

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DASATİNİB İLE MUAMELE EDİLEN K562 HÜCRE SERİSİNDE,
DASATİNİBİN, PP2A KATALİTİK VE REGULATUVAR ALT
BİRİMLERİNDE, ENZİM AKTİVİTESİNE VE PROTEİN EKSPRESYONU
ÜZERİNE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

Yüksek Lisans Öğrencisi

Buket ÖZEL

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Nur SELVİ GÜNEL

İZMİR

2015

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DASATİNİB İLE MUAMELE EDİLEN K562 HÜCRE SERİSİNDE,
DASATİNİBİN, PP2A KATALİTİK VE REGULATUVAR ALT
BİRİMLERİNDE, ENZİM AKTİVİTESİNE VE PROTEİN EKSPRESYONU
ÜZERİNE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

Yüksek Lisans Öğrencisi

Buket ÖZEL

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Nur SELVİ GÜNEL

İZMİR

2015

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Yrd. Doç. Dr. Nur SELVİ GÜNEL



(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Cumhur GÜNDÜZ



Üye : Yrd. Doç. Dr. Gülçin ITIRLI ASLAN.



Yüksek Lisans Tezinin Kabul Edildiği Tarih:02.12.2015.....

ÖNSÖZ

Yüksek lisansım boyunca, karşılaştığım her sorunda yanımda olan, tez süresince sabırla yardımını esirgemeyen değerli hocam ve tez danışmanım **Yrd. Doç. Dr. Nur SELVİ GÜNEL'e,**

Bilgi ve deneyimleri ile bana sabırla yardım edip yol gösteren yol gösteren Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın **Prof. Dr. Cumhur GÜNDÜZ'e** ve öğretim üyeleri **Doç. Dr. Zuhal EROĞLU, Doç.Dr. Buket KOSOVA CAN ve Doç. Dr. Çığır BİRAY AVCI'ya,**

Tez konusunun ve ilacın belirlenmesinde, yardımlarını esirgemeyen **Prof. Dr. Güray SAYDAM'a,**

Deneyimleri ile bana yardımcı olan **Arş. Gör. Dr. Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ, Arş. Gör. Dr. Burçin TEZCANLI, Arş. Gör. Dr. Aslı TETİK VARDARLI, Arş. Gör. Dr. Sunde YILMAZ SÜSLÜER, Arş. Gör. Dr. Duygu AYGÜNEŞ, Dr. Çağdaş AKTAN ve Dr. Ayşegül DALMIZRAK'a,**

Yüksek lisans eğitimim boyunca karşılaştığım her türlü sıkıntıda yanımda olan, pozitif enerjisiyle bana destek veren sevgili ekip arkadaşım **Sezgi KIPÇAK'a**

Tezimin düzenlenmesinde özveriyle yardımını esirgemeyen değerli ekip arkadaşım **Metin ÇALIŞKAN'a**

Tezimin her aşamasında yardımları ve görüşleriyle bana destek veren sevgili arkadaşlarım **Çağla KAYABAŞI, Zeynep MUTLU, Cansu ÇALIŞKAN, Besra ÖZMEN YELKEN, Bakiye GÖKER, Tuğçe BALCI, Özgün ÖZALP, Zekeriya DÜZGÜN ve Ceren ERDEM'e**

Laboratuvarda bize yardımcı olan teknikerimiz **Sn. Hale GÜNDÜZ'e**

Tezimin protein tayini ile ilgili deneylerinde yardımını esirgemeyen **Sn. Aylin AKIN ÜNSAL'a**

Tez süresince gerekli sekreteryaya işlerinde yardım eden sekreterlerimiz **Murat TUNÇER ve Yasemin UĞUR'a,**

Her koşulda yanımda olan, beni destekleyen ve cesaretlendiren canım babam **Osman ÖZEL**, canım annem **Hatice ÖZEL** ve kardeşi olduğum için şanslı hissettiğim canım ağabeyim **Şevket ÖZEL**'e

Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu ve EÜTF Bilimsel Araştırma Projeleri Altkomisyonu'na projemize verdikleri destekten dolayı teşekkür ederiz.

Son olarak bu çalışmanın gerçekleşmesi için gerekli maddi desteği 2014-TIP-020 nolu BAP projesi aracılığıyla sağlayan Ege Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkür ederim.

İzmir, 09.11.2015

Buket ÖZEL

ÖZET

Dasatinib ile muamele edilen K562 hücre serisinde, Dasatinib'in, PP2A katalitik ve reglatuvar alt birimlerinde, enzim aktivitesine ve protein ekspresyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi

Kronik miyeloid lösemi (KML), kemik iliğinde beyaz kan hücrelerinde başlayan bir kanser tipi olup, hastaların neredeyse tamamında saptanan BCR/ABL translokasyonuna bağlı artmış tirozin kinaz aktivitesiyle karakterizedir. Translokasyon sonucu yeni kimerik gen oluşumuna bağlı aktivasyona neden olduğu bilinen ilk yeniden düzenlenme Philadelphia (Ph) kromozomudur. 9 ve 22 numaralı kromozomlar arasındaki translokasyon sonrasında meydana gelir. 9q34 bölgesine yerleşmiş olan ABL1 geninin 5' kısmına yakın bir bölgeden kırılması sonrasında 3' tarafında kalan parçanın, 22q11 BCR geninin 3' kısmına yakın bir bölgeden kırılması ve kırılan bu bölgeye füzyonu sonrasında ortaya çıkar. Füzyon sonrasında ortaya çıkan yeni kimerik gen, artmış tirozin kinaz aktivitesine ve anormal hücre lokalizasyonuna sahip bir ABL1 proteininin üretilmesine neden olur. Bu yeniden düzenlemeyle oluşan BCR-ABL1 kinaz aktivitesini inhibe etmek için hastalar Tirozin Kinaz İnhibitörleri (TKI) ile tedavi edilmektedir.

Bu amaçla, Dasatinib BCR-ABL1'i inhibe etmek için uygulanan ikinci-nesil bir tirozin kinaz inhibitörüdür. KML'de İmatinib dirençli ya da tolere olmayan hastaların tedavisinde kullanılan güvenli ve etkili bir inhibitördür. Dasatinib, lösemide hücrelerin büyüme ve bölünmesiyle ilgili sinyalleri inhibe eder ve sonuç olarak sinyallerin bloklanması hücrenin ölümüyle sonuçlanır. Dasatinib, birinci-nesil TKI olan imatinibden 325 kat daha etkili olsa da KML hastalarının %20'si genel olarak ilaç tedavisine yanıt vermemektedir. Bu durum, tedavide etkin olabilecek alternatif ilaçların gündeme gelmesini ve olası direnç mekanizmalarının aydınlatılmasını gerektirmektedir. BCR-ABL1-indüklü KML'de genomik ya da fonksiyonel değişime uğramış birçok hücresel olayda fonksiyon gören protein fosfotaz 2A (PP2A) gibi yapıların incelenmesi bu sorulara yanıtlardan biri olabilir. Protein fosfotazlar, hücrede fosforilasyon-defosforilasyon dengesinin sağlanması açısından son derece önemlidir.

Yapılan alışmalarda KML'de (PP2A) aktivitesinin değiştiği saptanmıştır. PP2A, hüresel homeostazı sağlayan en önemli serin-treonin fosfotazdır. PP2A, 65kDa yapısal A alt birim ve 36 kDa katalitik C altbirim ve düzenleyici B alt birimden oluşur. Yapılan birçok çalışma sonucu, hematolojik malignansilerde PP2A ekspresyonunun ve/veya fonksiyonunun inhibe olduğu ortaya koyulmuştur.

Bu çalışmada amacımız, dasatinib ile muamele edilen K562 kronik myleoid lösemi hücre serisinde, PP2A enzim aktivitesi ve alt birimlerinin protein düzeyinde ekspresyon değişimini saptamaktır. Bu amaç ile dasatinibin KML'ye model oluşturan K562 hücre serisindeki sitotoksik etkisi WST-1 testi ile, apoptotik etkisi Annexin V ve Apo Direct Tunnel metodu ve sitostatik etkisi ise Hücre Döngüsü Analizi ile değerlendirilmiştir. PP2A'nın apoptoz ve hücresel sağkalım üzerindeki etkisini belirlemek için PP2A inhibitörü olan Okadaik asit (OA) ile çalışılmıştır. Dasatinib ile muamele edilen K562 hücre serisindeki değişen PP2A'nın enzim aktivitesi serin/treonin fosfataz analiz kiti, PP2A'nın alt birimlerindeki protein ifade düzeyleri ise Western Blot analizi ile değerlendirilmiştir.

Dasatinibin, K562 hücre serisindeki sitotoksik etki 4,6 Nm olarak belirlenmiştir. OA'nın PP2A'yı baskılanmasından dolayı apoptozda artış belirlenmiştir. İnhibitörler nedeniyle baskılanan PP2A'dan dolayı hücre döngüsü tutuklanmasında da değişiklikler kaydedilmiştir. Dasatinib ile muamele edilen hücrelerin PP2A enzim aktivitesi 72.saatte kontrole kıyasla azalmıştır. Western Blot analizi ile dasatinibin PP2A C alt birimin protein seviyesinin kontrole kıyasla azaldığı bulunmuştur.

Sonuç olarak, dasatinibin hücre homeostazında rol oynayan PP2A'nın enzim seviyesini ve protein seviyesinde değişime neden olduğu belirlenmiştir. Böylece PP2A inhibitörlerinin KML tedavisinde terapötik hedef olarak katkı sağlayabileceğini dşnmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: KML; PP2A; Dasatinib

ABSTRACT

The evaluation of the effects of Dasatinib on protein expression and the enzymatic activity of PP2A catalytic and regulatory subunits that are Dasatinib-treated K652 cell line.

Chronic myeloid leukemia (CML), a group of cancer that usually begins in white blood cells and observed in almost all patients belonging this group, is characterized by the increased tyrosine kinase activity depends on BCR/ABL translocation. Resulting in translocation, that is known to cause activation depending on new chimeric gene formation is anew rearrangement Philadelphia (Ph) chromosome. This anew rearrangement occurs after translocation which is between chromosome 9 and 22.

This chromosome has small acrocentric structure that is observed in 90% of chronic myeloid leukemia (CML) patients. It occurs after breaking from nearby the 5' region of the ABL1 gene in 9q34 region, by the break of the remaining part on the side 3' from nearby 3' region of 22q11 BCR gene and their fusion into this region. New chimeric gene, emerged after fusion, causes increased tyrosine kinase activity and production of ABL1 protein having abnormal cell localization. The patients have being generally treated using tyrosine kinase inhibitors (TKIs) to inhibit this BCR-ABL1 kinase activity, occurred by rearrangement. For this purpose, dasatinib is the second-generation tyrosine kinase inhibitor that is used for inhibition of Bcr-Abl1. In CML, it has been using to treat patients with Imatinib-resistant or intolerant CML-AP and it is so effective and safety. Dasatinib shows its effect in leukemia by inhibiting signals related to cell growth and splitting and eventually cell die as a result of blocking signals. Although dasatinib is 325 fold more effective than that of imatinib that is first-generation tyrosine kinase inhibitor, 20% of CML patients generally don't respond to treatment with certain drugs. Therefore, alternative drugs should be used and the resistant mechanism should be enlightened.

This problem may occur in CML that was induced by BCR-ABL1. This case, in BCR-ABL1-induced KML, one of responses to these questions can

be provided by the investigations of structures such as protein phosphatase 2A (PP2A) changed genetically or functionally that functions as tumor suppressor in some cancers *patients with imatinib-resistant* or -intolerant CML-AP

Protein phosphatases have major role in maintenance phosphorylation-dephosphorylation balance in cell. Studies related to KML have shown that the activity of PP2A is changed. PP2A is the most important serine/threonine phosphatase ensuring cellular homeostasis. PP2A consist of 65 kDa A, 36 kDa C subunit and regulatory B subunit. Most studies have shown that PP2A expression/or function in hematological malignancies is inhibited.

In our study, we aimed to evaluate PP2A enzyme activity in dasatinib treated K562 chronic myleoid leukemia cell line and the expression changes in protein levels. The cytotoxic effects of dasatinib on K562 cell line, were evaluated by WST-1 analysis. Apoptotic situation was determined by using Annexin V and Apo Direct Tunnel assays and cycletest plus DNA Reagent Kit was used to determine cytoctatic effcets of PP2A. We also used okadaic acidas PP2A inhibitor to assesed major role of PP2A in apoptosis. To analyse the changes of PP2A enyzme and protein levels we used serine/theroninephosphatase assay and western blot analysis, respectively.

For this aim, the effect of dasatinib on KML and the cytotoxic effect of dasatinib on K562 cell line, forming the model, were evaluated by WST-1 test, apoptotic effect by Annexin V and Apo Direct Tunnel method, and stochastic effect by cell cycle analysis. Okadaic acid, an inhibitor of PP2A, was studied to be able to determine the effect of PP2A on apoptosis and cellular survival. Enzyme activity of the PP2A, changing in K562 cell line, treated by dasatinib and protein levels in subunits of the PP2A were evaluated using serine/threonine phosphatase analysis kit and Western Blot analysis, respectively.

The cytotoxic effect of dasatinib in K562 cell line was found to be 4,6 nM at 48th hour. The increase in apoptosis owing to the repression of PP2A by OA was detected. The changes in cell cycle-arresting owing to the repressed PP2A by inhibitors were also detected. The PP2A enzyme activity

of cells, treated by dasatinib, increased compared to that of the control, depending on the time. It was found that protein level belonging to the PP2A C catalytic subunit of dasatinib decreased compared to that of the control.

Consequently, treatment with okadaic acid revealed the increase in apoptosis and cell cycle-arresting at G2/M transition owing to the PP2A suppressing. Phosphatase activity of PP2A decreased at 72nd hours. When treated with dasatinib. Protein level of catalytic subunit of PP2A slightly decreased. It is also found that the PP2A having a role in cell homeostasis of dasatinibin gave rise to the change in enzyme and protein levels. Thus, we could say that targeting PP2A inhibitors may be promoting therapeutic aim to treat CML.



İÇİNDEKİLER

BÖLÜM I	1
1.1 GİRİŞ	1
1.2 GENEL BİLGİLER	2
1.2.1 Kanser	2
1.2.1.1 Lösemi	3
1.2.1.1.1 Akut Lenfoid Lösemi (ALL)	4
1.2.1.1.2. Akut Miyeloid Lösemi (AML)	5
1.2.1.1.3. Kronik Lenfositik Lösemi (KLL)	5
1.2.1.1.4 Kronik Miyeloid Lösemi (KML)	6
1.2.1.1.4.1 KML'nin Aşamaları	7
1.2.1.1.4.1.1 Kronik Faz	7
1.2.1.1.4.1.2 Akselere Faz	7
1.2.1.1.4.1.3 Blast Faz	8
1.2.1.1.4.2 KML'nin Moleküler Biyolojisi	8
1.2.1.1.4.2.1 ABL Geni	8
1.2.1.1.4.2.2 BCR Geni (Breakpoint Cluster Region)	9
1.2.1.1.4.2.3 BCR-ABL Füzyon Geni	9
1.2.1.1.4.3 KML Tedavisi	11
1.2.1.1.4.3.1 Hematopoetik Kök Hücre Nakli	11
1.2.1.1.4.3.2 Tirozin Kinaz İnhibitörleri	11
1.2.1.1.4.3.2.1 Dasatinib	13
1.2.1.1.4.3.2.1.1 Dasatinib Yan Etkileri	14
1.2.2 SERİN-TREONİN FOSFOTAZLAR	15
1.2.2.1 Protein Serin/Treonin Fosfotazlar	15
1.2.2.1.1 Protein Fosfataz 2A (PP2A)	17
1.2.2.1.1.1 PP2A Yapısı	17

1.2.2.1.1.1.1 PP2A Alt birimleri ve Kompozisyonu	18
1.2.2.1.1.2 PP2A Regölasyonu	20
1.2.2.1.1.3 PP2A'nın Biyolojik Rolü	21
1.2.2.1.1.3.1 Hücre Döngüsünde PP2A'nın Rolü	21
1.2.2.1.1.3.2 PP2A'nın Sinyal iletimindeki Rolü	22
1.2.2.1.1.3.3 Apoptozda PP2A'nın Rolü.....	24
1.2.2.1.1.4 PP2A İnhibitörleri	25
1.2.2.1.1.4.1 Okadaik Asit.....	25
1.2.2.1.1.4.2 Calyculin A	26
1.2.3Hücre Ölüm Mekanizmaları.....	27
1.2.3.1 Apoptoz	28
1.2.3.1.1 Apoptoz Mekanizmaları	29
1.2.3.1.1.1 Apoptozun Ekstrinsik Yolağı.....	29
1.2.3.1.1.2 Apoptozun İnstrinrik Yolağı	29
1.2.3.2 Nekrozis.....	31
1.2.3.3 Nekroptosis.....	31
1.2.3.4 Otofaji	32
1.2.4 Hücre Döngüsü	32
1.2.4.1 Hücre Döngüsü Kontrolü	33
1.2.4.1.1 Hücre Döngüsünde G1-S Geçişİ	34
1.2.4.1.2 Hücre Döngüsünde G2-M Geçişİ.....	34
1.2.4.2 Hücre Döngüsü ve Kanser	35
BÖLÜM II.....	36
2.1 Gereç ve Yöntem	36
2.1.1 Hücre Kültürü	36
2.1.2 Hücrelerin Dondurulması ve Çözdürülmesi.....	37
2.1.3 Hücrelerin Pasajlanması	38

2.1.4 Hücre Canlılık Testi.....	38
2.1.5 Sitotoksisite Analizi	38
2.1.6 Apoptoz Analizleri	39
2.1.6.1 Annexin V Yöntemi	39
2.1.6.2 DNA Fragmentasyon (Tunnel) Yöntemi	40
2.1.7 Hücre Döngüsü Analizi	42
2.1.8 Serin/Treonin Fosforaz Analizi	43
2.1.9 Protein İzolasyonu	45
2.1.10 Protein Tayini	46
2.1.10.1 Lowry Metodu	46
2.1.11 Western Blot Analizi	46
BÖLÜM III.....	49
3.1 BULGULAR.....	49
3.1.1 Dasatinibin K562 Hücre Serisi Üzerine Sitotoksik Etkisinin WST-1 Testi ile Değerlendirilmesi	49
3.1.2 Dasatinibin ve Okadaik Asit'in K562 Hücre Serisi Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Değerlendirilmesi	49
3.1.2.1 Annexin V Metodu ile Dasatinib ve Okadaik asit'in K562 Hücre Serisi Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Değerlendirilmesi	50
3.1.2.2 Apo Direct Tunnel Yöntemi ile Dasatinib ve Okadaik asit'in K562 Hücre Serisi Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Değerlendirilmesi....	51
3.1.3 PP2A'nın Hücre Döngüsü Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	53
3.1.4 Dasatinibin PP2A Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	55
3.1.5 Dasatinibin PP2A Alt Birim Protein Seviyelerindeki Değişiminin İncelenmesi.....	56
BÖLÜM IV	58
4.1 TARTIŞMA	58

5.1 SONUÇ VE ÖNERİLER	64
BÖLÜM VI	66
6.1 KAYNAKLAR.....	66
ÖZGEÇMİŞ	79



Şekiller Listesi

Şekil 1	: Hematopoetik süreç	4
Şekil 2	: 9. ve 22. Kromozomlar arasındaki parça değişimi ile sonuçlanan yeniden düzenleme	6
Şekil 3	: ABL ve BCR genlerindeki kırılma noktalarının lokasyonu ve çeşitli kırılmalardan türevlenen kimerik BCR/ABL'nin yapısı	10
Şekil 4	: Reseptör ve reseptör olmayan tirozin kinaz	12
Şekil 5	: Dasatinibin iki boyutlu yapısı	14
Şekil 6	: Protein serin/treonin fosfatazların üç ailesi	16
Şekil 7	: PP2A yapısı	17
Şekil 8	: PP2A'nın siklin B-cdc2 üzerinden negatif kontrol mekanizması	21
Şekil 9	: PP2A'nın ERK-MAPK yolağı düzenlemesi	23
Şekil 10	: PP2A'nın apoptotik sinyal iletim yollarındaki düzenleyici rolü	24
Şekil 11	: Okadaik asit yapısı	26
Şekil 12	: Calyculin A yapısı	27
Şekil 13	: PP2A alt birimlerinin protein seviyesindeki değişimi	57

Tablolar Listesi

Tablo 1	: PP2A alt birim, gen ve izoformları	20
Tablo 2	: Hücre kültüründe kullanılan kimyasallar ve malzemeler	36
Tablo 3	: Annexin V kit içeriği	40
Tablo 4	: Apo Direct Tunel kit içeriği	41
Tablo 5	: BD Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit içeriği	42
Tablo 6	: Serin/treonin fosfataz analizi için Promega Kit içeriği	44
Tablo 7	: Protease Inhibitor Cocktail Tablets in EASYpacks (Roche) kit içeriği	45
Tablo 8	: Western Breeze Kit bileşenleri	47

Grafikler Listesi

Grafik 1	: K562 hücrelerinde dasatinibin sitotoksitesi	49
Grafik 2	: K562 hücre serisi üzerine dasatinib, okadaik asit ve kombinasyonlarının apoptotik değişime etkisi (Annexin V)	51
Grafik 3	: K562 hücre serisi üzerine dasatinib, okadaik asit ve kombinasyonlarının apoptotik değişime etkisi (Apo Direct Tunnel)	53
Grafik 4	: Dasatinib, okadaik asit ve kombinasyonlarının hücre döngüsündeki durdurucu etkisi	55
Grafik 5	: PP2A'nın enzim aktivitesi değişimi	56



Kısaltmalar Listesi

°C : Santigrat

μ : Mikro

ATP: Adenozintrifosfat

ALL:Akut lenfoblastik lösemi

AML:Akut myeloblastik lösemi

Bad: BCL2-ilışkiliölüm promotörü

Bax: Bcl-2 ilişkili X proteini

BCL-2: Lenfoma B hücresi - 2

BCR: Breakpoint cluster region

Cal A: Calyculin A

CD:Siklin Bağımlı

Cdk:Siklin bağımlı kinaz

DMSO:Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik asit

Erk: Sinyalle regüle olan ekstraselüler kinaz

FBS: Fötal sığır serumu

FITC: Fluorescein isothiocyante

IC50: İnhibitör konsantrasyon oranı

K562: İnsan kronik miyeloid lösemi hücre dizisi

KLL: Kronik Lenfositik Lösemi

KML: Kronik Myeloid Lösemi

L: Litre

M: Molar

mRNA: mesajcı Ribon kleikasit

OA: Okadaik asit

Ph: Philadelphia kromozomu

PI: Propidium iyodür

PP2A: Protein fosfataz 2A

RNA: Ribonükleik asit

rpm: Dakikadaki devir sayısı

s: saniye

WST-1:Hücre proliferasyonu ve canlılık ajanı

RPMI 1640: Hücre kültürü besiyeri

TKI: Tirozin kinaz inhibitörü

BÖLÜM I

1.1 GİRİŞ

Kronik miyeloid lösemi (KML), popülasyonda 100.000'de bir insanı etkileyen ve gelişmiş ülkelerde lösemilerin %15'ini oluşturan bir hastalıktır. Kronik miyeloid lösemi 9. ve 22. kromozomlar arasında resiprokal translokasyonla karakterize edilen klonal hematopoetik kök hücre hastalığıdır. Anormal 22. kromozom ilk olarak ABD'de Philadelphia'da gözlenmiştir. Bu nedenle genel terminoloji Philadelphia (Ph) kromozomudur. 9 ile 22. kromozomlar arasındaki translokasyon, 9.kromozom üzerindeki Abl1 geni (bölge q34) ile 22.kromozom üzerindeki BCR (breakpoint cluster region) (bölge q11) arasındaki parça değişimi ile bcr-abl füzyon geniyle sonuçlanır. Bu füzyon gen BCR-ABL1 mRNA ya transkribe edilir ve Bcr-Abl1 proteinine dönüşür. Bcr-Abl1, onkoproteini bir tirozin kinazdır ve KML'de hücre proliferasyonu ve sağkalımıyla ilgili sinyalleri aktive eder.

İmatinib gibi tirozin kinaz inhibitörleri KML'de önemli başarı sağlasa da aktif kinaz bölgesinde oluşan mutasyon ya da ilaç direnciyle sonuçlanan kromozomal/moleküler anomaliler hastanın tedavi durumunu değiştirmiştir ve yeni stratejilerin gerekliliğini ortaya koymuştur. Dasatinib, imatinib direçli hastalara alternatif olarak kullanılmaktadır. Dasatinib, BCR-ABL proteinini hedefleyen ikinci-nesil tirozin kinaz inhibitörüdür. Dasatinib, T315I mutasyonu hariç imatinib direnci olan BCR-ABL mutant hücre hatlarında ve yabani tipin kinaz aktivitesini ve proliferasyonunu inhibe etmektedir (38). Hücrede kinaz aktivitesinin tersine fonksiyon gören, sinyal iletiminde önemli rolü olan PP2A'nın tedaviye yönelik bir strateji olarak değerlendirilmesi son derece anlamlıdır.

Protein serin/treonin fosfotaz 2A en önemli hücresel serin-treonin fosfotazdır ve protein kinazlar tarafından başlatılan sinyal yollarının negatif regülasyonu ile hücre homeostazının regülasyonu ile ilgilidir. Proliferasyon, sağkalım, hücre döngüsü ve apoptoz regülatörü olarak birçok önemli hücresel olayla ilişkilidir. PP2A, 65kDa yapısal A alt birim ve 36 kDa katalitik C altbirimden oluşur. Bu A ve C alt birimleri sıklıkla regülatör B alt birimiyle

ilişkilidir. PP2A kompleks bir yapıya sahiptir. Hücrelerde tersinir fosforilasyon-defosforilasyon dengesi hücre için son derece önemlidir. Tümör süpresör rolüyle tutarlı olarak, PP2A, AKT defosforilasyonu PI3K/AKT yolağının negatif kontrolü üzerinden pro-apoptotik aktiviteye sahiptir. Böylece anti-apoptotik Bcl-2'yi inaktive ederken BAD ve BIM gibi pro-apoptotik faktörleri aktive eder. PP2A-bağımlı AKT inaktivasyonu ve BAD defosforilasyonu, PP2A'nın aktivasyonu ve mitokondriyal membrana bağlanıp Bcl-2'yi inhibe etmesiyle sonuçlanır. Üstelik, endoplazmik retikulum stresi süresinde apoptozu indükler. Ayrıca, Bcl-2'nin Ser70'ini defosforile ederek Bcl-2-p53 etkileşimini artırır ve Bcl-2'nin anti-apoptotik fonksiyonunu inhibe eder. Birçok hematolojik malignanside baskılanmış olan PP2A'nın, Bcr-Abl yeniden düzenlemesine neden olan KML'de de baskılandığı ortaya konmuştur.

