



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**IMATİNİB DUYARLI VE DİRENÇLİ KML HÜCRE
SERİLERİ K562S VE K562R HÜCRELERİNDE
METİLPREDNİZOLONUN APOPTOTİK, OTOFAJİK
VE METABOLİK ETKİLERİNİN GÖSTERİLMESİ**

Işıl YÜKSELEN

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Fügen AKTAN**

**ANKARA
2016**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**IMATİNİB DUYARLI VE DİRENÇLİ KML HÜCRE
SERİLERİ K562S VE K562R HÜCRELERİNDE
METİLPREDNİZOLONUN APOPTOTİK, OTOFAJİK
VE METABOLİK ETKİLERİNİN GÖSTERİLMESİ**

Işıl YÜKSELEN

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Fügen AKTAN**

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü'nün
15L0237002 proje numarası ile desteklenmiştir**

**ANKARA
2016**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “İmatinib Duyarlı ve Dirençli KML Hücre Serileri K562s ve K562r Hücrelerinde Metilprednizolonun Apoptotik, Otofajik ve Metabolik Etkilerinin Gösterilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Işıl YÜKSELEN

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Biyokimya Anabilim Dalında
Işıl Yükselen tarafından hazırlanan
“Imatinib Duyarlı ve Dirençli KML Hücre Serileri K562s ve K562r Hücrelerinde
Metilprednizolonun Apoptotik, Otofajik ve Metabolik Etkilerinin Gösterilmesi” adlı tez
çalışması
aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİYLE
ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 06 Nisan 2016



Prof.Dr. Mualla Çetin

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi

Jüri Başkanı



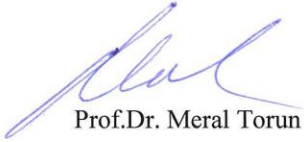
Prof.Dr. Fügen Aktan

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Raportör



Prof.Dr. Asuman Sunguroğlu

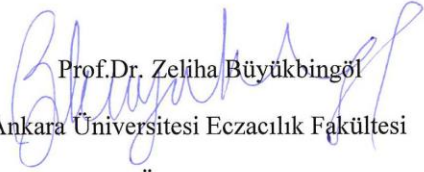
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Üye



Prof.Dr. Meral Torun

Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Üye



Prof.Dr. Zeliha Büyükbingöl

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Zafer Karaer

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Çizelgeler	viii
Şekiller	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Kronik Myeloid Lösemi	1
1.2. Kronik Myeloid Lösemi ve Metabolizma	5
1.3. Glukokortikoidler ve Kanser	9
1.4. Metabolik Enzimlerin Proliferasyon, Hayatta Kalım ve Ölüm Yolaklarıyla İlişkisi	11
2. GEREÇ VE YÖNTEM	17
2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar	17
2.1.1. Hücre Kültürü	17
2.1.2. Agaroze Jel Elektroforezi	17
2.1.3. Yükleme Tamponu	18
2.1.4. Yürütme Tamponu	18
2.1.5. EDTA solüsyonu	18
2.1.6. Etidyum Solüsyonu	18
2.2. Çalışma Grubu	19
2.3. K-562s ve K562r Hücrelere Metilprednizolon Uygulaması	20
2.3.1. [3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromid] (MTT) Sitotoksikite Testi	20
2.3.2. Akım Sitometri İle Apoptozis Tayini	20

2.3.2.1. Anneksin V ve 7-AAD ile İşaretleme Protokolü	21
2.4. Glukoz Assay Kiti ile Glukoz Tüketiminin Ölçülmesi	21
2.5. Laktat Dehidrogenaz Assay Kit İle Laktat Miktarının Ölçümü	23
2.6. RNA İzolasyonu	24
2.7. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time PCR)	24
3. BULGULAR	26
3.1. K- 562r Ve K-562s Hücre Serilerinin Kültürü	26
3.1.1. K- 562s Hücre Serilerinin Sıvı Azottan Çözdürülmesi	26
3.1.2. K-562s Hücre Hattının ve K-562r Hücre Hattının Pasajlanması	26
3.2. K562s ve K562r Hücre Serilerinde Metilprednizolon Doz Denemeleri Sonucu	28
3.2.1. MTT Testi İle Sitotoksite Tayini	28
3.3. Akım Sitometri Analizi İle Apoptozis Tayini	31
3.4. K-562s Hücre Hattında ve K-562r Hücre Hattında Laktat ve Glukoz Tayini	37
3.6. cDNA Sentezinin HPRT Primerleri Polimeraz Zincir Reaksiyonu	39
3.6.1. cDNA Sentezinin HPRT Primerleri Polimeraz Zincir Reaksiyonu	40
3.7. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time PCR) Sonuçları	41
3.8. İstatistiksel Analiz	43
4. TARTIŞMA	44
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	54
ÖZET	56
SUMMARY	58
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	65

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında Yüksek Doz Metiprednizolon'un K562s ve K562r hücrelerindeki metabolik, apoptotik ve otofajik etkisi araştırılmıştır. Elde edilen bulgular, yeni geliştirilecek tedavilerin hücre metabolizmasına hassasiyetle ilişkili ve metabolik manipulasyonlarla geliştirilebilecek yönde olması konusunda fikir vermektedir. Kanseri hücrelerinde artan metabolizma ve hücreye glikoz alımına Metilprednizolonun etkisi gösterilmiştir. Metilprednizolonun glukokortikoid yapıda olması ve glukokortikoidlerin metabolizmayı yavaşlatıcı, hücreye glikoz alımını azaltıcı etkisi göz önünde bulundurulduğunda, dirençli KML hücrelerinde metabolizmayı yavaşlatarak, onkogenik etkiyi azalttığı ve metabolizmanın yakından ilişkili olduğu apoptotik yolları aktive ettiği gösterilmiştir.

Bana tez çalışmamı yapma fırsatı tanıyan ve bu süreçte bilgisiyle, tecrübesiyle bana ışık tutan, desteğiyle hep yanımda olan sayın danışman hocam Prof.Dr. Fügen AKTAN'a, çalışmalarımızı ortak yürüttüğümüz, laboratuvar imkanları konusunda yardımlarını esirgemeyen ve her ihtiyacım olduğunda desteğini gördüğüm değerli hocam sayın Prof.Dr. Asuman SUNGUROĞLU'na, teşekkür ederim.

Tüm tüm akademik hayatımda ve tez çalışmamda deneylerin her aşamasında büyük fedakarlıkla katkı veren Araştırma Görevlisi Dr. Tülin ÖZKAN'a teşekkür ederim.

Deneylerimin her aşamasında özveriyle ve içtenlikle yardımlarını benden esirgemeyen Uzman Biyolog Yalda Hekmatshoar'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışmamı hazırlamam sırasında bana verdikleri sonsuz destek, gösterdikleri fedakarlık ve anlayıştan dolayı canım anneme, babama ve kardeşime teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

APL	: Akut Promyelositik Lösemi
AML	: Akut Myeloid Lösemi
KML	: Kronik Myeloid Lösemi
PKM2	: Piruvat Kinaz 2
LDHA	: Laktat dehidrogenaz A
PKD1	: Piruvat Dehidrogenaz
HK2	: Hekzokinaz
TCA	: Trikarboksilik Asit Döngüsü
Ph	: Philedelphia
ATP	: Adenozin TriFosfat
Pgp	: P glikprotein
GLUT-1	: Glukoz taşıyıcısı-1
BCL-2	: B-cell lymphoma 2
HDMP	: High-dose methylprednislone
YDMP	: Yüksek Doz Metilprednizolon
MP	: Metilprednizolon
ER	: Östrojen reseptörü
Bcl-2	: B-cell lymphoma 2
RT-PCR	: Real-Time Polimerase Chain Reaction
DMSO	: Dimetilsülfoksit
FBS	: Fetal Bovine Serum
µl	: mikrolitre
ml	: mililitre
mg	: miligram
g	: gram
NaOH	: Sodyum Hidroksit
EtOH	: Etil alkol
M	: Molar

ÇİZELGELER

	Sayfa No
Çizelge 2.1. Hücre kültüründe kullanılan malzeme ve gereçler	17
Çizelge 2.2. Agaroz jel elektroforezi için gerekli malzemeler	17
Çizelge 2.3. Yükleme Tamponu İçin Gerekli Malzemeler	18
Çizelge 2.4. Yürütme Tamponu İçin Gerekli Malzemeler	18
Çizelge 2.5. EDTA Solüsyonu için gerekli malzemeler	18
Çizelge 2.6. Etidyum Solüsyonu için gerekli malzemeler	18
Çizelge 2.7. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu İçin Kullanılan Primerler	25
Çizelge 3.1. Hücre kültüründe kullanılan malzeme ve gereçler	27
Çizelge 3.2. MTT testinin dozlara ve zamana bağımlı olarak sitotoksiteye olan etkisinin K562s sayısal verileri	29
Çizelge 3.3. MTT testinin dozlara ve zamana bağımlı olarak sitotoksiteye olan etkisinin K562r sayısal verileri	29
Çizelge 3.4. MTT testinin 24. Saatteki dozlara bağımlı olarak K562s hücrelerinde sitotoksiteye olan etkisinin sütun grafiği ile gösterimi	29
Çizelge 3.5. MTT testinin 24. Saatteki dozlara bağımlı olarak K562r hücrelerinde sitotoksiteye olan etkisinin sütun grafiği ile gösterimi	30
Çizelge 3.6. MTT testinin 48. Saatteki dozlara bağımlı olarak K562s hücrelerinde sitotoksiteye olan etkisinin sütun grafiği ile gösterimi	30
Çizelge 3.7. MTT testinin 48. Saatteki dozlara bağımlı olarak K562r hücrelerinde sitotoksiteye olan etkisinin sütun grafiği ile gösterimi	30
Çizelge 3.8. MTT testinin 72. Saatteki dozlara bağımlı olarak K562s hücrelerinde sitotoksiteye olan etkisinin sütun grafiği ile gösterimi	31

Çizelge 3.9.	MTT testinin 72. Saatteki dozlara bağımlı olarak K562r hücrelerinde sitotoksiteye olan etkisinin sütun grafiği ile gösterimi	31
Çizelge 3.10.	cDNA sentezinin ikinci aşamasında kullanılan malzemeler	39
Çizelge 3.11.	cDNA sentezi için gerekli şartlar	39
Çizelge 3.12.	HPRT primeri ile PCR analizi için gerekli malzemeler	40
Çizelge 3.13.	HPRT PCR analizi için gerekli şartlar	40
Çizelge 3.14.	K562s ve K562r hücrelerinde MP Uygulaması Sonrası Gen Ekspresyonlarındaki Kat Değişimleri	42



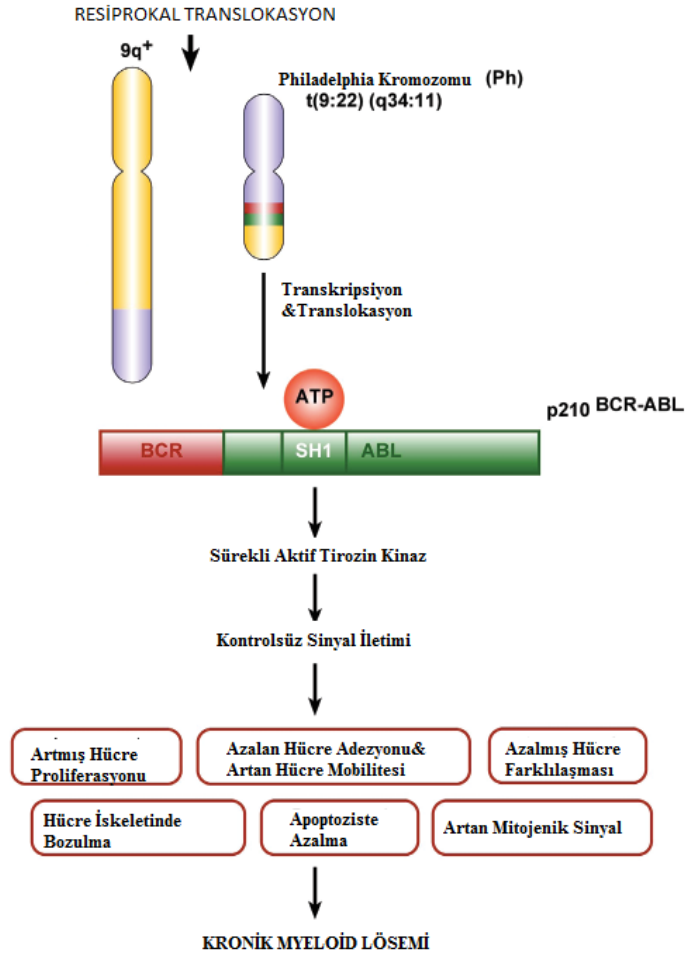
ŞEKİLLER

	Sayfa No
Şekil 1.1. KML'nin Oluşuma Neden Olan Moleküler değişiklikler	1
Şekil 1.2. BCR-ABL Sinyal Yolağı	2
Şekil 1.3. Imatinib Etki Mekanizması	3
Şekil 1.4. BCR/ABL pozitif myeloid progenitör hücredeki sinyal yolakları	4
Şekil 1.5. Glikolitik Yolağın Bağlandığı Ara Yolaklar	14
Şekil 1.6. PKM2'nin metabolik yeniden programlama ve kanser progresyonuyla ilişkisi	15
Şekil 1.7. Metabolik Yolakların Transkripsiyonel Aktivasyonu	16
Şekil 3.1. a) K562s ve b) K562r hücrelerin mikroskopik görüntüleri (10X10 büyütme)	27
Şekil 3.2. Metilprednizolon uygulanan K562s hücrelerinin akım sitometri analiz sonuçları	33
Şekil 3.3. Metilprednizolon uygulanan K562r hücrelerinin akım sitometri analiz sonuçları	34
Şekil 3.4. Metilprednizolon uygulanan K562s hücrelerinin akım sitometri analiz sonuçları	35
Şekil 3.5. Metilprednizolon uygulanan K562r hücrelerinin akım sitometri analiz sonuçları	36
Şekil 3.6. K562s hücrelerinde MP uygulaması sonrası hücredeki glukoz miktarının değişimi	37
Şekil 3.7. K562r Hücrelerinde MP uygulamasından sonra hücredeki laktat miktarının değişimi	38
Şekil 3.8. İzole edilen RNA'ların %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri	38
Şekil 3.9. HPRT amplifikasyon eğrisi grafiği	41
Şekil 3.10. Hedef gen amplifikasyon eğrisi grafiği	42

1. GİRİŞ

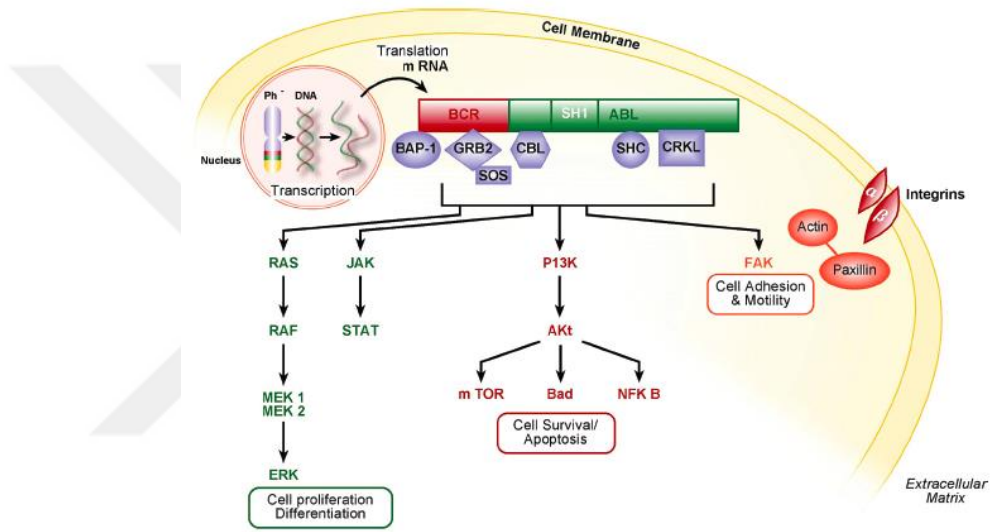
1.1. Kronik Myeloid Lösemi

Kronik myeloid lösemi (KML), (9;22) (q34;q11) dengeli resiprokal translokasyonunun sonucu oluşan Philedelphia (Ph) kromozomu ile karakteristik myeloproliferatif bir hastalıktır. Bu translokasyonun sonucunda oluşan BCR-ABL1 onkogeni, sürekli kinaz aktivitesi gösteren kimerik BCR-ABL1 proteinini kodlamaktadır (Quintas-Cardama ve ark., 2006). BCR-ABL1 füzyon geni taşıyan pluripotent hematopetik kök hücreler klonal olarak hızlıca çoğalarak KML'ye neden olmaktadır (Şekil 1.1).



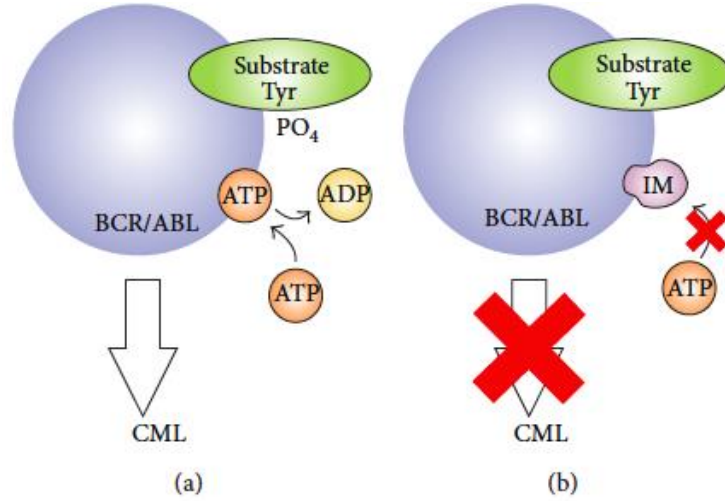
Şekil 1.1. KML'nin Oluşuma Neden Olan Moleküler değişiklikler (Frazer ve ark., 2006)

ABL proteinin normal tirozin kinaz aktivitesi sıkı kontrol altındadır ancak translokasyon sonucu BCR dizisinin eklenmesiyle oluşan BCR/ABL proteinini sürekli devam eden tirozin kinaz aktivitesine neden olmaktadır. Bu şekilde BCR/ABL çok sayıda substratın fosforillenmesine neden olarak birçok sinyal yolağının etkilemektedir (Şekil 1.2). Aktivitesini hücre proliferasyonu ve transformasyonunu artırarak, büyüme faktörü bağımlı yolları baskılayarak, apoptoza direnç mekanizması geliştirerek ve kemik iliği ve stromasındaki adhezyonu bozarak gösterdiği bilinmektedir (Thielen ve ark., 2011).



Şekil 1.2. BCR-ABL Sinyal Yolağı (Frazer ve ark., 2006)

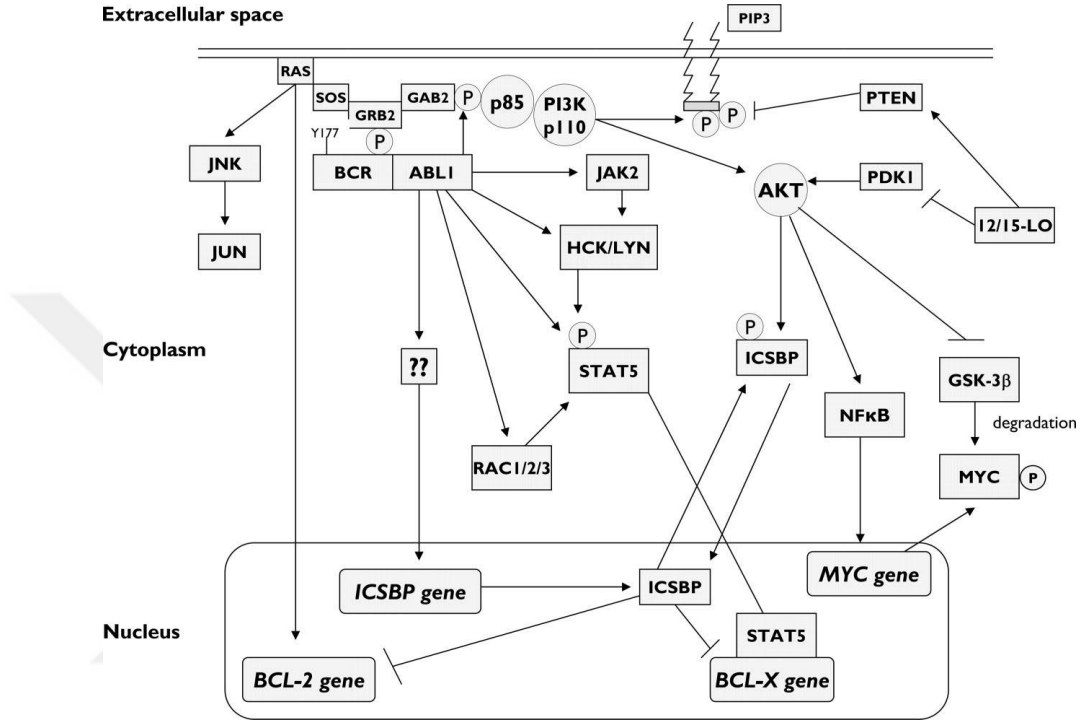
KML'nin tedavisinde kullanılan Imatinib BCR/ABL kinaz domaine bağlanarak, BCR/ABL'ın ATP bağlanmayan inaktif formda stabilize olmasını sağlar ve bu şekilde tirozin otoposforilasyonunu ve ardından gerçekleşecek olan çeşitli substratların fosforilasyonunu önlemektedir. ATP bağlanan bölgesiyle yarışarak BCR/ABL kinaz aktivitesini inhibe etmektedir. Bu sayede BCR/ABL onkoproteininin aktivitesi bozulmuş olur böylece hücre proliferasyonu baskılanır ve apoptozis indüklenir (Hehlmann ve ark., 2007; Trela ve ark., 2014) (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Imatinib Etki Mekanizması (Trela ark.,2014)

Imatinib mikromolar konsantrasyonlarda tüm ABL, ABL-ilişkili gen proteinleri veya KIT reseptörü gibi platelet-kaynaklı büyüme faktör reseptörlerinin kinaz aktivitesini inhibe etmektedir. Dirençte en sık görülen mekanizma BCR/ABL domaininde meydana gelen mutasyonlardır. Bu mutasyonlar kinaz domaininde konformasyonel değişikliğe neden olarak imatinibin BCR/ABL'a bağlanmasını engellemektedir (Klawitter ve ark., 2009). Bu mekanizma sekonder direnç mekanizması olarak değerlendirilmekte ve hastalığın relapsına neden olduğu hastalar ile yapılan çalışmalarda ortaya konulmaktadır. Birincil direnç mekanizması geliştiren hastalarda ise BCR/ABL mekanizmasından bağımsız olarak direnç geliştiği bulunmuştur. Birçok vakada Imatinib tedavisi başarılı sonuçlar vermesine rağmen tüm lösemik hücreleri tamamen yok edememektedir. Bu durumda da hastalığın relapsını engellemek için sürekli bir ilaç uygulaması gerekmektedir. KML'nin progresyonu ve Imatinib direnci DNA metilasyonu gibi epigenetik değişiklikler, antiapoptotik ve apoptotik genlerin transkripsiyonel regülasyonu progresyonla ilişkili genler ve oksidatif stres ile yakından ilişkili olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, hücre adezyonu, ilaç metabolizması, protein tirozin kinazlar ve fosfatazların ekspresyonu imatinib dirençli ve hassas hücrelerde farklılık göstermektedir. Aynı şekilde Imatinib dirençli ve hassas hücrelerde apoptotik yolaktaki gen ekspresyonları da farklılık göstermektedir. Primer KML hücrelerinde normal kemik iliği hücreleriyle karşılaştırıldığında çok düşük seviyede Bim ekspresyonu görülürken,

Imatinib dirençli hücrelerde BCL-2 geninin ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. Bu nedenle Imatinib ile apoptozisi indüklerken, apoptotik etkiyi artıracak bir ajan ile kombinasyonun daha etkili sonuçlar sağlayacağı düşünülmektedir (Trela ve ark., 2014).



