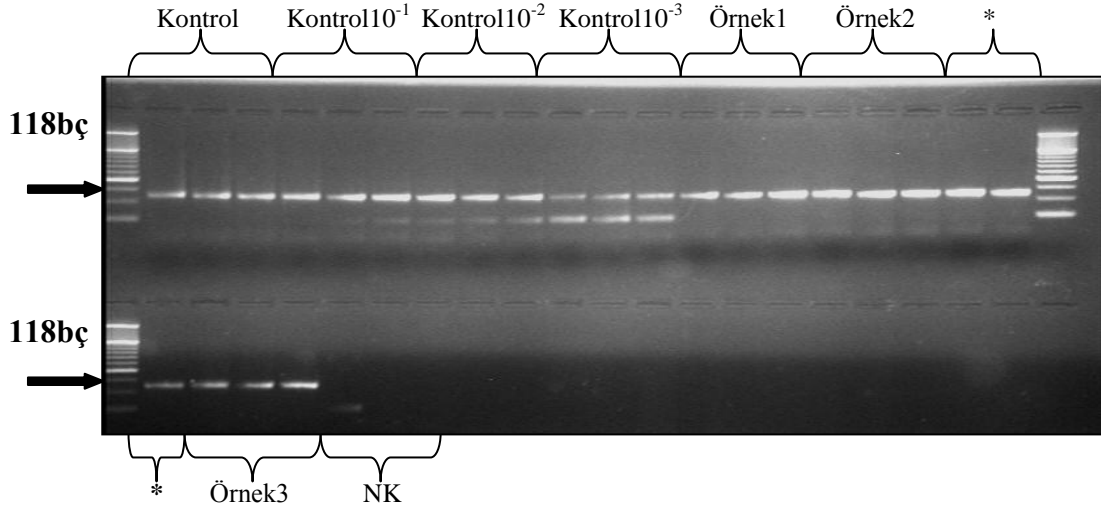
Şekil 4.2.K. S100 amplifikasyon eğrisi

| |
|------------------------|
| Kırmızı -Schwann hücre |
| Pembe-1 |
| Mor - * -Çıkartıldı |
| Mavi - 2 |
| Yeşil - 3 |
| Siyah - NK |

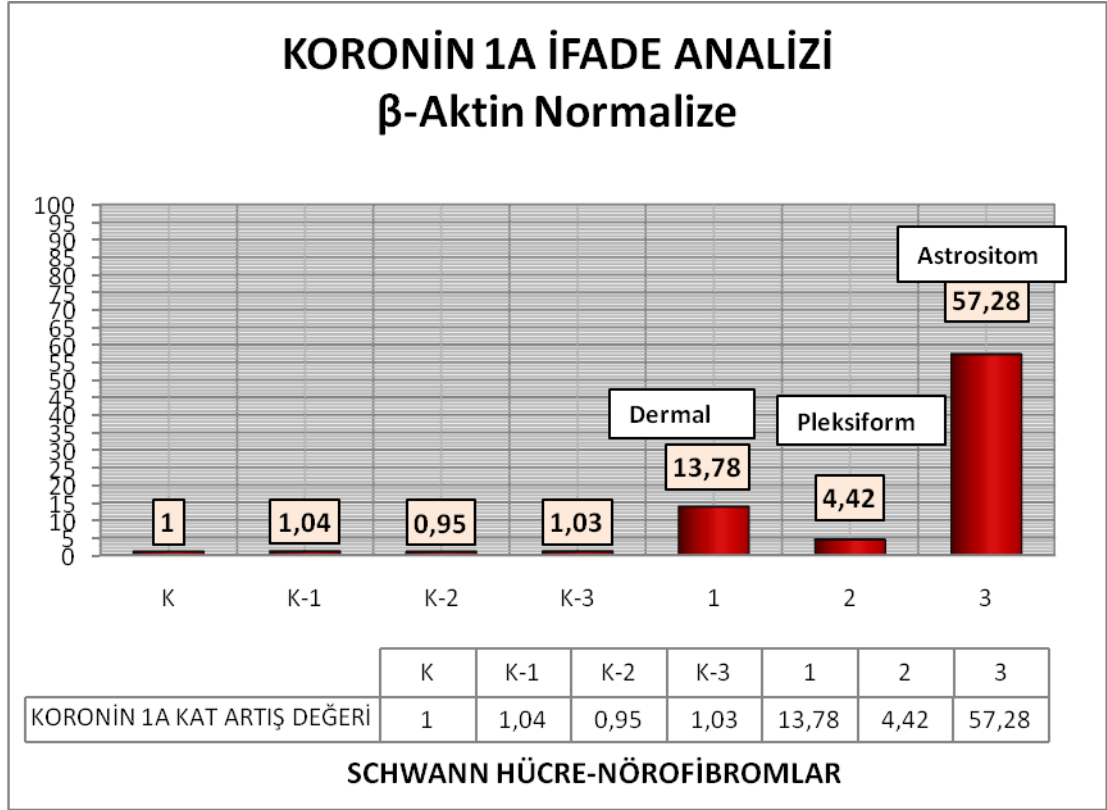
Kırmızı eğriler kontrol olarak kullanılan normal Schwann hücre kültüründen ve pembe, mavi, yeşil eğriler nörofibrom dokusundan elde edilen cDNA'lara aittir. Eşit amplikon sayısına ulaşılan noktalar ile reaksiyon eşiği (threshold) belirlendi. Eşik düzeyine önce nörofibrom dokusu cDNA'ları, yaklaşık 5 döngü sonra normal Schwann hücrelerinin cDNA'ları ulaştı. β -aktin ile S100 ifade farkı karşılaştırılarak ilgili genin ifade düzeyi anlaşıldı.



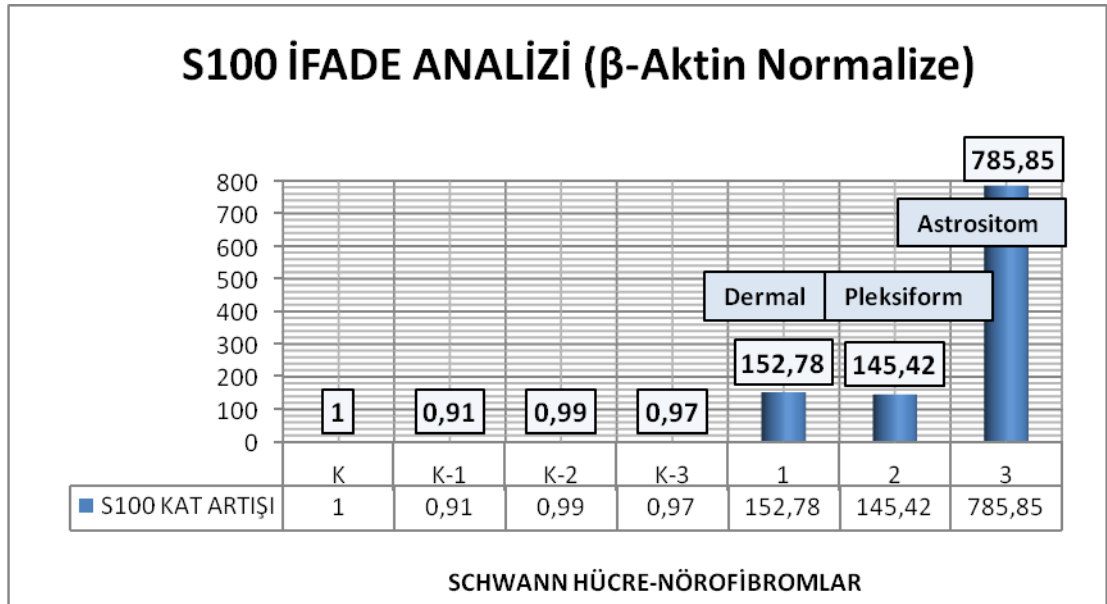
Şekil 4.2.L. S100 standart eğrisi. Verimliliği 1,03 , $R^2=0,99912$,örnekler standart eğri üzerinde ve standartların arasında olduğundan reaksiyon değerlendirilebilir bulunmuştur.



