



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİNE DİRENÇLİ KRONİK MYELOİD
LÖSEMİ HÜCRELERİNDE STAT5A' NIN CRISPR/CAS9 İLE
ÇIKARTILMASININ TERAPÖTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Besne ÇELİK

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir
2024

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİNE DİRENÇLİ KRONİK MYELOİD
LÖSEMİ HÜCRELERİNDE STAT5A'NIN CRISPR/CAS9 İLE
ÇIKARTILMASININ TERAPÖTİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Besne ÇELİK

Danışman
Doç. Dr. Burçin Kaymaz

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Tezli Yüksek Lisans

İzmir
2024

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Doç. Dr. Burçin KAYMAZ

(Danışman)

Üye : Prof.Dr.

Üye : Prof.Dr.

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih:

Önsöz

Bu tez çalışmam, akademik eğitimim boyunca yaptığım araştırmalar ve deneyimlerin sonucu olarak ortaya çıkmıştır. Yüksek lisans eğitimim süresince edindiğim akademik bilgi ve becerilerin, yaptığım araştırmalar neticesinde bilgi birikimimin sürekli genişlediği ve bu alana katkıda bulunmayı olanak tanıdı. Tez çalışmam, mevcut literatüre katkı sağlamayı hedeflemektedir. Buna bağlı olarak tez çalışmamın literatürdeki bilgi eksikliklerin giderilmesi amaçlanmaktadır. Bu tez çalışmam süresince sistematik bir yaklaşım benimseyerek, elde edilen bilgilerin güvenilirliği için özen gösterdim. Bu çalışma da elde ettiğim bulguların bilim dünyasına önemli bir katkı sağlayacağını ve genç araştırmacılar için faydalı yeni araştırma sorularının ortaya çıkmasını umut ediyorum. Bu tez çalışması süresinde karşılaşılan zorluklar ile bilimsel araştırmanın ne kadar zorlu bir süreç olduğunu anladım. Bilimsel merak, araştırma azminin, bilgi üretmenin çok önemli olduğunu inceleme fırsatı buldum. Aynı zamanda tez çalışmamda yaşadığım zorluklar neticesinde, bu zorlukların üstesinden gelmek için gösterdiğim çaba, ana önemli akademik deneyimler kazandırdı. Bu deneyimler, akademik kariyerim boyunca önemli bir rehber olacaktır. Sonuç olarak bu tez çalışmasının kendi alanına önemli bir katkı sağlamasını ve gelecekteki diğer araştırma konuları için ilham kaynağı olacağına ve bilimsel araştırmaların üretiminin ve paylaşılmasının önemine inanarak bu tezin bu süreçte katkı sağlamasını diliyorum.

İzmir, 21.08.2024

Besne ÇELİK

Özet

Tirozin Kinaz İnhibitörlerine Dirençli Kronik Miyeloid Lösemi Hücrelerinde

STAT5'A'nın CRISPR/Cas9 ile Çıkarılmasının Terapötik Etkilerinin

Araştırılması

Kronik myeloid lösemi (KML) yapıcı tirozin kinaz aktivitesine sahip bir füzyon proteini olan onkoprotein BCR-ABL1 (Breakpoint-cluster region/Abelson kinase) ile karakterize edilen kronik miyeloproliferatif bir neoplazmdir.

Tirozin kinazlar, hücre çoğalmasına, farklılaşmasına, hücre göçüne, metabolizmasına ve programlanmış hücre ölümüne yol açan bu sinyal iletim sürecinin önemli araçlarıdır. Tirozin kinaz sinyal yolları normalde düzensiz proliferasyonu önler veya apoptotik uyarılara karşı duyarlılığa katkıda bulunur. Tirozin kinazların kanser moleküler patogenezindeki rolü çok büyüktür ve son zamanlarda, potansiyel antikanser ilaç hedefleri olarak moda olan kinazlarla, Imatinib ve ikinci nesil tirozin kinaz inhibitörleri (TKI'ler) nilotinib ve dasatinib, prognozu ve yaşam beklentisini istatistiksel olarak önemli ölçüde iyileştirmiştir.

Kronik miyeloid lösemi hastalarının bununla birlikte, TKI'lere direnç, önemli bir klinik zorluk olmaya devam etmektedir. Üçüncü kuşak bir TKI olan ponatinib, BCR-ABL'ye bağlı direnç mekanizmalarına sahip hastalarda sonuçları iyileştirse de, hastaların bir kısmı BCR-ABL'den bağımsız direnç geliştirir ve ponatinib tedavisi başarısız olur. Kronik miyeloid lösemide, sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatörü 5a – STAT5A, BCR-ABL gibi tirozin kinaz onkogenlerinin (TKO) aşağı akış yönünde çok önemli bir efektördür ve transkriptomik çalışmaya dayalı olarak, STAT5A ve runt ile ilgili transkripsiyon faktörü 3'ün (RUNX3) ekspresyonunu arttırması da Tirozin Kinaz İnhibitörlerine karşı dirence neden olabilir. STAT5A'nın ayrıca KML hücrelerinin imatinib mesilat gibi tirozin kinaz inhibitörlerine (TKI) direncini arttırdığı gösterilmiştir. Belirli bir kanserin kemo direncinde önemli olan bir enzimi kodlayan bir genin CRISPR/CAS9 kullanılarak etkisizleştirilmesi, kemoterapiden önce veya kemoterapiyle birlikte verilebilecek potansiyel bir tedavidir.

Bu çalışmada, Kronik myeloid lösemi hücre modeli K562 ile onun 1.2 μ M İmatinibe direnç kazandırılmış formu K562/Ima-Res ile 3 nM Ponatinib' e direnç kazandırılmış K562/Pon-Res hücrelerinde Sinyal İleticisi ve Transkripsiyon Aktivatörü 5A – STAT5A' nın genom düzenleme teknolojisi Crispr/Cas9 ile çıkartılması (knock-out edilmesi) sonrasında, lösemik hücreler üzerindeki sitotoksik, apoptotik, hücre döngüsü tutulması üzerindeki etkilerin ve karsinogenetik kilit yolaklarda bulunan seçilmiş genlerin mRNA seviyesindeki ekspresyon değişimlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada Imatinib dirençli hücrelerin IC50 2.4 uM ve ponatinib dirençli hücrelerimizde 6nM olarak belirlenmiştir. Bu tez çalışlarında, K562 ve dirençli hücre hatlarında CRISPR/Cas9 uygulanarak STAT5A nakavt sonrasında hücresel yanıt analizleri araştırılmıştır. STAT5A nakavtı sonrasında apoptotik etkilerini Annexin V yöntemine göre değerlendirilmiştir. Hücre döngüsü üzerindeki etki “BD Cycletest Plus DNA Reagent Kit” ile değerlendirilmiştir. Gen ekspresyon değişimleri, tüm STAT5A nakavt hücre grubu ile kontrol gruplarından elde edilen mRNA'larla RT-qPCR ile belirlenmiştir. STAT5A nakavtı sonrasında dirençli hücre gruplarında apoptotic etkiye neden olduğu ve hücre arrestinin G0/G1 fazında arrestine neden olduğu tespit edilmiştir.

STAT5A'nın nakavtı sonrasında dirençli hücrelerde JAK2, STAT3 ve CISH sinyal yollarında farklı değişiklikler gözlemlenmiştir. Bu durum, STAT5A'nın gen ekspresyonu ve sinyal yollarındaki rolünü vurgulamaktadır. İlaç dirençli hücreler, STAT5A'nın yokluğunda sinyal yollarını farklı şekilde düzenlemektedir. İmatinib ve ponatinib direnci, bu yolların adaptasyonunu ve etkilenmesini göstermektedir. STAT5A'nın yokluğu, hücrelerin çeşitli sinyal yollarını yeniden düzenlemesine neden olmaktadır. Bu da STAT5A'nın silinmesinin KML hücrelerindeki ilaç direncini anlamada önemli bir rol oynadığını ve KML tedavisinde ilaç direnci ile ilişkili mekanizmanın aydınlatılmasına katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler; Kronik myeloid lösemi, kemoterapötik direnci, genom düzenleme teknolojisi, STAT5A,

Abstract

Investigating the Therapeutic Effects of Knocking out STAT5A with CRISPR/Cas9 in Chronic Myeloid Leukemia Cells Resistant to Tyrosine Kinase Inhibitors.

Chronic myeloid leukemia (CML) is a chronic myeloproliferative neoplasm characterized by the oncoprotein BCR-ABL1 (Breakpoint-cluster region/Abelson kinase), a fusion protein with constitutive tyrosine kinase activity.

Tyrosine kinases are important mediators of this signal transduction process that leads to cell proliferation, differentiation, cell migration, metabolism, and programmed cell death. Tyrosine kinase signaling pathways normally prevent dysregulated proliferation or contribute to sensitivity to apoptotic stimuli. The role of tyrosine kinases in the molecular pathogenesis of cancer is immense, and recently, with kinases in vogue as potential anticancer drug targets, Imatinib and the second-generation tyrosine kinase inhibitors (TKIs) nilotinib and dasatinib have statistically significantly improved prognosis and life expectancy. In patients with chronic myeloid leukemia, however, resistance to TKIs remains a significant clinical challenge. Although ponatinib, a third-generation TKI, improves outcomes in patients with BCR-ABL-dependent resistance mechanisms, a proportion of patients develop BCR-ABL-independent resistance and fail ponatinib treatment.

In chronic myeloid leukemia, signal transducer and transcription activator 5a – STAT5A is a crucial downstream effector of tyrosine kinase oncogenes (TKOs) such as BCR-ABL and, based on transcriptomic study, it suppresses the expression of STAT5A and runt-related transcription factor 3 (RUNX3). Its increase may also cause resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors. STAT5A has also been shown to increase the resistance of CML cells to tyrosine kinase inhibitors (TKIs) such as imatinib mesylate. Inactivation of a gene encoding an enzyme important in the chemoresistance of a particular cancer using CRISPR/CAS9 is a potential treatment that could be given before or in conjunction with chemotherapy.

In this study, the genome editing technology CRISPR of Signal Transducer and Transcription Activator 5A – STAT5A was used in Chronic myeloid leukemia cell model K562 and its form K562/Ima-Res, which was resistant to 1.2 μ M Imatinib, and K562/Pon-Res, which was resistant to 3 nM Ponatinib. It was aimed to determine the effects on cytotoxic, apoptotic, cell cycle arrest on leukemic cells and the expression changes at the mRNA level of selected genes in key carcinogenetic pathways after the removal of CRISPR/Cas9.

In this study, the IC50 values for imatinib-resistant cells were determined as 2.4 μ M and for ponatinib-resistant cells as 6 nM. In this thesis, the cellular responses were investigated following STAT5A knockout using CRISPR/Cas9 in K562 and resistant cell lines. The apoptotic effects after STAT5A knockout were evaluated using the Annexin V method. The impact on the cell cycle was assessed with the "BD Cycletest Plus DNA Reagent Kit." Changes in gene expression were determined by RT-qPCR using mRNA obtained from all STAT5A knockout cell groups and control groups. It was found that STAT5A knockout induced apoptotic effects in resistant cell groups and caused cell cycle arrest in the G0/G1 phase.

After the knockout of STAT5A, different changes were observed in the JAK2, STAT3, and CISH signaling pathways in resistant cells. This highlights the role of STAT5A in gene expression and signaling pathways. Drug-resistant cells regulate their signaling pathways differently in the absence of STAT5A. The resistance to imatinib and ponatinib demonstrates the adaptation and impact of these pathways. The absence of STAT5A leads to the reorganization of various signaling pathways in the cells. This suggests that the deletion of STAT5A plays a significant role in understanding drug resistance in CML cells and may contribute to elucidating the mechanism related to drug resistance in CML treatment.

Keywords; Chronic myeloid leukemia, chemotherapeutic resistance, genome editing technology, STAT5A

İçindekiler

Önsöz	II
Özet.....	III
Abstract.....	V
İçindekiler	VII
Tablolar Dizini.....	X
Şekiller Dizini	XII
Grafikler Dizini	XIV
Kısaltma Listesi	XVI
Giriş.....	1
1.1 Araştırmanın Problemi.....	1
1.2 Araştırmanın Sorusu	1
1.3 Araştırmanın Hipotezleri	2
1.4 Araştırmanın Varsayımları.....	2
1.5 Araştırmanın Sınırlılıkları	3
1.6 Araştırmanın Amacı	3
Genel Bilgiler	5
2.1 Kronik Miyeloid Lösemi.....	5
2.2 Kronik Miyeloid Lösemi de Tirozin kinaz İnhibitörleri (TKI)	6
2.2.1 Dasatinib (Sprycel, BMS-35425).....	6
2.2.2 Nilotinib (Tasigna, AMN107, Novartis)	7
2.2.3 Bosutinib (SKI-606, Wyeth),	7
2.2.4 Ponatinib (AP24534)	7
2.3 Kronik Miyeloid Lösemi Hücrelerinde İlaç Direnci	8
2.3.1. KML Direncin de JAK/STAT Sinyal Yolu	8
2.4 CRISPR-Cas9 Teknolojisi	9
2.5 Kronik Miyeloid Lösemi Hücrelerinde CRISPR-Cas9 Yöntemi.....	10
Gereç ve Yöntem	12
3.1 Hücrelerin Kültüre Edilmesi.....	12
3.1.1 Hücrelerin Çoğalma Koşulları ve Değerlendirilmesi	13
3.1.2 Dirençli Hücrelerin Elde Edilmesi.....	14
3.2 Transfeksiyon Verimliliği.....	14
3.2.1 PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile Jel Elektrophorez	17

3.2.1.1 PCR protokolü (GeneArt™ Genomic Cleavage Detection kit);	18
3.2.1.2 Jel elektroforez protokolü;	19
3.2.1.3 Bölünme analizi (Cleavage Assay)	20
3.3 Hücre Proliferasyon Analizi.....	21
3.4 Apoptoz Analizi	22
3.5 Hücre Döngüsü Analizi.....	23
3.6 Gen Ekspresyon Analizleri.....	24
3.6.1 Gen ekspresyonu için total RNA izolasyonu.....	25
3.6.2 Gen ekspresyonu için cDNA sentezi	25
Bulgular.....	28
4.1 Hücre Proliferasyon Testi.....	28
4.2. Dirençli hücrelerin sitotoksite analizi	28
4.2.1 K562/1.2uM Imatinib Dirençli ve K562/3nM Ponatinib Hücrelerin Sitotoksite Analizi	29
4.3. Transfeksiyon Analizi	30
4.4 Apoptoz Analizi	34
4.4.1 K562 Kontrol Hücre Hattı ile CRISPR/Cas9 Uygulanmış K562 Hücrelerin Apoptotik etkileri	34
4.4.2 K562 1.2 uM İmatinib Dirençli Kontrol Hücre Hattı ile CRISPR/CAS9 Uygulanmış K562 1.2 uM İmatinib Dirençli Hücrelerin Apoptotik etkileri	36
4.4.3 K562 3nM Ponatinib Dirençli Kontrol Hücre Hattı ile CRISPR/CAS9 Uygulanmış K562 3nM Ponatinib Dirençli Hücrelerin Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi	38
4.5 Hücre Döngüsü Analizi.....	40
4.5.1 K562 Kontrol Grubu ile CRISPR/Cas9 Uygulanmış Hücrelerinde Hücre Döngülerinin belirlenmesi	40
4.5.2. K562 Kontrol hücre Hattı ile CRISPR/Cas9 Uygulanmış Hücre Hatlarında Hücre Döngüsü Kat Değişimlerinin Belirlenmesi	42
4.5.3 K562 Kontrol Grubu ile CRISPR/Cas9 Uygulanan Hücre Hatlarında G0/G1, S, G2/M Fazları Arasında Anlamlı Fark Vardır	43
4.5.4 K562 1.2 uM imatinibe Dirençli Kontrol Grubu ile CRISPR/Cas9 Uygulanmış Dirençli Hücrelerinde Hücre döngülerinin belirlenmesi	46

4.5.5 K562 1.2uM İmatinib Dirençli Kontrol hücre Hattı ile CRISPR/Cas9 Uygulanmış Dirençli Hücre Hatlarında Hücre Döngüsü Kat Değişimlerinin Belirlenmesi	47
4.5.6 K562 1.2 uM İmatinib dirençli Kontrol Grubu ile CRISPR/Cas9 Uygulanan Hücre Hatlarında G0/G1, S, G2/M Fazları Arasında Anlamlı Fark Vardır	49
4.5.7 K562 3nM Ponatinib Dirençli Kontrol Grubu ile CRISPR/Cas9 Uygulanmış Dirençli Hücrelerinde Hücre döngülerinin belirlenmesi	54
4.5.8 K562 3nM Ponatinib Dirençli Kontrol hücre Hattı ile CRISPR/Cas9 Uygulanmış Dirençli Hücre Hatlarında Hücre Döngüsü Kat Değişimlerinin Belirlenmesi	55
4.5.9 K562 3nM Ponatinib Dirençli Kontrol Grubu ile CRISPR/Cas9 Uygulanan Hücre Hatlarında G0/G1, S, G2/M Fazları Arasında Anlamlı Fark Vardır.....	57
4.6 Gen Ekspresyon Analizi	62
4.6.1 STAT5A Nakavtının Gen Ekspresyonuna Etkisi.....	62
4.6.2 STAT5A Nakavtın K562 1.2 uM İmatinib Dirençli Hücre Hattında Gen Ekspresyonunda Değişikliklerin Belirlenmesi.....	65
4.6.3 STAT5A Nakavtın K562 3nM Ponatinib Dirençli Hücre Hattında Gen Ekspresyonunda Değişikliklerin Belirlenmesi.....	67
Tartışma	75
Sonuç ve Öneriler	85
Kaynaklar	86
Ekler	100
Teşekkür	101
Özgeçmiş	103

Tablolar Dizini

Table 1. K562 Hücre hatları ve Özellikleri	12
Tablo 2. Transfeksiyon Protokolü.....	15
Tablo 3. Thermal Cycler sıcaklık ve zaman döngüleri	18
Tablo 4. PCR ürünleri için verilen bileşen miktarları	18
Tablo 5: PCR döngüleri	19
Tablo 6. Bölünme analizin gerçekleştirilmesi için Thermal cycler da gereken adımlar	21
Tablo 7. Gen ekspresyon analizinde kullanılacak hedef genler	24
Tablo 8.cDNA için bileşen ve miktarlar	25
Tablo 9.Reverse transkripsiyon reaksiyon karışımının hazırlanması	26
Tablo 10.qPCR reaksiyonu için bileşenler ve miktarlar	26
Tablo 11.Termal profil.....	27
Tablo 12. K562 kontrol hücre hattı ile CRISPR/CAS9 uygulanmış hücrelerde 48. saat hücre döngüsü yüzde değerleri ve kat değişim sonuçları	42
Tablo 13. K562 hücre hattı ile K562 CRISPR/cas9 uygulanmış hücre G0/G1 Fazı <i>p</i> değerleri.....	43
Tablo 14. K562 hücre hattı ile K562 CRISPR/cas9 uygulanmış hücre S Fazı <i>p</i> değerleri.....	44
Tablo 15. K562 hücre hattı ile K562 CRISPR/cas9 uygulanmış hücre G2/M Fazı <i>p</i> değerleri.....	45
Tablo 16: K562 1.2 uM imatinib dirençli kontrol hücre hattı ile CRISPR/CAS9 uygulanmış dirençli hücrelerde 48. saat hücre döngüsü yüzde değerleri ve kat değişim sonuçları	48
Tablo 17. K562 1.2 uM imatinib dirençli hücre hattı ile K562 1.2 uM imatinib dirençli CRISPR/cas9 uygulanmış hücre hatlarının G0/G1 Fazı <i>p</i> değerleri.....	50
Tablo 18. K562 1.2 uM imatinib dirençli hücre hattı ile K562 1.2 uM imatinib dirençli CRISPR/cas9 uygulanmış hücre hatlarının S Fazı <i>p</i> değerleri	51
Tablo 19. K562 1.2 uM imatinib dirençli hücre hattı ile K562 1.2 uM imatinib dirençli CRISPR/cas9 uygulanmış hücre hatlarının G2/M Fazı <i>p</i> değerleri.....	53
Tablo 20. K562 3nM ponatinib dirençli kontrol hücre hattı ile CRISPR/CAS9 uygulanmış dirençli hücrelerde 48. saat hücre döngüsü yüzde değerleri ve kat değişim sonuçları	56

Tablo 21. K562 3nM ponatinib dirençli hücre hattı ile K562 3nM ponatinib dirençli CRISPR/cas9 uygulanmış hücre hatlarının G0/G1 Fazı <i>p</i> değerleri.....	58
Tablo 22. K562 3nM ponatinib dirençli hücre hattı ile K562 3nM ponatinib dirençli CRISPR/cas9 uygulanmış hücre hatlarının S Fazı <i>p</i> değerleri.....	59
Tablo 23. K562 3nM ponatinib dirençli hücre hattı ile K562 3nM ponatinib dirençli CRISPR/cas9 uygulanmış hücre hatlarının G2/M Fazı <i>p</i> değerleri	60
Tablo 24. K562 hücre hattı ile CRISPR/Cas9 uygulanmış K562 hücre hatlarında kontrole göre gen ifadelerindeki kat değişimleri	63
Tablo 25. K562 1.2 uM imatinib dirençli hücre hattı ile CRISPR/Cas9 uygulanmış dirençli K562 hücre hatlarında kontrole göre gen ifadelerindeki kat değişimleri	65
Tablo 26. K562 3nM ponatinib dirençli hücre hattı ile CRISPR/Cas9 uygulanmış dirençli K562 hücre hatlarında kontrole göre gen ifadelerindeki kat değişimleri	70

Şekiller Dizini

Şekil 1. Neubayer Lam.....	14
Şekil 2. Jel elektroforezde kullanılan DNA ladder	20
Şekil 3. XTT tahlilinin prensibi	22
Şekil 4. Tripan mavisi ile boyanmış 10x büyütmede K562 hücrelerinin sayımı yapılmıştır	28
Şekil 5. K562 hücre hattı ile K562 dirençli hücrelerimize CRISPR/Cas9 yöntemi uygulanmış hücrelerimizin PCR ürünleri gösterilmektedir.	31
Şekil 6. K562 STAT5A nakavt edilmiş hücre hattında 271 bp parental bant ile 259bp kesilen bant görülmektedir.	32
Şekil 7. K562 1.2 uM imatinib dirençli hücre hatlarında STAT5A nakavt edilen hücre hattı, pozitif kontrol olarak CDK4 nakavt hücre hattında ve negatif kontrol hücrelerinde bölünme analizi sonrasında jel görüntüsü	32
Şekil 8. K562 3nM ponatinib dirençli hücre hatlarında STAT5A nakavt edilen hücre hattı, pozitif kontrol olarak CDK4 nakavt hücre hattında ve negative kontrol hücrelerinde bölünme analizi sonrasında jel görüntüsü	33
Şekil 9. K562 kontrol grubu ile CRISPR/Cas9 uygulanmış K562 hücrelerinde STAT5'in nakavt edilmesi ile K562 hücrelerinde pozitif kontrol olarak CDK4'ün nakavt edilmesi ve negatif kontrolün 48. saat sonrasında apoptoz sonuçları	35
Şekil 10. K562 1.2 uM İmatinib dirençli kontrol hücreleri ile CRISPR/Cas9 uygulanmış hücrelerde 48. Saat sonunda apoptoz sonuçları.....	37
Şekil 11. K562 3nM ponatinib dirençli kontrol hücreleri ile CRISPR/Cas9 uygulanmış hücrelerde 48. saat sonunda apoptoz sonuçları	39
Şekil 12. K562 kontrol hücresi ile CRISPR/Cas9 uygulanmış hücre hatlarında gözlemlenen 48. saat hücre döngüsü analiz sonuçları	41
Şekil 13. K562 1.2 uM imatinib dirençli kontrol hücresi ile CRISPR/Cas9 uygulanmış dirençli hücre hatlarında gözlemlenen 48. saat hücre döngüsü analiz sonuçları.....	47
Şekil 14. K562 3nM ponatinib dirençli kontrol hücresi ile CRISPR/Cas9 uygulanmış dirençli hücre hatlarında gözlemlenen 48. saat hücre döngüsü analiz sonuçları	55
Şekil 15. K562 hücre hattı ile drençli hücre hatlarında STAT5A nakavt edilmesi sonrasında oluşan gen ifadelerindeki değişimin ısı grafiği	73

Şekil 16. K562 hücre hattı ile drençli hücre hatlarında CDK4 nakavt edilmesi sonrasında oluşan gen ifadelerindeki değişimin ısı grafiği 74



Grafikler Dizini

Grafik 1. K562/1.2 uM imatinib dirençli hücreler ile K562/3nM ponatinib dirençli hücreleri 48.saat sonunda sitotoksite analiz sonuçları	30
Grafik 2. STAT5A nakavt edilen hücrelerde %4.43, CDK4 KO hücrelerinde %3,78 indel grafiği	34
Grafik 3. K562 kontrol grubu ile CRISPR/Cas9 uygulanmış K562 hücrelerinde 48. saat sonunda apoptoz kat değişim grafiği	36
Grafik 4. K562 1.2 uM İmatinib dirençli kontrol hücreleri ile CRISPR/Cas9 uygulanmış dirençli hücrelerin 48. saat apoptoz kat değişim grafiği.....	38
Grafik 5. K562 3nM ponatinib dirençli kontrol hücreleri ile CRISPR/Cas9 uygulanmış dirençli hücrelerin 48. Saat sonunda apoptoz kat değişim grafiği	40
Grafik 6. K562 kontrol hücre hattı ile CRISPR/CAS9 uygulanmış hücrelerde 48. saat sonunda hücre döngüsü kat değişim grafiği.....	43
Grafik 7. K562 hücre hattı ile K562 CRISPR/cas9 uygulanmış hücre hatlarında G0/G1 faz grafiği	44
Grafik 8. K562 hücre hattı ile K562 CRISPR/cas9 uygulanmış hücre hatlarında S faz grafiği.....	45
Grafik 9. K562 hücre hattı ile K562 CRISPR/cas9 uygulanmış hücre hatlarında G2/M faz grafiği.....	46
Grafik 10. K562 1.2 uM imatinib dirençli kontrol hücre hattı ile CRISPR/Cas9 uygulanmış dirençli hücrelerde 48. saat hücre döngüsü kat değişim grafiği	49
Grafik 11. K562 1.2 uM imatinib dirençli hücre hattı ile CRISPR/cas9 uygulanmış hücre hatlarında G0/G1 faz grafiği	51
Grafik 12. K562 1.2 uM imatinib dirençli hücre hattı ile CRISPR/cas9 uygulanmış hücre hatlarında S faz grafiği	52
Grafik 13. K562 1.2 uM imatinib dirençli hücre hattı ile CRISPR/cas9 uygulanmış hücre hatlarında G2/M faz grafiği.....	54
Grafik 14. K562 3nM ponatinib dirençli kontrol hücre hattı ile CRISPR/Cas9 uygulanmış dirençli hücrelerde 48. saat hücre döngüsü kat değişim grafiği	57
Grafik 15. K562 3nM Ponatinib dirençli hücre hattı ile CRISPR/cas9 uygulanmış hücre hatlarında G0/G1 faz grafiği	58
Grafik 16. K562 3nM Ponatinib dirençli hücre hattı ile CRISPR/cas9 uygulanmış hücre hatlarında S faz grafiği	60

Grafik 17. K562 3nM Ponatinib dirençli hücre hattı ile CRISPR/cas9 uygulanmış hücre hatlarında G2/M faz grafiği.....	61
Grafik 18. K562 hücre hattı ile CRISPR/Cas9 uygulanmış K562 hücre hatlarında kontrole göre gen ifadelerindeki kat değişim grafiği	64
Grafik 19. K562 1.2 uM imatinib dirençli hücre hattı ile CRISPR/Cas9 uygulanmış K562 hücre hatlarında kontrole göre gen ifadelerindeki kat değişim grafiği	67
Grafik 20. K562 3nM Ponatinib dirençli hücre hattı ile CRISPR/Cas9 uygulanmış K562 hücre hatlarında kontrole göre gen ifadelerindeki kat değişim grafiği	70



Kısaltma Listesi

KML	: Kronik Miyeloid Lösemi
CRISPR	: Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar
TKİ	: Tirozin Kinaz İnhibitörleri
JAK	: Janus kinaz
STAT5A	: Sinyal iletilici ve transkripsiyon aktivatörü 5A
KO	: Nakavt, Knock-out
PS	: Fosfotidilserin
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
NHEJ	: Homolg olmayan uç birleştirme
sgRNA	: Tek kılavuzlu RNA
ZFN	: Çinko parmak nükleazları
TALEN	: Transkripsiyon aktivatörü benzeri efektör nükleazlar
ATP	: adenozin trifosfat
BCR	: Breakpoint Cluster Region
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-kinaz
CRKL	: CRK benzeri protein

Giriş

1.1 Araştırmanın Problemi

Kanser, günümüzde önemli halk sağlığı sorunudur. Kanser vakaları 2025 yılına kadar her yıl >20 milyon yeni kanser vakası beklenmektedir ve bu vakaların artacağı öngörülmektedir. Dünya çapında kanser vakalarının ve ölümlerin önde gelen nedeni olmaya devam etmektedir (Ferlay et al. 2015).

Moleküler ve tümör biyolojisi hakkında artan bilgi ile kanser tedavisine yönelik yeni yaklaşımlar ortaya çıkmıştır (Schiller et al. 2002). Gelişen tedavi yöntemleri avantaj sağlasa da ilaç direnci hâlâ kanser tedavisinde bir zorluk olarak devam etmektedir. Bu durum ilaç direncine bağlı gelişen kanser mekanizmasının aydınlatılması ve yeni tedavi yaklaşımlarının ortaya çıkmasına neden olmuştur (Haider et al. 2020).

Kanser hücrelerinin tedaviye karşı direnç göstermesi son yıllarda kanser tedavisinin zorlu yönlerinden biridir (Nikolaou et al. 2018). Kanser hücrelerine yönelik hedefli tedavilerin keşfinde kaydedilen ilerlemeler antikanser ajanların onaylanmasına yol açsa da direnç, yaşamı tehdit eden bir yan etki olarak kanser tedavilerinin önüne geçmektedir (Oun et al. 2018). İlaç direnci, kanser hücrelerinde içsel ve dışsal faktörleri arasındaki karmaşık etkileşim sonucunda kanser direncinde katkıda bulunmaktadır. Kanser direncinde rol oynayan içsel faktörler onkojenik yolları aktive ederek ilaç hedeflerinin ve tedavilere karşı duyarsızlaşmasına ayrıca DNA onarım mekanizmalarını güçlendirerek sağkalım yollarının aktivasyonuna neden olmaktadır. Böylece, kanser tedavileri sitotoksik etkilere kaçmasına yol açmaktadır (Dzobo et al. 2018).

1.2 Araştırmanın Sorusu

Araştırmamızda kullandığımız biyoteknolojik bir yöntem olan düzenli aralıklarla bölünmüş palindromik tekrar kümeleri (CRISPR) ve Cas9 proteini ile dirençli lösemi hücre grubu ile kontrol grubu sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatörü 5A (STAT5A)'nın çıkarılması üzerindeki sitotoksik, hücre proliferasyonu, apoptotik etkilerin değerlendirilmesi, hücre döngüsü tutulması üzerindeki etkilerin araştırılması ve karsinogenetik olarak rol oynayan genlerin mRNA seviyesindeki değişimleri belirlenmektedir. Bu yöntem ile dirençli lösemik hücrelerde meydana gelen ilaç direncinde rol oynayan proteinin çıkarılması sonucunda dirençli lösemi hücrelerinin proliferasyonunu inhibe etmeyi sağlayacağımızı düşünmekteyiz.

1.3 Araştırmanın Hipotezleri

Kronik miyeloid lösemi (KML) tedavisinde rol oynayan tirozin kinaz inhibitörleri (TKİ) hücre çoğalmasına, farklılaşmasına, hücre göçüne, metabolizmasına ve programlanmış hücre ölümüne yol açan bu sinyal iletim sürecinin önemli araçlarıdır. Potansiyel antikanser ilaç hedefleri olarak imatinib ve ikinci nesil tirozin kinaz inhibitörleri (TKİ'ler) nilotinib ve dasatinib, prognozu ve yaşam beklentisini istatistiksel olarak önemli ölçüde iyileştirmiştir. Kronik miyeloid lösemi hastalarının bununla birlikte, TKİ'lere direnç, önemli bir klinik zorluk olmaya devam etmektedir. Üçüncü kuşak bir TKİ olan ponatinib, BCR-ABL'ye bağlı direnç mekanizmalarına sahip hastalarda sonuçları iyileştirse de, hastaların bir kısmı BCR-ABL'den bağımsız direnç geliştirir ve ponatinib tedavisi başarısız olmaktadır. Dolayısıyla, kemoterapötik ajanlara direnç kazandıran tüm kanserler, aşamalı olarak büyümelerine ve malignite özellikleri sergilemelerine izin veren çoklu mutasyonlar içerdiğinden, kanser hücresi genomunu hedeflemek çekici bir yaklaşım haline gelmektedir.

Kronik miyeloid lösemide sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatörü 5a (STAT5A), BCR-ABL gibi tirozin kinaz onkogenlerinin (TKO) aşağı akış yönünde çok önemli bir efektördür ve transkriptomik çalışmaya dayalı olarak, STAT5A ve runt ile ilgili transkripsiyon faktörü 3'ün (RUNX3) ekspresyonunu arttırması da tirozin kinaz inhibitörlerine karşı direnç neden olabilir. STAT5A'nın ayrıca KML hücrelerinin imatinib mesilat gibi tirozin kinaz inhibitörlerine (TKİ) direncini arttırabilir. CRISPR/Cas9 yöntemi ile dirençli lösemi grubu ile kontrol grubunda STAT5A'nın çıkartılması TKİ direncini inhibe etmede önemli bir rol oynayabilir.

Araştırmamızda kronik miyeloid lösemi de ilaç direnci kazandırılmış imatinib ve ponatinib tirozin kinaz inhibitörleri, CRISPR/Cas9 yöntemi ile STAT5A'nın çıkarılması sonucunda dirençli kronik miyeloid lösemi grubu ile kontrol grubunun terapötik etkisi araştırılmıştır.

1.4 Araştırmanın Varsayımları

Araştırmamızda CRISPR/Cas9 yöntemi ile STAT5A'nın çıkarılması sonucunda direnç kazandırılmış lösemi hücre grubu ile kontrol grubu hücreleri üzerindeki etkilerin araştırılması hedeflenmiştir. Bu yöntem ile direnç kazandırılmış lösemi

hücre grubu ile kontrol grubu üzerindeki sitotoksik, hücre proliferasyonu, apoptotik, hücre döngüsü üzerindeki etkiler ve mRNA ifadesindeki değişimler incelenmiştir.

1.5 Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırmamızda dirençli ve kontrol lösemi hücreler ile in vitro koşullarında çalışılmıştır. Deney hayvanları ile hastalar grupları ile çalışılmadığından in vivo bir çalışma yapılmamıştır. Buna bağlı olarak herhangi bir değerlendirme de bulunmamıştır.

1.6 Araştırmanın Amacı

Kronik myeloid lösemi (KML) yapıcı tirozin kinaz aktivitesine sahip bir füzyon proteini olan onkoprotein BCR-ABL1 (Breakpoint-cluster region/Abelson kinase) ile karakterize edilen kronik miyeloproliferatif bir neoplazmdır.

Tirozin kinazlar, hücre çoğalmasına, farklılaşmasına, hücre göçüne, metabolizmasına ve programlanmış hücre ölümüne yol açan bu sinyal iletim sürecinin önemli araçlarıdır. Tirozin kinaz sinyal yolları normalde düzensiz proliferasyonu önler veya apoptotik uyarılara karşı duyarlılığa katkıda bulunur. Tirozin Kinazın ekspresyonunun ve aktivitesinin mutasyonlar veya diğer mekanizmalar yoluyla dereğülasyonu, çok çeşitli hastalıklara yol açar ve aynı zamanda kanser hücrelerinin klasik bir özelliğidir. Tirozin kinazların kanser moleküler patogeneziindeki rolü çok büyüktür ve son zamanlarda, potansiyel antikanser ilaç hedefleri olarak moda olan kinazlarla, Imatinib ve ikinci nesil tirozin kinaz inhibitörleri (TKI'ler) nilotinib ve dasatinib, prognozu ve yaşam beklentisini istatistiksel olarak önemli ölçüde iyileştirmiştir. Kronik miyeloid lösemi hastalarının bununla birlikte, TKI'lere direnç, önemli bir klinik zorluk olmaya devam etmektedir. Üçüncü kuşak bir TKI olan ponatinib, BCR-ABL'ye bağlı direnç mekanizmalarına sahip hastalarda sonuçları iyileştirse de, hastaların bir kısmı BCR-ABL'den bağımsız direnç geliştirir ve ponatinib tedavisi başarısız olmaktadır.