Şekil 1.4. BCR/ABL pozitif myeloid progenitör hücredeki sinyal yolları (Quintas-Cardama ve ark., 2009)

Imatinibin etkililik ve direnci ile moleküler mekanizmalar arasındaki ilişki iyi bilinse de imatinib tedavisinin metabolik sonuçları hala bilinmemektedir. BCR-ABL pozitif hücrelerde yüksek afiniteli GLUT-1 glukoz taşıyıcısının ekspresyonu görülmektedir ve hücreye glukoz alımı artmaktadır. Son çalışmalar, glukoz-substratlı fluxın kontrolünün imatinibin anti-proliferatif etkisinde önemli bir mekanizma olduğunu ve imatinibe hassas hücrelerin mitokondriyal homeostazı sürdürürken glikolitik aktivitelerinin azaldığını göstermektedir (Şekil 1.4). Sonuç olarak enerji metabolizması özellikle apoptozisin indüklenmesinde antikanser tedavilerinde oldukça hassas bir mekanizma olarak karşımıza çıkmaktadır (Klawitter ve ark., 2009).

1.2. Kronik Myeloid Lösemi ve Metabolizma

Imatinib hassas ve dirençli hücreler arasındaki metabolik farklılıklar hücre proliferasyon oranı, apoptozisin indüklenmesi, Pgp ekspresyonu ve hücre içi imatinib konsantrasyonu ile korelasyon göstermektedir. Glukoz metabolizmasında meydana gelen azalmanın özellikle ilaca hassas hücrelerde önemli derecede olması, hücre proliferasyonunun inhibisyonu ve apoptozisin başlamasında hücre spesifik bir metabolik cevap olduğunu göstermektedir. Dirençli hücrelerde ise imatinib uygulamasına rağmen proliferasyonun devam etmesi ve apoptozise gitmemeleri artmış fosofolipit sentezi ve yüksek seviyede glikolitik aktivite içeren fenotipin varlığının göstergesi olmaktadır (Klawitter ve ark., 2009). Yapılan çalışmalarda K562 hücrelerinde imatinib ile BCR/ABL aktivitesinin inhibisyonunun hücrenin glukoz metabolizmasında önemli değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir (Gottscalk ve ark., 2004; Barnes ve ark., 2005). Bcr-Abl pozitif hücreler yüksek afiniteli GLUT-1 glukoz taşıyıcısı eksprese ederek yüksek seviyede glukoz almaktadırlar. Bu nedenle imatinibin glukoz fluxundaki ve hücre metabolizmasındaki etkisi apoptozisten direnç gelişimine kadar birçok konuda hücredeki değişimlerin anlaşılması konusunda önem arz etmektedir. BCR-Abl füzyon geni örneğin glukoz alımını ve hücrenin hayatta kalımını artırabilir. Tirozin kinaz inhibitörü imatinib bu hücrelerde hayatta kalım sinyalini durdururken glikolizin azalmasına ve hücre ölümüne sebep olmaktadır. Artık metabolizmanın azalmasıyla büyüme faktörleri inhibe olarak hücre ölümü başlamaktadır (Mason ve ark., 2010).

Glukoz tüketimi hücrelerde direkt olarak enerji üretimiyle ilişkilidir. Kanser hücrelerinde de aerobik glikoliz ile yüksek seviyedeki enerji ihtiyacı karşılanmaktadır. Glukoz metabolizmasındaki önemli değişim imatinib tedavisiyle ortaya çıkmaktadır. K562 hücrelerindeki glikoliz oranı imatinib tedavisitle birlikte proliferasyondaki azalmaya bağlı olarak düşmekte, bu nedenle de daha az laktat üretilmektedir. Glukozdan glutamat üretimindeki azalma imatinib varlığında azalmaktadır. Dirençli hücrelerde ise glikoliz ve laktat seviyesinde artış devam etmektedir. Yüksek glikoz alımı glikolitik enzimlerin aktivitesinin artmasına neden olmaktadır ki bu da onkogenezin önemli göstergelerinden biridir. Artmış glikolizin

hızlı çoğalan hücrelerde onkogeneizde rol oynayan önemli sinyal yolları tarafından kontrol edildiği gösterilmiştir (Klawitter ve ark., 2009). Kanser hücreleri büyüme faktörü olmaksızın büyüme faktörünü taklit eden sinyallerle oluşabilir ve bu yolların inhibisyonunun kanser hücrelerini ortadan kaldırmakta etkili bir yol olduğu da kanıtlanmıştır. Buna ek olarak hücre metabolizması direkt olarak Bcl-2 ailesi proteinlerini regüle etmektedir. Glukoz alımının azalması prosurvival Mcl-1 proteininin degradasyonuna neden olmakta ve proapoptotik proteinlerden Pumanın aktivasyonunu sağlamaktadır. Glukoz metabolizmasının inhibisyonunun proapoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerinden Bax, Bim veya Puma varlığında gerçekleşmesi hücre ölümünü etkileyen metabolik yolların Bcl-2 ailesi proteinleriyle bir noktada keştiğini göstermektedir. İmatinib ile glukoz metabolizmasının azalması ama aerobik glikolizin devam etmesi p53 aktivasyonunu ve hücre ölümünü hızlandırırken, glikolizin inhibisyonu imatinib hassasiyetini p53 aracılığıyla artırmaktadır. Bu nedenle, glukoz metabolizması tek başına p53 aktivasyonu ile ilgili yolları baskıladığı ve onkogeneiz ile ve tedavi direnciyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Bim ve Bad gibi proapoptotik proteinler imatinib tedavisinden imatinib tedavisinden sonraki hücre ölümüyle ilişkili olmasına rağmen, Puma'nın hücre metabolizmasına hassasiyetine özgün olduğu bulunmuştur. Bu bulgu p53 aracılı Puma indüksiyonunun metabolik kontrolünün imatinib hassasiyetinde önemli bir belirleyici olduğunu göstermektedir. P53-null K562 hücrelerinde glikoliz inhibisyonunun imatinib hassasiyetini artırmada etkili olmaması, tümördeki metabolik manipülasyon sonucunun p53 varlığına bağlı olduğunu göstermektedir (Mason, 2010). İmatinibe dirençli hücrelerde glukoz metabolizmasının artması da, metabolizma ve ilaç dirençliliği arasındaki ilişkiyi desteklemektedir. Bu da yeni geliştirilecek tedavilerin hücre metabolizmasına hassasiyetle ilişkili ve metabolik manipülasyonlarla geliştirilebilecek yönde olması konusunda fikir vermektedir (Kominsky ve ark., 2009). Glukoz-substrat flux imatinibin antiproliferatif çalışma mekanizması için önemlidir çünkü birçok malign hücre Bcr-Abl pozitif hücreler yüksek afiniteli GLUT-1 glukoz taşıyıcısını eksprese eder ve glikoz alımını artırır. İmatinib dirençli c-kit pozitif malignansilerde glukoz alımının önemli miktarda arttığı gösterilmiştir. Bu nedenle imatinib tedavisine lösemi hücrelerinin metabolik cevabında önemli biyolojik göstergeler olarak karşımıza

çıkmaktadır. Tümörün biyokimyasında özellikle glukoz alımı ve metabolizmasında normal hücreye göre önemli farklılıklar görülmektedir. Mitokondriyal metabolizmanın bozulduğu ve sitozolik glikolizin arttığı tümör hücrelerinde gözlemlenmektedir (Gottschalk ve ark., 2004).

İmatinib dirençli K562r hücrelerinde glikolitik metabolizma yüksek seviyede görülmekte ve glukoz alımı ve laktat üretimi artmaktadır. Glukoz alımındaki ve metabolizmadaki değişiklikler GLUT-1'in plazma membranından hücre içine translokasyonu ile birliktelik göstermekteyken, imatinib uygulanan duyarlı hücrelerde GLUT-1 plazma membranında lokalize olmaktadır (Song ve ark., 2014; Hulleman ve ark., 2009). Bu nedenle, glikolizin inhibisyonu yüksek seviyede metabolizma ile birlikte ilaç direnci görülen tümör hücrelerinde etkili bir hedef tedavi olacağı düşünülmektedir. Glikolizin artması tümör hücrelerinde kemorezistans önemli rol oynamaktadır (Song ve ark., 2014). Song ve ark., diğer bir myeloid kökenli lösemi tipi olan AML hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada, GLUT-1 mRNA ekspresyonunu sağlıklı kontrol, kısmi remisyon ve tam remisyon görülen gruba göre remisyon olmayan grupta daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Bu da GLUT-1 overekspresyonunun AML'de kemorezistans ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Glukoz temel enerji kaynağıdır ve GLUT-1 ekspresyonundaki artış enerji yararlanımını sağlama yönündedir bu da sonuçta kötü prognozla ilişkilendirilmektedir. In vitro yapılan çalışmalar, glikoliz inhibitörü olan 3-bromopirüvik asit'in yüksek seviyede GLUT-1 ekspresyonu görülen kolon kanseri hücrelerinde düşük seviyede ekspresyon görülenlerle kıyaslandığında proliferasyonu önemli derecede baskıladığını göstermiştir. GLUT-1 ekspresyonu HIF-1 α transkripsiyon faktörü tarafından regüle olmaktadır. Kanserli dokuda HIF-1 α aerobik koşullarda da ekspresyonu indüklenebilmektedir (Song ve ark., 2014). HIF-1 α 'nın ilaca dirençli lösemi hücrelerinde ekspresyonu görülmesi önemli bir bulgudur (Deeb ve ark., 2011; Kluza ve ark., 2011). HIF-1 α glikolitik ve antiapoptotik birçok genin ekspresyonunda önemli rol oynamaktadır, bu da kanser hücrelerinin hayatta kalımını ve ilaç direncini etkilemektedir (Song ve ark., 2014).

Bcr-Abl kromozom 9 ve 22 arasındaki dengeli translokasyon olup, hemen hemen tüm KML hastalarında ve Akut Lenfoblastik Lösemi hastalarını %20'sinde tespit edilebilmektedir. Bcr-Abl pozitif lösemi hastalarının tedavileri Abl kinaz inhibitör imatinib ile yapılmaktadır. Sürekli aktif bir tirozin kinaz aktivitesi olan Bcr-Abl birçok büyüme ve antiapoptotik sinyal yollarındaki geninin ekspresyonunu etkilemektedir. Bcr-Abl Ras-MAPK yolağını aktive ederek sonuçta antiapoptotik protein Bcl-2'nin seviyesini artırır. Bcr-Abl bununla birlikte PI3K/Akt yolağını da aktive eder. MTOR yolağının aktivasyonunu sağlayan PI3K/Akt protein sentezinde temel regülatör rol oynarken, proapoptoik bir gen olan Bad'ı inhibe etmektedir. Bcr-Abl aynı zamanda malign hücrelerin ortak özelliği olarak bilinen metabolik reprogramming ile ilişkilidir. Bu hücrelerde görülen Warburg etkisi hücreye glikoz alımının, proliferatif kapasitelerinin ve kütlelerinin artmasını sağlamaktadır. GLUT-1 glukoz taşıyıcısı eksprese olmakta ve glukoz alımı artmaktadır. Hücre içi glukoz içeriğinin artması glukoz yıkım kapasitesini artırırken, hücre cevap olarak HIF-1 α ekspresyonunu indükleyerek fazla glukoz karbonunun laktat olarak atılımını gerçekleştirmektedir. Bu nedenle HIF-1 α upregülasyonu veya stabilizasyonu ile Bcr-Abl, hücre metabolizmayı değiştirerek laktat üretimini artırmakta ve oksijen tüketimini azaltmaktadır. Bcr-Abl kinaz aktivitesine bağlı olarak değişen bu metabolik regülasyon imatinib ile inhibisyon sonucunda değişerek aerobik glikolizi mitokondriyal sitrat döngüsüne yönlendirmekte ve HIF-1 α miktarını azaltmaktadır. Dengler ve ark., yaptıkları çalışmada Bcr-Abl'ın yüksek seviyede ekspresyonunun görüldüğü hücrelerde imatinib uygulamasının kesilmesinin ardından Bcr-Abl'ın akut aktivasyonu, değişen metabolizma ve hücre ölümü arasındaki ilişkiyi göstermişlerdir. Bcr-ABL'ın hiperaktivasyonu aerobik glikoliz ve glutaminolizin önemli derece artmasına sebep olmuştur. Metabolizmadaki bu ani artış p38 ve RIP-1 bağımlı hücre ölümünün indüklenmesinden sorumludur (Dengler ve ark., 2011).

Akut lösemi tedavisinde kullanılan Glukokortikoidler imatinib kesildikten sonra hücre ölümünü indüklediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Imatinib dirençli BaF3 hücrelerinde yapılan çalışmada betametazon ve prednizolon varlığında ve yokluğunda imatinib kesilerek hücre ölümü test edilmiştir. Her iki glukokortikoidin uygulandığı hücrelerde imatinib yokluğunda hücre ölümünün

varlığı tespit edilmiştir. Daha da önemlisi kortikosteroidlerin glukoz metabolizmasını normal sınırlara indirdiği de saptanmıştır. Bcr-Abl ın hiperaktivasyonunun görüldüğü hücrelerde betametazon, glukoz-6-fosfat, fruktoz-1,6-bifosfat ve fosfoenolpiruvat gibi glikolizin anahtar metabolitlerinin seviyesini düşürdüğü saptanmıştır. Bu bulgu da hücre ölümüyle ortak çalışan ve Bcr-Abl aktivasyonu ile artan seviyedeki glutamin ve glikoliz yollarının kortikosteroidler tarafından antagonize edildiğini göstermektedir (Dengler ve ark., 2011). Onkogenik stres cevabı olarak hücrede aerobik glikoliz ve glutaminoliz artmaktadır. Glukoz yararlanımının ve laktat üretiminin yeterli miktarda oksijen olmasına rağmen artması malign hücrelerde ortak olarak görülen bir özelliktir. Mitokondriyal glukoz oksidasyonunun aerobik glikolize değişimiyle gerçekleşen bu metabolik dönüşüm Warburg etkisi olarak bilinmekte ve tümör hücrelerinin hem enerji üretimini hem de anabolik büyümelerini artıran etkili bir sistem olarak çalışmaktadır (Dengler ve ark., 2011).

1.3. Glukokortikoidler ve Kanser

Glukokortikoidler immün cevap, metabolizma, hücre büyümesi, çoğalması, gelişimi ve üremeyi içeren birçok biyolojik süreçte işlev görürler. Glukokortikoidlerin antiproliferatif etkisi sayesinde, immün baskılama, inflamasyon tedavisi ve sitotoksitenin indüklenmesi için kullanılmaktadırlar. Glukokortikoidler apoptozisi indüklemektedirler ve lösemi, lenfoma ve Multiple Myeloma(MM) gibi birçok hematolojik hastalığın tedavisinde anahtar rol oynamaktadırlar (Sionov ve ark.,2008). Glukokortikoidler (dekzametazon gibi), eklem iltihabı gibi ateşli hastalıklar, astım, dermatitis ve otoimmün hastalıkların tedavisinde çok önemli bir yere sahiptir. Dahası glukokortikoidler kanser tedavisinde de yaygın olarak kullanılmaktadır, 1960'ların başlarında çocukluk çağı lösemilerinde, hastalığın gerilemesini sağlamak için kullanılmaya başlanmıştır. Daha sonra glukokortikoidlerin etkili bir şekilde lenfoid hücreleri öldürdüğüne bulunmasıyla, glukokortikoidler lenfoid hastalıklarda uygulanan tüm kemoterapi protokollerine katılmıştır. Glukokortikoidlerin normal ve tümörlü hücreleri antiproliferatif etkiye zorladığı gösterilmiştir. Çeşitli hücre serilerinde *in vitro* yapılan çalışmalarda,

glukokortikoidlerin uzaklaştırılmasından sonra hücre döngüsünün senkronize şekilde ilerlediği gösterilmiş, buna bağlı olarak glukokortikoidlerin antiproliferatif etkisinin, hücre döngüsünün ilerleyişinde tersinir G1-blokajına aracılık edebileceği bildirilmiştir (Mattern,2007). Metilprednizolon, sentetik bir glukokortikoid olup, doğal glukokortikosteroidin, hidrokortizonun kimyasal bir modifikasyonudur. Büyük ölçüde dokulara dağılır, oral biyoyararlanımı yüksektir ve kan-beyin bariyerini geçebilir. Birçok *in vitro* çalışma, deksametazonun ve prednizolonun bazı fare ve insan myeloid lösemi hücrelerinde makrofaj ve granülositlere farklılaşmayı indüklediğini göstermiştir (Sloka ve Stefanelli, 2005). Yüksek doz metilprednizolon (High-dose methylprednisolone- HDMP) tedavisi boyunca lösemi hücrelerinin sayısında ciddi azalma ve buna bağlı olarak myelosit, metamyelosit ve granülositlerin hem periferik kanda hem kemik iliğinde arttığı görülmüştür (Hiçsönmez ve ark., 1993). Glukokortikoid yapıda bir ilaç olan dexametazonun yüksek konsantrasyonda verildiğinde fare myeloid hücrelerin çoğalmasının duraklatılması sağlanmıştır. İnsan promyelositik lösemi hücre serisinde (HL-60) kortikosteroidlerin ve APL (Akut Promyelositik Lösemi) hücrelerinde deksametazonun anti-proliferatif etkisi vardır. Hiçsönmez ve arkadaşları 1988'den beri yeni AML tanısı konmuş çocuklar (AML'nin çeşitli alt tiplerinde) ve hastalığı tekrarlayanların tedavisinde, HDMP'nin belirgin bir lösemi karşıtı etkisi olduğunu göstermişlerdir (Hiçsönmez ve ark.,2006). Ayrıca kısa süreli (5-7 gün) kullanılan HDMP tedavisiyle, farklılaşma ile veya farklılaşma olmadan myeloid lösemi hücrelerinin apoptozise indüklendiği gösterilmiştir. HDMP tedavisiyle sitokinlerin baskılanmasının lösemi hücrelerinde apoptozisi indüklemeye rol oynadığı bildirilmiştir (Hiçdönmez ve ark.,1996). Kortikosteroidler lenfoblastlarda, hücre döngüsünde duraklama, kaspaz ve p53 geninin aktivasyonunda artış, *AP-1*, *NF-K B*, *c-myc* gibi genlerin transkripsiyonunu düşüş, IL-6, RAFTK, SHP-2 VE STAT-3 gibi hücre-sinyal transdüksiyon moleküllerinin regülasyonu, hücre içi kalsiyumun artışı yoluyla apoptotik etki gösterirler. Buna ek olarak kısa süreli HDMP tedavisi CD34 (+) hematopoetik progenitör hücreleri stimüle ederek lökosit iyileşmesini hızlandırdığı da bildirilmiştir (Hiçsönmez ve ark, 2006; Cetin ve ark., 1996).