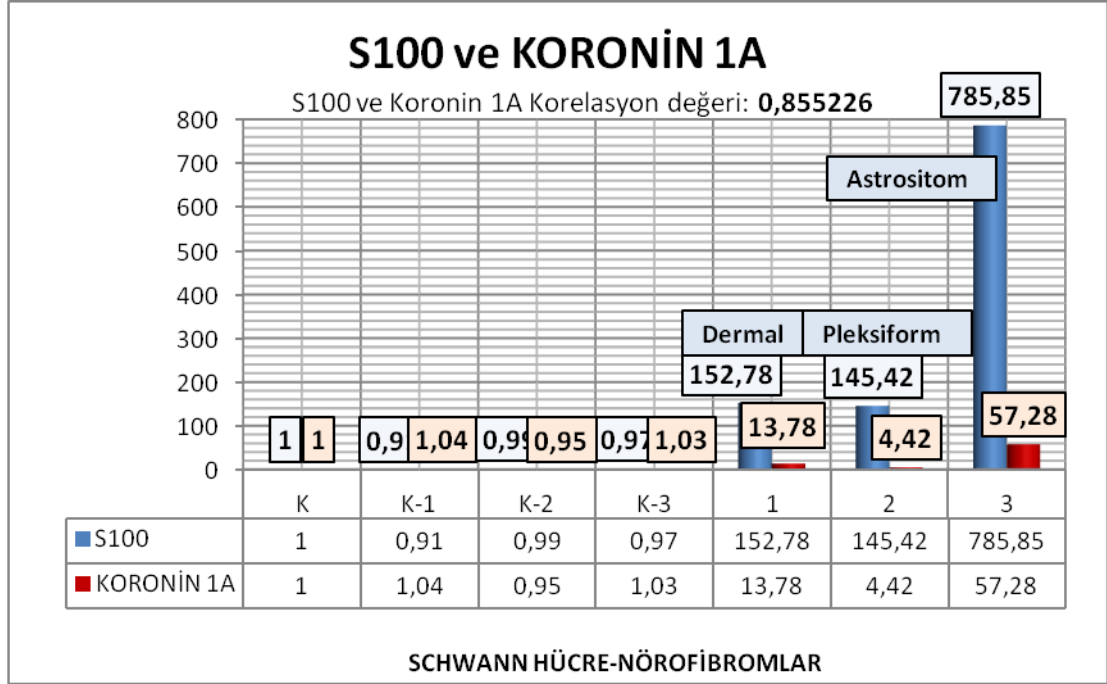
Şekil 4.2.M.Nörofibrom dokusunun cDNAsının S100 primerleri ile RT-PCR'nın agaroz jel elektroforezi görüntüsü; Kontrol olarak kullanılan Schwann hücrelerinden elde edilen cDNA azalan konsantrasyonlarda, nörofibrom dokusundan elde edilen cDNA üç tekrar yapılarak amplifiye edildi. (* çalışmadan çıkartıldı)



Şekil 4.2.N. Koronin 1A ifade analizi. Nörofibromda Koronin 1A'nın ifadesi Schwann hücre kültüründeki Koronin 1A'nın ifadesine göre 4,42-57,28 kat daha fazladır.



Şekil 4.2.O. S100 ifade analizi. Nörofibromda S100'ün ifadesi Schwann hücre kültüründeki S100 ifadesine göre 145,42 – 785,85 kat daha fazladır.

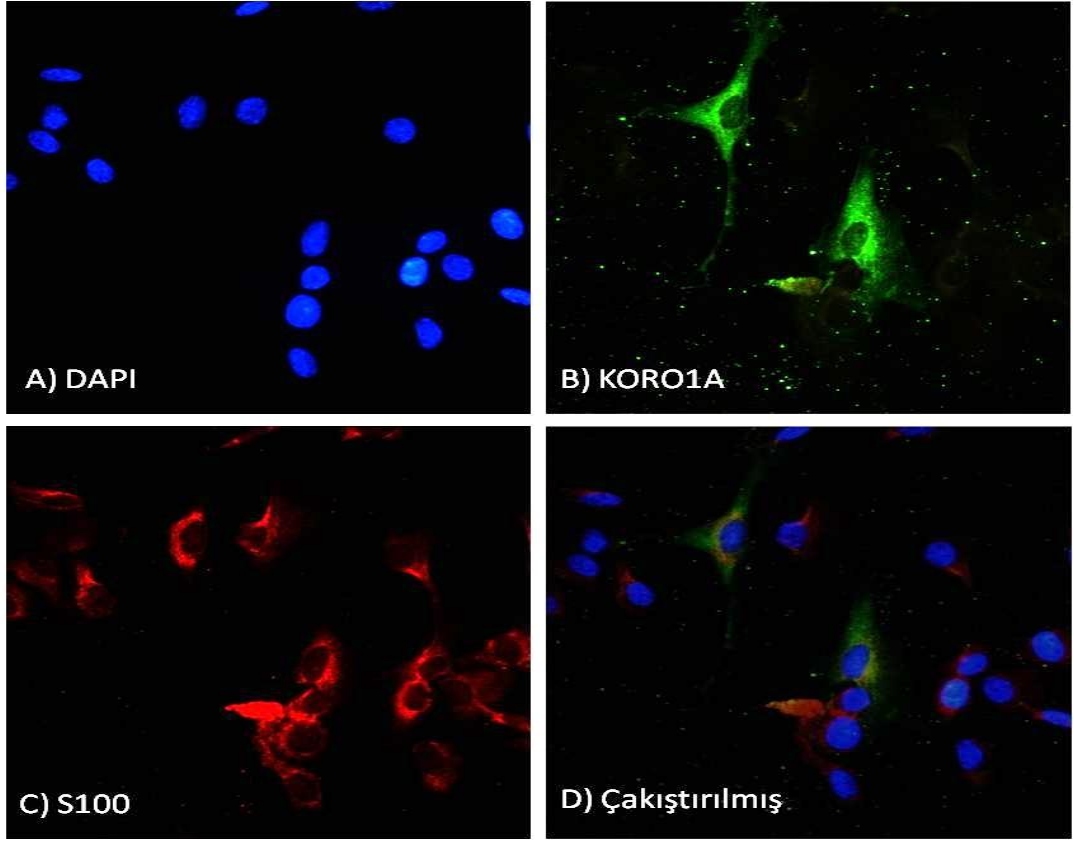


Şekil 4.2.P. S100 ve Koronin 1A korele artış grafiği. Nörofibromda S100 ve Koronin 1A'nın ifadeleri kontrol Schwann hücrelerine göre korele bir şekilde artmaktadır. Korelasyon değeri 0,855226 dır. Schwann hücre belirteci S100 ve Koronin 1A'nın birlikte artışı Koronin 1A ifade eden hücrelerin dokudaki Schwann hücreleri olduğunu desteklemektedir.