Kronik myeloid lösemi hücre modeli K562 ile onun 1.2 μ M İmatinibe direnç kazandırılmış formu K562/Ima-Res ile 3 nM Ponatinib' e direnç kazandırılmış K562/Pon-Res hücrelerinde STAT5A' nın genom düzenleme teknolojisi CRISPR/Cas9 ile çıkartılması (knock-out edilmesi) sonrasında, lösemik hücreler

zerindeki sitotoksik, apoptotik, hücre döngüsü tutulması üzerindeki etkilerin ve karsinogenetik kilit yolaklarda bulunan seçilmiş genlerin mRNA seviyesindeki ekspresyon değişimlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Böylelikle kontrol grubu hücreler ile deney grubu hücreler arasında yapılacak istatistiksel analizler sonrasında, gen ifadenmelerindeki değişikliklerin de saptanmasıyla, bir transkripsiyon faktörü olarak lkomogenez gelişim sürecini tetikleyen STAT5A geninin çıkartılmasının olası terapötik etkileri belirlenmesi amaçlanmıştır.



Genel Bilgiler

2.1 Kronik Miyeloid Lösemi

Kronik miyeloid lösemi (KML), 22. kromozom da bulunan BCR (Breakpoint Cluster Region) geni ile 9. kromozomda bulunan ABL1 geninin translokasyonu sonucunda oluşmaktadır (Zheng, 2013). Bunun sonucunda kromozom 9 uzamaktadır, kromozom 22 ise kısalmaktadır. Philadelphia kromozom, genellikle hatalı kromozom 22 olarak bilinmektedir (Surace et al., 2014). Bu onkogenin varlığı akut lenfoblastik lösemi olguların %15'inde, kronik miyeloid lösemi olgularının %95'inde gözlemlenmiştir (Ravandi and Kebriaei 2009). Bu translokasyon sonucunda 210 kDa (p210), 190kDa (p190) ve p229 füzyon proteini oluşmuştur (Score et al., 2010). Kronik miyeloid lösemi, BCR-ABL1 sonucunda oluşan p210 füzyon proteini ile ilişkilidir. BCR-ABL1 füzyon proteini, KML hücrelerin proliferasyonunda ve sağ kalım da işlev gören bir enzim olan fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) ilişkilendirilmektedir (Quintás-Cardama and Cortes 2009). C-Abl proteinin başlangıç ekzon dizisi ile BCR dizisinin yer değiştirilmesi sonucunda oluşan p210 mutant proteini, sitoplazmada artan tirozin kinaz aktivitesine yol açmaktadır (Carofiglio et al., 2020). Tirozin kinaz hücre proliferasyonunu ve apoptozun inhibe edilmesini teşvik etmektedir. Bu durum hücre döngüsünün hızlanmasına, DNA onarım süreçlerinin de engellenmesine yol açmaktadır (Hantschel, et al., 2003, Lemmon, and Schlessinger 2010). BCR-ABL1 onkogeni CRK benzeri protein (CRKL) ile etkileşim göstermektedir. Bu durum normal ABL proteininden ayırt etmektedir. Bu füzyon proteini, janus kinaz (JAK)/Sinyal iletici ve transkripsiyon aktivatörü 5 (STAT5) sinyal yolunu aktive eder ve RAS-protoonkogen (RAS) proteinlerini dolaylı olarak aktive edilmesini sağlamaktadır (Uemura et al., 1997, Ikeda et al., 2022). STAT (Sinyal iletici ve Transkripsiyon Aktivatörü), hücre zarından çekirdeğe sinyallerin iletilmesinden sorumludur, buna bağlı olarak gen ifadelerinde değişikliklere neden olmaktadır (Seif et al., 2017). BCR-ABL tirozin kinaz aktivitesi STAT ailesinin bir üyesi olan STAT5'i aktive etme yeteneğine sahiptir, bu durumda anormal bir şekilde hücre proliferasyonunda, sağ kalımda, BCR-ABL lösemi patofizyolojinde rol oynamaktadır (Berger et al., 2014).

2.2 Kronik Miyeloid Lösemi de Tirozin kinaz İnhibitörleri (TKİ)

Kronik miyeloid lösemi olgularında tedaviye yönelik kullanılan tirozin kinaz inhibitörleri (TKİ) BCR::ABL adenozin trifosfat (ATP) bağlayıcı bölgesine bağlanarak, substratların fosforilasyonunu engeller ve BCR::ABL'nin lökomonogenez sinyalleşmesini inhibe etmektedir. Tirozin kinazlar, hücre proliferasyonu, hücre göçüne, apoptoza yol açan sinyal iletim araçları için önemli arcılardır. Tirozin kinazların kanser patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. Son zamanlarda potansiyel antikanser ilaç hedefleri haline gelmektedir. Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan ilk TKİ imatinib mesilatıdır (İM) (Mitchell et al., 2018). Yapılan IRIS çalışmalarında imatinib mesilatı, kronik fazdaki KML olgularının yaklaşık %74'ünde tam sitogenetik remisyon, balistik fazdaki KML olgularının %11'inde hematolojik yanıt oluşturmaktadır (Kantarjian et al., 2002). İmatinib mesilatında yüksek moleküler yanıt ve sitogenetik oranlarına rağmen KML olgularında ilaç direnci gelişmektedir. Bu durum Ph- pozitif (Ph+) KML olguları için sorun olmaktadır (Yoshida and Melo 2004). İM direncine karşı ikinci ve üçüncü nesil TKİ'ler gelişmesine neden olmuştur. İkinci ve üçüncü nesil TKİ (dasatinib, nilotinib, bosutinib ve ponatinib) 'ler iyi bir remisyon oranı sağlasada hiçbir KML olgularında oluşan direncin üstesinden gelememektedir (Kantarjian et al., 2021, Cortes et al., 2018).

2.2.1 Dasatinib (Sprycel, BMS-35425)

İkinci nesil bir TKİ olan dasatinib, İM direncin üstesinden gelmek için geliştirilmiş çok hedefli bir TKİ'dir (Travis, 2004). Dasatinib, ATP bağlanma bölgesine bağlanarak ABL aracılığıyla inhibe edici etki göstermektedir. Bu durumda ATP bağlanma bölgesindeki P-döngüsündeki mutasyonlar ABL kinazın in vitro koşullarında dasatinibe olan etkinliği azalmıştır (Lombardo, et al., 2004). İmatinib ile karşılaştırıldığında T hücre popülasyonları gösteren bir tür immünolojik değişikliklere neden olmaktadır. Buna bağlı olarak dasatinib ile tedavi edilen KML olgularının yüksek seviyede efektör CD4+ T hücre popülasyonu bulunması ile doğrulanmaktadır (Nerretter et al., 2014). Aynı zamanda tedavi edilen olguların

periferik kan örneklerinde dentritik hücreler, sitotoksik T ve doğal öldürücü hücrelerde (natural killer, NK) artış olduğu bildirilmiştir (Futosi et al., 2012).

2.2.2 Nilotinib (Tasigna, AMN107, Novartis)

İkinci nesil TKİ olan nilotinib, imatinib türevidir ve yüksek özgüllükle tasarlanmıştır. Nilotinib, ATP bağlanma bölgesinde yer alan P-loop katlanarak ABL tirozin kinazın inaktif formuna bağlanmaktadır. Bunun sonucunda substrat bağlanma bölgesini bloke ederek, ATP bağlanma alanını bozmaktadır. Bu durumda tirozin kinaz enziminin katalitik aktivitesini inhibe etmektedir (Yang and Fu, 2015, Xie et al., 2016). İmatinib dirençli BCR-ABL mutasyonların inhibisyonunda güçlü bir ajandır ancak T315I mutasyonuna karşı etkili değildir (Blay and Von 2011). Nilotinib, epidermal büyüme faktörü reseptörleri, SRC kinazlar, vasküler endotelial büyüme faktöründe etkili olmaktadır (Weisberg et al., 2007). Ayrıca hücre ölümünü ile otofajiyi de tetiklediğinden apoptozu indüklemektedir (Shaker et al., 2013).

2.2.3 Bosutinib (SKI-606, Wyeth),

İkinci nesil bir TKİ olan bosutinib, c-KIT ile trombosit kaynaklı büyüme faktörüne karşı inhibitör etkinliğine sahip SCR-ABL kinaz inhibitörüdür (Remsing Rix et al., 2009). Bosutinib, M318 ile van der Waals bağları ile bir hidrojen bağı oluşturmaktadır (Levinson and Boxer 2012). ABL kinazın P halkası bosutinib ile temas etmemektedir, bu durumda P halkası mutasyonlarına karşı bosutinibi duyarlı hale gelmektedir. İmatinib dirençli KML hücre hatlarında bosutinibe karşı duyarlılık gösterilmiştir ancak T315I mutasyonuna karşı bosutinib duyarlılık göstermemiştir (Redaelli et al., 2009).

2.2.4 Ponatinib (AP24534)

Üçüncü nesil TKİ olan ponatinib, T315I mutasyonuna karşı aktivite gösteren güçlü bir inhibitördür. T315I da hidrojen bağı oluşmaması sonucunda ponatinibin etinil kısmı, ATP bağlanma bölgesinde yer değiştirerek karbon-karbon bağı oluşmasını sağlamaktadır. Bu durumda P-loop ile yakın temas kurarak F317 ile bir hidrojen bağı oluşturmaktadır. TKİ ile F317 arasındaki mutasyonlar in vitro koşullarında ponatinibi olumsuz etkilemektedir (Zhou et al., 2011). Ponatinib, T315I mutasyonu

dahil olmak üzere diğer BCR-ABL mutasyonlarına karşı güçlü bir inhibitördür. Bu mutasyonlara karşı etkili olsa da BCR-ABL den bağımsızda direnç oluşmaktadır, buna bağlı olarak ponatinib tedavisi başarısız olmaktadır (Mitchell et al., 2018).

2.3 Kronik Miyeloid Lösemi Hücrelerinde İlaç Direnci

Kronik miyeloid lösemi hücrelerinde TKİ direncinin en bilinen mekanizması BCR::ABL1 kinaz alan mutasyonlarıdır (Branford et al., 2018). BCR::ABL1'den bağımsız gelişen direncin mekanizması henüz anlaşılmamıştır TKİ direnci ile ilişkili olarak düşünülen alternatif sinyal yolları, DNA onarımı, epigenetik işlev bozukluğu, BCR::ABL1 aşırı ifade edilmesidir (Alves, et al., 2021). KML hücrelerinde direnç, tirozin kinazda meydana gelen kinaz bölgesindeki değişiklikler ile ilişkilendirilmektedir (Jabbour et al., 2013). Kinaz alanında meydana gelen mutasyonlar TKİ'lerin BCR::ABL1'in ATP bağlanma bölgesine bağlanmasını engel olur ve bunun sonucunda TKİ'lere karşı direnç kazanmaktadır (Fernandes et al., 2022). Bunlara ek olarak çoklu mutasyonlara sahip olguların ikinci nesil TKİ yanıtı zayıf olmaktadır. Ayrıca T315I'a ek mutasyonlara sahip olguların üçüncü nesil TKİ olan ponatinib'e yanıt yine zayıf olmaktadır (Parker et al., 2016). BCR::ABL1 aşırı ifadesi bir başka direnç mekanizmasıdır. Bu direnç mekanizması TKİ aracılığıyla inhibe edilmesi gereken onkoproteinin konsantrasyonunu artırarak dirence neden olmaktadır (Mahon et al., 2000). Duyarlı ve dirençli KML olgularında yapılan bazı çalışmalarda DNA onarım genlerinin (RAD51L1, FANCA, ERCC5) aşırı ifade edilmesi KML'de DNA onarım mekanizmasında bozuklağa neden olmaktadır. Bu durum TKİ direncinde ve KML evriminde doğrudan rol oynamaktadır (de Lavallade et al., 2010). BCR::ABL1, KML'de inhibe edilmesi ve kinaz aktivite eksikliğini gidermek için alternatif sinyal yollarını aktive etmektedir. Bu sinyal yolları (SRC, RAS/MAPK, JAK/STAT, PI3K/AKT) TKİ direncine katkıda bulunmaktadır (Alves et al., 2021).

2.3.1. KML Direncin de JAK/STAT Sinyal Yolu

KML de sağ kalımı, proliferasyonu ve ilaç direnci ile ilişkili olan JAK/STAT sinyal yolu STAT3 ve STAT5 efektörleri ile gerçekleşmektedir. (Amarante-Mendes et al., 2022, Brachet-Botineau et al., 2020). KML CD34+ hücrelerinde TKİ direncine neden olan Y705 fosforilasyonu sonucunda STAT3 aktivasyonuna neden olmaktadır.

Yapılan çalışmalarda bu direncin üstesinden gelmek için imatinib ve STAT3 inhibitörü olan BP-5-087 ile kombinasyon tedavileri uygulanmıştır. Bunun sonucunda TKİ'ye dirençli lösemik kök hücreler ile prognitör hücrelerin sağ kalımın azalmasına neden olmuştur (Eiring et al., 2014). Yine benzer bir çalışmada JAK1 ile BCR::ABL1'in beraber inhibe edildiğinde benzer sonuçlar elde edilmiştir. JAK1/STAT3 sinyallesinin eksinrik olarak aktive edildiğinden KML hücrelerinde kalıcılığı sağlamaktadır (Kuepper et al., 2019). Benzer bir şekilde STAT5'in aşırı ifade edilmesi in vitro ve in vivo koşullarda TKİ kaynaklı KML hücrelerinin apoptoza olan hassasiyeti azalttığı bildirilmiştir (Warsch et al., 2011). BCR-ABL, FLT3, JAK2 ve IL5 sinyallesine yanıt olarak STAT5 aktive olmaktadır (Gupta et al., 2019). STAT5 sinyallesmesi Pim-1 ve siklin D2 hedef genlerin ifadesini yukarı regülasyonuna neden olur ve hücre lökomogenezini teşvik etmektedir (Gupta et al., 2019, Klejman et al., 2002). Aynı zamanda fosforile edilmiş STAT5, PI3K/AKT sinyal yolunu aktive ederek hücre büyümesini arttırmaktadır. Diğer yandan STAT5'in inhibe edilmesi, anti apoptotik proteinler olan BCL-2 , MCL-1'in ifadelerini azaltır, pro-apoptotik protein olan Bim ifadesini ise artırmaktadır (Harir et al., 2007). Dolayısıyla KML'de STAT5 aktivasyonu, hücre proliferasyonu, sağ kalımı, apoptoz inhibisyonu ve imatinibe karşı direnç oluşturmaktadır (Minieri et al., 2018). STAT5 ikiye ayrılmaktadır STAT5A ve STAT5B bunlar kanser hücrelerinin sağ kalımında ve lösemi patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Yapılan bir çalışmada imatinibe duyarlı ve dirençli KML hücrelerinde STAT5A'nın siRNA aracılığıyla baskılanması apoptozu indüklediği ve imatinibe karşı duyarlılığın artmasına neden olmuştur (Kosova et al., 2010). TKİ direncine karşı STAT5A'yi hedeflemek potansiyel terapötik hedef haline gelmektedir.

2.4 CRISPR-Cas9 Teknolojisi

CRISPR (Kümelenmiş Düzenli Aralıklı Kısa Palindromik Tekrarlar) gen bölgeleri bazı bakteriler ve arkelerde bakteriyofaj enfeksiyonuna ve plazmit transferine karşı bağışıklık geliştirmek için CRISPR ile ilişkili genler tarafından kodlanan RNA kılavuzlu adaptif bağışıklık sistemleri geliştirmiştir. Daha sonra farklı DNA'nın kısa parçaları ile yeni ara parçalar konak kromozom içerisindeki CRISPR tekrar ara parçasına dahil edilmektedir (Mojica et al., 2016). CRISPR/Cas9 tekniği DNA dizisini belirli bir noktadan çift sarmallı kırıklara neden olan DNA endonükleaz Cas9

ve rehber RNA bulunmaktadır (Ran et al., 2013). Rehber RNA'lar, crRNA ve tracrRNA içermektedir. Her ikisinin de farklı işlevleri bulunmaktadır crRNA 20-22 bp'lik istenen DNA dizisine bağlanırken tracrRNA ise DNA kırıklarına neden olan Cas9 için bir çerçeve olarak işlev görmektedir (Wang et al., 2016). Cas9 proteini *S. pyrogenes* bakterisinden türetilmiştir ve SpCas9 olarak adlandırılmaktadır. 1368 amino aside sahip çok işlevli bir endonükleazdır. Cas9'ın iki belirgin bölgesi rehber RNA'yı istenen DNA bölgesinden bağlar ve DNA dizisinde çift sarmal kırıklara neden olmaktadır (Mei et al., 2016, Jiang and Doudna, 2017). CRISPR/Cas9'un nükleaz bölgesi HNH, RuvC ve PAM ile etkileşim bölgelerinden oluşmaktadır (Nishimasu et al., 2014). Cas9 proteinin HNH benzeri bölgesi, DNA dizisinde hedef bölgedeki PAM tanıma bölgeleri için özgüllük sağlayarak PAM ile etkileşimiyle hedef DNA'da çift sarmal kırıklarına neden olmaktadır (Nishimasu et al., 2014, Jiang and Doudna, 2017). Bu bağlamda RNase H katlanması ile tanımlanan retroviral integras süper ailesinin proteinlerine yapısal olarak benzeyen Cas9 proteini RuvC benzeri bölgeyi hedeflemeyen ipliği kesmektedir (Ariyoshi et al., 1994). Yapılan mutagenез çalışmalarında bu iki bölgenin Cas9 DNA endonükleaz olarak önemini göstermektedir. Bu iki alan değiştiğinde Cas9, endonükleaz işlevini kaybetmektedir (Nishimasu et al., 2014). CRISPR/Cas9 sistemi, kullanım kolaylığı, yüksek verimliliği ve tasarım kolaylığından dolayı çok çeşitli organizmalarda genom manipülasyonunda güçlü bir araç olarak uygulanmaktadır (Hsu et al., 2014). CRISPR/Cas9, çinko parmak nükleazları (ZFN'ler) ve transkripyon aktivatörü benzeri efektör nükleazlar (TALEN'ler) gibi nükleaz aracılı gen düzenleme tekniklerinin aksine, DNA'nın tanınması bir protein aracılığıyla değil 20nt'lik rehber RNA dizisi tarafından belirlenmektedir (Doudna and Charpentier 2014, Chandrasegaran and Carroll 2016). Böylece DNA tanıma alanlarındaki protein mühendisliği ortadan kalkarak büyük ölçekli genomik manipülasyonların ve uygulanabilirliği açısından yaygın olarak benimsenmesine neden olmaktadır (Hu et al., 2016).

2.5 Kronik Miyeloid Lösemi Hücrelerinde CRISPR-Cas9 Yöntemi

CRISPR/Cas9 yöntem, Cas9'un özgül alanları etkin bir şekilde kesmesini sağlayarak, hücreleri homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) yoluyla DNA'yı onarması için aktive edilen Tek rehber RNA (sgRNA) aracılığıyla çalışmaktadır. CRISPR/Cas9

sistemi baz eklemeleri veya delesyonlara neden olmaktadır, buna bağlı oluşan çerçeve kayması mutasyonları ile gen ifadesinde değişikliklere yol açmaktadır. Bu sayede DNA dizisinde büyük bir parça silinmiş olur hedef genin kolay bir şekilde nakavt (Knock-out, KO) edilmesini sağlamaktadır (Braun et al., 2020). KML’de BCR-ABL füzyon geni onkojenik bir nedendir. Bu nedenle BCR-ABL bozulması veya nakavt (Knock-out,KO) edilmesi durumunda BCR-ABL füzyon proteinin üretimini de ortadan kaldırmaktadır. Bunun sonucunda KML hücrelerini de tedavi etmemiz mümkün hale gelmektedir. Yapılan çalışmalarda CRISPR/Cas9 sistemi kanser hücrelerindeki füzyon genlerini etkili bir şekilde düzenlendiği bildirilmiştir. BCR-ABL lösemi hücrelerinde olası onkojenik etkinliğini önlemek için CRISPR/Cas9 sistemi kullanılmıştır (García-Tuñón et al., 2017, Vuelta et al., 2021). K562 hücrelerinde CRISPR gRNA FokI nükleaz ile CRISPR/Cas9 sistemleri kullanılmıştır (Luo et al., 2019). Yapılan çalışma sonucunda CRISPR/Cas9 yöntemi ile imatinib tedavisine karşı duyarsız veya dirençli KML olguların tedavisinde güçlü bir terapötik potansiyel olduğunu ve bu yöntemin TKİ direnci KML olguları için bir tedavi seçeneği olabileceği öne sürölmüştür (Zeng et al., 2024).

Gereç ve Yöntem

3.1 Hücrelerin Kültüre Edilmesi

Hücre kültürü yaşam bilimlerindeki en önemli tekniklerden biri olmaktadır. Dokuların veya organların çıkarılması ve bunların hayatta kalmalarına veya çoğalmalarına olanak sağlayacak yapay bir ortama yerleştirilmesi için kullanılan genel terimdir. Hücrelerin optimal şekilde büyümesi için temel çevresel gereksinimler şunlardır: Kontrollü sıcaklık, hücre bağlanması için substrat ve doğru pH ve ozmolaliteyi koruyan uygun büyüme ortamı ve inkübatör. Hücre kültüründe en önemli nokta, in vitro kültür için uygun büyüme ortamının seçilmesidir. Hücre kültürü ortamı genellikle uygun bir enerji kaynağı ve hücre döngüsünü düzenleyen bileşikler içermektedir. Tipik bir kültür ortamı, amino asitler, vitaminler, inorganik tuzlar, glikoz ve büyüme faktörleri, hormonlar ve bağlanma faktörlerinin kaynağı olarak serumdan oluşan bir tamamlayıcıdan oluşur. Besin maddelerine ek olarak ortam aynı zamanda pH ve ozmolalitenin korunmasına da yardımcı olmaktadır. Proje çalışmamızda kullanılan hücre hattı ve özellikleri **Tablo 1** de gösterilmiştir.

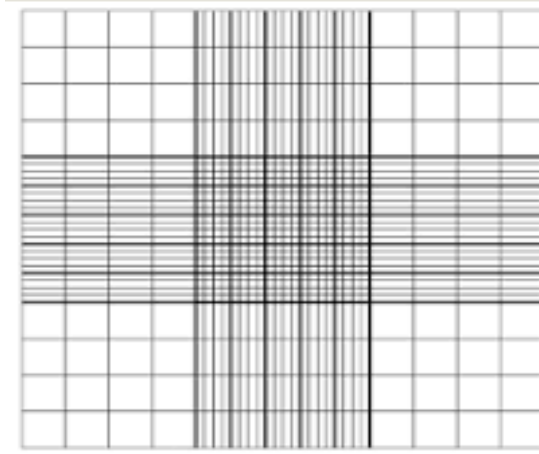
Table 1. K562 Hücre hatları ve Özellikleri

<u>Hücre Hattı</u>	<u>Özellikleri</u>
K562	K-562 (İnsan Kafkas Kronik Miyeloid Lösemi)- ECACC (European Hücre Kültürleri Koleksiyonu), Morfoloji: Lenfoplast). Kronik miyeloid lösemi hücresi
K562/IMA 1.2	1.2 μ M Imatinib'e dirençli K562 hücre hattıdır. Laboratuvarımızda, K562 hücrelerine 1 nM'dan başlayıp, ikilenme zamanına bağlı olarak, hücrelerin canlılık yüzdesine ve koloni oluşturmamalarına dikkat edilerek İmatinib ilavesini takiben, 8 aylık süreç sonunda 1.2 μ M direnç kazandırılmıştır

K562/Pon3	3 nM Ponatinib'e dirençli K-562 hücre hattıdır. Laboratuvarımızda, benzer şekilde K562 hücrelerine 0.1 nM'dan başlayıp Ponatinib ilavesini takiben, 10 aylık süreç sonunda 3 nM direnç kazandırılmıştır.
------------------	--

3.1.1 Hücrelerin Çoğalma Koşulları ve Değerlendirilmesi

Tirozin kinaz, inhibitörlerine direnç kazandırılmış K562/Ima-Res, K562/Pon-Res hücreleri ile K562, kronik miyeloid lösemi hücre hatları çalışmamızda kullanılmıştır. Bu hücre hatların çoğalması in-vitro koşullarında gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin proliferasyonları için RPMI 1640 %10 Fetal bovine serum (FBS) 2mM l-glutamin, 100U/mL penisilin, 0,1 mg/ml streptomisin kullanılmıştır. Proje çalışmamızda lösemik hücre hatlarımız ve kontrol grubumuzu filtreli kapaklı flasklara (25 cm² ve 75 cm² lik) ekildi. Hücrelerde %85 konfluent elde edene kadar çoğalma ve büyüme elde edilene kadar hücrelerin 37°C' de % 95 nem ve %5'lik CO₂'li etüvde inkübasyonu sağlanmıştır. Hücrelerin sayısı ve canlılığını tripan blue (tripan mavisi) boyası ile belirlenmiştir. 50 uL hücre ve 50uL tripan mavisi karışımını hazırlayıp Neubayer lamda, ışık mikroskobu altında hücre sayımı yapılmıştır. Tripan mavisi çalışma prensibi, hücre içine boyayı alarak mavi renkte görünmesini sağlar, bu hücreler ölü olarak değerlendirilir. Boyayı hücre içine almayıp parlak renkte görünen hücreler canlı olarak değerlendirilmiştir. Canlı ve ölü hücre sayısını ml başına şeklinde hücre canlılığı % olarak hesaplanmıştır. Hücrelerin takip işlemleri ve düzenli aralıklarla inverted mikroskop kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Pasajlama sonrasında hücreleri stoklama için DMSO (Dimetil sülfoksit) ve serum karışımı ile dondurularak -80°C saklanmıştır.



Şekil 1. Neubayer Lam

3.1.2 Dirençli Hücrelerin Elde Edilmesi

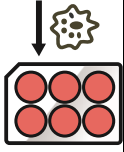
TKI dirençli KML hücre hatları elde edilmesi için 8-10 aylık süreç sonunda direnç kazandırılmıştır. K562/1.2Imatinib dirençli hücre hattı 1nM dan başlayarak, hücre canlılık yüzdesi ve koloni oluşturmamalarına dikkat edilerek ımatinib ilavisi ile ikilenme zamanına bağlı olarakta 8 aylık süreçte 1.2uM direnç kazandırılmıştır. K-562/3nM Ponatinib dirençli hücre hattında ise 0.1 nM dan başlayarak ponatinib ilavesine takiben 10 aylık süreçte direnç kazandırılmıştır.

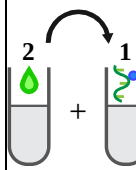
3.2 Transfeksiyon Verimliliği

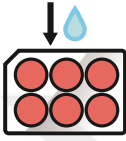
Proje çalışmamızda KML hücre hattı kullanılacak olup, sentetik gRNA dizileri ile STAT5A genine spesifik olarak dizayn edilmiş “TrueGuide™ Synthetic sgRNA, Assay ID: CRISPR731236_SGM, Catalog number:A35533 Thermo Scientific”, negatif kontrol olarak “TrueGuide™ sgRNA Negative Control, non-targeting 1 Catalog number:A35523, Thermo Scientific” ve pozitif kontrol olarak TrueGuide™ sgRNA Positive Control, CDK4 (human) Catalog number: A35526, Thermo Scientific” olarak belirlenmiştir. Cas9 kesimi ise “TrueCut™ Cas9 Protein v2 (1 mg/mL) 25 µg, Catalog number:A36497, Thermo Scientific” ile gerçekleştirilmiştir. Sentetik gRNA’ lar ile Cas9 kesim proteininin hücrelere transfeksiyon ise, lipid bazlı bir yeni nesil transfeksiyon ajanı olan “Lipofectamine™ CRISPRMAX ile Cas9 Transfection Reagent, Catalog number:CMAX00015 Thermo Scientific” transfeksiyon reaktifi” kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tranfeksiyon için “Opti-

MEM™ Reduced Serum Medium Catalog number:31985062 Thermo Scientific” serumu azaltılmış medium kullanılacaktır. gRNA Transfeksiyon işlemlerine ait protokol aşağıda detaylı olarak **Tablo 2.** de verilmiştir.

Tablo 2. Transfeksiyon Protokolü

	Adımlar	Eylem	Prosedür Detayları																
Gün 0	 1	Ekilen hücreler	Transfeksiyondan bir gün önce, yapışık hücrelerinizi aşağıdaki yönergelere göre tohumlayın, böylece transfeksiyon gününde %30-70 oranında birleşirler.																
			<table border="1"> <thead> <tr> <th></th><th>96-well</th><th>24-well</th><th>6-well</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Kuyu başına hücre yoğunluğu</td><td>8,000–18,000 hücre</td><td>40,000–90,000 hücre</td><td>250,000–450,000 hücre</td></tr> <tr> <td>Kuyu başına medyanın nihai hacmi</td><td>100 µL</td><td>0.5 mL</td><td>2 mL</td></tr> </tbody> </table>		96-well	24-well	6-well	Kuyu başına hücre yoğunluğu	8,000–18,000 hücre	40,000–90,000 hücre	250,000–450,000 hücre	Kuyu başına medyanın nihai hacmi	100 µL	0.5 mL	2 mL				
	96-well	24-well	6-well																
Kuyu başına hücre yoğunluğu	8,000–18,000 hücre	40,000–90,000 hücre	250,000–450,000 hücre																
Kuyu başına medyanın nihai hacmi	100 µL	0.5 mL	2 mL																
Gün 1	1  2	Tüp 1'i hazırlamak: Cas9 proteini + Opti-MEM™ I Medium'da Cas9 Plus™ Reaktifi ile gRNA solüsyonu	ÖNEMLİ! Lipofectamine™ CRISPRMAX™ Reaktifini (Tüp 2) seyreltmeden önce daima Cas9 protein/gRNA/Cas9 Plus™ reaktif solüsyonunu (Tüp 1) hazırlanacaktır. a. Standart iki parçalı gRNA formatını (crRNA:tracrRNA) kullanılıyorsa, crRNA:tracrRNA dupleksini oluşturmak için TrueGuide™ crRNA ve TrueGuide™ tracrRNA'yı 5X tavlama tamponunda tavlacaktır. Premium tek parça formatı (sgRNA) için bu adımı atlanabilir ve Adım 2b ile devam edilecektir. b. TrueCut™ Cas9 Protein v2, gRNA (crRNA:tracrRNA duplex veya sgRNA), Lipofectamine™ Cas9 Plus™ Reaktifi ve Opti-MEM™ I İndirgenmiş Serum Medium taze, RNase içermeyen mikrosantrifüj tüpünde aşağıdaki tabloya göre iyice karıştırmak. <table border="1"> <thead> <tr> <th>Reaktif</th><th>96-well</th><th>24-well</th><th>6-well</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Opti-MEM™ I Medium</td><td>5 µL</td><td>25 µL</td><td>125 µL</td></tr> <tr> <td>Cas 9 protein</td><td>250 ng (1.5 pmol)</td><td>1250 ng (7.5 pmol)</td><td>6250 ng (37.5 pmol)</td></tr> <tr> <td>gRNA</td><td></td><td></td><td></td></tr> </tbody> </table>	Reaktif	96-well	24-well	6-well	Opti-MEM™ I Medium	5 µL	25 µL	125 µL	Cas 9 protein	250 ng (1.5 pmol)	1250 ng (7.5 pmol)	6250 ng (37.5 pmol)	gRNA			
Reaktif	96-well	24-well	6-well																
Opti-MEM™ I Medium	5 µL	25 µL	125 µL																
Cas 9 protein	250 ng (1.5 pmol)	1250 ng (7.5 pmol)	6250 ng (37.5 pmol)																
gRNA																			

			<table><tr><td>(crRNA:tracrR NA duplex or sgRNA)*</td><td>50 ng (1.5 pmol)</td><td>240 ng (7.5 pmol)</td><td>1200 ng (37.5 pmol)</td></tr><tr><td>Lipofectamine™ Cas9 Plus™ Reagent**</td><td>0.5 µL</td><td>2.5 µL</td><td>12.5 µL</td></tr></table> Lipofectamine™ Cas9 Plus™ Reaktifini en son eklemek.	(crRNA:tracrR NA duplex or sgRNA)*	50 ng (1.5 pmol)	240 ng (7.5 pmol)	1200 ng (37.5 pmol)	Lipofectamine™ Cas9 Plus™ Reagent**	0.5 µL	2.5 µL	12.5 µL			
(crRNA:tracrR NA duplex or sgRNA)*	50 ng (1.5 pmol)	240 ng (7.5 pmol)	1200 ng (37.5 pmol)											
Lipofectamine™ Cas9 Plus™ Reagent**	0.5 µL	2.5 µL	12.5 µL											
2  3	Tüp 2'yi hazırlamak: Lipofectamine™ CRISPRMAX™ reaktifini Opti-MEM™ I Medium'da Seyreltmek	Lipofectamine™ CRISPRMAX™ Transfeksiyon Reaktifini Opti-MEM™ I İndirgenmiş Serum Medium'da aşağıdaki tabloya göre taze, RNase içermeyen bir mikrosantrifüj tüpünde iyice seyreltmek. <table><tr><th>Reaktif</th><th>96-well</th><th>24-well</th><th>6-well</th></tr><tr><td>Opti-MEM™ I Medium</td><td>5 µL</td><td>25 µL</td><td>125 µL</td></tr><tr><td>Lipofectamine™ CRISPRMAX™ Reagent</td><td>0.3 µL</td><td>1.5 µL</td><td>7.5 µL</td></tr></table>	Reaktif	96-well	24-well	6-well	Opti-MEM™ I Medium	5 µL	25 µL	125 µL	Lipofectamine™ CRISPRMAX™ Reagent	0.3 µL	1.5 µL	7.5 µL
Reaktif	96-well	24-well	6-well											
Opti-MEM™ I Medium	5 µL	25 µL	125 µL											
Lipofectamine™ CRISPRMAX™ Reagent	0.3 µL	1.5 µL	7.5 µL											
 4	Tüp 2'yi oda sıcaklığında 1 dakika inkübe etmek	Opti-MEM™ I Medium'da (Tüp 2) seyreltilmiş Lipofectamine™ CRISPRMAX™ Reaktifini oda sıcaklığında 1 dakika inkübe etmek. Tüp 2'yi oda sıcaklığında 5 dakikadan fazla bırakmayacaktır. Not: gRNA/Opti-MEM™ I solüsyonunu oda sıcaklığında 1 dakikadan daha uzun süre inkübe edilebilir. Tüp 1 oda sıcaklığında 30 dakikaya kadar bırakıldığında transfeksiyon verimliliğinde hiçbir değişiklik gözlemlenmedi.												
 5	Tüp 1 + Tüp 2'yi karıştırmak	Seyreltilmiş Lipofectamine™ CRISPRMAX™ Reaktifini (Tüp 2) gRNA/Opti-MEM™ I solüsyonuna (Tüp 1) eklemek ve pipetleyerek iyice karıştırmak. Not: Yüksek verimli kurulum için (örneğin, 96-well format veya diğerleri), Tüp 2'yi daha hacimli bir ana karışım												

			olarak hazırlanabilecek için Tüp 2'nin içeriğini daima Tüp 1'e eklemek.								
	 6	10-15 dakika oda sıcaklığında inkübe etmek	Tüp 1 + Tüp 2 karışımını (yani transfeksiyon kompleksi) oda sıcaklığında 10-15 dakika inkübe edin.								
	 7	Hücelere transfeksiyon kompleksi eklemek ve 37°C'de inkübe etmek.	a. Aşağıdaki tabloya göre %30-70 izdihamda yapışkan hücrelerinize transfeksiyon kompleksini (6. Adımdan) eklemek. <table border="1"> <thead> <tr> <th>Reaktif</th><th>96-well</th><th>24-well</th><th>6-well</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Cas9 protein/gRNA/transfeksiyon reaktif kompleksi</td><td>10 µL</td><td>50 µL</td><td>250 µL</td></tr> </tbody> </table> b. Hücreleri 37°C'de 2 gün inkübe etmek.	Reaktif	96-well	24-well	6-well	Cas9 protein/gRNA/transfeksiyon reaktif kompleksi	10 µL	50 µL	250 µL
Reaktif	96-well	24-well	6-well								
Cas9 protein/gRNA/transfeksiyon reaktif kompleksi	10 µL	50 µL	250 µL								
Gün 3-4	 8	Genom düzenleme verimliliğini doğrulamak ve alt uygulamalara geçmek	a. Kuluçkadan sonra kültür medium'u çıkarmak ve hücreleri 50-500 µL PBS ile durulamak. b. Genomik bölünme algılama tahlilini gerçekleştirmek için hücrelerin bir bölümünü kullanılacak. downstream deneylerinde kullanmak için en yüksek bölünme verimliliğini gösteren klonları seçilecektir. Not: TrueGuide™ Pozitif Kontroller (insan AVVS1, CDK4, HPRT1 veya fare Rosa 26) ile transfekte edilmiş hücrelerde gen düzenleme etkinliğini doğrulamak için GeneArt™ Genomic Cleavage Detection kitin kullanılması önerilmektedir.								