Çalışmamızda, dasatinibin K562 hücre serisi üzerindeki sitotoksik etkisi ve PP2A inhibitörü okadaik asitin apoptotik ve hücre döngüsü arestine etkileri incelenecektir. KML'de değişime uğramış PP2A'nın dasatinib ile muamelesi sonucu enzim aktivesi ve protein ekspresyonu üzerindeki değişimi incelenecektir.

1.2 GENEL BİLGİLER

1.2.1 Kanser

Kanser, vücudun bir bölümünde kontrolsüz hücre büyümesiyle başlar. Kanseri hücreleri normal hücre büyümesinden farklı olup, anormal hücreleri oluşturmaktadırlar. Kanseri hücreleri diğer dokulara yayılabilirler. Kontrolsüz olarak büyüme ve diğer dokulara yayılma yeteneği bir hücreyi kanser hücresi yapan özelliklerdir. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl bir milyondan fazla kişi kansere yakalanmaktadır(1). 2012'de dünyada 14.1 milyon yeni kanser vakasının olduğu tahmin edilmektedir. Bunların 7.4 milyonu (%53) erkek, 6.7 milyonu (%47) kadınlarda rastlanmaktadır (2). 2014'te Amerika Birleşik Devletleri'nde 1.665.540 yeni kanser vakasının olduğu tahmin edilmiştir ve ölüm nedenlerinin en sık ikinci nedeni olarak gösterilmektedir.

Kanser tek bir hücreden ortaya çıkmaktadır. Normal hücreden transformasyonla çok basamaklı bir süreçle tümör hücresine dönüşür. Bu

değişim kişinin genetik faktörleri ve fiziksel, biyolojik ve kimyasal etkileşiminin sonucudur (3).

Kanser Hücrelerinin Özellikleri;

- Normal hücrelerin aksine, kanser hücreleri sürekli büyüyüp kontrolsüzce bölünürler. Bunun sonucunda, orjinal kanser hücrelerinin milyarlarca kopyasıyla tümör oluşturmaktadırlar.
- Diğer hücrelerden gelen sinyalleri görmezden gelirler. Normal hücreler kimyasal sinyallere uyarken kanser hücreleri bu sinyalleri hükümsüz kılar.
- Birbirlerine tutunmazlar. Kanser hücreleri hücre yüzey reseptörlerini kaybedebilirler ve bağımsız hale gelebilirler.
- Kanser hücreleri özelleşmezler. Sağlıklı hücrelerin aksine kanser hücreleri olgunlaşmaya devam etmezler ve özelleşmezler.
- Kendilerini tamir etmezler ve apoptozdan kaçarlar.
- Mikroskop altında incelendiğinde normal hücrelere göre farklı görünürler. Farklı büyüklüklerde olurlar ve bazıları normalden daha büyüktürler (2).

1.2.1.1 Lösemi

Kan hücreleri pluripotent hematopoetik kök hücrelerden köken alıp hematopoez olarak adlandırılan süreç içerisinde çoğalan olgun lenfosit, granülosit, monosit, megakaryosit, trombosit ve eritrosit gibi periferik kan hücrelerine farklılaşmaktadır (Şekil 1).

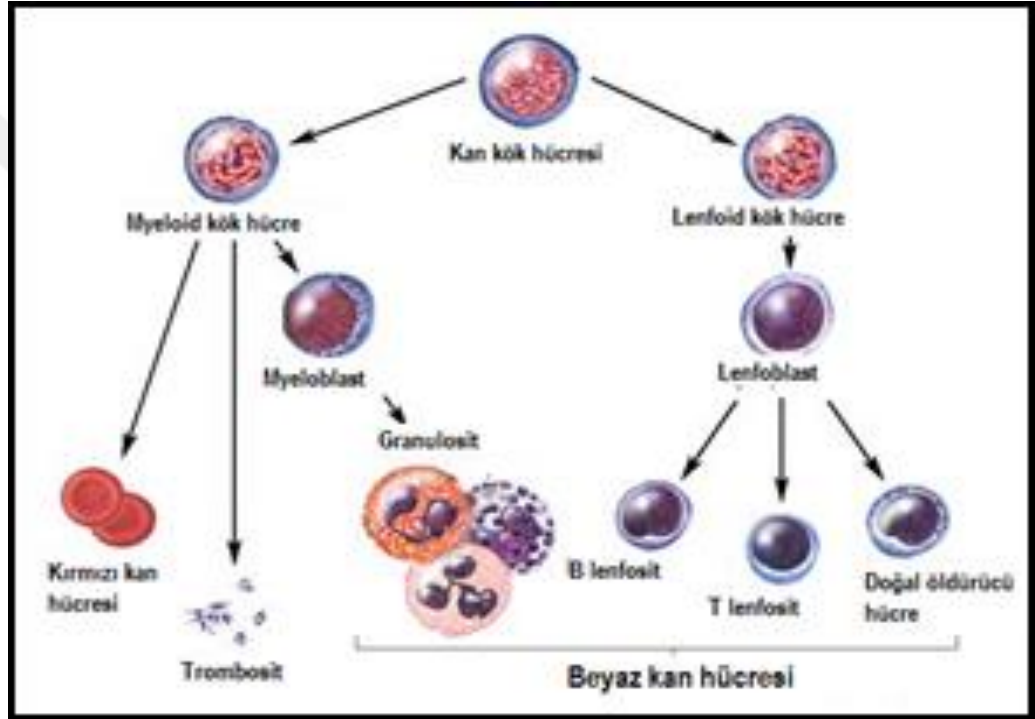
Lösemi, birkaç tipi olan kan-şekillendirici hücrelerin neden olduğu, kompleks bir hastalıktır. Kemik iliğinde, olgunlaşmış ya da olgunlaşmamış hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalmasıyla ortaya çıkar. Hücrenin tipine göre lenfositik ya da miyeloid olarak ve hastalığın tipine göre akut ve kronik olarak sınıflandırılır (4,5,6).

Akut miyeloid lösemi (AML), aynı zamanda akut miyelojenik lösemi, akut miyoblastik lösemi, akut granülositik lösemi ya da akut nonlenfositik lösemi olarak da bilinir. Kemik iliği ve kanın hızlı-gelişen kanser tipidir.

Akut lenfositik lösemi (ALL), ayrıca akut lenfoblastik lösemi ve akut lenfoid lösemi olarak da bilinir. Anormal beyaz kan hücrelerinin kemik iliğinde birikmesiyle sonuçlanır.

Kronik miyelojenöz lösemi olarak da bilinen kronik miyeloid lösemi (KML), kan ve kemik iliğini etkileyen kanserdir. Kemik iliğinin kan-şekillendirici hücrelerinde başlar zamanla kana yayılır.

Kronik lenfosittik lösemi (KLL) tipik olarak yavaş-gelişen kanser tipidir, kemik iliğinde lenfositlerde başlar ve kana yayılır (7).



Şekil 1: Hematopoetik süreç. Tüm kan hücreleri kemik iliğinde bulunan ş

1.2.1.1.1 Akut Lenfoid Lösemi (ALL)

Çocuklardaki en yaygın lösemi tipidir. ALL bazen çocukluk lösemisi diye de adlandırılmaktadır. ALL genellikle iki ile sekiz yaş arası çocukları etkilemektedir. Erkeklerde, ALL'ye kızlardan daha sık rastlanmaktadır. ALL aynı zamanda 65 yaş ve üstü yetişkinleri de etkiler. ALL hızlı ilerler, sağlıklı hücrelerin yerini alır. Lösemi hücreleri kan akımıyla beyin, karaciğer, lenf bezi ve testisler gibi diğer organ ve dokulara taşınırlar. Orada büyümeye ve

bölünmeye devam ederler. Lösemi hücrelerinin büyüyüp, bölünüp, yayılması olası semptomlara neden olur.

T ve B lenfosit yolağında farklılaşacak olan kan progenitör hücrelerindeki çeşitli genetik mutasyonlar sonucu meydana gelir. Bu mutasyonlar hücrenin sınırsız çoğalma yeteneği kazanmalarına neden olurlar. T- veya B- lenfosit klonları kemik iliğinde birikirler ve normal hematopoez baskılanır (6,8).

1.2.1.1.2. Akut Miyeloid Lösemi (AML)

Hem çocuklar hem de yetişkinlerde görülebilen lösemi tipidir. İnsanlar herhangi bir yaşta AML'ye yakalanabilirler. AML aynı zamanda akut nonlenfositik lösemi ya da ANLL olarak da adlandırılır.

Hastalık, gelişimlerinin erken safhasında duraklayan lenfoid öncül hücrelerinin aşırı çoğalmasıyla karakterizedir. Kemik iliğinde çoğalıp normal hematopoetik hücrelerin yerini alarak normal kan hücrelerinin yapılmasına engel olmaktadır. Genellikle spesifik kromozomal translokasyonlarından ve anormal gen ekspresyonundan dolayı meydana gelmektedir. t(9;22), t(4;11), t(1;19), t(12;21) gibi translokasyonlar hastalıkla ilişkilendirilmektedir (7,9).

1.2.1.1.3. Kronik Lenfositik Lösemi (KLL)

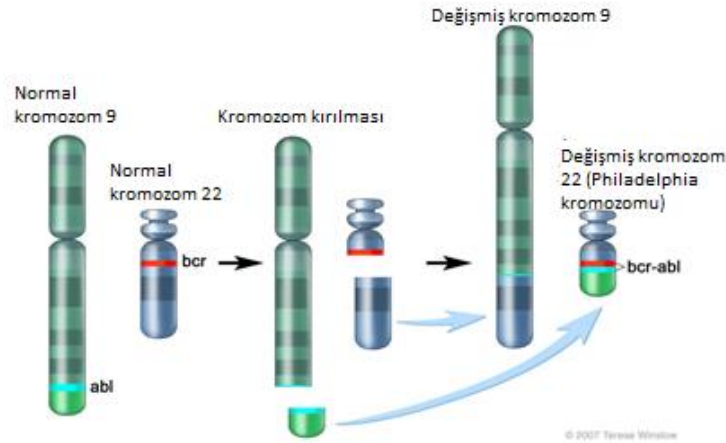
Kronik lenfositik lösemi (KLL), batı dünyasının en yaygın lösemi tipidir. KLL farklı şekillerde ortaya çıkabilir. B-hücreli lösemi, löseminin en sık görülen tipidir ve erkeklerde daha çoğunlukta rastlanır ve hastalar genelde 45 yaş üstü kişilerdir (10,11).

KLL hastalarının çoğu asemptomik olsa da, bazılarında lenfadenopati, dalak büyümesi ve sitopeni gibi semptom ve şikayetler görülür. KLL genomik aberasyonla ilişkilidir. 13q14'ün delesyonu, Trizomi 12, ATM genindeki 11q23 delesyonu ve p53 tümör süpresör genindeki 17p13 delesyon ya da mutasyonu KLL'ye sebep olan başlıca genetik anamolilerdir (11).

1.2.1.1.4 Kronik Miyeloid Lösemi (KML)

Kronik miyeloid lösemi, Amerika Birleşik Devletleri'nde lösemi vakalarının yaklaşık %12'sini, dünya çapında da bütün lösemi vakalarının %7-20 sini oluşturur. KML'nin dünya çapındaki insidansı 1.0-1.5 / 100.000 nüfus / yıl şeklindedir (12). KML'nin yaş ortalaması 45-55'dir; hastaların %20-30'u 60 yaş üstündedir (13).

Kronik miyeloid lösemi, 9. ve 22. kromozomlar arasında resiprokal translokasyonla karakterize edilen klonal hematopoetik kök hücre hastalığıdır. Anormal 22.kromozom ilk defa Amerika Birleşik Devletleri, Philedelphia'da gözlenmiştir bu nedenle genel terminoloji Philedelphia (Ph) kromozomudur. 9q34 bölgesine yerleşmiş olan ABL1 geninin 5' kısmına yakın bir bölgeden kırılması sonrasında 3' tarafında kalan parçanın, 22q11 BCR geninin 3' kısmına yakın bir bölgeden kırılması ve kırılan bu bölgeye füzyonu sonrasında ortaya çıkar. t(9;22), BCR-ABL1 füzyon geninin oluşmasına neden olur. Bu füzyon gen BCR-ABL1 mRNA'ya transkribe olur ve Bcr-Abl1 proteinine dönüşür (Şekil 2).



Şekil 2 : 9. ve 22. Kromozomlar arasındaki parça değişimi ile sonuçlanan yeniden düzenlenme (5)

Füzyon genin tanımlanması, 22.kromozomdaki kırılma bölgesinin en yakınıyla (5 kb) kolaylaştırılmıştır. Böylece breakpoint cluster region (BCR) terimi kullanılmıştır. BCR'nin sıralanması 5 ekzon gösterir (b1-b5), en sık kırılma bölgesi b2 ve b3 ya da b3 ve b4 dür. Kromozom 9'daki ABL1 içindeki kırılma noktası daha geniş alana yayılmıştır fakat genellikle ikinci ABL1 ekzonunun upstream füzyonuyla sonuçlanır. Böylece füzyonlar orijinal olarak b2a2 ya da b3a2 olarak bilinir (14).

Halsizlik, ateş, kilo kaybı, kanama gibi durumlar KML'nin başlıca klinik bulgularıdır. Kronik faz, akselere faz ve blastik faz olmak üzere KML 3 fazlı bir hastalıktır (1).

1.2.1.1.4.1 KML'nin Aşamaları

1.2.1.1.4.1.1 Kronik Faz

Hastaların yaklaşık %85'i bu fazda teşhis edilir. Genellikle şikayetleri yok ya da çok azdır. Tam kan sayımında tesadüfen yakalanmış olabilirler. Kemik iliği ve kanda %10'dan daha az blast hücreleri vardır. Bu evrede hastalık yavaş seyirlidir, normal yaşamlarını sürdürürler.

Bu dönemde ilaç dozlarının düzenlenmesi, etkinliğinin araştırılması, gerekirse başka tedavi seçeneklerine geçilmesi için düzenli poliklinik takibiyle muayene ve testlerinin yapılması gereklidir. Kronik evrenin süresi hastadan hastaya değişmekle birlikte tedavi edilmediğinde veya tedaviye yanıt alınamadığında ortalama olarak 3 - 4 yıl kadar sürer (15).

1.2.1.1.4.1.2 Akselere Faz

Akselere faz ortalama olarak KML'nin kronik fazı semptomlarının ve hastalığın daha agresif işaretlerinin çıkmasından önce 3-5 yıl sürer. Bu safhada hasta halsizlik, kilo kaybı, gece terlemeleri bazen kemik ağrılarından şikâyet eder. Abdominal rahatsızlık hissinin eşlik ettiği hepatosplenomegali kötüleşir.

Hem granülosit hem de platelet sayısının kontrolü daha güç bir hal alır. Lökosit sayısı yüksek düzeylere ulaşır ve hastaları yaygın lökosit infiltrasyonu açısından riske sokar.

Hastalarda lenfadenopati ve ciltte nodüler tümöral oluşumlar (kloroma) gelişebilir. Bu oluşumların biyopsisinde ilik dokusu gözlenir. Bazı hastalarda kemik iliğinde ilerleyici fibrosiz gelişir ve bu durum ekstramedüller hematopoezi ve doku infiltratlarının gelişimini stimüle eder (17).

1.2.1.1.4.1.3 Blast Faz

Hastalık ilerledikçe, kemik iliği ve periferdeki primitif blastların sayısı artmaya devam eder. Akselere fazda, 1 yıldan az bir sürede hastaların çoğu akut lösemi benzeri bir duruma geçerler. Bu durum blast krizi olarak adlandırılır.

Blastik fazın oluşumu için ne kadar blastın gerektiği belli değildir. Buna karşın hastada bir kez aneminin kötüleşmesi, trombositopeni infeksiyonlardan korunmada yeterli derecede matür granülositin olmaması gibi lösemik manifestasyonların gelişimiyle hastalığın son fazına yaklaştığı sonucuna varılabilir.

Sekonder genetik değişiklikler, p53 ve/veya Rb genlerinde mutasyonlar sıklıkla ve normal hücre farklılaşmasındaki kaybı açıklamada yardımcıdır (17).

1.2.1.1.4.2 KML'nin Moleküler Biyolojisi

1.2.1.1.4.2.1 ABL Geni

ABL geni 9q34 numaralı kromozom üzerinde lokalize olmuş, 12 ekzon içeren, tirozin kinaz olmayan 145 kDa ağırlığında hücre bölünmesi, farklılaşma ve strese cevap gibi hücresel süreçlerle ilişkili bir proto-onkogendir. Bu aktivitesi SH3 domaini ile negatif olarak regüle edilir. Bu nedenle bu domaini kodlayan bölgenin delesyonu, genin onkogene dönüşmesiyle sonuçlanır.

ABL geni çeşitli lösemilerde translokasyon parçalarının çeşitliliğiyle ilişkilendirilmiştir. En çok da break point cluster region (BCR) nin 5' ucuna füzyonla sonuçlanan t(9;22) ile ilgilidir. Bu genin alternatif splicingi ilk ekzonun alternatifini içeren iki transkript varyantıyla sonuçlanır (18).

1.2.1.1.4.2.2 BCR Geni (Breakpoint Cluster Region)

22. kromozom üzerinde 22q11.23 lokasyonunda 23 ekzona sahip bir gendir. İlk intron ekzon 1 ve ekzon 2 yi ayırır. 4.5 ve 7.0 kb uzunluğunda olmak üzere iki transkripti vardır. Nükleotid sekansı 1271 amino asit uzunluğunda protein sentezleyen 3818 nükleotidin açık okuma çerçevesini (ORF) içerir. Fonksiyonel kısmı, ilk ekzonda bir serin/treonin kinaz domaini, merkezi GEF domaini ve COOH-terminal GAP domaini içerir. Ayrıca ilk ekzonda SH2-bağlanma bölgesi bulunur.

BCR-ilişkili birkaç pseudogen tanımlanmıştır (BCR2, BCR3 ve BCR4). Ancak bunlar proteine dönüştürülemez. Normal BCR geni, Mr160,000 and Mr 130,000 olmak üzere iki majör protein kodlamaktadır. Bu proteinler 7,0 ve 4,5 kb lık BCR transkriptlerinden türemiştir.

BCR geni sürekli eksprese edilir. Değişmiş BCR-ABL geninin hematopoetik hücreleri etkilediği görülmüştür (19).

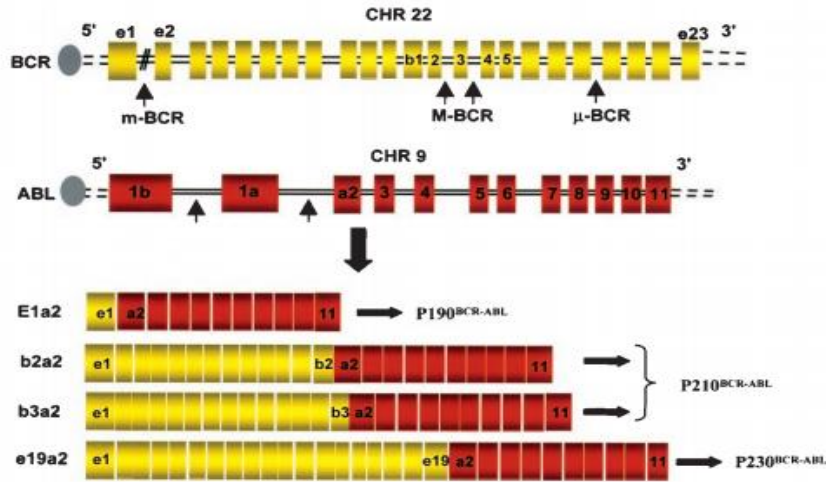
1.2.1.1.4.2.3 BCR-ABL Füzyon Geni

KML'nin en belirgin özelliği BCR (breakpoint cluster region)- ABL füzyon genidir. KML'de önemli genetik olay, t(9;22)(q34;q11) resiprokal kromozomal translokasyondur. 9.ve 22. kromozomun uzun kolları arasındaki bu translokasyon kısa 22 kromozomunun oluşmasıyla sonuçlanır ve Philadelphia (Ph) olarak adlandırılır. BCR genindeki kırılma bölgesine göre, üç temel BCR/ABL geni oluşur (20,21).

KML hastalarının çoğunluğu ABL geninin 1 ya da 2. intronuyla BCR geninin majör breakpoint cluster region (M-bcr) bölgesinde ya ekzon 13 ve 14 (b2) ya da 14 ve 15 (b3) arasında olur. Bu kırılma bölgeleri ya b2a2 ya da b3a2 mRNA'sına transkribe olan BCR/ABL füzyon geninin oluştururlar. Bu

genetik yeniden düzenlemenin son ürünü olarak sıklıkla 210 kDa sitoplazmik füzyon proteini oluşur (21).

Daha az sıklıkta, a2 yerine ekzon a3 ya da e1a2, e19a2 ya da e6a2 transkriptleri ile proteinler p190 BCR-ABL ve p230 BCR-ABL proteinleri oluşmaktadır (Şekil 3).



Şekil 3: ABL ve BCR genlerindeki kırılma noktalarının lokasyonu ve çeşitli kırılmalardan türevlenen kimerik BCR/ABL'nin yapısı (22).

BCR-ABL ile oluşan malign transformasyon, protein tirozin kinaz (PTK) aktivitesine bağlıdır. Bunun sonucu olarak, birçok sinyal yolağı kinaz-bağımlı şekilde aktive edilir ve bu nedenle bu yolların aktivasyonu genin ekspresyonunu etkiler. Otofosforilasyon, BCR-ABL'de Grb2, CrkL gibi adaptör proteinlerin bağlanmasına izin veren yerleşme bölgesi oluşturur. BCR/ABL füzyonu RAS/MAPK, PI3 kinaz, c-CBL ve CRKL yolları, JAK-STAT ve Src yolları gibi sinyal iletim yollarını aktive eder. RAS, Jun-kinaz ve PI-3 kinaz yollarının transformasyon ve proliferasyonda önemli rolü olduğu gösterilmiştir. Apoptozun inhibisyonunun, c-myc ve BCL-2'nin AKT yolağının indüklenmesiyle PI-3 ve RAS yolağının aktivasyonu sonucu olduğu düşünülmektedir (22,23,24).

p210^{BCR-ABL}, nükleer lokalizasyon sinyalini kaybettiği için hemen hemen tamamı sitozolde bulunur bu nedenle aktine bağlanma seviyesi artar (22).

1.2.1.1.4.3 KML Tedavisi

1.2.1.1.4.3.1 Hematopoetik Kök Hücre Nakli

Hematopoetik kök hücre nakli, tirozin kinaz inhibitörlerine (TKI) direnç geliştirmiş KML hastaları için etkili bir terapidir. Allojenik hematopoetik kök hücre nakli (HCT), kronik miyeloid lösemi tedavisi için kanıtlanmış tedavidir. BCR-ABL1 kinaz domaini (KD) mutasyonu, genellikle TKI direnciyle ilişkilidir. Yüksek direnç mutasyonu gösteren hastalar için, KML de hematopoetik kök hücre nakli (HSCT) etkili ve güçlü bir terapidir (24, 25).

1.2.1.1.4.3.2 Tirozin Kinaz İnhibitörleri

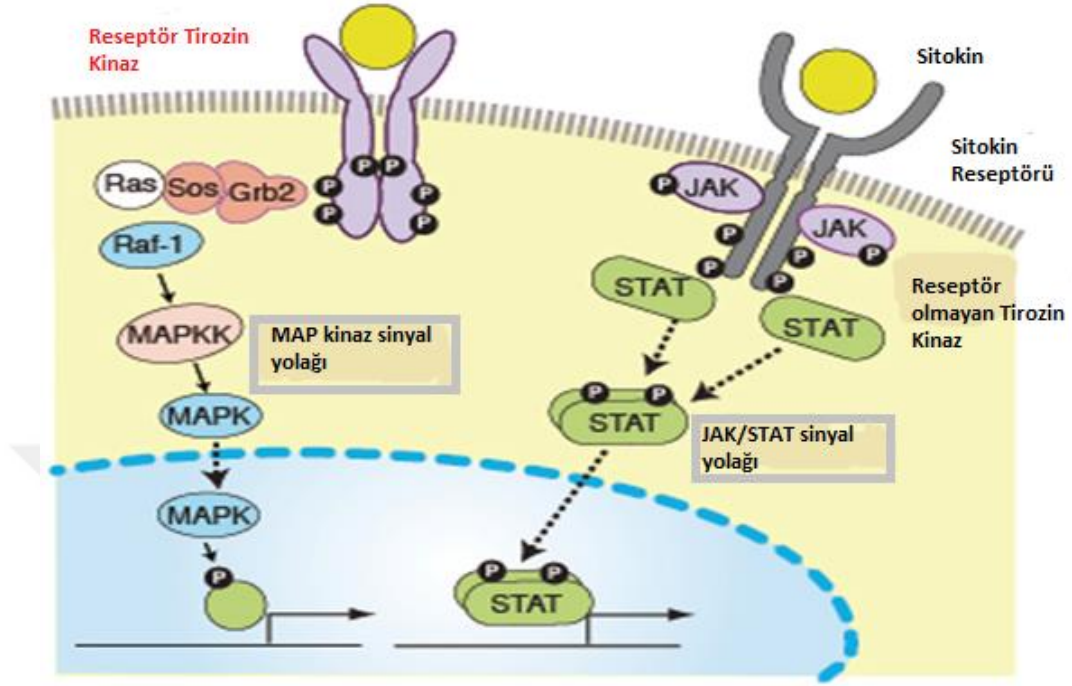
Tirozin Kinazlar (TK), polipeptitlerde ATP'den tirozin rezidülerine fosfat transferini katalizleyen enzimlerdir. İnsan genomu, hücresel proliferasyon, sağkalım, farklılaşma, fonksiyon ve motiliteyi regüle eden yaklaşık 90 tane TK ve 43 tane TK-benzeri gen içerir (26).

Kronik miyeloid lösemide (KML), bir BCR-ABL inhibitörü olan 'İmatinib mesilat'ın başarısıyla durum kökünden değişmiştir. Hedefli kanser terapisinin zaferi ve ilkesi olarak müjdelenmiştir. Tirozin kinazlar, kanser kemoterapisi için mükemmel hedef olarak kabul edilmiştir. Tirozin kinazlar büyüme faktörü sinyallerinin modülasyonunda kritik role sahiptir. Bu enzimlerin aktive formu, tümör hücre proliferasyonu ve büyümesi, anti-apoptotik etkilerin indüklenmesi, anjiyogenezin ve metastazın desteklenmesine neden olabilir (26,27).

Tirozin kinazlar, reseptör protein kinazlar ve non-reseptör protein kinazlar olarak iki sınıfa ayrılabilir (Şekil 4). Reseptör tirozin kinazlar ekstraselüler sinyallerin sitoplazmaya iletilmesinde önemli rol oynayan membran-geçen hücre yüzey proteinleridir. Yaklaşık 60 tirozin kinaz tanımlanmıştır ve reseptör ve/veya ligandına göre 20 alt aileye ayrılmaktadır.