4. 3. Schwann Hücrelerinde Koronin 1A'nın Varlığı ve Yerleşimi

Tez çalışmamızda Schwann hücreleri "*chamber slide*" üzerinde üretilerek boyamaya hazırlandı. Deneyler için, 3. ve 4. pasajdaki normal Schwann hücre kültürleri kullanıldı. Schwann hücrelerinde Koronin 1A'nın varlığı ve yerleşiminin belirlenmesi için S100 ve Koronin 1A antikorları ile birlikte boyama yapıldı.

Kültüre edilmiş hücreler Schwann hücre belirteci S100 ve Koronin 1A'ya özgü antikorlar ile immünfloresan olarak boyandığında; S100 ve Koronin 1A'nın perinükleer alan başta olmak üzere sitoplazmada boyandığı görülmüştür (Şekil 4.3)



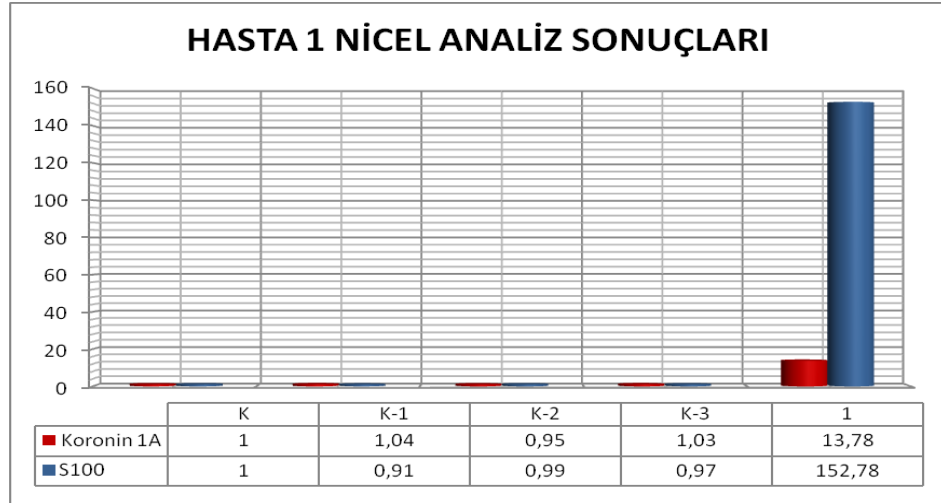
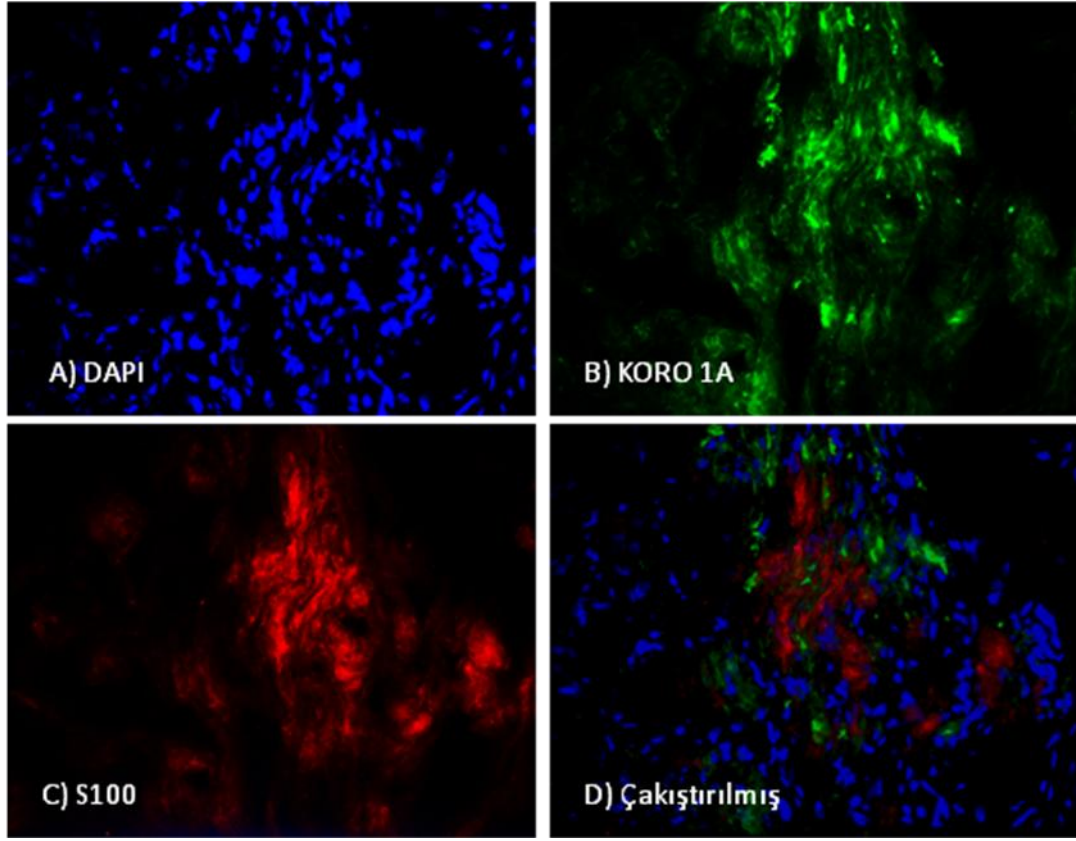
Şekil 4.3. İnsan Schwann hücrelerinin immünfloresan boyaması

A) Mavi nükleer DAPI B) Koronin 1A ile zayıf granüler boyanma C) S100 ile Schwann hücreleri D) Çakıştırılmış. Koronin 1A ve S100 çakıştırıldığında Koronin 1A'nın Schwann hücrelerinin başlıca perinükleer bölgede olmak üzere sitoplazmik boyandığı görülmüştür (40X).

4. 4. Nörofibrom Dokusundaki Schwann Hücrelerinde Koronin 1A'nın Varlığı ve Yerleşimi