3.2.1 PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile Jel Elektroforez

Genetik olarak manipüle edilmiş dirençli ve kontrol K562 hücre hatlarımızda transfeksiyon verimliliği gözlemlenmektedir. Bunun için “GeneArt™ Genomic Cleavage Detection kit” aracılığı ile PCR yapıldı ve PCR ürünlerimizi teyit edebilmek için jel elektroforez yapıldı. Jel elektroforezde pcr ürünlerimizi tespit etmek

için GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use (Katalog numarası #SM0323) DNA merdiven (ladder) kiti kullanıldı.

3.2.1.1 PCR protokolü (GeneArt™ Genomic Cleavage Detection kit);

1. 50ul Hücre lizis buffer ile 2uL protein parçalayıcı solüsyonları mikrosantrifüje içerisinde karıştırılır.
2. Bu karışımdan 50 ul alarak 200g 5 dakika 4°C santrifüj edilen hücrelerin peletleri üzerine resüspanse edilerek karıştırılır. Ardından PCR tüplerine aktarılır (0.200ul eppendorf) ve Thermal Cycle da aşağıda yer alan **Tablo 3** da sıcaklığa ve zamana uygun çalıştırılır.

Tablo 3. Thermal Cycler sıcaklık ve zaman döngüleri

Sıcaklık	Zaman
68°C	15 dakika
95°C	10 dakika
4°C	Hold

3. Thermal Cycler dan sonra hücre lizatlarını vortekleyerek **tablo 4** verilen bilgilere göre pcr tüplerine solüsyonlar eklenerek konvensiyonel PCR’da, PCR amplifikasyonu gerçekleştirilir. Ardından **tablo 5** gösterilen döngülerde PCR kurulur ve çalıştırılır.

Tablo 4. PCR ürünleri için verilen bileşen miktarları

Bileşen	Ürün (hücre lizatı)	Kontrol
Hücre lizatı	2 uL	-
10uM Primer F/R karışımı	1 uL	-
Kontrol primerleri	-	1 uL
Amplitaq Gold 360 Master mix	25 uL	25 uL

Nükleaz içermeyen su	22 uL	24 uL
Toplam hacim	50 uL	50 uL

Kullanılan Primerler:

STAT5A forward: GATAGGTAGGCATGGCAAGG

STAT5A reverse: CTGGATGGTAGGGACCCTCT

Bu primer ekzon 2 de yer alan primer amplikasyonuna neden olmaktadır 271 bp uzunluğundadır

CDK4 forward: GCACAGACGTCCATCAGCC

CDK4 reverse : GCCGGCCCCAAGGAAGACTGGGAG

Bu primer 557 bp uzunluğundadır.

Tablo 5: PCR döngüleri

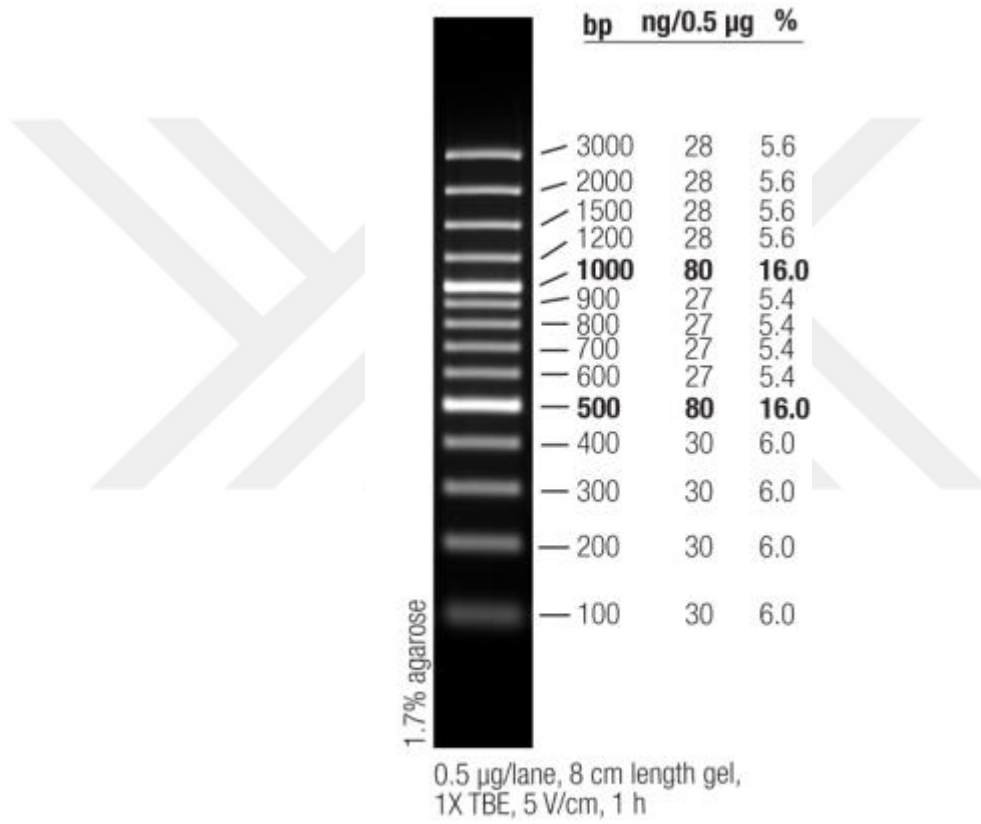
Evre	Sıcaklık	Zaman	Döngü
Enzim aktivasyonu	95°C	10 dakika	1X
Denatürasyon	95°C	30 saniye	40X
Bağlanma	55°C (T _m)	30 saniye	
Uzama	72°C	30 saniye	
Son Uzama	72°C	7 dakika	1X
Hold	4°C	Hold*	1X

Başarılı bir şekilde PCR döngülerimizin ve bileşenlerimizin çalıştığını teyit etmek için Jel elektroforez yapıldı.

3.2.1.2 Jel elektroforez protokolü;

1. 1xTAE (Tris Asetik Asit Edta) tampon için ve agoroz jel konstanrasyonumuzu ayarlamak için kullanıldı.
2. Agoroz'umuzu %2 olacak şekilde 2 gr agoroz hassas terazi de tartıldıktan sonra üzerine 100ml 1x TAE buffer ekliyoruz ve mikro dalgada 2-3dk agarozlar çözülene kadar ısıtıldı

3. Agarozumuzu yaklaşık 50°C soğuduktan sonra 10uL EtBr (Etidyum Bromür) eklendik ardından karıştırılarak agaroz jelimizi soğuması için kuyucuk kalıbına döküldü
4. Agaroz jelimizi jel elektroforez cihazımıza ekleyip üzerini geçinceye kadar 1x TAE buffer ile tankımızı dolduruyoruz
5. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ürünlerimizi DNA yükleme boyası (DNA loading dye 6X) ile muamele edildikten sonra kuyucuklara yerleştiriyoruz ardından 1 saat 100 V (Volt) çalıştırıyoruz.



Şekil 2. Jel elektroforezde kullanılan DNA ladder

3.2.1.3 Bölünme analizi (Cleavage Assay)

Hedeflediğimiz şekilde PCR ürünlerin doğrulanması sonucunda bölünme analizi yapılmaktadır

1. 1-3 uL PCR ürününü alarak yeni bir pcr tüpüne eklenir ardından 1 ul 10X detection reaction buffer eklenir
2. Son hacim 9ul olana kadar su eklenir tablo 6: yer alan protokole göre Thermal cyclers çalıştırılır.

Tablo 6. Bölünme analizinin gerçekleştirilmesi için Thermal cyclers da gereken adımlar

Evre	Sıcaklık	Zaman	Sıcaklık/Zaman
1	95°C	5 dakika	-
2	95° C-85°C	-	-2°C /saniye
3	85°C -25°C	-	-0.1°C /saniye
4	4°C	-	Hold*

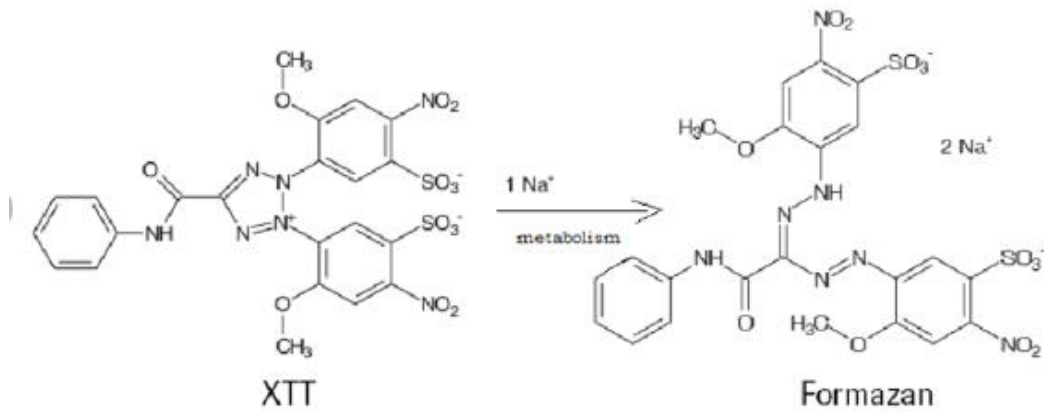
Ardından enzim sindirimi için;

1. 1 ul Detection enzim pcr tüplerine konulur
2. 37°C 1 saat inkübe edilir
3. Vortex ve spin yapılır
4. 4°C ye yerleştirilir ya da jel görüntüleme yapılır

3.3 Hücre Proliferasyon Analizi

Kontrol K562 ve dirençli K562 hücrelerinde STAT5A Knockout (KO) edilmiş deney grubu hücreleri ile onların STAT5A'yı ifade etmeye devam eden kontrol grubu eşleniklerinde sitotoksite analizini “cell proliferation kit (XTT)” kullanarak gerçekleştirilmiştir. XTT çalışma prensibi ise, canlı hücrelerden tetrazolyum tuzlarının ayrıştırılmasına dayanan non-reatif spektrofotometrik ve kalometrij bir test olan sitotoksiste analizinde tetrazolyum tuzları elektron alarak indirger ve

formazona dönüşmektedir. Bu sayede canlı hücreler üzerinde renk değişimi meydana gelmektedir. Cansız, ölü hücreler tetrazolyum bileşiklerini indirgeme yeteneklerini kaybettikleri için renk değişimi meydana getirmeyeceklerdir. Bundan dolayı canlı hücre sayısının artması formazon boyasının miktarı da arttırılacaktır. Formazon boyasının ölçümü ELISA mikropalak okuyucuda (Multiskan Fc, Thermo) ile gerçekleştirilmiştir. STAT5A knockout edilmesinin K562 hücrelerinin proliferasyonu üzerindeki etkileri zamana bağımlı olarak gösterilmiştir. Bu esnada gerçekleştirilmesi planlanan bir başka analiz ise, gen çıkartılması sonrasında hücrelerin tirozin kinaz inhibitörü imatinibe verdikleri yanıtın belirlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen tüm lösemi hücre hatlarımızın imatinib için hücrelerin yarısını öldüren sitotoksosite dozu IC50 önceki çalışmalarımızda belirlenmiş durumdadır. Transkripsiyon faktörü STAT5A' nın çıkartılması sonrasında 100 nM- 100 μ M doz aralığında ve 24 - 48 - 72 saat sürecinde lösemi hücrelerinin imatinib hassasiyetinin geri kazanılması hedeflenerek, bu analiz gerçekleştirilecektir. Gen çıkartılması sonrasında elde edilecek yeni IC50 değeri ile, hücrelere spesifik olarak önceden belirlenmiş IC50 dozlarının kıyaslanması sonrasında özellikle dirençli hücrelerde gözlenecek olası kemoterapötik yanıt geri kazanımı belirlenmiştir.



Şekil 3. XTT tahlilinin prensibi

3.4 Apoptoz Analizi

Kontrol ve dirençli K562 hücrelerinde STAT5A KO edilmiş deney grubu ve onların STAT5A yı ifade eden kontrol grubu eşleniklerinde apoptotik durumlarını belirlemek

amacıyla Annexin V yöntemi “BD Pharmingen FITC Annexin V apoptosis Detection Kit” kullanılarak, Normal bir hücrenin, hücre zarının sitoplazmik yüzünde membran lipidlerinden biri olan fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Hücrenin apoptoza girmesi durumunda hücre zarının iç yüzeyinde bulunan fosfatidilserin, hücre zarının dış yüzeyine geçmektedir. Bu geçiş süreci, membran bütünlüğünün bozulmadığı durumda apoptotik hücre ölümünün erken evresinde meydana gelmektedir. Hücrenin dış yüzeyine transloke olan ve fosfatidilserine bağlanan bir protein olan Annexin V floresan bir madde (FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücrenin görünür hale gelmesi sağlanmaktadır. PS’nin hücrenin dış yüzeye transloke olması nekrotik ve geç apoptotik hücrelerde de meydana gelmektedir. Bu nedenle erken apoptotik hücrelerin ayrımı propidium iodide (red fluorescence) boyası ile sağlanmaktadır. Bu bağlamda; FITC-Annexin V ve PI negatif olan hücreler canlı, FITC-Annexin V pozitif PI negatif olan apoptoz sürecine girmiş ancak henüz membran bütünlüğü bozulmamış hücreler erken apoptotik, FITC-Annexin V ve PI pozitif olan apoptoz sürecine girmiş ve membran bütünlüğü bozulmuş hücreler geç apoptotik, FITC-Annexin V negatif PI pozitif olan hücreler ise nekrotik olarak değerlendirilecektir. Apoptoz analizi, x3 biyolojik replika olacak şekilde gerçekleştirilecektir. Meydana gelen apoptotik indüksiyon, BD Accuri akış sitometri cihazında (BD Biosciences) değerlendirilmiştir.

3.5 Hücre Döngüsü Analizi

STAT5A KO edilmiş deney grubunu oluşturan K562 parental ve dirençli hücreler ile sağlıklı kontrol hücreleri ile STAT5A KO edilmemiş eşlenik kontrol grubu hücrelerde hücre döngüsü tutulması üzerindeki etkileri BD Cycletest Plus DNA Reagent Kit” (Becton Dickinson) kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu kitin çalışma prensibi, sodyum sitrat, süktroz ve DMSO içeren tampon içine toplanan hücrelerin membran lipidleri non-iyonik deterjanı ile liziz edilmektedir. Hücre iskeleti ve nükleer proteinler ise tripsin ile elimine edilmektedir. Ribonükleaz A RNA’ları sindirirken, sperminin ise kromatinlerin stabilizasyonu sağlamaktadır. İzole edilen DNA’nın Propidium iyodür (PI) boyası ile boyanması sonucunda 580nm ve 650nm arasındaki dalga boylarında floresan ışık yaymaktadır. Elde edilen floresans ışınları sayesinde; anöploidi (2n, 2-4n,4n) DNA miktarı belirlenir, böylece G0/G1, G2/M ve S faz evrelerindeki hücre sayısı ve yüzdeleri tespit edilmektedir. Tüm k562 hücrelerinden

ve dirençli k562 hücrelerinden 1×10^6 hücre 6 kuyucuklu mikropalakaya ekilip ve hücre döngüsü üzerindeki etki BD accuri akım sitometri cihazında (BD Biosciences) cihazında değerlendirilmiştir.

3.6 Gen Ekspresyon Analizleri

CRISPR/Cas9 genom düzenleme teknolojisi ile hedef genimiz STAT5A KO edilmiş deney grubu hücreler ile onların kontrol grubu hücrelerden lösemi ve karsinogenez sürecinde büyük önem taşıyan hedef genlerin mRNA transkripti seviyesindeki gen ekspresyon profillemesi yapılmıştır. Deney ve kontrol grubu hücrelerden izole edilen total RNA'dan cDNA çevrimi konvansiyonel PCR cihazında kit manueli gereğince oluşturulan termal profilde gerçekleştirildikten sonra belirlenen termal profilde hedefe spesifik genler olarak dizayn edilmiş primerler ile gerçek zamanlı PCR cihazında [LightCycler 480 (Roche, Germany)] kantatif PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda apoptoz, hücre döngüsü, ilaç direnci, lösemi terapötik hedef genleri, onkogenler, tümör süpresörlerin mRNA seviyesindeki ifade değişiklikleri oluşturduğumuz orijinal panel ile incelenmiştir. Belirlenen hedef genlerin mRNA seviyesindeki ifade profilleri her bir kuyucuk için eşik döngüsü (CT) değeri LightCycler 480 kantifikasyon yazılımı (Quantification software) kullanılarak hesaplanmıştır. Daha sonra verilerin analizi "SABiosciences PCR Array Data Analysis" sistemine girilerek $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi gereğince hesaplanmıştır. Gen ifadesi analizi x3 biyolojik replika olacak şekilde çalışılmıştır ve istatistiksel analizler Student-T testi ile gerçekleştirilmiştir. Gen ekspresyon profilleri yapılacak hedef genlere ait oluşturduğumuz orijinal panel **Tablo 7'de** verilmiştir.

Tablo 7. Gen ekspresyon analizinde kullanılacak hedef genler

Apoptoz	Hücre döngüsü	JAK/STAT	Diğer Genler	Diğer Genler	STAT5 Hedefleri	Onkogen İle ilişkili
BAX	ATM	STAM	BCR	GAPDH	CISH	ABL1
BCL-X	CCND1	STAT1	CEBPB	AKT1N	PIM1	
BCL-2	CDKN1A	STAT3	ABCG2		MTOR	
CASP3	CDKN2A	STAT5A	ABCC2			

CASP8	CDKN2B	STAT5B	GAB1			
MCL1	E2F1	SOCS1	GAB2			
	CDK4	IL6				
		JAK2				

3.6.1 Gen ekspresyonu için total RNA izolasyonu

Hücreler inkübasyon süreci sonunda toplanıp, santrifüj sonrası elde edilen hücre pelletlerinden, total RNA izolasyonları “Magna Pure Compact RNA Isolation” kit manuele göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre, elde edilen hücre pelleti üzerine 100 µl PBS ve 100 µl “Lysis-binding Buffer” eklenip karıştırılıp, karışım Magnapure Compact LC (Roche) cihazına yüklenip, otomatize RNA izolasyonu prosedürü başlatılmıştır. Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflıkları 260/280nm ve 230/260nm dalga boylarında absorbanlarının ölçülmesi ile belirlenmiştir. Bu ölçümler her bir örnekten 1-2uL kullanılarak Nanodrop cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.6.2 Gen ekspresyonu için cDNA sentezi

RNA’ların cDNA çevrimi “OneScript® Plus cDNA Synthesis Kit” ile konvanisyonel PCR cihazında yapılmıştır. Genomik DNA Eliminasyon Reaksiyonu: Hazırlanan reaksiyon karışımı 42°C’ de 5 dk inkübe edilip, 1 dk boyunca buz üzerinde tutulduktan sonra ters transkripsiyon karışımı hazırlanmıştır

Tablo 8.cDNA için bileşen ve miktarlar

Bileşen	Miktar
RNA	25ng-5ug
Buffer GE	2ul
RNase-free su	Değişken
Toplam Hacim	10ul

Reverse Transkripsiyon Reaksiyon Karışımının Hazırlanması: 10 µl RNA eliminasyon karışımı bulunan her tüpe 10 µl ters transkripsiyon karışımı eklenip, 42°C’ de 10 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra 95°C’ de 5 dk inkübe edilerek reaksiyon durduruldu. Her tüpe RNase-free su ilave edilip pipetlenerek, tüpler buz üzerine alınıp gerçek zamanlı PCR protokülü ile devam edilmiştir.

Tablo 9.Reverse trankripsiyon reaksiyon karışımının hazırlanması

Bileşen	1X Reaksiyon Hacmi
5X Buffer BC3	4 ul
Control P2	1ul
R3 Reverse	2ul
Transkriptase Mix	3ul
RNase-free su	
Toplam Hacim	10ul

Hücrelerden elde edilen total RNA’ lardan sentezlenen cDNA’ lar PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanıldı ve PCR sonucunda elde edilen ifadeler birbirleriyle karşılaştırıldı. Yapılan analizler laboratuvarımızda bulunan Roche LightCycler 480 platformunda gerçekleştirildi. qPCR reaksiyonu hazırlandı

Tablo 10.qPCR reaksiyonu için bileşenler ve miktarlar

Bileşen	Miktar
RT² SYBR Green	12.5ul
Mastermix	1ul
cDNA synthesis reaction	
RT² qPCR Primer Assay	1ul
RNase-free su	10.5ul
Toplam Hacim	25ul

Hazırlanan 25 µl reaksiyon karışımı, 96’ lık plak formatındaki her bir kuyuya 25 µl olacak şekilde dağıtıldı. Real-time PCR cihazında termal profile göre amplifiye

edilmiştir. qRT-PCR sonuçlarının analizi $\Delta\Delta C_t$ metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

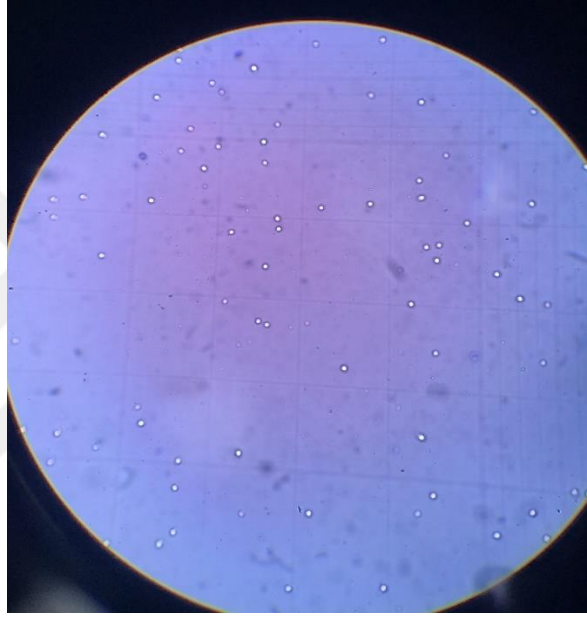
Tablo 11. Termal profil

Döngü	Süre	Sıcaklık
1	10dk	95°C
40	15s 1dk	95°C 60°C

Bulgular

4.1 Hücre Proliferasyon Testi

Kültüre edilmiş hücrelerin canlılık yüzdeleri hesaplamak amacıyla gerçekleştirdiğimiz tripan mavisi boyası ile K562 hücrelerinin yüzde %95 canlı, K562/1.2 İmatinib dirençli hücrelerin yüzde canlılığı %92, K562/3nM Ponatinib dirençli hücrelerin yüzde canlılığı ise %95'tir. Elde edilen verilerin deneylerde kullanılacak canlılıkta oldukları gözlemlenmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. Tripan mavisi ile boyanmış 10x büyütmede K562 hücrelerinin sayımı yapılmıştır

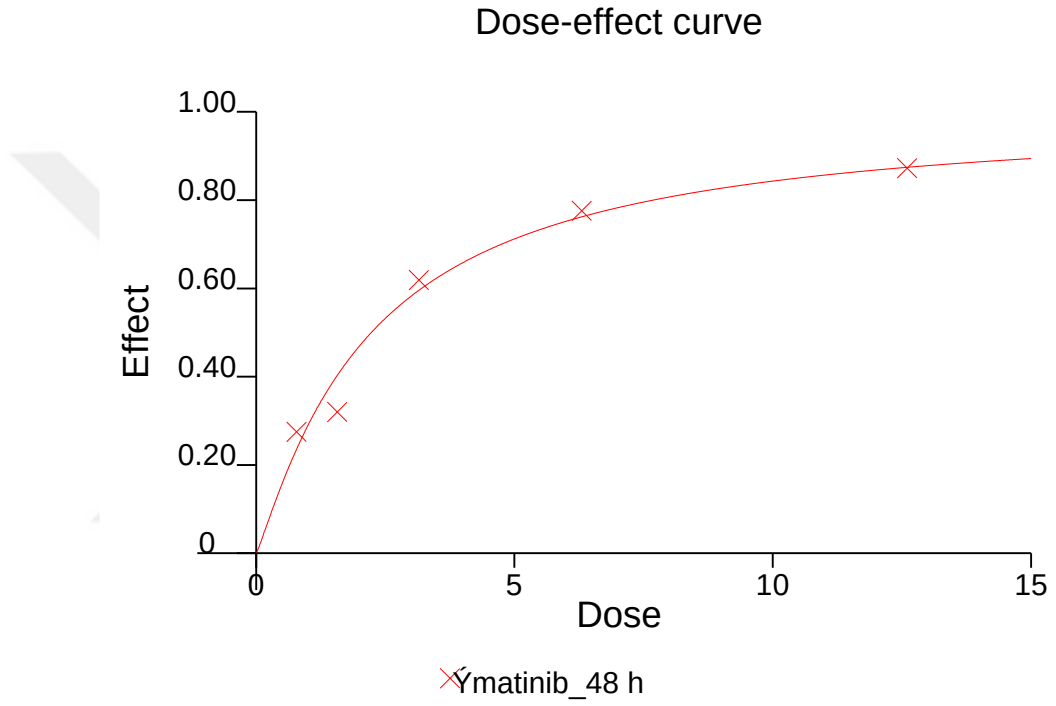
4.2. Dirençli Hücrelerin Sitotoksite Analizi

K562/1.2uM İmatinib ile K562/3nM Ponatinib dirençli hücrelerine imatinib için 0.5uM, 1uM, 1.2uM ve 2uM dozları uygulanmıştır. Dirençli ponatinib hücreleri için 1nM, 3nM, 6nM dozları uygulanmıştır. Dirençli hücrelerin XTT analizi ile gerçekleştirildi. IC₅₀ değeri calcusyn yazılım programında hesaplanmıştır.

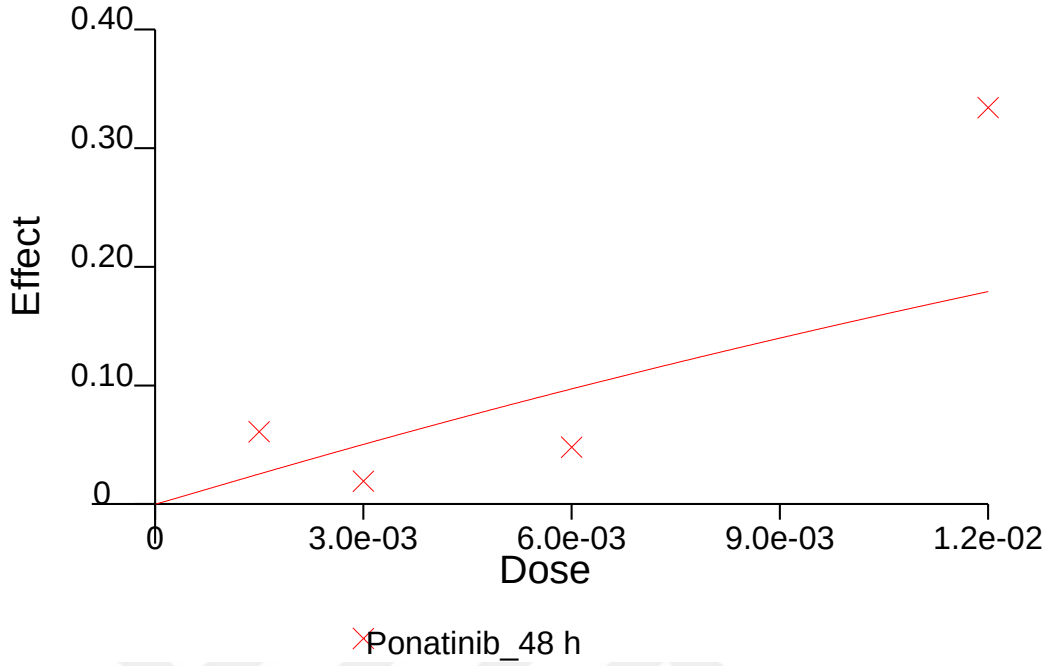
4.2.1 K562/1.2uM Imatinib Dirençli ve K562/3nM Ponatinib Hücrelerin

Sitotoksite Analizi

K562/1.2 uM imatinib dirençli hücrelerde 48. saatin sonunda yapılan sitotoksite sonucunda IC_{50} değeri 2.4 uM olarak belirlenmiştir ve R:0.89 olarak belirlenmiştir. K562/3nM ponatinib dirençli hücrelere 48. saatin sonunda yapılan sitotoksite analizi sonrasında R değeri: 0.80, IC_{50} değeri ise 6nM olarak bulunmuştur (**Grafik1**)



Dose-effect curve

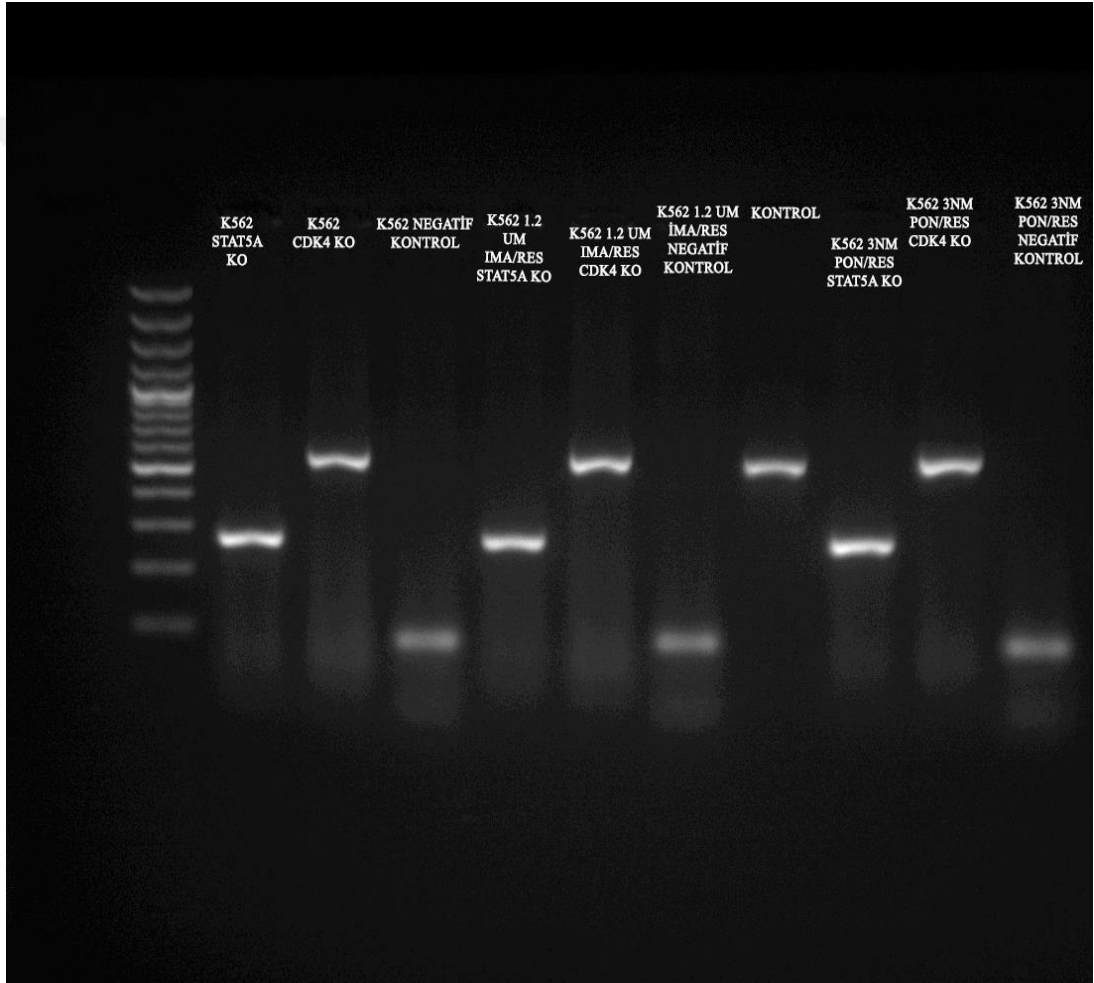


Grafik 1. K562/1.2 uM imatinib dirençli hücreler ile K562/3nM ponatinib dirençli hücreleri 48.saat sonunda sitotoksite analiz sonuçları

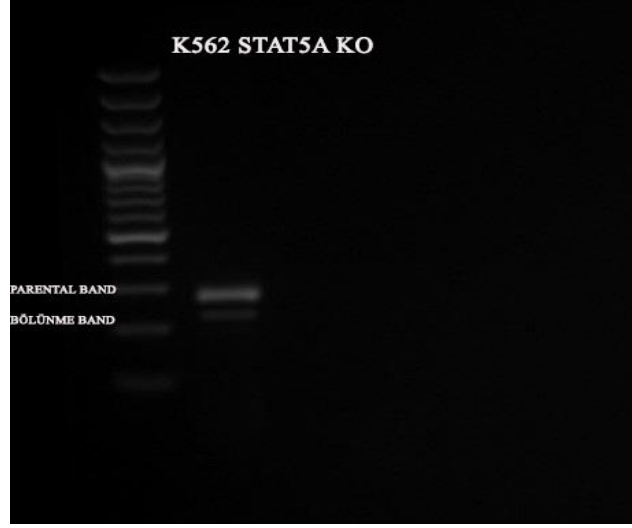
4.3. Transfeksiyon Analizi

K562 hücre hatları protokole göre 25×10^4 olacak şekilde hücreleri 6'lı well platelere ekilmiştir. Ardından rehber RNA'lar ve Cas9 Lipofektamin crispermax aracılığıyla transfeksiyonu gerçekleştirildi. 48. saatin sonunda hücreler toplandı ve bölünme verimliliği için belirlenen GeneArt™ Genomic Cleavage Detection kit aracılığıyla, elektroforezde primer ve indel analizi yapıldı. Elektroforez işleminde kullanılan primerler; STAT5A, CDK4 ve BRD4'tür. Ekzon 2'de yer alan STAT5A hedef baz dizisi AAGTAGTGCCGACCTCGAT'dir ve PAM dizisi GGG, hedef gen bölgesi, kromozom 17: 42289490-42289512 -insan, ileri iplikte yer alır ve hedeflenen geni nakavt etmektedir. Pozitif kontrol grubumuz için CDK4 ise hedef baz dizisi, 5'CACTCTTGAGGGCCACAAAG 3'tür. Negatif kontrolümüz ise non-targeting hedef baz dizisi, 5' AGTACGGATCGCGTCGATCT 3'tür. GeneArt™ Genomic Cleavage Detection kit aracılığıyla bölünme analizi yapılmıştır. Hücrelerimizin

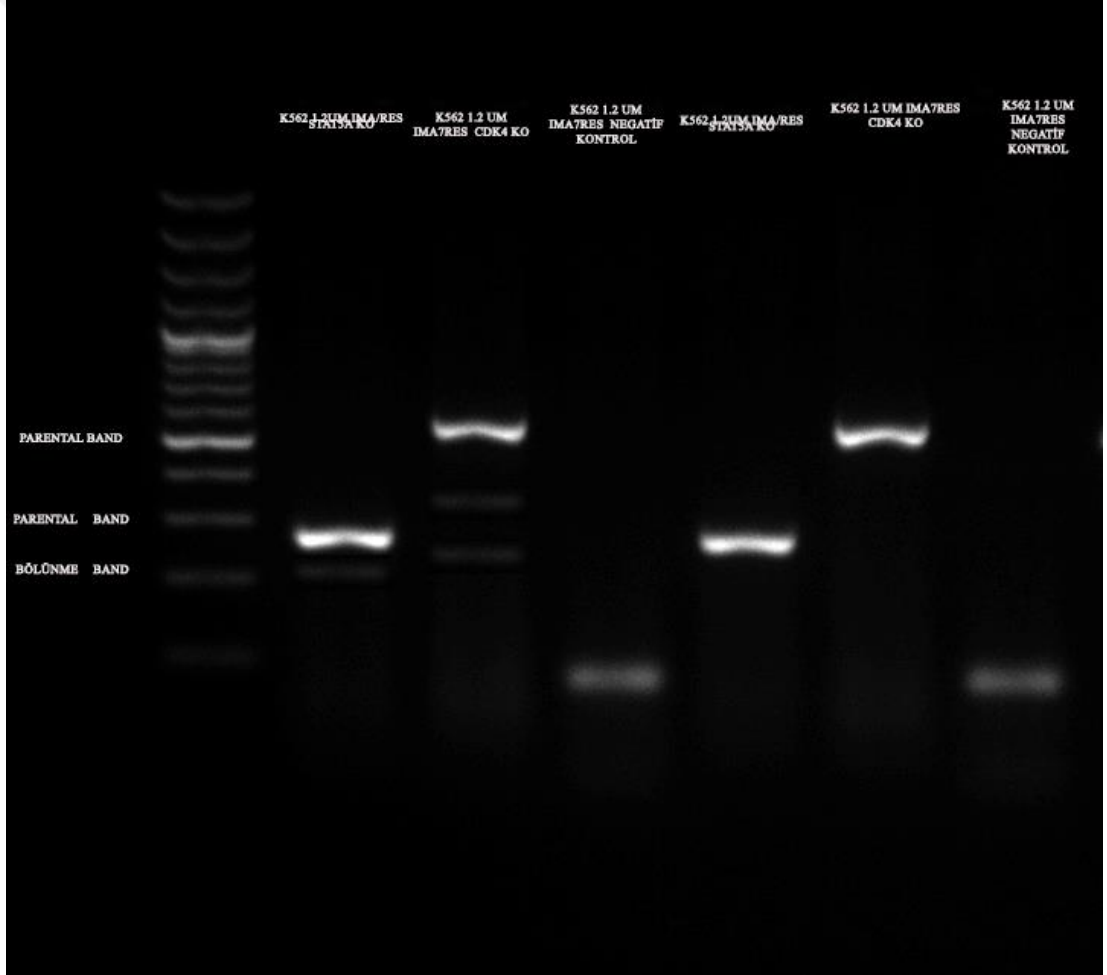
tranfeksiyonu yapıldıktan sonra jel elektroforez de şekil görüldüğü üzere görüntülenmiştir. Kit aracılığıyla indel analizi yapılmıştır, jel elektroforez de şeil gösterilmiştir. K562 kontrol ve dirençli hücrelerimizde STAT5A'nın nakavt edilmesi sonucunda 271 bp ila 220 bp bantlar gözlemlenmiştir. edef hücre hatlarında pozitif kontrol olarak CDK4 nakavt edilmesi sonucunda 557 bp 342 ile 235 bp bantlar gözlemlenmiştir. Negatif kontrol grubumuzda herhangi bir bölünme veya kesilen bant gözlemlenmemiştir (Şekil 5,6,7,8). İndel yüzdeleri ise STAT5A nakavt edilen hücrlerde %18,8, CDK4 nakavt edilen hücre hatlarında %19.2 olarak hesaplanmıştır (Grafik 2).