Amino-terminal ekstraselüler domainlerindeki immünoglobulin benzeri sekansları, lipofilik transmembran segmenti ve intraselüler karboksi-terminal domainleriyle karakterize edilirler. Diğer yandan non-reseptör tirozin kinazlar

intraselüler sinyalleri iletir. Tanımlanan ilk non-reseptör tirozin kinaz Src'dir (27).



Şekil 4: Reseptör ve reseptör olmayan tirozin kinaz (28)

Tirozin kinaz reseptörleri, spesifik ligand için multidomain ekstraselüler ligand içerirler, sinyal transmembran hidrofobik heliks ve tirozin kinaz domainine geçer. Reseptör tirozin kinazlar sadece hücre yüzey transmembran reseptörü değil ayrıca kinaz aktivitesine sahip enzimlerdir. Sitoplazmadaki kısım tirozin kinaz domaine sahiptir, bu kinaz domaini N- ve C- terminal uçta 7-8 regülatör sekans içerir. Non-reseptör tirozin kinaz reseptörü ek sinyal ve SH2 (Src homology 2), SH3 (Src homology 3) ve pH domaini gibi protein-protein etkileşim domainine sahiptir SH2 domaini fosforile peptidlere bağlanır (29).

Reseptör yapıdaki tirozin kinazların ekstraselüler bölgesine ligand bağlanarak aktivasyona neden olmakta ve kinaz aktivasyon bölgesindeki regülatör tirozinin otofosforilasyonu sağlanmaktadır. Aktive olmuş reseptör yapıdaki tirozin kinaz sinyal proteinlerini hücre membranına toplayarak çoklu sinyal yollarını aktive etmektedir (30).

Dimerik ligandın reseptör zincirine bağlanması yakınlığı artırır ve/veya reseptör zincirini stabilize eder daha sonra kinaz domainleriyle oto-fosforile olurlar. Bu non-kovalent dimerizasyon, reseptörün sitoplazmik kinaz domaininin aktivasyonuna neden olan konformasyonel değişimle ilişkilidir (31).

Tirozin kinazlar, neoplastik gelişim ve progresyonun birkaç basamağından sorumludur. Tirozin kinaz sinyal yolağı normalde düzensiz çoğalmayı önler ve apoptotik uyaranlara karşı hassasiyeti destekler. Bu sinyal yolakları sık sık genetik ya da epigenetik olarak kanser hücrelerinde değişime uğrar (32).

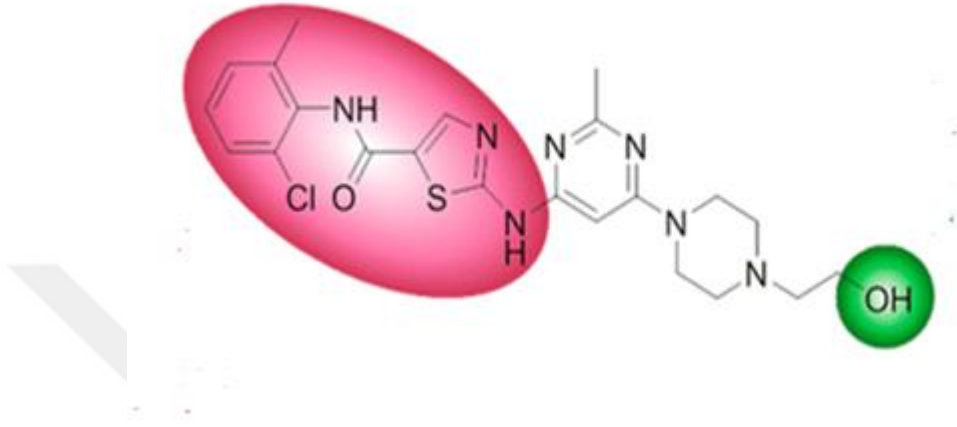
BCR-ABL füzyon geni normal ABL ile karşılaştırıldığında düzensiz protein tirozin aktivitesi göstermektedir. Sonuç olarak BCR-ABL proteinin de dahil olduğu birçok intraselüler proteinin aşırı tirozin kinaz aktivitesi ortaya çıkar (33).

Bu nedenle bir BCR-ABL tirozin kinaz inhibitörü KML için etkili ve seçici tedavi olmaktadır (34). Genel olarak tirozin kinaz inhibitörlerinin mekanizması dört gruba ayrılabilir: 1)kinazın ATP-bağlanma bölgesine bağlanan ATP-yarışmalı inhibitörler; 2) kinazın ATP-bağlanma bölgesinin aktif-olmayan konformasyonunu tanıyan ve bağlanan böylece aktivasyonu enerji açısından uygun olmayan hale getiren inhibitörler; 3) ATP-bağlanma bölgesinin dışına bağlanan allosterik inhibitörler: reseptörün üç boyutlu yapısını modifiye eden ve ve ATP ile kinaz oyuğu arasındaki ilişkiyi bozar, 4) hedef kinazın ATP-bağlanma bölgesine kovalent bağla geri dönüşümsüz olarak bağlanan kovalent inhibitörlerdir (35).

1.2.1.1.4.3.2 1 Dasatinib

Dasatinib (BMS-354825, Sprycel®; Bristol Myers Squibb, New York, NY, USA), KML'de kronik fazı tanımlanan yetişkinlerde BCR-ABL ve SRC'yi içeren, oral olarak alınan multiple tirozin kinazların küçük molekülü inhibitörüdür (36). KML'de (kronik- akselere veya blast faz) İmatinib gibi önceki tedavilere dirençli ya da tolere edilemeyen ya da Philadelphia kromozom pozitif (Ph+) Akut Lenfositik Lösemi, (ALL)'de kullanılır.

Dasatinib,[N-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-2-methyl-4-pyrimidinyl]amino]-5-thiazole carboxamide 1, kritik birkaç onkogenik kinazın çok hedefli inhibitörüdür (Şekil 5) (37).



Şekil 5: Dasatinibin iki boyutlu yapısı (37)

İn vivo çalışmalar bu ajanın İmatinib'den 325 kat daha etkili olduğunu göstermiştir. Dasatinib başlangıçta Fyn, Yes, Src ve Ltk gibi kinazların inhibitörü olarak geliştirilse de BCR-ABL, EphA2, PDGFR ve c-Kit'i de inhibe etmektedir. Dasatinib, T315I mutasyonu hariç imatinib direnci olan BCR-ABL mutant hücre hatlarında ve wild-tipin kinaz aktivitesini ve proliferasyonunu inhibe eder (38).

Dasatinib, ATP-bağlama bölgesine bağlanarak fonksiyon görür. Dasatinib, ABL kinaz domaininin inaktif ve aktif konformasyonuna bağlanır, ABL ile birkaç bağlantı noktasına gereksinim duyar ve imatinib ile karşılaştırıldığında ABL kinaz domainine daha fazla afinitesi bulunmaktadır (39, 40).

1.2.1.1.4.3.2 1 1 Dasatinib Yan Etkileri

Dasatinib, tolere edilebilir ve güvenilir bir profil göstermiştir. Hastaların küçük bir kısmında yan etki gözlenmiştir (41). Klinik çalışmalara göre, karın

ağrısı, ishal, mide bulantısı, kusma, gastrointestinal kanama, mukozal inflamasyon, karın şişliği ve hazımsızlık gibi gastrointestinal hastalıklar en sık görülen yan etkilidir (42). Plevral efüzyon, nefes darlığı, öksürük ve hatta pulmoner arteriyel hipertansiyon gibi solunum rahatsızlıklarına daha nadir rastlanmaktadır. Baş ağrısı, nöropatiyi içeren sinir sistemi rahatsızlıkları da daha az görülmektedir (42,43).

Sol ventrikül disfonksiyonu, kalp yetmezliği, kardiyomiyopati, ventriküler yetmezliği, diyastolik disfonksiyon ve QT-interval uzaması gibi kardiyak yan etkiler daha seyrekir. Cilt sekeli, ağır enfeksiyonlar, düzensiz regl, vertigo, iştah bozuklukları ve kanama gibi diğer toksisiteler de rapor edilen yan etkilerdendir. Bu toksisitelerin yönetimi, doz azaltımı, ilacı kesme ya da ara verilmesi ile sağlanabilmektedir (43).

1.2.2 SERİN-TREONİN FOSFOTAZLAR

Yapısal ve regülatör proteinlerin fosforilasyonu ökaryotlarda temel intraselüler kontrol mekanizmasıdır. Bir proteinin fosforilasyon durumu, kinazlar ve protein fosfotazlar tarafından kontrol edilen dinamik bir süreçtir (44). Fosforilasyon/defosforilasyon reaksiyonları, substratın yarı ömrünü, subselüler lokalizasyonunu, fonksiyonunu ve aktivitesini etkiler. Böylece bu dönüşümlü post-translasyonel modifikasyonu kontrol eden mekanizmayı anlamak önem taşımaktadır (45).

Protein kinazlar ve fosfotazların uygun dengesi, mekânsal ve zamansal düzenlenmesi, hücresel homeostazın sürdürülmesi için gereklidir. Çünkü bu enzimlerin deregülasyonu kanser, diyabet, kardiyak hipertrofi ve nörodejenerasyon gibi çeşitli hastalıklarla ilişkilidir. Gelişen terapötik stratejiler kinaz ve fosfotazların biyolojik etkisini etkileyen ilaçların tasarımı üzerine olmaktadır (46).

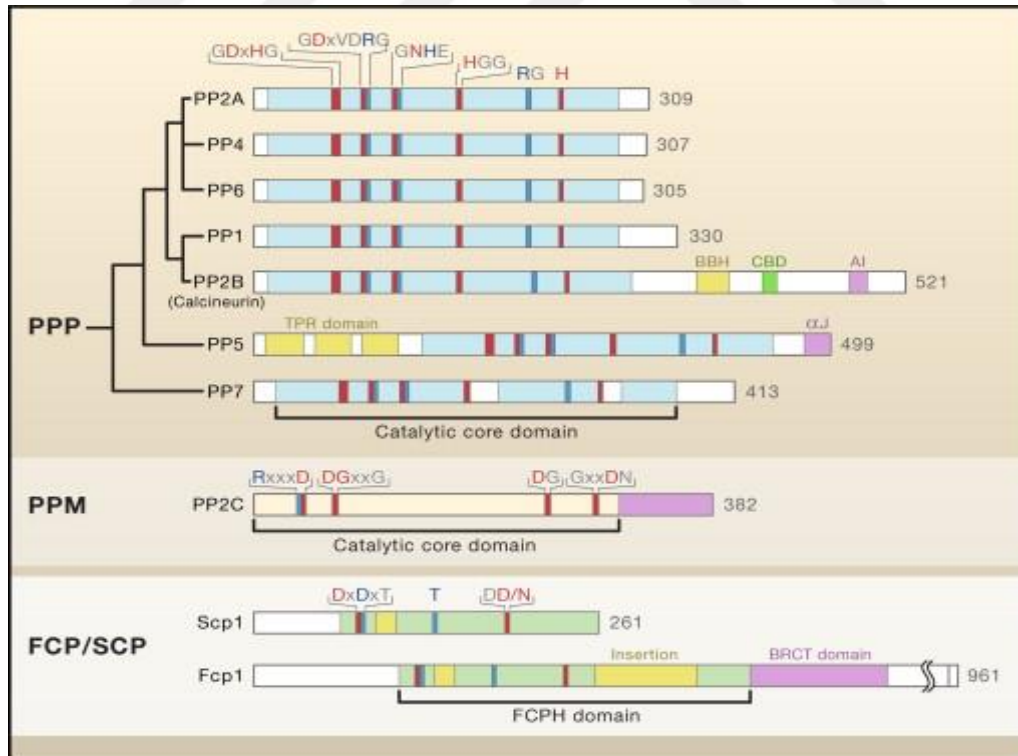
1.2.2.1 Protein Serin/Treonin Fosfotazlar

Protein fosfotazlar substrat spesifitelerine göre genel olarak protein serin/treonin fosfotazlar (PSTP) ve protein tirozin fosfotazlardır (PTP) olmak üzere iki temel gruba ayrılırlar. PTP'lar fosfo-tirozin rezidülerindeki

defosforilasyon reaksiyonunu katalizlerken, PSTP'lar fosfo-serin, fosfo-treonin rezidülerindeki defosforilasyonu katalizler. PTP ve PSTP'lar farklı yapısal karakterlere sahiptir. Her iki tip fosfotaz da hedef fosfat grubundaki nükleofilik atak ile fonksiyon görse de bunu farklı nükleofiller üzerinden yaparlar. PTP'lar nükleofil olarak katalitik sistein rezidülerini kullanırlarken, PSTP nükleofilik atak, katalitik cepte konumlanmış metal-aktive su molekülü üzerinden etki gösterir (45).

Reaksiyon mekanizmalarına, domain yapılarına ve üç boyutlu yapılarına göre protein serin/treonin fosfotazlar üçe ayrılır: Fcp/Scp gibi aspartat-temelli fosfotazlar, Mg^{2+} - ya da Mn^{2+} -bağımlı protein fosfotazlar (PPMs) ve fosfoprotein fosfatazlarıdır (PPPs) (48, 47).

PPP ailesi PP1, PP2A, PP2B, PP5 ve PP7 alt ailelerinden oluşur ve katalitik domainlerinde yüksek amino asit sekans homolojisi gösterirler ve muhtemelen aynı katalitik mekanizmayı paylaşırlar (45).



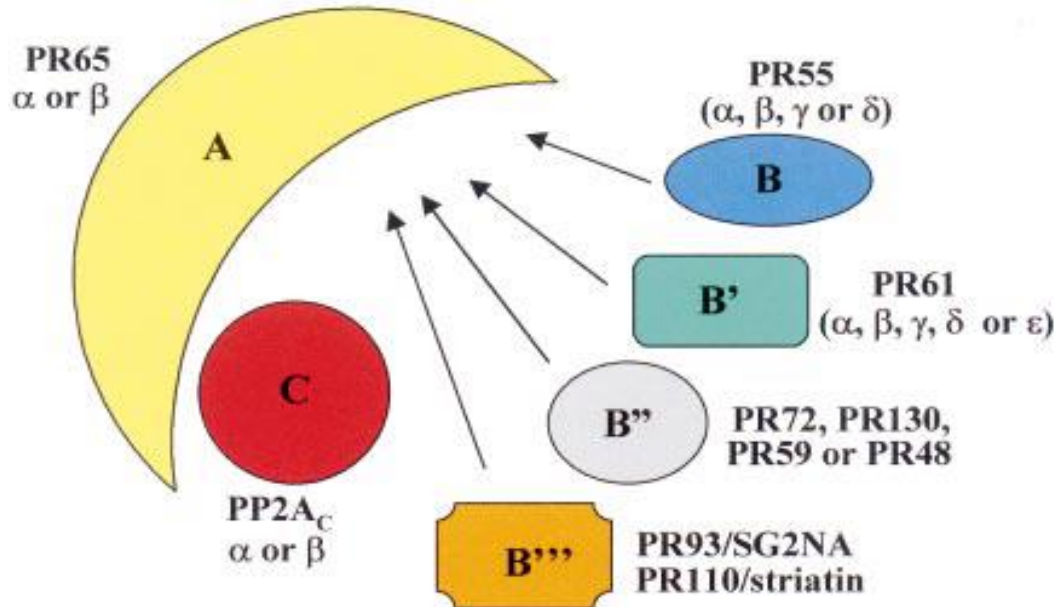
Şekil 6:Protein Serin/Treonin Fosfatazların Üç Ailesi (48)

1.2.2.1.1 Protein Fosfataz 2A (PP2A)

Protein fosfotaz 2A (PP2A), protein serin/treonin fosfataz süperaillesine ait bir fosfoprotein fosfataz (PPP) üyesidir. Proteinlerin serin ve treonin rezidülerinden fosfatı alarak protein kinazların aksine fonksiyon görür. PP2A'nın protein sentezi, hücresel sinyalleşme, hücre döngüsü kararlılığı, apoptoz, metabolizma ve stres cevabını kapsayan çeşitli hücresel süreçleri düzenlediği kanıtlanmıştır (48). PP2A, toplam hücresel proteinlerin %1'ni total serin/treonin fosfatazların %80'nini oluşturmaktadır. Bu nedenle protein fosfatazların esas sınıfıdır (50).

1.2.2.1.1.1 PP2A Yapısı

Core enzim dimer (PP2A_D), 65 kDa'luk PR65 olarak da adlandırılan yapısal A alt birimi ve 36 kDa'luk katalitik C alt birimini (PP2A_C) içermektedir (Şekil 7). Bu A/C alt birimi PP2A holoenzim formasyonunu oluşturmak üzere B alt birimiyle etkileşime girer (51). Halihazırda, B alt birimin dört farklı ailesi tanımlanmıştır. Bunlar; B, B', B'' ve B''' aileleridir (52).



Şekil 7: PP2A'nın yapısı (49)

C katalitik alt biriminin α ve β izoformları, primer sekanslarında %97 lik benzerlik göstermektedir. Bu izoformlar farklı genler tarafından kodlanmaktadır. α izoformu 5q23-q31, β izoformu 8p12-p11.2 de lokalizedir. (53, 54).

1.2.2.1.1.1 PP2A Alt birimleri ve Kompozisyonu

A yapısal alt birimi (PR65), uygun B alt biriminin bağlanabilmesi için PP2A_c ile sıkı ilişki içindedir. Farklı B alt birimleri aynı ya da üst üste gelen bölgelerde core dimerin A alt birimiyle etkileşime girer. A alt birim izoformları α ve β %86 sekans benzerliği göstermektedir. A alt birimi yapısı eşsizdir, HEAT (hungintin elongation A subunit TOR. TOR; Target of Rapamycin) olarak adlandırılan 39-amino asitlik sekansın 15 tekrar dizisinden oluşur. HEAT motifinin tandem tekrarları protein sentezi için ve TOR kinaz için gerekli olan huntingin proteinini de kapsayan çeşitli proteinlerde bulunur (55, 56). PR65'in kristal yapısı, her bir tekrarın temel yapısı aynı olduğunu ve üst üste α -heliksten oluştuğunu ortaya koymuştur. Evrimsel olarak korunmuş PR65 rezidüleri ve hidrofobik yüzeyler intra-tekrar dönüşlerde lokalize olmuştur ve her bir HEAT motifinin iki helisleri ile bağlantı yapmaktadır (57).

B alt birimi dört aileye sahip olup, PP2A'nın en değişken alt birimidir. B (PR55), B' (B56 ya da PR61), B'' (PR72), ve B''' (PR93/PR110) ve bu aileler içinde en az 16 alt aileye sahiptir. Regülatör alt birimlerin dört alt ailesi içinde sekans benzerliği çok düşüktür ve değişik regülatör alt birimlerin ekspresyon seviyeleri hücre tipi ve dokusuna göre farklılık göstermektedir. Bu bakımdan B alt birimi, PP2'nın substrat spesifitesini belirler (58).

Memelilerde, 55 kDa luk alt birim dört gen (PR55 α , PR55 β , PR55 γ ve PR55 δ ,) tarafından doku-spesifik olarak kodlanır. PR55 α ve PR55 δ dokularda yaygın dağılım gösterirken PR55 β ve PR55 γ beyinde daha bol bulunmaktadır (59). B' ailesi (ya da PR61) en az beş farklı gen ürününü içerir: α , β , γ , δ , ϵ . Bunlar insan kromozomlarında sırasıyla 1q41, 11q12, 3p21, 6p21.1 ve 7p11.2-p12'de lokalize durumdadır. B' β geni β 1 ve β 2 olmak üzere iki izoform kodlar. İnsanda B' γ 'ın en az üç farklı splice varyantı vardır. Tüm B'

aile üyeleri %80 benzerlikte korunmuş merkezi bölge içerirler, bununla birlikte C- ve N- terminalleri önemli ölçüde farklıdır. Bu durum korunmuş bölgenin A ve C alt birimleriyle etkileşimi için gerekli olduğunu ortaya koyar. PR61 α , PR61 β ve PR61 ϵ özellikle sitoplazmada bulunurken, PR61 γ 1, PR61 γ 2 ve PR61 γ 3 nukleusta konsantredir (60,61).

B''alt birimi, (PR72, PPP2R3), α /PR72/130, β /PR59, γ /PR48 olmak üzere üç izoform içerir (62). B''' ya da PR93/PR110 ailesi korunmuş epitopa göre, PR110/striatin ve S/G2 nükleer otoantijen (SG2NA; PR93) içermektedir. Striatin ve SG2NA WD-40 tekrarları içermektedir ve PP2A dimeriyle etkileşime girmektedir (63).

PP2A'nın iki tane C alt birim izoformu olmasına rağmen, A ve B 'nin farklı alt birimlerinin kombinasyon olasılıkları çok geniştir. İki A, iki C, dört B, en az sekiz B', dört B'' ve iki B''' izoform oluşumuyla toplamda yaklaşık 75 dimerik ve trimerik holoenzim ortaya çıkabilmektedir. Bu spesifik holoenzim kompozisyonu regülasyon için birçok olasılık sunmaktadır. İlk olarak, spesifik selüler ve subselüler lokalizasyonları nedeniyle bu üç alt birim farklı doku ve hücrel kompartmanlarda PPase 'ı hedefleyebilmektedir. Ayrıca, farklı regülatör alt birimlerinin varlığı in vivo ve in vitroda PP2A holoenziminin substrat spesifikliğini belirlemektedir (49).

Tablo 1: PP2A'nın alt birim, gen ve izoformları

Alt birim	Gen	İzoform
Yapısal (A)	PPP2R1A	α
Yapısal (A)	PPP2R1B	β
Katalitik (C)	PPP2CA	α
Katalitik (C)	PPP2CB	β
Düzenleyici (B)	PPP2R2A	α
Düzenleyici (B)	PPP2R2B	β
Düzenleyici (B)	PPP2R2C	γ
Düzenleyici (B)	PPP2R2D	δ
Düzenleyici (B')	PPP2R5A	α
Düzenleyici (B')	PPP2R5B	β
Düzenleyici (B')	PPP2R5C	γ 1,2,3
Düzenleyici (B')	PPP2R5D	δ
Düzenleyici (B')	PPP2R5E	ϵ
Düzenleyici (B'')	PPP2R3A	α
Düzenleyici (B'')	PPP2R3A	α
Düzenleyici (B'')	PPP2R3B	β
Düzenleyici (B'')	PPP2R3C	γ
Düzenleyici (B'')	PPP2R3D	δ
Düzenleyici (B''')	STRN	
Düzenleyici (B''')	STRN3	
Düzenleyici (B''')	STRN4	
Düzenleyici (B''')	PPP2R4	

1.2.2.1.1.2 PP2A Regülasyonu

PP2A, post translasyonel modifikasyon, otoregülasyon, alt birim çeşitliliği ve substrat - protein etkileşimleriyle regüle olmaktadır. Metilasyon ve fosforilasyon, PP2A katalitik etkinliğini modüle eden iki temel modifikasyon olarak gösterilmiştir. PP2A'nın katalitik alt birimi, tirozin kinaz pp60^{v-src} ve pp56^{lck} tarafından fosforillenir (64). Fosforilasyon, PP2A_c'nin korunmuş C-terminalinde Tyr³⁰⁷'de gerçekleşir. Böylece enzimin inaktivasyonu gerçekleşir (49). Tyr³⁰⁷'nin fosforilasyonu, PP2A_c'nin PP2APR55/PR61 alt birimiyle

etkileşiminin inhibisyonuna neden olarak PP2A aktivitesinin azalmasıyla sonuçlanır (65).

PP2A'nın metilasyonu, PP2A-metiltransferaz (PPMT) ile Leu³⁰⁹ pozisyonunda gerçekleşir. Ayrıca lösin karboksil metiltransferaz 1 ya da LCMT1 olarak da bilinir. Demetilasyon ise PP2A-metilesteraz (PPME) tarafından sağlanır. Leu³⁰⁹'a LCMT1 tarafından metil grubu eklenmesi core dimerin (A ve C alt birimleri) farklı regülatör birimlere bağlanma afinitesini artırır (64).

1.2.2.1.1.3 PP2A'nın Biyolojik Rolü

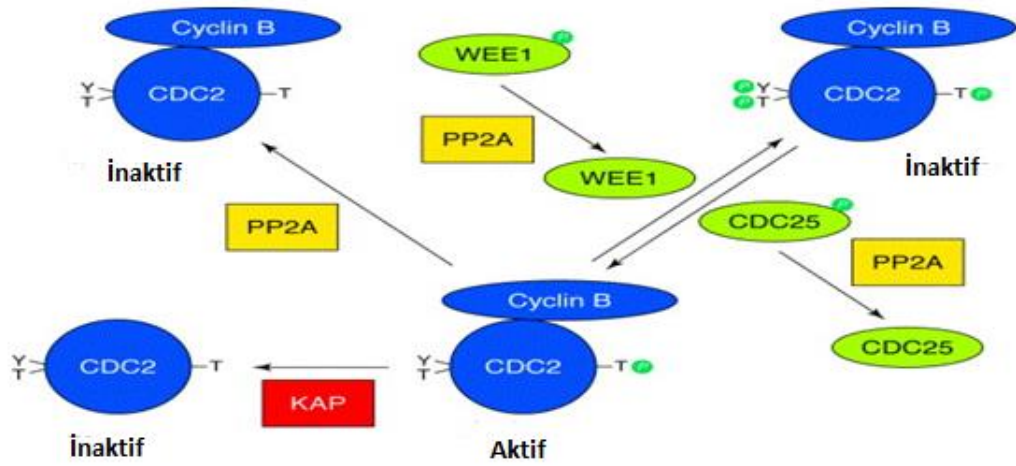
1.2.2.1.1.3.1 Hücre Döngüsünde PP2A'nın Rolü

Genetik kanıtlar PP2A'nın hücre-döngüsünün özellikle mitoz sürecindeki fonksiyonuna işaret etmiştir (66). PP2A, siklin-bağımlı kinazların (CDK) substratının defosforilasyonu için gereklidir. PP2A'nın mitotik etkisi CDK kompleksinin negatif regülasyonu yoluyla olmaktadır. PP2A, CDC2'nin aktivitesini ve ilişkili kinazların aktivitesini en az üç makul mekanizma ile gerçekleştirebilir (Şekil 8).

1) CDC2'nin kinaz aktivitesi Thr161'deki fosforilasyona bağlıdır. Farklı fosfatazlar, KAP (CIP2, CDKN3 olarak da bilinir), bu bölgeyi defosforile eder. CDC2'nin (ya da CDK2) KAP ile defosforilasyonu siklinin kinaza bağlanmasını engeller (67).

2) PP2A, kinaz WEE1'i defosforile ve aktive eder. Bilindiği üzere de WEE1, CDC2'yi inhibe eder. Yani PP2A indirekt olarak WEE1'in aktivasyonu ile CDC2'yi inaktive etmiş olur (68).