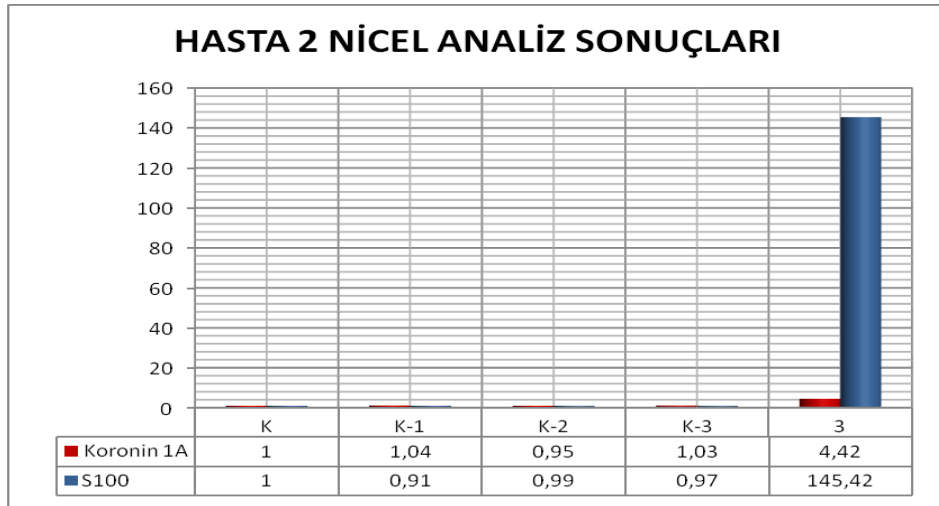
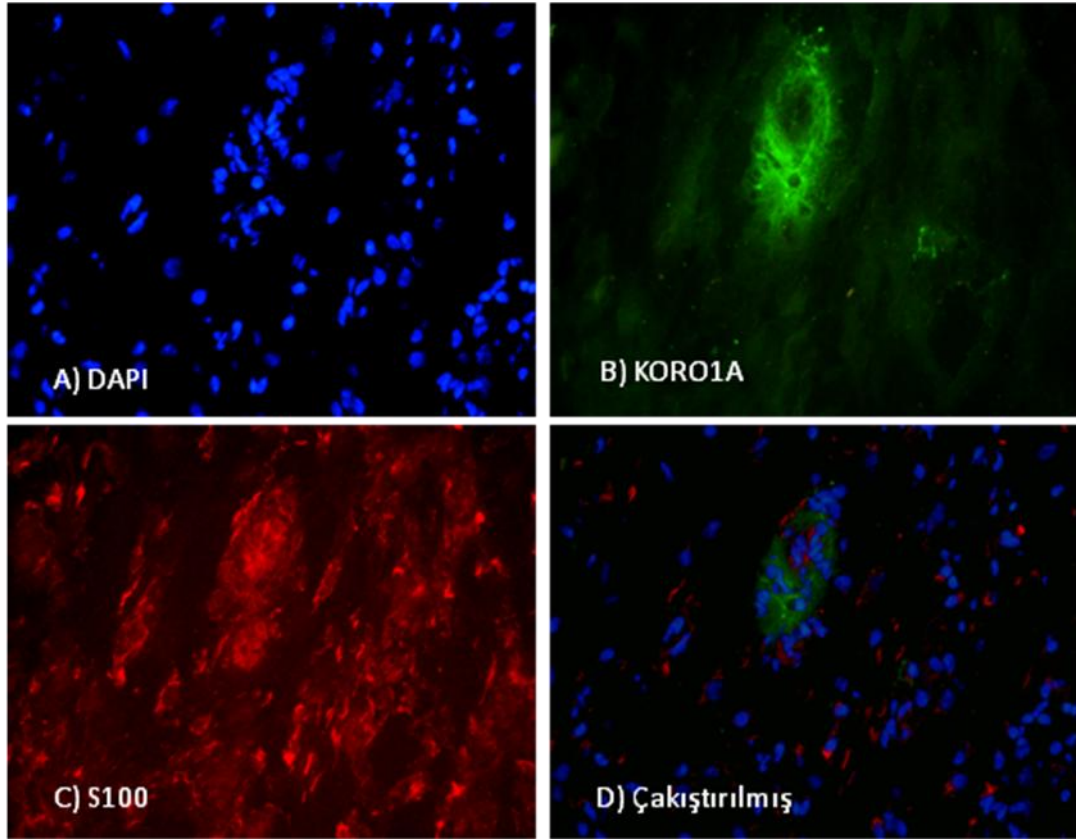
Tez çalışmamızda Schwann hücrelerinin immünfloresan boyanmasına benzer olarak nörofibrom dokusu kesitlerinin boyamalarında da Koronin 1A'nın varlığı gözlemlendi. Nörofibrom dokusu preparatlarından alınan immünfloresan mikroskop görüntüsü aşağıda sırası ile verilmiştir (Şekil 4.4-A-B-C). İmmünfloresan görüntüler nicel analiz sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

4.4.A. Hasta 1-Dermal Nörofibrom



Şekil 4.4.A. Hasta 1-İnsan nörofibrom tümör dokusunun (1.örnek) immünfloresan boyamasıve ifade analizi ile yorumlanması (40X).
A) Mavi nükleer DAPI B) Koronin 1A ile zayıf granüler boyanma C) S100 ile Schwann hücreleri D) Çakıştırılmış. Koronin 1A S100 çakıştırıldığında Koronin 1A'nın S100 ile lokalize boyandığı görülmüştür.

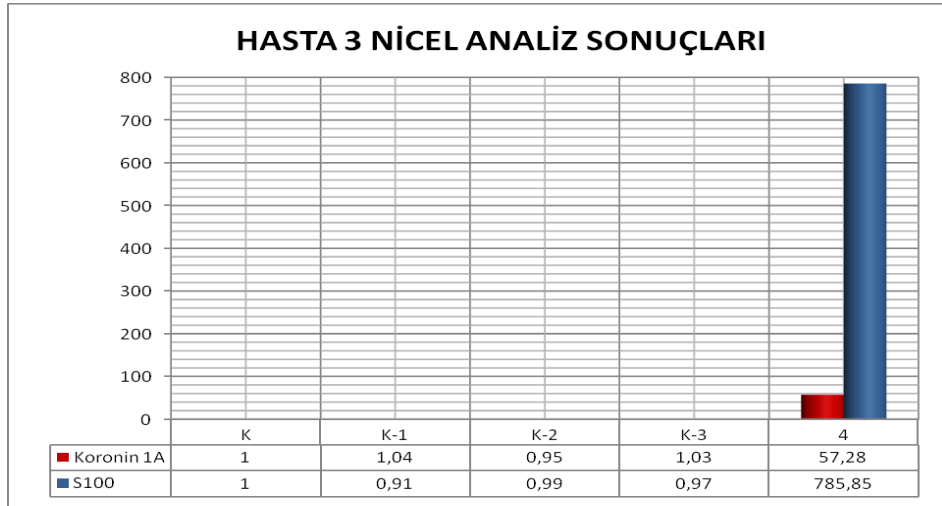
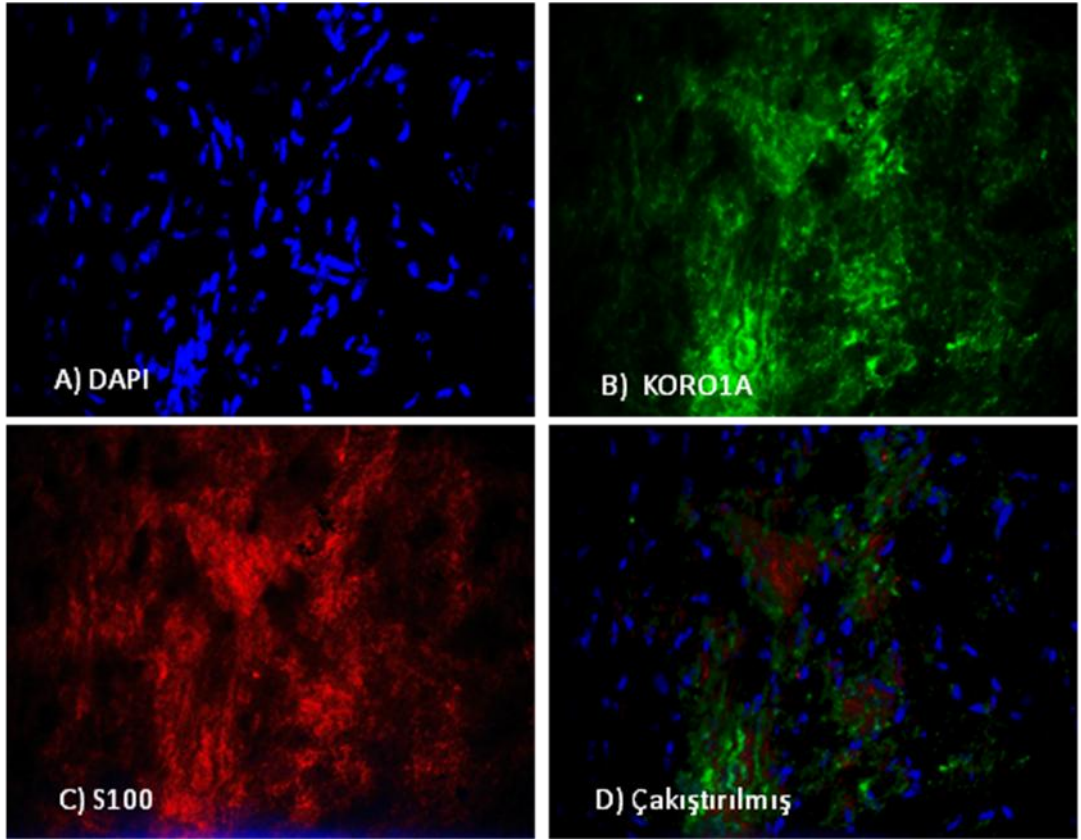
4.4.B. Hasta 2-Pleksiform Nörofibrom