Şekil 5. K562 hücre hattı ile K562 dirençli hücrelerimize CRISPR/Cas9 yöntemi uygulanmış hücrelerimizin PCR ürünleri gösterilmektedir.



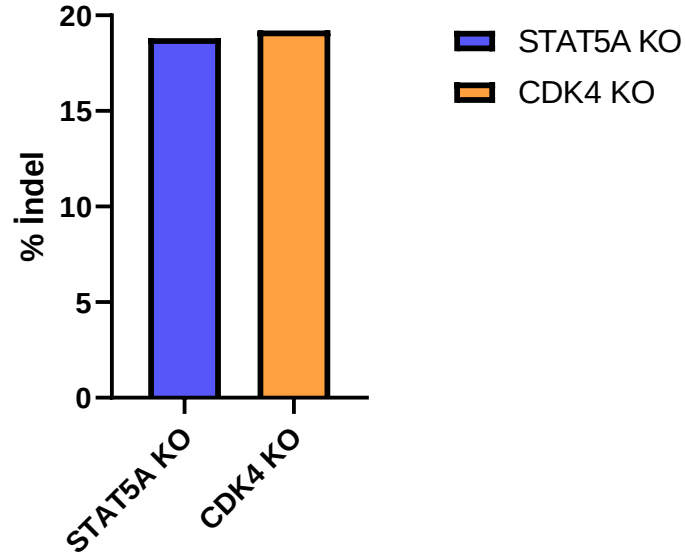
Şekil 6. K562 STAT5A nakavt edilmiş hücre hattında 271 bp parental bant ile 220bp kesilen bant görülmektedir.



Şekil 7. K562 1.2 uM imatinib dirençli hücre hatlarında STAT5A nakavt edilen hücre hattı, pozitif kontrol olarak CDK4 nakavt hücre hattında ve negatif kontrol hücrelerinde bölünme analizi sonrasında jel görüntüsü



Şekil 8. K562 3nM ponatinib dirençli hücre hatlarında STAT5A nakavt edilen hücre hattı, pozitif kontrol olarak CDK4 nakavt hücre hattında ve negative kontrol hücrelerinde bölünme analizi sonrasında jel görüntüsü



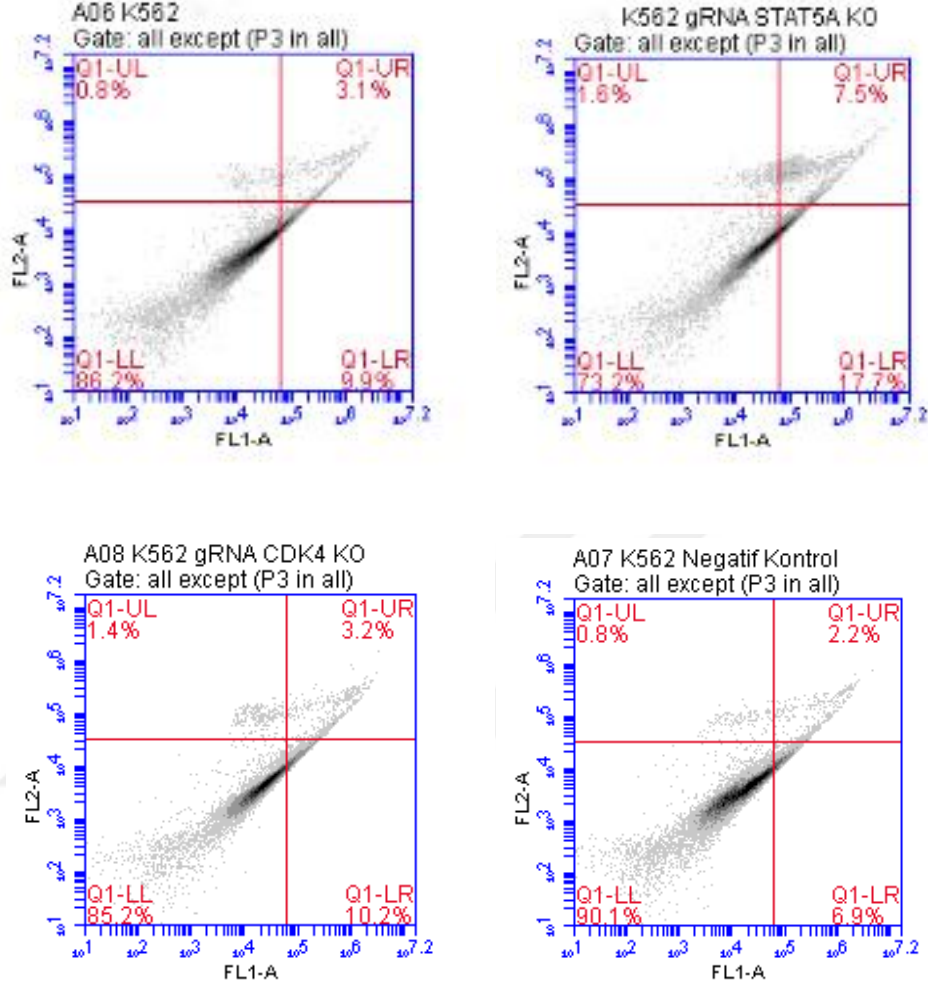
Grafik 2. STAT5A nakavt edilen hücrelerde %18.8, CDK4 KO hücrelerinde %19.2 indel grafiği

4.4 Apoptoz Analizi

4.4.1 K562 Kontrol Hücre Hattı ile CRISPR/Cas9 Uygulanmış K562 Hücrelerin Apoptotik etkileri

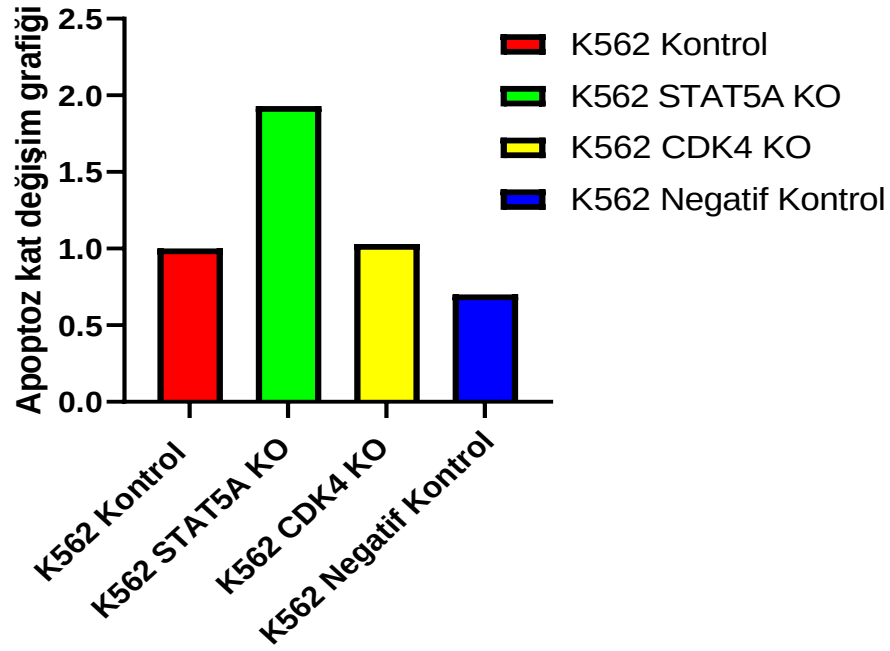
K562 Kontrol grubu hücreleri ile dirençli K562 hücrelerinde CRISPR/Cas9 uygulanması sonrasında 48.saat sonunda apoptoz ile hücrelerin indüklenmesi veya inhibisyonu analiz edilmiştir. K562 hattına ait apoptoz oranları şekil 9'da gösterilmiştir. K562 kontrol hücrelerine apoptoz oranları %9.9 erken apoptoz, %3.1 geç apoptoz ve %0.8 nekroz gözlemlenmiştir. CRISPR/Cas9 aracılığıyla STAT5A nakavt edilen K562 hücrelerinde apoptoz oranları ise %17,7 erken apoptoz, %7.5 geç apoptoz ve % 1.6 nekroz gözlemlenmiştir. Yine pozitif kontrol olarak K562 hücrelerinde CDK4 nakavt edilmesi sonucunda apoptoz oranları; %10.2 erken apoptoz, %3.2 geç apoptoz, %1.4 nekroz olarak gözlemlenmiştir. K562 negatif kontrol grubunda ise %6.9 erken apoptoz, %2.2 geç apoptoz ve %0.8 nekroz gözlemlenmiştir. K562 kontrol hücrelerine ait apoptoz kat değişimi grafik 3 gösterilmiştir. Kontrol grubuna kıyasla, K562 hücrelerinde STAT5A'nın nakavt

edilmesi sonucunda 1.93 katlık apoptoz artışı ile yine K562 hücrelerinin CDK4'ün nakavt edilmesi sonucunda hücrelerde 1.03 kat apoptoz artışı ile K562 negatif kontrol grubunda ise 0.7 kat azalma gözlemlenmiştir.



Şekil 9. K562 kontrol grubu ile CRISPR/Cas9 uygulanmış K562 hücrelerinde STAT5'in nakavt edilmesi ile K562 hücrelerinde pozitif kontrol olarak CDK4'ün nakavt edilmesi ve negatif kontrolün 48. saat sonrasında apoptoz sonuçları

K562 Hücre Hattı

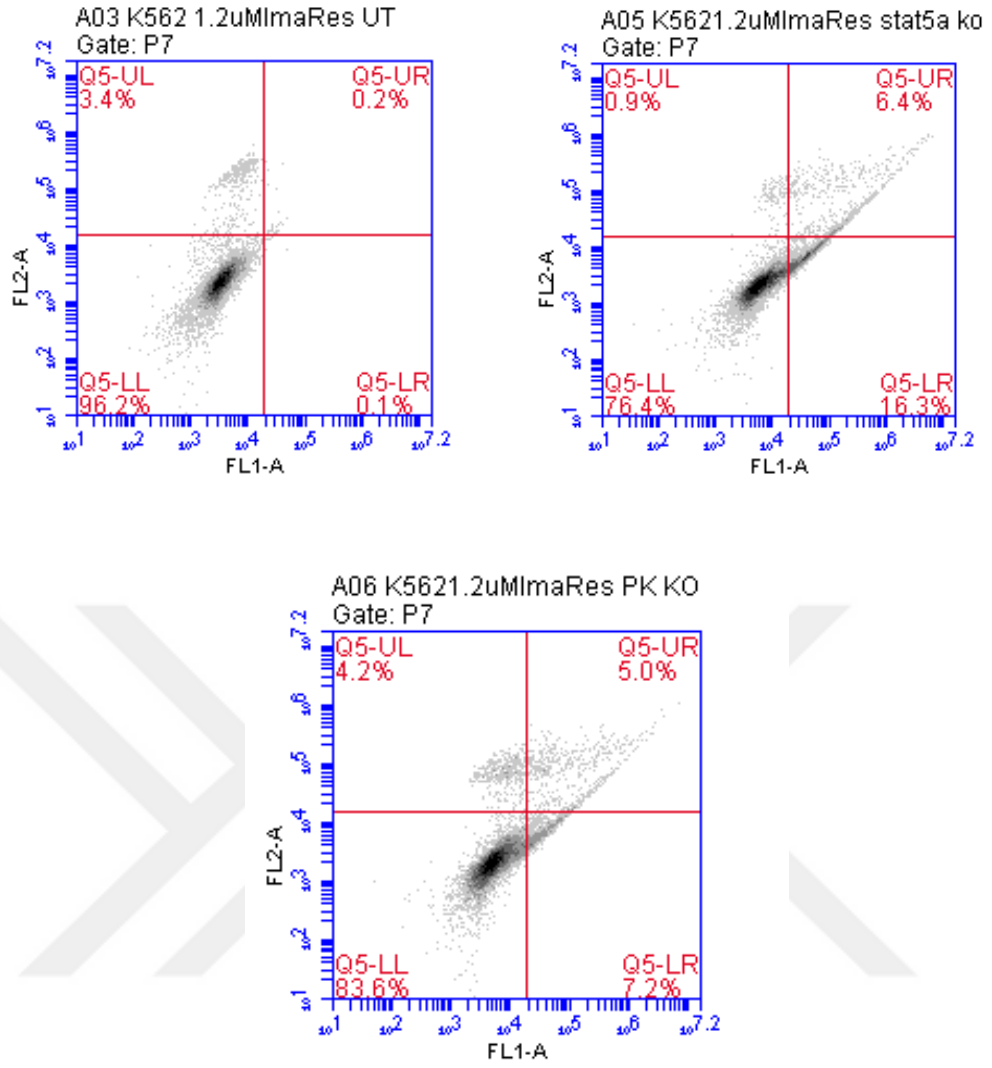


Grafik 3. K562 kontrol grubu ile CRISPR/Cas9 uygulanmış K562 hücrelerinde 48. saat sonunda apoptoz kat değişim grafiği

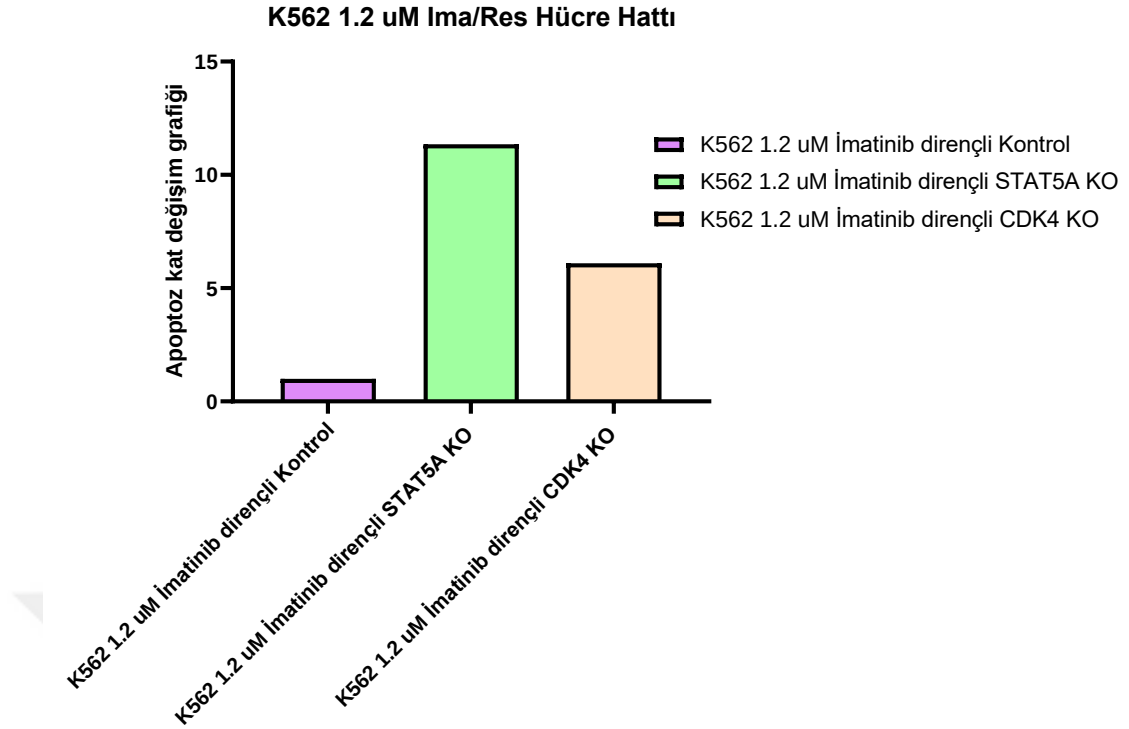
4.4.2 K562 1.2 uM İmatinib Dirençli Kontrol Hücre Hattı ile CRISPR/CAS9

Uygulanmış K562 1.2 uM İmatinib Dirençli Hücrelerin Apoptotik etkileri

K562 1.2 uM imatinib dirençli kontrol grubu ile CRISPR/Cas9 yöntemi uygulanarak bu hücrelerin 48. saat sonunda apoptotik etkileri şekil 10'da gösterilmiştir. Aynı zaman da bu hücrelerin apoptoz kat değişim grafiği 4 ile de gösterilmiştir. K562 1.2 uM Imatinib dirençli hücrelerde STAT5A'nın nakavt edilmesi sonucunda %16,3 erken apoptoz, %6,4 geç apoptoz, %0,9 nekroza neden olmuştur. K562 1.2 uM imatinib dirençli hücrelerde nakavt edilen CDK4'ün apoptotik etkileri ise %7.2 erken apoptoz, %5 geç apoptoz ve %4.2 ile nekroz ile sonuçlanmıştır. İmatinib dirençli hücrelerde STAT5A nakavt edilmesi sonucunda 11.35 kat apoptoz artışına neden olmuştur. CDK4'ün nakavt edilmesi sonucunda 6.1 kat apoptoz artışına neden olmuştur.



Şekil 10. K562 1.2 uM İmatinib dirençli kontrol hücreleri ile CRISPR/Cas9 uygulanmış hücrelerde 48. Saat sonunda apoptoz sonuçları

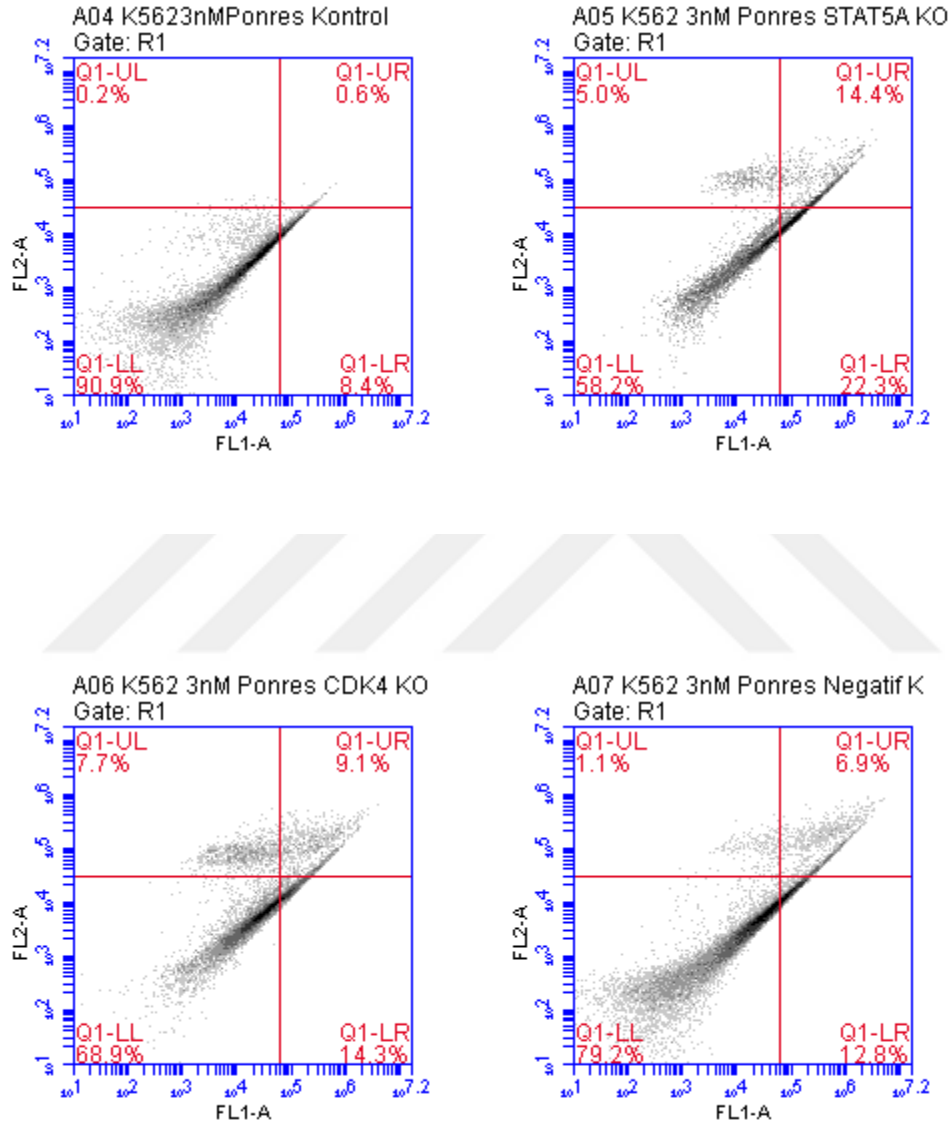


Grafik 4. K562 1.2 uM İmatinib dirençli kontrol hücreleri ile CRISPR/Cas9 uygulanmış dirençli hücrelerin 48. saat apoptoz kat değişim grafiği

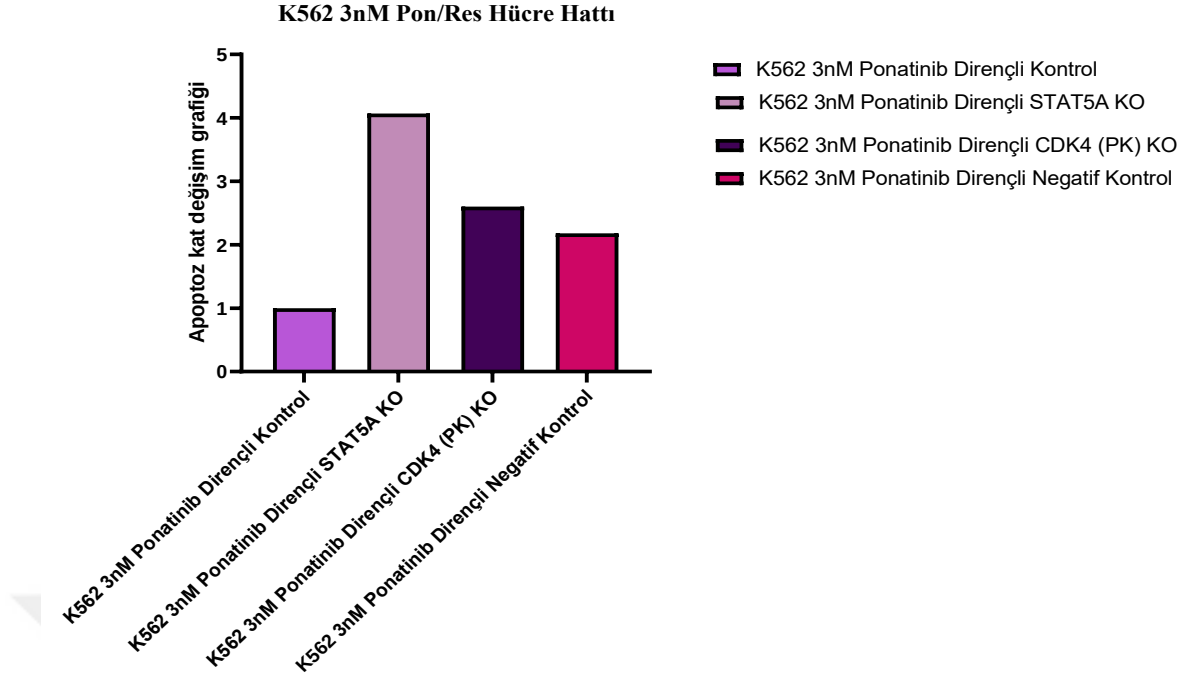
4.4.3 K562 3nM Ponatinib Dirençli Kontrol Hücre Hattı ile CRISPR/CAS9 Uygulanmış K562 3nM Ponatinib Dirençli Hücrelerin Apoptotik Etkilerinin Belirlenmesi

K562 3nM ponatinib dirençli kontrol grubu ile CRISPR/Cas9 yöntemi uygulanarak bu hücrelerin 48. saat sonunda apoptotik etkileri şekil 11’de gösterilmiştir. Aynı zaman da bu hücrelerin apoptoz kat değişim grafiği 5 ile de gösterilmiştir. K562 3 nM ponatinib dirençli kontrol grubunda %8.4 erken apoptoz, %0.6 geç apoptoz, %0.2 nekroz gözlemlenmiştir. K562 3 nM ponatinib dirençli hücrelerde STAT5A’nın nakavt edilmesi sonucunda %22,3 erken apoptoz, %14,4 geç apoptoz, %5 nekroza neden olmuştur. K562 3 nM ponatinib dirençli hücrelerde nakavt edilen CDK4’ün apoptotik etkileri ise %14.3 erken apoptoz, %9.1 geç apoptoz ve % 7.7 nekroz ile sonuçlanmıştır. K562 3 nM ponatinib dirençli negative kontrol hücre grubunda %12.8 erken apoptoz, %6.9 geç apoptoz % 1.1 nekroz gözlemlenmiştir. Ponatinib dirençli hücrelerde STAT5A nakavt edilmesi sonucunda kontrole göre

4.07 kat apoptoz artışına neden olmuştur. CDK4'ün nakavt edilmesi sonucunda kontrole göre 2.60 kat apoptoz artışına neden olmuştur. Ponatinib dirençli negative kontrol grubunda ise 2.18 kat artış gözlemlenmiştir.



Şekil 11. K562 3nM ponatinib dirençli kontrol hücreleri ile CRISPR/Cas9 uygulanmış hücrelerde 48. saat sonunda apoptoz sonuçları



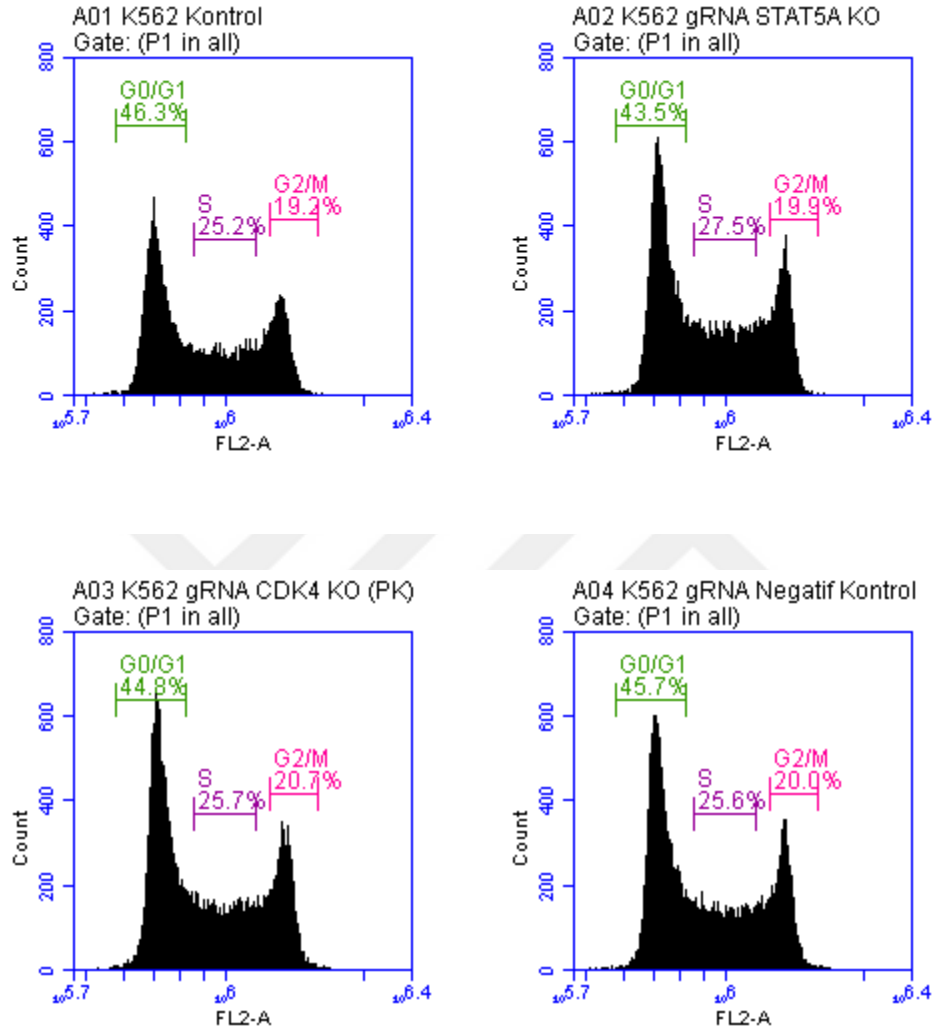
Grafik 5. K562 3nM ponatinib dirençli kontrol hücreleri ile CRISPR/Cas9 uygulanmış dirençli hücrelerin 48. Saat sonunda apoptoz kat değişim grafiği

4.5 Hücre Döngüsü Analizi

4.5.1 K562 Kontrol Grubu ile CRISPR/Cas9 Uygulanmış Hücrelerinde Hücre Döngülerinin belirlenmesi

K562 kontrol grubu hücreler ile gen manipülasyonu yapılmış hücrelerde hücre döngüsü analizi yapılmıştır (Şekil 12). Hücre döngüsü analizi için 48.saat sonunda K562 kontrol grubunda G0/G1 %46,3, S fazında ise %25,2, G2/M fazında ise %19.2 olarak gözlemlenmiştir. CRISPR/Cas9 uygulanan hücrelerde STAT5A'nın nakavt edilmesi sonrasında hücre döngüsünde G0/G1 fazında %43,5, S fazında %27,5, G2/M fazında %19,9 olarak gözlemlenmiştir. K562 hücrelerinde CDK4'ün nakavt edilmesi hücre döngüsünde G0/G1 fazında %44,8, S fazında %25,7, G2/M fazında

ise %20,7 olarak gözlemlenmiştir.K562 hücrelerinde negatif kontrol hücre döngüsünde G0/G1 fazında %45,7, S fazında %25,6, G2/M fazında ise %20,0 olarak gözlemlenmiştir.



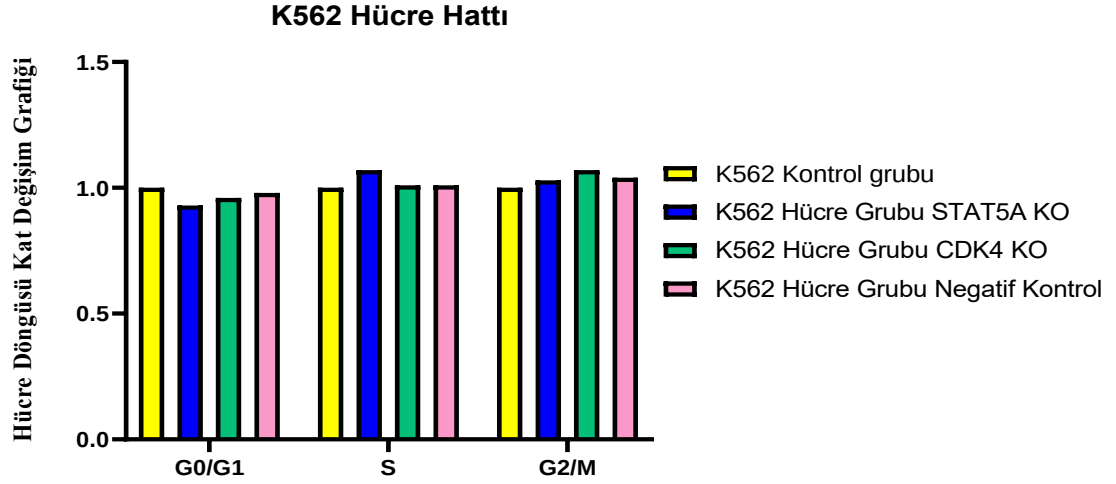
Şekil 12. K562 kontrol hücresi ile CRISPR/Cas9 uygulanmış hücre hatlarında gözlemlenen 48. saat hücre döngüsü analiz sonuçları

4.5.2. K562 Kontrol hücre Hattı ile CRISPR/Cas9 Uygulanmış Hücre Hatlarında Hücre Döngüsü Kat Değişimlerinin Belirlenmesi

K562 kontrol grubunda göre, 48. Saatte hücre döngüsünde STAT5A nakavt edilen hücre hattında G0/G1 **0.93** kat azaldığı, CDK4 nakavt edilmesi ile yine G0/G1 **0.96** kat azaldığı negatif kontrol hücre hattında G0/G1 **0.98 kat azaldığı** gözlemlenmiştir. S fazında kontrole göre STAT5A nakavt edilen hücrelerde **1.07** kat arttığı, CDK4 nakavt edilen hücre hatlarında ise 1.01 kat arttığı, negatif kontrol grubunda S fazı 1.01 kat arttığı gözlemlenmiştir. G2/M fazına bakıldığında STAT5A nakavt edilen hücrelerde yine **1.03** kat arttığı, CDK4 nakavt edilen hücre hattında G2/M fazı **1.07** kat arttığı, Negatif kontrol grubunda ise G2/M fazı 1.04 arttığı gözlemlenmiştir (Grafik 6, Tablo 12)

Tablo 12. K562 kontrol hücre hattı ile CRISPR/CAS9 uygulanmış hücrelerde 48. saat hücre döngüsü yüzde değerleri ve kat değişim sonuçları

Hücre Hatları	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
K562 Kontrol grubu (%)	46.3	25.2	19.2
K562 Hücre grubu STAT5A KO (%)	43.5	27.5	19.9
K562 Hücre Grubu STAT5A KO Kat Değişimi (%)	0.93	1.07	1.03
K562 Hücre Grubu CDK4 KO (%)	44.8	25.7	20.7
K562 Hücre Grubu CDK4 KO Kat Değişimi (%)	0.96	1.01	1.07
K562 Hücre Grubu Negatif Kontrol (%)	45.7	25.6	20
K562 Hücre Grubu Negatif Kontrol Kat Değişimi (%)	0.98	1.01	1.04



Grafik 6. K562 kontrol hücre hattı ile CRISPR/CAS9 uygulanmış hücrelerde 48. saat sonunda hücre döngüsü kat değişim grafiği

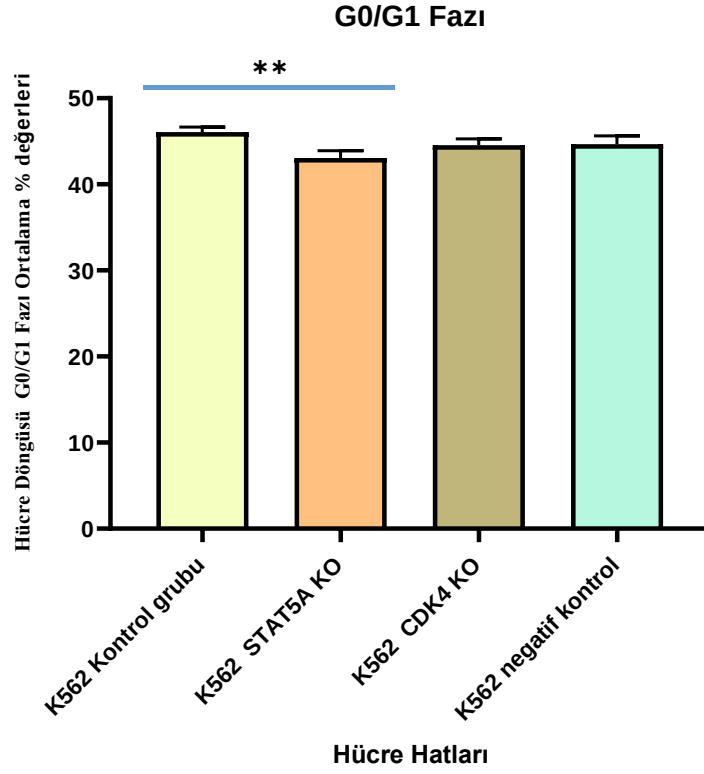
4.5.3 K562 Kontrol Grubu ile CRISPR/Cas9 Uygulanan Hücre Hatlarında