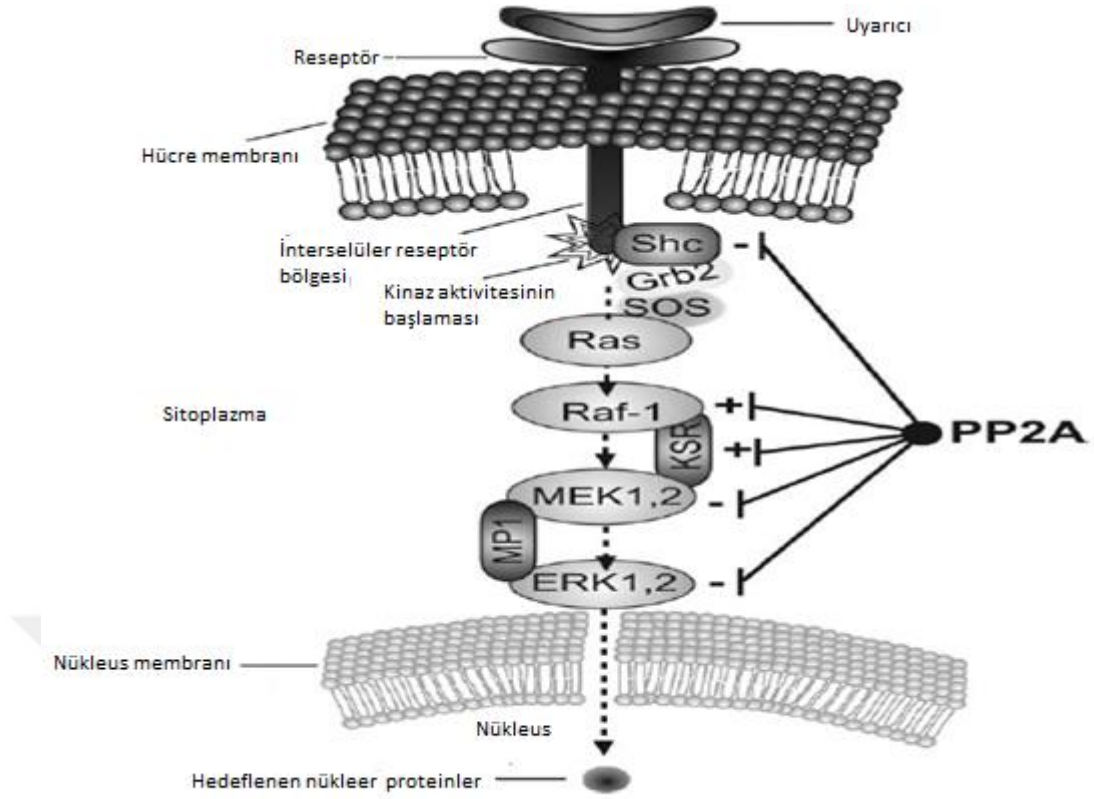
3) Cdc25, Siklin-B-bağı CDC2'nin defosforilasyonu tetikler ve mitozu indükler. PP2A, CDC25'in negatif regülatörüdür (66).



Şekil 8: Protein fosfataz 2A'nın (PP2A) siklin-B-CDC2 üzerinden negatif regülasyon mekanizmaları. PP2A'nın temel etkisi; CDC2'de Thr14/Tyr15'in fosforilasyonunu inhibe etmek, WEE1'i aktive etmek ve CDC25'i de inaktive etmektir. KAP, temel işlevsel fosfotaz olsa da, PP2A ayrıca CDC2 T-loop taki Thr161'i de defosforile eder (66).

1.2.2.1.1.3.2 PP2A'nın Sinyal iletimindeki Rolü

PP2A'nın tanımlanan bir fonksiyonu da Ras-Raf-Mitogen-activated protein (MAP) kinaz sinyal yollarını regüle etmesidir. PP2A, hücre tipine bağlı olarak bu yolları hem pozitif hem de negatif olarak regüle eder. PP2A Map/ERK kinaz (MEK) ve ekstraselüler signal-regulated kinaz (ERK) kinaz ailesini defosforile edip inaktive edebilir (69, 70)



Şekil 9: PP2A negatif ve pozitif olarak ERK-MAPK yolağının bileşenlerini kontrol eder (70)

Holoenzim kompozisyonuna bağlı olarak, farklı PP2A trimerleri tüm MAPK'ları negatif regüle edebilmektedir. Örneğin; PP2A, p38'in upstream aktivatörü olan MKK3'ü defosforile ederek p38'i regüle eder. İn vitro çalışmalar, PP2A'nın MEK1,2 ve ERK1,2 proteinlerini defosforile edip inaktive ettiğini göstermiştir (69). PP2A ayrıca ERK yolağını upstream aktivatör proteinleriyle etkileşime girerek de regüle edebilir. Adaptör protein Shc, Ras'ın reseptör-aracılı aktivasyonuna katılır. PP2A, Shc'ye bağlanarak bunun tirozin fosforilasyonunu engeller ve sinyal sürecini inhibe etmiş olur. Böylece Ras/MAP kinaz yolağının down-regülasyonu ile bir kontrol mekanizması sağlanmış olur (71).

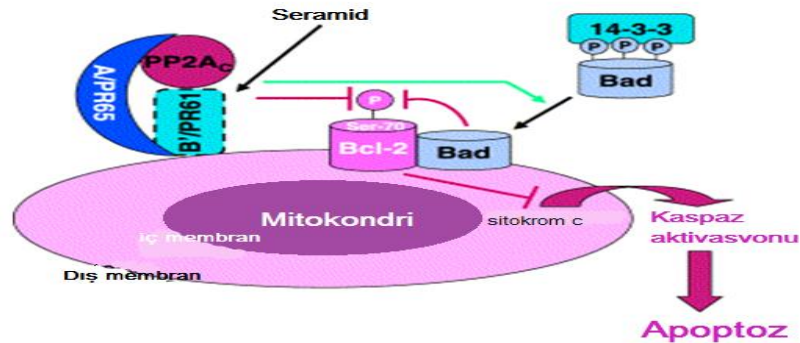
1.2.2.1.1.3.3 Apoptozda PP2A'nın Rolü

Birçok biyolojik süreçte olduğu gibi apoptozda da apoptotik sinyal proteinlerinin tersinir fosforilasyonu oldukça önemlidir. PP2A, Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik proteinlerini aktive edip, anti-apoptotik proteinlerini inhibe ettiği için PP2A'nın apoptozda pozitif regülatör olduğu kanısına varılmıştır (72). PP2A, Bcl-2 inaktive edici fosfataz olarak bulunmuştur. Seramid, apoptotik sinyalde ikinci mesajcıdır, seramid-indüklü apoptoz, mitokondriyal PP2A'nın spesifik aktivasyonu ile Bcl-2'yi defosforile edip inaktive eder (73) (Şekil 10)

PP2A'nın Bcl2 defosforilasyonu B'/PR61α içeren trimerik enzimle ilişkilidir. B'/PR61α, Bcl-2 ile direkt etkileşime girer ve Bcl-2 ile mitokondriyal membranda bulunmaktadır.

Seramid, B'/PR61α'yı up-regüle eder ve sonuç olarak B'/PR61α fazla ekspresyonu PP2A'nın pro-apoptotik fonksiyonu desteklediğini ve anti-apoptotik Bcl-2 proteinini defosforile ederek inaktive ettiğini işaret eder. Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyesi olan Bad proteinin defosforilasyonu da PP2A tarafından gerçekleştirilmektedir (73).

Apoptozda, Kaspaz aktivasyonu, kinaz ve fosfatazların kontrolü altındadır. Yapılan çalışmalar, Kaspaz-3 ile PP2A'nın regülatör Aα alt birimiyle etkileşim içinde olduğunu göstermiştir. Bu da PP2A'nın kaspaz-3 için substrat olduğunu açıklamaktadır (74).



Şekil 10: PP2A'nın apoptotik sinyal iletim yollarındaki düzenleyici rolü (72).

PP2A'nın kanser ile ilişkisine bakıldığında, proteinlerin geri dönüşümlü fosforilasyonu hücrenin neredeyse tüm hayatını regüle eder. Anormal fosforilasyon birçok hastalığın sebebidir. Belirli protein kinaz ve fosfatazlardaki mutasyonlar birçok hastalıkla ilişkilidir. Yapılan çalışmalar PP2A-B'yi alt biriminin baskılanması insan hücrel transformasyonu için yeterli olduğunu göstermiştir. PP2A-A α , A β , ve B'yi da ki somatik değişimler meme, akciğer ve kolorektal kanser ile yumuşak doku sarkomalarıyla ilişkilidir.

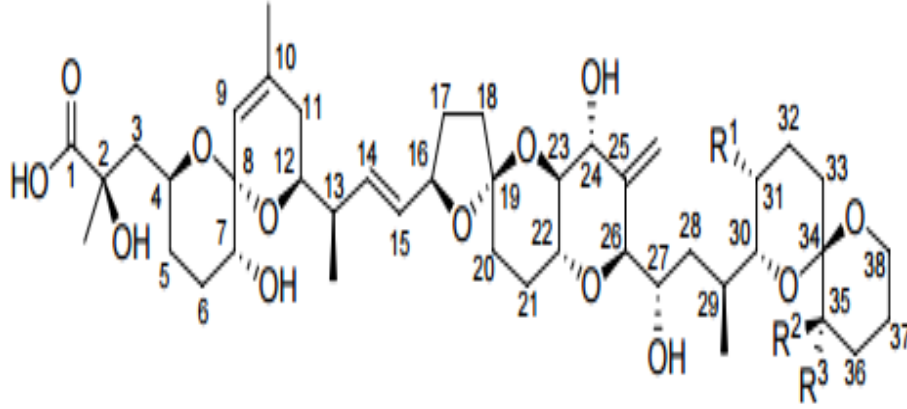
PP2A'nın ayrıca hematolojik malignansilerde de baskılanıp, değişime uğradığı saptanmıştır. Akiciğer, meme, kolon, mide ve lösemi gibi çeşitli malignansilerde downregüle olması PP2A'nın tümör süpresör olduğunu göstermiştir. Tümör süpresör olarak fonksiyon gören PP2A, Ph⁺ lösemilerde de inhibe olmuş durumdadır (75).

1.2.2.1.1.4 PP2A İnhibitörleri

Protein defosforilasyonu ve protein fosfatazların çeşitli hücrel süreçlerdeki önemine ışık tutmak için okadaik asit ve calyculin A gibi protein fosfataz inhibitörleri kullanılmaktadır (76).

1.2.2.1.1.4.1 Okadaik Asit

Okadaik asit (OA), C₄₄H₆₈O₁₃, siyah deniz süngerı Halichondria okadaii ve Halichondria melanodocia'dan elde edilen lipofilik doğal bir bileşendir. Sonradan Dinophysis ve Procentrum cinsine ait birkaç deniz dinofilajellatlarından üretilmiştir (77). 38 karbonlu (C₃₈) yağ asid polieter türevli bir bileşiktir (şekil 11). Miyosin hafif zincirinin fosforilasyonunu arttırarak düz kasların kasılmasına sebep olduğu saptanmıştır (83). 20 yılı aşkın süre önce, midye yemenin sonucu olarak mide-bağırsak yangısı sorunu diarrhetic shellfish poisoning (DSP)'in başlıca sebebi olarak okadaik asit tanımlanmıştır (78).

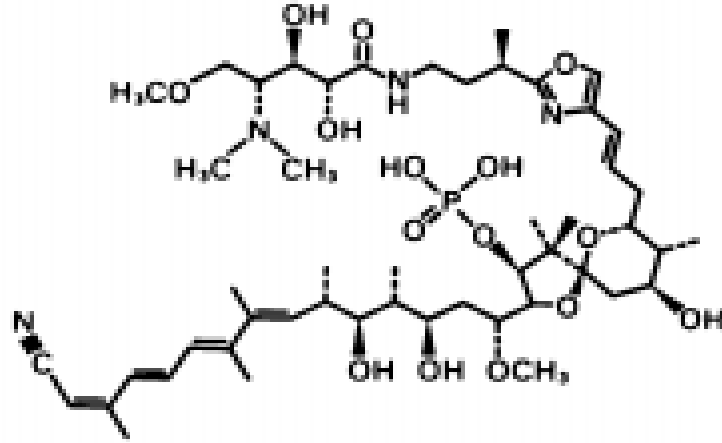


Şekil 11: Okadaik asitin genel yapısı (80).

Okadaik asit, güçlü ve selektif PP1 ve PP2A inhibitörüdür. Moleküler, hücresel, biyokimyasal ve nörotoksisite mekanizmalarının çalışılmasında önemli bir araçtır. PP1 ve PP2A'nın inhibitörüdür ve *in vivo* ve *in vitro* da tau'nun hiperfosforilasyonunu indükler (79). OA'in PP2A'ya olan inhibisyon etkisi PP1'den daha fazladır. Ayrıca PP4 ve PP5 için de etkilidir. OA ayrıca akut toksik etki, tümör teşvik edici özelliğe ve nörotoksik etkiye sahiptir (80). Okadaik asidin hücre geçirgen özelliğinin olması hücre biyolojisinde temel avantajdır ancak hücre membranından sitozole transferi yavaş gerçekleşmektedir (83).

1.2.2.1.1.4.2 Calyculin A

Calyculin A (Caly A), ($C_{50}H_{81}N_4O_{15}P$), 1008 moleküler ağırlığında, oktametil polihidroksilate içeren, 28 karbonlu (C_{28}) yağ asididir. (Şekil 12). Deniz süngerinden izole edilir ve yapısal olarak okadaik asit ile ilişkisi yoktur. Calyculin A, PPP ailesinden tip 1 ve tip 2A protein serin/treonin fosfataz inhibitörü olarak hücre biyolojisinde geniş ölçüde kullanılan okadaik asitten daha hücre-geçirgen bir toksindir. Calyculin A, ilk kez Japonyadaki Sagami körfezin'den deniz süngeri *Discodermia calyx*'den izole edilmiştir. Calyculin A, okadaik asit reseptörlerine bağlanır (81, 83).



Şekil 12: Calyculin A yapısı (81)

Calyculin A, PPP ailesininden tip 1 ve tip 2A protein serin/treonin fosfataz inhibitörü olarak hücre biyolojisinde geniş ölçüde kullanılan hücre-geçirgen bir toksindir. PPP ailesinin güçlü bir inhibitörü iken, PTP ve PPM ailelerini inhibe etmez. Caly A, PPP fosfotazları nanomolar dozlarda inhibe eder (82).

Caly A, 15 kiral merkeziyle kompleks doğal bir üründür. Yapılan çalışmalar, fosfat grubu, C-13' deki hidroksil grubu ve hidrofobik poliketid kuyruğu gibi fonksiyonel grupların PPP fosfatazlarının inhibisyonu için gerekli olduğunu göstermiştir. X-ray difraksiyonu, Caly A'nın fosforil gruplarına dolanmak için H-bağlarını kullanarak katlandığını göstermiştir (82).

1.2.3Hücre Ölüm Mekanizmaları

Düzenlenmiş, programlanmış hücre ölümü tüm çok hücreli organizmalar için kritik öneme sahiptir. Hücre ölümü, embriyogenez boyunca doku şekillenmesi, immün sistemin gelişimi ve zarar görmüş hücrelerin yıkımını içeren birçok süreçte önemlidir. En iyi çalışılmış programlanmış hücre ölüm şekli kaspaz proteazlarının aktivasyonuna gereksinim duyulan apoptoz olsa da nekroptoz, otofaji, kaspaz-bağımsız hücre ölümü ve piroptosis gibi apoptotik olmayan hücre ölüm formları da mevcuttur (84).

1.2.3.1 Apoptoz

Çok hücreli organizmalarda hücre sayısı sadece hücre bölünme oranıyla değil aynı zamanda hücre ölüm oranıyla da sıkıca kontrol edilir. Eğer hücreye daha fazla ihtiyaç yok ise, bir intraselüler ölüm programını aktive ederek hücreyi intiharına neden olurlar. Bu sürece programlanmış hücre ölümü ya da daha genel adıyla apoptoz denir. Yunanca'dan gelen bu kelime ağaçtan ayrılan, düşen yaprak anlamındadır (85). Apoptoz normal olarak gelişim süresince ve dokulardaki hücre popülasyonunu korumak için bir homeostatik mekanizma olarak yaşlanmada gerçekleşir. Apoptoz ayrıca, immün reaksiyonlarında ve hücreler kazara ya da zararlı ajanlarla zarar gördüğünde savunma mekanizması olarak görev alır. Kanser kemoterapisi için ışınlama ya da kullanılan ilaçlar bazı hücrelerde p53-bağımlı yolak üzerinden apoptotik ölüme neden olan DNA zararıyla sonuçlanır. Kortikosteroid gibi bazı hormonlar bazı hücrelerde apoptotik ölüme neden olurken diğerlerini etkilememektedir. Bazı hücreler ligand bağlanma yoluyla ya da protein çapraz-bağlama yolu ile apoptoza neden olan Fas ve TNF reseptörlerini ifade eder. Apoptoz kaspaz olarak adlandırılan sistein proteazları içeren enerji-bağımlı ve koordine edilen bir süreçtir (86).

Apoptozun nükleustaki morfolojik özelliği, kromatin kondensasyonu ve nükleer fragmentasyondur. Kondensasyon nükleer membranın periferinde başlar, hilal veya halka benzeri bir yapı oluşturur. Apoptozun geç safhalarında nükleus daha da kondense hale gelir ve sonuçta bozulmamış hücre membranının içinde parçalanır. Bu morfolojik özellikler kaspazlar tarafından ortaya çıkan çeşitli proteinlerle başlatılabilir. Çift-iplikli DNA 180-200 baz çifti uzunluğunda fragmanlara ayrılır. Apoptozun erken evresinde hücreler komşu hücre ile bağlantısını kaybeder. Membranlar ve mitokondrinin de dahil olduğu organlar erken apoptotik evrede korunur. Daha sonra mikrovilliler kaybolur ve hücre membranı kabarcık bir yapı göstermeye başlar. Hücre küçülüp büzülür ve kabarcıklar ayrılır apoptotik cisimleri şekillendirir. Apoptoz bir inflamasyon oluşmadan gerçekleşir. Apoptozun erken işaretlerinden biri fosfotidilserinin dışa çıkmasıdır bu da fagositoz yapan hücrelere 'beni-ye' sinyali verir.

Mitokondriyal membran permeabilizasyonu apoptoz süresince merkezi rol oynar. Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik üyeleri mitokondriyal membran permeabilizasyonun başlamasında önemlidir. Bcl-2 ailesinin anti-apoptotik üyeleri ise bu apoptoz sürecini inhibe eder. Sitokrom c ile Apaf-1 'in etkileşiminden apoptozom denen kompleks şekillenir, Apaf-1 oligomerizasyonu ve bağlanması ile kaspaz-9'un aktivasyonu ile sonuçlanır (87,88).

1.2.3.1.1 Apoptoz Mekanizmaları

Apoptozun mekanizmaları yüksek ölçüde kompleks ve moleküler olayların enerji-bağımlı kaskadını kapsayan sofistike bir mekanizmadır. Bugüne kadar yapılan çalışmalar, ekstrinsik ya da ölüm reseptör yolağı ve intrinsik ya da mitokondriyal yolak olan iki temel yolak olduğunu göstermiştir (86-88).

1.2.3.1.1.1 Apoptozun Ekstrinsik Yolağı

Ekstrinsik sinyal yolağı apoptozu transmembran reseptör-aracılı etkileşimlerle başlatır. Bu tümör nekroz faktör (TNF) reseptör gen ailesinin üyesi olduğu ölüm reseptörlerini kapsar (88). Tanımlanan en iyi ligand ve uyumlu ölüm reseptörleri FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 ve Apo2L/DR5'dir. Ligand bağlanması üzerine, sitoplazmik adaptör proteinleri bir araya gelir. Fas ligandının Fas reseptörüne bağlanması adaptör protein FADD'nin bağlanmasıyla, TNF ligandının TNF reseptörüne bağlanması da TRADD adaptör proteininin bağlanmasıyla sonuçlanır. Daha sonra FADD, prokaspaz-8 ile etkileşime girer. Bu noktada, ölüm-indüklü sinyal kompleksi (DISC) şekillenir ve pro-kaspaz 8'in oto-katalitik aktivasyonu ile sonuçlanır. Kaspaz-8 aktive olduğunda apoptozun infaz fazı tetiklenmiş olur (90).

1.2.3.1.1.2 Apoptozun İnstrinrik Yolağı

İntrinsik sinyal yolağı reseptör-olmayan-aracılı uyarıların çeşitli dizilerini içeren yolaktır. Hücre içinde direkt hedefine intraselüler sinyal üretir

ve mitokondriyal-başlatılan sinyallerdir. Bu üretilen intraselüler sinyal pozitif ya da negatif şekilde hareket edebilir. Negatif sinyaller,ölüm programının baskılanmasının başarısızlığıyla sonuçlanan büyüme faktörleri, hormonlar ve sitokinleri kapsar. Böylece apoptoz tetiklenmiş olur. Pozitif sinyal ise, radyasyon, toksinler, hipoksia, hipertermia, viral enfeksiyon ve serbest radikallerle ilişkilidir. Tüm bu uyarılar iç mitokondri membranda değişime neden olur ve mitokondriyal permeabilite geçişi (MPT) porunun açılmasıyla sonuçlanır. Mitokondriyal transmembran potansiyeli kaybolur ve iki temel pro-apoptotik protein intermembrandan sitozole salınır. İlk grup, sitokrom c, Smac/DIABLO ve serin fosfataz HtrA2/Omi 'den oluşur. Bu proteinler kaspaz-bağımlı mitokodriyal yolağı aktive eder (91).

Sitokrom c, Apaf-1'e bağlanır ve aktive eder ayrıca pro-kaspaz-9'a da bağlanarak apoptozomu şekillendirir. Prokaspaz-9'un kümelenmesi kaspaz-9'u aktive eder. Smac/DIABLO ve HtrA2/Omi'nin IAP'yi (inhibitors of apoptosis proteins) inhibe ederek apoptozu indüklediği bilinmektedir. Pro-apoptotik proteinlerin ikinci grubu, AIF, endnükleaz G ve CAD, apoptoz boyunca mitokondriden salınır ancak bu geç evrede gerçekleşir. CAD mitokondriden salındıktan sonra nükleusa transfer olur ve kaspaz-3 tarafından bölünerek DNA fragmentasyonuna neden olur (86).

Tümör süpresör protein p53, Bcl-2 ailesi proteinlerinin regülasyonunda önemli rol oynar. Bcl-2 ailesi proteinlerinin mekanizmasının, mitokondriyal membran permeabilitesinin değişimiyle mitokondriden salınan sitokrom c regülasyonunda görevli olduğu düşünülmektedir. Sitokrom c' nin mitokondriden salınımıyla ilişkili olan Bcl-2 ve onunla rekabet eden Bax ve Bad proteinleri arasındaki dengenin bozulmasıyla apoptoz uyarılmaktadır. Bcl-2 mitokondriden Sitokrom c çıkışını önleyerek apoptozu engellerken, Bad, Bcl-2' ye bağlanarak, Bax ise, Sitokrom c çıkışını sağlayarak apoptozu teşvik etmektedir (86, 92).

1.2.3.2 Nekrozis

Morfolojik olarak nekrotik hücre ölümü ya da nekrozis hücre hacminin artması, organellerin şişmesi, plazma membranının bozulması ve intraselüler içeriğin kaybıyla ilgilidir.

Nekrozis durumunda sitozolik içeriğin intraselüler alana dağılması nedeniyle inflamasyon gerçekleşir. Apoptozda bu ürünler makrofajlarda güvenli bir şekilde izole edilir. Mitokondrinin ayrılması, reaktif oksijen türlerinin üretimi mitokondriyal membran permeabilizasyonu nekroziste meydana gelen mitokondri ile ilgili değişimlerdir.

Fenton reaksiyonlarıyla ROS üretimi, lizozomal membran permeabilizasyonu lizozomdaki, RARP-1'in hiperaktivasyonu nükleustaki değişimlerdir. Lipid degradasyonu, artan sitosolik Ca^{+2} konsantrasyonu sonucu mitokondriye aşırı yük ile non-kaspaz proteazların aktivasyonu diğer nekrozis özellikleridir (93).

1.2.3.3 Nekroptosis

Düzenlenen nekrozis ya da nekroptosis, nekrozisten farkını belirtmek için kullanılmış bir terimdir. Nekroptosis TNF reseptör süperailisi, T cell reseptör, interferon reseptörleri, Toll-like reseptörlerin aktivasyonu, hücre metabolik ve genotoksik stres veya çeşitli anti-kanser ajanlar ile indüklenebilir. Reseptor-interacting protein kinase-1 (RIP1) ve RIP3'ün etkileşimi ile oluşan 'nekrozom' nekroptosisin en önemli karakteristiğidir. Nekroptoz çok-basamaklı bir süreçtir. İlk kontrol noktasında, TNF- α aracılı nekroptozda cIAP1 ve cIAP2, RIP ubiquitinasyonunu indükler, NF- κ B-bağımlı ya da bağımsız mekanizma ile nekroptoz inhibe olur. Deubiquitinase cylindromatosis (CYLD) tarafından RIP'den ubiquitin kopması, Kompleks IIa (kaspaz-8, FADD ve RIP1'in dahil olduğu) ve Kompleks IIb'nin (kaspaz-8, FADD, RIP1, RIP3 ve Mixed lineage kinase domain like, MLKL'nin dahil olduğu) paketlenmesi için kritiktir. İkinci kontrol noktasında, aktive olmuş kaspaz-8 bölünür ve RIP1 RIP3 ve CYLD'nin aktivitesini ortadan kaldırır. Bölünmüş RIP1 ve RIP3, trans-fosforilasyon ve downstream substrat

fosforilasyon yeteneklerini kaybederler. Üçüncü kontrol noktası da, RIP ve RIP3 dağıldığı zaman, kaspaz-8 inhibitörleri tarafından korunurlar.

Nekroptoz, normal gelişim sürecinde önemli bir rol oynar. Kansere dahil birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir (84, 94).

1.2.3.4 Otofaji

Otofaji terimi Yunanca 'kendini yeme' anlamından türemiştir. Makro-otofaji, mikro-otofaji ve şaperon-aracılı otofaji olmak üzere üç çeşit otofaji tanımlanmıştır.

Otofaji fagofore olarak da bilinen ayrılmış membranda başlar. Bu fagofore, protein agregatları, organeller ve ribozomlar gibi intraselüler kargoları yutmak için genişler. Böylece kargo çift-membran otofagazomda ayrılır. Yüklenmiş otofagazom lizozom ile füzyon yolu ile olgunlaşır, lizozomal asit proteazlarla otofagozomal içeriğin degradasyonunu sağlar.

Lizozomal permeazlar ve transporterlar, amino asit ve diğer degradasyon ürünlerini metabolizma için gereken makromoleküllerin yapımı için yeniden kullanılmak üzere sitoplazmaya taşır. Bu nedenle otofaji, hücresel 'recycling factor' olarak düşünülmektedir (95).