Şekil 4.4.B. Hasta 2-İnsan pleksiform nörofibrom tümör dokusunun (2.örnek) immünfloresan boyanması ve ifade analizi ile yorumlanması (40X).

A) Mavi nükleer DAPI B) Koronin 1A ile zayıf granüler boyanma C) S100 ile Schwann hücreleri D) Çakıştırılmış. Koronin 1A S100 çakıştırıldığında Koronin 1A'nın S100 ile lokalize boyandığı görülmüştür.

4.4.C. Hasta 3-Pilositik Astrositom



Şekil 4.4.C. Hasta 3-İnsan pilositik astrositom dokusunun (3.örnek) immünfloresan boyanması ve ifade analizi ile yorumlanması (40X).

A) Mavi nükleer DAPI B) Koronin 1A ile zayıf granüler boyanma C) S100 ile Schwann hücreleri D) Çakıştırılmış. Koronin 1A S100 çakıştırıldığında Koronin 1A'nın S100 ile lokalize boyandığı görülmüştür.

5. TARTIŞMA

Nörofibromatozis Tip 1 (NF1: MIM # 162.200) insan sinir sistemini etkileyen hastalıklar içerisinde en sık gözlenen tek gen hastalığıdır. Nörofibromatozis Tip 1(NF1, diğer adı da Von Recklinghausen hastalığı), görülme sıklığı 1/3500 olan, deride pigmentasyon bozuklukları (“Café-au-lait” lekeler, koltuk altı ve kasık bölgelerinde çillenme), iskelet ve kardiyovasküler sistem bozuklukları (skolyoz, hipertansiyon), lisch nodülü, sinir sisteminde tümörleşmeye yatkınlıkla karakterize, otozomal dominant kalıtılan bir hastalıktır. Merkezi sinir sistemi (optik gliom) ve periferik sinir sisteminde (nörofibrom) tümörleşmeye sebep olduğu için kansere yatkınlık sendromu olarak da adlandırılır (1-4). *Nf1* geninde oluşan mutasyonlar ile *Nf1* geni ürünü nörofibrominin yapısı değişir ve Nörofibromatozis tip 1 hastalığı ortaya çıkar (7).

Nörofibromin, hem Ras, hem de cAMP yolları aracılığıyla, nöronal aktiviteler başta olmak üzere çeşitli hücrel aktiviteleri düzenler (5). Nörofibrominin Ras sinyal yolağı üzerinden hücre çoğalmasını nasıl kontrol ettiği ve hangi proteinlerin bu mekanizmada yer aldığı bilinmektedir (6,11,12).

PKC'nin Koronin 1B'yi fosforlayarak hücre iskeleti proteinlerinden aktin filamentlerinin yapılanmasını düzenlediği daha önceki çalışmalarla kanıtlanmıştır (58). Benzer şekilde Koronin 1A'nın aktin dinamikleri üzerindeki etkisi bir çok çalışmada gösterilmiştir fakat NF1'de bu molekül ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır.

Koronin 1A, aktine bağlanır ve aktin yapısının korunmasını sağlar (40). Aktin iskeletinin yeniden yapılanmasında ve aktin iskelet ile ilişkili hücrel aktivitelerde (hücre hareketi, sitokinez, fagositoz) rol oynar (40, 41).

NF1'in yaygın bulgularından olan nörofibromlar periferik sinir sistemi dokusunda Ras sinyal yolağının kontrolünün bozulması nedeniyle ortaya çıkan hücrel heterojenite gösteren iyi huylu tümörlerdir. Literatürdeki çalışmalarda

nörofibromun köken aldığı hücrelerin *Nf1*-/- Schwann hücreleri olduğu gösterilmiştir (17, 19, 22). Bu nedenle tümörlerde Schwann hücreleri üzerine yapılan çalışmalar nörofibrom ve tümörleşme süreci ile ilgili bilgi verebilmektedir. Literatürde NF1 ile ilişkili tümör dokularının kontrolü olarak insan normal Schwann hücreleri ve daha az sayıda da normal dermal doku kullanılmıştır.

Tez çalışmamızda hücre kökenlerini dikkate alarak daha sağlıklı sonuç alacağımızı düşündüğümüz normal Schwann hücrelerini kontrol olarak kullandık.

Bulgular, NF1 ile ilişkili tümör dokularında Koronin 1A ve S100 ifadesinin (β -Aktin *house-keeping* genine normalize edildiğinde), Schwann hücre kültüründeki ifadelerinden daha yüksek olduğunu göstermiştir. İki proteinin artış düzeyine bakıldığında aralarında korelasyon görülmüştür. Bu korelasyon NF1 ile ilişkili tümör dokularında Schwann hücrelerinin artışı ile Koronin 1A ifadesinin arttığını, Koronin 1A'nın Schwann hücrelerinde ifade edildiğini desteklemektedir. Farklı tipte lenfomalar arasında ifadesi farklılık gösteren Koronin 1A'nın nörofibromlar arasında da farklı olup olmadığı araştırılmak istenmiştir fakat pleksiform, astrositom ve dermal nörofibrom sayısı böyle bir sonuca varmak için yetersiz kalmıştır.