G0/G1, S, G2/M Fazları Arasında Anlamlı Fark Vardır

K562 kontrol grubu ile K562 STAT5A nakavt edilen hücre hattında G0/G1 fazında kıyaslandığında anlamsal fark olduğu gözlemlenmiştir ($p:0.0073$)(Grafik 7, Tablo 13). K562 STAT5A nakavt hücre hattı ile K562 negatif kontrol grubunda kıyaslandığında S fazında anlamsal fark olduğu gözlemlenmiştir ($p: 0.0407$). (Grafik 8, Tablo 14) K562 Kontrol grubu ile K562 CDK4 nakavt edilen hücre hattında G2/M fazı anlamlı fark gözlemlenmiştir ($p:0.0201$) (Grafik 9, Tablo 15)

Tablo 13. K562 hücre hattı ile K562 CRISPR/cas9 uygulanmış hücre G0/G1 Fazı p değerleri

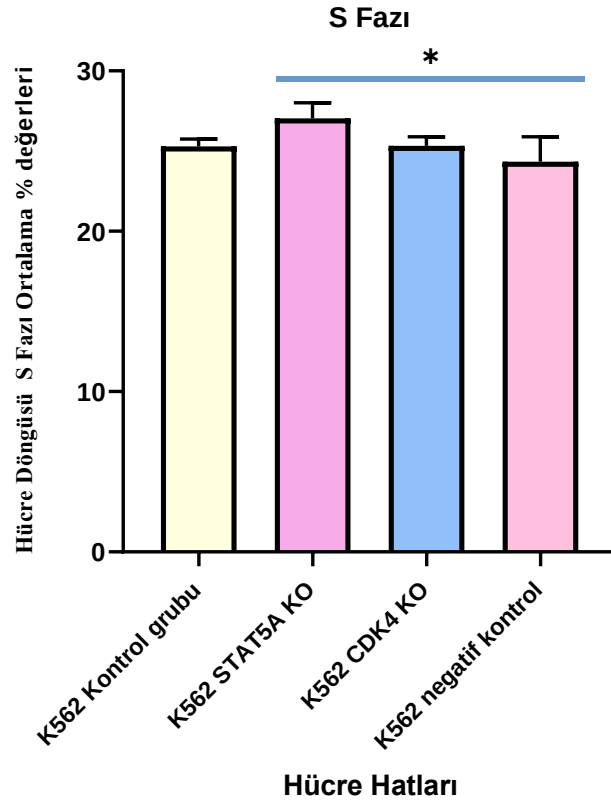
G0/G1 Fazı p değeri	K562 STAT5A KO	K562 CDK4 KO	K562 negatif kontrol
K562 Kontrol grubu	0.0073	0.1611	0,2131
K562 STAT5A KO		0.1855	0.1397
K562 CDK4 KO			0.9966



Grafik 7. K562 hücre hattı ile K562 CRISPR/cas9 uygulanmış hücre hatlarında G0/G1 faz grafiği

Tablo 14. K562 hücre hattı ile K562 CRISPR/cas9 uygulanmış hücre S Fazı *p* değerleri

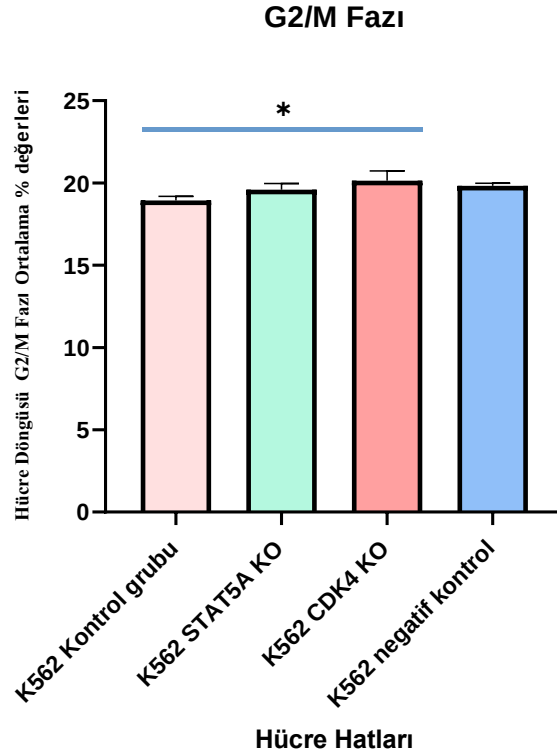
S faz <i>p</i> değerleri	K562 STAT5A KO	K562 CDK4 KO	K562 kontrol negatif
K562 Kontrol grubu	0.2168	>0.9999	0.6442
K562 STAT5A KO		0.2291	0.0407
K562 CDK4 KO			0.6210



Grafik 8. K562 hücre hattı ile K562 CRISPR/cas9 uygulanmış hücre hatlarında S faz grafiği

Tablo 15. K562 hücre hattı ile K562 CRISPR/cas9 uygulanmış hücre G2/M Fazı p değerleri

G2/M faz p değerleri	K562 STAT5A KO	K562 CDK4 KO	K562 kontrol	negatif
K562 Kontrol grubu	0,2185	0,0201	0,0772	
K562 STAT5A KO		0,3761	0,8740	
K562 CDK4 KO			0,7723	

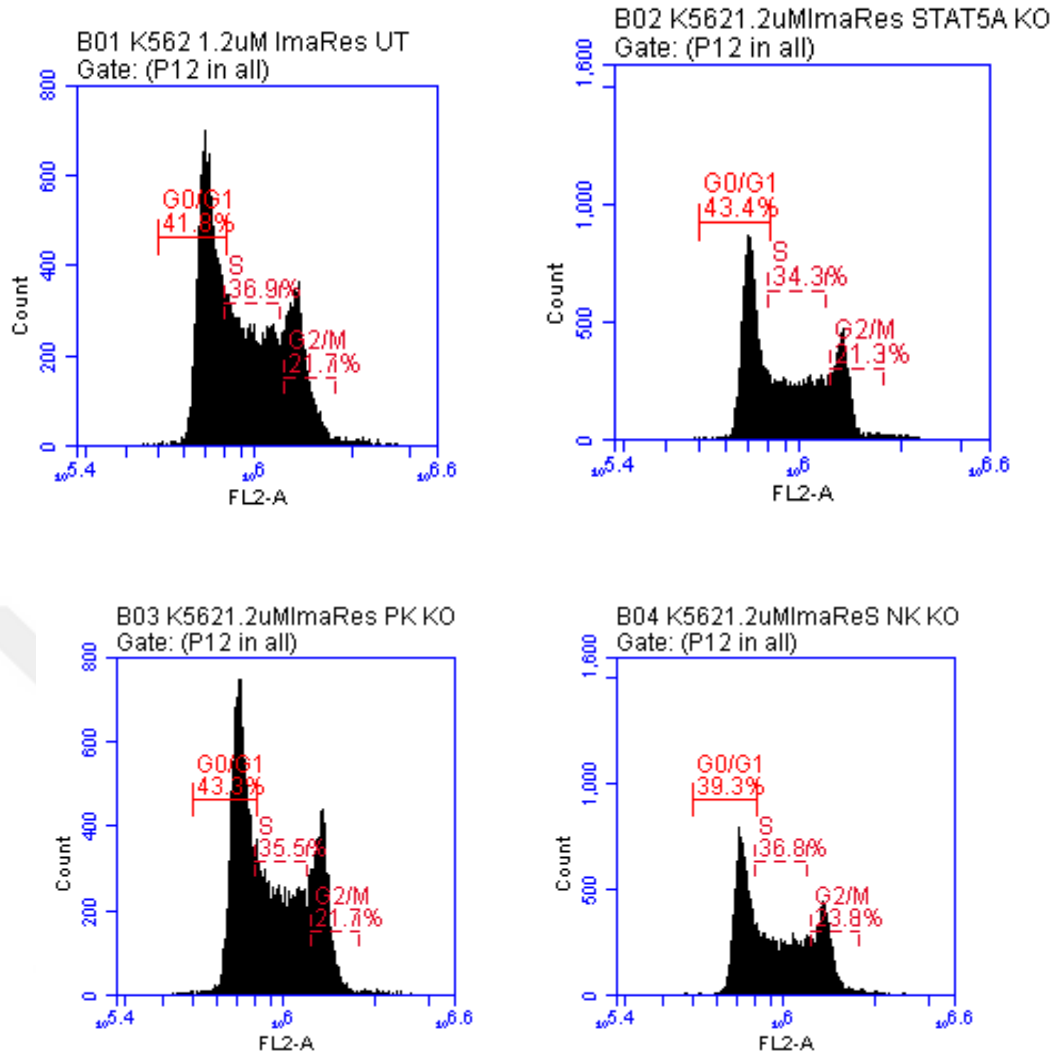


Grafik 9. K562 hücre hattı ile K562 CRISPR/cas9 uygulanmış hücre hatlarında G2/M faz grafiği

4.5.4 K562 1.2 uM imatinibe Dirençli Kontrol Grubu ile CRISPR/Cas9

Uygulanmış Dirençli Hücrelerinde Hücre döngülerinin belirlenmesi

K562 1.2 uM imatinib dirençli hücreler ile gen manipülasyonu yapılmış dirençli hücrelerde hücre döngüsü analizi yapılmıştır (Şekil 13). Hücre döngüsü analizi için 48.saat sonucunda sonucunda K562 1.2 uM imatinib dirençli kontrol grubunda G0/G1 %41.8, S fazında ise %36.9, G2/M fazında ise %21.7 olarak gözlemlenmiştir. CRISPR/Cas9 uygulanan dirençli hücrelerde STAT5A'nın nakavt edilmesi sonrasında hücre döngüsünde G0/G1 fazında %43.4, S fazında %34.3, G2/M fazında %21.3 olarak gözlemlenmiştir. Dirençli hücrelerde CDK4'ün nakavt edilmesi hücre döngüsünde G0/G1 fazında %43.3, S fazında %35.5, G2/M fazında ise %21,7 olarak gözlemlenmiştir. Negatif kontrol grubunda ise G0/G1 fazında %39.3, S fazında %36.8, G2/M fazında %23.8 gözlemlenmiştir.



Şekil 13. K562 1.2 uM imatinib dirençli kontrol hücresi ile CRISPR/Cas9 uygulanmış dirençli hücre hatlarında gözlemlenen 48. saat hücre döngüsü analiz sonuçları

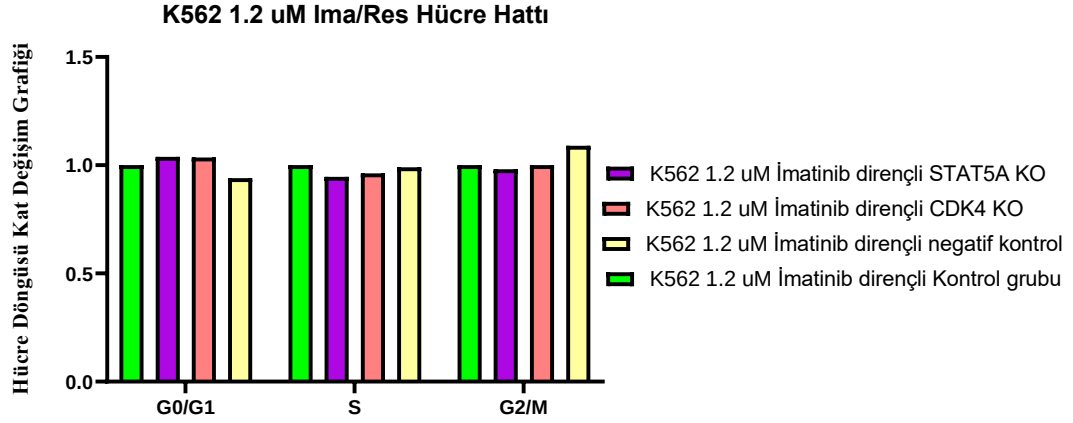
4.5.5 K562 1.2uM İmatinib Dirençli Kontrol hücre Hattı ile CRISPR/Cas9 Uygulanmış Dirençli Hücre Hatlarında Hücre Döngüsü Kat Değişimlerinin Belirlenmesi

K562 1.2 uM imatinib dirençli kontrol grubunda göre, 48. Saatte hücre döngüsünde STAT5A nakavt edilen hücre hattında G0/G1 1.0383 kat arttığı, CDK4 nakavt edilmesi ile yine G0/G1 1.0359 kat arttığı gözlemlenmiştir. S fazında kontrole göre STAT5A nakavt edilen hücrelerde 0.9458 kat azaldığı, CDK4 nakavt edilen hücre

hatlarında ise 0.9626 kat azaldığı tespit edilmiştir. G2/M fazına bakıldığında CDK4 nakavt edilen hücrelerde kontrol grubuna kıyasla herhangi bir değişim saptanamamıştır, ancak STAT5A nakavt edilen hücrelerde yine 0.9816 kat azaldığı saptanmıştır. Negatif kontrol hücrelerimiz kontrole göre, G0/G1 fazı 0.94 kat, S fazı ise 0.99 kat azalmıştır. G2/M fazı 1.09 kat artmıştır (Tablo 16, Grafik10)

Tablo 16: K562 1.2 uM imatinib dirençli kontrol hücre hattı ile CRISPR/CAS9 uygulanmış dirençli hücrelerde 48. saat hücre döngüsü yüzde değerleri ve kat değişim sonuçları

Hücre Hatları	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
K562 1.2 uM İmatinib dirençli Kontrol grubu (%)	41,8	36,9	21,7
K562 1.2 uM İmatinib dirençli STAT5A KO (%)	43,4	34,9	21,3
K562 1.2 uM İmatinib Dirençli STAT5A KO Kat Değişimi (%)	1.0383	0.9458	0.9816
K562 1.2 uM İmatinib dirençli CDK4 KO (%)	43,3	35,5	21,7
K562 1.2 uM İmatinib dirençli CDK4 KO Kat Değişimi (%)	1.0359	0.9626	1
K562 1.2 uM İmatinib dirençli negatif kontrol (%)	39.3	36.8	23.8
K562 1.2 uM İmatinib dirençli negatif kontrol Kat Değişimi (%)	0.94	0.99	1.09



Grafik 10. K562 1.2 uM imatinib dirençli kontrol hücre hattı ile CRISPR/Cas9 uygulanmış dirençli hücrelerde 48. saat hücre döngüsü kat değişim grafiği

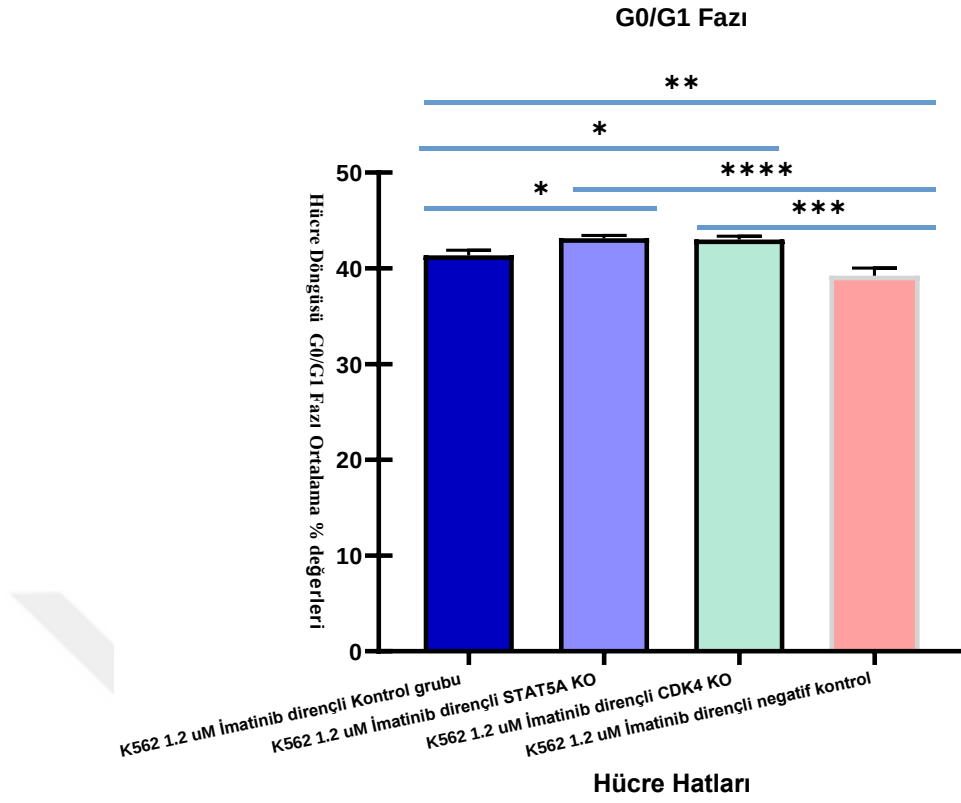
4.5.6 K562 1.2 uM İmatinib dirençli Kontrol Grubu ile CRISPR/Cas9 Uygulanan Hücre Hatlarında G0/G1, S, G2/M Fazları Arasında Anlamlı Fark Vardır

K562 1.2 uM imatinib dirençli kontrol grubuna kıyasla K562 1.2 uM imatinib dirençli STAT5A nakavt edilen hücre hattında, K562 1.2 uM imatinib dirençli CDK4 nakavt edilen hücre hattında ve K562 1.2 uM imatinib dirençli negatif kontrol grubu G0/G1 fazında kıyaslandığında anlamsal fark olduğu gözlemlenmiştir (p : 0.0151), (p : 0.0229), (p : 0.0051). K562 1.2 uM imatinib dirençli STAT5A nakavt edilen hücre hattı ile K562 1.2 uM imatinib dirençli negatif kontrol grubu G0/G1 fazında anlamsal fark vardır (p : <0.0001). K562 1.2 uM imatinib dirençli CDK4 nakavt edilen hücre hattında ve K562 1.2 uM imatinib dirençli negatif kontrol grubu G0/G1 fazında kıyaslandığında anlamsal fark olduğu gözlemlenmiştir (p : 0,0001) (Grafik 11, Tablo 17). S fazında herhangi bir anlamlı fark gözlemlenmemiştir (Grafik 12, Tablo 18). K562 1.2 uM imatinib dirençli kontrol grubu ile K562 1.2 uM imatinib dirençli negatif kontrol grubu G2/M fazında anlamsal fark vardır (p : 0,0160). K562 1.2 uM imatinib dirençli STAT5A nakavt edilen hücre hattı ile K562 1.2 uM imatinib dirençli negatif kontrol grubu G2/M fazında anlamsal fark vardır (p : 0,0050). K562 1.2 uM imatinib dirençli CDK4 nakavt edilen hücre hattında ve K562 1.2 uM imatinib dirençli

negatif kontrol grubu G2/M fazında kıyaslandığında anlamsal fark olduğu gözlemlenmiştir (p : 0,0457) (Grafik 13, Tablo 19).

Tablo 17. K562 1.2 uM imatinib dirençli hücre hattı ile K562 1.2 uM imatinib dirençli CRISPR/cas9 uygulanmış hücre hatlarının G0/G1 Fazı p değerleri

G0/G1 Fazı p değerleri	K562 1.2 uM imatinib dirençli STAT5A KO	K562 1.2 uM imatinib dirençli CDK4 KO	K562 1.2 uM imatinib dirençli negatif kontrol
K562 1.2 uM imatinib dirençli kontrol	0.0151	0.0229	0.0051
K562 1.2 uM imatinib dirençli STAT5A KO		0.9892	<0.0001
K562 1.2 uM imatinib dirençli CDK4 KO			0.0001

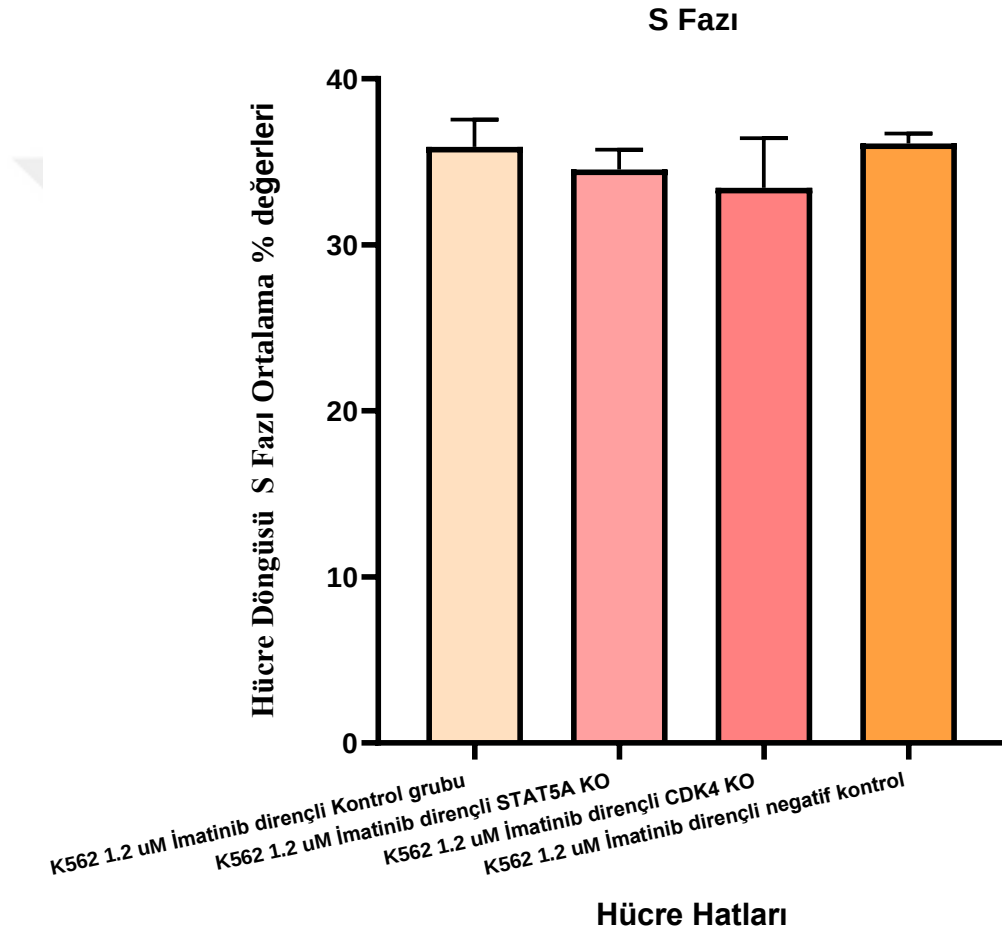


Grafik 11. K562 1.2 uM imatinib dirençli hücre hattı ile CRISPR/cas9 uygulanmış hücre hatlarında G0/G1 faz grafiği

Tablo 18. K562 1.2 uM imatinib dirençli hücre hattı ile K562 1.2 uM imatinib dirençli CRISPR/cas9 uygulanmış hücre hatlarının S Fazı p değerleri

S Fazı p değerleri	K562 1.2 uM imatnib dirençli STAT5A KO	K562 1.2 uM imatnib dirençli CDK4 KO	K562 1.2 uM imatnib dirençli negatif kontrol
K562 1.2 uM imatnib dirençli kontrol	0.7993	0.4077	0.9991
K562 1.2 uM imatnib dirençli STAT5A KO		0.8807	0.7292
K562 1.2 uM			0.3481

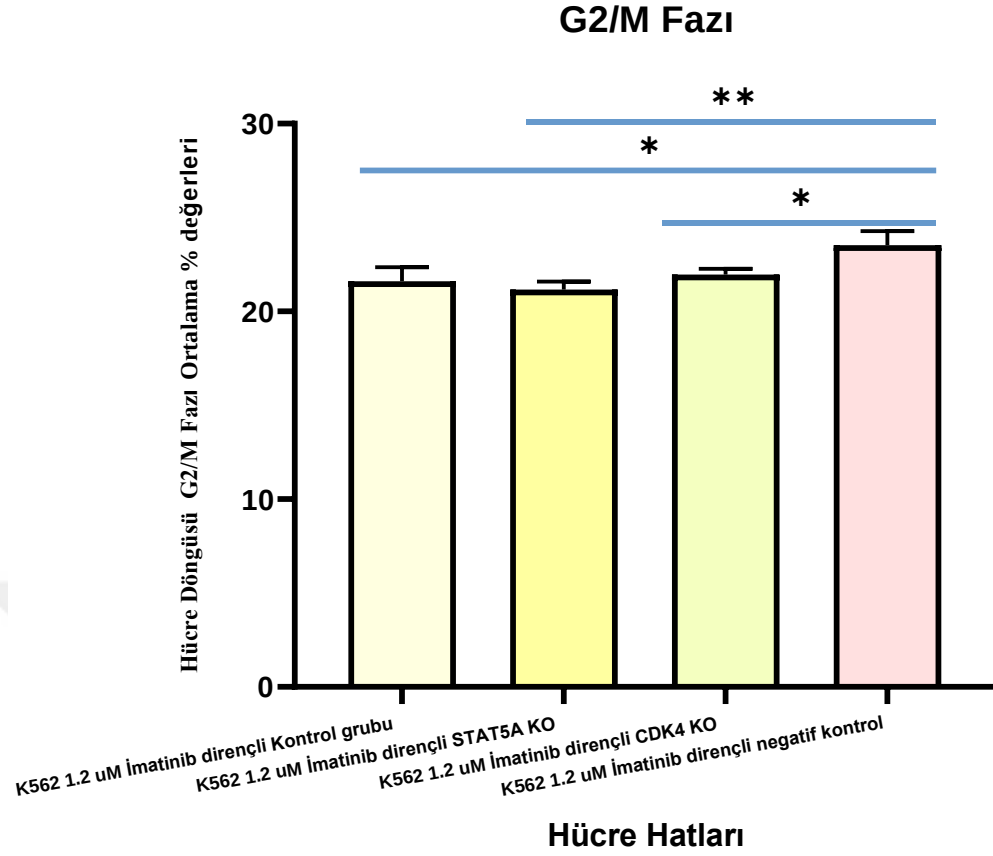
imatnib dirençli CDK4 KO			
-----------------------------	--	--	--



Grafik 12. K562 1.2 uM imatinib dirençli hücre hattı ile CRISPR/cas9 uygulanmış hücre hatlarında S faz grafiği

Tablo 19. K562 1.2 uM imatinib dirençli hücre hattı ile K562 1.2 uM imatinib dirençli CRISPR/cas9 uygulanmış hücre hatlarının G2/M Fazı *p* değerleri

G2/M Fazı <i>p</i> değerleri	K562 1.2 uM imatinib dirençli STAT5A KO	K562 1.2 uM imatinib dirençli CDK4 KO	K562 1.2 uM imatinib dirençli negatif kontrol
K562 1.2 uM imatinib dirençli kontrol	0,8036	0,8681	0,0160
K562 1.2 uM imatinib dirençli STAT5A KO		0,3976	0,0050
K562 1.2 uM imatinib dirençli CDK4 KO			0,0457



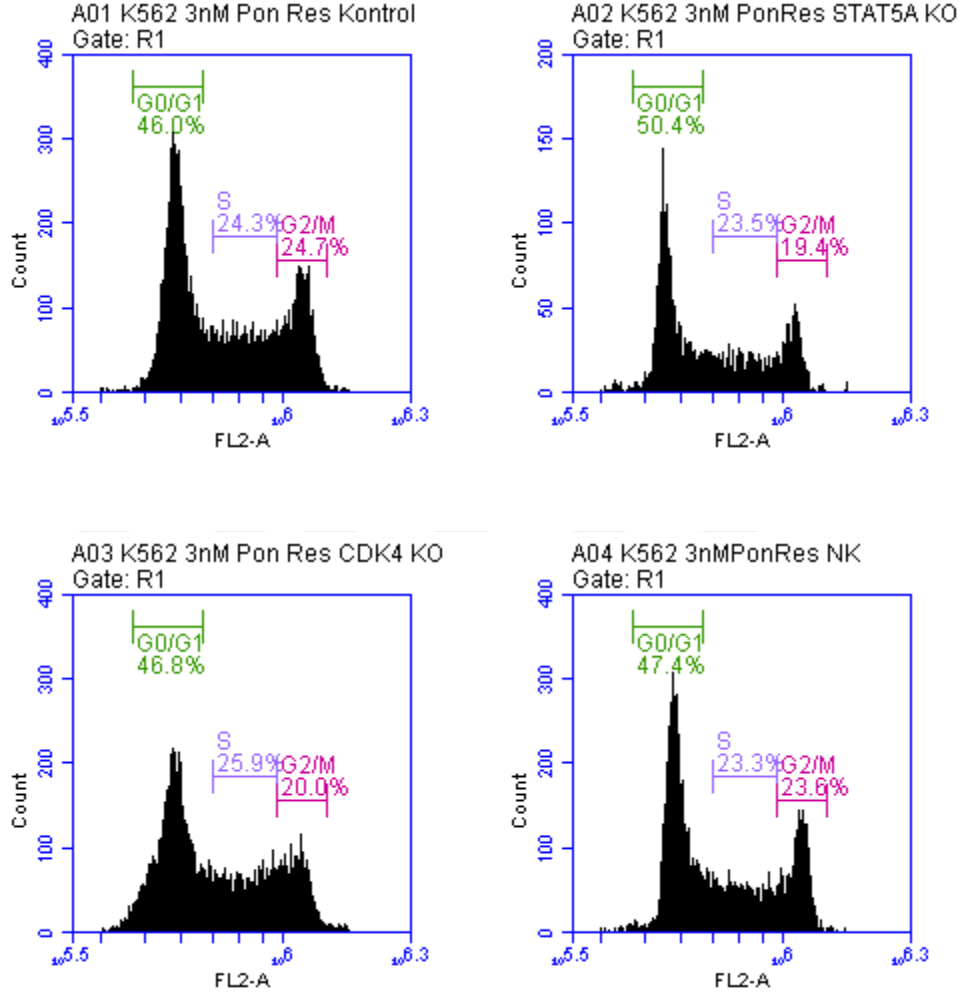
Grafik 13. K562 1.2 uM imatinib dirençli hücre hattı ile CRISPR/cas9 uygulanmış hücre hatlarında G2/M faz grafiği

4.5.7 K562 3nM Ponatinib Dirençli Kontrol Grubu ile CRISPR/Cas9

Uygulanmış Dirençli Hücrelerinde Hücre döngülerinin belirlenmesi

K562 3nM Ponatinib dirençli hücreler ile gen manipülasyonu yapılmış dirençli hücrelerde hücre döngüsü analizi yapılmıştır (Şekil 14). Hücre döngüsü analizi için 48.saat sonucunda sonucunda K562 3nM Ponatinib dirençli kontrol grubunda G0/G1 %46.0, S fazında ise %24.3, G2/M fazında ise %24.7 olarak gözlemlenmiştir. CRISPR/Cas9 uygulanan dirençli hücrelerde STAT5A'nın nakavt edilmesi sonrasında hücre döngüsünde G0/G1 fazında %50.4, S fazında %23.5, G2/M fazında %19.4 olarak gözlemlenmiştir. Dirençli hücrelerde CDK4'ün nakavt edilmesi hücre

döngüsünde G0/G1 fazında %46.8 S fazında %25.9, G2/M fazında ise %20 olarak gözlemlenmiştir. Negatif kontrol hücre hattında G0/G1 fazı %47.4, S fazı %23.3, G2/M fazı %23.6 olarak gözlemlenmiştir.



Şekil 14. K562 3nM ponatinib dirençli kontrol hücresi ile CRISPR/Cas9 uygulanmış dirençli hücre hatlarında gözlemlenen 48. saat hücre döngüsü analiz sonuçları

4.5.8 K562 3nM Ponatinib Dirençli Kontrol hücre Hattı ile CRISPR/Cas9

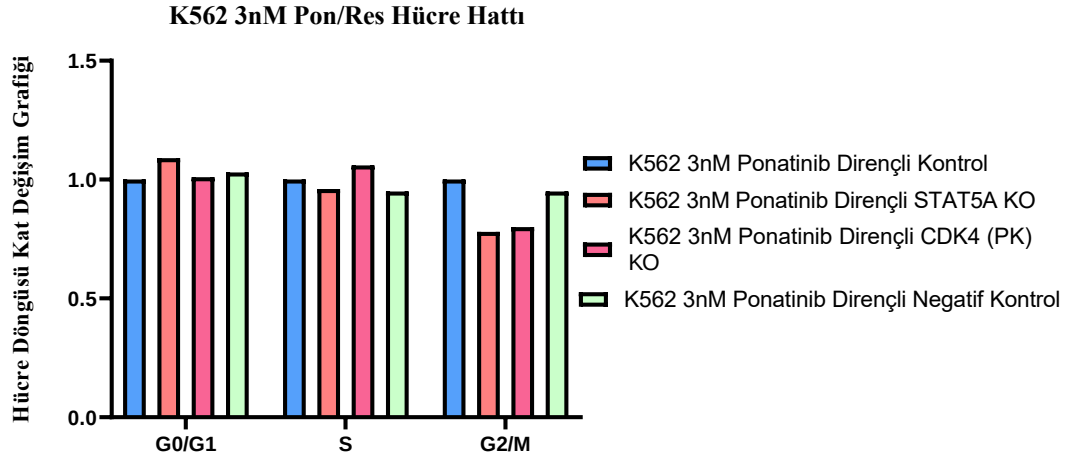
Uygulanmış Dirençli Hücre Hatlarında Hücre Döngüsü Kat Değişimlerinin Belirlenmesi

K562 3nM Ponatinib dirençli kontrol grubunda göre, 48. Saatte hücre döngüsünde STAT5A nakavt edilen hücre hattında G0/G1 1.09 kat arttığı, CDK4 nakavt edilmesi ile yine G0/G1 1.01 kat arttığı gözlemlenmiştir. Negatif kontrol grubu G0/G1 faz 1,03 kat arttığı gözlemlenmiştir. S fazında kontrole göre STAT5A nakavt edilen

hücrelerde 0.96 kat azaldığı, CDK4 nakavt edilen hücre hatlarında ise 1,06 kat arttığı tespit edilmiştir. Negatif kontrol grubunda S fazı 0.95 kat azaldığı gözlemlenmiştir. G2/M fazına bakıldığında STAT5A nakavt edilen hücrelerde yine 0.78 kat azaldığı, CDK4 nakavt edilen hücrelerde 0,80 kat azaldığı, negatif kontrol grubunda ise 0,95 kat azaldığı saptanmıştır (Grafik 14, Tablo 20)

Tablo 20. K562 3nM ponatinib dirençli kontrol hücre hattı ile CRISPR/CAS9 uygulanmış dirençli hücrelerde 48. saat hücre döngüsü yüzde değerleri ve kat değişim sonuçları

Hücre Hatları	G0/G1 (%)	S (%)	G2/M (%)
K562 3nM Ponatinib dirençli Kontrol grubu (%)	46,0	24,3	24,7
K562 3nM Ponatinib dirençli STAT5A KO (%)	50,4	23,5	19,4
K562 1.2 uM İmatinib Dirençli STAT5A KO Kat Değişimi (%)	1.09	0.96	0.78
K562 3nM Ponatinib dirençli CDK4 KO (%)	46,8	25,9	20
K562 3nM Ponatinib dirençli CDK4 KO Kat Değişimi (%)	1.01	1,06	0,80
K562 3nM Ponatinib dirençli negatif kontrol (%)	47,4	23,3	23,6
K562 3nM Ponatinib dirençli negatif kontrol kat değişimi (%)	1,03	0,95	0,95



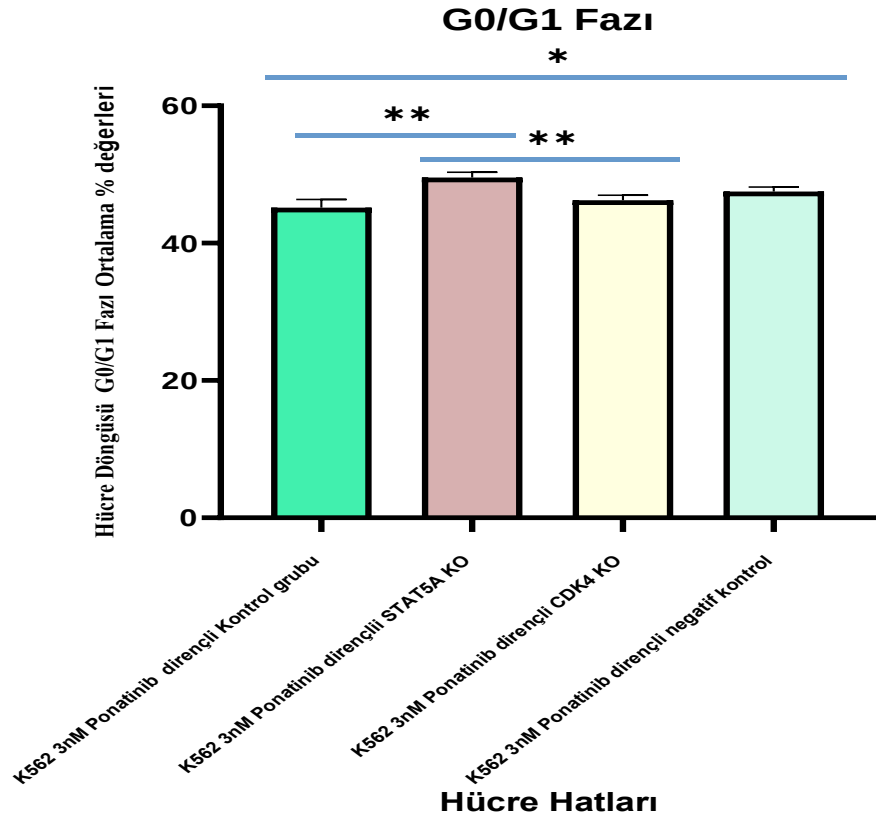
Grafik 14. K562 3nM ponatinib dirençli kontrol hücre hattı ile CRISPR/Cas9 uygulanmış dirençli hücrelerde 48. saat hücre döngüsü kat değişim grafiği

4.5.9 K562 3nM Ponatinib Dirençli Kontrol Grubu ile CRISPR/Cas9 Uygulanan Hücre Hatlarında G0/G1, S, G2/M Fazları Arasında Anlamlı Fark Vardır

K562 3nM ponatinib dirençli kontrol grubuna kıyasla K562 3nM ponatinib dirençli STAT5A nakavt edilen hücre hattında ve K562 3nM ponatinib dirençli negatif kontrol grubu G0/G1 fazında kıyaslandığında anlamsal fark olduğu gözlemlenmiştir ($p: 0,0011$), ($p: 0,0429$). K562 3nM ponatinib dirençli STAT5A nakavt edilen hücre hattı ile K562 3nM ponatinib dirençli CDK4 nakavt edilen hücre hattında G0/G1 fazında anlamsal fark vardır ($p: 0,0065$). (Grafik 15, Tablo 21). S fazında herhangi bir anlamlı fark gözlemlenmemiştir (Grafik 16, Tablo 22). K562 3nM ponatinib dirençli kontrol grubuna kıyasla K562 3nM ponatinib dirençli STAT5A nakavt edilen hücre hattında ve K562 3nM ponatinib dirençli CDK4 nakavt edilen hücre hattında G2/M fazında kıyaslandığında anlamsal fark olduğu gözlemlenmiştir ($p: 0,0013$) ($p: 0,0057$). K562 3nM ponatinib dirençli STAT5A nakavt edilen hücre hattında ve K562 3nM ponatinib dirençli negatif kontrol grubu G2/M fazında anlamlı fark gözlemlenmiştir ($p: 0,0395$) (Grafik 17, Tablo 23).