1.2.4 Hücre Döngüsü

Hücre bölünmesi genel olarak iki evreden oluşur: Mitoz (M) ve interfaz. Mitoz evresi, profaz, metafaz, anafaz ve telofaz evrelerini kapsar. Mikroskop altında, interfazdaki hücreler sadece büyüme durumunda gibi görünse de farklı tekniklerle interfazın G1, S ve G2 fazından oluştuğu ortaya konmuştur. DNA'nın replikasyonu interfazın S fazında meydana gelir. S fazı, hücrelerin DNA sentezine hazırlandığı G1 fazından önce gelir. Daha sonra hücrelerin mitoz için hazırlandığı G2 fazı takip eder. G1, S ve G2 fazları, standart hücre döngüsünün alt bölümleridir. G1'deki hücreler DNA replikasyonuna başlamadan önce G0 denilen dinlenme evresine girerler. G0'daki hücreler insan vücudundaki büyümeyen, proliferasyon olmayan hücrelerin büyük çoğunluğunun içinde olduğu evredir (96).

1.2.4.1 Hücre Döngüsü Kontrolü

Hücre siklusu temelde siklin-bağımlı kinazlar (cdk)'lar ve siklin kompleksleriyle katalize edilir. Cdk'lar hücre siklusunun belirli noktalarında aktive edilen serin/treonin protein kinazlardır. Cdk'lar hücre döngüsünde kritik öneme sahiptir çünkü inaktivasyonları mitozu önler (97). Cdk'ların konsantrasyon seviyesi hücre döngüsünde sabit kalır. Hücre faz progresyon ve geçişinde siklinlerin ekspresyon ve yıkımıyla regüle edilir. Memeli hücrelerinde D/Cdk4-6, E/Cdk2, A/Cdk2 ve B/Cdk1 olmak üzere dört siklin-cdks tanımlanmıştır. Siklinler, G1-S fazı arasında, S fazı boyunca ve G2-M fazında eksprese olur. Ayrıca sırasıyla G1-S fazı siklini, S-fazı siklini ve G2-M fazı siklini olarak bilinir. Her bir siklin hücre döngüsünün spesifik bir fazında sentezlenir ve fonksiyonu bittikten sonra yıkılır. Hücre siklusu başladığında, Cdk'ların bazıları yıkılırken bazıları yıkılmaz. Siklinler ve Cdk'lar bağlanıp aktive olduğunda, hedef proteinin serin ve treonin rezidülerini fosforile ederler. Fosforile olmuş hedef protein hücre döngüsünün fazlarını sırasıyla gerçekleştirir. Özellikle, G1-S faz siklin ve G1-S faz Cdk'larının birkaç tipi vardır. Siklin D-Cdk4/6 kompleksi ve S fazının başlamasında fonksiyon gören siklin E-Cdk2 kompleksi buna örnektir. G2-M faz siklini ve G2-M fazı Cdk (siklin B-Cdc2 kompleksi) M fazının başlamasında fonksiyon görür ve aktive olduğunda nükleer membranın yıkılması ve kromozom formasyonunu indükler (97, 98).

Cdk/siklin kompleksinin aktivitesi, uygun olmayan şartlarda Cdk inhibitörleri (CKIs) tarafından durdurulur. INK4 inhibitörü ve Cip/Kip inhibitörleri olmak üzere CKI'lerin iki ailesi tanımlanmıştır. İnhibitörlerinin bilinen büyük çoğunluğu ATP-yarışmalıdır. Siklin-bağımlı kinazların katalitik ATP-bölgelerine bağlanarak fonksiyon görür. ATP bağlanma bölgesine bağlanmayan ATP-yarışmalı olmayan Cdk inhibitör sınıfının ise iki tipi vardır: Küçük Moleküllü İnhibitörler ve Küçük Peptid İnhibitörler. Küçük moleküllü inhibitörler, Cdk/siklin kompleksinin ATP-bağlanma bölgesiyle etkileme girmeden inhibe edebilme özelliğindedir. ATP-yarışmalı olmayan inhibitörlerin ikinci sınıfı, p21, p27 ve p57 gibi endojen Cdk inhibitörlerine benzerliklerine dayanarak sentezlenmiştir. Allosterik inhibitörler ise, ATP-bağlanma bölgesinde uzakta Cdk'lara bağlanma spesifitesi vardır. Allosterik bölgeye

sabitlenmeleri Cdk'ların konformasyonunun değişimini indükler böylece aktiviteleri modifiye olur. Abl, p38 ve MEK1 gibi protein kinazlar için umut veren stratejidir (99).

1.2.4.1.1 Hücre Döngüsünde G1-S Geçişi

G1-S süreci, hiperfosforile olmuş Retinoblastoma (Rb) geni ya da p107 ve p130 gibi ilişkili olduğu proteinler ile regüle edilir. G1 fazı süresince Rb/HDAC represör kompleksi E2F-DP1 transkripsiyon faktörüne bağlanır. Cdk4/Cdk6 ve Cdk2, düzenleyici partnerleri sırasıyla D-tip siklinler (D1, D2 ve D3) ve siklin E, G1-spesifik Cdk'ların iki farklı sınıfını sunar. Aktivasyonu S fazına girerken gereklidir. Siklin D/Cdk4-Cdk-6 aktivitesi G1-fazının ortasında meydana gelir. Çoğalmayı destekleyen koşullar altında, G1'in ortasından sonuna Rb'nin Cdk'lar tarafından inaktivasyonu, E2F'nin serbest kalmasıyla sonuçlanır. Bu E2F geninin açığa çıkması siklin E ve Cdc25'in transkripsiyonunu aktive etmek için yeterlidir. Hücre döngüsündeki bu nokta 'kısıtlayıcı nokta' olarak bilinir. Kısıtlayıcı nokta aşılsa S fazına geçiş olur (100).

İnsan hücrelerinde, G1-S geçişi transkripsiyon faktörü olan E2F'ye ve onun dimerizasyon partner proteinlerine bağlıdır. E2F fonksiyonundaki düzensizlik sıklıkla kanserle ilişkilidir (101).

1.2.4.1.2 Hücre Döngüsünde G2-M Geçişi

Kontrol noktaları, hücre döngüsünün uygun zamanlamasını garantilemek için gereken kontrol mekanizmalarıdır. DNA hasarlı olduğunda, G2 kontrol mekanizması ile mitozaya geçiş engellenir. S fazına geçiş ve G2'den mitozaya geçiş, sırasıyla serin-treonin cdk2 ve cdk1 (cdc2) ile regüle edilir. Cdk2 ve Cdk1'in aktivesi, siklin A ve siklin B ile birleşmesini ve cdk-aktive edici kinaz ile Thr161'in fosforilasyonunu gerektirir. Bu cdk-siklin kompleksi ayrıca Thr14 ve Tyr15'de fosforilasyon ile negatif olarak regüle edilir. G2/M faz geçişinde cdc25 protein fosfataz ile Thr14 ve Tyr15'in defosforilasyonu Cdk2-Siklin A (S-fazının arasında) ve Cdk1-Siklin B (G2/M) aktivasyonu tetiklenmiş olur (102).

DNA-hasarı söz konusu olduğunda, ATM/ATR aktivasyonu ve downstream kontrol noktası kinazları CHK1/CHK2 cdc25 fosfatazların fosforilasyonuna neden olur. 14-3-3 proteini için bağlanma bölgesi oluşumuna ve fosfotazın Cdk2-SiklinA ve Cdk-1-Siklin B'den ayrılmasına neden olur. Bu durum G2/M hücre-döngüsü arestine neden olur (102).

1.2.4.2 Hücre Döngüsü ve Kanser

İnsan tümörlerinin moleküler analizi, hücre döngüsü regülatörlerinin sıklıkla mutasyona uğradığını göstermiştir. Hücre döngüsü süreci, çoklu kontrol noktaları içeren yüksek derecede regüle edilen bir süreçtir. Siklin-bağımlı kinazlar (Cdk) ve onların siklin partnerleri hücre döngüsünü indükleyen pozitif regülatörlerdir.

Kanser bu pozitif regülatörlerin anormal ekspresyon ya da aktivasyonundan kaynaklanmaktadır. CKIs'in baskılanması da bir diğer tümörögenesis nedenidir. p15 (INK4B), p16 (INK4A), p18 (INK4C) ve p19 (INK4D)'u kapsayan INK4 ailesinde insan kanserlerinde ve transforme delesyon ve mutasyon olduğu bilinmektedir. CKI'lerinin ikinci ailesi p21(CIP1/WAF1), p27 (KIP1) ve p57 (KIP2) içeren Cip/Kip'te ki mutasyonlar da tümör fraksiyon ve hücre hatlarında gözlenmektedir (103).

G1/S geçişinde önemli rolü olan siklin D1 ve E birçok kanser tipinde fazla eksprese olmaktadır ve G1/S geçişi düzensiz hale gelmektedir (104). G2/M kontrol noktası genomik doğruluğun sağlanmasında temel göreve sahiptir. G2/M kontrol noktasında ki düzensizlikler kanserle ilişkilendirilmiştir. ATR, ATM, NBS1, BRAC1 ve 14-3-3ε gibi G2 yolağıyla ilişkili olan genlerdeki mutasyonlara da kanserli hücrelerde rastlanmaktadır. Bu nedenle G2/M geçişi kontrol noktası genomik kararlılığın devamı için önemlidir (105)

BÖLÜM II

2.1 Gereç ve Yöntem

2.1.1 Hücre Kültürü

Hücre kültürü teknolojisi son yıllarda majör rol oynamaktadır. Hücre biyolojisi çalışmalarında, ilaçların hücre üzerindeki etkisinin çalışmasında, toksisite ve kanser araştırmalarında, gen terapisinde, genetik mühendislikte önemli yer tutmaktadır. Hücrelerin içinde bulunduğu şartların kontrolüne imkan sağlaması, homojen yapıda olması, tekrarlanabilir olması hücre kültürünün avantajlarındanıdır. İn vitro olarak çalışma imkanı sağlayan hücre kültüründe kullanılan besi ortamı hücrelerin yaşayıp, proliferere olmaları için gerekli içeriğe sahip olmalıdır.

Çalışmamızda kullandığımız kronik myeloid lösemi hücre hattı olan K562 için %4 Fetal Sığır Serumı (FBS), 2mM L-glutamin, %1 Penisilin/Streptomisin (Biological Industries) içeren RPMI 1640 (Biological Industries)besi ortamı kullanılmıştır. Hücreleri çalışmada uygulanacak işlemlere hazırlamak için hücreler 25 cm²'lik flasklara ekilmiştir. Hücreler yeterli sayıya ulaşıncaya kadar 37°C'de %95 nem ve %5 CO₂'li inkübatörde inkübe edilmiştir. Işık mikroskobu ile hücrelerin proliferasyonu takip edilmiştir.

Tablo 2: Hücre kültüründe kullanılan kimyasallar ve malzemeler

15 ve 50 ml falkon tüp (Corning)	Hassas terazi
25 ve 75 cm ² lik flask (Corning)	K562 hücre hattı (ATCC)
6' lı mikropalak (Corning)	Inverted mikroskop
96' lı mikropalak (Corning)	Işık mikroskobu
Calyculin A	Laminar Air Flow
Amizadole	L-glutamin (Biological Industries)
Annexin V-EGFP Apoptosis Detection Kiti (Biovision)	Neubauer Lam
Apo-Direct™ Kit (BD Pharmingen™)	PBS
Dasatinib (Selleckchem)	Penisilin/Streptomisin (Biological Industries)

Okadaik asit (Abcam)	pH-metre
CO ₂ 'li incubator	Pipetman seti (0,1–1000µl)
Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche)	RPMI 1640 (Biological Industries)
Derin dondurucu	Santrifüj
DMSO (Sigma)	Triton –X
Etanol (Sigma)	Soğutmalı Santrifüj
Filtre 0,2 µm (Millipore)	Glycerol
BSA	Tripan Blue (Biological Industries)
Fötal bovine serum (Biological Industries)	Vortex

2.1.2 Hücrelerin Dondurulması ve Çözdürülmesi

Hücre kültürü çalışmalarının uzun süre devam etmesi, kontaminasyon ve üreme hızının düşüşü gibi sorunlara yol açar. Bunun önüne geçebilmek ve geriye dönebilme imkanı sağlamak için hücreler dondurulur.

Hücrelerin dondurma işlemi için; belli bir sayıya ulaşan hücreler, 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilip dibe çöktürülür. Santrifüj esnasında dondurma ortamı hazırlanır. Dondurma ortamı olarak %10 DMSO içeren FBS çözeltisi hazırlanır. Santrifüjden sonra hücreler alınıp süpernatant uzaklaştırılır ve hazırlanan dondurma çözeltisi ile pipetaj yapıp kryotüplere aktarılır. Önce -20°C sonra da -86°C'ye kaldırılır.

Hücre çözme işlemi için hücreler -86°C'den alınıp kryotüplerin içinde serumsuz besi ortamı ile pipetaj yapıp 15 ml'lik ortam içeren falkonlara alınır. 2000 rpm'de 10 dk santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırılmıştır. Aynı işlem iki kez tekrarlanır. İkinci santrifüjde sonra süpernatant atılıp hücrelere serumlu besi ortamları eklenir ve hücreler 25 cm²'lik flasklara ekilir ve inkübatörde inkübasyona bırakılır.

2.1.3 Hücrelerin Pasajlanması

Hücre sayısı arttıkça hem besi ortamı hücreler için yetersiz hale gelir, hem de kültür kabında yer olmadığı için kontakt inhibisyon adı verilen mekanizma ile hücrelerin çoğalmaları durur. Hücrelerin bir kısmını ya da tamamını yeni besi ortamına alma işlemine hücre pasajlanması denir.

Çalışmamızda süspanse hücreler belli bir yoğunluğa ulaştıklarında falkonlara alınıp 1200 rpm'de 5 dk çevrilmiştir. Süpernantant uzaklaştırılıp üzerine besi ortamı eklenmiş ve bölüştürülerek yeni flaskalara ekim yapılmıştır. Hücreler tekrar inkübatöre kaldırılıp inkübasyona bırakılmıştır.

2.1.4 Hücre Canlılık Testi

Hücrelerin canlılıklarını ve sayılarını kontrol etmek için, Tripan mavisi boyası uygulanmıştır. Bunun için, 50 µl süspanse hücreye 50 µl boya karıştırılıp, ışık mikroskobu ile hücrelerin canlılığına ve sayısına "Neubauer" lamile bakılmıştır. Bu nedenle, "Neubauer" lamındaki 4x4' lük karelerden oluşan dört adet alan sayılmıştır. Hücre zarı bütünlüğü bozulduğu için Tripan mavisi boyasını içine alan ve mavi renkte görünen hücreler ölü, hücre zarı yapısı bozulmamış hücreler boyayı içine almadığı için canlı olarak kabul edilmiştir. Sayılan canlı hücrelerin toplamlarının ortalamasını alıp dilüsyon faktörü ve 20.000 ile çarpıp, ml'deki canlı hücre sayısı hesaplanmıştır. Mavi görünümde olan yani ölü hücreler için de aynı sayım gerçekleştirildiğinde, ml'deki ölü hücre sayısı hesaplanmıştır. Canlı hücre sayısının toplam hücre sayısına % olarak oranlanmasıyla hücre canlılığı hesaplanmıştır.

2.1.5 Sitotoksite Analizi

Etken madde dasatinibin K562 hücreleri üzerine sitotoksitesini saptamak için WST-1 (WST-1 Cell Proliferation Reagent, -Roche) yöntemi kullanılmıştır. WST-1 analizi canlı hücrede mitokondriyal dehidrogenazlarla sarı tetrazolium tuzlarının kesilerek turuncu formazan rengine değişmesine dayanmaktadır. Çalıştığımız kronik myeloid lösemi hücre hattı olan K562 hücreleri 96-kuyucuklu platelerde başlangıç yoğunluğu 1 ml'de 6×10^5 olacak şekilde hesaplanıp her bir kuyucuğa 50 µl dağıtılmıştır ve üzerine

50 µl içerisinde ilaç içeren ortam eklenerek toplam 100 µl'ye tamamlanmıştır Hücrelere 0,00001-100 nM doz aralığında dasatinib etken maddesi eklenmiştir. Son sıraya etken madde dasatinib verilmemiş ve kontrol grubu olarak kabul edilmiştir.

Sitotoksosite analizi için deney 24, 48 ve 72. saat olmak üzere üç günlük kurulmuştur. Her üç günün inkübasyonundan sonra 10 µl WST-1 solüsyonu eklenmiş ve 30 dk inkübe edilmiştir. 30 dk'lık süreden sonra oluşan turuncu renkteki formazan boyasının kantitatif ölçümü 30 dk'da bir mikropalak okuyucusunda (Multiskan FC, Thermo) 450 nm absorbans 620 referans aralığında ölçülmüştür. Etken madde dasatinibin IC₅₀ değeri sigmodial doz-cevap eğrisi analizi ile CalcuSyn® (Biosoft) yazılımında hesaplanmıştır.

2.1.6 Apoptoz Analizleri

Dasatinibin IC₅₀ dozu ile okadaik asit 2,5 nM ve 25 nM olmak üzere seçilen iki dozunun K562 hücrelerindeki apoptotik etkisi 48 saatte çalışılmıştır. Bunun için 6-kuyucuklu platelere kuyucuk başı 1x10⁶ hücre ekilmiştir. Dasatinib ve inhibitör uygulanmayan gruplar kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Apoptoz analizleri Annexin V ve Apo Direct Tunnel testi olmak üzere iki farklı yöntem ve üç tekrarlı olarak yapılmıştır.

2.1.6.1 Annexin V Yöntemi

Annexin V analizi apoptoza giden hücrelerin sayısını belirleyen bir testtir. Apoptotik ve ölü hücreyi etiketlemek için annexin V proteini kullanılır. Yöntem için ya flow sitometri ya da floresan mikroskobu kullanılır. Normal hücrelerde negatif fosfolipidlerin hücre membranının içindedir. Apoptoz sırasında gerçekleşen olaylardan biri negatif yüklü fosfolipidlerinin dışa doğru birikmesidir. Annexin V proteini membran yüzeyindeki fosfolipidlerine bağlanır. Fluorokroma bağlı annexin-V ile canlı hücrelerin boyanmasıyla apoptozun erken fazındaki hücreler saptanabilir. Canlı ve ölü hücreleri membran bütünlüğüne bağlı olarak ayıran propidium iyodür (PI) ile birlikte kullanıldığında, geç apoptotik/nekrotik hücreler erken apoptotik hücrelerden ayırt edilebilmektedir.

Boyanmayan hücreler canlı demektir. Geç apoptotik durumdaki hücreler yüzeylerinde fosfatidilserin ifade ettikleri için PI' yı içlerine alırlar. Sonuçlar, akım sitometresi ya da floresan mikroskobu ile yorumlanabilmektedir.

Tablo 3: Annexin V kit içeriği (BD)

<u>Anneksin V-EGFP Kit İçeriği:</u>
1. Binding Buffer, 100 ml
2. Propidium Iodide, 1ml
3. Annexin V FITC, 1ml

Anneksin V-EGFP Yöntem Protokolü:

1. Kültüre edilen K562 hücreleri dasatinibin IC₅₀ dozunda, okadaik asidin 2,5 nM ve 25 nM olmak üzere seçilen iki dozuyla 48 saat inkübe edilmiştir.
2. 5×10^5 hücre santrifüj edilmiştir ve toplanmıştır.
3. 100 µl Binding Buffer eklenerek hücreler resüspanse edilmiştir.
4. 1 µl Anneksin VEGFP ve 1 µl PI eklenmiştir.
5. 5 dakika karanlıkta oda sıcaklığında bekletilip, akım sitometrisi ile 20000 hücrenin değerlendirilmesi yapılmıştır.

2.1.6.2 DNA Fragmentasyon (Tunnel) Yöntemi

Tunnel, apoptotik sinyal kaskadı sonucunda oluşan DNA fragmentasyonunu saptamak için kullanılan genel bir yöntemdir. Bu analiz, dUTP'nin eklenmesini katalizleyen TdT ya da terminal deoksinükleotid transferaz ile tanımlanabilen, DNA'da ki çentiklerin varlığına dayanır. ApoDirect In Situ DNA Fragmentation Assay Kit 'i (Becton Dickinson) bu olay esnasında oluşan parçalanmış DNA fragmentlerinin 3'hidroksil uçlarına terminal deoksinükleotid transferaz (TDT) enzimi ile fluorescein-12-dUTP' yi

bağlamaktadır. Floresan işaretli DNA bu şekilde akım sitometrisi ile analiz edilebilmektedir.

Tablo 4: Apo direct Tunnel Kit İçeriği (Becton Dickinson)

1.	25 ml, PI/RNase Staining Buffer
2.	0.5 ml Reaction Buffer
3.	100 ml, Rinsing Buffer
4.	100 ml, Wash Buffer
5.	0.4 ml, FITC-dUTP
6.	0.038 ml TdT Enzim içermektedir.

Apo-Direct Yöntemi Protokolü:

1. 6 kuyucuklu platede kuyucuk başına 1×10^6 hücre olacak şekilde hücre ekilmiştir.
2. Hücreler dasatinibin IC₅₀ dozu 4,6 nM ve okadaik asidin 2,5 nM ve 25 nM olarak seçilen iki dozu ile 48 saat süresince inkubasyona bırakılmıştır.
3. 48 saat sonunda hücreler toplanıp santrifüj edilmiştir.
4. Daha sonra hücreler 500µl PBS ile resüspanse edilip ve 2000rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
5. Hacimce %1'lik 5ml paraformaldehit hücrelerin üzerine eklenip 15 dk buz üzerinde fiksasyon edilmiştir.
6. 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edilen hücrelerin üstündeki, süpernatant uzaklaştırılmış ve üzerlerine 5ml PBS eklenmiştir. Bu işlem iki kez tekrar edilmiştir.
7. Süpernatantları tekrar uzaklaştırılan hücrelere 500µl PBS ile resüspanse edilip 5ml soğuk %70'lik etanol eklenmiştir.
8. Etanol ile fikse olan hücreler homojenize hale getirilip 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
9. Süpernatantları atılıp 1 ml yıkama tamponu ilave edilip, 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve bu işlem iki kez tekrar edilmiştir.

10. Hazırlanmış olan staining solüsyonundan (10µl TdTReaction Buffer + 0.75µl TdT Enzyme 8µ FITC-dUTP + 32.25µl ddH₂O) tüplere 50µl eklenmiştir.
11. Hücreler bu solüsyonda 60 dk, 37°C'de inkübe edilmiştir.
12. 60 dakika sonrasında 1 ml Rinse Buffer ilave edilmiş ve 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki kez yapılmıştır.
13. Süpernatantlar uzaklaştırılmış ve pellet üzerine 500µl Propidium Iodide/RNase A Solution ilave edilip hücreler resüspanse edilmiştir.
14. Hücreler 30 dk boyunca karanlıkta bekletilmiştir.
15. Akım sitometrisi ile 20000 hücrenin analizi yapılmıştır.

2.1.7 Hücre Döngüsü Analizi

Hücre döngüsünde rolü olan PP2A'nın inhibitör uygulanarak inhibe edildiğinde hücre döngüsündeki değişimi incelemek amacıyla hücre döngüsü analizi yapılmıştır. Bu yaklaşım, G1, S ve G2 olmak üzere hücre döngüsünün üç ana fazının dağılımını ortaya koyar ve kısmi DNA içeriğiyle apoptotik hücreleri saptamayı mümkün kılar. Döngünün farklı fazlarında nukleustaki DNA miktarı da değişmektedir. Hücre döngüsü süresince gerçekleşen değişimler nedeniyle, DNA içeriğinin analizi G1, S, G2 ve M fazları arasındaki ayrımı sağlar.

Çalışmamızda BD Cycletest™ Plus DNA Reagent Kiti hücre döngüsü analizi amacıyla kullanılmıştır. Non-iyonik deterjan ile hücre zarının lizisine, tripsin ile hücre sitoskeleti ile nükleer proteinlerin uzaklaştırılmasına, Ribonükleaz A ile RNA'nın sindirilmesine ve spermin ile nükleer kromatinin stabilhale getirilmesi esasına dayanmaktadır. Propidium iodide (PI) nukleustaki DNA'yı boyamak için kullanılmıştır.

Tablo 5: BD Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit içeriği:

1.	Trypsin in spermine tetrahydrochloride detergent buffer (Solution A)
2.	RNase A and trypsin inhibitor in spermine buffer (Solution B)
3.	Propidium Iodide (PI) in spermine buffer (Solution C)
4.	Dimethylsulfoxide (DMSO) in sucrose-sodium citrate (Buffer Solution)

BD Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit Yöntemi Protokolü:

1. 6-kuyucuklu platlere kuyucuk başına hücre sayısı 5×10^5 olacak şekilde hücre ekilip, dasatinibin IC₅₀ dozu ve okadaik asidin 2,5 nM ve 25 nM dozlarında 48 saat boyunca inkübe edilmiştir.
2. Hücreler santrifüj edilerek toplanmıştır.
3. 500 µl PBS ile hücrelersüspanse edilip 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
4. Santrifüjden sonra süpernatant atılıp hücrelere 500µl buffer solüsyonu eklenip resüspanse edilip, 2500 rpm'de 5dk santrifüj edilmiştir ve bu işlem 2 kez tekrar edilmiştir.
5. Santrifüjden sonra süpernatant tamamıyla uzaklaştırılıp hücrelerin üzerine 125µl solution A eklenmiştir ve resüspanse edilip 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.
6. Hücreler üzerine 100µl solution B eklenip tekrar 10 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.
7. Hücreler üzerine 100µl solution C eklenip 10 dk 2°C -8°C'de bekletilmiştir.
8. 20000 hücrenin analizi akım sitometrisi ile analiz edilmiştir.

2.1.8 Serin/Treonin Fosfotaz Analizi

Dasatinibin PP2A katalitik ve reglatuvar alt birimlerinin enzim aktivitesine etkisini değerlendirmek için Serin/Treonin Fosfotaz kiti(Promega) ile analiz yapılmıştır. Non-radyoaktif serin/treonin fosfataz analiz sistemi serin/treonin fosfataz aktivitesini ölçmek için hızlı, rahat bir metoddur. Analiz reaksiyonda üretilen serbest fosfat miktarını saptamaya dayanır. Bu amaçla 6 kuyucuklu platelere toplamda 2×10^6 hücre ekilmiştir. Etken madde dasatinib uygulanmayan grup kontrol grubu olarak kabul edilmiştir. 24, 48 ve 72. saatler olmak üzere üç gün ve üç tekrarlı olmak üzere deney kurulmuştur.

Hücreler 6 kuyucuklu plateden toplanmış ve lizis tamponu ile yıkanmıştır. Lizis tamponu, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.05% Triton X-100, 0.1 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 0.05% β-mercaptoethanol, 10% glycerol içermektedir. Çalışma soğuk ortamda gerçekleştirilmiştir. Kitin içerisindeki

spin kolonları 10 ml deionize su, 10 ml Sephadex G25ve 10 ml fosfataz storage tamponu ile yıkanmıştır. Daha sonra, 250 µl hücre lizati kolon içine eklenmiş, 600xg'de 5 dk +4°C'de santrifüj edilmiştir. Çalışmada kullanılacak standartlar için kit içerisinde bulunan 1 mM'lık phosphate standartı gerekli dilisyonlar yapılarak 0, 25µM, 12,5µM, 6.25µM, 3.125µM ve 1,56µM'lık dilüsyonlar hazırlanmıştır.