Tez çalışmamızın diğer basamağı olarak Schwann hücreleri S100 ve Koronin 1A özgül antikorları ile eş zamanlı olarak boyandığında; Koronin 1A hücre kültüründen elde edilmiş insan normal Schwann hücrelerinde sitoplazmik boyanma ile görülmüştür. Bu Koronin 1A'nın hem plazma membranının altında ve sitozolde ARP2/3, hücre korteksinin distalinde ise Kofilin ile birlikteliğini desteklemektedir. NF1 ile ilişkili tümör dokularında ise Koronin 1A S100 ile örtüşen ve soluk boyanan bir düzen göstermiştir. Nörofibromların Schwann hücrelerinden oluştuğu bir çok çalışmada gösterilmiştir. S100 'e özgül antikorlarla yapılan doku boyamalar yaygın boyama düzeni göstermiştir. S100 ile boyanan bu bölgeler aynı zamanda Koronin 1A'ya özgül antikorlarla da boyanma düzeni göstermiştir. S100 ile boyanmayan alanlarda Koronin 1A'nın boyanma nedeni NF1 ile ilişkili tümör dokularının heterojenitesinden kaynaklanabilir. Bu durumun üstesinden gelmek için biyopsilerin ortak bir teknikle ve standart işlem ile alınması gerekir. (9 doku ile başlanan tez

çalışması sırasında tümör örneklerinin ulaşımından doğan problemler neticesinde 6 örnek çalışmamızdan çıkarılmıştır.) ve immünfloresan boyama için alınan kesit ile RNA izole edilen örnek en yakın bölgeden seçilmelidir. Aynı zamanda heterojenitenin daha net anlaşılabilmesi için tümör örneklerinin 2-4 parçaya ayırılarak her parçanın eş zamanlı çalışılmasının yerinde olacağı sonucu ortaya çıkmıştır.

Koronin 1A'nın yüksek konsantrasyonda bulunması hücre membranının altında yeni filament oluşumunda ARP2/3' ün aktivitesinin sağlanmasını (Koronin 1A tarafından filament bölgesine getirilip serbest bırakılan Arp2/3 aktin filamenti nükleolizasyonuna başlar), hücre korteksinin distalinde ise Kofilinin depolimerizasyon işlevini yerine getirememesine neden olduğu düşünülmektedir (28). Benzer bir çalışmada Koronin'in mutant olduğu T-Lenfositlerde F-Aktin/G-Aktin oranının F-Aktin lehine döndüğü gösterilmiştir. F-Aktin oluşumu tümör oluşumunda önemli rol oynamaktadır (59). Normal hücrede kontrol altında olan aktin yapılanması tümör hücrelerinde bozulduğu için hücrede aktin filamentlerinin dallanması artıyor olabilir. Bunun sonucu hücrelerin uzantılar çıkararak dallanıp sitoplazmik olarak aşırı büyümesine nörofibromdaki dağınık hücresel yapının ortaya çıkmasına neden olabilir.

NF1 ile ilişkili tümör dokularında Koronin 1A gen ifadesinin normal Schwann hücresinden daha yüksek olmasının bir başka sebebi de tümör dokusundaki hücrelerin olgunlaşmasını tamamlamamış karakterde ya da farklılaşma kaybına uğramış olması olabilir (8). Ayrıca NF1 tümör dokularında farklı kökenlerden gelen Schwann hücreleri ve diğer hücreler bulunmaktadır. Tümör mikroçevresinde gerçekleşen sinyal iletimi ve çoğalma özellikleri kültürdeki Schwann hücrelerinden farklı olabilir.

NF1 ile ilişkili tümör dokularında S100 gen ifadesinin normal Schwann hücresinden daha yüksek olmasının sebebi ise hücre kültüründeki proliferen olan hücre ile tümör dokusunda farklılaşma kaybına uğramış hücrelerden kaynaklanabilir. S100 ifade düzeyinin dokularda farklı koşullar altında artış gösterdiği daha önce

gösterilmiştir. Ayrıca tek Schwann hücre kültürü ve Dorsal Kök Gangliyon Nöronu/Schwann hücre ko-kültürü karşılaştırıldığında S100B ifadesinin ko-kültürde arttığı gösterilmiştir.

Literatürde NF1 ile ilişkili tümör dokularında ve Schwann hücrelerinde Koronin ailesi proteinleriyle ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda Koronin 1A'nın NF1 ile ilişkili tümör dokularında ve insan normal Schwann hücrelerinde varlığı ve ifade düzeyi ilk kez gösterilmiştir.

Koronin 1A proteininin tümör dokusundaki Schwann hücrelerinde, normal Schwann hücresinden daha az olmasının nedenleri ve tümör oluşumundaki rolü fazla sayıda tümör örneğinde daha ayrıntılı araştırmalar yapılarak netleştirilebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Koronin 1A'nın Schwann hücrelerinde *housekeeping* gen kadar, bazal düzeyde ifade edildiği bulunmuştur.
- Beklediğimiz gibi nörofibromdaki Koronin 1A gen ifadesi normal Schwann hücresinden farklı bulunmuştur. Nörofibromdaki Koronin 1A ifadesinin insan normal Schwann hücrelerine göre 4,42-57,28 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Nörofibromdaki S100 ifadesinin insan normal Schwann hücrelerine göre 145,42 – 785,85 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir. Schwann hücre belirteci olan S100 proteininin neoplastik hücrelerde ifade düzeyinin arttığı dikkat çekmiştir.
- Koronin 1A'nın NF1 ilişkili tümör dokularındaki Schwann hücrelerinde, normal Schwann hücrelerinden daha düşük ifade edildiği gösterildi. Farklı tipte lenfomalar arasında ifadesi farklılık gösteren Koronin 1A'nın nörofibromlar arasında da farklı olup olmadığı araştırılmak istenmiştir ancak elde edilebilen tümör sayısı yetersiz kalmıştır.
- Tümör malinitesiyle Koronin 1A'nın ilişkisinin araştırılması için fazla sayıda farklı NF1 tümör dokuları (dermal, pleksiform nörofibromlar, malin periferik sinir kılıfı tümörleri) ile yapılacak bir çalışma yararlı olacaktır.
- Gen ifadesi çalışmalarının yanı sıra fosforilasyonla kontrol edilen Koronin 1A'nın hücre içinde fosforilasyon durumunun ve Koronin 1A'nın etkileşime girdiği proteinlerin gösterilmesi için immün çöktürme çalışmasının yapılması tümör oluşumundaki rolü hakkında daha bilgi verici olabilecektir.

KAYNAKLAR

1. Brems H., Beert E., de Ravel T., Legius E. (2009) Mechanisms in the pathogenesis of malignant tumours in neurofibromatosis type 1. *Lancet Oncology* , 10: 508–15.
2. Le L. Q., Parada L. F. (2007) Tumor microenvironment and neurofibromatosis type 1 : connecting the GAPs. *Oncogene* 0950-9232/07.
3. Yi-Ping H., (2007) Neurofibromin signaling and synapses. *Journal of Biomedical Science* 14:461–466.
4. NIH consensus development conference. (1988) [Bildiri].
5. Shen M. H., Harper P. S., Upadhyaya M. (1996) Molecular genetics of neurofibromatosis type 1 (NF1). *J Med Genet*; 33:2-17
6. Cichowski K., Jacks T (2001) NF1 tumor suppressor gene function narrowing the GAP. *Cell* 104(4) 593-604.
7. Viskochil D. H.,Fults D. W.,Couldwell W. T. (2006) Molecular, genetic, and cellular pathogenesis of neurofibromatosis and surgical implications *Neurosurgery* 58:1-16.
8. Ohgaki H., Kleihues P. (2009). Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Science* 100 (12): 2235. doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01308.x.
9. Li Y., O’Connell P., Breidenbach H. H., Cawthon R., Stevens J., Xu G. ve diğ erleri (1995) Genomic organization of the neurofibromatosis 1 gene (NF1). *Genomics* 25:9–18.
10. Viskochil D. (2002) Genetics of Neurofibromatosis 1 and the NF1 Gene. *J Child Neurol* 17; 562.
11. Trovo-Marqui A.B., Tajara E.H. (2006) Neurofibromin: a general outlook. *Clinical Genetics* 70:1-13.
12. Scheffzek K., Ahmadian M. R., Wiesmüller L., Kabsch W., Stege P., Schmitz F. ve Wittinghofer A. (1998) Structural analysis of the GAP-related domain

from neurofibromin and its implications. *The EMBO Journal* Vol.17 No.15 pp.4313–4327.