Tablo 21. K562 3nM ponatinib dirençli hücre hattı ile K562 3nM ponatinib dirençli CRISPR/cas9 uygulanmış hücre hatlarının G0/G1 Fazı p değerleri

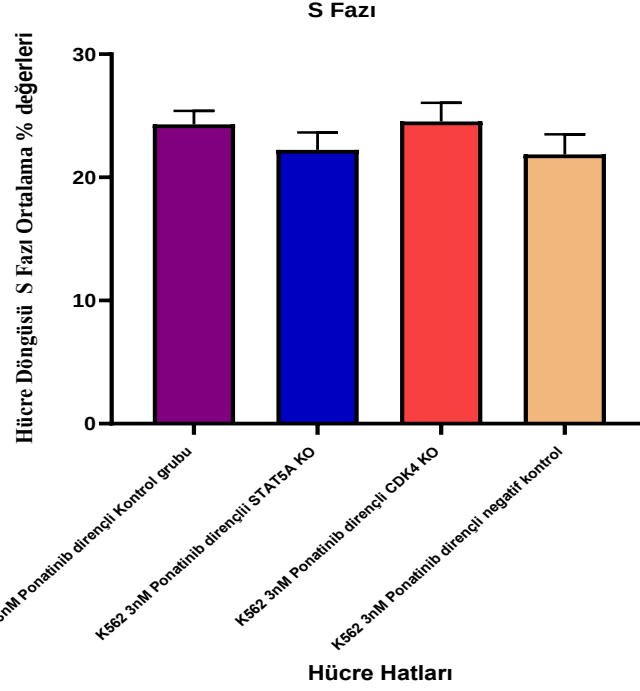
G0/G1 Fazı p değerleri	K562 3nM ponatinib dirençli STAT5A KO	K562 3nM ponatinib dirençli CDK4 KO	K562 3nM ponatinib dirençli negatif kontrol
K562 3nM ponatinib dirençli kontrol	0.0011	0.4731	0.0429
K562 3nM ponatinib dirençli STAT5A KO		0.0065	0.0732
K562 3nM ponatinib dirençli CDK4 KO			0.3408



Grafik 15. K562 3nM Ponatinib dirençli hücre hattı ile CRISPR/cas9 uygulanmış hücre hatlarında G0/G1 faz grafiği

Tablo 22. K562 3nM ponatinib dirençli hücre hattı ile K562 3nM ponatinib dirençli CRISPR/cas9 uygulanmış hücre hatlarının S Fazı p değerleri

S Fazı p değerleri	K562 3nM ponatinib dirençli STAT5A KO	K562 3nM ponatinib dirençli CDK4 KO	K562 3nM ponatinib dirençli negatif kontrol
K562 3nM ponatinib dirençli kontrol	0.3519	0.9969	0.2362
K562 3nM ponatinib dirençli STAT5A KO		0.2741	0.9884
K562 3nM ponatinib dirençli CDK4 KO			0.1807

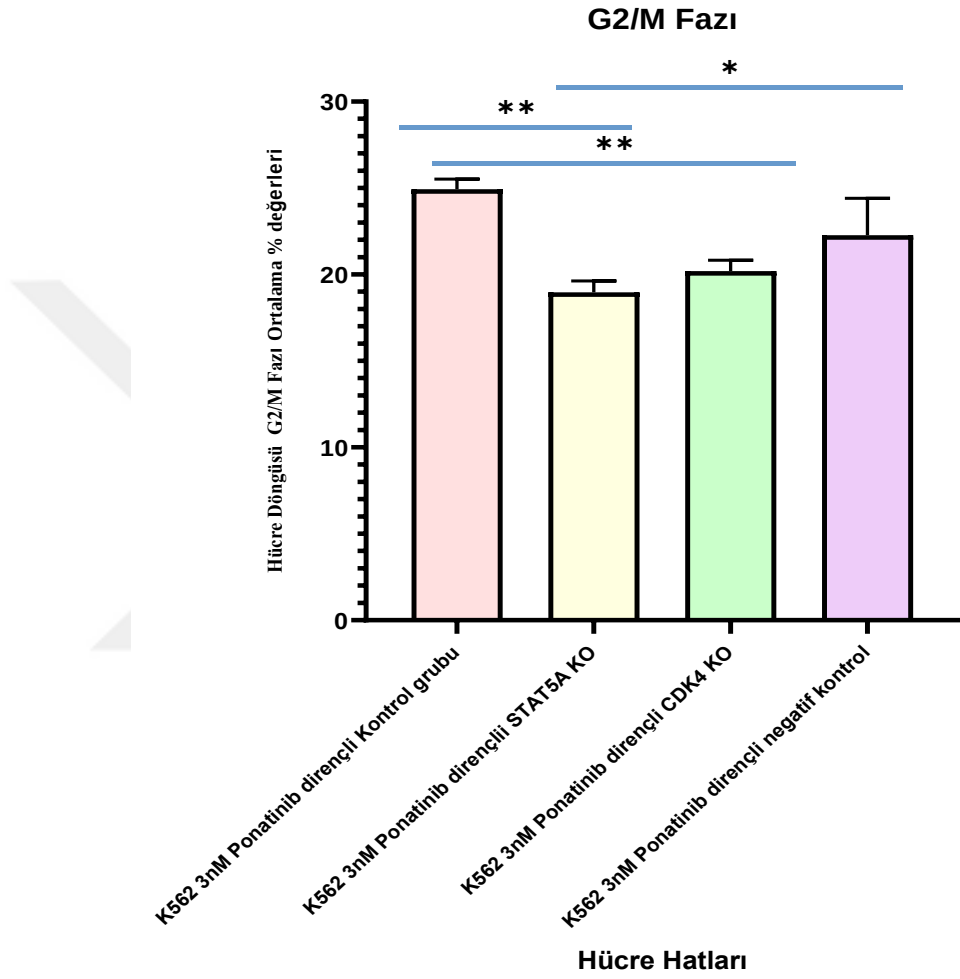


Grafik 16. K562 3nM Ponatinib dirençli hücre hattı ile CRISPR/cas9 uygulanmış hücre hatlarında S faz grafiği

Tablo 23. K562 3nM ponatinib dirençli hücre hattı ile K562 3nM ponatinib dirençli CRISPR/cas9 uygulanmış hücre hatlarının G2/M Fazı p değerleri

G2/M Fazı p değerleri	K562 3nM ponatinib dirençli STAT5A KO	K562 3nM ponatinib dirençli CDK4 KO	K562 3nM ponatinib dirençli negatif kontrol
K562 3nM ponatinib dirençli kontrol	0.0013	0.0057	0.0982
K562 3nM ponatinib dirençli STAT5A KO		0.6101	0.0395

K562 3nM ponatinib dirençli CDK4 KO			0.2283
--	--	--	--------



Grafik 17. K562 3nM Ponatinib dirençli hücre hattı ile CRISPR/cas9 uygulanmış hücre hatlarında G2/M faz grafiği

4.6 Gen Ekspresyon Analizi

K562 hücre hattı, dirençli hücrelerde ve CRISPR/Cas9 yöntemi uygulanan hücrelerin 48. saat sonunda RNA izolasyonu yapıldı. cDNA çevrimi sonrasında gen ifadeleri analiz edildi.

4.6.1 STAT5A Nakavtının Gen Ekspresyonuna Etkisi

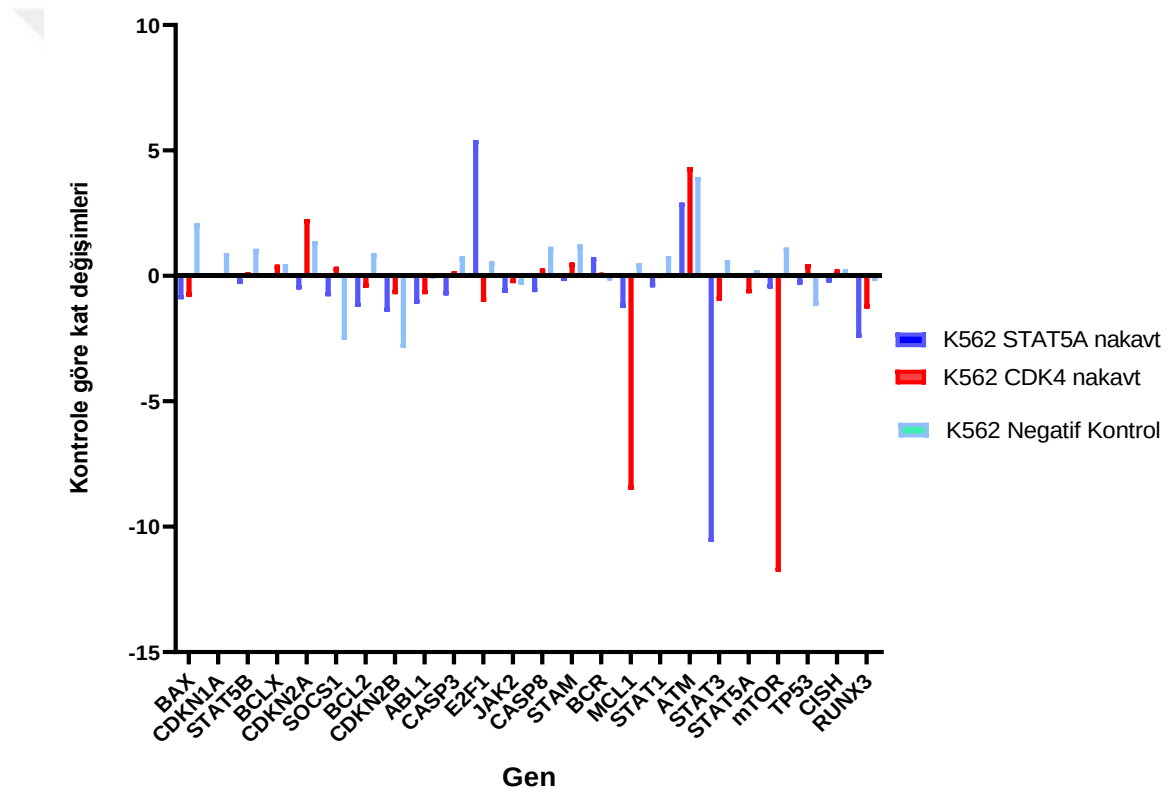
Bu çalışmada, STAT5A geninin nakavt edildiği K562 hücre hattında, çeşitli genlerin ekspresyon düzeylerinde belirgin ve istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler gözlemlenmiştir. Nakavt edilen STAT5A, hücredeki bazı genlerin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. BCL2, 1,24 kat azalma ($p = 0,0058$) CDKN2B, 1,43 kat azalma ($p = 0,0114$) ABL1, 1,11 kat azalma ($p = 0,0317$) E2F1: 5,42 kat artış ($p = 0,0063$) anlamlı değişiklikler gözlemlenmiştir. BCL2, Apoptozu (hücre ölümünü) inhibe eden BCL2 geninde, STAT5A nakavtından sonra 1,24 kat azalma gözlemlenmiştir. Bu azalma, hücrelerin apoptoza daha yatkın hale gelmiş olabileceğini düşündürmektedir ($p = 0,0058$). CDKN2B, Hücre döngüsünü kontrol eden CDKN2B geninde ise 1,43 kat azalma tespit edilmiştir. Bu azalma, hücre döngüsünün düzenlenmesinde aksamalara yol açabilir ve hücre proliferasyonunu etkileyebilir ($p = 0,0114$). ABL1, ABL1 gen ekspresyonunda 1,11 kat azalma görülmüştür. ABL1, hücre büyümesi ve farklılaşmasında rol oynayan bir kinaz olarak bilinir ve bu azalmanın hücrel sinyal yolağında önemli etkileri olabilir ($p = 0,0317$). E2F1, E2F1, hücre döngüsünün G1/S geçiş noktasını kontrol eden önemli bir transkripsiyon faktörüdür. Bu gende 5,42 kat artış gözlemlenmiştir. STAT5A'nın nakavtı, E2F1'in artan ekspresyonunu tetikleyerek hücre proliferasyonunu hızlandırabilir ($p = 0,0063$). STAT5A'nın bu genlerin ekspresyonunda önemli bir rol oynayabileceğini ve hücrel süreçlerdeki yerinin kritik olduğunu göstermektedir (Tablo 24, Grafik 18).

Tablo 24. K562 hücre hattı ile CRISPR/Cas9 uygulanmış K562 hücre hatlarında kontrole göre gen ifadelerindeki kat değişimleri

	Kontrole Göre Kat Değişimleri			
Gen Sembolü	K562 STAT5A nakavt	K562 CDK4 nakavt (Pozitif Kontrol)	K562 Negatif Kontrol	K562 STAT5A nakavt (<i>p</i> değeri)
BAX	-0,93	-0,83	2,10	0,0606
CDKN1A	-0,05	0	0,91	0,2579
STAT5B	-0,32	0,14	1,08	0,1554
BCLX	0	0,44	0,45	0,1070
CDKN2A	-0,54	2,27	1,39	0,3906
SOCS1	-0,81	0,36	-2,54	0,1781
BCL2	-1,24	-0,47	0,90	0,0058
CDKN2B	-1,43	-0,73	-2,87	0,0114
ABL1	-1,11	-0,73	0,07	0,0317
CASP3	-0,77	0,18	0,77	0,2437
E2F1	5,42	-1,03	0,57	0,0063
JAK2	-0,67	-0,29	-0,35	0,0585
CASP8	-0,65	0,29	1,16	0,2531
STAM	-0,21	0,53	1,25	0,1228
BCR	0,75	0,12	-0,18	0,3345
MCL1	-1,28	-8,52	0,5	0,3714
STAT1	-0,45	0,08	0,78	0,7684
ATM	2,92	4,34	3,94	0,2454
STAT3	-10,61	-0,99	0,63	0,3501

STAT5A	-0,05	-0,69	0,23	0,0022
mTOR	-0,5	-11,8	1,12	0,4156
TP53	-0,34	0,47	-1,19	0,3753
CISH	-0,26	0,25	0,26	0,3973
RUNX3	-2,48	-1,3	-0,2	0,3195

K562 Hücre Hattı



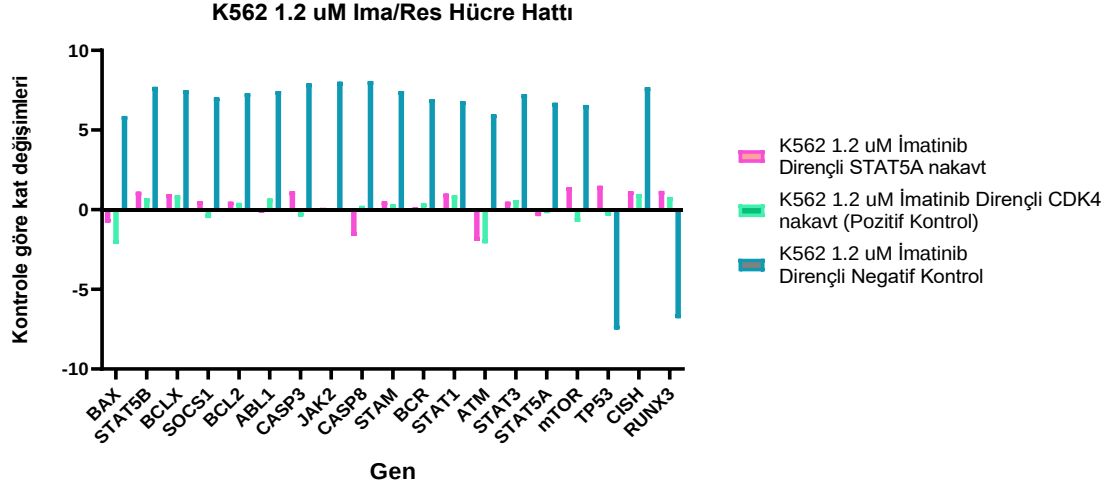
Grafik 18. K562 hücre hattı ile CRISPR/Cas9 uygulanmış K562 hücre hatlarında kontrole göre gen ifadelerindeki kat değişim grafiği

4.6.2 STAT5A Nakavtın K562 1.2 uM İmatinib Dirençli Hücre Hattında Gen Ekspresyonunda Değişikliklerin Belirlenmesi

Bu çalışmada, STAT5A geninin nakavt edildiği K562 1.2 uM imatinib dirençli hücre hattında, çeşitli genlerin ekspresyon düzeylerinde belirgin ve istatistiksel olarak anlamlı değişiklikler gözlemlenmiştir. TP53 gen ekspresyonunda 1.5 kat artış gözlenmiş ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.0348$). TP53'ün artışı, hücre döngüsü ve apoptoz kontrolünde önemli rol oynayan bir tümör baskılayıcı gen olarak imatinib direncine karşı olası bir yanıt olabilir. CISH geninde 1.16 kat artış gözlenmiş ve bu değişim istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0.0459$). CISH, JAK/STAT sinyal yolunu düzenleyen bir inhibitör olarak bilinir ve STAT5A knockout'unun JAK/STAT yoluna etkisini yansıtır olabilir. ATM geninde 1.96 kat azalma gözlenmiş olup, bu değişim çok anlamlıdır ($p=0.0007$). ATM, DNA hasar yanıtında kilit rol oynayan bir gen olup, azalan ekspresyonu imatinib direncinde genetik stabilitenin azalmasıyla ilişkilendirilebilir. STAT5A geninde beklenildiği gibi 0.40 kat azalma kaydedilmiş olup, bu azalma anlamlıdır ($p=0.0255$). STAT5A'nın nakavtı, bu genin baskılanmasının imatinib direnci üzerindeki etkilerini araştırmaya yöneliktir. RUNX3 geninde 1.18 kat artış gözlenmiş ve bu artış anlamlı bulunmuştur ($p=0.0460$). RUNX3, tümör baskılayıcı bir gen olup, artışı imatinib direncinin önlenmesine katkıda bulunabilir. STAT5A nakavtı imatinib direncini etkileyen çok sayıda genin ekspresyonunda önemli değişikliklere yol açtığını göstermektedir. Özellikle ATM, TP53, CISH ve RUNX3 gibi genlerdeki değişiklikler, imatinib direncinde bu genlerin potansiyel rollerine işaret etmektedir. Ayrıca, STAT5A eksikliğinin diğer JAK/STAT yol bileşenlerinde dengeleyici bir etki yaratabileceği düşünülmektedir. (Tablo 25, Grafik 19).

Tablo 25. K562 1.2 uM imatinib dirençli hücre hattı ile CRISPR/Cas9 uygulanmış dirençli K562 hücre hatlarında kontrole göre gen ifadelerindeki kat değişimleri

	Kontrolle Göre Kat Değişimleri			
Gen Sembolü	K562 1.2 uM İmatinib Dirençli STAT5A nakavt	K562 1.2 uM İmatinib Dirençli CDK4 nakavt (Pozitif Kontrol)	K562 1.2 uM İmatinib Dirençli Negatif Kontrol	K562 1.2 uM İmatinib Dirençli STAT5A nakavt ((p değeri)
BAX	-0,81	-2,15	5,88	0,3365
STAT5B	1,13	0,71	7,71	0,1890
BCLX	0,97	0,90	7,49	0,0831
SOCS1	0,54	-0,52	7,04	0,5239
BCL2	0,50	0,43	7,31	0,8218
ABL1	-0,19	0,70	7,45	0,3766
CASP3	1,15	-0,42	7,92	0,5747
JAK2	0,12	0,08	8,03	0,0698
CASP8	-1,64	0,24	8,08	0,2879
STAM	0,52	0,33	7,45	0,1639
BCR	0,16	0,4	6,93	0,9566
STAT1	1,00	0,90	6,8	0,2931
ATM	-1,96	-2,11	5,98	0,0007
STAT3	0,5	0,6	7,25	0,4051
STAT5A	-0,40	-0,21	6,71	0,0255
mTOR	1,4	-0,76	6,57	0,8780
TP53	1,5	-0,38	-7,51	0,0348
CISH	1,16	0,98	7,69	0,0459
RUNX3	1,18	0,79	-6,81	0,0460



Grafik 19. K562 1.2 uM imatinib dirençli hücre hattı ile CRISPR/Cas9 uygulanmış K562 hücre hatlarında kontrole göre gen ifadelerindeki kat değişim grafiği

4.6.3 STAT5A Nakavtın K562 3nM Ponatinib Dirençli Hücre Hattında Gen Ekspresyonunda Değişikliklerin Belirlenmesi

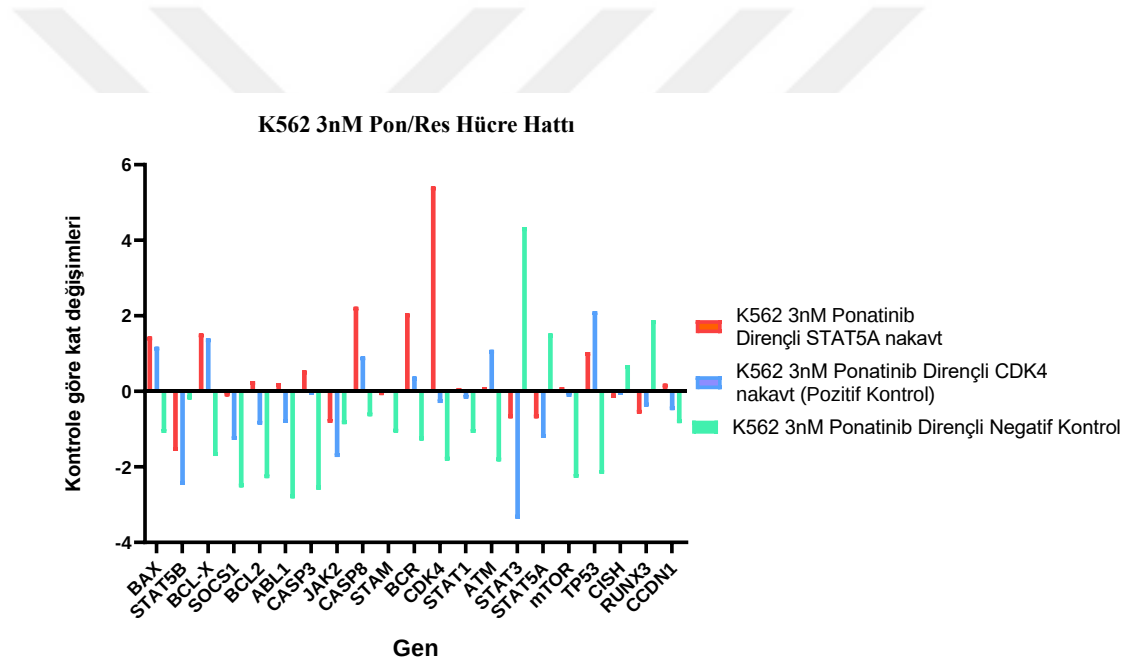
STAT5B gen ekspresyonu, Ponatinib'e dirençli STAT5A nakavt hücrelerinde önemli ölçüde azalmıştır (-1.57 kat, $p = 0.0194$). Bu durum, STAT5A'nın yokluğunda STAT5B ekspresyonunun baskılandığını ve STAT5B'nin Ponatinib direncinde potansiyel bir rolü olabileceğini düşündürmektedir. STAT5A gen ekspresyonu ise azalmıştır (-0.71 kat, $p = 0.0397$). ABL1 gen ekspresyonu, Ponatinib'e dirençli STAT5A nakavt hücrelerinde önemli ölçüde azalmıştır (-0.22 kat, $p = 0.0056$). ABL1, Ponatinib'in hedeflediği bir kinazdır ve bu azalmanın, ilaç direnci ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. JAK2 gen ekspresyonu, STAT5A nakavt grubunda anlamlı derecede azalmıştır (-0.83 kat, $p = 0.0030$). JAK-STAT sinyal yolunun önemli bir bileşeni olan JAK2'deki bu azalma, Ponatinib direnciyle ilişkili olabilir ve bu yolaktaki bozulmaların direncin oluşumuna katkıda bulunabileceğini gösterir. STAT3 gen ekspresyonu, STAT5A nakavt grubunda anlamlı derecede azalmıştır (-

0.71 kat, $p = 0.0278$). Bu azalma, STAT3'ün Ponatinib direncinde kritik bir rol oynayabileceğini ve bu genin potansiyel bir direnç belirteci olabileceğini düşündürmektedir. TP53 gen ekspresyonu, Ponatinib'e dirençli STAT5A nakavt hücrelerde belirgin şekilde artmıştır (1.04 kat, $p = 0.0469$). TP53, hücre döngüsü kontrolü ve apoptozda yer alır; bu artış, Ponatinib'e direnç geliştirmiş hücrelerde TP53'ün rol oynayabileceğini ve apoptozun baskılanmış olabileceğini öne sürmektedir. CISH gen ekspresyonu, STAT5A nakavt grubunda anlamlı bir azalma göstermiştir (-0.17 kat, $p = 0.0203$). CISH, JAK-STAT yolunu negatif düzenleyen bir gen olup bu azalma, STAT yolundaki değişimlerin Ponatinib direncine etkisini işaret edebilir. STAT1 gen ekspresyonu, STAT5A nakavt grubunda anlamlı bir artış göstermiştir (0.09 kat, $p = 0.0208$). STAT1'in artması, Ponatinib direncinde bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Bu bulgular, Ponatinib tedavisine dirençli K562 hücrelerinde bazı genlerdeki belirgin değişikliklerin Ponatinib direncine katkıda bulunabileceğini ortaya koymaktadır. Özellikle STAT5B, ABL1, JAK2 ve STAT3 gibi genlerdeki anlamlı değişiklikler, bu genlerin Ponatinib direncinde kritik roller oynayabileceğini işaret etmektedir. Ayrıca, TP53 ve CISH gibi genlerdeki ekspresyon değişiklikleri, dirençli hücrelerin apoptoz ve sinyal yollarında adaptasyonlar geliştirdiğini göstermektedir. Bu bulgular, Ponatinib direnci geliştiren hücrelerdeki biyolojik süreçlerin daha iyi anlaşılması ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesi açısından önemlidir (Tablo 26, Grafik 20).

	Kontrole Göre Kat Değişimleri			
Gen Sembolü	K562 3nM Ponatinib Dirençli STAT5A nakavt	K562 3nM Ponatinib Dirençli CDK4 nakavt (Pozitif Kontrol)	K562 3nM Ponatinib Dirençli Negatif Kontrol	K562 3nM Ponatinib Dirençli STAT5A nakavt (p değeri)
BAX	1.45	1,18	-1,10	0,3359
STAT5B	-1.57	-2,47	-0,21	0,0194
BCL-X	1.53	1,40	-1,71	0,1366
SOCS1	-0.13	-1.29	-2.54	0,2049
BCL2	0.27	-0.88	-2.30	0,7083
ABL1	0.22	-0.83	-2.83	0,0056
CASP3	0.55	-0.09	-2.60	0,4386
JAK2	-0.83	-1.74	-0.87	0,0030
CASP8	2.24	0.92	-0.66	0,3505
STAM	-0.10	-0.04	-1.09	0,4407
BCR	2.06	0.39	-1.30	0,2233
CDK4	5.42	-0,31	-1,83	0,3813
STAT1	0.09	-0,19	-1,10	0,0208
ATM	0.11	1,10	-1,85	0,8614
STAT3	-0.71	-3,37	4,34	0,0278
STAT5A	-0.71	-1,23	1,53	0,0397
mTOR	0.11	-0,14	-2,29	0,9766
TP53	1.04	2,12	-2,18	0,0469

CISH	-0.17	-0,09	0,69	0,0203
RUNX3	-0.59	-0,40	1,88	0,3880
CCDN1	0.20	-0,50	-0,84	0,7043

Tablo 26. K562 3nM ponatinib dirençli hücre hattı ile CRISPR/Cas9 uygulanmış dirençli K562 hücre hatlarında kontrole göre gen ifadelerindeki kat değişimleri

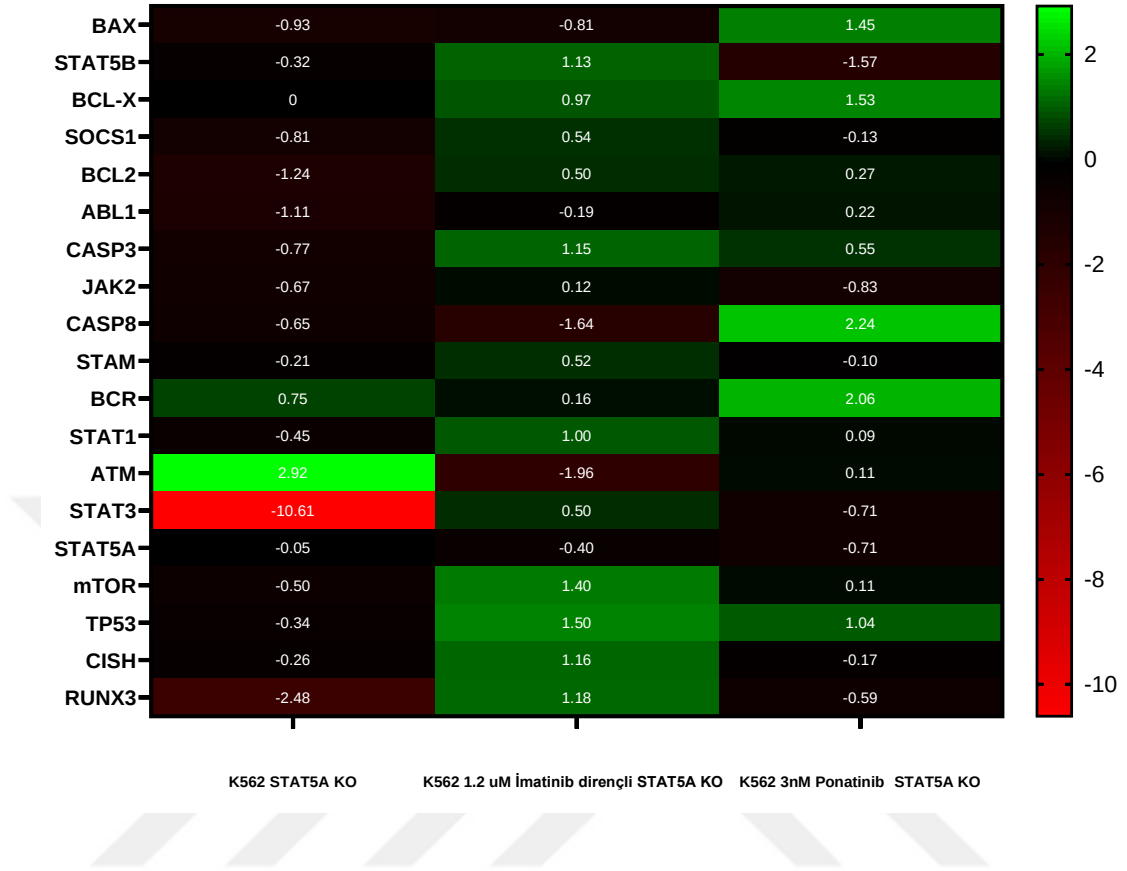


Grafik 20. K562 3nM Ponatinib dirençli hücre hattı ile CRISPR/Cas9 uygulanmış K562 hücre hatlarında kontrole göre gen ifadelerindeki kat değişim grafiği

4.6.4 STAT5A nakavt sonrasında İmatinib ve Ponatinib Dirençli K562 Hücre Hatlarında Gen Ekspresyon Profillerinin Analizi

STAT5A'nın K562 hücrelerinde gen ekspresyonu düşük (-0.05), İmatinib'e dirençli hücrelerde STAT5A'nın ekspresyonu azamıştır (-0.40). Bu, K562 1.2 μ M imatinib dirençli STAT5A KO hücrelerinde STAT5A'nın ifadesinin azaltıldığını göstermektedir. K562 3 nM ponatinib dirençli STAT5A KO (-0.71) hücrelerinde STAT5A'nın ekspresyonu daha da düşük. STAT5A'nın ponatinib direnci ile ilişkili olabileceğini veya ponatinib'in STAT5A'nın ekspresyonunu etkileyebileceğini öne sürebilir. STAT5A'nın ekspresyonunun dirençli hücrelerde daha da azaldığı görülmektedir. Bu, STAT5A'nın bu ilaçlara karşı direnç ile ilgili bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. K562 STAT5A KO (-1.24) hücrelerinde BCL-2 ekspresyonu önemli ölçüde azalmış, bu da STAT5A'nın BCL-2'nin düzenlenmesinde rol oynadığını gösteriyor. K562 1.2 μ M imatinib dirençli STAT5A KO (0.50) ve K562 3 nM ponatinib dirençli STAT5A KO (0.27) dirençli hücrelerde BCL-2 ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Bu artış, STAT5A'nın eksikliği ile BCL-2'nin yeniden ifade edilmesinin, ilaç direnci ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. K562 STAT5A KO (-0.67) hücrelerinde JAK2 ekspresyonunu önemli ölçüde azaltmış. Bu, STAT5A'nın JAK2'nin düzenlenmesinde bir rol oynadığını göstermektedir. K562 1.2 μ M imatinib dirençli STAT5A KO (0.12) ve K562 3 nM ponatinib dirençli STAT5A KO (-0.83) hücrelerinde JAK2 ekspresyonunun azalması, STAT5A'nın eksikliği ile ilişkili olabilir. İmatinib dirençli hücrelerde JAK2'nin biraz artmış olması, bu direncin JAK2 ile ilişkilendirilebileceğini veya farklı bir mekanizma etkili olabilir. K562 STAT5A KO (-10.61) hücrelerinde STAT3'ün ekspresyonunu önemli ölçüde azaltmış, bu da STAT5A'nın STAT3'ün düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. K562 1.2 μ M imatinib dirençli STAT5A KO (0.50) hücrelerinde STAT3 ekspresyonunun arttığı, ancak K562 3 nM ponatinib dirençli STAT5A KO (-0.71) hücrelerinde STAT3 ekspresyonunun azaldığı gözlemleniyor. Bu durum, STAT3'ün imatinib ve ponatinib direnci ile farklı şekillerde ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. K562 STAT5A KO (2.92) hücrelerinde ATM ekspresyonunu artırmış, bu da STAT5A'nın ATM'nin düzenlenmesinde rol oynayabileceğini düşündürür. K562 1.2 μ M imatinib dirençli STAT5A KO (-1.96) ve K562 3 nM ponatinib dirençli STAT5A KO (0.11) hücrelerinde ATM ekspresyonunun düşmesi,

bu ilaçların ATM ekspresyonunu etkileyebileceğini veya ATM'nin düşük ekspresyonunun direnç katkısında bulunabileceğini düşündürebilir. K562 STAT5A KO (-0.5) hücrelerinde mTOR ekspresyonunu önemli ölçüde azaltmış, bu da STAT5A'nın mTOR'un düzenlenmesinde bir rol oynadığını düşündürebilir. K562 1.2 μ M imatinib dirençli STAT5A KO (1.40) hücrelerinde mTOR ekspresyonunun arttığı, ancak K562 3 nM ponatinib dirençli STAT5A KO (0.11) hücrelerinde mTOR ekspresyonunun azaldığı gözlemleniyor. Bu durum, mTOR'un ilaç direnci ile farklı şekillerde ilişkilendirilebileceğini ve STAT5A'nın eksikliği ile mTOR ekspresyonundaki değişikliklerin, bu ilaçların etkileriyle ilişkili olabileceğini düşündürebilmektedir. K562 STAT5A KO (-0.34) hücrelerinde TP53 ekspresyonunu azaltmış, bu da STAT5A'nın TP53'ün düzenlenmesinde önemli bir rol oynayabileceğini gösterir. K562 1.2 μ M imatinib dirençli STAT5A KO (1.53) ve K562 3 nM ponatinib dirençli STAT5A KO (1.04) hücrelerinde TP53 ekspresyonu artmış. Bu, TP53'ün artışının bu ilaçların direnci ile ilişkili olabileceğini düşündürebilir. TP53'ün artışı, hücrel stres yanıtı ve DNA hasarı ile ilişkilidir, bu da ilaca dirençli hücrelerin TP53'ü daha yüksek seviyelerde ifade edebileceğini göstermektedir. K562 STAT5A KO (-0.26) hücrelerinde CISH ekspresyonunu önemli ölçüde azaltmış, bu da STAT5A'nın CISH'in düzenlenmesinde rol oynadığını göstermektedir. K562 1.2 μ M imatinib dirençli STAT5A KO (1.16) hücrelerinde CISH ekspresyonunun arttığı, ancak K562 3 nM ponatinib dirençli STAT5A KO (-0.17) hücrelerinde CISH ekspresyonunun düştüğü gözlemlenmektedir. K562 1.2 μ M imatinib dirençli STAT5A KO (1.18) hücrelerinde RUNX3 ekspresyonunun arttığı, ancak K562 3 nM ponatinib dirençli STAT5A KO (-0.59) hücrelerinde RUNX3 ekspresyonunun azaldığı gözlemleniyor. Bu durum, RUNX3'ün imatinib ve ponatinib direnci ile farklı şekillerde ilişkili olabilmektedir (Şekil 15)