Reaksiyona eklenecek boya için, 1 ml Molybdate Dye Solüsyonuna 10 µl Molybdate Dye Additive eklenmiştir. Ayrıca reaksiyonlara eklenmek üzere 1.33 ml fosfat-içermeyen suda RRA(pT)VA Serin/Treonin Phosphopeptide çözülmüştür.

Tablo 6:Serin/treonin fosfataz analizi içinPromega Kit içeriği

20 ml Molybdate boya solüsyonu
• 200 µl Molybdate Dye Additive Solüsyonu
• 1 ml Phosphate Standard, (Konsantrasyon: 1mM)
• 1mg Ser/Thr Phosphopeptide
• 1 adet 96-kuyucuklu Plate (½ -area, flat-bottom)
• 4 Spin Kolonu, Rezervuarlar ve Adaptorler
• 40ml Sephadex® G-25
• 25ml Phosphate-Free Water

Protein Fosfotaz Analiz Protokolü:

- 1) Verilen Phosphate-Free Water ile 1mM fosfotaz standartı ile dilue ederek uygun fosfataz standartları hazırlanmıştır.
- 2) 96-well plate içinde uygun premix solüsyonları hazırlanmıştır.
- 3) 96-well plate istenen reaksiyon sıcaklığına yerleştirilmiştir.
- 4) Kuyucuklara enzim örnekleri eklenerek reaksiyon başlatılmıştır.
- 5) Reaksiyon hazırlanan Molybdate Dye/Additive karışımdan 50µl eklenerek durdurulmuştur.

6) 96-well plate 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.

7) 630 ya da 600 nm de plate reader kullanarak örneklerin optik yoğunluğu okutulmuştur.

2.1.9 Protein İzolasyonu

Western Blot analizi için protein izolasyonu yapılmıştır. Bu amaçla, complete mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets in EASYpacks (Roche) kiti kullanılmıştır. 6-kuyucuklu platelere hücre ekimi yapılmıştır. 24, 48 ve 72.saat lerde dasatinib uygulanmış ve bunların her birinin etken madde uygulanmayan kontrolleri için ayrı ayrı 3×10^6 hücre ekilmiştir.

Tablo 7: Protease Inhibitor Cocktail Tablets in EASYpacks (Roche) kit içeriği

• Lyses Buffer, 50 ml
• 20 adet paketli tablet

Kit protokolü:

- 1- Hücreler toplanıp 1200 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
- 2- Hücreler PBS eklenerek ependorfa aktarılmıştır.
- 3- 2500 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir.
- 4- Bu esnada Lyses-M buffer hazırlanır. Bunun için, 10 ml bufferın içine 1 adet mini tabletlerden atılıp iyice çözünmesi sağlanmıştır.
- 5- Santrifüjen alına hücrelerin süpernatantları atılmış ve hücreler 100 µl Lyses-M bufferda çözülmüştür.
- 6- Hücreler 10 dk bekletilir.
- 7- Hücreler 14000 g'de 15 dk santrifüj edilmiştir.
- 8- Süpernatant atılıp protein izole edilmiştir.

2.1.10 Protein Tayini

2.1.10.1 Lowry Metodu

Bir çözeltideki protein içeriğinin saptanması için hızlı ve güvenilir bir protein tayin yöntemidir. Alkali ortamda bakır iyonu (Cu^{+2}) proteinlerdeki peptid bağları ile bir kompleks oluşturur ve Cu^{+1} e indirgenir. İndirgenmiş bakır ve proteinlerin yan zincirinde yer alan Tyr, Trp ve Cys aminoasitleri Folin-Fenol reaktifini indirgeyerek renk oluşumuna neden olur. Oluşan rengin şiddeti protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Çalışmamızda Lowry metodu ile protein tayini için Varioskan™ Flash Multimode Reader (Thermo Scientific) cihazı kullanılmıştır.

Lowry Yöntemi Protokolü:

- 1) % 2'lik Sodyum karbonat çözeltisi 100 ml'de hazırlanmıştır.
- 2) %1'lik bakır sülfat çözeltisi için 1 ml distile suda çözülmüştür.
- 3) %2,7'lik Na-K-Tartanat.4H₂O 1 ml distile suda çözülmüştür.
- 4) Tüm çözeltiler taze hazırlanmıştır.
- 5) Folin hazırlamak için 1 N HCl kullanılmıştır. Bire bir oranında kullanılmıştır.
- 6) Örnek, standartlar ve kör için distile su, alkali bakır çözeltilerinden 5, 20 ve 125 µl olmak üzere plate'e eklenmiştir.
- 7) 10 dk plak çalkalayıcıda bekletilmiştir.
- 8) Örnek, standart ve köre 25 µl Folin eklenmiştir
- 9) 30 dk plak çalkalayıcıda bekletilmiştir.
- 10) 720 nm dalga boyunda okutulmuştur.

2.1.11 Western Blot Analizi

Western Blot, bir protein solüsyonunda, aranan bir proteinin olup olmadığını ve varsa ne kadar olduğunu tespit etmek için kullanılan bir yöntemdir. Proteinlerin poliakrilamid jelde elektroforez ile ayrılması ve ayrılan proteinlerin otoradyografi, ultraviyole ışığı ya da peroksidaz reaksiyon ürünü ile gösterilmesidir. Western blotlama için ilk adım olarak, SDS-PAGE jel elektroforezi yapılır. Proteinler 3-boyutlu yapılar denatüre edilip polipeptit

uzunluklarına göre ayrılır. Daha sonra proteinler membrana aktarılır. Bu membran genellikle Nitroselüloz ya da PVDF dir. Burada hedef proteini belirlemek için antikorlarla muamele edilir. Western blot analizinin genel aşamaları; Jel elektroforezi, transfer, blocking, Primer ve Sekonder Antikor ile tespit ve görüntülemedir. Çalışmamızda dasatinib ile muamele edilen K562 hücrelerinde PP2A ve alt birimlerinin protein ekspresyon seviyelerini saptamak için Invitrogen iBlot™ Dry Blotting System kullanılarak western breeze kiti (Thermo Fisher Scientific) ile western blot analizi yapılmıştır.

Tablo 8 : Western Breeze Kit Bileşenleri

• Blocking/Diluent A
• Blocking/Diluent B
• Antibody wash solution
• De-bubbling rulosu
• Kromojenik substrat

Protokol:

1. İzole edilen proteinlerin Lowry yöntemi ile miktarı saptanmıştır. Hazır jelde her bir kuyucuğa eşit protein miktarı yüklenecek şekilde örneklerden kaç µl protein kullanılacağı hesaplanmıştır.
2. Jelde yürütmek için, LDS Sample Buffer (4X), H₂O, Reducing Buffer (10X) ve hesaplanan miktardaki protein karışımı ve marker jele yüklenmiştir.
3. Jelin yürütmesi için 475 ml distile su ile 25 ml Running Buffer karıştırılıp tampon hazırlanmıştır.
4. Örnekler hazır jele yüklendikten sonra 200 V'da 60 dk yürütülmüştür.
5. Jelden membrana tranfer için iblot cihazının programı ayarlanmıştır. Anot ve katot stackları, yürütülen jel ve transfer membranı düzgünce yerleştirdikten sonra 8 dk'lık program seçilmiş ve transfer gerçekleştirilmiştir.

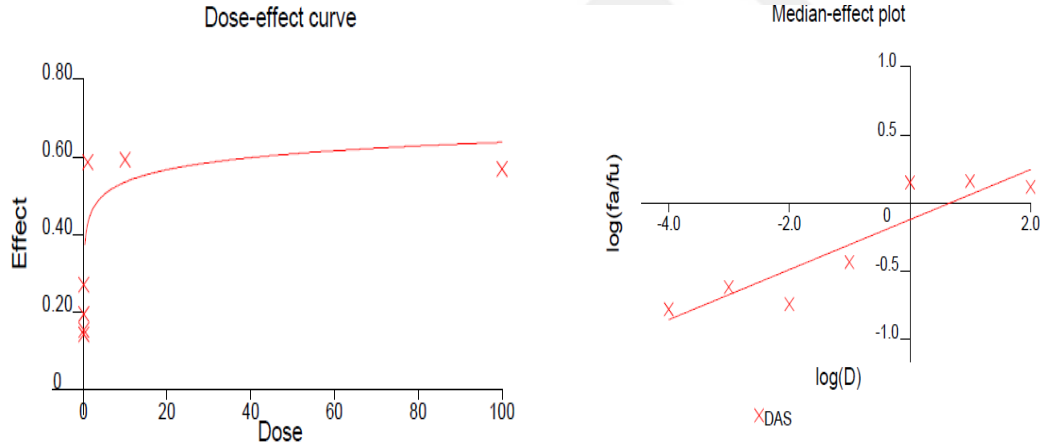
6. Jel transferinden sonra membrana bloklama işlemi yapılmıştır. 1 saatlik blokma süresince membran shakerda bekletilmiştir. Blocking solüsyonu için 5 ml H₂O, 2 ml Dilüent A ve 3 ml Dilüent B karışımı hazırlanmıştır.
7. 1 saatlik sürenin ardından primer antikor uygulaması yapılmıştır. Primer antikor olarak PP2A'nın A ve C alt birimlerinin ile regülatör B alt biriminin antikorları kullanılmıştır.
8. Bir saatlik primer antikor uygulamasından sonra 3 kez wash solution ile yıkama yapılmıştır.
9. Yıkamaların ardından sekonder antikor eklenmiştir ve shakerda bekletilmiştir.
10. Antibody wash solüsyonu ile 5'er dakikadan 3 kez yıkama yapılmıştır.
11. Sonrasında 2'şer dakikadan iki defa membran su ile yıkanmıştır.
12. Su uzaklaştırıldıktan sonra membran üzerine 5 ml Chromogenic substrat reaktifi eklenmiştir.
13. 5 dk. oda sıcaklığında bekletilmiştir.
14. Membranda mor bant görülene kadar shaker da bekletilmiş ve bant elde edildikten sonra görüntülenmiştir.

BÖLÜM III

3.1 BULGULAR

3.1.1 Dasatinibin K562 Hücre Serisi Üzerine Sitotoksik Etkisinin WST-1 Testi ile Değerlendirilmesi

Kronik miyeloid lösemiye (KML) model hücre serisi K562 hücrelerinin sitotoksikite analizleri WST-1 testi ile yapılmıştır. Deneylerde 6×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde üç tekrarlı olarak çalışılmıştır. Dasatinibin 0,00001-100 nM aralığındaki dozları 24, 48 ve 72. saatler olmak üzere hücrelere uygulanmış ve sitotoksitesi belirlenmiştir. Dasatinib ile muamele edilmeyen hücreler de kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Dasatinibin K562 hücrelerinde IC_{50} dozu 48.saatte 4,6 nM olarak bulunmuştur. (Grafik 1).



Grafik 1: K562 hücrelerinde Dasatinibin sitotoksitesi

3.1.2 Dasatinibin ve Okadaik Asitin K562 Hücre Serisi Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Değerlendirilmesi

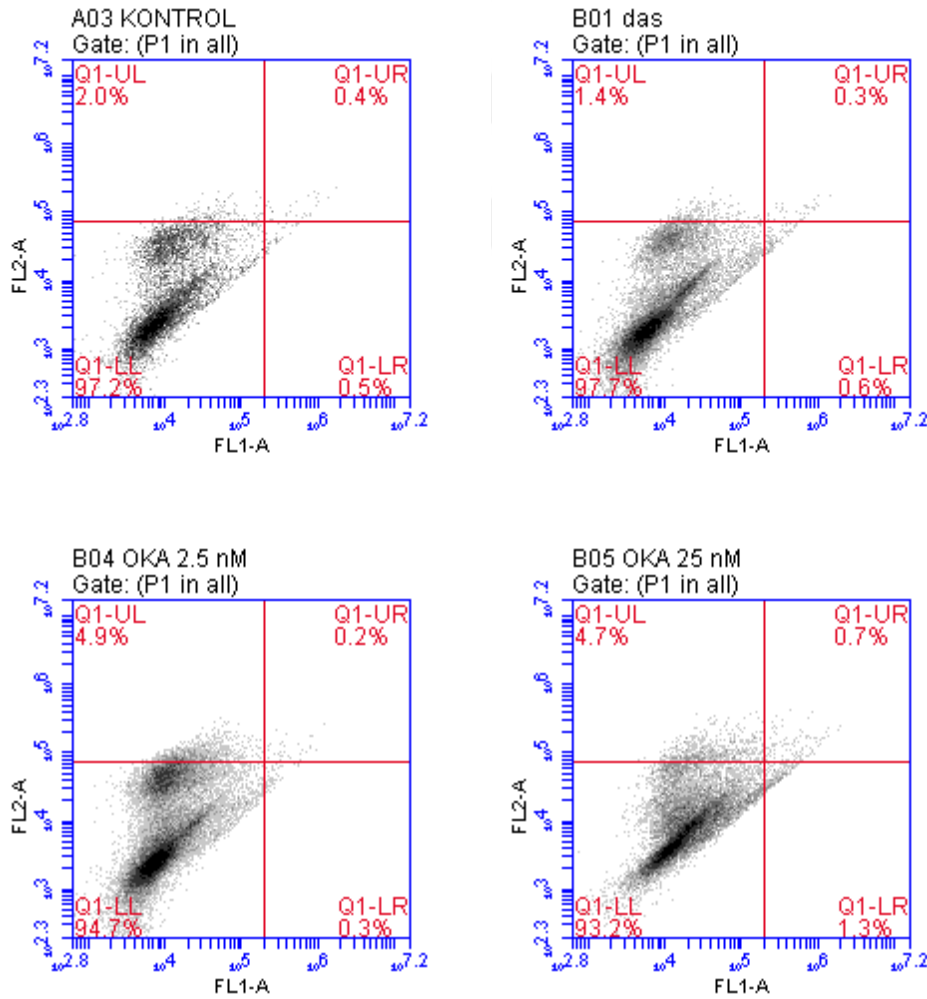
Dasatinibin IC_{50} dozu 4,6 nM ve okadaik asitin 2,5 nM ve 25 nM olarak seçilen iki dozu ile 48. saatte apoptoz çalışması yapılmıştır. Uygulanan

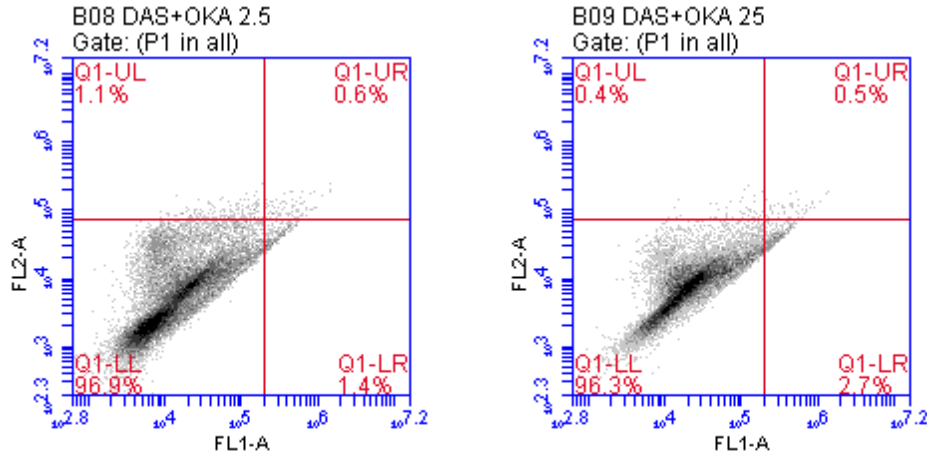
maddelerin K562 hücre serisi üzerindeki apoptotik etkileri, Annexin V ve Apo Direct Tunnel yöntemleri kullanılarak saptanmıştır.

3.1.2.1 Annexin V Metodu ile Dasatinib ve Okadaik asit'in K562 Hücre Serisi Üzerindeki Apoptotik Etkisinin Değerlendirilmesi

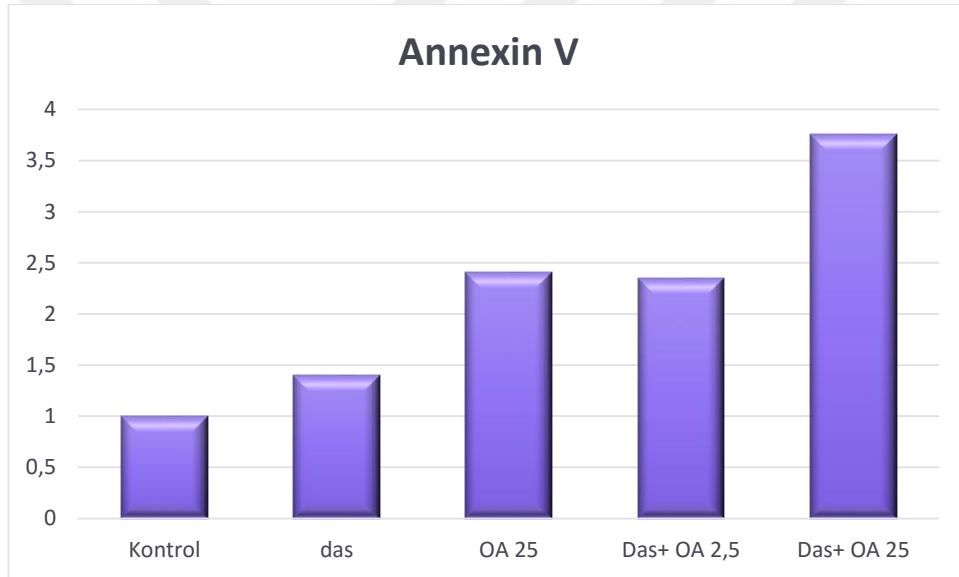
Annexin V yöntemi ile dasatinibin IC_{50} dozu ile PP2A inhibitörü okadaik asitin 2,5 nM ve 25 nM'lık dozlarına bakıldığında, 48. saatte kontrole göre dasatinib ile muamele sonucu 1,4 kat, okadaik asitin 25 nM dozunda 2.41 kat, apoptoz artışı saptanmıştır. Dasatinibin IC_{50} dozu ile okadaik asitin 2,5 ve 25 nM dozlarının ayrı ayrı kombinasyonlarında sırasıyla 2,35 ve 3,76 kat artış belirlenmiştir (Grafik 2).

A)





B)



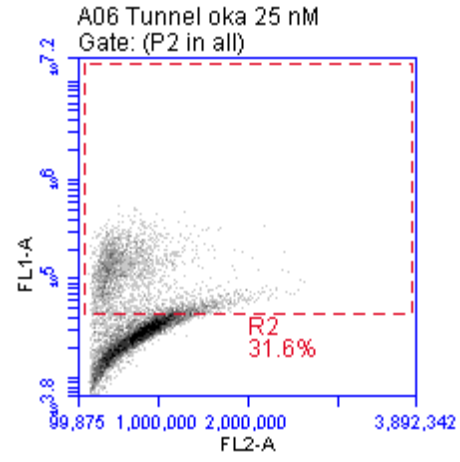
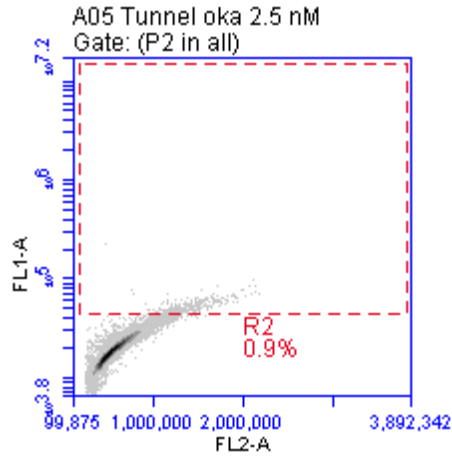
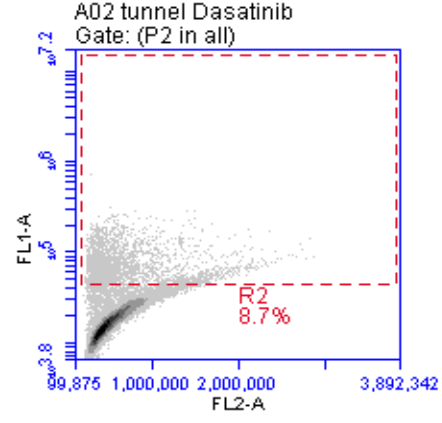
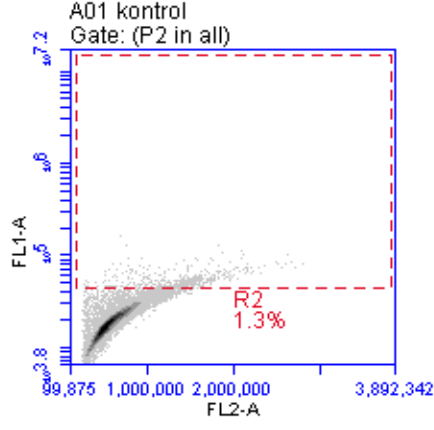
Grafik 2 : K562 hücre serisi üzerine dasatinib, OA ve kombinasyonlarının apoptotik değişime etkisi (Annexin V)

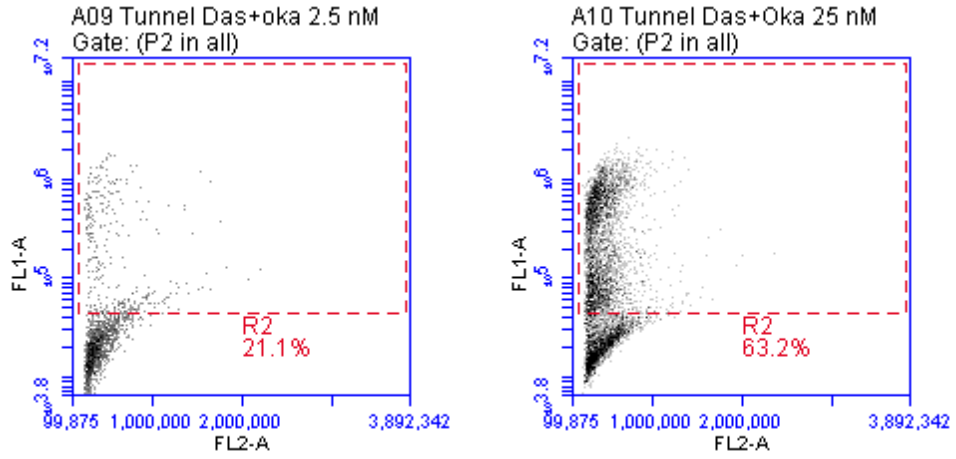
3.1.2.2 Apo Direct Tunel Yöntemi İle Dasatinib ve Okadaik asitin K562 Hücre Serisi Üzendeki Apoptotik Etkisinin Değerlendirilmesi

Apo Direct Tunel analiziyle, kontrol grubu ile kıyaslandığında dasatinibin IC₅₀ dozu 4,6 nM'da 6.79 kat, 25 nM okadaik asit uygulanan grupta 24,65 kat, dasatinib ve okadaik asitin 2,5 nM doz kombinasyonunda 16,45 kat, dasatinib

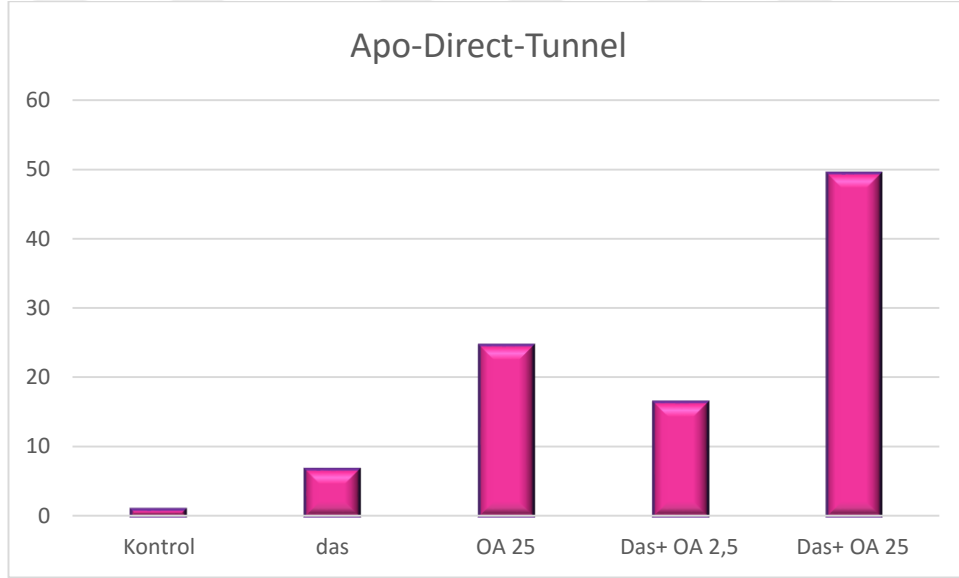
ve okadaik asit 25 nM kombinasyonunda ise 49,38 kat apoptoz artışı gözlenmiştir (Grafik 3).

A)





B)

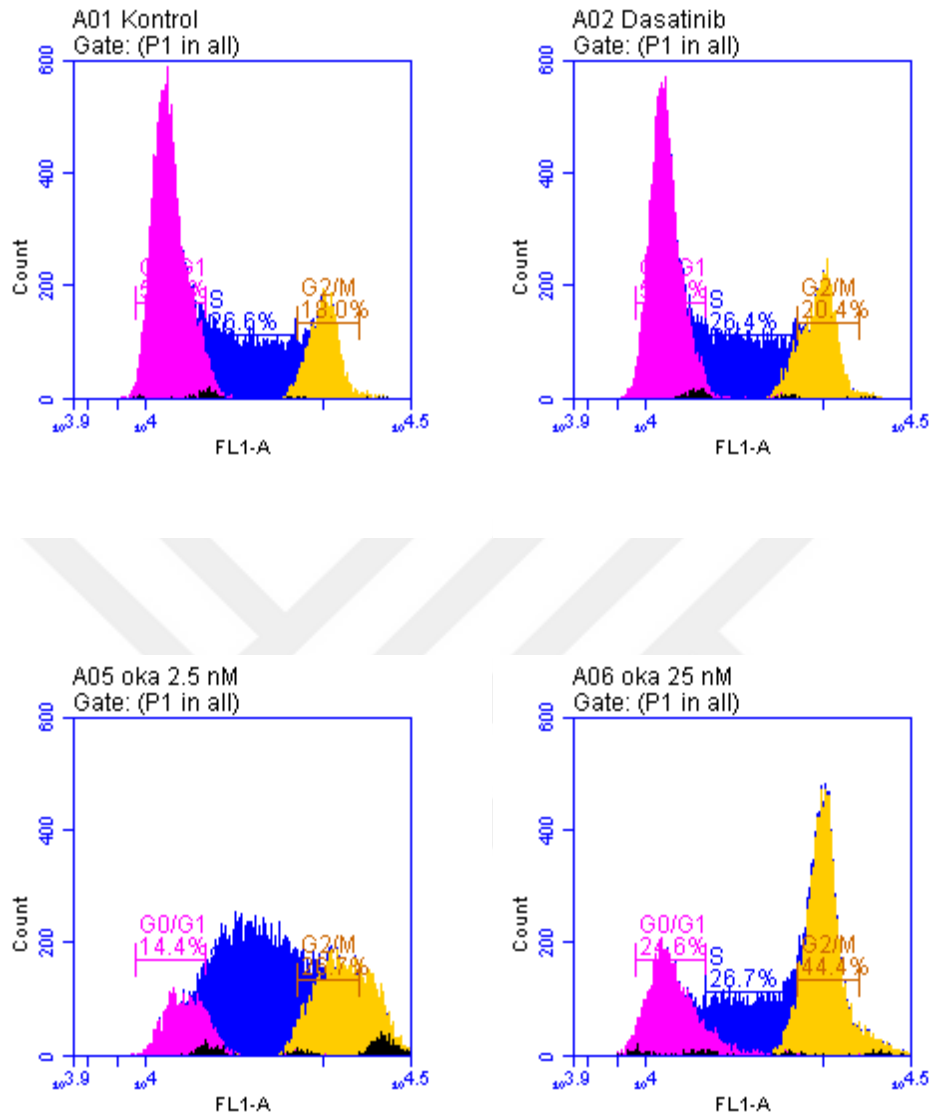


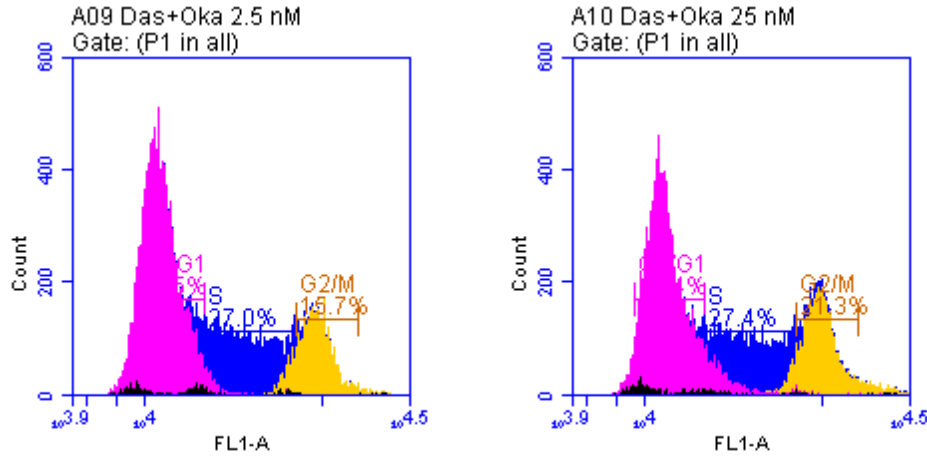
Grafik 3: K562 hücre serisi üzerine dasatinib, OA, Cal A ve kombinasyonlarının apoptotik değişime etkisi (Tunnel Yöntemi)

3.1.3 PP2A'nın Hücre Döngüsü Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Dasatinibin IC₅₀ dozu ile okadaik asit 2,5 nM ve 25 nM tek tek ve dasatinib ile kombinasyonlarının PP2A üzerinden hücre döngüsüne etkisini belirlemek için başlangıçta 6-kuyucuklu platelere kuyucuk başı 5x10⁵ ekilmiştir. Hücre döngüsü analizi sonuçlarımıza göre, okadaik asitin 2,5 ve 25

nM da G2/M fazında kontrole kıyasla sırasıyla 1,48 ve 2,46 kat artış belirlenmiştir (Grafik 4).



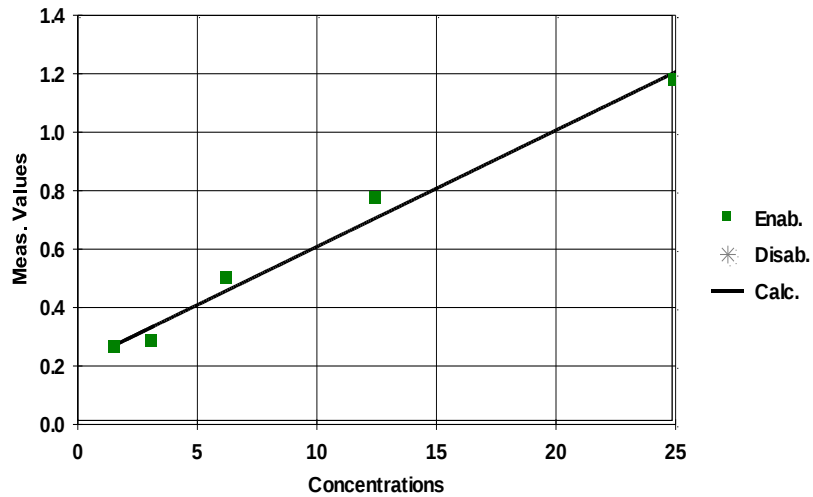


Grafik 4: Dasatinib ve OA'in hücre döngüsü üzerine etkisi

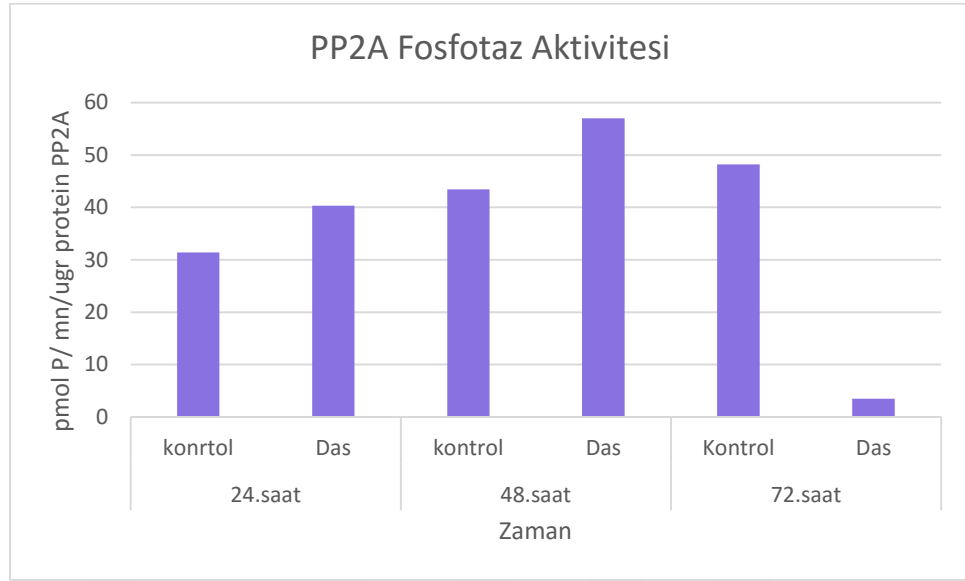
3.1.4 Dasatinibin PP2A Enzim Aktivitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Bu amaçla 6-kuyucuklu platelere 24., 48. ve 72. saatler için doz ve kontrol olmak üzere ayrı ayrı kuyucuk başı 2×10^6 hücre ve üç tekrarlı olacak şekilde ekim yapılmıştır. K562 hücrelerinin, dasatinibin IC_{50} dozu ile muamelesi sonucunda PP2A'nın enzim aktivitesinde 72. saatte kontrole kıyasla 13,9 kat azalış gözlenmiştir (Grafik 5).

(A)



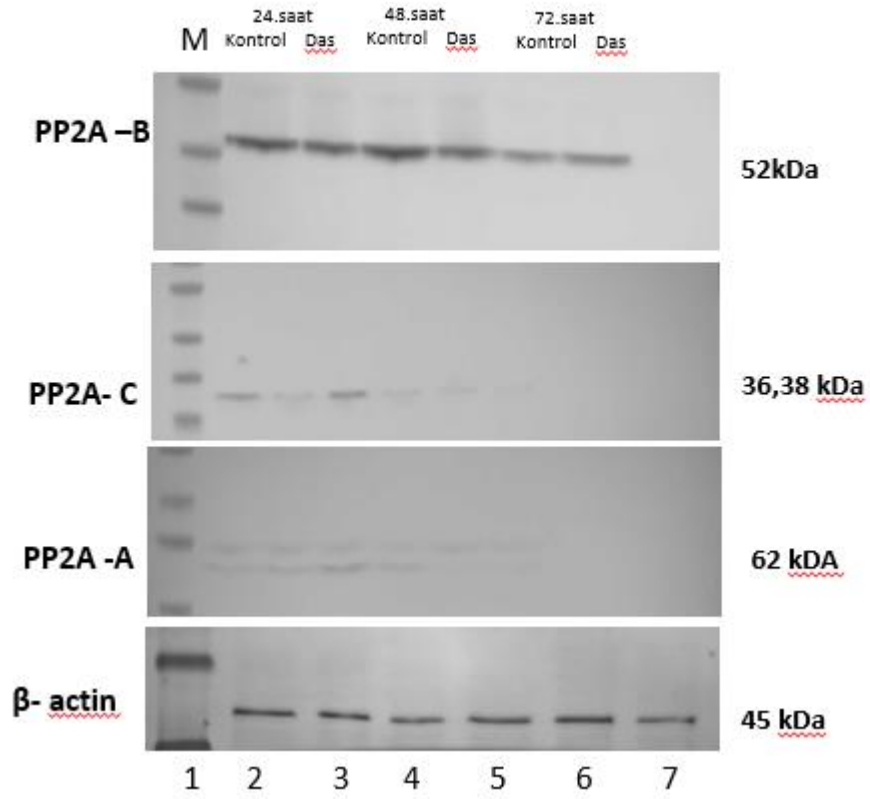
(B)



Grafik 5: PP2A Enzim Aktivitesinin Değişimi

3.1.5 Dasatinibin PP2A Alt Birim Protein Seviyelerindeki Değişiminin İncelenmesi

Western Blot için 24.saat, 48.saat ve 72. saatlerde 6-kuyucuklu platelere her bir örnek için toplam 3×10^6 hücre ekilmiştir. Dasatinib eklenmeyen gruplar kontrol grubu olarak kabul edilmiştir. Bekleme sürelerinin sonunda toplanan hücrelerden elde edilen protein izolasyonu ile elde edilen proteinler ile yapılan western blot sonucunda PP2A'nın işlevsel alt birimi olan katalitik alt birimi C'de kontrole kıyasla zamana bağlı azalış görülmüştür. Regülatör ve yapısal alt birimlerde önemli bir değişiklik bulunmamıştır.



Şekil 13: Dasatinib ile muamele edilmiş K562 hücrelerinde PP2A/A, PP2A/B ve PP2A/C alt birimlerinin protein ifade değişimlerinin western blot analizi. 1) Marker, 2) 24.saat kontrol, 3) 24.saat Dasatinib IC₅₀ dozu uygulanmış K562, 4) 48.saat kontrol, 5) 48.saat Dasatinib IC₅₀ dozu uygulanmış K562, 6) 72.saat kontrol, 7) 72.saat Dasatinib IC₅₀ dozu uygulanmış K562.

BÖLÜM IV

4.1 TARTIŞMA

Kronik miyeloid lösemi (KML), normal miyeloid hücrelerin birikmesiyle karakterize edilen miyeloproliferatif hastalıktır. 100.000 insandan 1-2 insidansda görülmektedir. KML hastalarının %90'dan fazlası kronik faz (CP) olarak bilinen erken fazda teşhis edilmektedir (106). KML, Philadelphia (Ph) kromozomunun varlığıyla karakterizedir. Bu Ph kromozomu, (9;22)(q34;q11) resiprokal translokasyonu sonucunda oluşmaktadır ve 9. kromozom üzerindeki ABL1 onkogeniyle 22. kromozomdaki BCR geni yan yana sıralanır. BCR-ABL1 füzyon onkogeni artmış ABL1 kinaz aktivitesine sahiptir (106).

İmatinib gibi tirozin kinaz inhibitörleri KML'de önemli başarı sağlasa da aktif kinaz bölgesinde oluşan mutasyon ya da ilaç direnciyle sonuçlanan kromozomal/moleküler anomaliler hastanın tedavi durumunu değiştirmiştir ve yeni stratejilerin gerekliliğini ortaya koymuştur (107). Dasatinib, imatinib direçli hastalara alternatif olarak kullanılmaktadır. Dasatinib, BCR-ABL proteinini hedefleyen ikinci-nesil tirozin kinaz inhibitörüdür. Dasatinib, T315I mutasyonu hariç imatinib direnci olan BCR-ABL mutant hücre hatlarında ve yabancıl tipin kinaz aktivitesini ve proliferasyonunu inhibe etmektedir (38). Hücrede kinaz aktivitesinin tersine fonksiyon gören, sinyal iletiminde önemli rolü olan PP2A'nın tedaviye yönelik bir strateji olarak değerlendirilmesi son derece anlamlıdır. PP2A, hücrede en önemli serin/treonin fosfotazdır. PP2A'nın, KML'de BCR-ABL1 tarafından oto-fosforilasyonunun önlenerek inaktif durumda olduğu bilinmektedir (108,109). Çalışmamızda KML hücre serisi modeli oluşturan K562 hücrelerinde ikinci-nesil tirozin kinaz inhibitörü olan dasatinibin, PP2A enzim aktivite düzeyini ve PP2A katalitik ve regülatuar alt birimlerinin protein ekspresyonu seviyesi üzerindeki değişikliği belirlemeyi hedefledik.

Bu amaçla, ilk olarak dasatinibin K562 hücre serisi üzerine sitotoksik etkisi saptanmıştır. Çalışmamızın sonucunda, dasatinibin K562 hücreleri üzerinde IC50 değeri WST-1 yöntemi ile 48.saatte 4,6 nM olarak

belirlenmiştir. Literatürde dasatinibin sitotoksik etkisini araştıran birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan birisi, Dalgıç ve arkadaşları, tarafından gerçekleştirilmiş ve dasatinibin K562 hücre serisi üzerindeki IC50 dozunu XTT yöntemi ile 48.saatte 3,3 nM olarak bulmuşlardır (110). Bu çalışma bizim sonucumuzla benzerlik göstermektedir. Bu durumun dasatinibin TKI etkisinden kaynakladığını düşünmekteyiz. Bir başka çalışmada ise Takeuchi ve arkadaşları, K562 hücre serisi üzerinde dasatinibin IC50 dozunu 48.saatte 0,514 nM olarak bulmuşlardır (111). Takeuchi ve arkadaşları, K562 hücre serisi üzerinde dasatinibin IC50 dozunu 48.saatte 0,514 nM olarak bulurken (111) Skoglund ve arkadaşları da MTT analizi sonucu K562 hücreleri için dasatinibin IC50 dozunu 1,6 nM olarak belirlemişlerdir (112). Diğer bir çalışmada Okabe ve arkadaşları normal K562 hücre serisinde dasatinibin IC50 dozunu 1nmol/L, imatinib dirençli K562 IM-R hücre serisinde 10nmol/L olarak bulmuşlardır (113). Örnek olarak gösterdiğimiz diğer çalışmalarda IC50 değerinin düşük olmasını hücre pasaj sayısı ve hücre yaşı ile orantılı olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızın ikinci adımında, PP2A'nın apoptoz ve hücre sağkalımı ile ilişkisi incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda PP2A'nın apoptoz üzerine etkisi gösterilmiştir (114, 115). Bizim çalışmamızda da okadaik asitin 2,5 nM ve 25 nM olmak üzere iki dozu uygulanmıştır. Annexin V yöntemine göre 25 nM okadaik asit uygulanan K562 hücre serisinde apoptoz kontrole göre 2,41 kat artmıştır. 2,5 nM okadaik asit uygulamasında apoptozda anlamlı değişim olmamıştır. Uygulanan 2.5 nM konsantrasyonda apoptozda anlamlı değişiklik olmamasını düşük konsantrasyon kaynaklı olabileceğini düşünmekteyiz.

Apo-Direct Tunnel yöntemi ile apoptoz analizi sonuçlarında, okadaik asitin kontrol ve dasatinibe oranla apoptozu PP2A baskılanmasına bağlı olarak arttırdığı belirlenmiştir. Dasatinibin IC50 dozunda apoptoz 6,79 kat artarken 25 nM okadaik asit uygulanan grupta apoptoz kontrole kıyasla 24,65 kat artmıştır. 25 nM okadaik asit ile dasatinib kombinasyonunda ise apoptoz 49,38 kat artmıştır. Doz artışıyla orantılı olarak apoptoz oranının da artmış olduğunu belirledik.

Lösemi hücre serisi K562’de, PP2A baskılanmasına bağlı olarak okadaik asitin DNA fragmentasyonuna yol açıp apoptozu indüklediğini düşünmekteyiz. İki analiz arasındaki farklılığın ise, yöntemlerin, apoptozun farklı evrelerini saptamasından kaynakladığını düşünmekteyiz. Bizim sonuçlarımızla benzer şekilde, Bodreau ve arkadaşlarının Cal A ve okadaik asit ile yaptıkları çalışmada, T hücrelerinin devamlılığı için PP2A’nın önemini saptamışlardır. Jurkat ve CCRF-CEM T lösemi hücrelerini 10 nM Cal A ile muamele ederek apoptozun özelliği olan DNA fragmentasyonunun 18.saatte arttığı 48.saatte de en üst seviyeye ulaştığını bulmuşlardır. Jurkat hücrelerinde 10 nM Cal A ile apoptozun %58, CCRF-CEM hücrelerinin %52 arttığını belirlemişlerdir. Yine aynı çalışmada, apoptozdaki benzer değişimler 100 nM okadaik asit ile de saptanmıştır. 100 nM okadaik asit ile kontrole kıyasla Jurkat hücrelerinde %42, CCRF-CEM hücrelerinde %49 kat apoptoz artışı belirlenmiştir. Sonuçlara göre PP2A’nın apoptoz ve hücre sağklalımı arasındaki denge için önemini ve PP2A’nın apoptozun negatif regülatörü olduğunu belirlemişlerdir (114). PP2A baskılanmasına ilişkin olarak yapılan diğer bir çalışmada Riordan ve arkadaşları, 10 nM okadaik asitin HL-60 hücre serisinde zamana bağımlı şekilde apoptozu indüklediği bulunmuştur. Bu sonucun azalmış Bcl-2 protein ve mRNA seviyesiyle ilişkili olduğunu ortaya koyarlarken (115) Benito ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da, K562 hücrelerine 48 saat süreyle 15 nM OA uygulaması sonucu, Bcl-XL mRNA seviyesinin azalmasına bağlı olarak apoptozda artış bulmuşlardır (116). Yapılan çalışmalardaki apoptoz sonuçları bizim sonuçlarımızla benzerlik göstermektedir. Ancak diğer taraftan PP2A’nın kompleks yapısı ve çeşitli sinyal yollarına farklı şekilde etki etmesinden dolayı PP2A’nın apoptoza hem anti-apoptotik hem de pro-apoptotik etkisinin olduğu çalışmalarla ortaya konmuştur. Örneğin; Chiang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 5nM Calyculin A uygulanan FL5.12 hücrelerinde apoptozun baskılandığını bulmuşlardır. Çalışmalarında, baskılanan PP2A nedeniyle, pro-apoptotik fonksiyon gören BAD’ın defosforilasyonunun inhibe olduğunu belirlemişlerdir. İnhibisyon ile BAD defosforilasyonunun engellenmesi FL5.12 hücrelerini IL-3 geri çekilmesiyle-indüklenen apoptozdan kurtardığını öne sürmüşlerdir (117). Bu sonuçlara göre PP2A’nın pro-apoptotik etkisini ortaya koymuşlardır. Bu durumun PP2A’nın, hücre serisi ve inhibitör dozuna bağlı olarak ve farklı

yolaklar üzerinden PP2A fonksiyonuna bağlı olarak hem apoptozu indükleyebileceğini hem de hücre canlılığının devamını sağlamakla ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızın bir diğer amacı, PP2A'nın OA ile baskılanmasının hücre döngüsü üzerine etkisini incelemektir. Sonuçlarımıza göre, 2,5 ve 25 nM dozlarında okadaik asit uygulanan K562 hücrelerinde kontrole kıyasla G2/M fazında sırasıyla 1,48 ve 2.46 kat bir artış saptadık. Okadaik asitin, apoptozdaki artışa sebep olmasıyla uyumlu olarak hücre döngüsü arestini de G2/M fazında indüklediğini belirledik. Gong ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 30 nM okadaik asit uyguladıkları pankreatik ve meme kanseri hücrelerinde PP2A/JNK/Sp1/CDK1 bağımlı yolak üzerinden G2/M arestinin indüklendiğini bulmuşlardır. (118). Taylor ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da, 48 saat 0-9 nM OA ile muamele edilmiş hücrelerde G2/M fazında hücre döngüsü arresti saptanmış ve kontrolsüz artmış DNA içeriği saptanmıştır (119).

Literatürde bizim sonuçlarımıza benzer çalışmalar bulunmaktadır. PP2A inhibitörü OA ile muamele sonucu PP2A baskılanmasına bağlı olarak DNA içeriği artmış, G2/M fazında hücre döngüsü arresti gerçekleşmiştir.

Çalışmamızın bir diğer amacı, KML'de değişime uğramış PP2A'nın dasatinib ile muamelesi sonucu enzim aktivitesindeki değişimi belirlemektir. Sonuçlarımıza göre, dasatinib uygulanmış K562 hücre serisinde 72. saatte enzim aktivitesinde azalış belirlenmiştir. Apoptoz sonuçlarımız ile PP2A enzim aktivite sonuçlarının uyumlu olduğu görölmektedir (120). Şahin ve arkadaşlarının PP2A ile ilgili çalışmada, Gossypol uygulanan HL60 hücrelerinde PP2A fosfotaz aktivitesinin zamana bağlı şekilde azaldığını bulmuşlardır (121). Saydam ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, IC50 dozunu 600 IU/ml olarak belirledikleri IFN- α -2b uygulanan K562 hücre serisinde zamana bağımlı şekilde PP2A enzim aktivitesinin arttığı bulmuşlardır. Artan fosfotaz aktivitesini çalışmadaki artan apoptoz sonuçları ile tutarlı olarak değerlendirmişlerdir. Bununla birlikte, PP2A katalitik alt birimde IFN- α -2b muamelesi sonucu herhangi bir değişim kaydedememişlerdir (120).

Enzim aktivitesiyle ilgili sonuçlar bizim sonuçlarımızla benzerlik göstermektedir. Diğer farklılıklarının hücre serisi ve uygulanan doz ve etken madde farklılığından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda son olarak, dasatinib uygulanan ve uygulanmayan hücrelerde PP2A'nın alt birimlerindeki protein seviyelerinin değişimlerine western blot ile baktığımızda, dasatinibin PP2A'nın katalitik C alt birimlerinde kontrole kıyasla azalma gözlemledik. Şahin ve arkadaşlarının PP2A ile ilgili çalışmada, Gossypol uygulanan HL60 hücrelerinde western blot ile PP2A katalitik alt birim ekspresyonunda zamana bağlı olarak azalma bulmuşlardır. Gossypol'ün PP2A inhibitörü olabileceğini ileri sürmüşlerdir (121). Biray Avcı ve arkadaşlarının Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) ve CCRF-CEM hücreleri ile yaptıkları çalışmada 72 saatlik CAPE muamelesinden sonra PP2A katalitik C alt birimde azalma belirlemişlerdir. PP2A baskılanmasıyla tutarlı olarak, apoptozdaki artışı CAPE'nin PP2A inhibitörü olabileceği şeklinde ilişkilendirmişlerdir. (122). Bizim sonucumuzla tutarlı olarak, 2009'da Wei ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da, insan fosfotazlarını hedef alan Lenalidomid uygulanan U937 hücre hattında azalan PP2A C alt birim seviyesinin artmış apoptoz ve hücre döngüsü arestisiyle ilişkili olduğu bulunmuştur (123). Bu sonucun, C alt biriminin hedefi olan sinyal yolağını regüle ederek apoptoz ve hücre döngüsü arestisini gerçekleştirdiğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, K562 hücre serisinin dasatinib ile muamelesi sonucu, dasatinibin sitotoksitesini literatürle uygun olarak 4,6 nM olarak belirledik. Ayrıca, PP2A'nın inhibitörü olan okadaik asit uygulaması sonucu hücre canlılığı ve apoptoz arasındaki dengede önemli rolü olan PP2A 'nın baskılanmasına bağlı olarak apoptozun okadaik asit ile arttığını saptadık.

Çalışmamızın asıl amacı olan KML'de baskılanmış ya da değişime uğramış PP2A'nın dasatinib ile muamelesi sonucu enzim aktivite ve alt birim protein seviyelerini inceledik. Bcr-Abl+ K562 hücrelerinin dasatinibin IC50 dozu ile muamele edilmesi sonucunda, PP2A fosfotaz enzim aktivitesinde 72. saatte azalış gözlemledik. Dasatinib, PP2A'nın işlevsel aktiviteden sorumlu olan katalitik C alt biriminde önemli azalışa sebep olduğunu gözlemledik.

Bugüne kadar, dasatinib, imatinib vs. gibi tirozin kinaz inhibitörlerinin PP2A enzim aktivitesi ve protein seviyesi üzerine etkisi daha önce çalışılmamıştır. Ancak tirozin kinaz inhibitörü olmasa da diğer anti-kanser ajanlarının da K562 hücre serisinde PP2A enzim aktivitesinin azalması bizim sonuçlarımızla paralellik göstermektedir. PP2A'nın inhibisyonu sonucu K562 hücre serisinde apoptoz arttırmıştır ve okadaik asit ile dasatinib kombinasyonu sinerjistik etki yaparak apoptozda daha belirgin bir artışa sebep olmuştur. PP2A'nın hücrel bir çok fonksiyonu olduğu bilinmektedir.

Elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda PP2A inhibitörlerinin in vivo çalışmalar ile desteklenmesi durumunda KML tedavisinde teröpatik hedef olarak değerlendirilebileceğini düşünmekteyiz.

BÖLÜM V

5.1 SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda; kronik miyeloid lösemi hücre hattı olan K562 hücrelerinde dasatinibin ve okadaik asitin sitotoksik, apoptotik ve sitostatik etkileri incelenmiştir. Ayrıca çalışmamızın asıl amacını oluşturan PP2A'nın dasatinib ile muamelesi sonucunda enzim aktivite değişimleri ve protein seviyesinde ne gibi değişimlere neden olduğunu çalışılmıştır.

Dasatinibin K562 hücre serisinde IC₅₀ dozu 48.saatte 4,6 nM olarak saptanmıştır.

Annexin V yöntemi ile dasatinibin IC₅₀ dozu ile PP2A inhibitörü okadaik asitin 2,5 nM ve 25 nM'lık dozlarına bakıldığında, 48.saatte kontrole göre dasatinib ile muamele sonucu 1,4 kat, okadaik asitin 25 nM dozunda 2.41 kat, apoptoz artışı saptanmıştır. Dasatinibin IC₅₀ dozu ile okadaik asitin 2,5 ve 25 nM dozlarının ayrı ayrı kombinasyonlarında sırasıyla 2,35 ve 3,76 kat artış belirlenmiştir.

Apo Direct Tunel analiziyle, kontrol grubu ile kıyaslandığında dasatinibin IC₅₀ dozu 4,6 nM'da 6.79 kat, 25 nM okadaik asit uygulanan grupta 24,65 kat, dasatinib ve okadaik asitin 2,5 nM doz kombinasyonunda 16,45 kat, dasatinib ve okadaik asit 25 nM kombinasyonunda ise 49,38 kat apoptoz artışı gözlenmiştir.

Hücre döngüsü analizi ile okadaik asitin 2,5 ve 25 nM dozlarında kontrole göre G2/M arrestini sırasıyla 1,48 ve 2,46 kat arttırdığı belirlenmiştir.

Çalışmamızın diğer basamağında, serin/treonin fosfataz analizi sonuçlarına göre 24. ve 48. saatlerde dasatinibin IC₅₀ dozu 4,6nM'da fosfataz aktivitesinin kontrole göre arttığı bulunmuştur.

Dasatinib ile muamele edilen K562 hücreleri ile etken madde uygulanmayan kontrol gruplarından elde edilen proteinler ile western blot analizi sonucunda PP2A'nın yapısal A alt birimi ve regülatör B alt birimlerinin protein seviyelerinde değişim gözlenmezken, katalitik alt biriminin protein seviyesinde belirgin azalış gözlenmiştir.

Sonuç olarak, tirozin kinaz inhibit6r6 olan dasatinib ile PP2A arasındaki ilişki ilk defa tarafımızdan çalışılmış olup, pek çok h6cressel olayda g6rev alan ve h6crede fosforilasyon/defosforilasyon dengesinin sağlanmasında kritik rol oynayan PP2A'nın KML tedavisinde yeni bir terap6tik hedef olabileceğini d6ř6nmekteyiz.



BÖLÜM VI

6.1 KAYNAKLAR

- 1-American Cancer Society Web Sitesi [İnternet]. [Erişim Tarihi: 9.2.2015], <http://www.cancer.org/cancer/index>
- 2-Cancer Research UK Web Sitesi [İnternet]. [Erişim Tarihi: 10.2.2015] , <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/cancerstats/world/incidence/>
- 3- World Health Organization Web Sitesi [İnternet]. [Erişim Tarihi: 11.2.2015], <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>
- 4- Alberts B, Johnson A, Lewia, j, Raff, M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell. New York: Garland Science; 2002.
- 5- National Cancer Institute [İnternet]. [Erişim Tarihi: 18.06. 2015], <http://www.cancer.gov/types/leukemia/patient/cml-treatment-pdq>.
- 6- Leonard B. Leukemia Research. United Kingdom: Diana Publishing; 1998.
- 7- Cancer Treatments Centre of America Web Sitesi [İnternet]. [Erişim Tarihi], <http://www.cancercenter.com/leukemia/types/>
- 8- Peacock J, Asselin B. Leukemia Perspectives on Disease and Illness. Capstone 1999.
- 9- Charrin C, Faderi S, Kantarjian H. Leukemias: Principles and Practice of Therapy. Willey-Black Well; 2011.
- 10- Lu C, Li L, Qiao Q , Liu G, Fang L. Cutaneous manifestations in a patient with chronic lymphocytic leukemia involving the head, neck and distal extremities. Experimental and Therapeutic Medicine 2015;9(3): 877–879.
- 11- Nabhan C. Chronic Lymphocytic Leukemia Research Focus. Nova Biomedical; 2007.
- 12- Mauro MJ, Davis C, Zyczynski T, Khoury HJ. The role of observational studies in optimizing the clinical management of chronic myeloid leukemia. Therapeutic Advances in Hematology 2015; 6: 3-14.

- 13- Apperley JF. Chronic myeloid leukaemia. The Lancet 2014; Vol 385: No.9976.
- 14- Koca E, Haznedaroğlu IC. Imatinib mesylate and the management of chronic myeloid leukemia (CML). Turk J Hemato 2005; 22(4): 161-172.
- 15- Hochhaus A, Kantarjian HM, Baccarani M, Lipton JH, Apperley JF, Druker BJ et.al. Dasatinib induces notable hematologic and cytogenetic responses in chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of imatinib therapy. Blood 2005; 1;110(5):1438.
- 16- Lösemi Lenfoma Miyelom Hastaları ve Araştırma Eğitim Birliği Derneği. Web Sitesi [İnternet].[ErişimTarihi:23.2.2015], <http://www.losemilenfomamiyelom.org/TR,25/kronik-miyeloid-losemi-kml.html>
- 17- Robert S. Kenneth AA. Henry MR. Klinik Pratikte Hematoloji, Dördüncü Baskı 2009; Nobel Kitabevi.
- 18- ABL1 ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase Web Sitesi. [İnternet] [Erişim Tarihi: 4.3.2015], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/25>.
- 19- Laurent E, Talpaz M, Kantarjian H, Kurzrock R. The BCR Gene and Philadelphia Chromosome-positive Leukemogenesis. Cancer Research 2001; 61, 2343–2355.
- 20- Rumjanek VM, Vidal RS, Maia RC. Multidrug resistance in chronic myeloid leukaemia: how much can we learn from MDR–CML cell lines. Bioscience Reports 2013; 33(6).
- 21- Salesse S, Verfaillie CM. BCR/ABL: from molecular mechanisms of leukemia induction to treatment of chronic myelogenous leukemia. Oncogene 2002; 21, 8547-8559.
- 22-Rana A, Ghulam MA, Shaukat A, Khan A, Mansoor S, Malik S et. al. BCR-ABL1 in leukemia: Disguise master outplays riding shotgun. Journal of Cancer Research Therapeutics 2013; Volume : 9 Issue : 1 Page : 6-10.
- 23- Deininger MWN, Vieira S, Mendiola R, Schultheis B, Goldman JM, Melo JV. BCR-ABL Tyrosine Kinase Activity Regulates the Expression of Multiple

Genes Implicated in the Pathogenesis of Chronic Myeloid Leukemia. Cancer Research 2000; 60; 2049.

24- Cortes J, Deininger M. Chronic Myeloid Leukemia. CRC Press; 2006.

25- Jabbour E, Cortes J, Santos FP, Jones D, O'Brien S, Rondon G et. al. Results of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for chronic myelogenous leukemia patients who failed tyrosine kinase inhibitors after developing BCR-ABL1 kinase domain mutations. Blood 2011 ; 31;117(13):3641-7.

26- Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine Kinases as Targets for Cancer Therapy. The New England Journal of Medicine 2005 ;353:172-87.

27- Arora A, Scholar EM. Role of Tyrosine Kinase Inhibitors in Cancer Therapy. Perspectives in Pharmacology 2005; Vol. 315, No. 3.

28- MBL Life Science [Web Sitesi] [Internet]. [Erişim Tarihi: 08.04.2015] <http://ruo.mbl.co.jp/g/product/discovery/tyrosine.html>

29- Bari SB, Adhikari S, Surana SJ. Tyrosine Kinase Receptor Inhibitors: A New Target for Anticancer Drug Development. Journal of PharmaSciTech 2012; 1(2):36-45.

30- Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. Cell 2000;103: 211–25.

31- Ségaliny A, Gabriela MT, Heymann MF, Heymann D. Receptor tyrosine kinases: Characterisation, mechanism of action and therapeutic interests for bone cancers. Journal of Bone Oncology 2015; Volume 4, Issue 1, Pages 1–12.

32- Paul MK, Mukhopadhyay AK. Tyrosine kinase – Role and significance in Cancer. International Journal of Medical Sciences 2004; 1(2):101-115.

33- Deininger MWN, Vieira S, Mendiola R, Schultheis B, Goldman JM, Melo JV. BCR-ABL Tyrosine Kinase Activity Regulates the Expression of Multiple Genes Implicated in the Pathogenesis of Chronic Myeloid Leukemia. Cancer Research 2000; 60, 2049–2055.

- 34- Mughal A, Aslam HM, Khan AMH, Saleem S, Umah R and Saleem M. Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitors- current status. *Infectious Agents and Cancer* 2013; 8:23.
- 35- Sierra JR, Cepero V, Giordano S. Molecular mechanisms of acquired resistance to tyrosine kinase targeted therapy. *Molecular Cancer* 2010; 14:76-4598-9-75.
- 36- McCormack PL, Kearn SJ. Dasatinib. *Drugs* 2012; Volume 71, Issue 13, pp 1771-1795.
- 37- Lombardo LJ, Lee FY, Chen P, Norris D, Barrish JC, Behnia K et. al. Discovery of N-(2-chloro-6-methylphenyl)-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. *J. Med. Chem.* 2004; 47, 6658– 6661.
- 38- Rix U, Hantschel O, Dürnberger G, Rensing Rix LL, Planyavsky M, Fernbach NV et. al. Chemical proteomic profiles of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib reveal novel kinase and nonkinase targets. *Blood* 2007; 110(12):4055-63.
- 39- O'Hare T1, Walters DK, Stoffregen EP, Jia T, Manley PW, Mestan J et.al. In vitro Activity of Bcr-Abl Inhibitors AMN107 and BMS-354825 against Clinically Relevant Imatinib-Resistant Abl Kinase Domain Mutants. *Cancer Research* 2005; 65(11):4500-5.
- 40- Tokarski JS, Newitt JA, Chang CY, Cheng JD, Wittekind M, Kiefer SE et. al. The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants. *Cancer Research* 2006; 1;66(11):5790-7.
- 41- Hochhaus A, Baccarani M, Deininger M, Apperley JF, Lipton JH, Goldberg SL et.al. Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase with resistance or intolerance to imatinib. *Leukemia* 2008; 22, 1200–1206.

- 42- Keating GM, Lyseng-Williamson KA, McCormack PL, Keam SJ. Dasatinib: a guide to its use in chronic myeloid leukemia in the EU. *BioDrugs* 2013; 27(3):275-9.
- 43- Chen R, Chen B. The role of dasatinib in the management of chronic myeloid leukemia. *Drug Des Devel Ther* 2015; 9:773-9.
- 44- Wera S, Hemmings BA. Serine/threonine protein phosphatases. *Biochemical Journal* 1995; 311 (17–29).
- 45- McConnell JL, Wadzinski BE. Targeting Protein Serine/Threonine Phosphatases for Drug Development. *Molecular Pharmacology* 2009; 75:1249–1261.
- 46- Bauman AL, Scott JD. Kinase- and phosphatase-anchoring proteins: harnessing the dynamic duo. *Nature Cell Biology* 2002; 4(8):E203-6.
- 47- Zhang M, Yogesha SD, Mayfield JE, Gill GN, Zhang Y. Viewing serine/threonine protein phosphatases through the eyes of drug designers. *The Febs Journal* 2013; 280(19):4739-60.
- 48- Shi Y. Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure. *Cell* 2009; 139(3):468-84.
- 49- Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *The Biochemical journal* 2001; 353(Pt 3):417-39.
- 50- Shi Y. Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell* 2009; 468–82.
- 51- Kowluru A, Matti A. Hyperactivation of protein phosphatase 2A in models of glucolipotoxicity and diabetes: Potential mechanisms and functional consequences. *Biochemical Pharmacology* 2012; 84(5):591-7.
- 52- Hendrix P, Mayer-Jackel RE, Cron P, Goris J, Hofsteenge J, Merlevede W et. al. Structure and expression of a 72-kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A. Evidence for different size forms produced by alternative splicing. *The Journal of Biological Chemistry* 1993; 268(20):15267-76.

- 53- Goodall YK, Hemmings BA. Tissue-specific expression of mRNAs encoding α - and β -catalytic subunits of protein phosphatase 2A. Federation of European Biochemical Societies 1988; Volume 238, number 2, 265-268 .
- 54- Jones TA, Barker HM, da Cruz e Silva EF, Mayer-Jaekel RE, Hemmings BA, Spurr NK et.al. Localization of the genes encoding the catalytic subunits of protein phosphatase 2A to human chromosome bands 5q23-->q31 and 8p12-->p11.2, respectively. Cytogenet Cell Genet 1993; 63(1):35-41.
- 55- Ruediger R, Hentz M, Fait J, Mumby M, Walter G. Molecular Model of the A Subunit of Protein Phosphatase 2A: Interaction with Other Subunits and Tumor Antigens. Journal of Virology 1994;68(1):123-9.
- 56- Andrade MA, Bork P. HEAT repeats in the Huntington's disease protein. Nat. Genet. 1995; 11(2):115-6.
- 57- Groves MR, Hanlon N, Turowski P, Hemmings BA, Barford D. The Structure of the Protein Phosphatase 2A PR65/A Subunit Reveals the Conformation of Its 15 Tandemly Repeated HEAT Motifs. Cell 1999; Vol. 96, 99–110.
- 58 Xu Y, Xing Y, Chen Y, Chao Y, Lin Z, Fan E. et.al. Structure of the Protein Phosphatase 2A Holoenzyme. Cell 2006; 127(6):1239-51.
- 59- Zolnierowicz S, Csontos C, Bondor J, Verin A, Mumby MC, DePaoli-Roach A A. Diversity in the Regulatory B-Subunits of Protein Phosphatase 2A: Identification of a Novel Isoform Highly Expressed in Brain. Biochemistry 1994; 33(39):11858-67.
- 60- McCright, B, Rivers AM, Audlin S, Virshup DM. The B56 Family of Protein Phosphatase 2A (PP2A) Regulatory Subunits Encodes Differentiation-induced Phosphoproteins That Target PP2A to Both Nucleus and Cytoplasm. J. Biol. Chem. 1996; 271(36):22081-9.
- 61- McCright B, Brothman AR, Virshup D M. Assignment of human protein phosphatase 2A regulatory subunit genes B56 α , B56 β , B56 γ , B56 δ , and B56 ϵ (PPP2R5A- PPP2R5E), highly expressed in muscle and brain to chromosome regions 1q41, 11q12, 3p21, 6p21.1, and 7p11.2-p12. Genomics 1996; 36,168-170.

- 62- Slupe AM, Merrill RA, Strack S. Determinants for Substrate Specificity of Protein Phosphatase 2A. *Enzyme Research* 2011; Volume 2011 , Article ID 398751, 8 pages.
- 63- Moreno CS, Park S, Nelson K, Ashby D, Hubalek F, Lane WS, Pallas DC. WD40 repeat proteins striatin and S/G2 nuclear autoantigen are members of a novel family of calmodulin-binding proteins that associate with protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* 2000; 275(8): 5257–5263.
- 64-.Seshacharyulu P, Pandey P, Datta K, Batra SK. Phosphatase: PP2A structural importance, regulation and its aberrant expression in cancer. *Cancer Letters* 2013; 335(1):9-18.
- 65- Longin S, Zwaenepoel K, Louis JV, Dilworth S, Goris J, Janssens V. Selection of Protein Phosphatase 2A Regulatory Subunits Is Mediated by the C Terminus of the Catalytic Subunit. *The Journal of Biological Chemistry* 2007; 282(37):26971-80.
- 66- Millward TA, Zolnierowicz S, Hemmings BA. Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Cell* 1999; 24(5):186-91.
- 67- Clarke PR, Hoffmann I, Draetta G, Karsenti E. Dephosphorylation of cdc25-C by a type-2A protein phosphatase: specific regulation during the cell cycle in *Xenopus* egg extracts. *Mol. Biol. Cell* 1993; 4(4): 397–411.
- 68- Mueller PR, Coleman TR, Dunphy WG. Cell Cycle Regulation of a *Xenopus* Weel-like Kinase. *Molecular Biology of the Cell* 1995; 6(1): 119–134.
- 69- Silverstein AM, Barrow CA, Davis AJ, Mumby MC. Actions of PP2A on the MAP kinase pathway and apoptosis are mediated by distinct regulatory subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(7):4221-6.
- 70- Junttila MR, Li S, Westermarck J. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *The FASEB Journal* 2008; 22(4):954-65.
- 71- Ugi S, Imamura T, Ricketts W, Olefsky JM. Protein Phosphatase 2A Forms a Molecular Complex with Shc and Regulates Shc Tyrosine

Phosphorylation and Downstream Mitogenic Signaling. *Mol. Cell Biol.* 2002; 22(7):2375-87.

72- Hoof CV, Goris J. Phosphatases in apoptosis: to be or not to be, PP2A is in the heart of the question. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2003; 1640(2-3):97-104.

73- Ruvolo PP, Deng X, Ito T, Carr BK, May WS. Ceramide induces Bcl-2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondrial PP2A. *J. Biol. Chem.* 1999; 274(29):20296-300.

74- Santoro MF, Annand RR, Robertson MM, Peng W, Brady MJ, Mankovich JA. Regulation of Protein Phosphatase 2A Activity by Caspase-3 during Apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry* 1998; 273, 13119-13128.

75- Pandey P, Seshacharyulu P, Das S, Rachagani S, Ponnusamy MP, Yan Y. et al. Impaired expression of protein phosphatase 2A subunits enhances metastatic potential of human prostate cancer cells through activation of AKT pathway. *British Journal of Cancer* 2013; 108(12):2590-600.

76- Peirce MJ, Cox SE, Munday MR. Peachell P.T. Preliminary characterization of the role of protein serine/threonine phosphatases in the regulation of human lung mast cell function. *British Journal of Pharmacology* 1997; 120, 239-246.

77- Medina M, Avila J, Villanueva N. Use of Okadaic Acid to Identify Relevant Phosphopeptides in Pathology: A Focus on Neurodegeneration. *Marine Drugs* 2013; 11(5), 1656-1668.

78- Dawson JF, Holmes CFB. Molecular Mechanisms Underlying Inhibition Of Protein Phosphatases By Marine Toxins. *Frontiers in Bioscience* 1999; 4, d646-658.

79- Kamat PK, Nath C. Okadaic acid: a tool to study regulatory mechanisms for neurodegeneration and regeneration in Alzheimer's disease. *Neural Regen Res.* 2015; 10(3): 365–367.

- 80- Bialojan C, Takai A. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. *Biochem J.* 1988, 15;256(1):283-90.
- 81- Suganuma M, Fujiki H, Furuya-Suguri H, Yoshizawa S, Yasumoto S, Kato Y et. al. Calyculin A, an Inhibitor of Protein Phosphatases, a Potent Tumor Promoter on CD-1 Mouse Skin. *Cancer Research* 1990, 50, 3521-3525.
- 82- Holy M, Brautigan DL. Calyculin A from Discodermia Calyx Is a Dual Action Toxin that Blocks Calcium Influx and Inhibits Protein Ser/Thr Phosphatases. *Toxins* 2012; 4(10), 940-954.
- 83- Brautigan DL. Protein Ser/Thr phosphatases – the ugly ducklings of cell signalling. *The FEBS Journal* 2012; Vol 280, Issue 2, 324–325.
- 84- Tait SWG, Ichim G, Green DG. Die another way – non-apoptotic mechanisms of cell death. *Journal of Cell Science* 2014; 127, 2135-2144.
- 85- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. New York: Garland Science; 2002.
- 86- Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Path.* 2007; 35(4): 495–516.
- 87- Ziegler U, Groscurth P. Morphological Features of Cell Death. *American Physiology Society* 2004; Vol. 19 no. 3, 124-128.
- 88- Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 1995; 146(1): 3–15.
- 89- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF Receptor Superfamilies: Integrating Mammalian. *Biology. Cell Press* 2001; Volume 104, Issue 4, , Pages 487–501.
- 90- Peter ME. The TRAIL DISCUSSION: It is FADD and caspase-8!. *Cell Death and Differentiation* 2000; Volume 7, Number 9, Pages 759-760.
- 91- Gao W, Pu Y, Luo KQ, Chang DC. Temporal relationship between cytochrome c release and mitochondrial swelling during UV-induced apoptosis in living HeLa cells. *Journal of Cell Science* 2001; 114, 2855-2862.

- 92- Luo J, Nikolaev AY, Imai S, Chen D, Su F, Shiloh A. Negative Control of p53 by Sir2 α Promotes Cell Survival under Stress. In: Cell 2001; Vol. 107, 137–148.
- 93- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Cell Death and Differentiation 2009; 16, 3–11.
- 94- Su Z, Yang Z, Xu Y, Chen Y, Yu Q. Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis. Molecular Cancer 2015; 14:48.
- 95- Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. J Pathol. 2010; 221(1): 3–12.
- 96- Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. Cell Prolif. 2003; 36, 131–149.
- 97- Schafer KA. The Cell Cycle. Vet Pathol. 1998; 35:461- 478.
- 98- Pavletich NP. Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of cdks, their cyclin activators, and cip and INK4 inhibitors. Journal of Molecular Biology 1999; Volume 287, Issue 5, Pages 821–828.
- 99- Mariaule G, Belmont P. Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors as Marketed Anticancer Drugs: Where Are We Now? A Short Survey. Molecules 2014; 19(9), 14366-14382.
- 100- Neganova I, Lako M. G1 to S phase cell cycle transition in somatic and embryonic stem cells. Journal of Anatomy 2008; 213, pp30–44.
- 101- Bertoli C, Skotheim JM, Bruin RAM. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. Nature 2013; Vol 14.
- 102- Schmitt E, Paquet C, Beauchemin M, Bertrand R. DNA-damage response network at the crossroads of cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis. Journal of Zhejiang University 2007; 8(6):377-397.

- 103- Park MT, Lee SJ. Cell Cycle and Cancer. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 2003; Vol. 36, No. 1, pp. 60-65.
- 104- Tenga MJ, Lazar IM. Proteomic snapshot of breast cancer cell cycle: G1/S transition point. *Proteomics* 2013; Volume 13, Issue 1, pages 48–60.
- 105- Xing J, Spitz MR, Lu C, Zhao H, Yang H, Wang W et. al. Deficient G2-M and S Checkpoints are Associated with Increased Lung Cancer Risk: A Case-Control Analysis . *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007; 16; 1517.
- 106- Perrotti D, Jamieson C, Goldman J, Skorski T. Chronic myeloid leukemia: mechanisms of blastic transformation. *The Journal of Clinical Investigation* 2010; 1; 120(7): 2254–2264.
- 107- Shenolikar S. *Protein Phosphorylation in Health and Disease*. Academic Press; 2012.
- 108- Chen W, Wang Z, Jiang C, Ding Y. PP2A-Mediated Anticancer Therapy. *Gastroenterology Research and Practice* 2013; Article ID 675429.
- 109- Ciccone M, Calin GA, Perrotti D. From the biology of PP2A to the PADs for therapy of hematologic malignancies. *Frontiers in Oncology* 2015; Vol 5, article 21.
- 110- Dalgıç CT, Kaymaz BT, Özkan MC, Dalmızrak A, Şahin F, Saydam G. Investigating the Role of JAK/STAT Pathway on Dasatinib-Induced Apoptosis for CML Cell Model K562. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2015; Suppl:S161-6.
- 111- Takeuchi M, Ashihara E, Yamazaki Y, Kimura S, Nakagawa Y and Tanaka R et. al. Rakicidin A effectively induces apoptosis in hypoxia adapted Bcr-Abl positive leukemic cells. *Japanese Cancer Association* 2010; vol. 102 no. 3 591–596.
- 112- Skoglund K, Boiso S, Jönsson JI, Vikingsson S, Carlsson B and Green H. Single-nucleotide polymorphisms of ABCG2 increase the efficacy of tyrosine kinase inhibitors in the K562 chronic myeloid leukemia cell line. *Pharmacogenetics & Genomics* 2014; (24), 1, 52-61.

- 113- Okabe S, Tauchi T, Ohyashiki K. Characteristics of Dasatinib- and Imatinib-Resistant Chronic Myelogenous Leukemia Cells. Clin Cancer Res 2008; 14(19).
- 114- Boudreau RTM, Conrad DM, Hoskin DW. Apoptosis induced by protein phosphatase 2A (PP2A) inhibition in T leukemia cells is negatively regulated by PP2A-associated p38 mitogen-activated protein kinase. Cellular signaling 2007, Volume 19, Issue 1, Pages 139–151.
- 115- Riordan FA, Foroni L, Hoffbrand AV, Mehta AB, Wickremasinghe RG. Okadaic acid-induced apoptosis of HL60 leukemia cells is preceded by destabilization of bcl-2 mRNA and downregulation of bcl-2 protein. Febs letters 1998, Volume 435, Issues 2–3, Pages 195–198.
- 116- Benito A, Lerga A, Silva M, Leon J, Fernandez-Luna JL. Apoptosis of human myeloid leukemia cells induced by an inhibitor of protein phosphatases (okadaic acid) is prevented by Bcl-2 and Bcl-XL. Leukemia 1997, 11, 940–944.
- 117- Chiang CW, Harris G, Ellig C, Masters SC, Subramanian R, Shenolikar S et. al. Protein phosphatase 2A activates the proapoptotic function of BAD in interleukin-3-dependent lymphoid cells by a mechanism requiring 14-3-3 dissociation. Blood 2001; 97 (5).
- 118- Gong FR, Wu MY, Shen M, Zhi Q, Xu ZK, Wang R, et. al. PP2A inhibitors arrest G2/M transition through JNK/Sp1- dependent down-regulation of CDK1 and autophagy-dependent up-regulation of p21. Oncotarget 2015, Vol. 6, No. 21.
- 119- Taylor BK, Stoops TD, Everett AD. Protein phosphatase inhibitors arrest cell cycle and reduce branching morphogenesis in fetal rat lung cultures. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2000; 278: L1062–L1070.
- 120- Saydam G, Aydın HH, Şahin F, Selvi N, Öktem G, Terzioğlu E et. al. Involvement of protein phosphatase 2A in interferon- α -2b-induced apoptosis in K562 human chronic myelogenous leukaemia cells. Leukemia Research 2003, 27 ; 709–717.

121- Agarwal A, MacKenzie RJ, Pippa R, Eide CA, Oddo J, Tyner WJ et. al. Antagonism of SET Using OP449 Enhances the Efficacy of Tyrosine Kinase Inhibitors and Overcomes Drug Resistance in Myeloid Leukemia. *Clinical Cancer Research* 2014, 20(8); 2092–103.

122- Biray Avcı Ç, Şahin F, Gündüz C, Selvi N, Aydın HH, Öktem G et.al. Protein phosphatase 2A (PP2A) has a potential role in CAPE-induced apoptosis of CCRF-CEM cells via affecting human telomerase reverse transcriptase activity. *Hematology* 2007, 12(6): 519–525.

123- Samanta AK, Chakraborty SN, Wang Y, Kantarjian H, Sun X, Hood J, Perrotti D. Jak2 inhibition deactivates Lyn kinase through the SET–PP2A–SHP1 pathway, causing apoptosis in drug-resistant cells from chronic myelogenous leukemia patients. *Oncogene* 2009, 28, 1669–1681.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında İzmir’de doğdum. 2008 yılında Ege üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümüne yüksek öğrenimime başladım ve 2013’de mezun oldum. 2013 yılında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimime başladım. Yabancı dilim İngilizce ve orta düzeyde Yunanca’dır.

Elektronik posta: buketozel89@gmail.com