13. Ratner N., Carroll S. T. (2008) How Does the Schwann Cell Lineage Form Tumors in NF1? *Glia* 56: 1590-1605.
14. Lévy P., Bièche I. ve diğerleri (2004) Molecular Profiles of Neurofibromatosis Type 1-Associated Plexiform Neurofibromas: Identification of a Gene Expression Signature of Poor Prognosis. *Clinical Cancer Research* 3763Vol. 10, 3763–3771, June 1.
15. McLaughlin, M.E., Jacks, T.(2002) Thinking beyond the tumor cell: Nf1 haploinsufficiency in the tumor environment. *Cancer Cell*, 408-410.
16. Bhatheja K., Field J. (2006) Schwann cells: Origins and role in axonal maintenance and regeneration. *IJBC* 38 1995–1999.
17. Brossier N.M, Carroll S.L. (2012) Genetically engineered mouse models shed new light on the pathogenesis of neurofibromatosis type I-related neoplasms of the peripheral nervous system. *Brain Res Bull.* 2012 May 1;88(1):58-71. Epub 2011 Aug 10.
18. Schäfer B.W., Heizmann C.W. (1996) The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem. Sci.* 21 134-140.
19. Donato R. (1999) Functional roles of S100 proteins, calcium-binding proteins of the EF-hand type. *Biochimica et Biophysica Acta* 1450 191-231.
20. Gutmann D.H., Geist R. T., Wright D. E., Snider W. D. (1995) Expression of the Neurofibromatosis 1 (NF1) Isoforms in Developing and Adult Rat Tissues. *Cell Growth & Differentiation*,Vol. 6, 3 15-323.
21. Reed N., Gutmann D. H. (2001) Tumorigenesis in neurofibromatosis: new insights and potential therapies. *Trends in Molecular Medicine* Vol.7 No.4.
22. Muir D., Neubauer D., Lim I. T., Anthony T. Y., WallaceM. R. (2001) Tumorigenic properties of neurofibromin-deficient neurofibroma Schwann cells. *AmJ Pathol*: 158 (2): 501–513.

23. Wu M., Wallace M. R., Muir D. (2005) Tumorigenic properties of neurofibromin-deficient Schwann cells in culture and as syngrafts in Nf1 knockout mice. *J Neurosci Res*: 82 (3): 357–367.
24. Rutkowski J. L., Wu K., Gutmann D. H., Boyer P. J., Legius E. (2000) Genetic and cellular defects contributing to benign tumor formation in neurofibromatosis type 1. *Human Molecular Genetics*, Vol 9 No 7, 1059-1066.
25. Carroll S.L. (2012) Molecular mechanisms promoting the pathogenesis of Schwann cell neoplasms. *Acta Neuropathol*. 2012 Mar;123(3):321-48. Epub 2011 Dec 11.
26. Perry A., Roth K. A., Banerjee R., Fuller C. E., Gutmann D. H. (2001) *NF1* Deletions in S-100 Protein-Positive and Negative Cells of Sporadic and Neurofibromatosis 1 (NF1)-Associated Plexiform Neurofibromas and Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. *American Journal of Pathology*, Vol. 159, No. 1, July.
27. Mullins R.D., Heuser J.A., Pollard T.D. (1998) The interaction of Arp2/3 complex with actin: Nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 May 26; 95(11): 6181–6186.
28. Gandhi M., Goode B.L. (2008) Coronin: the double-edged sword of actin dynamics. 2008; *Subcell Biochem* 48:72-87.
29. Kamal J. K.A., Benchaar S.A., Takamoto K., Reisler E., Chance M.R. (2007) Three-dimensional structure of cofilin bound to monomeric actin derived by structural mass spectrometry data. *PNAS*, May 8, 2007, vol. 104, no. 19, 7910–7915.
30. McGough A., Pope B., Chiu W., Weeds A. (1997). Cofilin changes the twist of F-actin: implications for actin filament dynamics and cellular function. *J. Cell Biol.* 138 (4): 771–81.

31. Ozawa T., Araki N., Yunoue S., Tokuo H., Feng L., Patrakitkomjorn S. Ve diğ erleri (2005) The neurofibromatosis type1 Gene product neurofibromin enhances cell motility by regulating actin filament dynamics via the rho-rock-limk2-cofilin pathway. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 280, NO. 47, pp. 39524–39533.
32. Pope B. J., Zierler-Gould K. M., Kühne R., Weeds A. G., Ball L. J. (2004) Solution Structure of Human Cofilin Actin Binding, pH Sensitivity, and Relationship to Actin-Depolymerizing Factor. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 279, No. 6, Issue of Feb. 6, 4840–4848.
33. de Hostos E. L.(1999) The coronin family of actin-associated proteins. *Trends in Cell Biology* Vol. 9.
34. Clemen C.S., Eichinger L., Rybakin.V. (2008) The Coronin Family of Proteins. *Subcell Biochem.* 2008;48:1-5.
35. Oku T., Itoh S., Okano M. Suzuki A., Suzuki K., Nakajin S., ve diğ erleri (2003) Two Regions Responsible for the Actin Binding of p57, a Mammalian Coronin Family Actin-Binding Protein. *Biol. Pharm. Bull.* 26(4) 409-416.
36. Suzuki K., Nishihata J., Arai Y. ve diğ erleri (1995) Molecular cloning of a novel actin-binding protein, p57, with a WD repeat and a leucine zipper motif. *FEBS Lett*; 364:283-8.
37. Oku T., Itoh S., Ishii R., Suzuki K., Nauseef W. M. , Toyoshima S. ve diğ erleri (2005) Homotypic dimerization of the actin-binding protein p57/Coronin-1 mediated by a leucine zipper motif in the C-terminal region. *Biochem. J.* 387, 325–33.
38. Rybakin V., Clemen C.S. (2005) Coronin proteins as multifunctional regulators of the cytoskeleton and membrane trafficking. *Bioessays*, 27:625-32.
39. Humphries C. L., Balcer H. I., D'Agostino J. L., Winsor B., Drubin D. G., Barnes G. ve diğ erleri (2002). Direct regulation of Arp2/3 complex activity and function by the actin binding protein Coronin. *J. Cell Biol.* 159, 993–1004.