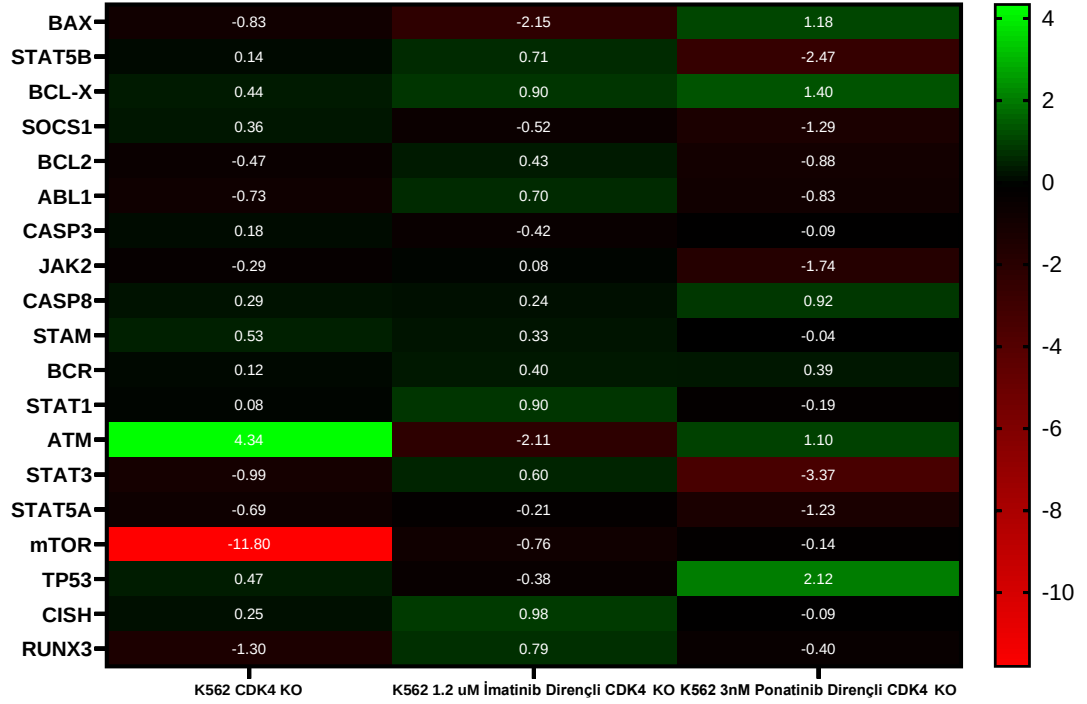


Şekil 15. K562 hücre hattı ile drençli hücre hatlarında STAT5A nakavt edilmesi sonrasında oluşan gen ifadelerindeki değişimin ısı grafiği

4.6.5 CDK4 nakavt sonrasında İmatinib ve Ponatinib Dirençli K562 Hücre Hatlarında Gen Ekspresyon Profillerinin Analizi

K562 CDK4 KO (4.34) hücrelerinde CDK4'ün yokluğunun ATM gen ekspresyonunu etkilediğini ve bu etkinin ilaç direnci durumuna bağlı olarak değiştiğini gösteriyor. K562 1.2 μ M İmatinib dirençli CDK4 KO (-2.11) ile K562 3 nM Ponatinib dirençli CDK4 KO (1.10) hücrelerinde ATM ekspresyonu arasındaki farklılık, bu ilaçların hücresel mekanizmalar üzerindeki etkilerini ve gen ekspresyonu üzerindeki dolaylı etkilemektedir. K562 CDK4 KO (-11.80) hücrelerinde mTOR gen ekspresyonunda büyük bir düşüş olduğunu gösteriyor. Bu düşüş, CDK4'ün mTOR ekspresyonunu pozitif yönde etkileyen bir rolü olabileceğini düşündürüyor. K562 1.2 μ M İmatinib dirençli CDK4 KO (-0.76), hücrelerinde imatinib direnci ile birlikte mTOR

ekspresyonunu az miktarda azalttığını gösteriyor. İmatinib direnci, mTOR ekspresyonundaki bu küçük düşüşü etkileyebilir. K562 3 nM Ponatinib dirençli CDK4 KO (-0.14) hücrelerinde ponatinib direnci ile birlikte mTOR ekspresyonunda neredeyse minimal bir değişiklik yarattığını göstermektedir (Şekil 16).



Şekil 16. K562 hücre hattı ile drençli hücre hatlarında CDK4 nakavt edilmesi sonrasında oluşan gen ifadelerindeki değişimin ısı grafiği

Tartışma

Kronik miyeloid lösemi (KML), kemik iliği ve kan dolaşımında miyeloid kökenli olgunlaşmamış lösemik hücrelerin birikimi ile karakterize edilen bir hematolojik kanser türüdür. Bu malignitenin temel nedeni, kromozom 9 ve 22'nin uzun kolları (q kolları) arasında gerçekleşen karşılıklı translokasyondur. Bu translokasyon, BCR (breakpoint cluster region) ve ABL genlerini bir araya getirerek Philadelphia kromozomu (Ph) olarak bilinen anormal bir kromozomal yapının oluşumuna yol açmaktadır ve (BCR/ABL füzyon proteininin ekspresyonunu sağlamaktadır (Deininger et al., 2000). BCR/ABL proteininin sürekli aktif olan tirozin kinaz aktivitesi, kontrolsüz hücre büyümesine neden olur ve aynı zamanda farklılaşma, hücre yapışması, göç ve apoptotik yanıt gibi normal hücresel işlevlerdeki çeşitli bozuklukların sorumlusu olarak görülmektedir. Bu nedenle, Ph-pozitif KML'li hastaların tedavisinde BCR/ABL füzyon proteini önemli bir hedef olarak kabul edilmektedir (Peled et al., 2002).

Tirozin kinazlar, kanserli hücrelerde genellikle onkogenik bir rol üstlenerek hücrelerin kontrolsüz büyümesine ve çoğalmasına neden olur. Özellikle kronik miyeloid lösemide (KML), BCR-ABL tirozin kinaz füzyon proteini sürekli olarak hücre büyümesini ve bölünmesini teşvik eder (Chislock et al., 2013). Tirozin kinazlar, hücresel sinyal yollarını düzenleyerek normal şartlarda hücrelerin düzgün çalışmasını sağlar; ancak aşırı aktivasyonları veya mutasyonları, hücrelerin sürekli büyümesine, çoğalmasına ve programlanmış hücre ölümünden (apoptoz) kaçmasına yol açarak kanserli hücrelerin sağ kalımını uzatmaktadır ve hastalığın ilerlemesine katkıda bulunmaktadır (Saraon et al., 2021). Kanser tedavisinde tirozin kinazlar önemli hedefler haline gelmiştir ve tirozin kinaz inhibitörleri (TKI'lar) bu enzimlerin aktivitesini bloke ederek kanserli hücrelerin büyümesini durdurmaktadır. KML tedavisinde kullanılan Imatinib gibi TKI'lar, BCR-ABL füzyon proteini üzerinde etkili olup hastalığın ilerlemesini engelleyebilmektedir (Goldman et al., 2001). Ancak, tirozin kinazların mutasyona uğraması veya alternatif sinyal yollarının aktivasyonu, TKI'lara karşı direnç gelişimine neden olarak tedavide önemli bir zorluk oluşturmakta ve yeni nesil tirozin kinaz inhibitörlerinin geliştirilmesini gerektirmektedir (Attili et al., 2023). Imatinib ve ikinci nesil tirozin kinaz inhibitörleri (TKI'lar) nilotinib ve dasatinib, prognozu ve yaşam beklentisini

istatistiksel olarak önemli ölçüde iyileştirmiştir. Kronik miyeloid lösemi hastalarının Bununla birlikte, TKI'lere direnç, önemli bir klinik zorluk olmaya devam etmektedir. Üçüncü kuşak bir TKI olan ponatinib, BCR-ABL'ye bağlı direnç mekanizmalarına sahip hastalarda sonuçları iyileştirse de, hastaların bir kısmı BCR-ABL'den bağımsız direnç geliştirir ve ponatinib tedavisi başarısız olmaktadır (Mitchell et al.,2018).

Transkripsiyonun sinyal dönüştürücüleri ve aktivatörleri (STAT) proteinleri, sitokin reseptör süper ailesinin üyeleri tarafından kullanılan sitoplazmik transkripsiyon faktörleridir. Bir ligandın hücre yüzeyindeki kendi reseptörüne bağlanmasının ardından fosforile edilirler. Daha sonra STAT'lar dimerleşir ve hedef gen promotörlerine bağlanarak gen ifadesinde hızlı değişiklikler meydana getirebilecekleri bir çekirdeğe göç ederler. Hücre çoğalmasını ve sağ kalımını modüle ettikleri için, anormal aktivasyonları hücresel dönüşüme katkıda bulunabilmektedir (Bowman et al., 2000). İki farklı gen tarafından kodlanan iki çok benzer protein - STAT5A (96 kDa) ve STAT5B (94 kDa), STAT ailesine aittir (Grimley et al.,1999). STAT5 proteinleri akut miyeloid lösemi (AML), akut lenfositik lösemi (ALL), kronik miyeloid lösemi (KML), HTLV-I ile ilişkili yetişkin T hücreli lösemi/lenfoma gibi bazı hematolojik malignitelerde sürekli olarak aktive edilir ve bu da lösemogenezdeki önemlerini göstermektedir (Benekli et al., 2003). STAT5 proteinleri, KML'nin gelişimi için hücrelerinin çoğalmasında ve hayatta kalmasında önemli rol oynamaktadır (Hoelbl et al., 2010). İmatinib mesilat (IM) gibi BCR-ABL'yi hedef alan tirozin kinaz inhibitörlerinin (TKI) geliştirilmesi, KML tedavisinde devrim yaratmıştır. Ancak oluşan ilaç direnci nedeniyle yetersiz kalmaktadır. BCR-ABL mutasyonlarının ortaya çıkması KML hücrelerinin IM direncini teşvik etmektedir (Gambacorti-Passerini et al., 2003). Bu nedenle, KML'yi iyileştirmek için tamamlayıcı tedavi stratejilerine ihtiyaç duyulmaktadır (Cumaraswamy et al., 2014). STAT5, KML'de önemli bir ilaç hedefi haline gelmektedir. STAT5'in kemoterapiye dirençli KML hücrelerinin bakımında önemli bir rol oynadığı bildirilmiştir (Prost et al., 2015). Bu nedenle, STAT5'i hedeflemek, TKI'ye dirençli hale gelen relaps KML hastalarına da fayda sağlamaktadır. Lösemide STAT5'i hedeflemek için çeşitli yaklaşımlar kullanılmıştır. Bunlar arasında, önceden onaylanmış ilaçların hücre tabanlı tarama, psikotrop ilaç pimozidin KML hücrelerinde potansiyel bir STAT5 inhibitörü olarak tanımlanmasına olanak sağlamıştır (Nelson et al., 2011). Pimozid, STAT5'in tirozin fosforilasyonunu

azaltmış ve KML hücrelerinde büyüme durması ve apoptozu indüklemiştir (Gumus et al., 2023). Pimozidin lösemik hücrelerde deubiquitinating (DUB) enzimi USP1'i hedef aldığı bildirilmiştir, bu da pimozidin STAT5 aktivitesi üzerindeki etkilerinin dolaylı olabileceğini göstermektedir (Mistry et al., 2011). Bu da STAT5 proteinlerinden STAT5A'nın farklı ilaç stratejilerin araştırılmasına olanak sağlamaktadır.

CRISPR/Cas9, bakteriyel adaptif bağışıklığın önemli bir bileşeni olan CRISPR/Cas sistemi, cas nükleazından ve iki ayrı RNA bileşeninden, programlanabilir bir crRNA (CRISPR RNA) ve sabit bir tracrRNA'dan (trans-aktifleştirici crRNA) oluşmaktadır. Cas proteini, istilacı faj DNA'sını küçük parçalara kesebilir ve bu parçalar daha sonra bir ara parça olarak CRISPR dizisine entegre edilmektedir. Daha sonra, CRISPR dizisi, Cas proteinlerini kesme için çift sarmallı bir RNA yapısı oluşturan crRNA ve tamamlayıcı bir tracrRNA üretmek üzere transkripsiyona uğrar (Datsenko et al., 2012, Jinek et al., 2012). İstilacı DNA'daki crRNA hedefli diziye bitişik, protospacer bitişik motif (PAM) olarak adlandırılan kısa bir dizi, CRISPR/Cas kompleksinin hedef DNA bağlanması sırasında tanıdığı adaptasyon ve girişim aşamalarında önemli bir rol oynar. Bir PAM dizisinin yokluğu, Cas ile hedef DNA arasındaki afiniteyi değiştirebilir, çünkü spesifik PAM dizisi tanıma, hedef olmayan dizileri hedef olmayan dizilerden ayırt etmeye yarar (Westra, et al., 2013). CRISPR/Cas9 teknolojisi 2014 yılında Jenniffer Doudna ve Emmanuella Charpentier tarafından keşfedildi (Doudna and Charpentier 2014). Tasarım kolaylığı ve verimliliği sayesinde genetik mühendisliği alanında bir çığır açmıştır (Hsu et al., 2014). Bu yüzden bilim insanları farklı organizmalarda bu tekniği denemeye başlamıştır. Aynı zamanda lösemi araştırmaların CRISPR/Cas9 ile ilgili çalışmalar da artmaktadır (Huang, et al., 2018). Bu çalışmaların çoğu çeşitli genlerin işlevini açıklamak in vitro koşullarında yapılan çalışmalardır (Vukovic et at., 2015). 2015 yılında Valletta ve arkadaşları CRISPR/Cas9 ile ilgili yaptıkları çalışmalarda lösemi hücre hattından edinilmiş mutasyonları düzeltebileceği ilk kez gösterilmiştir (Valletta et al., 2015). Kronik miyeloid lösemi de CRISPR/Cas9 yöntemi kullanılması terapötik potansiyeli

yüksek adaylardan biri haline gelmiştir. Kronik miyeloid lösemi, onkoprotein olan BCR-ABL füzyon geninin varlığıyla ile karakterize edilmektedir (García-Tuñón et al., 2017). Bir araştırmada, CRISPR/Cas9'un BCR/ABL füzyon genini etkili bir şekilde nakavt edilmesi sonrasında onkoprotein ifadesindeki azalma olması ve tümörjenik etkilerinde azalmasına neden olduğu gözlemlenmiştir. Bu yaklaşım doğrultusunda KML in vitro ve in vivo fare modellerinde de başarılı olmuştur (Barghout et al., 2021).

Bu tez çalışmasında, imatinib ve ponatinib'e dirençli KML hücre hatlarında CRISPR/Cas9 aracılığıyla STAT5A'nın silinmesi, baskılanması sonrasında hücre proliferasyonu, transfeksiyon analizi, apoptozu, hücre döngüsü analizi, çeşitli biyolojik fonksiyonlarda bulunan genlerin mRNA seviyesindeki ekspresyonlar gibi hücresel yanıtlar üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla KML hücre hattı modeli atasal K562 ve onun 1.2 uM İmatinib'e ile 3 nM Ponatinib'e direnç kazandırılmış K562/Ima1.2 ile K562/Pon3 dirençli hücrelerde moleküler düzeyde analizler yapılmıştır. Ayrıca STAT5A nakavtı sonrasında bu hücrelerde hücresel yanıt analizleri bu deney grubu için de gerçekleştirilmiştir.

Bu bağlamda öncelikle K562 hücre grubu, K562/Ima1.2 ve K562/Pon3 hücre gruplarına CRISPR/Cas9 yöntemi ile STAT5A ve Pozitif kontrol olarak CDK4 nakavt edildi. Transfeksiyon işlemini lipofektamincrisprmax aracılığıyla yapıldı. Transfeksiyon verimliliği Yu ve ark. Yaptığı çalışmada K562 hücre hattında lipofektamin crispermax denemesi sonrası % indel 20 ± 2 olarak belirlenmiştir. Hücre gruplarımızda STAT5A nakavt grubunda %18.8 olarak hesaplanmıştır. CDK4 nakavt grubunda ise %19.2 olarak hesaplanmıştır. Bu bağlamda lipofektamincrisprmax K562 hücrelerinde etkinliği Yu ve ark. Yaptığı çalışmalar ile örtüşmektedir (Yu et al., 2016).

K562 hücre grubu ile K562 dirençli gruplara CRISPR/Cas9 uygulanması sonucunda STAT5A'nın nakavt edilmesi, CDK4 nakavt edilmesi (pozitif kontrol) ve negatif kontrol hücre hatlarımızda anneksin V yöntemine göre elde ettiğimiz sonuçlar şu şekildedir. Bunun sonucunda K562 STAT5A ko hücre hattımız kontrol grubuna göre 1.93 katlık apoptoz artışı göstermiştir. K562 CDK4 ko hücre hattımız

kontrol grubuna göre hücrelerde 1.01 kat apoptoz artışı ile K562 negatif kontrol grubunda ise 1.42 kat artış gözlemlenmiştir. STAT5A nakavtın K562 hücrelerine apoptoza etkisi ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızın verileri literatür için bir ilk niteliğindedir. Kaneshige ve arkadaşları tarafından yapılan bir in vivo çalışmasında KU815 ve NCO2 hücre hatlarında AK-2922 aracılığıyla STAT5 inhibisyonuna neden olmuştur ve bu süreçte apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Kaneshige et al., 2023). Nakatani ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada AML hücre hattında CDK4 inhibisyonu apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Nakatani et al., 2021). İmatinib dirençli hücrelerde STAT5A nakavt edilmesi sonucunda 11.35 kat apoptoz artışına neden olmuştur. Kaymaz ve arkadaşları K562/IMA-3+ siRNA dirençli grupta transfekte edilmemiş benzerlerine kıyasla 3,08 kat apoptoz artışı olduğunu bildirmişlerdir (Kaymaz et al., 2015). CDK4'ün nakavt edilmesi sonucunda 6.1 kat apoptoz artışına neden olmuştur. STAT5A nakavtın K562 imatinibe dirençli hücrelerinde apoptoza etkisi ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızın verileri literatür için bir ilk niteliğindedir. Ponatinib dirençli hücrelerde STAT5A nakavt edilmesi sonucunda kontrole göre 4.07 kat apoptoz artışına neden olmuştur. Gumus ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 1nM ponatinibe dirençli K562 hücrelerine STAT5 inhibitörü olan pimoizid uygulandığında apoptozu 14 kat indüklediği bildirilmiştir (Gumus et al., 2023). CDK4'ün nakavt edilmesi sonucunda kontrole göre 2.60 kat apoptoz artışına neden olmuştur. Ponatinib dirençli negative kontrol grubunda ise 2.18 kat artış gözlemlenmiştir. Çalışmamızın verileri literatür için bir ilk niteliğindedir.

K562 hücre grubu ile K562 dirençli gruplara CRISPR/Cas9 uygulanması sonucunda STAT5A'nın nakavt edilmesi, hücre hatlarımızda hücre döngüsü analizleri şu şekildedir. K562 kontrol grubunda göre, 48. Saatte hücre döngüsünde STAT5A nakavt edilen hücre hattında G0/G1 %43.5 fazında arrestlenmiştir ve anlamlıdır. CRISPR/Cas9 uygulanan imatinib dirençli hücrelerde STAT5A'nın nakavt edilmesi sonrasında hücre döngüsünde G0/G1 fazında %43.4, arrestlenmiştir ve anlamlıdır. CRISPR/Cas9 uygulanan ponatinib dirençli hücrelerde STAT5A'nın nakavt edilmesi sonrasında hücre döngüsünde G0/G1 fazında %50.4 arrestlenmiştir ve anlamlıdır. Casetti ve arkadaşları in vivo çalışmalarında KML hücre hatlarında (K562, LAMA84, MEG01) STAT5A tek başına nakavt edildiğinde hücre döngüsü üzerinde doğrudan bir etki görülmediği ancak bu durumun hücrelerin uzun süreli

hayatta kalmasını destekleyen sinyal yollarının zayıflatacağını bildirmektedir (Casetti et al., 2013). Kollman ve arkadaşları yaptığı in vivo çalışmada KML hücrelerinde STAT5A nakavtı sonrasında G0/G1 fazında arrestlendiği bildirilmiştir (Kollman et al., 2019). Bu da bulgularımız ile örtüşmektedir.

Gen ekspresyon çalışmalarıyla ilgili sınırlı sayıda veri bulunmaktadır. K562 hücre grubu ile K562 dirençli gruplara CRISPR/Cas9 uygulanması sonucunda STAT5A'nın nakavt edilmesi, hücre hatlarımızda gen ifadelerindeki değişiklikler şu şekildedir; K562 STAT5A ko hücre grubunda, kontrole kıyasla BCL-2 -1.24 kat anlamlı azaldığını bu da hücrelerin apoptoza daha duyarlı hale geldiğini göstermektedir. CDKN2B-1.43 kat anlamlı azaldığı STAT5A'nın yokluğunda bu genin baskılanması, hücre döngüsünün düzensizleşmesine yol açabilmektedir. ABL1 -1.11 kat anlamlı azalması, hücre büyümesinin inhibe olduğunu gösterebilir. CASP3 -0.77 kat gen ifadelerinde anlamlı apoptoz mekanizmasının etkinliğinin azaldığını veya başka bir şekilde düzenlendiğini düşünmekteyiz. E2F1 gen ifadesindeki anlamlı 5,42 kat artış, proliferasyon hızını artırabilir. STAT5A KO sonrası, hücreler, proliferatif sinyalleri sürdürebilmek için E2F1 ekspresyonunu artırmış olabilir. Bu artış, STAT5A'nın normalde hücre proliferasyonunu doğrudan veya dolaylı olarak baskılamasından kaynaklanıyor olabilir. STAT5A'nın yokluğunda, hücreler E2F1 seviyelerini artırarak proliferasyonu desteklemeye çalışıyor olabilirler. STAT5A gen ifadesindeki hafif anlamlı azalma göstermektedir (-0.05).

K562 1.2 uM imatinib dirençli STAT5A nakavtı sonrasında meydana gelen gen ifadesindeki değişiklikler şu şekildedir; ATM gen ifadesinde anlamlı azalma (-1.96) hücrelerin DNA hasarına karşı olan yanıtını zayıflatabilir. STAT5A'nın varlığında ATM'nin daha yüksek seviyelerde tutuluyor olabileceği, STAT5A'nın eksikliği durumunda ise ATM ekspresyonunun baskılandığı düşünülebilir. Bu, hücrelerin DNA hasarına karşı daha savunmasız hale gelmesine yol açabilir. TP53 gen ifadesinde anlamlı artış (1.5) hücrede bir stres yanıtı yaratabilir, bu da TP53 ifadesini artırabilir. İmatinib direncine sahip hücrelerde, TP53'ün artışı, hücrenin hayatta kalma mekanizmalarını güçlendirme çabası olarak yorumlanabilir. Hücreler, STAT5A'nın yokluğunda proliferatif sinyalleri azaltıp, TP53 aracılığıyla hücre döngüsünü kontrol altına almayı hedefliyor olabilir. Casetti ve arkadaşları in vivo

çalışmalarında KML hücre hatlarında shS5A uygulaması, normal ve KML CD34+ hücrelerinde STAT5A'nın zayıflatılması, hücrelerde bazal oksidatif stresi ve DNA hasarını artırdığı ve, p53 ve CHK2 yolaklarının aktivasyonunda artış nedeniyle, STAT5A'nın hücresel stresin yönetiminde önemli bir rol oynadığını bildirilmiştir. Bulgularımız bu çalışma ile örtüşmektedir (Casettiet al., 2013). CISH gen ifadesinde anlamlı artış (1,16) bir geri besleme mekanizması olarak düşünülebilir. İmatinib direncine sahip hücrelerde CISH artışı, hücrelerin STAT sinyal yolağını baskılayarak, STAT5A'nın yokluğunda dengenin sağlanmasına çalıştığını gösterebilir. Bu artış, hücrenin kalan JAK-STAT aktivitesini sınırlayarak, hücredeki proliferatif sinyalleri dengelemeye yönelik bir yanıt olabilir. Brachet-Botineau ve arkadaşlarının K562 hücrelerinde yaptığı çalışmada CISH geni imatinib dirençli hücreye göre ekspresyonun azaldığı gözlemlenmiştir (Brachet-Botineau et al., 2020). STAT5A gen ifadesinde anlamlı azalış (-0.40), genin tamamen baskılanmamış olabileceğini ya da hücrelerin bu gene yönelik bir miktar geri besleme mekanizmasıyla yanıt verdiğini gösterebilir. Hücredeki STAT5A aktivitesinin bu düşük seviyelerde kalması, hücrenin dengeyi koruma çabası olarak yorumlanabilir. Runx3 gen ifadesinde anlamlı artış (1,18), STAT5A nakavt sonrasında hücrelerin proliferatif sinyalleri zayıfladığı için, hücreler farklılaşma ve apoptoza yönlendirilebilir. Bu durumda, Runx3 ifadesinin artışı, hücrelerin bu süreçlere uyum sağlama çabasını yansıtabilir. Runx3'ün artışı, STAT5A'nın yokluğunda, hücrelerin stresle başa çıkmak ve sinyal yollarını yeniden düzenlemek için başlattığı bir kompensatuar yanıt olabilir. Runx3'ün artması, hücrelerin mevcut stres koşullarında hayatta kalmak için yeniden programlandığını gösterebilir. STAT5A'nın yokluğunda, hücrelerin kanserleşme eğilimlerini baskılamak amacıyla Runx3 ifadesini artırmış olması olasıdır. Bu artış, hücrelerin imatinib direncine ve STAT5A eksikliğine karşı geliştirdiği bir savunma mekanizması olabileceği düşünülmektedir.

K562 3nM ponatinibe dirençli hücrelerde STAT5A nakavtı sonrasında gen ifadesindeki değişiklikler şu şekildedir; STAT5B gen ifadesinde anlamlı azalma (-1.57) STAT5A eksikliğinin STAT5B ekspresyonu üzerinde dolaylı bir etkisi olduğunu veya STAT5B'nin de bazı fonksiyonel etkilerinin STAT5A tarafından dengelendiğini gösterebilir. ABL1 gen ifadesinde anlamlı artış (0.22) STAT5A'nın yokluğunda, ABL1 ifadesindeki artış, hücrenin büyüme ve proliferasyon sinyallerini

artırma çabası olarak yorumlanabilir. Bu artış, STAT5A'nın normalde ABL1 ekspresyonunu baskılayan bir rolü olabileceğini ve STAT5A'nın eksikliği durumunda bu baskılamının ortadan kalktığını gösterebilir. JAK2 gen ifadesindeki anlamlı azalma (-0.83) JAK-STAT sinyal yollarının genel olarak etkilenmiş olabileceğini gösterir. JAK2'nin azalmış olması, STAT5A'nın yokluğunda sinyal iletiminde bir bozulma yaşandığını ve JAK-STAT yolunun etkisinin azaldığını göstermektedir. STAT1 gen ifadesindeki anlamlı artış (0.09) STAT1'in daha fazla aktive olmasına neden olabilir. Bu artış, STAT1'in STAT5A'nın rolünü telafi etmeye çalıştığı veya STAT1 sinyal yollarının hücre stresine yanıt olarak aktivite kazandığı anlamına gelebilir. STAT3 gen ifadesindeki anlamlı azalma (-0.71) STAT5A'nın eksikliğinin hücresel sinyal yollarında yaratmış olduğu değişikliklerin bir yansıması olabilir. STAT5A ve STAT3 arasındaki etkileşimler, JAK-STAT sinyal yollarındaki değişiklikler ve hücre adaptasyon süreçleri, STAT3 ifadesindeki azalmayı açıklayabilir. STAT5A'nın yokluğu, STAT3 aktivitesini ve ekspresyonunu etkileyebilir, bu da hücrelerin yeni koşullara yanıt verme şeklini değiştirebilmektedir. STAT5A gen ifadesindeki anlamlı azalma (-0.71), TP53 gen ifadesinde anlamlı artış (1.04) TP53, hücresel stres ve DNA hasarı yanıtında rol oynar. STAT5A'nın eksikliği, hücredeki stres yanıtlarını etkileyebilir ve TP53 ifadesinin artmasına yol açabilir. Bu artış, STAT5A'nın eksikliğinde hücrenin DNA onarımına veya apoptoza yönelme çabasını yansıtır olabilir. CISH gen ifadesindeki anlamlı azalma (-0.17) JAK-STAT sinyal yollarını negatif olarak düzenler. STAT5A'nın nakavt edilmesi, CISH ifadesinde azalmaya neden olabilir, çünkü CISH'in STAT5A'nın aktivitelerini düzenlemedeki rolü, STAT5A'nın eksikliği durumunda yeterli olmayabilir. Ayrıca, CISH ekspresyonu azalmış olabilir çünkü hücre, STAT5A'nın yokluğunda farklı yollarla denge kurmaya çalışıyor olabileceğini düşündürmektedir.

STAT5A nakavt sonrasında imatinib ve ponatinib dirençli K562 hücre gen ifadesindeki değişiklikler şu şekildedir; K562 STAT5A KO (-1.24) hücrelerinde BCL-2 ekspresyonu önemli ölçüde azalmış, bu da STAT5A'nın BCL-2'nin düzenlenmesinde rol oynadığını gösteriyor. K562 1.2 μ M imatinib dirençli STAT5A KO (0.50) ve K562 3 nM ponatinib dirençli STAT5A KO (0.27) dirençli hücrelerde BCL-2 ekspresyonunun arttığı gözlemlenmiştir. Bu artış, STAT5A'nın eksikliği ile BCL-2'nin yeniden ifade edilmesinin, ilaç direnci ile ilişkili olabileceğini

düşündürmektedir. K562 STAT5A KO (-0.67) hücrelerinde JAK2 ekspresyonunu önemli ölçüde azaltmış. Bu, STAT5A'nın JAK2'nin düzenlenmesinde bir rol oynadığını göstermektedir. K562 1.2 μ M imatinib dirençli STAT5A KO (0.12) ve K562 3 nM ponatinib dirençli STAT5A KO (-0.83) hücrelerinde JAK2 ekspresyonunun azalması, STAT5A'nın eksikliği ile ilişkili olabilir. Imatinib dirençli hücrelerde JAK2'nin biraz artmış olması, bu direncin JAK2 ile ilişkilendirilebileceğini veya farklı bir mekanizma etkili olabilir. K562 STAT5A KO (-10.61) hücrelerinde STAT3'ün ekspresyonunu önemli ölçüde azaltmış, bu da STAT5A'nın STAT3'ün düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını göstermektedir. K562 1.2 μ M imatinib dirençli STAT5A KO (0.50) hücrelerinde STAT3 ekspresyonunun arttığı, ancak K562 3 nM ponatinib dirençli STAT5A KO (-0.71) hücrelerinde STAT3 ekspresyonunun azaldığı gözlemleniyor. Bu durum, STAT3'ün imatinib ve ponatinib direnci ile farklı şekillerde ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Yin ve arkadaşları yaptıkları çalışmada K562 hücrelerinde ve imatinib dirençli K562 dirençli hücrelerinde SH-4-54 inhibitörü aracılığıyla STAT3/STAT5 inhibisyonuna neden olmaktadır. Bunun sonucunda Dirençli hücrelerde ve K562 hücrelerinde STAT3 ve STAT5 gen ifadesinde azalma meydana gelmektedir. STAT5 baskılanan K562 hücrelerinde STAT3 gen ifadesinde azalma meydana gelmektedir (Yin et al., 2023). K562 STAT5A KO (2.92) hücrelerinde ATM ekspresyonunu artırmış, bu da STAT5A'nın ATM'nin düzenlenmesinde rol oynayabileceğini düşündürür. K562 1.2 μ M imatinib dirençli STAT5A KO (-1.96) ve K562 3 nM ponatinib dirençli STAT5A KO (0.11) hücrelerinde ATM ekspresyonunun düşmesi, bu ilaçların ATM ekspresyonunu etkileyebileceğini veya ATM'nin düşük ekspresyonunun dirence katkıda bulunabileceğini düşündürülebilir. K562 STAT5A KO (-0.26) hücrelerinde CISH ekspresyonunu önemli ölçüde azaltmış, bu da STAT5A'nın CISH'in düzenlenmesinde rol oynadığını göstermektedir. K562 1.2 μ M imatinib dirençli STAT5A KO (1.16) hücrelerinde CISH ekspresyonunun arttığı, ancak K562 3 nM ponatinib dirençli STAT5A KO (-0.17) hücrelerinde CISH ekspresyonunun düştüğü gözlemlenmektedir. K562 1.2 μ M imatinib dirençli STAT5A KO (1.18) hücrelerinde RUNX3 ekspresyonunun arttığı, ancak K562 3 nM ponatinib dirençli STAT5A KO (-0.59) hücrelerinde RUNX3 ekspresyonunun azaldığı gözlemleniyor. Bu durum, RUNX3'ün imatinib ve ponatinib direnci ile farklı şekillerde ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Elde ettiğimiz veriler ışığında K562 hücrelerinde ve dirençli K562 hücrelerinde STAT5A nakavt sonrasında meydana gelen gen ifadelerindeki değişiklikler bize ponatinib ve imatinib'in ilaç direncinde farklı mekanizmalar aracılığıyla direnç kazanmaktadır. STAT5A ilaç direnci üzerindeki etkisi CRISPR/Cas9 sonrasında KML hücrelerinde apoptozu indüklemektedir. STAT5A ifadesindeki azalma olmasına rağmen bazı onkogenik genlerin rol alması ilaç direnci ile ilişkili olup aynı zamanda STAT5A negatif geri besleme aracı olan CISH genin aktivasyonun ve mekanizmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz bu süreçte STAT5A ile ilişkili transkripsiyonel geri beslenme mekanizmalarını araştırma için önemli bir konu olduğunu düşünmekteyiz. Bunun sonucunda K562 hücre hattında ve dirençli K562 hatlarında CRISPR/Cas9 kullanılarak STAT5A'nın nakavt edilmesi ile bu hücre hatlarında rol oynayan epigenetik ve stres mekanizmalarının daha iyi araştırılması düşüncesindeyiz.

Sonuç ve Öneriler

STAT5A'nın nakavtı, JAK2, STAT3 ve CISH sinyal yollarında farklı değişikliklere neden olur. Bu, STAT5A'nın gen ekspresyonu ve sinyal yollarındaki rolünü vurgulamaktadır. İlaç dirençli hücreler, STAT5A'nın eksikliği durumunda sinyal yollarını farklı şekilde düzenler. İmatinib ve ponatinib direnci, bu yolların adaptasyonunu ve etkilenmesini gösterir. STAT5A'nın yokluğu, hücrelerin çeşitli sinyal yollarını yeniden düzenlemesine neden olur. Bu düzenlemeler, hücresel yanıtları ve ilaç direncini etkiler. Dirençli hücre hatlarında gözlemlenen değişiklikler, STAT5A'nın eksikliği durumunda hücrelerin nasıl adapte olduğunu ve çeşitli sinyal yollarını nasıl düzenlediğini gösterir. Elde edilen bilgiler ışığında, STAT5A'nın sinyal yolları üzerindeki etkilerini ve ilaç direnci durumundaki rolünü daha iyi anlamamıza yardımcı olabilir.