1.4. Metabolik Enzimlerin Proliferasyon, Hayatta Kalım ve Ölüm Yolaklarıyla İlişkisi

Kanser hücrelerinde aerobik glikoliz, glutaminoliz, yağ asitleri ve lipit de novo sentezi ve anaplerozis gibi metabolik yolların birçoğu aktive olmaktadır. Enzimatik yolların upregülasyonu, hem metabolik enzimlerin kanser spesifik izoformlarının upregülasyonu ile piruvat kinaz 2 (PKM2), laktat dehidrogenaz A(LDHA), piruvat dehidrogenaz (PKD1) ve hekzokinaz (HK2) hem de metabolik yolları etkileyen mutasyonlu ve anormal olarak aktive olmuş onkogenler ile gerçekleşir. İki temel büyüme faktör-cevaplı yolk olan PI3K, AKT/protein kinaz B, mTOR ve MAPK yolları kanserde sıklıkla mutant ve anormal olarak aktive olur. Bu yollar hücrel metabolizmayı da etkiler ve malign fenotipe neden olur. Aslında, PI3K/AKT/mTOR yollarının aktivasyonu besin transporterlarını upregüle eder ve hücreler aminoasit, glukoz ve besinlerin alınmasını artırır. AKT aktivasyonu gen ekspresyonunu değiştirerek, glikoliz ve laktat üretimini artırmasına ek olarak yağ asiti oksidasyonunu da inhibe eder. PI3K/AKT/mTOR yolu aynı zamanda lipit ve protein makromolekül sentezini artırmasıyla bilinmektedir. PI3K yolk aktivasyonu MYC transkripsiyon faktörü ekspresyonunu ve HIF-1 stabilizasyonunu artırır. Bu iki onkogen kanser hücrelerinde yer alan metabolik izozimlerin (GLUT1, HK1/HK2, LDHA, PDK1) transkripsiyonunu regüle ederek aerobik glikolizde rol oynar. MYC aktivasyonu aynı zamanda glutamin metabolizmasını artırır. Glutaminoliz kanser hücrelerinin proliferatif kapasitesini artırır. Aminoasit ve nükleotit sentezi için nitrojen kaynağı olarak, lipit sentezi için sitrat kaynağı olarak, TCA döngüsü aracılığı ve anaplerozisi sürdürmek için karbon üniteri sağlayarak ve lipit ve nükleotit için NADPH sağlayarak görev yapar. MYC ekspresyonu artmış hücreler sağkalım için glutamine bağımlı oldukları bilinmektedir. MAPK sinyal yolundaki mutasyonlar özellikle RAS ailesi onkogenlerinin hücrel metabolizmadaki etkileri bilinmektedir. RAS'ın aktive formları (hem direkt hem de dolaylı olarak HIF-1'i aktive eder) asetil-CoA havuzunu azaltır ve TCA siklusu metabolitlerinden sitrat ve izositratın azalmasına neden olur. RAS aynı zamanda PI3K yolunu aktive eder ve mitokondriyal alımı ve yağ asitlerinin β oksidasyonunu inhibe eder. Aktive RAS mutasyonları iyi bir besin kaynağı olsa da otofajinin ve mitofajinin seviyesini artırır.

Bu MEK/ERK aracılı mekanizmalarla Beclin-1 artışı ve Noxa'nın indüklenmesi gibi veya BNIP3 ekspresyonu yoluyla olur (Leone ve Amaravadi, 2013). Bu metabolik yollar mitokondri aracılığıyla birbirine entegre olmaktadır. Aerobik glikoliz piruvatı mitokondriden ve oksidatif fosforilasyondan uzakta tutma eğilimindeyken eş zamanlı olarak glutaminoliz (büyük bölümü mitokondride gerçekleşir) TCA döngüsünün devamlılığı için karbonları sağlar ve oksidatif fosforilasyonun sürmesine izin verir. Buna ek olarak mitokondride glutaminolizle gerçekleşen indirgeyici karboksilasyon önemli bir sitrat kaynağıdır ve lipid sentezi için sitozole gönderilir. Dahası hipoksiktümör şartlarında ROS, mitokondriyal kompleks III tarafından oluşturulur ve metabolik disregülasyon aracılığıyla HIF-1 sinyalini tetikler. Hücresel stres ve değişen metabolizma devam edip, mitokondride algılandığında programlı hücre ölümü yolları başlatılır. Bunun tam tersi hücresel stres ve onkojenik sinyal hücre hayatta kalım mekanizması olarak devreye girer (Leone ve Amaravadi, 2013).

Hipoksi HIF-1 instabilizasyonu ile transkripsiyonu değiştirerek glikolitik kapasiteyi arttırıp, mitokondriyal solunumu azaltmaktadır. Buna ek olarak HIF'tan bağımsız olarak hipoksi mTOR sinyalini inhibe ederek metabolik fenotipin değişmesinden sorumlu birçok mekanizmayı etkilemektedir ki otofaji önemli mekanizmalardan biridir. mTOR inhibisyonunun tümör baskılayıcı etkisi olması beklenmesine rağmen malignansilere cevap olarak hipoksiye tolerans artmakta ve metabolik stres boyunca tümör hücre hayatta kalımı uyarılmaktadır. Diğer metabolik stres yaratan koşullar düşük pH ve düşük glukoz olup, solid tümörlerde yaygın görülmektedir ve metabolik fenotipin muhtemel belirteçlerinden biri olarak düşünülmektedir.

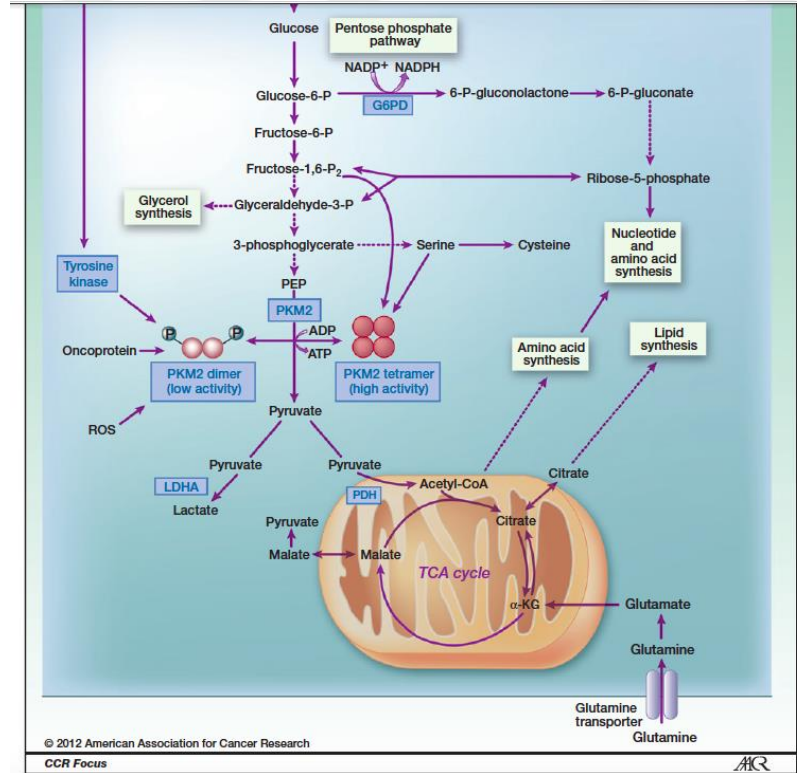
Otofajik bir gen ürünü olan Beclin-1'in Bcl-2'ye bağlanan bir molekül olduğunun bulunması, Bcl-2-Beclin-1 kompleksinin apoptotik ve otofajik sinyal yolları arasındaki karşılıklı etkileşimin odak noktası olması gerektiğini göstermiştir. Bir BH3-only protein olan Beclin-1, Bcl-xL, Bcl-w ve Mcl-1 ile etkileşmekte ancak Bcl-2 ailesinin pro-ölüm BH3-only üyeleriyle etkileşmemektedir (Gordy ve He, 2012).

LDH-A geni epidermal büyüme faktörü olarak bilinmektedir ve yaygın olarak prognostik tümör belirteci olarak kullanılmasına rağmen etki mekanizmasında hala bilinmeyen noktalar bulunmaktadır. LDH enziminin izoformlarından LDH-A normal hücrelerde anaerobik koşullarda piruvatı laktata çevirmektedir. Diğer bir LDH izoformu olan LDH-B ise kalp gibi aerobik dokularda yüksek seviyede bulunmaktadır ve laktatın piruvata çevrilmesinden sorumludur. C-Myc proteini hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptozis süreçlerinin regülasyonuna katılmaktadır. Shim ve ark., yaptıkları çalışma sonucunda LDH-A'nın direkt bir c-Myc –responsive gen olduğu ve MYC-aracılı hücre transformasyonunda yer aldığını saptamışlardır. LDH-A'nın ekspresyonunun artması laktat üretiminin artması için yeterli olmaktadır ve kanser hücrelerine neoplastik büyüme avantajı sağlayacak metabolizma değişimine neden olmaktadır (Shim ve ark, 1997).

HIF-1, kanserli hücrelerin çoğunluğunda yetersiz oksijen ortamı oluştuğunda yani hipoksik koşullara transkripsiyonel cevabı düzenleyen temel transkripsiyon faktörlerinden biridir. HIF-1 anjiyogenez, invazyon, metastaz ve oksidatif metabolizmadan glikolitik metabolizmaya dönüşüm süreçlerinde aktive olmaktadır. HIF-1 glukoz taşıyıcıları ve glikolitik enzimleri kodlayan genlerin transkripsiyonlarını aktive ederek, hücrelerde glukoz alımını ve glikolizisi artırmaktadır. HIF-1 aynı zamanda LDH-A ve piruvat dehidrogenaz kinaz 1 (PDK1) ekspresyonunu da kontrol etmektedir. LDHA piruvatın laktata dönüşümünü katalize eder bu sayede piruvatı asetil koenzim A'ya çevirecek olan piruvat dehidrogenazı (PDH) substratı olan piruvatın mitokondriyal kullanımı azalır. PDK1, PDH'nin katalitik alt ünitesini fosforilleyerek inaktivasyonuna neden olur ve piruvatı mitokondriden uzaklaştıracak şanti aktive eder. HIF-1 aktivasyonu oksidatif fosforilasyon metabolizması ile glikoliz arasındaki dengeyi değiştirerek, Warburg etkisinin oluşmasına neden olur (Luo ve ark., 2011). Christofk ve ark. yaptıkları çalışmada, PKM2 ekspresyonunun düşük oksijen tüketiminde hücreye glukoz alımı ve laktat üretiminin artışıyla ilişkili olduğunu göstermişlerdir (Christofk ve ark, 2008).

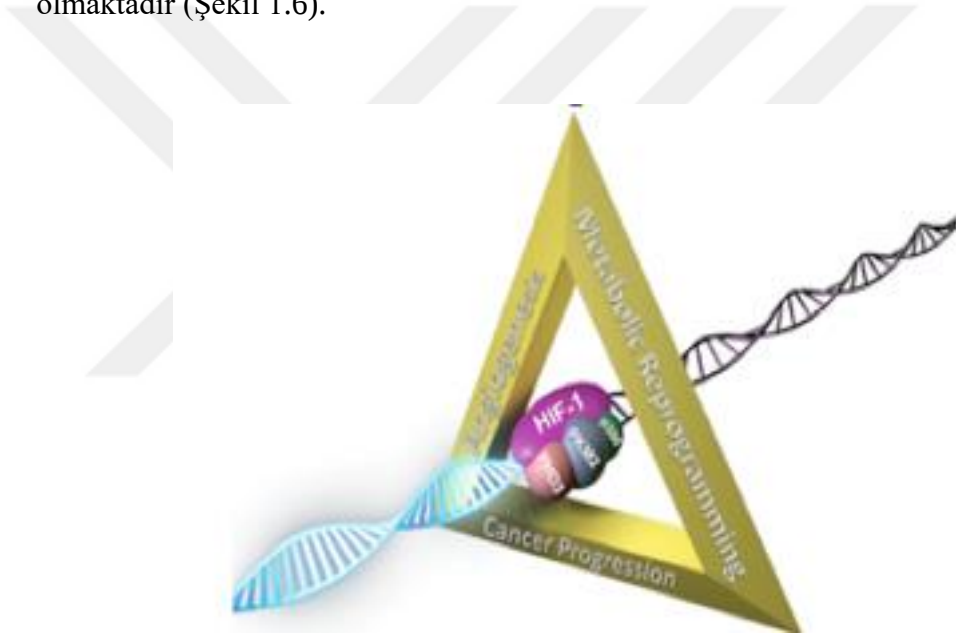
Piruvat kinaz fosfoenolpiruvattan piruvat ve ATP oluşumunu katalizleyen enzimdir. Bu enzimin M1 formu (PKM1) kalp ve beyin gibi farklılaşmış erişkin dokularda ifade edilirken, M2 izoformu (PKM2) embriyonik hücrelerde, erişkin kök hücreler ve kanser hücrelerinde ifade edilmektedir. Kanser hücrelerindeki genetik değişimle birlikte, PKM1'in yerine PKM2 ekspresyonu gerçekleşerek Warburg etkisinin ortaya çıktığı ortaya konulmuştur. PKM2'nin ekspresyonu görülen hücrelerde tümör oluşumu tetiklenmektedir.

PKM2'nin glikolitik enzim aktivitesi, seçici olarak kanser hücrelerine büyüme ve reaktif oksijen türevlerinin baskılanması gibi avantajlar sağlayan Warburg etkisi için gereklidir. Çünkü bu sayede hem hücreye oksidatif fosforilasyon yolağından daha hızlı ATP sağlayan glikolitik yolak aktive olur hem de PKM2'nin düşük aktivitesi sayesinde glikolitik ara ürünlerin gliserol sentezi ve pentoz fosfat yollarına bağlanması ve takiben NADPH üretimiyle ROS üretimini baskılanması ve aynı zamanda nükleotit sentezi gerçekleşmiş olur (Şekil 1.5) (Tamada ve ark., 2012).



Şekil 1.5. Glikolitik Yolağı Bağlandığı Ara Yolaklar (Tamada ve ark., 2012)

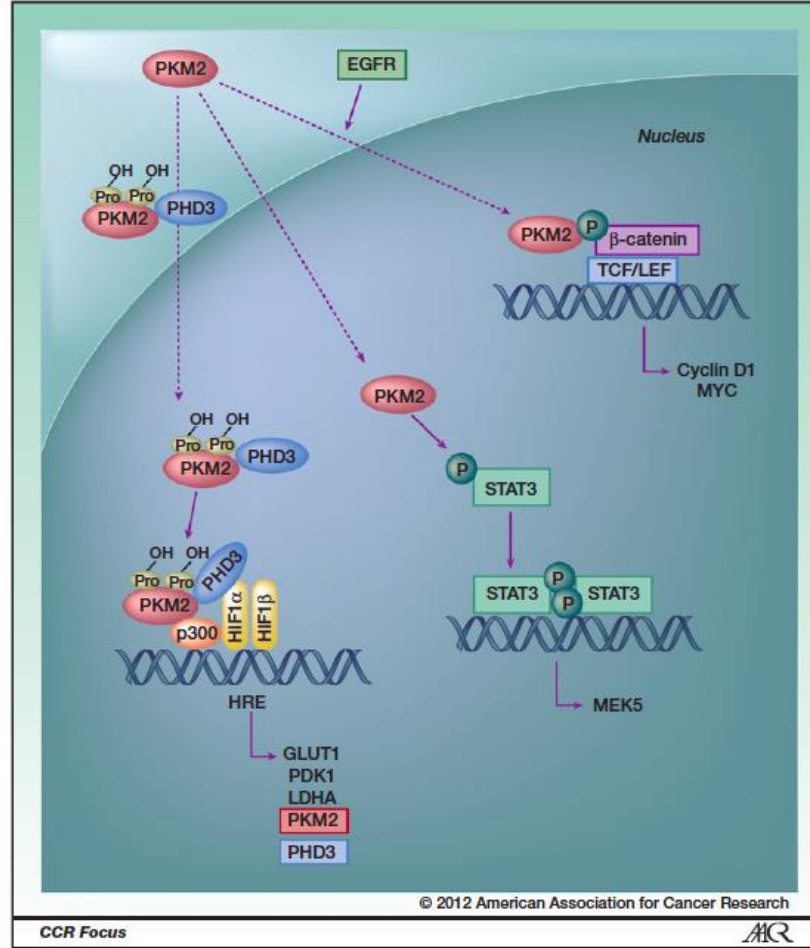
Tirozin kinazlar kanserde hücre büyümesi, metabolizma ve anjiyogenezde önemli rol oynamaktadırlar. PKM2'nin fosforillendiği tirozin rezidüsüne göre aktivitesinde değişiklik olmaktadır. Hala PKM2'nin aktivitesindeki hangi değişikliklerin piruvatın laktat ya da AcCoA'ya dönüşümünü tetiklediği bilinmemektedir. Luo ve ark., PKM2'nin kanser hücrelerinde neden olduğu Warburg etkisini hepatoblastoma hücrelerinde yapılan bir çalışmayla göstermişlerdir. PKM2'nin, HIF-1'in hedef genleri üzerinde HRE'lere bağlanarak koaktivatörlerin toplanmasını ve ardından LDHA ve PDK1 genlerinin transkripsiyonunu indüklediğini göstermişlerdir (Luo ve ark., 2008). PKM2'nin stimüle ettiği HIF-1'in hedef genleri oksidatif fosforilasyonun glikolitik metabolizmaya dönüşümüne neden olmaktadır (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. PKM2'nin metabolik yeniden programlama ve kanser progresyonu ile ilişkisi

Birçok çalışma, PKM2'nin nükleer translokasyon gibi glikolitik olmayan fonksiyonu olduğunu göstermiştir. PKM2, hücre proliferasyonu ile ilgili EGFR gibi yolların aktivasyonu ile indüklenmekle birlikte, hidrojen peroksit, UV ışınları gibi apoptotik uyarılarla da indüklenmektedir. EGFR aktivasyonu ile nükleer PKM2 aktive olur ve takiben cyclinD1 ve c-Myc ekspresyonunu başlatan B-katenin transaktivasyonunu sağlar. C-myc, PKM2/PKM1 oranını artırır ve c-Myc glukoz

taşıyıcıları ve LDH-A ekspresyonunu başlatır. PKM2'nin çekirdeğe translokasyonu glikolizi başlatan geri beslemeli bir mekanizma olarak çalışır (Şekil 1.7)(Tamada ve ark., 2012).



Şekil 1.7. Metabolik Yolakların Transkripsiyonel Aktivasyonu (Tamada ve ark.,2012)

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzeme ve Solüsyonlar

2.1.1. Hücre Kültürü

Çizelge 2.1. Hücre kültüründe kullanılan malzeme ve gereçler

Besi yeri	Hyclone marka, Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 (1X), No: SH30096.0 1 (L-glutaminsiz)
Fötal Dana Serum (FBS)	Hyclone marka, No: SV20160.03
L-Glutamin	PAA marka, 200mM (100X), No: M11-004
Penisilin-Streptomisin	PAA marka, No: P11-010
Hücre Dondurma tüpleri	Applichem marka, No: 67-68-5
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Greiner bio-one marka, 2 ml
PBS 10X	Hyclone marka- HyQ Phosphate Buffered Saline.067M (PO4) No: SH30258.01
Flask (75 cm²)	Orange Scientific marka, No: 5520200

2.1.2. Agaroz Jel Elektroföresi

Çizelge 2.2. Agaroz jel elektroföresi için gerekli malzemeler

Malzeme adı	Üretici firma	Katalog no
Agaroz	Prona	
Tris	Bio basic inc	TB0194
Borik asit	Amresco	0588
EDTA	Applichem	A2937
Etidyum bromür	Applichem	A1151

2.1.3. Yükleme Tamponu

Çizelge 2.3. Yükleme Tamponu İçin Gerekli Malzemeler

Malzeme adı	Üretici firma	Katalog no
Xylene cyanol	Amresco	0819
Gliserol	Applichem	A2926

2.1.4. Yürütme Tamponu

Çizelge 2.4. Yürütme Tamponu İçin Gerekli Malzemeler

Malzeme adı	Üretici firma	Katalog no
Tris	Bio Basic Inc	TB0194
Borik asit	Amresco	0588
EDTA	AppliChem	A2937
NaOH	Sigma-Aldrich	06203

2.1.5. EDTA solüsyonu

Çizelge 2.5. EDTA Solüsyonu için gerekli malzemeler

Malzeme adı	Üretici firma	Katalog no
EDTA	Applichem	A2937
NaOH	Sigma-Aldrich	06203

2.1.6. Etidyum Solüsyonu

Çizelge 2.6. Etidyum Solüsyonu için gerekli malzemeler

HPRT	F: TGACACTGGCAAAACAATGCA R: GGTCTTTTTTACCAGCAAGCT
PKM1	F: GAGGCAGCCATGTTCCAC R: TGCCAGACTCCGTCAGAACT
PKM2	F: CCA CTT GCA ATT ATT TGA GGAA

	R: GTG AGC AGA CCTGCC AGA CT
LDHA	F: TTGGTCCAGCGTAACGTGAAC R: CCAGGATGTGTAGCCTTTGAG
LDHB	F: TCCCGTGTCAACAATGGTAA R: CCCACAGGGTATCTGCACTT
HEXOKİNAZ 2	F:ACCCGGGAAAGCAACTGTTTG R: TCACCAGGATAAGCCTCACCAG
PDK1	F:TGGTGGAAAAGGCAAAGGAAGTC R: CAGACGCCTAGCATTTTCATAGC
C-MYC	F:GCTGCCAGGACCCGCTTCTC R: ACGTTGAGGGGCATCGTCGC
BIM	F: ATCTCAGTGCAATGGCTTCC R:CATAGTAAGCGTTAAACTCGTCTCC
BAX	F: GACGGCAACTTCAACTGGG R: AGGAGTCTCACCCAACCAC
BCL-2	F: CGCCCTGTGGATGACTGAGT R: GGGCCGTACAGTTCCACAA
MDR	F : AAGGCATTTACTTCAAACCTGTCA R : GGATTCATCAGCTGCATTTTC
BECLIN-1	F: AGCTGCCGTTATACTGTTCTGGG R: TTCTAACTTCTGTGTCCGTCA
MCL-1	F: CGAACCATTAGCAGAAAGTATCAC R: GATATGCCAAACCAGCTCCT

2.2. Çalışma Grubu

Kronik Myeloid Lösemi hastalığını taklit eden hücre serisi olan K562 hücreleri bu çalışmaya dahil edildi. Daha önce dondurulup sıvı azota konmuş olan İmatinibe hassas K-562s ve İmatinibe dirençli K562r hücre serileri bu tez çalışmasında kullanıldı. Her iki hücre serisi de %10 serum, %1 L-glutamin, %1 streptomisin-penisilin içeren RPMI 1640 besiyeri ortamında çoğaltıldılar. Büyümeleri için gerekli olan 37°C sıcaklık ve %5 CO2 içeren etüvde inkübe edildi.

2.3. K-562s ve K562r Hücrelere Metilprednizolon Uygulaması

Çalışmada Prednol-L (Mustafa Nevzat) kullanıldı. Hücrelere farklı konsantrasyonlarda Metilprednizolon uygulanarak doz denemeleri yapıldı ve apoptozis için uygun doz (LD50) belirlendi. 10 mM, 5mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,1 mM doz aralıklarında Metilprednizolon uygulandı. 24., 48. Ve 72. saatlerdeki sonuçlar analiz edildi. Toksik doz ve apoptotik doz için etkin doz belirlendi.

2.3.1. [3-(4,5-dimethyldiazol-2-yl)-2,5 diphenyl Tetrazolium Bromid] (MTT) Sitotoksisite Testi

Metilprednizolonun hücreler üzerindeki sitotoksisite düzeylerini saptamak amacıyla MTT yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla aşağıda yer alan protokol izlenmiştir.

- 96 kuyucuklu plakın ekim yapılacak her bir kuyucuğuna 10 µl MTT (5 mg/1 ml) koyulduktan sonra üzerine 100 µl hücre- besiyeri karışımından eklenmiştir. 100 µl 'de 10.000 hücre olacak biçimde ekim yapılmıştır.
- Bu hücreler 37°C'de, %5 CO₂'li etüvde en az 4 saat bekletildikten sonra her bir kuyucuğa. 100 µl lizis solüsyonundan eklendikten sonra tekrar aynı koşullarda konularak 1 gece beklendi.
- Ertesi gün spektrofotometrede (Epoch marka) 550 nm ve 690 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı.

2.3.2. Akım Sitometri İle Apoptozis Tayini

Yüksek doz Metilprednizolonun K562s ve K562r hücrelerindeki apoptotik etkisini belirlemek amacıyla akım sitometri analizleri yapılmıştır. Apoptozis tayini

için, hücreler Annexin V ve 7-Amino Actinomycin D (7-AAD) ile işaretlenerek Accuri C6 cihazı ile akım sitometri analizi ile gerçekleştirilmiştir.

2.3.2.1. Anneksin V ve 7-AAD ile İşaretleme Protokolü

BD Pharmingen FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit kullanılmıştır. Kitin protokolü uygulanmıştır.

1. 1 ml besiyerinde 10^6 hücre olacak şekilde hücreler ependorfa aktarıldı.
2. 2500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
3. Süpernatant atılıp, peletin üzerine 1X PBS eklendi. Hafifçe elle vurularak pelet çözüldü.
4. 2500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
5. Süpernatant dökülüp, üzerine tekrar 1XPBS eklendi. Hafifçe elle vurularak pelet çözüldü.
6. 2500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
7. Süpernatant dökülüp pelete kitten çıkan 1X Binding Buffer'dan 200 µl eklendi.
8. Bu karışımdan 50 µl başka bir ependorfa aktarıldı. Aktarılan hücrelere 2,5 µl AnnexinV ve 2,5 µl PI eklendi.
9. Karanlıkta 15 dakika beklendi.
10. Üzerlerine 1X Binding Buffer'dan 200 µl eklendikten sonra akım sitometri analizine başlandı.

2.4. Glukoz Assay Kiti ile Glukoz Tüketiminin Ölçülmesi

Glukoz (HK) Assay Kiti ile glukozun glukoz-6-fosfoglukonata dönüşümü ölçülmektedir. Glukoz önce glukoz-6-fosfata dönüşmekte, sonra da NAD varlığında 6-fosfoglukonata okside olmaktadır. Bu esnada NAD'ın NADH'a indirgendiği de görülmektedir. NAD'ın NADH'a indirgenmesi 340 nm absorbansta ölçülmekte ve

bçylece direkt olarak glukoz konsantrasyonu hakkında bilgi vermektedir. Hem dirençli hem dirençli olmayan hücrelerde Metilprednizolon uygulamasını takiben bu yöntem ile glukoz tüketimi analiz edildi.

- 4mM Metilprednizolon uygulanan ve uygulanmayan kontrol grubu hücrelerinin 48. Saatte sayımları yapılarak, kitin önerdiği şekilde her tekrar için 2×10^6 hücre toplandı.
- Hücreler 1200 rpm de 3' santrifüj edildi.
- Süpernatantları atılarak pelet üzerine soğuk 1XPBS eklendi ve hafifçe elle vurularak pelet çözüldü.
- 2500 rpm de 1' santrifüj edildi.
- Süpernatant atılarak pelet üzerine Glukoz Assay Buffer eklendi ve hafifçe elle vurularak pelet çözüldü.
- En yüksek hızda 4°C'de 5' santrifüj edildi.
- Süpernatant alınarak deproteinizasyon aşaması için 10 kD'luk spin kolonlu tüplere aktarıldı.
- En yüksek hızda 5' santrifüj edildi. Kolondan geçen sıvı ölçüm yapılmak üzere 96'lık well plate'lere aktarıldı.
- Uygun dilüsyon belirlenerek örnekler Glukoz Assay Buffer ile sulandırıldı.
- Background ölçüm için aynı şekilde örnekler hazırlandı.
- Standartlar ise farklı konsantrasyonlarda kitin önerdiği şekilde hazırlanmıştır.
- Kuyulardaki örneklerin üzerine glukoz enzim mix içeren reaksiyon karışımı eklendi.
- Örnekler oda sıcaklığında 37 °C'lık etüvde 30' inkübe edildikten sonra spektrofotometrede 570 nm'de ölçümleri yapıldı.

2.5. Laktat Dehidrogenaz Assay Kit İle Laktat Miktarının Ölçümü

Kitin çalışma prensibi LDH'ın, NAD'yi NADH'a indirgeyip, spesifik bir renk üreten prob ile etkileşmesine dayanmaktadır ve bu sayede LDH aktivitesini ölçmeye yaramaktadır. Metilprednizolon uygulamasını takiben bu yöntem ile laktat üretimi analiz edildi.

- 4mM Metilprednizolon uygulanan ve uygulanmayan kontrol grubu hücrelerinin 48. Saatte sayımları yapılarak, kitin önerdiği şekilde her tekrar için 2×10^6 hücre toplandı.
- Hücreler 1200 rpm de 3' santrifüj edildi.
- Süpernatantları atılarak pelet üzerine soğuk 1XPBS eklendi ve hafifçe elle vurularak pelet çözüldü.
- 2500 rpm de 1' santrifüj edildi.
- Süpernatant atılarak pelet üzerine Lactate Assay Buffer eklendi ve hafifçe elle vurularak pelet çözüldü.
- En yüksek hızda 4°C'de 5' santrifüj edildi.
- Süpernatant alınarak deproteinizasyon aşaması için 10 kD'luk spin kolonlu tüplere aktarıldı.
- En yüksek hızda 5' santrifüj edildi. Kolondan geçen sıvı ölçüm yapılmak üzere 96'lık well plate'lere aktarıldı.
- Uygun dilüsyon belirlenerek örnekler Laktat Assay Buffer ile sulandırıldı.
- Background ölçüm için aynı şekilde örnekler hazırlandı.
- Standartlar farklı dilüsyonlarda kitin önerdiği şekilde hazırlanmıştır.
- Kuyulardaki örneklerin üzerine laktat enzim mix içeren reaksiyon karışımı eklendi.
- Örnekler oda sıcaklığında 30' inkübe edildikten sonra spektrofotometrede 450 nm'de ölçümleri yapıldı.

2.6. RNA İzolasyonu

K562s ve K562r hücrelerinde apoptotik dozun uygulandığı hücrelerden metabolik, apoptotik ve otofajik genlerin ekspresyonu tespit etmek tüm örneklerden RNA izolasyonu yapıldı. İzolasyon sırasında aşağıdaki prosedür takip edildi.

- Kültür ortamındaki hücreler 300 x g'de 5 dk santrifüj edildi ve supernatan kısım atıldı.
- Pelet üzerine (1×10^6 hücreye 1 ml Trizol) Trizol eklendi ve homojenize edilmiş hücreler 15-30°C'de 5 dk inkübe edildi
- Her tüpe 200 µl kloroform eklendi. Tüpler elle 15 sn. boyunca sallandıktan sonra 15-30°C'de 10 dk inkübe edildi. 12,000 x g'de 2-8°C, 13 dk santrifüj edilip Santrifüj sonrası alttaki faz kırmızı fenol-kloroform fazı, ara faz ve renksiz-akıcı üst faz olmak üzere 3 faz oluşur. RNA üst fazdadır. (DNA ara fazda ve protein ise alt fazdadır. Bu fazlar saklanır.) Bu faz yeni bir tüpe aktarıldı.
- Üzerine 0.5mL izopropil alkol eklenir. 15-30°C'de 10dk inkübe edilip tüpler 12,000 x g.de 10 dk 2-8°C'de santrifüj yapıldı. Süpernatant atılıp, 1 ml %75'lik etanol eklenir örnekler vortekslenir ve 7,500 x g.de 5 dk 2-8°C'de santrifüjlendi.
- RNA pelleti oda sıcaklığında bekletilerek kurutulup sonrasında RNA, RNaz içermeyen DEPC'li su içinde çözüldü. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrik yöntemle belirlendi. Daha sonra %1'lik Agaroz Jel'de yürütülerek görüntülendi.

2.7. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time PCR)

Bu çalışmada qRT-PCR yöntemi kullanılarak genlerin ifadesi kantitatif olarak analiz edilmiştir. Bunu için RNA izole edilen hücrelerden "Transcriptor High Fidelity c-DNA synthesis kit" ile c-DNA sentezlendi. Çizelge 2.1'de belirtilen

primerler kullanılarak kantitatif eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirildi.

Çizelge 2.7. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu İçin Kullanılan Primerler

HPRT	F: TGACACTGGCAAAACAATGCA R: GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT
PKM1	F: GAGGCAGCCATGTTCCAC R: TGCCAGACTCCGTCAGAACT
PKM2	F: CCA CTT GCA ATT ATT TGA GGAA R: GTG AGC AGA CCTGCC AGA CT
LDHA	F: TTGGTCCAGCGTAACGTGAAC R: CCAGGATGTGTAGCCTTTGAG
LDHB	F: TCCCGTGTCAACAATGGTAA R: CCCACAGGGTATCTGCACTT
HEXOKİNAZ 2	F: ACCCGGGAAAGCAACTGTTTG R: TCACCAGGATAAGCCTCACCAG
PDK1	F: TGGTGGAAGGCAAAGGAAGTC R: CAGACGCCTAGCATTTTCATAGC
C-MYC	F: GCTGCCAGGACCCGCTTCTC R: ACGTTGAGGGGCATCGTCGC
BIM	F: ATCTCAGTGCAATGGCTTCC R: CATAGTAAGCGTTAAACTCGTCTCC
BAX	F: GACGGCAACTTCAACTGGG R: AGGAGTCTCACCCAACCAC
BCL-2	F: CGCCCTGTGGATGACTGAGT R: GGGCCGTACAGTTCCACAA
MDR	F : AAGGCATTTACTTCAAACCTTGTC R : GGATTCATCAGCTGCATTTTC
BECLIN-1	
MCL-1	

3. BULGULAR

3.1. K- 562r Ve K-562s Hücre Serilerinin Kültürü

3.1.1. K- 562s Hücre Serilerinin Sıvı Azottan Çözdürülmesi

Daha önce dondurulup sıvı azota konmuş olan K-562s ve K562r hücre hattını sıvı azottan çıkarıp çözmek amacıyla önce 100 ml RPMI (Biological Industries/Israel) üzerine 10,2 FBS (Sigma/A.B.D.), 1,2 Penisillin/Streptomisin (Gibco/ A.B.D. ve 1,2 ml L-Glutamin (Gibco/ A.B.D.) konarak besiyeri hazırlandı (Çizelge 2.1.). K-562 hücreleri sıvı azottan çıkarılıp hızlı bir şekilde çözünmesi sağlandı. Steril kabin içinde 2 ml besiyeri bu donmuş hücreler üzerine konarak pipetaj yapıldı ve 15 ml'lik steril falkon tüp içine alındı. Üstüne 7-8 ml besiyeri eklenerek 1000 rpm.'de 4 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak üzerine 2 ml besiyeri eklendi, pipetaj yapılarak üzerine tekrar yaklaşık 10 ml besiyeri eklenerek 37 °C'de %5 CO₂'li etüve kaldırıldı.

3.1.2. K-562s Hücre Hattının ve K-562r Hücre Hattının Pasajlanması

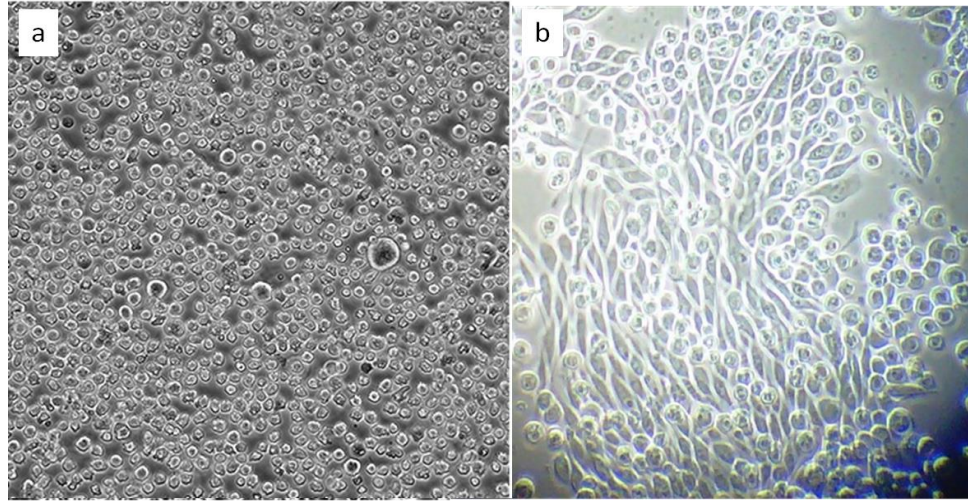
Tez çalışmasında yapılacak deneyler için yeterli hücre sayısına ulaşabilmek ve hücrelerin sağlıklı çoğalabilmesi için pasajlama işlemi yapıldı. T-25 flask ve 10 ml besiyeri içinde bulunan hücreler 15 ml'lik falkona alınarak 1000 rpm'de 4 dk. santrifüj edildi ve süpernatantları atıldı. Pelet üzerine yaklaşık 10 ml besiyeri eklenerek 37 C'de %5 CO₂'li etüve kaldırıldı.

Etüvde T-25 flask ve 10 ml besiyeri içinde bulunan K-562r hücreleri 15 ml'lik falkona alınarak 1000 rpm.'de 4 dk. santrifüj edildi ve süpernatantları atıldı. Pelet üzerine 10 ml. besiyeri eklendi. Bu hücreler T-25 flask içine alınarak üzerlerine

5 uM İmatinib konuldu. Hücrelerin düzenli olarak ışık mikroskopuyla büyümeleri takip edildi (Şekil 3.1).

Çizelge 3.1. Hücre kültüründe kullanılan malzeme ve gereçler

Besi yeri	Hyclone marka, Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 (1X), No: SH30096.0 1 (L-glutaminsız)
Fötal Dana Serum (FBS)	Hyclone marka, No: SV20160.03
L-Glutamin	PAA marka, 200mM (100X), No: M11-004
Penisilin-Streptomisin	PAA marka, No: P11-010
Hücre Dondurma tüpleri	Applichem marka, No: 67-68-5
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Greiner bio-one marka, 2 ml
PBS 10X	Hyclone marka- HyQ Phosphate Buffered Saline.067M (PO4) No: SH30258.01
Flask (75 cm ²)	Orange Scientific marka, No: 5520200



Şekil 3.1. a) K562s ve b) K562r hücrelerin mikroskopik görüntüleri (10X10 büyütme)

3.2. K562s ve K562r Hücre Serilerinde Metilprednizolon Doz Denemeleri Sonucu

K562s ve K562r hücrelerine farklı dozlarda Metilprednizolon (Prednol-L) uygulanarak etkin doz saptandı. K562s ve K562r hücrelerine hücrelerine 10 mM, 5mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,1 mM dozlarında MP uygulaması yapıldı. Uygulama sonucunda MTT sitotoksiste testi, akım sitometri ile apoptozis tayini yapılmıştır.

3.2.1. MTT Testi İle Sitotoksiste Tayini

MTT yöntemi ile bir hücre topluluğundaki canlı hücreler kolorimetrik ve kantitatif olarak saptanabilmektedir. Bu yöntem sağlam mitokondrinin MTT boyasının tetrazolium halkasını parçalayabilmesi ilkesine dayanmaktadır. MTT testi sonucunda her iki hücre hattında da 10 mM ve 5 mM MP dozlarının sitotoksisteye neden olduğu saptanmıştır. Diğer dozların uygulandığı grubun kontrol grubuyla farklılık göstermediği belirlenmiştir (Çizelge 3.1.1 ve 3.1.2). 10mM MP dozu toksik etki göstermiştir ve her iki hücre grubunu da büyük oranda hücre ölümüne neden olduğundan, 5mM ve daha düşük ara dozlarla apoptozis deneylerine başlandı. 0,5 mM ve 0,1 mM MP dozlarının kontrol grupları ile karşılaştırıldığında her iki hücre grubu için de etkili dozlar olmadığı saptandı. Bu sonuçlar göz önünde bulundurularak devam edilecek doz aralıkları 5 mM, 2,5 mM ve 1mM olarak belirlendi. Bu dozlar K562s ve K562r hücrelerine uygulanarak apoptozis tayini gerçekleştirildi.

MTT sonuçlarına göre 48. Saatte, 24. Saate göre canlılık oranları daha belirgin saptanabilmektedir (Çizelge 3.1.3, 3.1.4, 3.1.5 ve 3.1.6). Hücrelerin bölünme süresi ve ilacın etkisi birlikte düşünüldüğünde ve sayısal verilere bakıldığında 48. Saat, MP 'nin apoptotik etkisinin araştırılması için daha anlamlı bir süre olarak belirlendi. 72. Saat her iki hücre grubunda canlılık önemli ölçüde azalmaktadır, bunun da analiz sonuçlarını olumsuz yönde etkileyeceği düşünüldüğünden 72. Saat apoptozis analizi için uygun bulunmadı (Çizelge 3.1.7 ve 3.1.8).

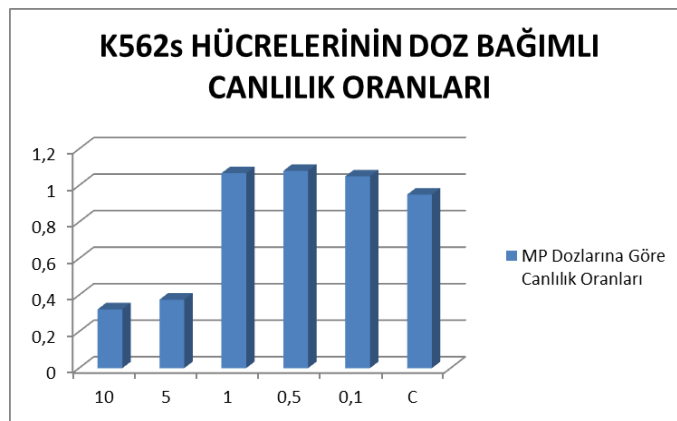
Çizelge 3.2. MTT testinin dozlara ve zamana bağımlı olarak sitotoksiteye olan etkisinin K562s sayısal verileri

DOZ	24. saat	48. saat	72. saat
10 mM	0,322	0,473	0,371
5 mM	0,375	0,372	0,269
1 mM	1,067	1,303	1,348
0,5 mM	1,08	1,615	1,33
0,1 mM	1,05	1,395	1,22
Kontrol	0,95	1,332	1,12

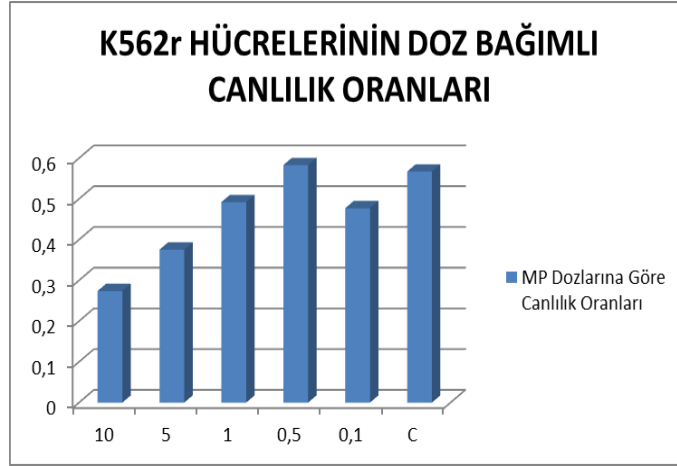
Çizelge 3.3. MTT testinin dozlara ve zamana bağımlı olarak sitotoksiteye olan etkisinin K562r sayısal verileri

DOZ	24. saat	48. saat	72. saat
10 mM	0,274	0,344	0,281
5 mM	0,375	0,27	0,187
1 mM	0,492	0,427	0,219
0,5 mM	0,583	0,559	0,372
0,1 mM	0,477	0,593	0,400
Kontrol	0,567	0,505	0,397

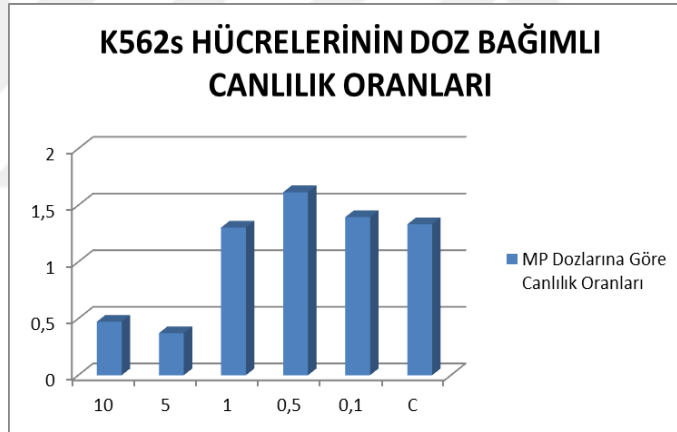
Çizelge 3.4. MTT testinin 24. Saatteki dozlara bağımlı olarak K562s hücrelerinde sitotoksiteye olan etkisinin sütun grafiği ile gösterimi



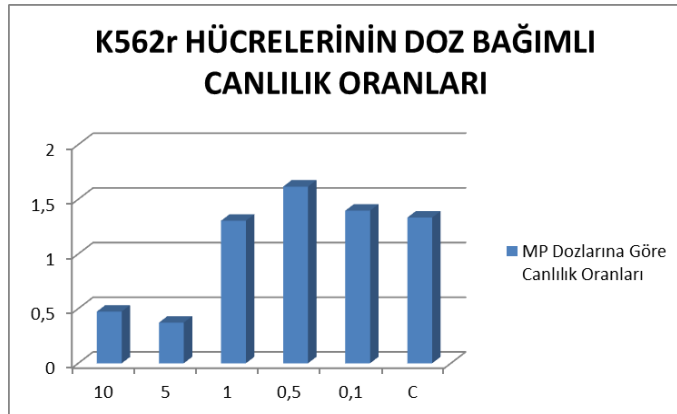
Çizelge 3.5. MTT testinin 24. Saatteki dozlara bağımlı olarak K562r hücrelerinde sitotoksiteye olan etkisinin sütun grafiği ile gösterimi



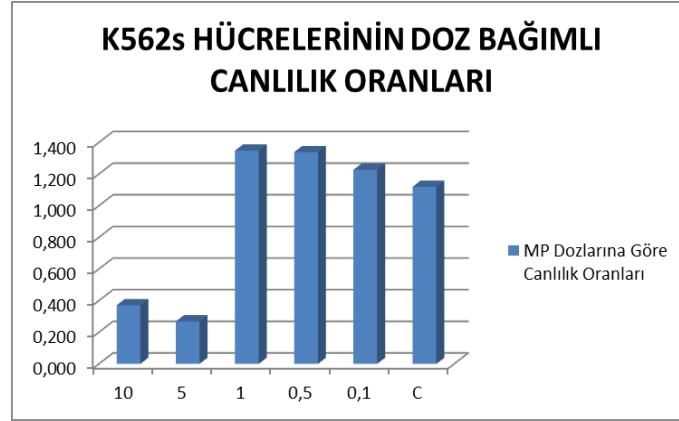
Çizelge 3.6. MTT testinin 48. Saatteki dozlara bağımlı olarak K562s hücrelerinde sitotoksiteye olan etkisinin sütun grafiği ile gösterimi



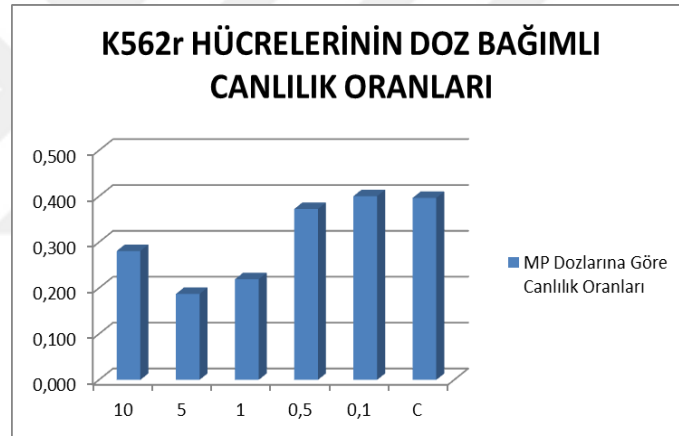
Çizelge 3.7. MTT testinin 48. Saatteki dozlara bağımlı olarak K562r hücrelerinde sitotoksiteye olan etkisinin sütun grafiği ile gösterimi



Çizelge 3.8. MTT testinin 72. Saatteki dozlara bağımlı olarak K562s hücrelerinde sitotoksiteye olan etkisinin sütun grafiği ile gösterimi



Çizelge 3.9. MTT testinin 72. Saatteki dozlara bağımlı olarak K562r hücrelerinde sitotoksiteye olan etkisinin sütun grafiği ile gösterimi

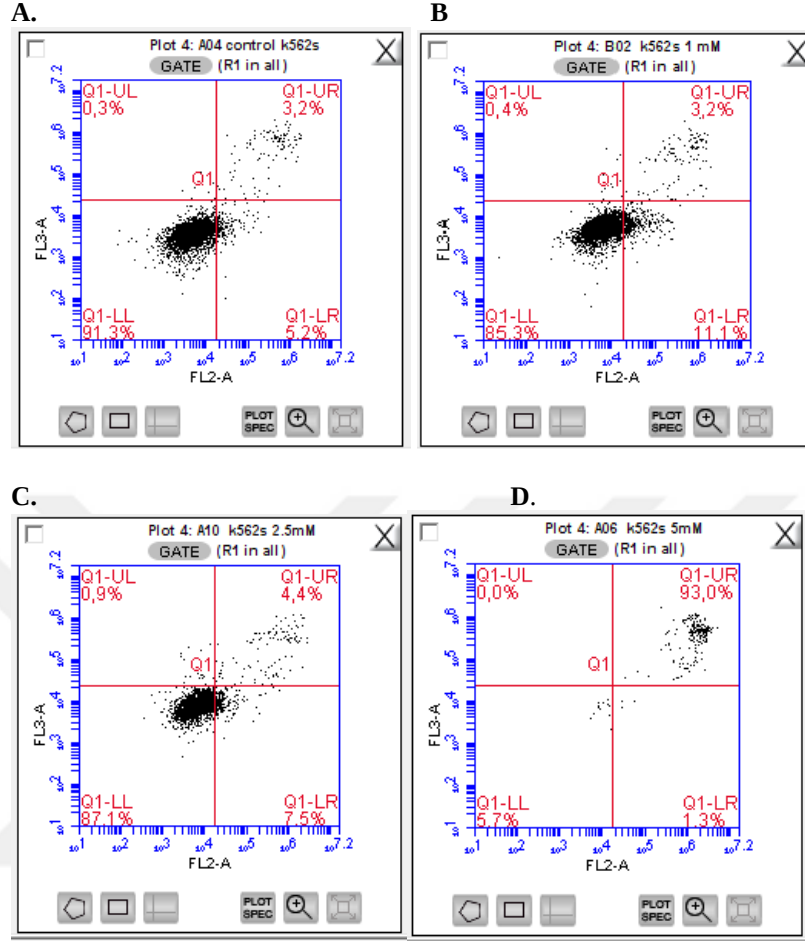


3.3. Akım Sitometri Analizi İle Apoptozis Tayini

Hücrelere uygulanan MP dozlarının 48. Saatteki apoptotik etkilerini araştırmak amacıyla uygulanan her doz için örnek alınmıştır. Örnekler, Propidyum İyodur (PI) ve 7-AAD ile işaretlenerek akım sitometri analizi yapılmıştır. 7-AAD, akım sitometride FL-2 filtresinde ışıma verirken, Anneksin-V FL-3 filtresinde ışıma vermektedir. Annexin V erken apoptozis, 7-AAD ise nekrozu tayin etmektedir. Uygulanan doz düştükçe apoptozise giren hücre sayısı da doğru orantılı olarak azalmaktadır. Uygulanan dozun azalmasıyla erken apoptoza giren hücre sayının yüzdesinde azalma görülmektedir.

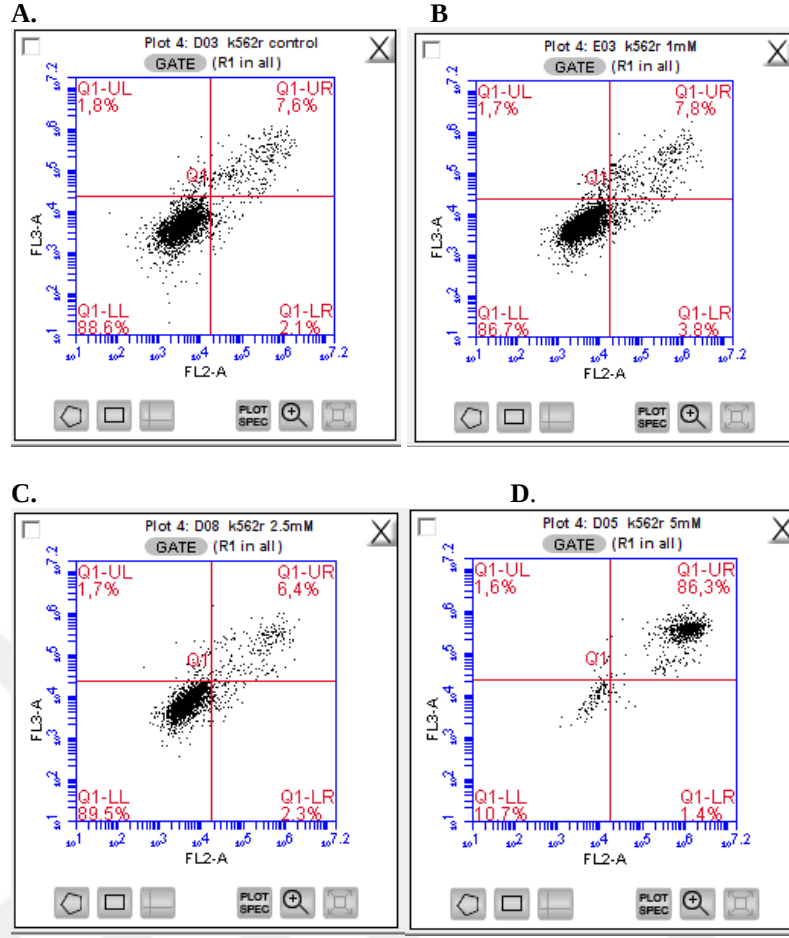
İlk etapta MTT sonuçlarına belirlenen 5mM, 2.5 mM ve 1mM MP dozlara uygulanan K562s ve K562r hücrelerinde apoptozis tayini yapılmıştır (Şekil 3.1 ve 3.2). Sonuçlara göre 1mM ve 2.5 mM MP uygulanan hücreler kontrol grubuyla apoptotik hücre yüzdesi açısından farklılık göstermemektedir. 5 mM MP uygulanan hücrelerde ise önemli oranda hücre ölümü gerçekleştirmiştir ve hücre sayısındaki kayıp bir sonraki aşamada yapılması planlanan laktat ve glukoz ölçümü, ekspresyon analizlerinin güvenilirliğini etkileyecektir. Bu nedenle doz denemelerine 2.5 mM ve 5mM arasında belirlenen dozlar ile devam edilerek apoptozis için etkin doz araştırılmaya devam edilmiştir. Bir sonraki aşamada 2.5 mM, 3mM ve 4mM MP uygulanan K562s ve K562r hücre hatlarında apoptozis tayini yapılmıştır. Sonuçlara göre her iki hücre grubunda kontrol grubuyla 2.5 mM ve 3mM MP uygulanan hücreler arasında anlamlı bir fark görülememiştir. 4mM MP uygulanan hücrelerde ise kontrol grubuna ve diğer dozlara göre önemli oranda apoptozis gerçekleşmiştir (Şekil 3.3 ve 3.4).

Doz Uygulamalarının 48. Saatteki Apoptotik Etkileri



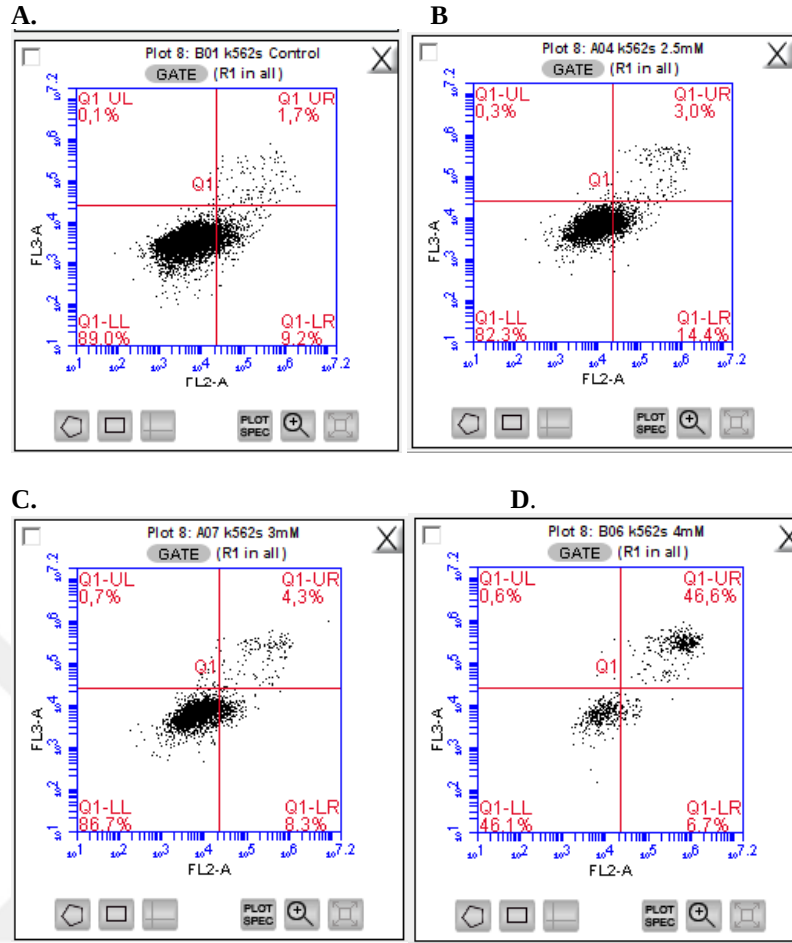
Şekil 3.2. Metilprednizolon uygulanan K562s hücrelerinin akım sitometri analiz sonuçları

A.MP uygulanmayan kontrol hücre popülasyonu. B. 1 mM MP uygulanan hücre popülasyonunun **Anneksin V** ve **7-AAD** ile işaretlenmiş Hücre Popülasyonunun Dağılımı. C. 2,5mM MP uygulanan hücre popülasyonunun **Anneksin V** ve **7-AAD** ile işaretlenmiş Hücre Popülasyonunun Dağılımı. D. 5 mM MP uygulanan hücre popülasyonunun **Anneksin V** ve **7-AAD** ile işaretlenmiş Hücre Popülasyonunun Dağılımı.



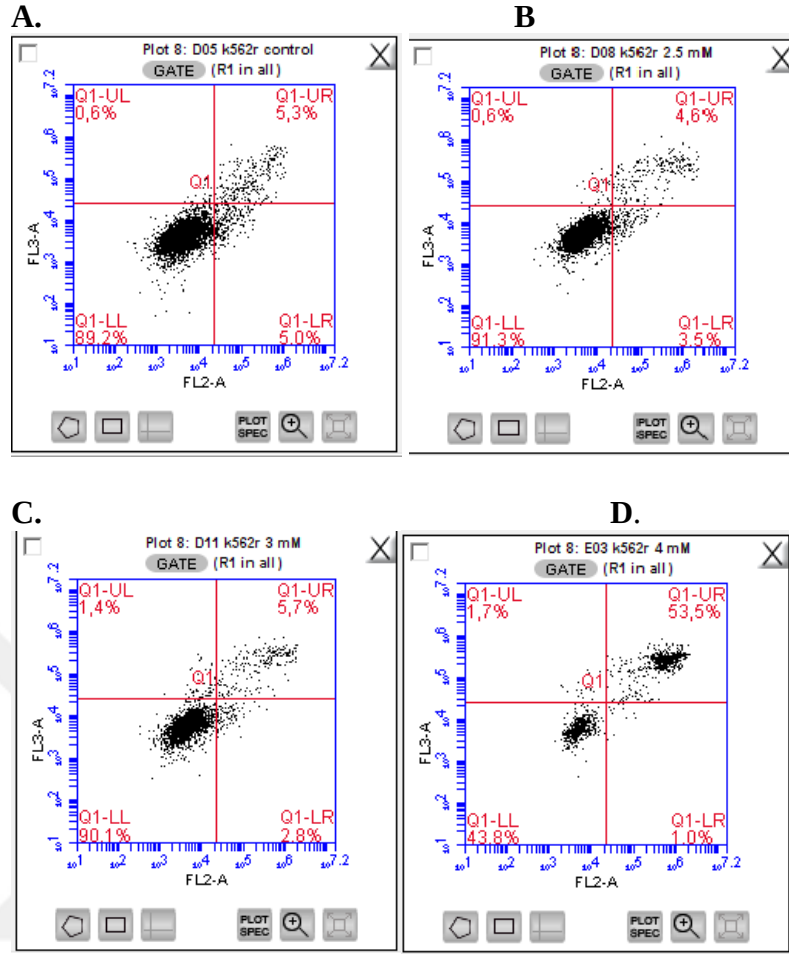
Şekil 3.3. Metilprednizolon uygulanan K562r hücrelerinin akım sitometri analiz sonuçları

A. MP uygulanmayan kontrol hücre popülasyonu. **B.** 1 mM MP uygulanan hücre popülasyonunun **Anneksin V** ve **7-AAD** ile işaretlenmiş Hücre Popülasyonunun Dağılımı. **C.** 2,5mM MP uygulanan hücre popülasyonunun **Anneksin V** ve **7-AAD** ile işaretlenmiş Hücre Popülasyonunun Dağılımı. **D.** 5 mM MP uygulanan hücre popülasyonunun **Anneksin V** ve **7-AAD** ile işaretlenmiş Hücre Popülasyonunun Dağılımı.



Şekil 3.4. Metilprednizolon uygulanan K562s hücrelerinin akım sitometri analiz sonuçları

A.MP uygulanmayan kontrol hücre popülasyonu. B. 2,5 mM MP uygulanan hücre popülasyonunun **Anneksin V** ve **7-AAD** ile işaretlenmiş Hücre Popülasyonunun Dağılımı. C. 3mM MP uygulanan hücre popülasyonunun **Anneksin V** ve **7-AAD** ile işaretlenmiş Hücre Popülasyonunun Dağılımı. D. 4 mM MP uygulanan hücre popülasyonunun **Anneksin V** ve **7-AAD** ile işaretlenmiş Hücre Popülasyonunun Dağılımı.



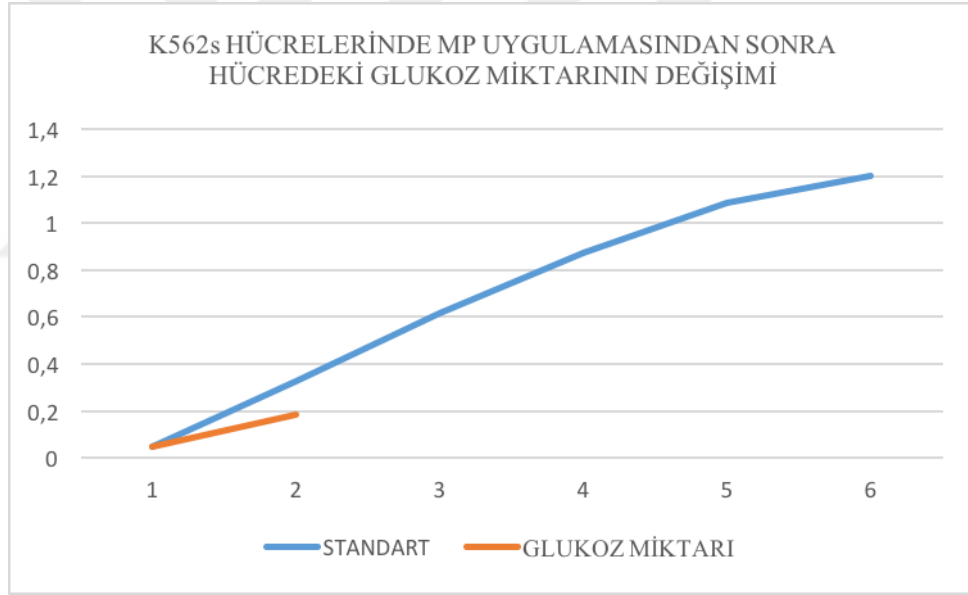
Şekil 3.5. Metilprednizolon uygulanan K562r hücrelerinin akım sitometri analiz sonuçları

A. MP uygulanmayan kontrol hücre popülasyonu. **B.** 2,5 mM MP uygulanan hücre popülasyonunun **Anneksin V** ve **7-AAD** ile işaretlenmiş Hücre Popülasyonunun Dağılımı. **C.** 3mM MP uygulanan hücre popülasyonunun **Anneksin V** ve **7-AAD** ile işaretlenmiş Hücre Popülasyonunun Dağılımı. **D.** 4 mM MP uygulanan hücre popülasyonunun **Anneksin V** ve **7-AAD** ile işaretlenmiş Hücre Popülasyonunun Dağılımı.

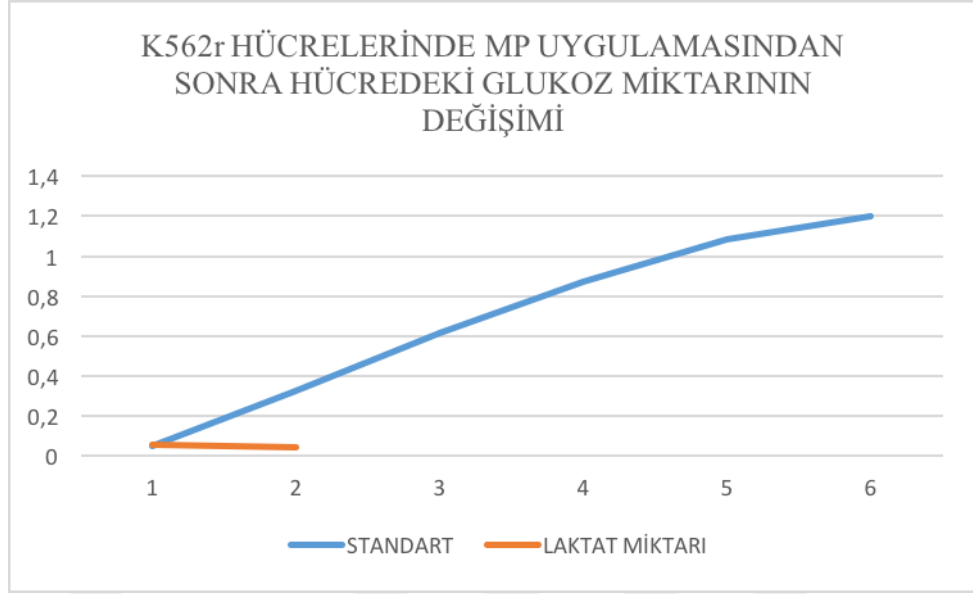
3.4. K-562s Hücre Hattında ve K-562r Hücre Hattında Laktat ve Glukoz Tayini

K562s ve K562r hücre hatlarında Metilprednizolon uygulaması her iki hücre hattında da laktat üretiminde herhangi bir değişikliğe neden olmamıştır. Imatinib dirençli K562r hücrelerinde İmatinib duyarlı K562s hücrelerine göre daha yüksek miktarda laktat saptanmıştır.

K562s hücre hattında Metilprednizolon uygulaması hücrenin glukoz kullanımında azalmaya neden olurken, K562r hücrelerinde Metilprednizolon uygulaması hücrenin glukoz kullanımında bir değişikliğe neden olmamıştır. K562r hücrelerinde ortamdaki tüm glukozun hücreler tarafında kullanıldığı saptanmıştır.



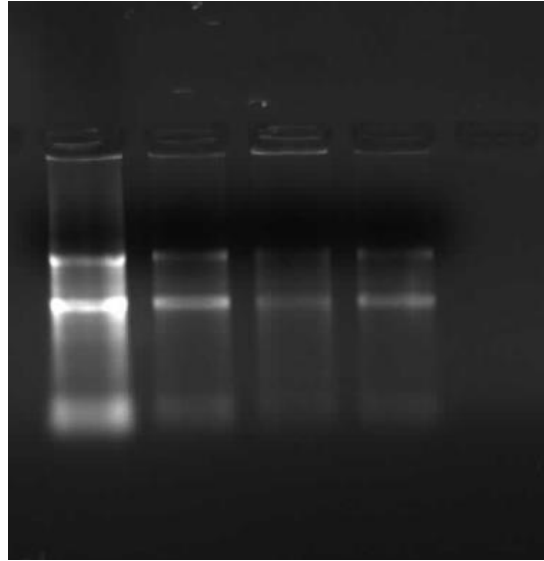
Şekil 3.6. K562s hücrelerinde MP uygulaması sonrası hücredeki glukoz miktarının değişimi



Şekil 3.7. K562r Hücrelerinde MP uygulamasından sonra hücredeki laktat miktarının değişimi

3.5. RNA İzolasyonu

RNA'lar spektrofotometrede ölçülmüştür ve %1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir.



Şekil 3.8. İzole edilen RNA'ların %1'lik agaroz jeldeki görüntüleri

3.6. cDNA Sentezinin HPRT Primerleri Polimeraz Zincir Reaksiyonu

İlk aşamada RNA ölçümleri yapıldıktan sonra cDNA sentezi için gereken RNA miktarı hesaplanmıştır. Kullanılacak olan RNA miktarı hesaplanırken, 150 ng olacak şekilde hesaplanmıştır.

Çizelge 3.10. cDNA sentezinin ikinci aşamasında kullanılan malzemeler

Malzemeler	Miktar
Random Hexamer	2 µL
RNA	500 ng / µL olacak şekilde (örneğin 2 µL)
dH ₂ O	5,4 µL
Toplam	9,4 µL

Bu karışım eklendikten tekrar thermocycler cihazına aşağıda belirtilen şartlarda konulur.

Çizelge 3.11. cDNA sentezi için gerekli şartlar

Şartlar	
Derece	dakika(')
29 °C	10'
48 °C	60'
85°C	5'

3.6.1. cDNA Sentezinin HPRT Primerleri Polimeraz Zincir Reaksiyonu

cDNA sentezinin sorunsuz gerçekleştiğini tespit etmek amacıyla her hücrede ekspresyonu görülen ve "housekeeping gen" olarak adlandırılan HPRT geninin primeriyle PCR analizi yapılmıştır.

Çizelge 3.12. HPRT primeri ile PCR analizi için gerekli malzemeler

PCR ŞARTLARI

Malzemeler	Miktar (Her örnek için)
Buffer	2.5 µL
dNTP	2,5 µL
MgCl ₂	3 µL
Forward Primer	1 µL
Reverse Primer	1 µL
cDNA	1 µL
Taq polimeraz	0.2 µL
dH ₂ O	13.8 µL
Toplam	25 µL

Çizelge 3.13. HPRT PCR analizi için gerekli şartlar

Derece	dakika(‘), saniye (’')	Döngü sayısı
95 °C	10‘	
95 °C	45’’	35 döngü
62 °C	30’’	
72 °C	45’’	
72 °C	5’	

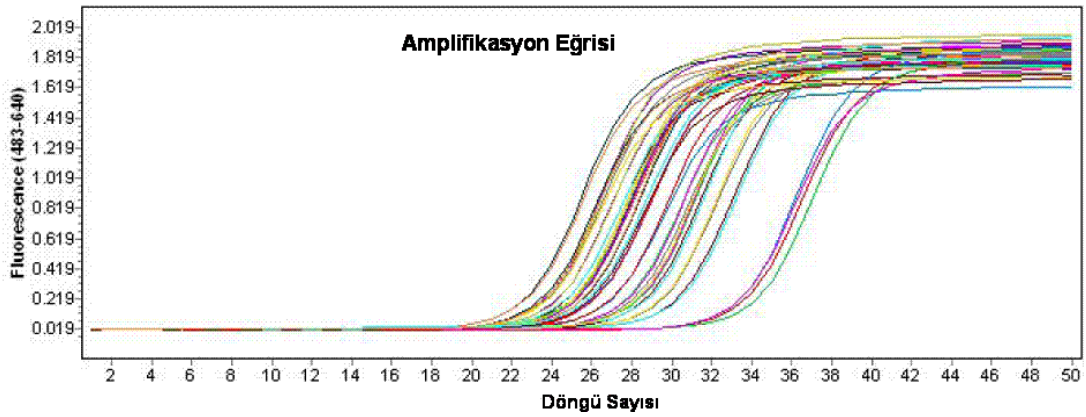
- HPRT Primeriyle yapılan PCR ürünleri %2’lik agaroz jelde görüntülenmiştir.

3.7. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time PCR) Sonuçları

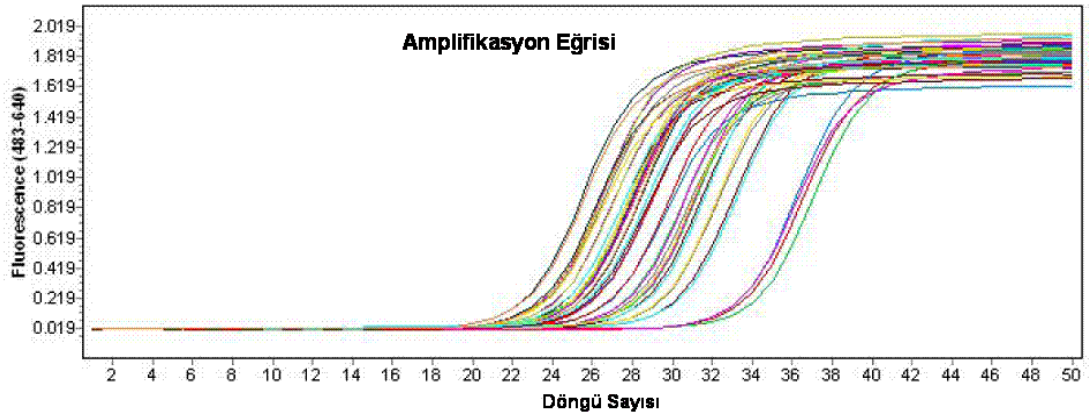
Hedef genlerin ve HPRT (housekeeping gen) genleri için tasarlanmış primerlerin optimizasyonu amacıyla yapılan PCR'ların ardından, elde edilen cDNA'lar ile qRT-PCR analizi gerçekleştirilmiştir. Birbirinden farklı RNA konsantrasyonuna sahip her bir örneğin, başlangıç RNA miktarı 500 ng olacak biçimde ayarlanmıştır ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

qRT-PCR sonucu oluşan ürün miktarının artmasıyla beraber SYBR Green Idaha çok bağlanmakta ve böylelikle floresan ışıma artmaktadır. Eşik değerinin üzerinde anlamlı floresan artışı gözlenen ilk döngü sayısına sayısına Ct (Cycle Threshold) veya Cp (Crossing point) denilmektedir.

K562s ve K562r hücrelerinin RNA'larından sentezlenen cDNA'lar bu şekilde analiz edilmiştir.



Şekil 3.9. HPRT amplifikasyon eğrisi grafiği



Şekil 3.10. Hedef gen amplifikasyon eğrisi grafiği

Gen İfade oranları hesabı ise aşağıdaki formülle yapılmıştır:

$$R = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_P^{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_P^{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample})}}$$

Çizelge 3.14. K562s ve K562r hücrelerinde MP Uygulaması Sonrası Gen Ekspresyonlarındaki Kat Değişimleri

	K562s	K562r
pkm1	2,2	0,5
pkm2	1,1	1,2
ldha	0,3	0,3
ldhb	0,3	0,5
hexokinase	5,7	0,5
pdk1	1,9	1,2
c-myc	0,6	0,3
mcl-1	0,4	0,6
hif-1	1	0,9
bax	2,3	1
bcl-2	0,3	0,1
mdr	82	2,1
bcl-xl	0,5	0,3
beclin-1	0,6	0,5
bim	2,6	1,4

3.8. İstatistiksel Analiz

K562s ve K562r hücrelerinde farklı MP dozları uygulaması öncesi ve sonrası MTT canlılık testi sonuçlarının istatistik analizi Tekrarlı Ölçümlerde Varyans Analizi ile yapılmıştır.

K562s ve K562r hücrelerinde farklı MP dozları uygulaması öncesi ve sonrası laktat ve glukoz değişimlerinin istatistik analizi Wilcoxon Signed Rank testi ile yapılmıştır.

K562s ve K562r hücrelerinde MP uygulaması öncesi ve sonrası gen ekspresyonlarındaki kat değişimlerin istatistiksel analizi “Bağımsız Örneklem T Testi” ile yapılmıştır.

4. TARTIŞMA

Imatinib hassas ve dirençli hücreler arasındaki metabolik farklılıklar hücre proliferasyon oranı, apoptozisin indüklenmesi, Pgp ekspresyonu ve hücre içi imatinib konsantrasyonu ile korelasyon göstermektedir. Glukoz metabolizmasında meydana gelen azalmanın özellikle ilaca hassas hücrelerde önemli derecede olması, hücre proliferasyonunun inhibisyonu ve apoptozisin başlamasında hücre spesifik bir metabolik cevap olduğunu göstermektedir. Dirençli hücrelerde ise imatinib uygulamasına rağmen proliferasyonun devam etmesi ve hücrelerin apoptozise gitmemeleri artmış fosfolipit sentezi ve yüksek seviyede glikolitik aktivite içeren fenotipin varlığının göstergesi olmaktadır (Klawitter ve ark., 2009). Yapılan çalışmalarda K562 hücrelerinde imatinib ile BCR/ABL aktivitesinin inhibisyonunun, hücrenin glukoz metabolizmasında önemli değişikliklere neden olduğu gösterilmiştir (Gottscalk ve ark., 2004; Barnes ve ark., 2005). Tirozin kinaz inhibitörü imatinib bu hücrelerde hayatta kalım sinyalini durdururken, glikolizin azalmasına ve hücre ölümüne sebep olmaktadır. Metabolizmanın azalmasıyla büyüme faktörleri inhibe olarak hücre ölümü başlamaktadır (Mason ve ark., 2010).

Glukoz tüketimi hücrelerde direkt olarak enerji üretimiyle ilişkilidir. Kanser hücrelerinde de aerobik glikoliz ile yüksek seviyedeki enerji ihtiyacı karşılanmaktadır. Mitokondriyal glukoz oksidasyonunun aerobik glikolize değişimiyle gerçekleşen bu metabolik dönüşüm Warburg etkisi olarak bilinmekte ve tümör hücrelerinin hem enerji üretimini hem de anabolik büyümelerini artıran etkili bir sistem olarak çalışmaktadır (Dengler ve ark., 2011).

Glukoz metabolizmasındaki önemli değişim imatinib tedavisiyle ortaya çıkmaktadır. K562 hücrelerindeki glikoliz oranı imatinib tedavisiyle birlikte proliferasyondaki azalmaya bağlı olarak düşmekte, bu nedenle de hücreler daha az laktat üretilmektedir. Dirençli hücrelerde ise glikoliz ve laktat seviyesinde artış devam etmektedir. Yüksek glukoz alımı glikolitik enzimlerin aktivitesinin artmasına

neden olmaktadır ki bu da onkogenezin önemli göstergelerinden biridir. Artmış glikolizin hızlı çoğalan hücrelerde onkogeneze rol oynayan önemli sinyal yolları tarafından kontrol edildiği gösterilmiştir (Klawitter ve ark.,2009). İmatinib dirençli K562r hücrelerinde glikolitik metabolizma yüksek seviyede görülmekte ve glukoz alımı ve laktat üretimi artmaktadır. Glukoz alımındaki ve metabolizmadaki değişiklikler GLUT-1'in plazma membranından hücre içine translokasyonu ile birliktelik göstermekteyken, imatinib uygulanan duyarlı hücrelerde GLUT-1 plazma membranında lokalize olmaktadır (Song ve ark.,2014; Hulleman ve ark., 2009). Bu nedenle, glikolizin inhibisyonu yüksek seviyede metabolizma ile birlikte ilaç direnci görülen tümör hücrelerinde etkili bir hedef tedavi olacağı düşünülmektedir.

Akut lösemi tedavisinde kullanılan Glukokortikoidlerin, İmatinib kesildikten sonra hücre ölümünü indüklediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. İmatinib dirençli BaF3 hücrelerinde yapılan çalışmada, betametazon ve prednizolon varlığında ve yokluğunda İmatinib kesilerek hücre ölümü test edilmiştir. Her iki glukokortikoidin uygulandığı hücrelerde İmatinib yokluğunda hücre ölümünün varlığı tespit edilmiştir (Dengler ve ark., 2011). Bizim çalışmamızda, K562s ve K562r hücrelerine glukokortikoid yapıda bir ilaç olan Metilprednizolon uygulanmıştır ve MP uygulamasının hem apoptotik hem de metabolik etkileri araştırılmıştır. MP'nin hücre canlılığına etkisi MTT testi ile araştırılmış ve sonucunda her iki hücre hattında da 10 mM ve 5 mM MP dozlarının sitotoksiteye neden olduğu daha düşük diğer dozların uygulandığı grubun kontrol grubuyla anlamlı bir farklılık göstermediği belirlenmiştir. Bu dozlardan 10mM MP dozu toksik etki göstermiştir ve her iki hücre grubunu da büyük oranda hücre ölümüne neden olmuştur. Bu nedenle 5mM ve daha düşük ara dozlarla deneylere devam edilerek apoptozis tayini yapılmıştır. MTT sonuçlarına göre 48. Saatte, 24. Saate göre canlılık oranları daha belirgin saptanabilmektedir. Hücrelerin bölünme süresi ve ilacın etkisi birlikte düşünüldüğünde ve sayısal verilere bakıldığında 48. Saat, MP 'nin apoptotik etkisinin araştırılması için daha anlamlı bir süre olarak belirlendi. 72. Saat her iki hücre grubunda canlılık önemli ölçüde azalmaktadır, bunun da analiz sonuçlarını olumsuz yönde etkileyeceği düşünüldüğünden 72. Saat apoptozis analizi ve ekspresyon analizleri için uygun bulunmadı.

Akım sitometri analizi ile apoptozis tayinine ara dozlarla 48.saat kadar devam edilmiştir ve K562s ve K562r hücreleri için LD₅₀ dozunun 48. Saatte 4mM olduğu saptanmıştır.

Glukokortikoidlerin apoptotik etkileri kadar önemli olan diğer etkisi de glukoz metabolizmasını normal sınırlara indirebilmesidir. Glukokortikoidlerin Bcr-Abl'ın hiperaktivasyonunun görüldüğü hücrelerde betametazon, glukoz-6-fosfat, fruktoz-1,6-bifosfat ve fosfoenolpiruvat gibi glikolizin anahtar metabolitlerinin seviyesini düşürdüğü saptanmıştır. Bu bulgu da hücre ölümüyle ortak çalışan ve Bcr-Abl aktivasyonu ile artan seviyedeki glutamin ve glikoliz yollarının glukokortikoidler tarafından antagonize edildiğini göstermektedir(Dengler ve ark., 2011).

Glikolizin artması tümör hücrelerinde kemorezistansa önemli rol oynamaktadır (Song ve ark., 2014). Glukoz temel enerji kaynağıdır ve GLUT-1 ekspresyonundaki artış enerji yararlanımını sağlama yönündedir bu da sonuçta kötü prognozla ilişkilendirilmektedir. Bizim çalışmamızda hem Imatinib dirençli hem Imatinibe duyarlı hücrelerde YDMP uygulamasının laktat ve glukoz miktarlarına olan etkisi araştırılmıştır. Imatinibe duyarlı hücrelerde YDMP uygulaması sonrası hücrenin kullandığı glukoz miktarı azalmış olsa da istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır. Bununla birlikte laktat miktarında farklı denemelerde farklı sonuçlar elde edilmiştir. YDMP uygulaması öncesi ve sonrası her iki hücre hattında da istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanamamıştır. Imatinib dirençli hücrelerde ise hücrenin kullandığı glukoz miktarı değişmediği gibi laktat miktarında da istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik saptanamamıştır. Ancak hassasiyeti daha yüksek yöntemlerle glukoz alımı ve laktat salınımı araştırılacaktır.

Hücre metabolizması, direkt olarak Bcl-2 ailesi proteinlerini regüle etmektedir. Glukoz alımının azalması prosurvival Mcl-1 proteininin degradasyonuna neden olmakta ve proapoptotik proteinlerin aktivasyonunu sağlamaktadır. Glukoz metabolizmasının inhibisyonunun proapoptotik Bcl-2 ailesi proteinlerinden Bax, Bim varlığında gerçekleşmesi hücre ölümünü etkileyen metabolik yolların Bcl-2 ailesi

proteinleriyle bir noktada kesiştiğini göstermektedir. Bim ve Bad gibi proapoptotik proteinler Imatinib tedavisinden hücre ölümüyle ilişkili olduğu bulunmuştur. P53-null K562 hücrelerinde glikoliz inhibisyonunun imatinib hassasiyetini artırmada etkili olmaması, tümördeki metabolik manipulasyon sonucunun p53 varlığına bağlı olduğunu göstermektedir (Mason, 2010). Imatinibe dirençli hücrelerde glukoz metabolizmasının artması da, metabolizma ve ilaç dirençliliği arasındaki ilişkiyi desteklemektedir. Bcr-Abl ın hiperaktivasyonunun görüldüğü hücrelerde betametazon, glukoz-6-fosfat, fruktoz-1,6-bifosfat ve fosfoenolpiruvat gibi glikolizin anahtar metabolitlerinin seviyesini düşürdüğü saptanmıştır. Bu bulgu da hücre ölümüyle ortak çalışan ve Bcr-Abl aktivasyonu ile artan seviyedeki glutamin ve glikoliz yollarının kortikosteroidler tarafından antagonize edildiğini göstermektedir (Dengler ve ark., 2011). Bizim çalışmamızda hem K562s hem de K562r hücrelerde MP proapoptotik genlerden BIM geninin ekspresyonunda anlamlı bir artışa neden olurken, BAX geninin ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Bununla birlikte her iki hücre hattında da MP uygulaması sonrası antiapoptotik genlerden BCL-2 ve BCL-xL genlerinin ekspresyonlarında anlamlı bir azalma meydana gelmiştir ($p<0,05$).

Otofaji, hücrenin besin yokluğunda veya büyüme faktörleri eksikliğinde metabolizmasını açığa adapte ederek programlı hücre ölümünden kaçmasını sağlayan bir süreçtir. Imatinib'in birçok hücre hattında yapılan çalışmalarda otofajiyi indüklediği gösterilmiştir. Imatinibi bir otofaji inhibitörüyle kombine olarak kullanmak KML hücrelerini ortadan kaldırmayı kolaylaştırmaktadır (Ohtomo ve ark., 2010). Otofajik bir gen ürünü olan Beclin-1'in Bcl-2'ye bağlanan bir molekül olduğunun bulunması, Bcl-2-Beclin-1 kompleksinin apoptotik ve otofajik sinyal yolları arasındaki karşılıklı etkileşimin odak noktası olması gerektiğini göstermiştir. Bir BH3-only protein olan Beclin-1, Bcl-xL, Bcl-w ve Mcl-1 ile etkileşmektedir (Gordy ve He, 2012). MAPK sinyal yolağındaki mutasyonlar özellikle RAS ailesi onkogenlerinin hücre metabolizmadaki etkileri bilinmektedir. RAS'ın aktive formları (hem direkt hem de dolaylı olarak HIF-1'i aktive eder) asetil-CoA havuzunu azaltır ve TCA siklusu metabolitlerinden sitrat ve izositratın azalmasına neden olur. RAS aynı zamanda PI3K yolağını aktive eder ve

mitokondriyal alımı ve yağ asitlerinin β oksidasyonunu inhibe eder. Aktive RAS mutasyonları iyi bir besin kaynağı olsa da otofajinin ve mitofajinin seviyesini artırır. Bu MEK/ERK aracılı mekanizmalarla Beclin-1 artışı ve Noxa'nın indüklenmesi gibi veya BNIP3 ekspresyonu yoluyla olur (Leone ve Amaravadi, 2013). Bcr-Abl Ras-MAPK yolağını aktive ederek sonuçta antiapoptotik protein Bcl-2'nin seviyesini artırır. Bcr-Abl bununla birlikte PI3K/Akt yolağını da aktive eder. MTOR yolağının aktivasyonunu sağlayan PI3K/Akt protein sentezinde temel regülatör rol oynarken, proapoptoik bir gen olan Bad'ı inhibe etmektedir. Bizim çalışmamızda K562s hücrelerinde BECLIN-1 geninin ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik olmazken, MCL-1 geninin ekspresyonlarında anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p < 0,05$). K562r hücrelerinde ise BECLIN-1 ekspresyonunda anlamlı derecede bir azalma meydana gelmiştir. K562r hücrelerinde MCL-1 geninin ekspresyonunda azalma saptanmıştır ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Bcr-Abl, malign hücrelerde görülen Warburg etkisi yani hücreye glikoz alımının, proliferatif kapasitelerinin ve kütlelerinin artmasını sağlamaktadır. GLUT-1 glukoz taşıyıcısı eksprese olmakta ve glukoz alımı artmaktadır. Hücre içi glukoz içeriğinin artması glukoz yıkım kapasitesini artırırken, hücre cevap olarak HIF-1 α ekspresyonunu indükleyerek fazla glukoz karbonunun laktat olarak atılımını gerçekleştirmektedir. Bu nedenle HIF-1 α upregülasyonu veya stabilizasyonu ile Bcr-Abl, hücre metabolizmayı değiştirerek laktat üretimini artırmakta ve oksijen tüketimini azaltmaktadır. Bcr-Abl kinaz aktivitesine bağlı olarak değişen bu metabolik regülasyon imatinib ile inhibisyon sonucunda değişerek aerobik glikolizi mitokondriyal sitrat döngüsüne yönlendirmekte ve HIF-1 α miktarını azaltmaktadır. Dengler ve ark., yaptıkları çalışmada Bcr-Abl'ın yüksek seviyede ekspresyonunun görüldüğü hücrelerde imatinib uygulamasının kesilmesinin ardından Bcr-Abl'ın akut aktivasyonu, değişen metabolizma ve hücre ölümü arasındaki ilişkiyi göstermişlerdir (Dengler ve ark., 2011). Kanserli dokuda HIF-1 α hipoksik olmayan aerobik koşullarda da ekspresyonu indüklenebilmektedir (Zhao ve ark., 2010; Song ve ark., 2014). HIF-1 α 'nın ilaca dirençli lösemi hücrelerinde ekspresyonu görülmesi önemli bir bulgudur (Deeb ve ark., 2011; Kluza ve ark., 2011). Hipoksi HIF-1 instabilizasyonu ile transkripsiyonu değiştirerek glikolitik kapasiteyi artırır,

mitokondriyal solunumu azaltmaktadır. Buna ek olarak HIF'tan bağımsız olarak hipoksi mTOR sinyalini inhibe ederek metabolik fenotipin değişmesinden sorumlu birçok mekanizmayı etkilemektedir ki otofaji önemli mekanizmalardan biridir. MTOR inhibisyonunun tümör baskılayıcı etkisi olması beklenmesine rağmen malignansilere cevap olarak hipoksiye tolerans artmakta ve metabolik stres boyunca tümör hücre hayatta kalımı uyarılmaktadır. Bizim çalışmamızda, K562s ve K562r hücrelerinde HIF-1 geninin artmış ekspresyonu görülürken, MP uygulaması sonrası her iki hücre grubunda da ekspresyon seviyesinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. HIF-1 α glikolitik ve antiapoptotik birçok genin ekspresyonunda önemli rol oynamaktadır, bu da kanser hücrelerinin hayatta kalımını ve ilaç direncini etkilemektedir. Otofajinin bu aşamadaki rolü düşünüldüğünde bizim çalışmamızda her iki hücre grubunda da BECLIN-1 ekspresyonu görülmektedir yani hücre hayatta kalım yolağını kullanmaktadır. MP uygulandığında her iki hücre grubunda da BECLIN-1 ekspresyonunda azalma görülmekteyken, dirençli hücrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark meydana gelmiştir.

Kanserde enzimatik yolların upregülasyonu, hem metabolik enzimlerin kanser spesifik izoformlarının upregülasyonu (piruvat kinaz 2 (PKM2), laktat dehidrogenaz A(LDHA), piruvat dehidrogenaz (PKD1) ve hekzokinaz (HK2) hem de metabolik yolları etkileyen mutasyonlu ve anormal olarak aktive olmuş onkogenler ile gerçekleşir.

İki temel büyüme faktör-cevaplı yolak olan PI3K, AKT/protein kinaz B, mTOR ve MAPK yolları kanserde sıklıkla mutant ve anormal olarak aktive olur. Bu yollar hücrel metabolizmayı da etkiler ve malign fenotipe neden olur. PI3K yolak aktivasyonu MYC transkripsiyon faktörü ekspresyonunu ve HIF-1 stabilizasyonunu artırır. Bu iki onkogen kanser hücrelerinde yer alan metabolik izozimlerin (GLUT1, HK1/HK2, LDHA, PDK1) transkripsiyonunu regüle ederek aerobik glikolizde rol oynar. Bizim çalışmamızda, onkogenez sürecindeki metabolik izozimlerden Hexokinaz-2, LDH-A, LDH-B, PDK1, PKM1 ve PKM2 enzimlerinin ekspresyonuna MP uygulamasının etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır.

Hekzokinaz glukozu glukoz-6-fosfata çevirerek hücrede glikoliz yolağının başlangıç basamağını katalizleyen enzimdir. Hekzokinaz II (HKII) izoformu normal kas, adiposit ve akciğer dokularında az miktarda ifade edilmektedir. Yapılan çalışmalarda HK II'nin malign fenotipin devamlılığında rol alan önemli bir protein olduğu gösterilmiştir. Glukoz, glukoz taşıyıcılarıyla hücre içine girdikten sonra iki farklı şekilde HK II'nin substratı olarak görev alır. HK II, mitokondriyal membran proteini voltaj kapılı iyon kanalına(VDAC) bağlanır, mitokondri iç membranındaki ATP sentaz hekzokinazın ikinci substratı olan ATP'yi sentezler ve adenin nükleotit taşıyıcı ATP'yi VDAC-HK II kompleksine taşır. Bu yolak glukoz-6-fosfattan hızlı bir enerji üretimi sağlamasa da pentoz fosfat yolu ve mitokondriyal TCA döngüsüyle metabolitlerin sentezini sağlayarak kanser hücrelerine büyüme ve çoğalma avantajı kazandırır. HK II'nin kanser hücrelerinde transkripsiyonel olarak da yüksek seviyede olduğu bilinmektedir. Mitokondriye bağlı hekzokinaz II enzimi sitokrom c salınımını bloke ederek apoptozisi engellemede de önemli rol oynamaktadır. VDAC HK II kompleksinin mitokondriyal permeabilite transisyon porlarını (MTPT) inhibe ederek apoptozisi indüklediği bilinmektedir. HK'ın VDAC'a bağlanması, VDAC üzerindeki Bax gibi proapoptotiklerin bağlanacağı bölgeleri kapatmaktadır (Mathupala ve ark.,2006; Bhattacharya ve ark.,2016). Bizim çalışmamızda hem K562s hem de K562r hücrelerinde HK II enzim ekspresyonu yüksek seviyede ifade edilmektedir ve MP uygulaması sonrasında ekspresyon seviyesinde anlamlı bir azalma saptanamamıştır.

LDH-A geni epidermal büyüme faktörü olarak bilinmektedir ve yaygın olarak prognostik tümör belirteci olarak kullanılmasına rağmen etki mekanizmasında hala bilinmeyen noktalar bulunmaktadır. LDH enziminin izoformlarından LDH-A normal hücrelerde anaerobik koşullarda pruvatu laktata çevirmektedir. Diğer bir LDH izoformu olan LDH-B ise kalp gibi aerobik dokularda yüksek seviyede bulunmaktadır ve laktatın piruvata çevrilmesinden sorumludur. Glikolitik yolda LDH-A meme kanserinde paclitaxel/trastuzumab direncinden sorumludur (Zhao ve ark., 2013). Bizim çalışmamızda MP uygulaması ile hem K562s hem de K562r hücrelerinde LDH-A ve LDH-B gen ekspresyonunda anlamlı olarak azalma saptanmıştır ($p<0,05$). C-Myc proteini hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptozis

süreçlerinin regülasyonuna katılmaktadır. Shim ve ark., yaptıkları çalışma sonucunda LDH-A'nın direkt bir c-Myc –responsive gen olduğu ve MYC-aracılı hücre transformasyonunda yer aldığını saptamışlardır. LDH-A'nın ekspresyonunun artması laktat üretiminin artması için yeterli olmaktadır ve kanser hücrelerine neoplastik büyüme avantajı sağlayacak metabolizma değişimine neden olduğu bilinmektedir (Shim ve ark, 1997). Bizim çalışmamızda LDH-A ve LDH-B gen ekspresyonlarının azalmasıyla birlikte her iki hücre grubunda da c-MYC geninin ekspresyonunda da istatistiksel olarak anlamlı bir azalma meydana gelmiştir ($p<0,05$).

HIF-1'in de aynı zamanda LDH-A ve piruvat dehidrogenaz kinaz 1 (PDK1) ekspresyonunu da kontrol etmektedir. LDHA piruvatın laktata dönüşümünü katalize eder bu sayede piruvatı asetil koenzim A'ya çevirecek olan piruvat dehidrogenazı n(PDH) substratı olan piruvatın mitokondriyal kullanımı azalır. PDK1, PDH'ın katalitik alt ünitesini fosforilleyerek inaktivasyonuna neden olur ve piruvatı mitokondriden uzaklaştıracak şantı aktive eder (Luo ve ark., 2011; Bhattacharya ve ark., 2016).

Christofk ve ark. yaptıkları çalışmada, PKM2 ekspresyonunun düşük oksijen tüketiminde hücreye glikoz alımı ve laktat üretiminin artışıyla ilişkili olduğunu göstermişlerdir (Christofk ve ark, 2008). Piruvat kinaz fosfoenolpiruvattan piruvat ve ATP oluşumunu katalizleyen enzimdir. Kanser hücrelerindeki genetik değişimle birlikte, PKM1'in yerine PKM2 ekspresyonu gerçekleşerek Warburg etkisinin ortaya çıktığı ortaya konulmuştur. Farklı tümörlerde PKM2 ekspresyonundaki değişim ilaç direnciyle ilişkilendirilmektedir. Örneğin Shi ve ark. Akciğer kanseri hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada, shRNA ile PKM2'nin baskılanmasıyla docetaxel etkililiği artarak hem in vitro hem in vivo olarak proliferasyon baskılanmış ve apoptozis artmıştır (Shi ve ark., 2010). PKM2'nin düşük aktivitesi sayesinde glikolitik ara ürünlerin gliserol sentezi ve pentoz fosfat yollarına bağlanması ve takiben NADPH üretimiyle ROS üretimini baskılanması ve aynı zamanda nükleotit sentezi gerçekleşmiş olur (Tamada ve ark., 2012). Bizim çalışmamızda, hem K562s hücrelerinde YDMP uygulaması sonrası PDK1 geninin ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmıştır. K562r hücrelerinde ise MP uygulaması sonrası

PDK1 geninin ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. PKM1 geninin ekspresyonu MP uygulaması sonrası hem K562s hücrelerinde anlamlı derecede artarken, K562r hücrelerinde anlamlı derecede azalmaktadır. PKM2 genini ekspresyonundaki değişiklik her iki hücre hattında da istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p<0,05$).

Bu metabolik yollar mitokondri aracılığıyla birbirine entegre olmaktadır. Aerobik glikoliz piruvatı mitokondriden ve oksidatif fosforilasyondan uzakta tutma eğilimindeyken eş zamanlı olarak glutaminoliz (büyük bölümü mitokondride gerçekleşir) TCA döngüsünün devamlılığı için karbonları sağlar ve oksidatif fosforilasyonun sürmesine izin verir. Hücresel stres ve değişen metabolizma devam edip, mitokondride algılandığında programlı hücre ölümü yolları başlatılır. Bunun tam tersi hücresel stres ve onkojenik sinyal hücre hayatta kalım mekanizması olarak devreye girer (Leone ve Amaravadi, 2013). Bu tez çalışmasında bu ilişki düşünülerek apoptotik ve metabolik enzimlerin transkripsiyonu arasında ilişki olabileceği ve apoptozisi indükleyen ve metabolizmaya yavaşlatması beklenen YDMP'nun gen ekspresyonu üzerine etkisi ortaya konulmuştur.

Kanser hücreleri biyoenerjetik ve biyosentetik ihtiyaçlarını karşılamak için metabolizmalarını yeniden programlamaktadırlar. Aerobik glikolizin, yağ asidi sentezinin ve glutamin metabolizmasının artması kanserde tedaviye dirençle ilişkilendirilmektedir. Kanser metabolizmasındaki bu değişimle artan enerji üretimi ve metabolit sentezi hücre proliferasyonunu indüklemekte ancak tedavi ile hedeflenen apoptozisi azaltmaktadır, bu da ilaç direnciyle ilişkilendirilmektedir. Glikolizin artmasıyla birlikte yüksek miktarda ATP ve NADPH üretilmektedir. Kemoterapötik ilaçlar da oksidatif hasarı indükleyerek kısmen anti-tümör etki göstermektedir. NADPH önemli bir antioksidandır ve kanser hücrelerinde kemorezistansa sebep olan glikolizle birlikte yüksek seviyede üretilmektedirler.

Imatinib tedavisine lösemi hücrelerinin metabolik cevabı önemli biyolojik göstergeler olarak karşımıza çıkmaktadır. Tümörün biyokimyasında özellikle glukoz alımı ve metabolizmasında normal hücreye göre önemli farklılıklar görülmektedir.

Mitokondriyal metabolizmanın bozulduğu ve sitozolik glikolizin arttığı tümör hücrelerinde gözlemlenmektedir.

Bu tez çalışmasında elde edilen bulgular, yeni geliştirilecek tedavilerin hücre metabolizmasına hassasiyetle ilişkili ve metabolik manipulasyonlarla geliştirilebilecek yönde olması konusunda fikir vermektedir. Kanser hücrelerinde artan metabolizma ve hücreye glikoz alımına Metilprednizolonun etkisi gösterilmiştir. Metilprednizolonun glukokortikoid yapıda olması ve glukokortikoidlerin metabolizmayı yavaşlatıcı, hücreye glikoz alımını azaltıcı etkisi göz önünde bulundurulduğunda, dirençli KML hücrelerinde metabolizmayı yavaşlatarak, onkogenik etkiyi azalttığı ve metabolizmanın yakından ilişkili olduğu apoptotik yolları aktive ettiği gösterilmiştir. Yüksek Doz Metilprednizolonun bu çalışmayla Warburg etkisini tersine çevirebilecek ibr ajan olabileceği kısmen gösterilmiştir. Ancak bu etkisini teyit edebilmek için daha hassas yöntemlerle ek analizler yapılması planlanmaktadır. Literatürde Yüksek Doz Metilprednizolonun hem Imatinib dirençli hem de İmatinibe hassas KML hücreleri üzerindeki metabolik ve apoptotik etkisini gösteren ilk çalışma olması açısından önem taşımaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Yüksek doz MP uygulanan K562s ve K562r hücrelerinde MTT ve akım sitometri analizleri sonucu ilacın canlılığı istatistiksel olarak ($p<0.001$) anlamlı biçimde azalttığı saptandı. Her iki hücre hattında da ortak LD50 dozunun 48.saatte 4mM olduğu saptandı.
- 4mM dozda MP uygulanan K562r ve K562s hücre hatlarında ilaç uygulaması öncesi ve sonrası laktat ve glukoz miktarlarında değişim analiz edildi.
- 4mM dozda MP uygulanan K562r ve K562s hücre hatlarında ilaç uygulaması öncesi ve sonrası apoptotik ve glikolitik yolak enzimlerinin ekspresyonları analiz edildi. Anti-apoptotik genlerin (BCL-2, BCL-XL, MCL-1) ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı biçimde azalma saptanırken, proapoptotik genlerden Bim ekspresyonunda anlamlı bir artış saptanmıştır.
- YDMP'nin otofaji yolağına etkisinin olup olmadığı araştırıldı. Otofajik genlerden BECLIN-1 ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik olmadığı saptandı.
- YDMP'nin glikolitik yolak etkisi üzerine etkisi HK II, PKM1, PKM2, LDH-A, LDH-B, PDK1 genlerinin ekspresyonu üzerinden araştırıldı. LDH-A ve LDH-B genlerinin ekspresyonu hem Imatinib dirençli hem hassas hücrelerde anlamlı derecede azalırken, onkogen olan c-myc ekspresyonunda da anlamlı azalma meydana gelmiştir.

- YDMP'nin PDK1'in ve PKM2'nin ekspresyonunu azaltması beklenirken çalışmamızda bu genlerin ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır.
- YDMP uygulaması sonrası ekspresyonu anlamlı olarak değişen genlerin protein düzeyinde analizleri Western Blot tekniği ile yapılacaktır.
- Hem TCA döngüsündeki hem de oksidatif olmayan pentoz fosfat yolağındaki Tiamin bağımlı enzimlerin inhibitörü olarak kullanılan oksitiaminin dirençli hücrelerde imatinib hassasiyetini artırdığı bilinmektedir. Çalışmamızın devamında Oksitiamin ve Metilprednizolon hücrelere uygulanarak laktat ve glukoz miktarları ile metabolik yolak gen ekspresyon seviyelerindeki değişimler analiz edilerek karşılaştırılacaktır.
- İmatinib dirençli hastalardan izole edilen myeloid hücrelerde Stable isotope-based dynamic metabolic profiling (SiDMAP) yöntemi ile glukozdan oksidatif olmayan pentoz fosfat sentezinin indüklendiği ve mitokondriyal glikoz oksidasyonunun azaldığı yapılan çalışmalarda bulunmuştur, bu yöntem ile ilaç direnci ile hastalık progresyonu güvenilir bir şekilde analiz edilebilmektedir (Serkova ve ark., 2005). Çalışmanın devamında Imatinib dirençli KML hastalarından alınacak kemik iliği myeloid hücrelerine Metilprednizolon uygulanarak SiDMAP yöntemi ile ilacın dirence etkisi araştırılacaktır.
- Çalışmamızın devamında K562s ve K562r hücrelerinde YDMP'nin glutaminoliz yolağına etkisi olup olmadığı araştırılacaktır. Çalışmamızda MP uygulaması sonrası ekspresyonu anlamlı derecede azalan c-MYC onkogenin glutaminoliz yolağıyla olan ilişkisi göz önünde bulundurularak, MP'nin glutaminoliz yolağını da baskılayacağı düşünülmektedir.

ÖZET

Imatinib Duyarlı ve Dirençli KML Hücre Serileri K562s ve K562r Hücrelerinde Metilprednizolonun Apoptotik, Otofajik ve Metabolik Etkilerinin Gösterilmesi

Kronik myeloid lösemi (KML), (9;22)(q34;q11) translokasyonunun moleküler ürünü olan BCR-ABL füzyon geni nedeniyle oluşan hematopoetik bir neoplazidir. Imatinib mesilat “BCR-ABL tirozin kinaz inhibitörü (TKİ)” olarak adlandırılan bir ilaç tipidir. Abl kinaz domaininin ATP bağlanan bölgesiyle yarışarak inhibe eden Abl tirozin kinaz inhibitörüdür. Imatinib hassas ve dirençli hücreler arasındaki metabolik farklılıklar hücre proliferasyonu oranı, apoptozisin indüklenmesi, Pgp ekspresyonu ve hücre içi imatinib konsantrasyonu ile korelasyon göstermektedir. Glukoz metabolizmasında meydana gelen azalmanın özellikle ilaca hassas hücrelerde önemli derecede olması, hücre proliferasyonunun inhibisyonu ve apoptozisin başlamasında hücre spesifik bir metabolik cevap olduğunu göstermektedir. Bu tez çalışmasında, Akut Lösemilerin tedavisinde kullanılmakta olan, anormal hücreleri apoptozise ve farklılaşmaya götürdüğü bilinen Metilprednizolonun, Imatinibe dirençli olan ve dirençli olmayan KML hücreleri üzerindeki metabolik, apoptotik ve otofajik etkisi araştırılmıştır. Kanseri hücrelerinde artan metabolizma ve hücreye glukoz alımına Yüksek Doz Metilprednizolonun etkisi gösterilmiştir. Metilprednizolonun glukokortikoid yapıda olması ve glukokortikoidlerin metabolizmayı yavaşlatıcı, hücreye glukoz alımını azaltıcı etkisi göz önünde bulundurulduğunda, dirençli KML hücrelerinde metabolizmayı yavaşlatarak, onkogenik etkiyi azalttığı ve metabolizmanın yakından ilişkili olduğu düşünülen apoptotik yolları aktive ettiği saptanmıştır. Bu bağlamda KML hücre serisi olan K-562 hücrelerinin dirençli ve dirençsiz formlarına Metilprednizolon uygulanarak, apoptotik etken doz 4mM olarak bulunmuştur. Yüksek doz Metilprednizolon uygulanan hücrelerde glukoz tüketimi ve laktat üretimi üzerinde değişiklik araştırılmış ancak anlamlı bir değişiklik saptanamamıştır. Yüksek doz Metilprednizolon uygulanan hücrelerden RNA izolasyonu yapılarak, BCL-2, BCL-xL, BAX, BIM, MCL-1, C-MYC VE HK1/HK2, LDH-A, LDH-B, PDK1, BECLIN-

1, PKM1 ve PKM2 genlerinin ekspresyon analizleri yapılmıştır. Hem dirençli hem dirençsiz K562 hücrelerinde MP uygulaması sonrası C-MYC, BCL-2 ve BCL-xL genlerinin ekspresyonlarında azalma görülürken, BAX ve BIM genlerinin ekspresyonlarında anlamlı bir azalma saptanmıştır. BECLIN-1 ekspresyonunda önemli bir değişiklik saptanmaması Metilprednizolonun bu hücrelerde otofajiyi önleyici bir etkisi olmadığını göstermektedir. Warburg etkisini ortaya koyan LDH-A ve LDH-B genlerinin ekspresyonlarında anlamlı bir azalma saptanırken, PDK1, PKM1 ve PKM2 genlerinin ekspresyonunda anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Dirençli ve dirençsiz K-562 hücre serilerinde Yüksek Doz Metilprednizolonun hem apoptotik hem otofajik hem de metabolik etkisinin belirlenmesi açısından ilk çalışma olmasının yanı sıra, metabolizma ve ölüm yollarının arasında ilişki düşünüldüğünde gen ekspresyonu düzeyinde bu ilişkinin aydınlatılmasında literatüre önemli katkısı olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, Kanser Metabolizması, Kronik Myeloid Lösemi, Meilprednizolon, Otofaji

SUMMARY

Apoptotic, Autophagic and Metabolic Effects of Methylprednisolone on Imatinib sensitive and resistant CML cell lines K562 and K562s.

Chronic myeloid leukemia (CML), (9, 22) (q34, q11) translocation of the molecular product of the BCR-ABL fusion gene causes hematopoietic neoplasm. Imatinib mesylate "BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor (TKI)" is a type of drug using for CML therapy. Abl kinase domain and ATP binding site racing with inhibiting the Abl tyrosine kinase inhibitor. Imatinib sensitive and resistant cells have metabolic differences among cell proliferation rate, apoptosis induction, Pgp expression and intracellular imatinib concentration and these are correlated. A reduction in glucose metabolism in cells especially sensitive to drugs that substantially, the initiation of cell proliferation and inhibition of apoptosis suggests that cells of a specific metabolic responses. In this thesis, methylprednisolone which is used in the treatment of acute leukemia and the abnormal cells are known to lead to apoptosis and differentiation was treated in Imatinib-resistant and sensitive CML cells and metabolic, apoptotic and autophagic effect was explored. Effect of High Dose Methylprednisolone on glucose uptake and lactate efflux in cancer cells were shown and did not find a significant change. Methylprednisolone is a glucocorticoid and glucocorticoid metabolism slows cell glucose uptake. When these effects are considered, resistant CML cells metabolism, slowing oncogenic effects diminish and metabolism is closely associated with apoptotic and autophagic pathways activated is expected to. In this context, the K-562 cells in CML cell lines resistant and sensitive forms by applying High Dose Methylprednisolone, apoptotic effect was shown for two cell lines. And RNA isolation was performed cells treated high dose MP. Following cDNA synthesis BCL-2, BCL-xL, BAX, BIM, MCL-1, C-MYC VE HK1/HK2, LDH-A, LDH-B, PDK1, BECLIN-1, PKM1 and PKM2 gene expression analysis was performed. Confirming apoptosis, MCL-1, BCL-2 and BCL-xL gene expressions were significantly decreased whereas BIM and BAX gene expressions were significantly increased in both cell lines. BECLIN-1 expression did not change

significantly so we did not find any change in autophagy. LDH-A and LDH-B gene expressions were significantly decreased that we expected to. But HDMP did not show any changes on other metabolic gene expressions. Resistant and sensitive K-562 cell lines which are treated with Methylprednisolone showed apoptotic effect as well as the metabolic effects of the determination of the terms of the first study as well as being, metabolism and death pathways relationship between considering the gene expression level of this relationship is the first study in literature.

Keywords: Apoptosis, Autophagy, Cancer Metabolism, Chronic Myeloid Leukemia, Methylprednisolone



KAYNAKLAR

1. Barnes K, McIntosh E, Whetton AD, Daley GQ, Bentley J, Baldwin SA (2005). Chronic myeloid leukaemia: an investigation into the role of Bcr-Abl-induced abnormalities in glucose transport regulation. *Oncogene*, **24**: 3257–3267.
2. Bhattacharya B, Mohd Omar MF, Soong R (2016). The Warburg effect and drug resistance. *Br J Pharmacology*, **173**:970-979.
3. Christofk HR, Vander Heiden MG, Wu N, Asara JM, Cantley LC (2008). Pyruvate kinase M2 is a phosphotyrosine binding protein. *Nature*, **452**:181-186.
4. Colloff JL, Macintyre AN, Nichols AG, Liu T, Gallo CA, Plas DR, Rathmell JC (2011). Akt-Dependent Glucose Metabolism Promotes Mcl-1 Synthesis to Maintain Cell Survival and Resistance to Bcl-2 Inhibition. *Cancer Research*, **71(15)**: 5204–5213.
5. Çetin M, Hiçsönmez G, Tuncer AM, Kansu E, Canpınar H (1996). The effect of short, course high-dose corticosteroid therapy on peripheral blood CD34 progenitor cells in children with acute leukemia. *Experimental Hematology*, **24**: 191-194.
6. Deeb G, Vaughan MM, McInnis I (2011). Hypoxia-inducible factor-1 α protein expression is associated with poor survival in normal karyotype adult acute myeloid leukemia. *Leuk Res*, **35**:579-584.
7. Dengler AM, Staiger MA, Gutekunst M, Hofmann U, Doszczak M, Scheurich P, Schwab M, Aulitzky WA, Kuip H (2011). Oncogenic Stress Induced by Acute Hyper-Activation of Bcr-Abl Leads to Cell Death upon Induction of Excessive Aerobic Glycolysis. *PLoS ONE*, **6(9)**.

8. Frazer R, Irvine AE, Frances –McMullin M (2007). Chronic Myeloid Leukaemia in The 21st Century. *Ulster Med J*, **76**: 8-17.
9. Gordy C, He You-Wen (2012). The crosstalk between autophagy and apoptosis: where does this lead? *Protein Cell*, **3(1)**: 17–27.
10. Gottschalk S, Anderson N, Hainz C, Eckhardt SG, Serkova NJ (2004). Imatinib (STI571)-mediated changes in glucose metabolism in human leukemia BCR-ABL-positive cells. *Clin Cancer Res*, **10**: 6661–6668.
11. Hehlmann R, Hochhaus A, Baccarani M (2007). Chronic myeloid leukaemia. *Lancet*, **370**: 342–350.
12. Hiçsönmez G (2006). The effect of steroid on myeloid leukemic cells: ‘The potential of short-course high-dose methylprednisolone treatment in inducing differentiation, apoptosis and in stimulating myelopoiesis. *Leukemia Research*, **30**: 60–68.
13. Hiçsönmez G, Özsoylu S, Tuncer AM (1991). Differentiation of myeloid leukemic cells induced by high-dose methylprednisolone in patients with acute myeloblastic leukemia and its therapeutic potential. *Leukemia Research*, **15**: 537-541.
14. Hiçsönmez G, Tuncer AM, Güler E, Tan E, Tekelioglu M (1993). The potential role of high-dose methylprednisolone on the maturation of leukemic cells in children with acute promyelocytic leukemia (APL). *Experimental Hematology*, **21**: 599-601.
15. Hulleman E, Kazemier KM, Holleman A (2009). Inhibition of glycolysis modulates prednisolone resistance in acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood*, **113**: 2014-21.
16. Kaymaz BT, Selvi N, Saydam G, Sahin F, Kosova B (2012). Methylprednisolone induces apoptosis by interacting with the JAK/STAT pathway in HL-60 and K-562 leukemic cells. *Hematology*, **17(2)**:93-99.

17. Klawitter J, Kominsky DJ, Brown JL, Klawitter J, Christians U, Leibfritz D, Melo JV, Eckhard SG, Serkova NJ (2009). Metabolic characteristics of imatinib resistance in chronic myeloid leukaemia cells. *British Journal of Pharmacology*, **158**: 588–600.
18. Kominsky DJ, Klawitter J, Brown JL (2009). Abnormalities in glucose uptake and metabolism in imatinib-resistant human BCR-ABLpositive cells. *Clin Cancer Res*, **15**:3442–3450.
19. Kluza J, Jendoubi M, Ballot C (2011). Exploiting mitochondrial dysfunction for effective elimination of imatinib-resistant leukemic cells. *PLoS One*, **6**: 219-224.
20. Leone RD, Amaravadi KA (2013). Autophagy: a targetable linchpin of cancer cell metabolism. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **24**: 209-217.
21. Luo W, Semenza GL (2011). Pyruvate kinase M2 regulates glucose metabolism by functioning as a coactivator for hypoxia-inducible factor 1 in cancer cells. *Oncotarget*, **2**: 551 – 556.
22. Mason EF, Zhao Y, Goraksha-Hicks P, Coloff LJ, Gannon H, Jones SN, Rathmell JC (2010). Aerobic Glycolysis Suppresses p53 Activity to Provide Selective Protection from Apoptosis upon Loss of Growth Signals or Inhibition of BCR-Abl. *Cancer Research*, **70**(20).
23. Mattern J, Büchler Markus W, Herr I (2007). Cell Cycle Arrest by Glucocorticoids May Protect Normal Tissue and Solid Tumors from Cancer Therapy. *Cancer Biology & Therapy*, **6**:1345-1354.
24. Mathupala SP, KO YH, Pedersen PL (2006). Hexokinase II: Cancer’s double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. *Oncogene*, **25**: 4777–4786.
25. Ohtomo T, Miyazawa K, Naito M, Moriya S, Kuroda M, Itoh M, Tomoda A (2010). Cytoprotective effect of imatinib mesylate in non-BCR-ABL-

expressing cells along with autophagosome formation. *Biochem Biophys Res Commun*, **391**: 310.

26. Quintá's-Cardama A, Cortes JE (2006). Chronic myeloid leukemia: diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc*, **81**:973-988.
27. Serkova N., Boros GL (2005). Detection Of Resistance To Imatinib by Metabolic Profiling. *Ann J Pharmacogenomics*. **5**.
28. Shim H, Dolde C, Lewis BC, Wu CS, Dang G, JUNGMAN RA, DALLA-FAVERA R, DANG CV (1997). c-Myc transactivation of LDH-A: Implications for tumor metabolism and growth. *Proc. Natl. Acad. Sci*, **94**.
29. Shi HS, Li D, Zhang J, Wang YS, Yang L, Zhang HL, Wang XH, Mu B, Wang W, Ma Y, Guo FC, Wei YQ (2010). Silencing of pkm2 increases the efficacy of docetaxel in human lung cancer xenografts in mice. *Cancer Sci*, **101**:1447-1453.
30. Sionov RV, Spokoini R, Shlomit KE, Cohen O, Yefenof E (2008). Mechanisms Regulating the Susceptibility of Hematopoietic Malignancies to Glucocorticoid Induced Apoptosis. *Adv Cancer Res*, **101**: 127-148.
31. Song K, Li M, Xu Xiao-Jun, Li Xuan, Gui-Nian Huang, Xiao-Ling Song, Qi-Fa Liu (2014). HIF-1 α and GLUT1 Gene Expression is Associated with Chemoresistance of Acute Myeloid Leukemia. *Asian Pacific Journal Cancer Prevention*, **15 (4)**: 1823-1829.
32. Tamada M, Suematsu M, Saya H (2012). Pyruvate Kinase M2: Multiple Faces for Conferring Benefits on Cancer Cells. *Clin Cancer Res*, **18(20)**.
33. Thielen N, Ossenkoppele GJ, Schuurhuis GJ, Janssen M (2011). New insights into the pathogenesis of chronic myeloid leukaemia: towards a path to cure. *Netherlands Journal of Medicine*, **69**: 430–440.

34. Thomas J, Wang L, Clark RE, Pirmohamed M (2004). Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood*, **104**: 3739–3745.
35. Trela E, Glowacki S, Basiak J (2014). Therapy of Chronic Myeloid Leukemia: Twilight of the Imatinib Era? *ISRN Oncology*, **10**.
36. Zhao F, Mancuso A, Bui TV, Tong X, Gruber JJ, Swider CR, Sanchez P, Lum JJ, Sayed N, Melo JV, Perl AE, Carroll M, Tuttle SW, Thompson CB (2010). Imatinib-resistance associated with BCR-ABL upregulation is dependent on HIF-1 α -induced metabolic reprogramming. *Oncogene*, **20**: 2962–2972.
37. Zhao Y, Butler EB, Tan M (2013). Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. *Cell Death Dis.* **7**:4.

ÖZGEÇMİŞ

I. KİŞİSEL BİLGİLER

ADI, SOYADI : Işıl YÜKSELEN
DOĞUM TARİHİ ve YERİ : 10.05.1985 /Hatay
HALEN GÖREVİ : Doktora öğrencisi (Tez Dönemi), Ankara
Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya
Anabilim Dalı
TELEFON : 05333967600
E-MAIL : isilyukselen@gmail.com

II. EĞİTİM

YILI	DERECESİ	ÜNİVERSİTE	ÖĞRENİM ALANI
2011- Şubat 2016'da teslim edilecek	Do Doktora	Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Biyokimya Anabilim Dalı
2008-2011	İç Yüksek Lisans	Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
2004-2008	Lisans	Hacettepe Üniversitesi	Biyoloji

Yüksek Lisans Tez Konusu: Pediatrik Akut Myeloid Lösemi Tedavisinde Kullanılan Metilprednizolon'un DNA Metilasyonu Üzerine Etkisi

Doktora Tez Konusu: Imatinib Duyarlı ve Dirençli KML Hücre Serileri K562s ve K562r Hücrelerinde Metilprednizolonun Apoptotik, Otofajik ve Metabolik Etkilerinin Gösterilmesi

Yüksek Lisans'ta Alınan Dersler

- Moleküler Genetik
- PCR Temelli Genetik Analiz Yaklaşımları
- Güvenli ve Etkin Laboratuvar Uygulamaları
- Moleküler Biyoloji ve Genetik
- İnsan Genetiği
- Etik
- Genombilimde Mikrodizin Uygulamaları ve Biyoinformatik Analiz
- Gen Moleküler Biyolojisi
- Alan Uygulaması
- Biyoteknoloji Seminerleri

Doktora'da Alınan Dersler

- Kanser Moleküler Biyolojisi
- Proteinlerin İzolasyon ve Pürifikasyonları
- Doku Biyokimyası
- Hormonlar
- Hücresel Sinyal İletimi
- Proteinlerin Kimyası ve Yapısal Analizi
- Metabolik Regülasyon
- PAA Jel Elektrophorezi
- Genel Biyokimyada Matematiksel Problem Çözümü
- Biyolojik membranların Yapı ve Fonksiyonları
- Metabolizma I
- Hücre Kültürü
- Metabolizma II
- Protein Biyosentezi ve Regülasyonu
- Beslenme Biyokimyası

III. SINAVLAR

ALES Sayısal puan : 73

ÜDS : 74

IV. BİLİMSEL ETKİNLİKLER

Çalışma Alanları

ÇALIŞMA ALANI	ANAHTAR SÖZCÜKLER
Moleküler Genetik	Kanser, epigenetik, mutasyon, polimorfizm, otofaji
Biyokimya	Metabolizma

Posterler

- **İşıl Yükselen**, Yalda Hekmatshoar, Buket Altınok, Fügen Aktan, Asuman Sunguroğlu, Zeynep Gençtürk: Apoptotic Effect of Methylprednisolone on Imatinib sensitive and resistant CML cell lines K562s and K562r., XIV. Congress of Medical Biology and Genetics, Fethiye, 27-30 October 2015.

- O. S. Aydos, B. Altınok, T. Özkan, **I. Yükselen**, F. Kaplan, Y. Hekmatshoar, O. Sakiragaoglu, M. Taspınar, A.Sunguroglu, K. Aydos, The investigation of genetic analysis of genes encoding sperm nuclear proteins with the effects on fertility in infertile men, 40th FEBS Congress, The Biochemical Basis Of Life, Berlin, 4-9 July 2015.

- **Yükselen I.**, Özkan T., Altınok B., Kuşkonmaz B., Çetin M, Sunguroğlu A., Yüksek Doz Metilprednizolon'un HL-60 AML Hücrelerinde Apoptotik ve Otofajik Etkisi, 39. Ulusal Hematoloji Kongresi, 2013

- **Yükselen I.**, Altınok, B., Karadag, A., Canpınar, H., Oztuna, D., Sunguroglu, A Effects of methylprednisolone on DNA methylation in HL-60 AML cells,, 22nd IUBMB Congress/37th FEBS Congress, Seville, SPAIN, SEP 04-09, 2012

- Ozkan T., Gokce I., Altinok B., Karadag A., **Yukselen I.**, Hekmatshoar Y., Aydos S., Baltacı S., SÜngürođku A., GSTP1 gene methylation analysis in prostat cancer, Seville,SPAIN, Sep 04-09, 2012.

- Ozturk G., Altinok B, Ozkan T., **Yukselen I.**, Ilgaz S., Karadag A., Ozsoy N., Sungürođlu S., Detection of NPM1 gene mutations in AML patients in Turkish population, 6th FEBS Congress of the Biochemistry for Tomorrows Medicine, Torino, ITALY, JUN 25-30, 2011

- Aydos S., Altinok B., Özkan T., **Yükselen I.**, Çalışkan E., Gökçe İ., Baltacı S., Öztuna D., Sungürođlu S., Prostat Kanserli Hastalarda DAP Kinaz Geninin Metilasyon Analizi, XI. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 2009.

- Ozkan T, Karabay ZA, Koc A, Karadag A, Aydos S, Caliskan E, Ozturk G, Ilgaz SN, **Yukselen I**, Sunguroglu A., Wheatgrass extract increases proliferation of RAW 264.7 macrophages induced by hydrogen peroxide (H2O2) or lipopolysaccharide (LPS, Planta Medica, 75, 923, 2009.

Seminerler

- Embriyonik Transkripsiyon Faktörlerinin Etki Mekanizmaları
- Otofaji
- Kanser Metabolizması

Görev Aldığı Projeler

- 1- HL-60, Jurkat ve U-937 Hücre Serilerinde Metilprednizolon Uygulamasının Epigenetik Mekanizmalar Üzerindeki Etkisi (**Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu Terry Fox Kanser Araştırma Desteđi almıştır**)
- 2- “Çocukluk Çağı Akut Myeloid Lösemi Hastalarının Tedavisinde Kullanılan Metilprednizolonun DNA Metilasyonu Üzerindeki Etkinliđi” adlı **TÜBİTAK 1001 Projesi Bursiyeri**

- 3- İnfertil erkeklerde, sperm nükleer proteinlerini kodlayan genlerin genetik ve epigenetik analizi ile fertilité üzerine etkisinin araştırılması, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projesi
- 4- Imatinib Duyarlı ve Dirençli KML Hücre Serileri K562s ve K562r Hücrelerinde Metilprednizolonun Apoptotik, Otofajik ve Metabolik Etkilerinin Gösterilmesi, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projesi-Lisanüstü-Doktora Tez Projesi

Teknik Deneyimler

- Hücre Kültürü
- Akım Sitometri
- PCR, RT-PCR
- DNA Sekans Analizi
- Metilasyon Analizi

V. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

1. Moleküler Kansér Araştırma Derneđi
2. Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneđi
3. European Association for Cancer Research (EACR)
4. Türk Biyokimya Derneđi

Katılınan Bilimsel Toplantılar

5. XIV. Congress of Medical Biology and Genetics, Fethiye, 27-30 October 2015.
6. 39. Ulusal Hematoloji Kongresi Sözlü Bildiri Sunumu, 23-26 Ekim 2013, Yüksek Doz Metilprednizolon'un HL-60 AML Hücrelerinde Apoptotik ve Otofajik Etkisi
7. 22nd IUBMB Congress/37th FEBS Congress, Seville, SPAIN, SEP 04-09, 2012
8. Türkiye Bilimler Akademisi, VI. Kök Hücre Sempozyumu, 24-25 Haziran 2011
9. Ürolojide Güncel Yaklaşımlar- II Androloji, 27-28 Şubat 2009

10. Horizons in Molecular Biology and Genetics Symposium, Bilkent Üniversitesi, 11-12 Mayıs 2009
11. Mediterranean Medical Genetics 2009 Meeting, 28 Haziran-1 Temmuz 2009
12. Mediterranean Medical Genetics 2009 Meeting, European Society of Human Genetics- ESHG Course "Medical genetics and genomic analysis in isolated and consanguineous populations", 30 Haziran -1 Temmuz 2009
13. Türkiye Bilimler Akademisi, IV. Kök Hücre Sempozyumu, 26-27 Haziran 2009

V. İŞ DENEYİMİ

2013- Halen, Klinik Çalışma Koordinatörü, MediSMART CRO

Görev Alınan Klinik Araştırma Çalışmaları

- Faz II Çalışma, Hematoloji (Eylül 2015- Halen)
- Faz I/IIa Çalışma, Hematoloji (Ağustos 2015-Halen)
- Faz III Çalışma, Hematoloji (Mayıs 2014-Halen)
- Faz III Çalışma, Gastroenteroloji (Ağustos 2013-Temmuz 2014)
- Gözlemsel Çalışma, Üroloji (Eylül 2013- Temmuz 2014)