40. Goode B., Wong J., Butty A., Peter M. McCormack A. L., Yates J. R. ve diğerleri (1999) Coronin Promotes the Rapid Assembly and Cross-linking of Actin Filaments and May Link the Actin and Microtubule Cytoskeletons in Yeast. *The Journal of Cell Biology*, Volume 144, Number 1, 83-98.
41. Galkin V. E., Orlova A., Briehner W., Kueh H. Y., Mitchison T. J., Egelman E. H., (2008) Coronin-1A stabilizes f-actin by bridging adjacent actin protomers and stapling opposite strands of the actin filament. *J. Mol. Biol.* 376, 607–613.
42. Föger N., Rangell L., Danilenko D. M., Chan A. C. ve diğerleri (2006) Requirement for coronin 1 in T-lymphocyte trafficking and cellular homeostasis. *Science*; 313:839-42.
43. Yan M., Di Ciano-Oliveira C., Grinstein S., Trimble W. S. (2007) Coronin function is required for chemotaxis and phagocytosis in human neutrophils. *J Immunol*; 178:5769-78.
44. LeClaire L.L., Baumgartner M., Iwasa J. SH. ve diğerleri (2008) Phosphorylation of the Arp2/3 complex is necessary to nucleate actin filament, *J. Cell Biology* Vol 182no 4 647-654.
45. Rodal A. A., Sokolova O., Robins D. B., Daugherty K. M., Hippenmeyer S., Riezman H. ve diğerleri (2005). Conformational changes in the Arp2/3 complex leading to actin nucleation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 26–31.
46. Machesky L. M., Gould K. L. (1999) The Arp 2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Current Opinion In Cell Biology* 11: 117-121.
47. Uetrecht A.C, Bear J.E. (2006) Coronins: the return of the crown. *Trends Cell Biol*; 16:421-6.
48. Ahmed Z., Shaw G., Sharma V. P., Yang C., McGowan E., Dickson D. W. (2007) Actin-binding Proteins Coronin-1a and IBA-1 Are Effective Microglial Markers for Immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, Volume 55(7): 687–700.

49. Di Giovanni S., De Bias A., Yakovlev A., Finn T., Beers J., Hoffman E.P. ve diğerleri. (2005). In vivo and in vitro characterization of novel neuronal plasticity factors identified following spinal cord injury. *J Biol Chem*, 280 (3), 2084-2091.
50. Thai D. R., Xavier C. P., Rosentreter A., Linder S. ve diğerleri (2008) Expression of Coronin 3 (Coronin 1C) in diffuse gliomas related to malignancy. *J Pathology*; 214; 415-424.
51. Nakamura T., Takeuchi K., Muraoka S., Takezoe H., Takahashi N., Mori N. (1999). A neurally enriched coronin-like protein, ClipinC, is a novel candidate for an actin cytoskeleton-cortical membrane-linking protein. *J Biol Chem*, 274 (19), 13322-13327.
52. Huang W., Ghisletti S., Saijo K., Gandhi M., Aouadi M., Tesz G. J., Zhang D. X., Yao J., Czech M. P., Goode B. L., Rosenfeld M. G., Glass C. K. (2011) Coronin 2A mediates actin-dependent de-repression of inflammatory response genes. *Nature*:470 414-419.
53. Di Giovanni S., Knoblach S.M., Brandoli C., Aden S.A., Hoffman E.P., Faden A.I. (2003). Gene profiling in spinal cord injury shows role of cell cycle in neuronal death. *Ann Neurol*, 53 (4), 454-468.
54. De Biase A., Knoblach S.M., Di Giovanni S., Fan C., Molon A., Hoffman E.P. ve diğerleri. (2005). Gene expression profiling of experimental traumatic spinal cord injury as a function of distance from impact site and injury severity. *Physiol Genomics*, 22 (3), 368-381.
55. Yanagisawa Y., Sato Y., Asahi, Ozaki Y. ve diğerleri (2006) Effusion and solid lymphomas have distinctive gene and protein expression profiles in an animal model of primary effusion lymphoma. *J Pathol* 209(4):464-473.
56. Carinci F., Francioso F., Piattelli A., Rubini C., ve diğerleri (2003) Genetic Expression Profiling of Six Odontogenic Tumors. *J Dent Res* 82(7):551-557

57. Casella G. T. B., Wieser R., Bunge R. P., Margitich I. S., ve diğerleri (2000) Density Dependent Regulation of Human Schwann Cell Proliferation. *GLIA* 30:165–177.
58. Cai L., Holoweckyj N., Schaller M. D., Bear J. E. (2005) Phosphorylation of Coronin 1B by Protein Kinase C Regulates Interaction with Arp2/3 and Cell Motility. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 280, No. 36, Issue of September 9, pp. 31913–31923.
59. Shiow L.R., Roadcap D.W., Paris K., Watson S.R., Grigorova I.R., Lebet T., An J., Xu Y., Jenne C.N., Föger N., Sorensen R.U., Goodnow C.C., Bear J.E., Puck J.M., Cyster J.G. (2008) The actin regulator coronin 1A is mutant in a thymic egress–deficient mouse strain and in a patient with severe combined immunodeficiency. *Nature Immunology* 9, 1307 - 1315 (2008) Published online: 5 October 2008.

EK-ETİK KURUL RAPORU



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR
DEĞERLENDİRME KOMİSYONU

Tıp Fakültesi Dekanlığı 06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1082 • Faks: 0 (312) 310 0580
E-posta: selmak@hacettepe.edu.tr
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr











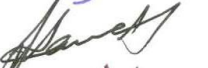
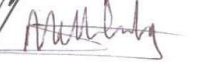
Sayı: B.30.2.HAC.0.20.05.04/ 643

19 Nisan 2011

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 24 MART 2011 PERŞEMBE
Toplantı No : 2011/3
Proje No : TBK 11/12 (Değerlendirme Tarihi 24.03.2011)
Karar No : TBK 11/12 -19

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Şükriye Ayter'in sorumlu araştırmacısı olduğu, Doç. Dr. Çetin Kocaefe ile birlikte çalışacakları TBK 11/12 kayıt numaralı ve "Nörofibromatozis Tip 1 (NF 1) ile İlişkili Tümör Dokularında Koronin 1A İfadesinin Gösterilmesi" başlıklı proje önerisi Komisyonumuzda değerlendirilmiş olup, uygun bulunmuştur.

1. Prof. Dr. Rüştü Onur (Başkan) 
2. Prof. Dr. Murat Yurdakök (Üye) KATILMADI
3. Prof. Dr. İbrahim Haznedaroğlu (Üye) 
4. Prof. Dr. Arzu Topeli İskit (Üye) KATILMADI
5. Prof. Dr. İnci Erdemli (Üye) KATILMADI
6. Prof. Dr. Haydar A. Demirel (Üye) 
7. Prof. Dr. Zafer Çehrelî (Üye) 
8. Prof. Dr. Osman Abbasoğlu (Üye) 
9. Prof. Dr. Nurten Akarsu (Üye) 
10. Prof. Dr. Nüket Örnek Büken (Üye) 
11. Prof. Dr. Alev Türker (Üye) 
12. Prof. Dr. Bilgehan Yalçın (Üye) 
13. Prof. Dr. Nilgün Sayınalp (Üye) 
14. Prof. Dr. S. Mehmet Mercanlıgil (Üye) 
15. Doç. Dr. Mutlu Hayran (Üye) 
16. Av. Meltem Onurlu (Üye) 