Gelecek araştırmalar, STAT5A'nın ve ilgili sinyal yollarının ilaç direnci üzerindeki etkilerini daha ayrıntılı bir şekilde inceleyebilir. Bu, kanser tedavileri ve ilaç geliştirme stratejileri için önemli bilgiler sağlayabilir. STAT5A'nın nakavtı ve farklı ilaç direnç koşulları, hücre içindeki sinyal yollarında belirgin değişikliklere yol açmaktadır. Bu değişiklikler, STAT5A'nın ve diğer genlerin işlevlerinin ve ilaç direncinin daha iyi anlaşılmasını sağlayabileceğini düşünmekteyiz. Bu tez çalışması STAT5A'nın sinyal yollarındaki rolünü ve ilaç direnci koşullarındaki etkilerini daha iyi anlamak için önemli bir temel sağlar ve ileri araştırmalar için yön gösterici olabileceğini düşünmekteyiz. Elde edilen veriler ile bu tez çalışması lösemi çalışmalarında CRISPR/Cas9 tabanlı ilaçların geliştirilmesine önemli katkıda bulunacağını düşünmekteyiz.

Kaynaklar

- Alves, R., Gonçalves, A. C., Rutella, S., Almeida, A. M., De Las Rivas, J., Trougakos, I. P., & Sarmiento Ribeiro, A. B. (2021). Resistance to Tyrosine Kinase Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia-From Molecular Mechanisms to Clinical Relevance. *Cancers*, 13(19), 4820. <https://doi.org/10.3390/cancers13194820>
- Amarante-Mendes, G. P., Rana, A., Datoguia, T. S., Hamerschlag, N., & Brumatti, G. (2022). BCR-ABL1 Tyrosine Kinase Complex Signaling Transduction: Challenges to Overcome Resistance in Chronic Myeloid Leukemia. *Pharmaceutics*, 14(1), 215. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14010215>
- Ariyoshi, M., Vassilyev, D. G., Iwasaki, H., Nakamura, H., Shinagawa, H., & Morikawa, K. (1994). Atomic structure of the RuvC resolvase: a holliday junction-specific endonuclease from *E. coli*. *Cell*, 78(6), 1063–1072. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90280-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90280-1)
- Arlinghaus, R., & Sun, T. (2004). Signal transduction pathways in Bcr-Abl transformed cells. *Cancer treatment and research*, 119, 239–270. https://doi.org/10.1007/1-4020-7847-1_12
- Attili, I., Corvaja, C., Spitaleri, G., Del Signore, E., Trillo Aliaga, P., Passaro, A., & de Marinis, F. (2023). New Generations of Tyrosine Kinase Inhibitors in Treating NSCLC with Oncogene Addiction: Strengths and Limitations. *Cancers*, 15(20), 5079. <https://doi.org/10.3390/cancers15205079>
- Barghout, S. H., Aman, A., Nouri, K., Blatman, Z., Arevalo, K., Thomas, G. E., MacLean, N., Hurren, R., Ketela, T., Saini, M., Abohawya, M., Kiyota, T., Al-Awar, R., & Schimmer, A. D. (2021). A genome-wide CRISPR/Cas9 screen in acute myeloid leukemia cells identifies regulators of TAK-243 sensitivity. *JCI insight*, 6(5), e141518. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.141518>
- Benekli, M., Baer, M. R., Baumann, H., & Wetzler, M. (2003). Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias. *Blood*, 101(8), 2940–2954. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-04-1204>
- Berger, A., Sexl, V., Valent, P., & Moriggl, R. (2014). Inhibition of STAT5: A therapeutic option in BCR-ABL1-driven leukemia. *Oncotarget*, 5(20), 9564.

- Blay, J. Y., & von Mehren, M. (2011, April). Nilotinib: a novel, selective tyrosine kinase inhibitor. In *Seminars in oncology* (Vol. 38, pp. S3-S9). WB Saunders.
- Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J., & Jove, R. (2000). STATs in oncogenesis. *Oncogene*, 19(21), 2474–2488. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203527>
- Brachet-Botineau, M., Polomski, M., Neubauer, H. A., Juen, L., Hédou, D., Viaud-Massuard, M. C., Prié, G., & Gouilleux, F. (2020). Pharmacological Inhibition of Oncogenic STAT3 and STAT5 Signaling in Hematopoietic Cancers. *Cancers*, 12(1), 240. <https://doi.org/10.3390/cancers12010240>
- Brachet-Botineau, M., Polomski, M., Neubauer, H. A., Juen, L., Hédou, D., Viaud-Massuard, M. C., Prié, G., & Gouilleux, F. (2020). Pharmacological Inhibition of Oncogenic STAT3 and STAT5 Signaling in Hematopoietic Cancers. *Cancers*, 12(1), 240. <https://doi.org/10.3390/cancers12010240>
- Branford, S., Wang, P., Yeung, D. T., Thomson, D., Purins, A., Wadham, C., Shahrin, N. H., Marum, J. E., Nataren, N., Parker, W. T., Geoghegan, J., Feng, J., Shanmuganathan, N., Mueller, M. C., Dietz, C., Stangl, D., Donaldson, Z., Altamura, H., Georgievski, J., Braley, J., ... Hughes, T. P. (2018). Integrative genomic analysis reveals cancer-associated mutations at diagnosis of CML in patients with high-risk disease. *Blood*, 132(9), 948–961. <https://doi.org/10.1182/blood-2018-02-832253>
- Braun, T. P., Eide, C. A., & Druker, B. J. (2020). Response and Resistance to BCR-ABL1-Targeted Therapies. *Cancer cell*, 37(4), 530–542. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.03.006>
- Carofiglio, F., Trisciuzzi, D., Gambacorta, N., Leonetti, F., Stefanachi, A., & Nicolotti, O. (2020). Bcr-Abl allosteric inhibitors: where we are and where we are going to. *Molecules*, 25(18), 4210.
- Casetti, L., Martin-Lannerée, S., Najjar, I., Plo, I., Augé, S., Roy, L., Chomel, J. C., Lauret, E., Turhan, A. G., & Dusanter-Fourt, I. (2013). Differential contributions of STAT5A and STAT5B to stress protection and tyrosine kinase inhibitor resistance of chronic myeloid leukemia stem/progenitor cells. *Cancer research*, 73(7), 2052–2058. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3955>
- Chandrasegaran, S., & Carroll, D. (2016). Origins of Programmable Nucleases for Genome Engineering. *Journal of molecular biology*, 428(5 Pt B), 963–989. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2015.10.014>

- Chislock, E. M., Ring, C., & Pendergast, A. M. (2013). Abl kinases are required for vascular function, Tie2 expression, and angiopoietin-1-mediated survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(30), 12432–12437. <https://doi.org/10.1073/pnas.1304188110>
- Chomel, J. C., Bonnet, M. L., Sorel, N., Sloma, I., Bennaceur-Griscelli, A., Rea, D., Legros, L., Marfaing-Koka, A., Bourhis, J. H., Ame, S., Guerci-Bresler, A., Rousselot, P., & Turhan, A. G. (2016). Leukemic stem cell persistence in chronic myeloid leukemia patients in deep molecular response induced by tyrosine kinase inhibitors and the impact of therapy discontinuation. *Oncotarget*, 7(23), 35293–35301. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9182>
- Cortes, J. E., Gambacorti-Passerini, C., Deininger, M. W., Mauro, M. J., Chuah, C., Kim, D. W., ... & Brümmendorf, T. H. (2018). Bosutinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia: results from the randomized BFORE trial. *Journal of Clinical Oncology*, 36(3), 231-237.
- Cortes, J. E., Talpaz, M., Beran, M., O'Brien, S. M., Rios, M. B., Stass, S., & Kantarjian, H. M. (1995). Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia with rearrangement of the breakpoint cluster region. Long term follow-up results. *Cancer*, 75(2), 464-470.
- Cumaraswamy, A. A., Lewis, A. M., Geletu, M., Todici, A., Diaz, D. B., Cheng, X. R., Brown, C. E., Laister, R. C., Muench, D., Kerman, K., Grimes, H. L., Minden, M. D., & Gunning, P. T. (2014). Nanomolar-Potency Small Molecule Inhibitor of STAT5 Protein. *ACS medicinal chemistry letters*, 5(11), 1202–1206. <https://doi.org/10.1021/ml500165r>
- Datsenko, K. A., Pougach, K., Tikhonov, A., Wanner, B. L., Severinov, K., & Semenova, E. (2012). Molecular memory of prior infections activates the CRISPR/Cas adaptive bacterial immunity system. *Nature communications*, 3(1), 945.
- de Lavallade, H., Finetti, P., Carbuccioni, N., Khorashad, J. S., Charbonnier, A., Foroni, L., Apperley, J. F., Vey, N., Bertucci, F., Birnbaum, D., & Mozziconacci, M. J. (2010). A gene expression signature of primary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Leukemia research*, 34(2), 254–257. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2009.09.026>
- Deininger, M. W., Goldman, J. M., & Melo, J. V. (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 96(10), 3343–3356.

- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science (New York, N.Y.)*, 346(6213), 1258096. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Dzobo, K., Senthebane, D. A., Thomford, N. E., Rowe, A., Dandara, C., & Parker, M. I. (2018). Not Everyone Fits the Mold: Intratumor and Intertumor Heterogeneity and Innovative Cancer Drug Design and Development. *Omics : a journal of integrative biology*, 22(1), 17–34. <https://doi.org/10.1089/omi.2017.0174>
- Eiring, A. M., Kraft, I. L., Page, B. D., O'Hare, T., Gunning, P. T., & Deininger, M. W. (2014). STAT3 as a mediator of BCR-ABL1-independent resistance in chronic myeloid leukemia. *Leukemia supplements*, 3(Suppl 1), S5–S6. <https://doi.org/10.1038/leusup.2014.3>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., ... & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer*, 136(5), E359–E386.
- Fernandes, A., Shanmuganathan, N., & Branford, S. (2022). Genomic Mechanisms Influencing Outcome in Chronic Myeloid Leukemia. *Cancers*, 14(3), 620. <https://doi.org/10.3390/cancers14030620>
- Futosi, K., Németh, T., Pick, R., Vántus, T., Walzog, B., & Mócsai, A. (2012). Dasatinib inhibits proinflammatory functions of mature human neutrophils. *Blood*, 119(21), 4981–4991. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-369041>
- Gambacorti-Passerini, C. B., Gunby, R. H., Piazza, R., Galiotta, A., Rostagno, R., & Scapozza, L. (2003). Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukaemias. *The Lancet. Oncology*, 4(2), 75–85. [https://doi.org/10.1016/s1470-2045\(03\)00979-3](https://doi.org/10.1016/s1470-2045(03)00979-3)
- García-Tuñón, I., Hernández-Sánchez, M., Ordoñez, J. L., Alonso-Pérez, V., Álamo-Quijada, M., Benito, R., Guerrero, C., Hernández-Rivas, J. M., & Sánchez-Martín, M. (2017). The CRISPR/Cas9 system efficiently reverts the tumorigenic ability of BCR/ABL in vitro and in a xenograft model of chronic myeloid leukemia. *Oncotarget*, 8(16), 26027–26040. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15215>
- Goldman, J. M., & Melo, J. V. (2001). Targeting the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine*, 344(14), 1084–1086. <https://doi.org/10.1056/NEJM200104053441409>

- Grimley, P. M., Dong, F., & Rui, H. (1999). Stat5a and Stat5b: fraternal twins of signal transduction and transcriptional activation. *Cytokine & growth factor reviews*, 10(2), 131–157. [https://doi.org/10.1016/s1359-6101\(99\)00011-8](https://doi.org/10.1016/s1359-6101(99)00011-8)
- Gumus, N., Gunduz, C., & Tezcanli Kaymaz, B. (2023). STAT5 inhibitor Pimozide as a probable therapeutic option in overcoming Ponatinib resistance in K562 leukemic cells. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 41(1), 186–199. <https://doi.org/10.1080/07391102.2021.2004924>
- Gupta, R., Li, W., Yan, X. J., Barrientos, J., Kolitz, J. E., Allen, S. L., Rai, K., Chiorazzi, N., & Mongini, P. K. A. (2019). Mechanism for IL-15-Driven B Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Cycling: Roles for AKT and STAT5 in Modulating Cyclin D2 and DNA Damage Response Proteins. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 202(10), 2924–2944. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1801142>
- Haider, T., Pandey, V., Banjare, N., Gupta, P. N., & Soni, V. (2020). Drug resistance in cancer: mechanisms and tackling strategies. *Pharmacological reports : PR*, 72(5), 1125–1151. <https://doi.org/10.1007/s43440-020-00138-7>
- Hantschel, O., Nagar, B., Guettler, S., Kretzschmar, J., Dorey, K., Kuriyan, J., & Superti-Furga, G. (2003). A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl. *Cell*, 112(6), 845–857.
- Harir, N., Pecquet, C., Kerenyi, M., Sonneck, K., Kovacic, B., Nyga, R., Brevet, M., Dhennin, I., Gouilleux-Gruart, V., Beug, H., Valent, P., Lassoued, K., Moriggl, R., & Gouilleux, F. (2007). Constitutive activation of Stat5 promotes its cytoplasmic localization and association with PI3-kinase in myeloid leukemias. *Blood*, 109(4), 1678–1686. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-01-029918>
- Hoelbl, A., Schuster, C., Kovacic, B., Zhu, B., Wickre, M., Hoelzl, M. A., Fajmann, S., Grebien, F., Warsch, W., Stengl, G., Hennighausen, L., Poli, V., Beug, H., Moriggl, R., & Sexl, V. (2010). Stat5 is indispensable for the maintenance of bcr/abl-positive leukaemia. *EMBO molecular medicine*, 2(3), 98–110. <https://doi.org/10.1002/emmm.201000062>
- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1262–1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>

- Hu, J. H., Davis, K. M., & Liu, D. R. (2016). Chemical Biology Approaches to Genome Editing: Understanding, Controlling, and Delivering Programmable Nucleases. *Cell chemical biology*, 23(1), 57–73. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.12.009>
- Huang, N., Huang, Z., Gao, M., Luo, Z., Zhou, F., Liu, L., Xiao, Q., Wang, X., & Feng, W. (2018). Induction of apoptosis in imatinib sensitive and resistant chronic myeloid leukemia cells by efficient disruption of bcr-abl oncogene with zinc finger nucleases. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 37(1), 62. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0732-4>
- Ikeda, D., Chi, S., Uchiyama, S., Nakamura, H., Guo, Y. M., Yamauchi, N., ... & Minami, Y. (2022). Molecular classification and overcoming therapy resistance for acute myeloid leukemia with adverse genetic factors. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 5950.
- Jabbour, E. J., Cortes, J. E., & Kantarjian, H. M. (2013). Resistance to tyrosine kinase inhibition therapy for chronic myelogenous leukemia: a clinical perspective and emerging treatment options. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia*, 13(5), 515–529. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2013.03.018>
- Jiang, F., & Doudna, J. A. (2017). CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual review of biophysics*, 46, 505–529. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-062215-010822>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *science*, 337(6096), 816-821.
- Kaneshige, A., Bai, L., Wang, M. *et al.* A selective small-molecule STAT5 PROTAC degrader capable of achieving tumor regression in vivo. *Nat Chem Biol* **19**, 703–711 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41589-022-01248-4>
- Kantarjian, H. M., Hughes, T. P., Larson, R. A., Kim, D. W., Issaragrisil, S., le Coutre, P., ... & Hochhaus, A. (2021). Long-term outcomes with frontline nilotinib versus imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase: ENESTnd 10-year analysis. *Leukemia*, 35(2), 440-453.
- Kantarjian, H., Sawyers, C., Hochhaus, A., Guilhot, F., Schiffer, C., Gambacorti-Passerini, C., ... & Druker, B. (2002). Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *New England Journal of Medicine*, 346(9), 645-652.

- Kaymaz, B. T., Günel, N. S., Ceyhan, M., Çetintaş, V. B., Özel, B., Yandım, M. K., Kıpçak, S., Aktan, Ç., Gökbulut, A. A., Baran, Y., & Can, B. K. (2015). Revealing genome-wide mRNA and microRNA expression patterns in leukemic cells highlighted "hsa-miR-2278" as a tumor suppressor for regain of chemotherapeutic imatinib response due to targeting STAT5A. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(10), 7915–7927. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3509-9>
- Klejman, A., Schreiner, S. J., Nieborowska-Skorska, M., Slupianek, A., Wilson, M., Smithgall, T. E., & Skorski, T. (2002). The Src family kinase Hck couples BCR/ABL to STAT5 activation in myeloid leukemia cells. *The EMBO journal*, 21(21), 5766–5774. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf562>
- Kollmann, S., Grundschober, E., Maurer, B., Warsch, W., Grausenburger, R., Edlinger, L., Huuhtanen, J., Lager, S., Hennighausen, L., Valent, P., Decker, T., Strobl, B., Mueller, M., Mustjoki, S., Hoelbl-Kovacic, A., & Sexl, V. (2019). Twins with different personalities: STAT5B-but not STAT5A-has a key role in BCR/ABL-induced leukemia. *Leukemia*, 33(7), 1583–1597. <https://doi.org/10.1038/s41375-018-0369-5>
- Kosova, B., Tezcanli, B., Ekiz, H. A., Cakir, Z., Selvi, N., Dalmizrak, A., Kartal, M., Gunduz, U., & Baran, Y. (2010). Suppression of STAT5A increases chemotherapeutic sensitivity in imatinib-resistant and imatinib-sensitive K562 cells. *Leukemia & lymphoma*, 51(10), 1895–1901. <https://doi.org/10.3109/10428194.2010.507830>
- Kuepper, M. K., Bütow, M., Herrmann, O., Ziemons, J., Chatain, N., Maurer, A., Kirschner, M., Maié, T., Costa, I. G., Eschweiler, J., Koschmieder, S., Brümmendorf, T. H., Müller-Newen, G., & Schemionek, M. (2019). Stem cell persistence in CML is mediated by extrinsically activated JAK1-STAT3 signaling. *Leukemia*, 33(8), 1964–1977. <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0427-7>
- Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141(7), 1117-1134.
- Levinson, N. M., & Boxer, S. G. (2012). Structural and spectroscopic analysis of the kinase inhibitor bosutinib and an isomer of bosutinib binding to the Abl tyrosine kinase domain. *PloS one*, 7(4), e29828. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029828>
- Lombardo, L. J., Lee, F. Y., Chen, P., Norris, D., Barrish, J. C., Behnia, K., ... & Borzilleri, R. M. (2004). Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-

- piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino) thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *Journal of medicinal chemistry*, 47(27), 6658-6661..
- Luo, Z., Gao, M., Huang, N., Wang, X., Yang, Z., Yang, H., Huang, Z., & Feng, W. (2019). Efficient disruption of bcr-abl gene by CRISPR RNA-guided FokI nucleases depresses the oncogenesis of chronic myeloid leukemia cells. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 38(1), 224. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1229-5>
- Mahon, F. X., Deininger, M. W., Schultheis, B., Chabrol, J., Reiffers, J., Goldman, J. M., & Melo, J. V. (2000). Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood*, 96(3), 1070–1079.
- Mei, Y., Wang, Y., Chen, H., Sun, Z. S., & Ju, X. D. (2016). Recent Progress in CRISPR/Cas9 Technology. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao*, 43(2), 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2016.01.001>
- Minieri, V., De Dominici, M., Porazzi, P., Mariani, S. A., Spinelli, O., Rambaldi, A., Peterson, L. F., Porcu, P., Nevalainen, M. T., & Calabretta, B. (2018). Targeting STAT5 or STAT5-Regulated Pathways Suppresses Leukemogenesis of Ph⁺ Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer research*, 78(20), 5793–5807. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-0195>
- Mistry, H., Hsieh, G., Buhrlage, S. J., Huang, M., Park, E., Cuny, G. D., Galinsky, I., Stone, R. M., Gray, N. S., D'Andrea, A. D., & Parmar, K. (2013). Small-molecule inhibitors of USP1 target ID1 degradation in leukemic cells. *Molecular cancer therapeutics*, 12(12), 2651–2662. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0103-T>
- Mitchell R, Hopcroft L.E. M, Baquero P, Allan E.K, Hewit K, James D, Hamilton G,, Mukhopadhyay A, O'Prey J, Hair A, V Melo J, Chan E, Ryan K. M, Maguer-Satta V, Druker B.J, Clark R. E, Mitra, Herzyk P, Nicolini F. E, Salomoni P, Shanks E,, Calabretta B, Holyoake T.L, Helgason G. V. (2018). Targeting BCR-ABL-Independent TKI Resistance in Chronic Myeloid Leukemia by mTOR and Autophagy Inhibition. *J Natl Cancer Inst*. 110(5);467-478.
- Mojica, F. J., & Rodriguez-Valera, F. (2016). The discovery of CRISPR in archaea and bacteria. *The FEBS journal*, 283(17), 3162–3169. <https://doi.org/10.1111/febs.13766>

- Nakatani, K., Matsuo, H., Harata, Y., Higashitani, M., Koyama, A., Noura, M., Nishinaka-Arai, Y., Kamikubo, Y., & Adachi, S. (2021). Inhibition of CDK4/6 and autophagy synergistically induces apoptosis in t(8;21) acute myeloid leukemia cells. *International journal of hematology*, 113(2), 243–253. <https://doi.org/10.1007/s12185-020-03015-4>
- Nelson, E. A., Walker, S. R., Weisberg, E., Bar-Natan, M., Barrett, R., Gashin, L. B., Terrell, S., Klitgaard, J. L., Santo, L., Addorio, M. R., Ebert, B. L., Griffin, J. D., & Frank, D. A. (2011). The STAT5 inhibitor pimozone decreases survival of chronic myelogenous leukemia cells resistant to kinase inhibitors. *Blood*, 117(12), 3421–3429. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-255232>
- Nerretter, T., Köchel, C., Jesper, D., Eichelbrönnner, I., Putz, E., Einsele, H., & Seggewiss-Bernhardt, R. (2014). Dasatinib enhances migration of monocyte-derived dendritic cells by reducing phosphorylation of inhibitory immune receptors Siglec-9 and Siglec-3. *Experimental hematology*, 42(9), 773–82.e823. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2014.05.010>
- Nikolaou, M., Pavlopoulou, A., Georgakilas, A. G., & Kyrodimos, E. (2018). The challenge of drug resistance in cancer treatment: a current overview. *Clinical & experimental metastasis*, 35(4), 309–318. <https://doi.org/10.1007/s10585-018-9903-0>
- Nishimasu, H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann, S., Shehata, S. I., Dohmae, N., Ishitani, R., Zhang, F., & Nureki, O. (2014). Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 156(5), 935–949. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.001>
- O'Hare, T., Shakespeare, W. C., Zhu, X., Eide, C. A., Rivera, V. M., Wang, F., Adrian, L. T., Zhou, T., Huang, W. S., Xu, Q., Metcalf, C. A., 3rd, Tyner, J. W., Loriaux, M. M., Corbin, A. S., Wardwell, S., Ning, Y., Keats, J. A., Wang, Y., Sundaramoorthi, R., Thomas, M., ... Clackson, T. (2009). AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer cell*, 16(5), 401–412. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2009.09.028>
- Oun, R., , Moussa, Y. E., , & Wheate, N. J., (2018). The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists. *Dalton transactions (Cambridge, England : 2003)*, 47(19), 6645–6653. <https://doi.org/10.1039/c8dt00838h>

- Parker, W. T., Yeung, D. T., Yeoman, A. L., Altamura, H. K., Jamison, B. A., Field, C. R., Hodgson, J. G., Lustgarten, S., Rivera, V. M., Hughes, T. P., & Branford, S. (2016). The impact of multiple low-level BCR-ABL1 mutations on response to ponatinib. *Blood*, 127(15), 1870–1880. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-09-666214>
- Peled, A., Hardan, I., Trakhtenbrot, L., Gur, E., Magid, M., Darash-Yahana, M., Cohen, N., Grabovsky, V., Franitza, S., Kollet, O., Lider, O., Alon, R., Rechavi, G., & Lapidot, T. (2002). Immature leukemic CD34⁺CXCR4⁺ cells from CML patients have lower integrin-dependent migration and adhesion in response to the chemokine SDF-1. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 20(3), 259–266. <https://doi.org/10.1634/stemcells.20-3-259>
- Prost, S., Relouzat, F., Spentchian, M., Ouzegdouh, Y., Saliba, J., Massonnet, G., Beressi, J. P., Verhoeyen, E., Raggueneau, V., Maneglier, B., Castaigne, S., Chomienne, C., Chrétien, S., Rousselot, P., & Leboulch, P. (2015). Erosion of the chronic myeloid leukaemia stem cell pool by PPAR γ agonists. *Nature*, 525(7569), 380–383. <https://doi.org/10.1038/nature15248>
- Quintás-Cardama, A., & Cortes, J. (2009). Molecular biology of bcr-abl1–positive chronic myeloid leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 113(8), 1619-1630.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature protocols*, 8(11), 2281–2308. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- Ravandi, F., & Kebriaei, P. (2009). Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Hematology/oncology clinics of North America*, 23(5), 1043-1063.
- Redaelli, S., Piazza, R., Rostagno, R., Magistroni, V., Perini, P., Marega, M., Gambacorti-Passerini, C., & Boschelli, F. (2009). Activity of bosutinib, dasatinib, and nilotinib against 18 imatinib-resistant BCR/ABL mutants. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(3), 469–471. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.19.8853>
- Remsing Rix, L. L., Rix, U., Colinge, J., Hantschel, O., Bennett, K. L., Stranzl, T., Müller, A., Baumgartner, C., Valent, P., Augustin, M., Till, J. H., & Superti-Furga, G. (2009). Global target profile of the kinase inhibitor bosutinib in primary chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia*, 23(3), 477–485. <https://doi.org/10.1038/leu.2008.334>

- Rowley J. D. (1973). Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*, 243(5405), 290–293. <https://doi.org/10.1038/243290a0>
- Saraon, P., Pathmanathan, S., Snider, J., Lyakisheva, A., Wong, V., & Stagliar, I. (2021). Receptor tyrosine kinases and cancer: oncogenic mechanisms and therapeutic approaches. *Oncogene*, 40(24), 4079–4093. <https://doi.org/10.1038/s41388-021-01841-2>
- Schiller, J. H., Harrington, D., Belani, C. P., Langer, C., Sandler, A., Krook, J., ... & Johnson, D. H. (2002). Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non–small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*, 346(2), 92-98.
- Score, J., Calasanz, M. J., Ottman, O., Pane, F., Yeh, R. F., SobrinhoSimões, M. A., ... & Grand, F. H. (2010). Analysis of genomic breakpoints in p190 and p210 BCR–ABL indicate distinct mechanisms of formation. *Leukemia*, 24(10), 1742-1750
- Seif, F., Khoshmirsafa, M., Aazami, H., Mohsenzadegan, M., Sedighi, G., & Bahar, M. (2017). The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. *Cell communication and signaling*, 15, 1-13.
- Shaker, M. E., Ghani, A., Shiha, G. E., Ibrahim, T. M., & Mehal, W. Z. (2013). Nilotinib induces apoptosis and autophagic cell death of activated hepatic stellate cells via inhibition of histone deacetylases. *Biochimica et biophysica acta*, 1833(8), 1992–2003. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.02.033>.
- Sonoyama, J., Matsumura, I., Ezoe, S., Satoh, Y., Zhang, X., Kataoka, Y., Takai, E., Mizuki, M., Machii, T., Wakao, H., & Kanakura, Y. (2002). Functional cooperation among Ras, STAT5, and phosphatidylinositol 3-kinase is required for full oncogenic activities of BCR/ABL in K562 cells. *The Journal of biological chemistry*, 277(10), 8076–8082. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111501200>
- Surace, C., Berardinelli, F., Masotti, A., Roberti, M. C., Da Sacco, L., D’Elia, G., ... & Angioni, A. (2014). Telomere shortening and telomere position effect in mild ring 17 syndrome. *Epigenetics & chromatin*, 7, 1-9.
- Travis, J. (2004). Gleevec, chapter two: new leukemia drug aims to overcome resistance.
- Uemura, N., Salgia, R., Li, J. L., Pisick, E., Sattler, M., & Griffin, J. D. (1997). The BCR/ABL oncogene alters interaction of the adapter proteins CRKL and CRK with cellular proteins. *Leukemia*, 11(3), 376-385.

- Valletta, S., Dolatshad, H., Bartenstein, M., Yip, B. H., Bello, E., Gordon, S., Yu, Y., Shaw, J., Roy, S., Scifo, L., Schuh, A., Pellagatti, A., Fulga, T. A., Verma, A., & Boultonwood, J. (2015). ASXL1 mutation correction by CRISPR/Cas9 restores gene function in leukemia cells and increases survival in mouse xenografts. *Oncotarget*, 6(42), 44061–44071. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6392>
- Vuelta, E., Ordoñez, J. L., Alonso-Pérez, V., Méndez, L., Hernández-Carabias, P., Saldaña, R., Sevilla, J., Sebastián, E., Muntión, S., Sánchez-Guijo, F., Hernández-Rivas, J. M., García-Tuñón, I., & Sánchez-Martín, M. (2021). CRISPR-Cas9 Technology as a Tool to Target Gene Drivers in Cancer: Proof of Concept and New Opportunities to Treat Chronic Myeloid Leukemia. *The CRISPR journal*, 4(4), 519–535. <https://doi.org/10.1089/crispr.2021.0009>
- Vukovic, M., Guitart, A. V., Sepulveda, C., Villacreces, A., O'Duibhir, E., Panagopoulou, T. I., Ivens, A., Menendez-Gonzalez, J., Iglesias, J. M., Allen, L., Glykofrydis, F., Subramani, C., Armesilla-Diaz, A., Post, A. E., Schaak, K., Gezer, D., So, C. W., Holyoake, T. L., Wood, A., O'Carroll, D., ... Kranc, K. R. (2015). Hif-1 α and Hif-2 α synergize to suppress AML development but are dispensable for disease maintenance. *The Journal of experimental medicine*, 212(13), 2223–2234. <https://doi.org/10.1084/jem.20150452>
- Wang, X., Huang, X., Fang, X., Zhang, Y., & Wang, W. (2016). CRISPR-Cas9 System as a Versatile Tool for Genome Engineering in Human Cells. *Molecular therapy. Nucleic acids*, 5(11), e388. <https://doi.org/10.1038/mtna.2016.95>
- Warsch, W., Kollmann, K., Eckelhart, E., Fajmann, S., Cerny-Reiterer, S., Hölbl, A., Gleixner, K. V., Dworzak, M., Mayerhofer, M., Hoermann, G., Herrmann, H., Sillaber, C., Egger, G., Valent, P., Moriggl, R., & Sexl, V. (2011). High STAT5 levels mediate imatinib resistance and indicate disease progression in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 117(12), 3409–3420. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-10-248211>
- Weisberg, E., Manley, P. W., Cowan-Jacob, S. W., Hochhaus, A., & Griffin, J. D. (2007). Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nature reviews. Cancer*, 7(5), 345–356. <https://doi.org/10.1038/nrc2126>

- Westra, E. R., Semenova, E., Datsenko, K. A., Jackson, R. N., Wiedenheft, B., Severinov, K., & Brouns, S. J. (2013). Type IE CRISPR-cas systems discriminate target from non-target DNA through base pairing-independent PAM recognition. *PLoS genetics*, 9(9), e1003742.
- Xie, H., Peng, C., Huang, J., Li, B. E., Kim, W., Smith, E. C., ... & Orkin, S. H. (2016). Chronic myelogenous leukemia-initiating cells require Polycomb group protein EZH2. *Cancer discovery*, 6(11), 1237-1247.
- Yang, K., & Fu, L. W. (2015). Mechanisms of resistance to BCR–ABL TKIs and the therapeutic strategies: A review. *Critical reviews in oncology/hematology*, 93(3), 277-292.
- Yin, L., Xu, J., Wu, W., Niu, M., Li, Z., Zhu, F., & Xu, K. (2023). Dual inhibition of STAT3 and STAT5 may overcome imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*, 28(1), 2224625. <https://doi.org/10.1080/16078454.2023.2224625>
- Yoshida, C., & Melo, J. V. (2004). Biology of chronic myeloid leukemia and possible therapeutic approaches to imatinib-resistant disease. *International journal of hematology*, 79, 420-433.
- Yu, X., Liang, X., Xie, H., Kumar, S., Ravinder, N., Potter, J., de Mollerat du Jeu, X., & Chesnut, J. D. (2016). Improved delivery of Cas9 protein/gRNA complexes using lipofectamine CRISPRMAX. *Biotechnology letters*, 38(6), 919–929. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2064-9>
- Zeng, J., Liang, X., Duan, L., Tan, F., Chen, L., Qu, J., Li, J., Li, K., Luo, D., & Hu, Z. (2024). Targeted disruption of the *BCR-ABL* fusion gene by Cas9/dual-sgRNA inhibits proliferation and induces apoptosis in chronic myeloid leukemia cells. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 56(4), 525–537. <https://doi.org/10.3724/abbs.2023280>
- Zheng, J. (2013). Oncogenic chromosomal translocations and human cancer. *Oncology reports*, 30(5), 2011-2019.
- Zhou, T., Commodore, L., Huang, W. S., Wang, Y., Thomas, M., Keats, J., Xu, Q., Rivera, V. M., Shakespeare, W. C., Clackson, T., Dalgarno, D. C., & Zhu, X. (2011). Structural mechanism of the Pan-BCR-ABL inhibitor ponatinib (AP24534): lessons for overcoming kinase inhibitor resistance. *Chemical biology & drug design*, 77(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2010.01054.x>



Ekler

Tez çalışmamızda K562 hücre hattı ile dirençli K562 hücreleride in vitro koşullarından çalışıldından dolayı “Etik Kurul Onay Belgesi, Gönüllü Onam Formu, Olgu Rapor Formu” gereksinim duyulmamıştır.



Teşekkür

Yüksek lisans eğitimim boyunca verdiği bilgi ve tecrübesi sayesinde akademik kariyerime önemli bir adım atmamı sağlayan ve her zaman beni motive ederek tez çalışmamda yol gösteren, inan, ve desteklerini esirgemeyen, daha iyi akademisyen olmayı öğreten değerli tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Burçin KAYMAZ'a

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleri ile desteklerini esirgemeyen anabilim dalımızın değerli hocaları Sn.Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ'e, Sn. Prof. Dr. Çığır BİRAY AVCI'ya, Sn. Doç. Dr. Buket KOSOVA'ya, Sn. Doç. Dr. Zuhale EROĞLU'na, Sn. Doç. Dr. Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ'a, Sn. Doç. Dr. Aslı TETİK VARDARLI'a, sn. Doç. Dr. Sunde YILMAZ SÜSÜLÜER'e Sn. Yrd. Doç. Dr. Nur SELVİ GÜNEL'e

Laboratuvarında çalışmaktan mutluluk duydum ekip arkadaşım Dok. Öğr. İlayda ALÇİTEPE'ye

Her zaman yanımda olan desteklerini esirgemeyen, beni her zaman motive eden, çalışmaktan büyük keyif aldığım, her koşulda yanımda olan değerli arkadaşım Dok. Öğr. Ayshan AHADOVA'ya

Eğitim hayatımın ilk gününden beri bana destek olan ve karşılaştığım sorunlara çözüm bulan, verdiğim kararlarda ve terciherde her koşulda yanımda olan, hem kişisel hayatımda hem de akademik hayatımda büyük rol oynayan değerli annem Zeynep ÇELİK'e, babam Abdurrahman ÇELİK'e ve sevgili ablalarım Halat ÇELİK'e, Şindar ÇELİK'e, değerli kardeşlerim Şükran ÇELİK'e, Şehmus ÇELİK'e, Hüseyin Zınar ÇELİK'e

Sonsuz teşekkürler...

Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu ve EÜTF Bilimsel Araştırma Projeleri Altkomisyonu'na projemize verdikleri destekler için içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, bu çalışmanın gerçekleştirilmesi için gerekli maddi desteği sağlayan TS-GAP-2022-75591 numaralı BAP projesi aracılığıyla katkıda bulunan Ege Üniversitesi Rektörlüğü'ne de teşekkür ederim.

TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programı Başkanlığına (BİDEB) 2211-Yurt İçi Lisansüstü Burs Desteği ile 2210-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında verdiğiniz değerli destekler için en içten teşekkürlerimi sunarım.

İzmir, 21.08.2024

Besne ÇELİK



Özgeçmiş

İlköğretimimi Bahçelievler İlköğretim okulunda Adana’da tamamladım. Ortaokulumu İzmir’de Atatürk Ortaokulunda devam ettim. Gürçeşme Anadolu Lisesinden eğitimimi tamamladıktan sonra, Afyon Kocatepe Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik lisans programına başladım. Lisans eğitimim boyunca çeşitli kurum ve kuruluşlarda stajyer olarak yer aldım. Yüksek Lisans eğitimime Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında başladım. Burada öğrendiğim akademik bilgi ve birikim sayesinde sözlü bildiri ve poster bildiri yapma imkanım oldu.

e- posta:

