

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KRONİK MİYELOİD LÖSEMİ TEDAVİSİNDE RUXOLİTİNİBİN İN VİTRO
UYGULANMASI İLE MEYDANA GELEN MOLEKÜLER BİYOLOJİK
DEĞİŞİKLİKLERİN İNCELENMESİ**

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi
Bakiye GÖKER

DANIŞMAN:
Doç. Dr. Çığır BİRAY AVCI

İZMİR
2015

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KRONİK MİYELOİD LÖSEMİ TEDAVİSİNDE RUXOLİTİNİBİN İN VİTRO
UYGULANMASI İLE MEYDANA GELEN MOLEKÜLER BİYOLOJİK
DEĞİŞİKLİKLERİN İNCELENMESİ**

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi
Bakiye GÖKER

DANIŞMAN:
Doç. Dr. Çığır BİRAY AVCI

İZMİR
2015

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Doç. Dr. Çığır BİRAY AVCI

(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Cumhur GÜNDÜZ

Üye : Prof. Dr. Güray SAYDAM

Yüksek Lisans Tezinin Kabul Edildiği Tarih:

04.02.2015

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgisiyle önümü aydınlatan, desteği, güveni ve güler yüzüyle koşullar ne olursa olsun çalışmam için motivasyon kaynağı olan, hem akademik hayatımda hem de sosyal hayatımda karşılaştığım tüm sorunlarla sabırla ve özveriyle ilgilenen, başarılarıyla örnek olan, yol gösteren, en iyi şekilde yetişmemi sağlayan danışmanım, değerli hocam **Sn. Doç. Dr. Çığır BİRAY AVCI**’ ya,

Anabilim dalımızın kapısından girdiğim ilk günden beri, ihtiyaç duyduğum her an çekinmeden kapısını çalabildiğim, karşılaştığım tüm sorunları içtenlikle dinleyen ve zamanını ayırarak mutlaka çözüm bulan, bilgisi ve deneyimleriyle yardımcı olan, değerli hocam, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı **Sn. Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ**’ e,

Tez konumun belirlenmesi ve ilaç seçimimde yardımcı olan Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahiliye Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı Başkanı saygı değer hocam **Sn. Prof. Dr. Güray SAYDAM**’ a,

Yüksek lisans eğitimim sürecinde bilgi ve desteklerini esirgemeyen anabilim dalımızın saygı değer hocaları **Sn. Doç. Dr. Zuhal EROĞLU**’ na, **Sn. Doç. Dr. Buket KOSOVA CAN**’ a, **Sn. Yrd. Doç. Dr. Nur SELVİ GÜNEL**’ e,

Çalışmamın otofaji aşamasında vaktini ayırarak yardımcı olan **Sn. Doç. Dr. Petek BALLAR KIRMIZIBAYRAK**’ a,

Eğitimim süresince tecrübelerini benimle paylaşarak yardımcı olan **Sn. Arş. Gör. Dr. Burçin TEZCANLI KAYMAZ**’ a, **Sn. Arş. Gör. Dr. Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ**’ a, **Sn. Arş. Gör. Dr. Aslı TETİK VARDARLI**’ ya, **Sn. Arş. Gör. Dr. Sunde YILMAZ SÜSLÜER**’ e, **Sn. Arş. Gör. Dr. Duygu AYGÜNEŞ**’ e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca, sevinçleri ve üzüntüleri paylaştığımız, yardımları ve motivasyonları ile her zaman bana destek olan başta ekip arkadaşlarım **Sn. Dok. Öğr. Zeynep MUTLU**, **Sn. Dok. Öğr. Cansu ÇALIŞKAN**, **Sn. Yük. Lis. Öğr. Özgün ÖZALP** olmak üzere bu tüm bu zorlukları birlikte atlattığımız değerli arkadaşlarım **Sn. Dok. Öğr. Tuğçe BALCI**’ ya, **Sn. Dok. Öğr. Çağla KAYABAŞI**’ na, **Sn. Dok. Öğr. Besra ÖZMEN YELKEN**’ e, **Sn. Dok. Öğr. Sezgi KIPÇAK**’ a, **Sn. Yük. Lis. Öğr. Buket ÖZEL**’ e, **Sn. Arş. Gör. Zekeriya DÜZGÜN**’ e, **Sn. Yük. Lis. Öğr. Metin ÇALIŞKAN**’ a, **Sn. Dok. Öğr. Ali Şahin KÜÇÜKASLAN**’ a, **Sn. Dr. Çağdaş AKTAN**’ a, **Sn. Dr. Ayşegül DALMIZRAK**’ a ve yüksek lisans eğitimleri sırasında birlikte olduğumuz arkadaşlarım **Sn. Selin YEŞİL**’ e, **Sn. Mert Kaya ARAS**’ a,

Laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan çok değerli teknikerimiz **Sn. Hale GÜNDÜZ**’ e, her işimize koşturan sekreterlerimiz **Sn. Anıl KARAKAŞ**’ a ve **Sn. Murat TUNCER**’ e değerli personelimiz **Salih TOROĞLU**’ na,

Hayatıma girdiği ilk günden beri iyi kötü tüm zamanları birlikte atlattığımız, koşulsuz sevgisi ve desteğiyle her an yanımda olan, dostum, arkadaşım, sevgilim, her şeyim **Sn. Fırat BAĞCA**’ ya,

Her zaman her koşulda değerli arkadaşlığı ve dostluğuyla yanımda olan kuzenden öte kardeşim, canım **Sn. Elif KÜÇÜKAYDIN**’ a,

Gözlerini bu dünyaya açtığı ilk andan beri iyi kötü güzel çirkin her şeyi paylaştığımız birbirimize destek olduğumuz, canımdan çok sevdiğim, kardeşim olduğu için her zaman gurur duyduğum **Sn. Ayşe GÖKER**’ e,

Attığım her adımda sonsuz güvenleri ve destekleri ile her zaman yanımda olan, tüm hayatlarını bizim için adayan, üzerimdeki emeklerini bir iki cümle ile asla özetleyemeyeceğim, çocukları olduğum için kendimi şanslı ve özel hissettiğim sevgisiyle bana hayat veren canım annem **Sn. Gülay GÖKER**’ e, bana bilimi öğreten, sevdiren, aklına her zaman hayran olduğum canım babam **Sn. Hasan Hüseyin GÖKER**’ e,

Sonsuz teşekkürler...

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

Son olarak bu çalışmanın gerçekleşmesi için gerekli maddi desteği 14-TIP-048 nolu BAP projesi aracılığıyla sağlayan Ege Üniversitesi Rektörlüğü’ne teşekkür ederim.

İzmir, 28.01.2015

Bakiye GÖKER

ÖZET

KRONİK MİYELOİD LÖSEMİ TEDAVİSİNDE RUXOLİTİNİBİN İN VİTRO UYGULANMASI İLE MEYDANA GELEN MOLEKÜLER BİYOLOJİK DEĞİŞİKLİKLERİN İNCELENMESİ

Kronik miyeloid lösemi hematopoietik kök hücrenin klonal bir hastalığıdır. Philadelphia kromozomu olarak bilinen resiprokal (9;22) translokasyonu sonucu BCR-ABL füzyon proteininin aşırı ifade seviyesi lösemik fenotipin meydana gelmesinden sorumludur.

Ruxolitinib, miyelofibroz tedavisine karşı geliştirilen ilk ajandır ve hematopoiez için zorunlu olan çeşitli sitokin ve büyüme faktörlerinin sinyalleşme yolağında bulunan seçici JAK 1 ve 2 inhibitörüdür.

Apoptoz ve otofaji sırasıyla tip I ve tip II hücre ölümü olarak da bilinmektedir. Bu iki mekanizma hücrenin uyarılara yanıt veren önemli protein kaskadlarını düzenleyerek hücre yaşamını ya da ölümünü belirler. Kanserlerde çeşitli etken maddelerle apoptotik ve otofajik etkinliğin artırılması güncel bir terapötik hedeftir.

Çalışmamızda K-562 insan kronik miyeloid lösemi hücre hattı ve NCI-BL 2171 insan normal B lenfositleri üzerine güçlü JAK inhibitörü olan ruxolitinibin uygulanması sonucu meydana gelen sitotoksik, apoptotik ve otofajik değişikliklerin, apoptoz, otofaji ve lösemi ilişkili genlerin ifadelerindeki değişikliklerin kontrol grubuyla karşılaştırılarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

K-562 ve NCI-BL 2171 hücrelerinde ruxolitinibin sitotoksik etkisi WST-1 analizi kullanılarak zaman ve doza bağımlı olarak değerlendirilmiştir. Ruxolitinib uygulanan K-562 ve NCI-BL 2171 hücrelerinden ve kontrol olarak kullanılan, doz uygulanmayan hücrelerden total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. cDNA sentezi için ters transkripsiyon protokolü uygulanmıştır. Ruxolitinibin apoptotik etkisi JC-1 ve Annexin V metotlarıyla belirlenmiş, gen ifadelerindeki değişiklikler RT-qPCR ile değerlendirilmiştir.

Ruxolitinibin IC₅₀ dozu (48. saat), K-562 ve NCI-BL 2171 hücreleri için sırasıyla 20µM ve 23,6µM olarak belirlenmiştir. Ruxolitinib hücreler üzerinde apoptotik etkiye neden olmamakla birlikte K-562 ve NCI-BL 2171 hücrelerinde sırasıyla 2,01 ve 1.79 kat otofajiyi indüklemiştir. Ruxolitinibin mTOR, AKT ve STAT gibi otofaji inhibitörlerinin ekspresyon seviyelerini azaltarak hücre ölümünü gerçekleştirdiğini düşünmekteyiz.

Kronik miyeloid lösemide BCR-ABL tirozin kinaz inhibitörlerinin kullanımının yarattığı en büyük sorun zamanla direnç ya da ilaca karşı duyarsızlık oluşmasıdır. Ruxolitinibin BCR-ABL tirozin kinazının aşağı-akış yönündeki hedeflerinden JAK/STAT yolağını bloklayarak kronik miyeloid lösemide potansiyel bir tedavi yöntemi olacağı düşünülmekle birlikte otofajiyile ilgili herhangi bir çalışma yapılmamıştır. Ruxolitinibin moleküler mekanizmaları aydınlatılarak kronik miyeloid lösemi tedavisinde otofaji indüksiyonu aracılığıyla yeni bir bakış açısı oluşturacağını düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: otofaji; kronik miyeloid lösemi; ruxolitinib

ABSTRACT

EXAMINATION OF MOLECULAR BIOLOGIC CHANGES THAT OCCUR RESULT OF IN-VITRO APPLICATION OF RUXOLITINIB IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA TREATMENT

Chronic myeloid leukemia is a clonal disorder of hematopoietic stem cells. Over-expression level of BCL-ABL fusion protein is the result of reciprocal (9;22) translocation known as Philadelphia chromosome is responsible for occurring leukemic phenotype.

Ruxolitinib is the first agent approved for the treatment of myelofibrosis. Ruxolitinib is a selective inhibitor of Janus kinases (JAK) 1 and 2, which are involved in the signalling pathway of various cytokines and growth factors essential to haematopoiesis.

Apoptosis and autophagy known as type I and type II programmed cell death, respectively. These two mechanisms determine cell survival or death via regulating important protein cascades as essential response of cell to stimulus. Raise of apoptotic and autophagic activity in cancers is a novel therapeutic target using different active substance.

In our study we aimed to determine cytotoxic, apoptotic and autophagic changes in K-562 human chronic myeloid cell line and NCI-BL 2171 human normal B lymphocytes treated with potent JAK inhibitor ruxolitinib compared to untreated control group, and detect the expression changes of apoptosis, autophagy and leukemogenesis related genes with the treatment of ruxolitinib.

The cytotoxic effects of ruxolitinib on K-562 and NCI-BL 2171 cells were determined in time and dose dependent manner by using WST-1 analysis. Total RNA was isolated from K-562 and NCI-BL 2171 cells treated with ruxolitinib and untreated cells as control group. Reverse transcription procedure was performed for cDNA synthesis. Apoptotic effect of ruxolitinib was evaluated with JC-1 and Annexin-V methods, and gene expressions were shown by RT-qPCR.

IC₅₀ (48th hours) dose of ruxolitinib was determined as 20µM, 23,6µM for K-562 and NCI-BL 2171 cells, respectively. Ruxolitinib caused no apoptotic effect on K-562 and NCI-BL2171 cells. However, ruxolitinib induced autophagy in K-562 and NCI-BL 2171 cells 2,01 and 1,79 fold, respectively. We supposed that ruxolitinib realizes this cell death via down-regulating autophagy inhibitors mTOR, AKT and STATs.

Ruxolitinib is thought to be potential treatment method in chronic myeloid leukemia by blocking JAK/STAT pathway known as BCR-ABL downstream target, but there has been no study correlated with autophagy. The most critical trouble caused by using BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia treatment is drug resistance or loss of sensitiveness in patients. We suggest that a new perspective would be generated in treatment of chronic myeloid leukemia by clarifying of molecular mechanisms of ruxolitinib through autophagy induction.

Key Words: autophagy, chronic myeloid leukemia, ruxolitinib

İçindekiler

1.GİRİŞ.....	1
2.GENELBİLGİLER.....	3
2.1. Kanser Tanımı ve Tarihçesi	3
2.2. Hematopoiez, Hematopoietik Kök Hücre ve Kanın Şekli Elemanları.....	4
2.3. Lösemi Tanımı ve Tarihçesi.....	5
2.4. Lösemi Oluşturan Risk Faktörleri, Belirtileri, Tanısı, İnsidansı ve Sağkalım Oranları.....	6
2.5. Lökomogenezde Rol Alan Genler.....	7
2.6. Lösemilerin Sınıflandırılması.....	7
2.6.1. Akut Lösemiler	7
2.6.1.1. Akut Lenfositik Lösemi.....	8
2.6.1.2. Akut Miyeloid Lösemi.....	8
2.6.2. Kronik Lösemiler.....	8
2.6.2.1. Kronik Lenfositik Lösemi.....	8
2.6.2.2. Kronik Miyeloid Lösemi.....	8
2.6.2.2.1. Kronik Miyeloid Lösemi Moleküler Biyolojisi.....	9
2.6.2.2.2. Kronik Miyeloid Löseminin Evreleri.....	13
2.7. Nadir Görülen Diğer Lösemi Tipleri.....	14
2.8. Hücre Ölüm Şekilleri.....	14
2.8.1. Nekroz.....	15
2.8.2. Apoptoz.....	15
2.8.2.1. Apoptoz Biyokimyası.....	16
2.8.2.1.1. Ekstrinsik Yolak.....	16
2.8.2.1.2. İntrinsik Yolak.....	17
2.8.2.2. Apoptozda Görev Alan Gen Aileleri.....	18
2.8.2.2.1. Kaspazlar.....	18
2.8.2.2.2. Bcl-2 Ailesi	19
2.8.2.3. Apoptozda Rol Alan Genler.....	20
2.8.3. Otofaji.....	20
2.8.3.1. Otofajinin Moleküler Mekanizması.....	22
2.8.3.2. Otofajinin Tümör Baskılayıcılar ve Onkogenlerle Kontrolü...23	
2.8.3.3. Otofaji ve Apoptoz İlişkisi	25
2.8.3.4. Otofajide Rol Alan Genler	25

2.9. Ruxolitinib ve Etki Mekanizmaları.....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. Hücre Kültürü Çalışmaları	29
3.2. Hücre Canlılık Testi.....	31
3.3. Etken Maddenin Kullanıma Hazır Hale Getirilmesi.....	31
3.4. Sitotoksikite Testleri.....	31
3.5. Apoptoz Analizleri.....	32
3.5.1. JC-1 Yöntemi	32
3.5.2. Annexin V Yöntemi.....	34
3.6. Otofaji Analizi.....	35
3.7. Gen Ekspresyonu Değişim Analizleri.....	36
3.7.1. Total RNA İzolasyonlarının Yapılması.....	37
3.7.2. RNA'nın Saflık ve Kalite Kontrolünün Yapılması.....	37
3.7.3. cDNA Sentezinin Gerçekleştirilmesi.....	38
3.7.4. Gerçek Zamanlı PCR Çalışmalarının Yapılması.....	39
4. BULGULAR	47
4.1. Deneylerde Kullanılacak Uygun Hücre Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	47
4.2. Ruxolitinibin K-562 ve NCI-BL 2171 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi.....	48
4.3. Ruxolitinibin K-562 ve NCI-BL 2171 Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkilerinin Değerlendirilmesi.....	49
4.4. Ruxolitinibin K-562 ve NCI-BL 2171 Hücreleri Üzerindeki Otofajik Etkilerinin Değerlendirilmesi.....	51
4.5. Ruxolitinibin K-562 ve NCI-BL 2171 Hücreleri Üzerinde Oluşturduğu Gen Ekspresyon Değişimlerinin Değerlendirilmesi.....	52
4.5.1. Ruxolitinibin K-562 ve NCI-BL 2171 Hücrelerinin Apoptoz İlişkili Genlerine Etkisi.....	52
4.5.2. Ruxolitinibin K-562 ve NCI-BL 2171 Hücrelerinin Otofaji İlişkili Genlerine Etkisi.....	56
4.5.3. Ruxolitinibin K-562 ve NCI-BL 2171 Hücrelerinin Lösemi İlişkili Genlerine Etkisi.....	59
5. TARTIŞMA.....	62
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	68

7. KAYNAKLAR.....	69
Özgeçmiş.....	79



Tablolar Dizini

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1 : WHO sınıflandırmasına göre kronik miyeloid neoplazmlar.....	9
Tablo 2 : Ruxolitinibin kimyasal özellikleri.....	27
Tablo 3 : Ruxolitinib fosfatın kimyasal özellikleri.....	27
Tablo 4 : K-562 hücre modeli özellikleri.....	29
Tablo 5 : NCI-BL 2171 hücre modeli özellikleri.....	29
Tablo 6 : Otofaji çalışma içeriğinin hazırlanması.....	35
Tablo 7 : Tam 6x liziz tamponunun hazırlanması.....	36
Tablo 8 : Genomik DNA eliminasyon karışımı hazırlanması.....	38
Tablo 9 : Ters transkripsiyon karışımının hazırlanması.....	38
Tablo 10 : Apoptoz plakasının gen dizilimi.....	39
Tablo 11 : Apoptoz plakasında bulunan genler.....	40
Tablo 12 : Otofaji plakasının gen dizilimi.....	41
Tablo 13 : Otofaji plakasında bulunan genler.....	41
Tablo 14 : Lösemi plakasının gen dizilimi.....	43
Tablo 15 : Lösemi plakasında bulunan genler.....	43
Tablo 16 : PCR bileşenlerinin hazırlanması.....	45
Tablo 17 : PCR program protokolü.....	45
Tablo 18 : Ruxolitinibin K-562 hücrelerinin apoptotik gen ekspresyonlarına etkisi.....	52
Tablo 19 : Ruxolitinibin NCI-BL 2171 hücrelerinin apoptotik gen ekspresyonlarına etkisi..	54
Tablo 20 : Ruxolitinibin K-562 hücrelerinin otofajik gen ekspresyonlarına etkisi.....	56
Tablo 21 : Ruxolitinibin NCI-BL 2171 hücrelerinin otofajik gen ekspresyonlarına etkisi.....	58
Tablo 22 : Ruxolitinibin K-562 hücrelerinin lösemi ilişkili gen ekspresyonlarına etkisi.....	59
Tablo 23 : Ruxolitinibin NCI-BL 2171 hücrelerinin lösemi ilişkili gen ekspresyonlarına etkisi.....	61

Şekiller Dizini

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1 : Kanın hücresel elemanları.....	4
Şekil 2 : Philadelphia kromozomu karyotipi.....	6
Şekil 3 : t(9;22) translokasyonu sonucu oluşan Ph kromozomu.....	9
Şekil 4 : BCR-ABL1 kinazını oluşturan kesim noktaları.....	10
Şekil 5 : BCR- ABL1 kinazının fonksiyonel bölgeleri.....	11
Şekil 6 : BCL- ABL1 füzyonunun etkilediği sinyal yolları	12
Şekil 7 : Hücre ölüm tipleri.....	14
Şekil 8 : Hücre ölüm tiplerinin elektron mikroskop görüntüsü.....	15
Şekil 9 : Apoptozom kompleksinin yapısı.....	17
Şekil 10 : Ekstrinsik ve intrinsik yollar.....	18
Şekil 11 : Kaspazların apoptozdaki rolü.....	19
Şekil 12 : Bcl-2 ailesi.....	19
Şekil 13 : Otofajinin şematik gösterimi.....	21
Şekil 14 : Otofajinin moleküler mekanizması.....	24
Şekil 15 : Ruxolitinibin moleküler yapısı.....	27
Şekil 16 : WST-1 testinin prensibi.....	31
Şekil 17 : Otofaji plakası planı.....	36

Grafikler Dizini

	<u>Sayfa</u>
Grafik 1 : K-562 hücrelerinin absorbans değeri.....	47
Grafik 2 : NCI-BL 2171 hücrelerinin absorbans değeri.....	47
Grafik 3 : K-562 hücrelerinde ruxolitinibin IC ₅₀ dozu.....	48
Grafik 4 : NCI-BL 2171 hücrelerinde ruxolitinibin IC ₅₀ dozu.....	48
Grafik 5 : Annexin V yöntemine göre ruxolitinibin K -562 hücrelerindeki apoptotik etkisi	49
Grafik 6 : Annexin V yöntemine göre ruxolitinibin NCI- BL 2171 hücrelerindeki apoptotik etkisi.....	49
Grafik 7 : JC-1 yöntemine göre ruxolitinibin K -562 hücrelerindeki apoptotik etkisi.....	50
Grafik 8 : JC-1 yöntemine göre ruxolitinibin NCI- BL2171 hücrelerindeki apoptotik etkisi	50
Grafik 9 : Ruxolitinibin K-562 ve NCI-BL 2171 hücreleri üzerindeki otofajik etkisi.....	51
Grafik 10 : Ruxolitinib uygulanan K-562 hücrelerinin apoptoz ilişkili genlerinin clustergram analizi.....	53
Grafik 11 : Ruxolitinib uygulanan K-562 hücrelerinin apoptoz ilişkili genlerinin ısı haritası.	53
Grafik 12 : Ruxolitinib uygulanan NCI- BL 2171 hücrelerinin apoptoz ilişkili genlerinin clustergram analizi.....	54
Grafik 13 : Ruxolitinib uygulanan NCI- BL 2171 hücrelerinin apoptoz ilişkili genlerinin ısı haritası.....	55
Grafik 14 : Ruxolitinib uygulanan K-562 hücrelerinin otofaji ilişkili genlerinin clustergram analizi.....	57
Grafik 15 : Ruxolitinib uygulanan K-562 hücrelerinin otofaji ilişkili genlerinin ısı haritası...	57
Grafik 16 : Ruxolitinib uygulanan NCI- BL 2171 hücrelerinin otofaji ilişkili genlerinin clustergram analizi.....	58
Grafik 17 : Ruxolitinib uygulanan NCI- BL 2171 hücrelerinin otofaji ilişkili genlerinin ısı haritası.....	58
Grafik 18 : Ruxolitinib uygulanan K-562 hücrelerinin lösemi ilişkili genlerinin clustergram analizi.....	60
Grafik 19 : Ruxolitinib uygulanan K-562 hücrelerinin lösemi ilişkili genlerinin ısı haritası..	60
Grafik 20 : Ruxolitinib uygulanan NCI- BL 2171 hücrelerinin lösemi ilişkili genlerinin clustergram analizi.....	61
Grafik 21 : Ruxolitinib uygulanan NCI- BL 2171 hücrelerinin lösemi ilişkili genlerinin ısı haritası.....	61

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
KML	: Kronik Miyeloid Lösemi
Ph	: Philadelphia Kromozomu
BCR	: Breakpoint Cluster Region
ABL	: Abelson Leukemia Virus
JAK	: Janus Kinaz Ailesi
STAT	: Signal Transducer and Activator of Transcription
HKH	: Hematopoietik Kök Hücre
NK	: Doğal Öldürücü Hücreler
FISH	: Floresan In Situ Hibridizasyon
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
MPN	: Miyeloproliferatif Neoplazm
PV	: Polistemia Vera
MF	: Miyelofibroz
ET	: Esansiyel Trombostemia
ALL	: Akut Lenfositik Lösemi
AML	: Akut Miyeloid Lösemi
KLL	: Kronik Lenfositik Lösemi
M-bcr	: Major Breakpoint Cluster Region
m-bcr	: Minor Breakpoint Cluster Region
SH	: Src Homoloji Alan
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
IAP	: Sitosolik Apoptoz İnhibitörü Proteinler
CASP	: Sistein-Aspartik Asit-Proteazları
BH	: Bcl-2 Homoloji Bölgesi
ATG	: Otofaji İlişkili Proteinler
mTOR	: Mechanistic Target of Rapamycin
DAPK	: Ölüm İlişkili Protein Kinaz
MOMP	: Mitokondriyal Dış Membran Potansiyeli
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
nM	: Nanomolar
K-562	: İnsan Kronik Miyeloid Lösemi Hücre Hattı
NCI- BL 2171	: İnsan Sağlıklı B Lenfosit Hücre Hattı
FBS	: Fetal Bovin Serum
rpm	: Rounds (Revolutions) Per Minute
DMSO	: Dimetilsülfoksit
$\Delta\psi$	: Mitokondriyal membran potansiyeli değişimi
JC-1	: 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide

g (RCF) : Relative Centrifugal Force
PS : Fosfatidilserin
FITC : Fluorescein Isothiocyanate
PI : Propidium Iodide



1.GİRİŞ

Lösemi kan, kemik iliği ve lenfoid sistemi etkileyen hematolojik neoplazmlar için kullanılan geniş bir kavram olmakla birlikte lösemi terimi genellikle, tek bir mutant kemik iliği öncül hücresinden köken alan, anormal beyaz kan hücrelerinin kontrolsüz proliferasyonu ile karakterize kan ya da kemik iliği kanserlerini tanımlamak için kullanılmaktadır. Lökomogenez olarak adlandırılan lösemi gelişiminde, kalıtsal hastalıklar, kromozomal bozukluklar gibi genetik etmenlerin, onkoviral ajanların, bağışıklık sistemi bozukluklarının ya da çeşitli çevresel faktörlerin etkisi olduğu bilinmektedir. Lösemiler hem ortaya çıkış zamanına ve özelliklerine göre akut ya da kronik lösemiler olarak hem de köken aldıkları ve etkilenen hücre tipine göre miyeloid ya da lenfoid lösemiler olarak alt sınıflara ayrılabilir. Dünya Sağlık Örgütü' nün (WHO) 2001 yılında hazırladığı ve 2008 yılında revize edilen sınıflandırma sistemine göre kronik miyeloproliferatif hastalıklar arasında yer alan kronik miyeloid lösemi (KML) Philadelphia kromozomu (Ph) ile karakterize yaygın bir hematolojik malignansidir. 22. kromozom üzerindeki BCR (breakpoint cluster region) geni ile 9. kromozom üzerindeki ABL (Abelson leukemia virus) genlerinin füzyonuna neden olan (9;22) translokasyonu ile oluşan Ph, KML hastalarının %95' inde görülmektedir. Bu malign füzyon sonucu ABL geninin yüksek seviyede ifade edilmesine neden olan BCR-ABL füzyon proteini oluşur. Füzyon sonucu oluşan BCR-ABL proteini oldukça aktif bir tirozin kinazdır ve normal hematopoietik hücrelerde gelişme ve farklılaşmada görevli RAS, RAF, PI3K, JUN, MYC, STAT gibi çok sayıda sinyal iletim yolağını aktive etmekle birlikte lösemi oluşumunda da büyük ölçüde etkin bir tirozin kinazdır. Füzyon proteinin aşırı aktivasyonu sonucunda hücre normal hematopoiesi gerçekleştirememekte ve lösemik fenotip kazanmaya başlamaktadır. KML hastalarının tedavisinde BCR-ABL proteinin tirozin kinaz aktivitesini önleyen tirozin kinaz inhibitörleri kullanılmaktadır. Klinikte KML tedavisi için BCR-ABL tirozin kinaz inhibitörleri kullanılmakla birlikte zamanla oluşturulan mutasyonlar sonucu olgularda ilaca karşı direnç gelişmekte ya da duyarsızlık meydana gelmektedir. Lökomogenezin de içinde bulunduğu çeşitli kanser tiplerinin miyeloproliferatif hastalıkların gelişimiyle ilişkisi bulunan bir diğer tirozin kinaz ailesi de JAK' lar olarak bilinen Janus kinaz ailesidir. Janus kinaz ailesi aynı yapıdaki yedi JAK homolog domaini ile karakterize edilmiş JAK1, JAK2, JAK3 ve TYK2 tirozin kinazlarından oluşmaktadır ve STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B ve STAT6 transkripsiyon faktörlerini içeren STAT' larla (signal transducer and activator of transcription) birlikte lösemi gibi hematolojik malignansilerin gelişiminde önemli rolü olan JAK/STAT sinyal iletim yolağını oluşturmaktadır. Gen ekspresyonunu düzenleyen etkili ve karmaşık bir sisteme sahip olan bu yolda bulunan reseptörlerin hormonlar ya da büyüme faktörleri gibi çeşitli etkenlerle uyarılması JAK aktivasyonuna, bu da STAT' ların seçici olarak fosforillenerek nükleusa yönelerek gen regülasyonunu düzenlemek üzere hedef genin promotör bölgesine bağlanmasına neden olmaktadır. JAK/STAT yolağının aktivasyonu aracılığıyla hücre bölünmesi, hücre göçü ve apoptozu regüle eden genlerin ifade seviyelerinin değişmesi, bu sinyal yolağındaki bozuklukların hematopoies bozukluklarından köken alan lösemi oluşumunda önemli rol oynamasına neden olmaktadır. Ruxolitinib (INCB018424) JAK1 ve JAK2 tirozin kinazlarının güçlü inhibitörüdür. Temel etkisi JAK' ın STAT' ı fosforile edebilmesini önleyerek hücre bölünmesini durdurması olarak tanımlanmıştır. Ruxolitinib bu özelliği ile primer miyelofibrozis, polisitemia vera

ve trombositemia hastalıklarını içeren orta ya da yüksek miyelofibrozis riski taşıyan hastaların endikasyonlarında ve bu hastalıklara bağlı splenomegalili yetişkin hastaların tedavisinde 2011 yılından beri kullanılmaktadır. İmatinib tirozin kinazının geliştirildiği 2001 yılından bu yana Ph+ KML tedavisinde tirozin kinaz inhibitörlerine odaklanılmıştır. BCR-ABL tirozin kinaz inhibitörlerine karşı zaman içinde meydana gelen direnç veya duyarsızlaşma tedavide bu inhibitörlerin kullanılması konusunda aşılması gereken en büyük sorun olarak görülmektedir. Çalışmamızda lökomogenezde etkili olan bir diğer tirozin kinaz olan JAK2 inhibitörü ruxolitinib maddesinin kullanılması sonucu Ph+ ve kontrol hücre hatları üzerinde meydana gelen sitotoksik, apoptotik ve otofajik etkilerin karşılaştırılarak araştırılması planlanmıştır. Ayrıca ruxolitinibin hücrelerin apoptotik ve otofajik yollar ile lösemi oluşumu ile ilişkilendirilmiş genlerinin ekspresyon seviyelerindeki farklılaşmaların belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmanın sonucunda KML' nin moleküler yapısının ve tedavi alanında ruxolitinibin kullanılabilirliğinin daha iyi aydınlatılması hedeflenmektedir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser Tanımı ve Tarihçesi

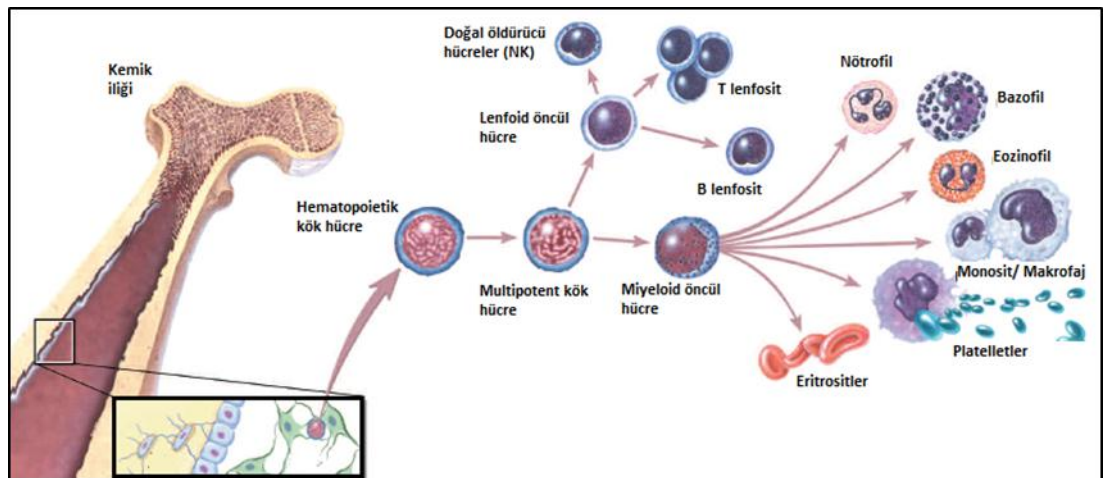
Kanser günümüz dünyasında ölüme neden olan etmenlerin en başında yer almaktadır. Dünya çapında her yıl on dört milyondan fazla kişinin kansere yakalandığı, sekiz milyondan fazla kişinin ise kanser nedeniyle hayatını kaybettiği raporlanmıştır (1). Kanser, çok hücreli gelişmiş organizmalarda görülen, normal hücresel programda bulunan hücre bölünmesini ve farklılaşmasını kontrol eden çok sayıdaki genin ekspresyonundaki değişiklikler ile karakterize bir grup hastalığa verilen isimdir (2). Normal hücre proliferasyonu ve farklılaşması nükleusta bulunan DNA üzerindeki temelde iki gruba ayrılan genlerin kontrolü altında tutulmaktadır. Her insanda bulunan bu gen grupları bölünmeyi teşvik eden proteinlerin kodlanmasını sağlayan proto-onkogenler ve bölünmeyi baskılayan proteinleri kodlayan tümör baskılayıcılardır. Bu iki grubun dengeli ve kontrollü çalışması sonucunda hücresel süreçler normal şekilde ilerler, hücre bölünme ve farklılaşmayı doğru zamanda gerçekleştirir (3). Çeşitli etmenler nedeniyle proto-onkogenlerde mutasyonların meydana gelmesiyle anormal fonksiyon gösteren onkogenler oluşmaktadır. Bunun yanı sıra yine çeşitli mutasyonlar nedeniyle tümör baskılayıcı genlerde fonksiyon kaybı meydana gelmektedir. Bunun sonucunda tümör baskılayıcılar ve proto-onkogenler arasındaki denge anormal ve kontrolsüz bölünme ve farklılaşma oluşturacak şekilde değişmektedir. Bu değişim hücre replikasyonu ve ölümü arasındaki dengeyi, tümörlü bir popülasyon oluşumuna neden olacak yönde bozmaktadır. Tümörler benign ve malign olarak iki ana grup altında sınıflandırılmaktadır. Kanser olarak adlandırılan ve tedavi edilmezse ölüme sonuçlanan malign tümörler, lenf nodlarına ulaşarak vücudun diğer bölgelerini metastaz yoluyla istila edebilme özellikleri ile benign tümörlerden ayrılmaktadır (4). Klinikte kanserler birçok farklı fenotipik karakteristiğe sahip farklı hastalıklar olarak görünmektedir. Karsinogenez olarak adlandırılan kanser gelişim sürecinde meydana gelen genetik değişiklikler hücre antijenliği, invazivlik, metastatik potansiyel, hücre proliferasyonu oranı, farklılaşma durumları ve kemoterapötik ajanlara verilen yanıtta farklılığı sağlayan bu hücresel heterojeniteye neden olmaktadır. Moleküler düzeyde tüm kanserlerin ortak özelliklere sahip olması, malign transformasyona neden olan gen okumasındaki değişimlerin henüz kesin olarak tanımlanamamış ortak süreçlerle meydana geldiğini göstermektedir (5).

Kanser, tarihi neredeyse insanlık kadar eski olan bir hastalıktır. Tümörlerle ilgili ilk bilgilere; Mısır papirüsleri, Babil tabletleri, Hint yazmaları ve Antik Yunan'a ait kalıntılar aracılığıyla ulaşılabilmektedir. Kanser terimini ilk defa Hipokrat, milattan önce dördüncü yüzyılda, vücut yüzeyinde fizyolojik açıdan farklı özellikteki yavaş büyüyen, ülserli, kırmızı, sert malign şişlikleri tanımlamak için kullanmış, epitelyal kökenli bu tümörleri “karkinos” ya da “karkinoma” olarak adlandırmıştır. Galen milattan sonra ikinci yüzyılda, yengece benzer görünüşleri nedeniyle bu yapılara “kanser” adını vermiştir (6). On altıncı yüzyılda Ambroise Paré, malign tümörlerin tanımını yapmış ve meme kanserini keşfetmiş, on yedinci yüzyılda Morgani pek çok kanser türünü tanımlamış ve “primer”, “sekonder” tümör kavramlarını ortaya koymuştur. On dokuzuncu yüzyılda Ribbert ve Virchow tarafından tümörler, dejenerasyona uğramış hücrelerin kontrolsüz çoğalması sonucunda farklılaşarak yeni hücre grupları oluşturması olarak tanımlanmıştır. Yirminci yüzyılın başında Borrel tarafından kanserin kökeninin virüsler olabileceği fikri, aynı yüzyılın ortasında ise Stanley tarafından her insanda kanser virüsünün mevcut olduğu ama bu virüsün hormonlar, radyasyon, kimyasallar ve

diyete bağı olarak aktive edilmesiyle kanserin meydana geleceğı fikri öne sürülmüştür. Yirminci yüzyılın ortasında Warburg, kanserlerin kökeninin metabolik bozukluklar olduğunu belirtmiştir. Daha sonraki dönemlerde “Warburg Etkisi” olarak adlandırılan bu durum; kanser hücrelerinin enerji üretimi için sağlıklı hücrelerin mitokondrilerindeki pirüvat oksidasyonu yerine, sitosoldeki laktik asit fermentasyonunu takip eden glikolizi kullanarak hızlı gelişimleri için gereken yüksek miktardaki enerjiyi sağlayabildiğini tanımlamaktadır (7). Maude Slye ise aynı dönemde kanser gelişiminde genetik faktörlerin etkisini ortaya koymuştur. Ayrıca yine yirminci yüzyılın ortalarında yapılan çeşitli araştırmalar kanserin alışkanlıklara bağı olarak ortaya çıkan çevresel etmenlere de bağı olduğunu ve değişik toplumlarda değişik etmenlere maruz kalınması sonucunda farklı tür kanserlerin ortaya çıktığını göstermiştir. Yaşla birlikte kanser sıklığının artması ise kanserin birikmiş mutasyonlar ve dejenerasyonlar sonucu meydana geldiğini kanıtlamaktadır (8).

2.2. Hematopoiez, Hematopoietik Kök Hücre ve Kanın Şekli Elemanları

Kan ve hücrelerinden oluşan sistem hematopoietik sistem olarak adlandırılmaktadır. Hematopoiez temel olarak kemik iliğinde; ihtiyaç halinde ise dalak, timüs ve karaciğerde de gerçekleşen, hematopoietik kök hücreden (HKH) yeni HKH’ nin ya da daha fazla özelleşerek farklılaşma özelliğı sınırlanmış diğer kan hücrelerinin üretildiğı sürekli devam eden sürece verilen addır. HKH, kanın tüm hücrelerine farklılaşma yeteneğıne sahip, kendini yenileme ve multipotensi özellikleriyle karakteristik kan hücreleridir (9). HKH’ den meydana gelen lenfoid ve miyeloid öncül hücreler (progenitör hücreler) ortamda bulunan interlökin-3, trombopoietin ve eritropoietin gibi büyüme faktörleri ve koloni uyarıcı faktörlerin kontrolü doğrultusunda kırmızı kan hücrelerini (eritrositler), beyaz kan hücrelerini (lökositler) ve plateletleri (trombositler) meydana getirmektedir (Şekil 1). Kan hücrelerinin farklılaşma ve olgunlaşma süreci büyük oranda kemik iliğinde gerçekleşmekle birlikte bazı hücreler olgunlaşmalarını timüs, dalak, lenf nodları ve bademciklerde de tamamlayabilmektedir (10).



Şekil 1: Kanın hücresel elemanları (11)

Eritrositler, nükleusu olmayan, bikonkav şekilli, oksijen ve karbondioksit taşınımında görevli demir bakımından zengin hemoglobin proteinini içeren hücrelerdir (11). Lökositler vücudun savunmasında görev alan nötrofil, monosit, lenfosit, eozinofil ve bazofil hücrelerini içeren gruptur. Sitoplazmasında granüller taşıyan nötrofil, bazofil ve eozinofili içeren savunma hücreleri granülositler olarak adlandırılmaktadır. Nötrofiller bakteri ve virüs enfeksiyonlarında görev alan çok loblu nükleusa sahip hücrelerdir. Eozinofiller taşıdıkları anti-histaminle alerjik durumlarda ya da parazit enfeksiyonlarında görevli iki loblu çekirdeğe sahip hücrelerdir. Bazofiller granüllerinde histamin, heparin, hiyaluronik asit taşıyan ve alerjik reaksiyonlara karşı histamin salgılayan ayrıca mast hücrelerinin kökenini oluşturan kan hücreleridir. Lösemi gibi miyeloproliferatif hastalıklarda sayıları dikkat çekici biçimde artmaktadır. Mononükleer hücreler ise antijenlerle savaşan monositler ve lenfositleri içermektedir. Monositler diğer hücelere göre daha büyük yapıda tek loblu nükleusa sahip hücrelerdir, çeşitli dokulara girerek ölü hücreleri ve patojenleri fagosite etme yeteneğine sahip makrofajları oluştururlar. Kanda bulunan lökositlerin yarısını oluşturan ve immün yanıtın oluşmasından sorumlu hücre grubu ise B, T ve doğal öldürücü (NK) hücrelerden oluşan lenfositlerdir. T lenfositleri hücresel bağışıklık oluşumundan ve B hücrelerinin aktivasyonundan; B hücreleri antikor üreterek humoral bağışıklığın sağlanmasından; doğal öldürücü hücreler ise virüsler tarafından enfekte edilmiş ya da kanserli hücelere karşı savunma geliştirilmesinden yani doğal bağışıklıktan sorumludur. Megakaryositlerden meydana gelen platletler ise pıhtılaşmayı sağlamakla görevlidir (12,13).

2.3. Lösemi Tanımı ve Tarihçesi

Lösemi tek bir hematopoietik kök hücrenin mutasyonundan köken alan, kan ve kemik iliğindeki lökositlerin kontrolsüz şekilde çoğalması sonucu olgunlaşmamış ya da fonksiyon kaybı taşıyan hücrelerin anormal birikimiyle oluşan, sirküler bir kanserdir (14). Hastalık anormal kan hücrelerinin çoğalmasıyla normal oksijen taşıma ve vücudu savunma işlevlerinin bozulmasına ve buna bağlı semptomların ortaya çıkmasına neden olmaktadır (15).

Lösemi gözle görülebilir, somut olarak fark edilebilir ya da X-ray gibi bir yöntemle görüntülenebilir herhangi bir tümör kitlesi oluşturmadığından keşfedilmesi diğer kanser türlerine göre daha geç olmuştur. Bin sekiz yüz yirmi yedi yılında Fransız doktor Alfred Velpeau yüksek ateş ve halsizlik sonucu hayatını kaybeden bir hastaya yaptığı otopsi sırasında ölünün kanının soluk renkli, az miktarda ve irin benzeri keseciklerle dolu olduğunu ayrıca dalağının normale göre yirmi kat daha büyük olduğunu fark etmiş, bin sekiz yüz kırk beş yılında İskoç doktor John Bennet bu kesecikleri mikroskop altında incelediğinde keseciklerin aslında çok sayıda lökositin oluşturduğu topluluklar olduğunu keşfetmiştir. Aynı yıl Alman doktor Rudolph Virchow bu hastalığa, beyaz kan adını vermiş ve ilerleyen yıllarda hastalık Yunancada aynı anlama gelen lösemi adını almıştır (16). Bin dokuz yüz altmış yılında Nowel ve Hungerford tarafından Ph' nun keşfedilmesi ile kronik miyeloid lösemi kromozomal bir anomali ile ilişkilendirilmiş ilk neoplazi olmuştur (Şekil 2). Bin dokuz yüz yetmiş üç yılında t(9;22) translokasyonu, bin dokuz yüz seksen beş yılında ise bu translokasyon sonucu oluşan BCR-ABL füzyon proteini, sahip olduğu tirozin kinaz aktivitesi ve lökomogenezdeki rolünün keşfedilmesinin ardından kullanılmaya başlayan tirozin kinaz inhibitörleri tedavinin etkin birer parçası olmuştur (17).



Şekil 2: Philadelphia kromozomu karyotipi (17)

2.4. Lösemi Oluşturan Risk Faktörleri, Belirtileri, Tanısı, İnsidansı ve Sağkalım Oranları

Lösemi oluşumuna neden olan faktörler kesin olarak anlaşılmamış olmakla birlikte, radyasyona maruz kalmak, genetik ve konjenital etmenler, mutajen kimyasallar ya da virüs enfeksiyonları gibi etmenlerin hastalığın oluşum riskini arttırdığı belirlenmiştir. X ve gama ışınlarını, mikro dalgaları içeren radyasyon, sahip olduğu yüksek enerji ile hücrelere zarar vermektedir. X ışınlarına maruz kalan çocuklarda lösemi gelişiminin iki kat arttığı çalışmalarla gösterilmiştir. Genetik faktörlerin ve çeşitli konjenital anomalilerin lösemi oluşumunda büyük öneme sahip olduğu belirlenmiştir. Down sendromu, Bloom sendromu, Fanconi anemisi, nörofibromatozisli hastaların akut lösemi geliştirme insidansının fazla olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Pre-lösemi olarak da nitelendirilen miyelodisplastik sendroma sahip hastalarda da lösemi geliştirme sıklığı oldukça yüksektir. Kemik iliği hücrelerinde çevresel etmenler nedeniyle konjenital olmayan kromozomal anomalilerin oluşumu da lösemiye neden olmaktadır. Benzen ve diğer aromatik hidrokarbonlar gibi kimyasalların, herbisit ve pestisitlerin hatta bazı kanserlerin tedavisinde kullanılan alkilleyici ajanların lösemi oluşumuna neden olduğu bilinmektedir. Yetişkin T- lenfositik lösemiye neden olan insan T- lenfotrofik virüs tip I gibi retrovirüsler de lösemi oluşumuna neden olan etmenler arasında yer almaktadır (14, 16).

Lösemi hastalarında fonksiyon kaybı bulunan ya da anormal fonksiyon kazanmış lösemi hücrelerinin eritrositlere yer bırakmaması nedeniyle anemi gelişimi ve buna bağlı olarak soluk görünme, oksijen taşınmasının yetersiz olmasına bağlı olarak çabuk yorulma, plateletlerin azalmasına bağlı olarak çabuk kanama, pıhtılaşma sorunları ve ciltte kolay morarma, lökositlerin fonksiyon kaybına bağlı olarak savunma sisteminin zayıflaması ve kolay enfeksiyon kapma, dolaşımda fazla sayıda anormal lökositin bulunmasına bağlı olarak lenf nodu, dalak, karaciğer gibi organlarda büyüme görülmektedir (18).

Lösemi tanısında fiziksel belirtilerden yola çıkılarak, kan sayım testleri, kemik iliği aspirasyonu ya da biyopsisi ile elde edilen örneklerin boyanması, immünofenotiplenmesi ve konvansiyonel sitogenetik analizler ve floresan in situ hibridizasyon (FISH), gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi moleküler analizleri içeren genetik testler uygulanmakta, klinik bulguları tamamlayan yüksek güvenilirlikte sonuçlar elde edilmektedir (19).

İki bin on iki yılında dünya çapında yaklaşık üç yüz elli bin kişiye lösemi tanısı konduğu ve iki yüz altmış beş bin kişinin lösemi nedeniyle hayatını kaybettiği belirtilmiştir (1). Erkeklerde görülme sıklığı kadınlara göre daha fazladır. Median yaşı 66'dır ve yetişkinlerde görülme sıklığı çocuklara göre 10 kat fazladır. Bununla birlikte çocukluk çağında en yaygın olarak görülen kanser tipidir. Lösemi hastalarının beş yıllık sağkalım oranları etkin herhangi bir kemoterapi uygulamasının

olmadığı yirminci yüzyılın ortasından bu yana dramatik şekilde artış göstermiştir. Kullanılan kemoterapötik ilaçlar ve kemik iliği transplantasyonu ile beş yaşın altındaki lösemili çocuklarda sağkalım oranı % 90'ın üzerinde bulunmaktadır (14-16).

2.5. Lökomogenezde Rol Alan Genler

Lösemi oluşumunda APAF1, CADM1, CDH1, CDH13, CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2B, DAPK1, DKK3, DLC1, EGR3, HIC1, JUNB, MEIS1, MLH1, NPM1, PTEN, SFRP2, SFRP4, SFRP5, SOCS1, TP53, WIF1 genleri normal durumlarından farklı olarak metillenmiş promotor bölgeleri olarak rol oynarlar. BCR-ABL yolağında bulunan ABL1, BCR, GRB2, JAK2, SHC1, STAT3, STAT5A, STAT5B ve JAK-STAT sinyalleşmesinde yer alan AKT1, CSF3, IFNA1, IL4, IL6, JAK2, STAT1, STAT3, STAT5A, STAT5B, SOCS1 genleri lösemi oluşumunda önemli yere sahiptir. Normal kan hücrelerinin oluşum sürecinde yer alan hematopoiezden sorumlu BCL2, CSF3, CTNNB1, IL4, JAK2, LMO2, PML, RUNX1, STAT5A, STAT5B, TAL1, TP53 genleri, miyeloid hücre farklılaşmasında görevli CTNNB1, FOXO3, IL4, JUN, LMO2, RUNX1, SPI1, STAT5A, STAT5B, TAL1 ve lenfosit proliferasyonu ve farklılaşmasında rol oynayan BCL2, CSF3, CTNNB1, IL4, IL6, STAT5A, STAT5B genlerinin düzensizlikleri anormal hücre oluşumuna neden olmaları nedeniyle lösemiyle ilişkili bulunmuştur. Ayrıca immün sistem gelişiminde görevli BCL2, CSF3, CTNNB1, IL4, JAK2, LMO2, MLH1, PML, RUNX1, STAT5A, STAT5B, TAL1, TLX1, TP53, sitokin ve kemokinler ile ilişkili CCL3, CSF3, CXCL10, IFNA1, IL1R1, IL4, IL6, IL8, IL10, IL12 genleri de lösemi oluşumuyla ilişkilidir. BAALC, BMPR1B, BTG3, CD34, CDC42EP3, CTGF, GAS2L3, MN1, NR4A3, RGS12 genleri lösemi hücrelerinin malignant özellikleri ile CEBPB, GATA1, IKZF3, JUN, LMO1, LMO2, LYL1, MEIS1, NFKB1, RUNX1, RUNX2, RUNX3, SPI1, STAT1, STAT3, STAT5A, TAL1, TLX1, TLX3 genleri de lösemi kök hücresi ile ilişkilidir. Güncel lösemi tedavi hedefleri ise AKT1, ALOX5, BCL2, CTNNB1, FGR, FOXO3, HCK, HDAC1, HSP90AA1, IFNA1, JAK2, MCL1, MERTK, MTOR, PML, PRKCB, RAC2, SMO genlerini içermektedir (20).

2.6. Lösemilerin Sınıflandırılması

Lösemiler köken aldıkları hücre tipine göre miyeloid ve lenfoid lösemiler olarak, ortaya çıkış şekline bağlı olarak olgunlaşmamış blast hücrelerin çoğunlukta olduğu akut ve daha çok olgun hücrelerin baskın olduğu, yavaş progresyon gösteren kronik lösemiler olarak alt gruplara ayrılmaktadır (14).

2.6.1. Akut Lösemiler

Hücre farklılaşması hücrenin çok erken dönemi olan blast evresinde kesintiye uğradığından olgunlaşmamış blastlar çoğunluktadır. Bunun sonucunda olgunlaşmamış, fonksiyonel olmayan blastlar kemikte ve daha az oranda da kanda birikmeye başlar. Akut lösemiler ani ve yoğun belirtilerle ortaya çıkmakta ve tedavi edilmediğinde yüksek hızla ölüme neden olmaktadır. Akut lösemilerin erken belirtileri benzerdir ve genellikle genel enfeksiyon hastalıklarının belirtileriyle karıştırılmaktadır. Ateş ve gribe benzer semptomlar hastalığın sıklıkla ilk belirtisidir. Kemik iliğinde çoğalan blastlar sağlıklı hücrelerin oluşumunu olumsuz etkileyecek şekilde kana karışır ve yaşamsal organları istila eder. Akut lösemilerin belirtilerinin çoğu sağlıklı kan hücrelerinin sayısının azalmasından kaynaklanır. Kırmızı kan hücrelerinin azalması sonucu halsizlik, solukluk, baş ağrısı ve

baş dönmesi gibi semptomlar meydana gelmektedir. Plakette azalması kolay morarma ve kanamalara neden olmaktadır. Sağlıklı beyaz kan hücrelerinin azalması ise virüs, bakteri ve fungus enfeksiyonlarına karşı savunmasız hale getirmektedir. Diğer semptomlar lösemi hücrelerinin kendisinden kaynaklanmaktadır. Blastların özellikle lenf nodları, dalak, karaciğer gibi organları istila etmesi ağrı ve organomegaliye neden olmaktadır. Eklem ve kemik ağrısı da görülmektedir. Lösemi hücreleri merkezi sinir sistemini de etkileyerek baş ağrısı, bulanık görme gibi semptomlar oluşturmaktadır (21, 22).

2.6.1.1. Akut Lenfositik Lösemi

Olgun olmayan lenfoblastlarla başlayan hastalık, etkilenen lenfoblast türüne göre B- hücreli ya da T- hücreli akut lenfoblastik lösemi olarak sınıflandırılmaktadır. IL-1, IL-6, TNF ekspresyonlarının artışı ile birlikte t(9;22), t(1;19), t(12;21), t(8;14), t(8;22), t(2;8), t(5;14), t(7;19), t(7;10), t(4;11), t(10;11) translokasyonları genetik olarak sıklıkla görülen anomalilerdir (22).

2.6.1.2. Akut Miyeloid Lösemi

Olgun olmayan miyeloid hücrelerle (miyelositlerle) başlamaktadır. Lenfositik olmayan hücreleri etkilediğinden aynı zamanda, akut non- lenfositik lösemi olarak da adlandırılmaktadır. t(8;21), t(15;17), inv(16), del(11q), t(9;11), t(11;19), t(1;22) sitogenetik olarak sıklıkla görülen anomalilerdir (21).

2.6.2. Kronik Lösemiler

Kronik lösemide çok sayıda olgun lökosit üretilmektedir. Hastalığın erken dönemlerinde hücreler normal işlevlerini yerine getirebilmektedir ancak uzun dönemde hücreler ya fonksiyon kaybı yaşamakta ya da anormal fonksiyon kazanmaktadır. Kronik lösemiler uzun süre boyunca herhangi bir semptom göstermeden yavaş ilerlediklerinden tespit edilmeleri zaman almaktadır (18,19).

2.6.2.1. Kronik Lenfositik Lösemi

Kronik lenfositik lösemi vakalarının % 95' i neoplastik monoklonal B lenfositlerin, geri kalan % 5' i T lenfositlerin periferik kanda ve lenfoid dokularda birikmesinden kaynaklanmaktadır. Hastaların % 25' i herhangi bir semptom göstermemekte, başka bir şikayet sonucu alınmış olan kan testinin sonucuyla ya da splenomegali gelişimi ile tanı almaktadır. Hastalarda yorgunluk, gece terlemesi, iştah kaybı, ateş görülmekle birlikte, anemi, trombositopeni, genişlemiş lenf nodları ve büyümüş dalak hastalığın semptomlarından. Hücreler yüzeylerinde CD19, CD5, CD23 antijenlerini bulundurmaktadır. Trizomi12, del(13)(q14.3), t(11;14), t(14;19), t(2;14) sitogenetik olarak sıklıkla görülen anomalilerdir (23).

2.6.2.2. Kronik Miyeloid Lösemi

Başlangıcı, normal gelişim sürecini tamamladığında granülositleri meydana getirecek olan olgunlaşmamış miyeloid hücrelere dayandığından kronik granülositik lösemi olarak da adlandırılmaktadır. Kronik miyelojenik lösemi olarak da adlandırılabilen KML, BCR-ABL pozitif klonal bir hastalıktır. WHO' nun miyeloid malignansilere ait yaptığı son düzenlemede kronik miyeloproliferatif neoplazmlar (MPN) grubuna giren KML' de başlangıçta normal fonksiyonlarını koruyan granülositler çoğalarak zaman içinde temel fonksiyonlarını kaybetmekte, hastalığın ilerleyen

dönemlerinde kemik iliği ve kanda çok sayıda bulunan blastları meydana getirmektedir (Tablo 1) (24, 25).

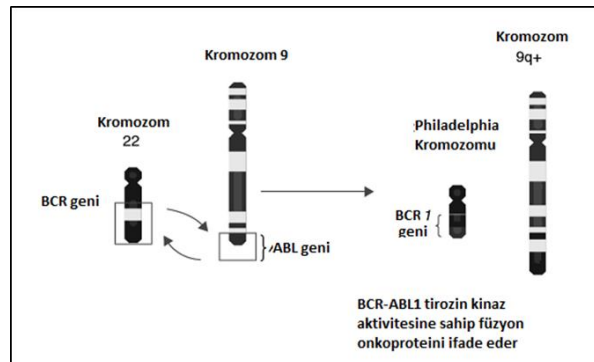
Tablo 1: WHO sınıflandırmasına göre kronik miyeloid neoplazmlar (25)

<i>Kronik miyeloid neoplazmlar</i>
*Kronik miyeloid lösemi, BCR-ABL pozitif
*Kronik nötrofilik lösemi
* Polistemia Vera (PV)
* Primer Miyelofibrozis (P-MF)
* Esansiyel Trombostemia (ET)
* Kronik eozinofilik lösemi
* Mastositoz

KML' nin hematopoietik kök hücrenin sonradan kazandığı genetik bozukluklar yoluyla olduğu düşünülmektedir. Hastaların büyük çoğunluğunda kromozom 9 ve 22 arasında meydana gelen dengeli t(9;22) (q34;q11.2) translokasyonu sonucu oluşan 22q- ya da Ph bulunmaktadır. Translokasyon sonucu oluşan füzyon BCR-ABL1 tirozin kinazı, KML patolojisinden sorumlu onkojenik protein p210 ile ilişkilidir. Hastaların % 90' ında görülen erken dönem belirtileri, yorgunluk, kilo kaybı, büyümüş dalaktır. Baş ağrısı, terleme, kemik ağrısı, ateş ve platelet azalmasına bağlı olarak kanama gibi belirtiler görülse de hastaların çoğu tanı aldığında herhangi bir semptom göstermemektedirler (24-26).

2.6.2.2.1. Kronik Miyeloid Lösemi Moleküler Biyolojisi

KML, resiprokal t(9;22) (q34;q11.2) translokasyonu sonucu meydana gelen Ph, BCR-ABL1 füzyon geninin varlığı (BCR-ABL1) ve bu genin bulunmasına bağlı olarak artmış tirozin kinaz aktivitesi ile tanımlanan HKH' nin klonal bir hastalığıdır (Şekil 3) (27).

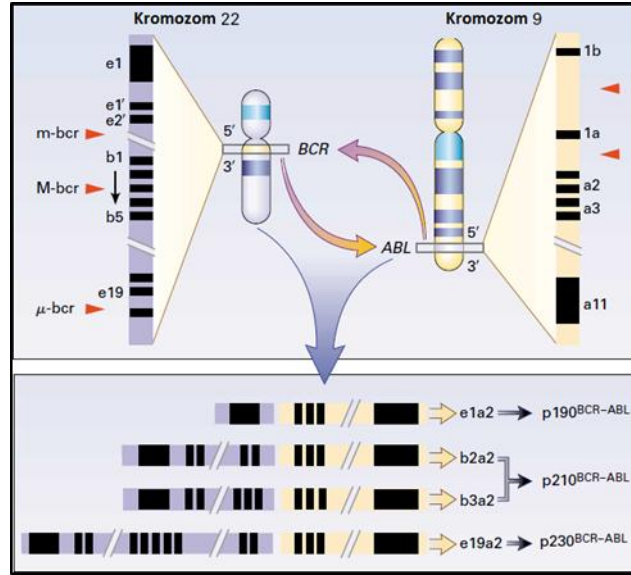


Şekil 3: t(9;22) translokasyonu sonucu oluşan Ph kromozomu (26)

Ph kromozomu tüm KML hastalarında ve hastalığın tüm fazlarında bulunmaktadır (28). Ayrıca derivatif 9. kromozom üzerinde progresyonla ilişkilendirilmiş kısmi delesyonlar da %15 oranında bulunmaktadır. KML hastalarının ve KML'ye ait hücre hatlarının genomlarının taranması ile elde edilen veriler KML'de genom çapında "klonal evrim" olarak adlandırılan büyük dengesizliklerin bulunduğunu özellikle 1p36, 5q21, 9p21 ve 9q34' de meydana gelen kayıpların ve 1q, 8q24, 9q34, 16p ve 22q11'de meydana gelen artışların yanısıra derivatif 8., 9., 21. kromozom, çift Ph kromozomu ve i(17)(q)' nun KML profilinde sıklıkla görüldüğünü göstermektedir. İlerlemiş hastalıkla sitokinler, alternatif RAS yolları, hücre adezyonunu düzenleyen genler ve JUNB, FOS, PRAME, MXF1 ve EF1 gibi genler ilişkilendirilmiştir (29).

BCR-ABL1 Onkogeni

ABL1 içindeki kesim noktaları, genellikle ekzon 1b ve 1a arasında olmakla birlikte ekzon 1b'nin yukarı-akış ve ekzon 1a'nın aşağı-akış bölgelerinde bulunmaktadır. KML hastalarının çoğunda BCR içerisindeki kırılma noktalarını taşıyan, ekzon e12-e16 bölgelerini kapsayan 5.8-kilobazlık alana "major breakpoint cluster region" (M-bcr) adı verilmektedir. Alternatif kesim ile b2a2 veya b3a2 birleşmeleri sonucu 210-kDa'luk bir füzyon transkripti ($p^{210BCR-ABL1}$) meydana getirilmektedir. Ph+ B-ALL hastalarının üçte ikisinde ve KML' de nadir durumlarda BCR kırılma noktası $p^{190BCR-ABL1}$ proteinini kodlayan e1a2 transkriptini oluşturacak şekilde ekzon e2' ve e2 arasındaki 54.4kb' lık "minor breakpoint cluster region" ya da m-bcr olarak adlandırılan alana lokalizedir (Şekil 4) (30).

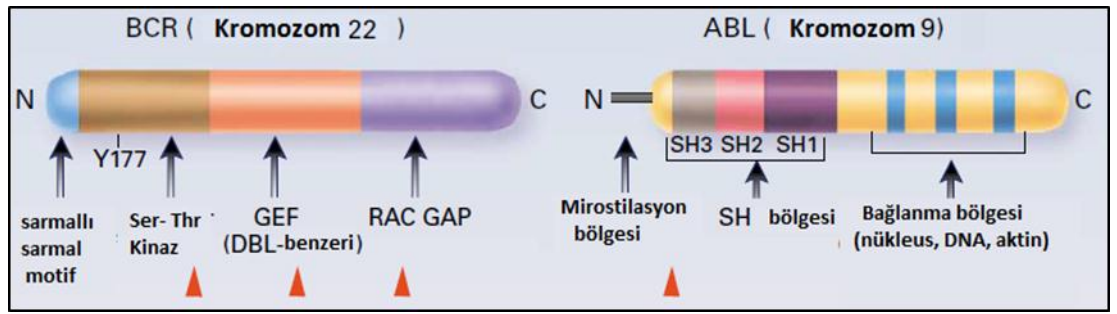


Şekil 4: BCR-ABL1 kinazını oluşturan kesim noktaları (30)

BCR-ABL1 Füzyon Proteini ve Düzenlenmesi

BCR-ABL1 kinaz fonksiyonel olarak farklı bir dizi alt birim içerir. BCR-ABL1'nin N ucu, birinci ekzonun alternatif kesimi ile üretilen 1a ve 1b olarak adlandırılan 2 farklı izoform halinde mevcut olan "kap" bölgesinden oluşur. Miristoillenmemiş olan tip 1a'ya göre, kovalent olarak N

terminine bağlanmış bir C14 miristoillenmiş bölge içeren ABL 1b daha yüksek seviyelerde ifade edilir. ABL1 ayrıca yüksek ölçüde korunmuş bir Src homoloji alan-2 (SH2) ve SH3 öncesinde bir tirozin kinaz alanı da içerir. Son ekzon bölgesi SH3 alanı için bağlanma bölgesi oluşturan 4 tane prolin-zengin SH3 motifi içerir. Bunlar; Crk, GRB2, Nck 13, 14a bölgeleri adaptör proteinleri gibi DNA-bağlama bölgesi, bir aktin bağlanma bölgesi, çevresel uyarılara yanıt olarak ABL1'in hücrel lokalizasyonunu belirleyen 3 nükleer lokalizasyon sinyali ve 1 nükleer eksport sinylidir. BCR ayrıca bir sarmallı-sarmal oligomerizasyon alanı, bir serin treonin kinaz alanı, bir Dbp/CDC24 guanin nükleotit değiştirici faktör homoloji alanı, bir kalsiyum bağımlı bağlanma bölgesi ve bir Ras-ilişkili C3 botulinum toksin substrat guanozin trifosfat aktive edici protein alanı içeren üç boyutlu yapı gösterir (Şekil 5) (31, 32).

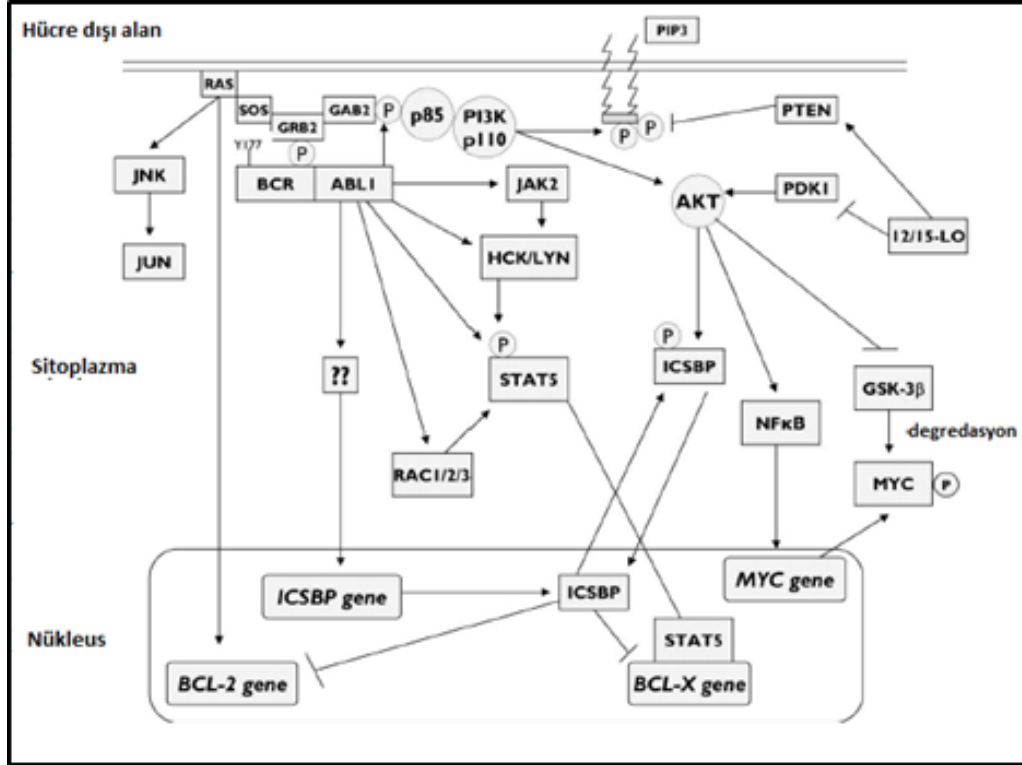


Şekil 5: BCR- ABL1 kinazının fonksiyonel bölgeleri (32)

BCR'de bulunan Tyr177 kendi SH2 alanı aracılığıyla GRB2, GRB10, 14-3-3 ve ABL1 proteinleri için yerleştirme bölgesi olarak işlev görür. ABL1b N-uç segmentinin en ucundaki miristoil modifikasyon, ABL1 katalitik alanının C-uç lobunu SRC' nin inaktif yapısına benzer bir şekilde, SH2 ve SH3 alanlarının kinaz alanı üzerine yerleşmesini kolaylaştıracak şekilde bir arada tutar. ABL1b bulunmayan miristoil grubu biçimleri yapıcı tirozin kinaz aktivitesi gösterir. ABL1a içindeki yapısal öğeler, kesin olarak bilinmeyen bir şekilde ABL1b'in miristoil grubunun fonksiyonunun yerini alabilir. Kinaz alanının inaktif konformasyonunda, kinazın N-terminal lobundaki önemli alfa heliks içten içe aktif bölgenin yerini alır, SH2 alan kalıntıları kinazın C-lobuna sıkı şekilde bağlanarak korunmuş Lys271 ve Glu286 rezidüleri arasında iyon çifti oluşturur. Bu konformasyonda, alfa C heliksin rotasyonu önemli katalitik rezidülerin aktif bölge dışına doğru yer değiştirmesiyle böylece ATP ve peptit substratların aktif bölgeye ulaşmasının zayıflamasıyla sonuçlanır. Ancak, ABL1 'in son ekzon bölgesi in vitroda SH3-alan-bağımlı-otoinhibisyon için olmazsa olmaz değildir. Sarmallı sarmal alanı (BCR30-65) içeren BCR-ABL1 (1-72 veya BCR1-72 rezidüleri) oligomerizasyon alanının X-ışını kristal yapı analizi göstermiştir ki, bir anti-paralel dimerde 2 monomer ortak bir tetramer oluşturulması için ilişki kurmaktadır. Kinaz aktivitesi, katalitik bölgenin aktivasyon döngüsünde tirozin rezidülerinin fosforilasyonu ve BCR-ABL1'in lökomogenetik potansiyeli oligomerizasyonu bozacak şekilde, sarmallı sarmal alanın mutasyonlarıyla dikkat çekici ölçüde bozulmaktadır (31, 32).

BCR-ABL1 Füzyon Proteinine Bağlı Sinyalleşme Yolakları

BCR-ABL1 füzyon tirozin kinazının oluşumu kronik miyeloid lösemi patofizyolojisi için zorunlu olan birçok sinyalleşme yolağının aktivasyonunda görevlidir (Şekil 6) (31).



Şekil 6: BCL-ABL1 füzyonunun etkilediği sinyal yolakları (31)

BCR Tyr177 fosforilasyonu BCR-ABL1 aracılı lökomogenez için zorunludur (31). Tyr177'yi fenilalanine dönüştüren mutasyon (Tyr177Phe), GRB2 bağlanmasını engelleyerek BCR-ABL1 aracılı RAS aktivasyonunu önler (31, 33). Bu nedenle, BCR-ABL1-Tyr177Phe mutasyonu sonucu ABL1 kinaz aktivitesi korunmasına rağmen primer kemik iliği dönüşümü bozulmaktadır (31, 33). Tyr177, sırayla SOS toplanmasını sağlayan GRB2'nin SH alanı için yüksek afiniteli bağlanma bölgesi olarak görev aldığından RAS ve GAB2 aktivasyonu gerçekleşir (31, 34). Böylece KML hücrelerinde GRB2/GAB2 kompleksi BCR-ABL-indüklü GAB2 fosforilasyonuna aracılık eder ve bu da PI3K/AKT ve ERK'in yapısal aktivasyonuna neden olur. BCR-ABL1, SRC ailesi kinazları (SFKs) olan HCK, LYN ve FGR'yi de fosforiller. Fosforile HCK, gen transkripsiyonuna aracılık eden ve hücre döngüsünün G1'den S fazına geçişini sağlayan siklin D1'i yukarı-regüle eden STAT5'i çağırır. (31, 35, 36). JUN, miyeloid hücrelerde tümör süpressör olarak fonksiyon gören aktivatör protein 1 ailesi transkripsiyon faktörlerinin bileşenidir, RAS'a antagonistik sinyal yolağı JNK böylece hücre çoğalması ve hayatta kalmasını engellemektedir (37). Guanozin trifosfat (GTPases) olan RAC alt familyası RAC1, RAC2 ve RAC3'ü kapsar ve çoklu hücre fonksiyonlarını yönetir. RAC GTPaz'ları

primer KML hücrelerinde aktif haldedir. BCR-ABL1 sinyalleşme ağının büyük ölçüde RAC GTPazlarına bağlı olduğu bilinmektedir (31, 38).

BCR-ABL ifade eden hücrelerde SCH gibi adaptör proteinler, paksilin ve tensin gibi sitoskeletal proteinler, STAT5 gibi transkripsiyon faktörleri, FES ve HCK gibi diğer tirozin kinazlar ve BCL-ABL'in kendisinin de içinde bulunduğu çok sayıda protein tirozin fosforiledir. Otofosforilasyon BCR-ABL'de sırasıyla PI3K regülatör alt birimlerinden olan GAB2 ve p85 moleküllerinin toplanmasını sağlayan GRB2, CrkL gibi adaptör proteinlerin bağlanabileceği yerleştirme bölgeleri oluşturur. Bazı durumlarda BCR-ABL ve çeşitli proteinler arasında hem doğrudan hem de dolaylı ilişkiler bir arada bulunmaktadır. Temel olarak bir fosfotirozine bağlı etkileşimlerle bir arada bulunan multimerik sinyalleşme kompleksinin şekillenmesi ve devamlılığı BCR-ABL kinaz aktivitesi ile meydana gelmektedir. Bu kompleksle meydana gelen sinyalleşme çıktıları MAPK ve PI3K/AKT/mTOR yollarını da içeren pek çok yolağı aktive eder. Ayrıca BCR-ABL kinaz aktivitesinin DNA tamir mekanizmasını etkilediği ve çeşitli mekanizmalarla genomik kararsızlığı arttırdığı yönünde de kanıtlar bulunmaktadır. BCR-ABL tarafından yönetilen bu kompleks sinyal iletim ağının moleküler mekanizmasının aydınlatılmasıyla bazıları kliniğe yansımış bulunan bir çok tedavi hedefi ortaya çıkmaktadır (39).

2.6.2.2.2. Kronik Miyeloid Löseminin Evreleri

Kronik Faz

Hastalığın tanısının konduğu aylar ya da yıllar süren ve genellikle semptomların görülmediği, blast sayısının %10' dan az bulunduğu fazı oluşturmaktadır. Lökosit sayısı mikrolitrede 100.000' e, fonksiyon bozukluğuna sahip trombosit sayısı ise mikrolitrede 1.000.000'a yükselmiş durumdadır (14, 19, 18, 26).

Akselere Faz

Akselere faz, lökositoz sayısında artış, trombositopeni, blast sayısının %10' dan %30' a yükselmesi ile karakterize klonal evrim gibi belirtilerin görüldüğü evredir (14, 19, 18, 26).

Blastik Faz

Hücrelerin %30' undan fazlası blast hücrelidir. Bu evrede blastlar lenf nodları ya da kemiklerde tümör oluşturmaktadırlar. Genellikle tanıdan sonraki 3- 5 yıl içinde geçirilen ve blast krizi olarak adlandırılan bu evre akut lösemiye benzer bir süreci içermektedir. Ortalama sağkalım süresi 2 ile 4 ay arasındadır (14, 19, 18, 26).

Blastik Faza Dönüşüm Mekanizmaları

BCR-ABL1 ekspresyonu KML progresyonunda da çok büyük öneme sahiptir. BCR-ABL1 mRNA ve protein seviyeleri blastik fazda kronik faza göre daha yüksektir. İn vitro olarak, BCR-ABL1 doğrudan doza bağımlı olarak, büyüme faktörü bağımlılığı, klonogeniklik, apoptoza karşı koruma ve hareketliliği düzenler (31, 40, 41).

BCR-ABL1 farklılaşmada görevli genleri düzenleyen birçok transkripsiyon faktörünün aktivitesini düzenlediğinden, farklılaşma sürecinin kademeli olarak bozulması KML progresyonunun karakteristik özelliğidir. Transkripsiyon faktör CEBPα normal granülosit farklılaşması için zorunludur

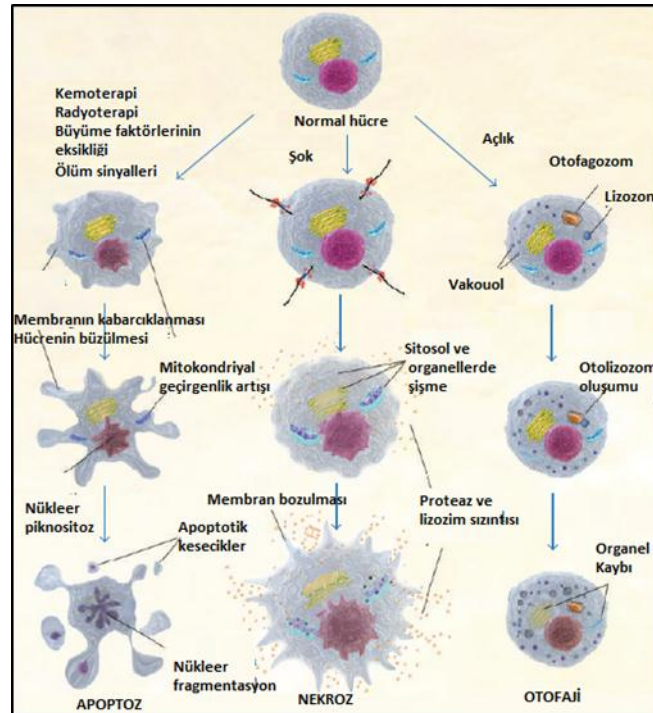
ve kronik faz KML örneklerindeki normal kemik iliği hücrelerinde bulunmakla birlikte blastik faz hücrelerinde bulunmamaktadır. CEBP α , hnRNPE2 üzerinden transkripsiyonel seviyede BCR-ABL1 aracılığıyla aşağı regüle olmaktadır ve ekspresyon kaybının miyeloid hücrenin kararlılığını etkilediğini göstermektedir (42). IKZF1 geninin delesyonları blastik faz KML progresyonuyla ilişkilendirilmiştir (43). Blastik faz KML fenotipi gelişimi NUP98-HOXA9 ya da AML1-EVI1 gibi BCR-ABL1 translokasyonlarının etkileşimini de içerebilmektedir. AML1-EVI1'in farklılaşmayı önlemesiyle birlikte NUP98-HOXA9 simetrik ve asimetrik bölünme dengesini olgun olmayan prekürsörlerin oluşması lehine bozarak blastik faza geçilmesine neden olur (44). Tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu blastik faza dönüşümde önemli rol oynamaktadır. KML' nin blastik faza progresyonunda görülen en önemli mutasyon p53 mutasyonları ve INK4A/ARF delesyonlarıdır (31). BCR-ABL1' in proteozomal degradasyonunu sağlayan tirozin fosfataz1 (SHP1)'i kodlayan Serin/treonin fosfataz2A (PP2A) mutasyonları da blastik faza dönüşümde etkili genlerdir (45).

2.7. Nadir Görülen Diğer Lösemi Tipleri

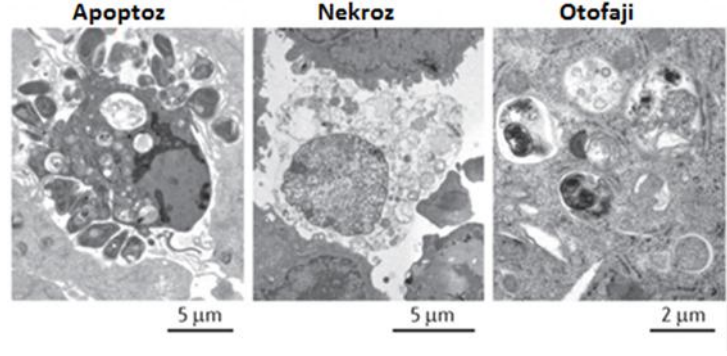
Sıklıkla görülmeyen prolenfositik lösemi, büyük granüler lenfositik lösemi, yetişkin T-hücreli lösemi/lenfoma, saçlı (hairy) hücreli lösemi, eritrolösemi, eozinofilik lösemi, plazma hücreli lösemi gibi nadir lösemi tipleri de bulunmaktadır (46 - 50).

2.8. Hücre Ölüm Şekilleri

Hücrelerde ve dokularda farklı patolojik ve fizyolojik durumları düzenlemekte görev alan farklı hücre ölüm programları karakterize edilmiştir. Bunlardan en iyi bilinenleri; tip III hücre ölümü olan nekroz, tip I hücre ölümü olan apoptoz ve tip II hücre ölümü olan otofajidir (51).



Şekil 7: Hücre ölüm tipleri (52)



Şekil 8: Hücre ölüm tiplerinin elektron mikroskop görüntüsü (53)

2.8.1. Nekroz

Yunanca “ceset, ölü” sözcüklerinden türetilen “nekroz”, mekanik hasar, hipoksi, ağır oksidatif stres, aşırı pH ve sıcaklık, yüksek konsantrasyonlarda toksinler, litik virüs enfeksiyonu gibi çevresel zararlara doğrudan maruz kalma ile ilişkili olan patolojik hücre ölümüdür. Nekrozu başlatan süreç ATP depolarının, PARP enzimi ile tüketilmesidir. Hücrenin fizyolojik olmayan bozukluklarıyla indüklenen nekroza hücresel yanıtta bozulan iyon homeostazı nedeniyle kalsiyum bağımlı fosfolipazlar ve proteazlar aktive olur ayrıca endoplazmik retikulum, golgi kompleksi ve mitokondrileri içeren zarlı organellerde şişme oluşur bunun sonucu olarak hücre lizise uğrayarak parçalanır ve dokuda akut inflamatuvar yanıt meydana gelir. Proteaz aktivitesinin artması histonlara zarar vererek kromatinin dağılmasına yol açar ve DNA endojen nükleazlara karşı savunmasız hale gelir. Pasif bir süreç olan nekroz, DNA’da rastgele, düzensiz kırıklara neden olmaktadır (52, 54, 55).

2.8.2. Apoptoz

İlk kez 1971 yılında Kerr tarafından keşfedilen hücre ölüm şekli “büzülme nekrozu” olarak adlandırılmıştır (56). 1972 yılında yine aynı bilim insanı tarafından nekrozdan farklı bir şekilde, çevresel uyarılarla indüklenebilen ya da inhibe edilebilen bu programlı hücre ölümünü tanımlamak için Yunancada ağaçtan çiçek veya yaprakların düşmesi ya da dökülmesi anlamına gelen “apoptozis” sözcüğü kullanılmıştır (57).

Fizyolojik hücre ölümü ya da hücre intiharı olarak da adlandırılan apoptoz; organizmanın normal yaşamı için gerekli olan hücre sayısının homeostazını korumak için hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki dengeyi sağlayan sınırlandırılmış öldürücü bir genetik programı içermektedir (57, 58). Embriyogenez, başkalaşım ve doku şekillenmesinin ayrılmaz bir parçası olmakla birlikte viral hastalıklar, kanser, nörodejeneratif hastalıklar apoptozun patolojik nedenleridir (59).

Apoptotik hücrenin indüklediği program fiziksel ve kimyasal uyarana tepki olarak belirli genlerin kontrolü altında biyokimyasal değişiklikleri içeren kaskad oluşumuna neden olur. Hücre, kendisini yok edeceği aktif intihar sürecine katılmaktadır. Tüm hücreleri eş zamanlı olarak değil bireysel olarak etkileyen bu programlı hücre ölümü ve nekrozun altında yatan mekanizmalar arasındaki farklar oldukça belirgindir. Zar yapıları bozulmadan kaldığından nekrozun tersine, apoptoz, hücre parçalanması anlamına gelmez. Doku bütünlüğü korunurken tek hücrenin hacminde belirgin bir azalma, kalsiyum konsantrasyonu ve hücre yoğunluğunda artış meydana gelmektedir. Kromatini

yoğunlaşarak piknotik görüntü sergiler, hücre büzülür, hacmi küçülür, komşu hücrelerle bağlantısı kesilir. Elektron mikroskopuyla ultrastrüktürel olarak incelenen apoptotik hücrelerin ana morfolojik özelliği; sitoplazmik yoğunlaşma ve hücrenin büzülmesini izleyen yıkımın apoptotik cisimler içinde gerçekleşmesidir. Apoptotik ölümün başlatılmasında en önemli aşama uyarılara bağlı olarak reseptörlerin algılayacağı birinci ve ikinci mesajcı olarak görev yapan makro moleküllerin sentezlenmesidir. Apoptotik kaskad bir kere başlatıldığında tamamlanana kadar ilerlemektedir. Birçok genin yer aldığı kaskadda son basamak DNA'nın endojen endonükleazlarla yok edilmesidir. Meydana gelen "apoptotik cisimler" makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından sindirildiğinden diğer hücrelere zarar veren lizozomal enzimler ve lokal inflamatuvar yanıt oluşmamaktadır. Nekrotik ölümle karşılaştırıldığında iyi düzenlenmiş ve daha yavaş bir süreçtir. ATP' nin kullanıldığı ve çok sayıda proteinin rol aldığı, güçlü, seçici hücre ölümü ortalama 3 saatte gerçekleşmektedir. Apoptoz sırasında endonükleaz saldırısıyla kırılmaya açık olan DNA bölgeleri sınırlı durumda olduğundan apoptoz sonucu oluşan DNA kırıkları apoptozun biyokimyasal parmak izini oluşturacak şekilde 180 kb çiftinin katları halinde düzenli yapıdadır (54, 58, 59).

Önceleri tümör gelişiminde sadece hücrelerin çoğalma hızının önemli olduğu düşünülse de apoptoz ya da bozulmuş apoptoz mekanizmasının tümör başlangıcı ve gelişiminde önemli rol oynadığı artık bilinmektedir. Apoptoza gidemeyen ve genetik olarak değişmiş hücreler, ileride kanser gelişimine neden olabilirler. Günümüzde kanserin yanısıra, otoimmün hastalıkları (sistemik lupus eritematoz, immün aracılı trombositopeni, otoimmün nötrojeni, glomerulonefrit, romatoid artrit, Hashimoto tiroid büyümesi hastalığı, insüline bağımlı diyabet ve çoklu skleroz) ve viral enfeksiyonları (Poxvirus, Adenovirus, Herpesvirus) içeren pek çok patoloji apoptoz azalması ile, Parkinson, Alzheimer, Huntington, amiyotrofik lateral skleroz, serebral dejenerasyon, status epileptikus, prion hastalığı, glokom, diyabetik retinopati, retinitis pigmentosa, spinal kas atrofiksi gibi nörodejeneratif hastalıklar ise artmış apoptozla ilişkilendirilmiştir. Genler ve moleküler düzenlenme hakkında ilk bilgilerin edinildiği günlerden bu yana kanser hücrelerinin hedefli bir şekilde apoptoza itilmesi ve apoptozun düzenlenmesi hedefli kanser tedavisinde en çok çalışılan alanlardan biri olmuştur (54, 60).

2.8.2.1. Apoptoz Biyokimyası

Apoptoz biyokimyası başlatıcı kaspazların aktivasyonu, apoptojenlerin mitokondriden salınımı ve efektör kaspazların aktivasyonu olarak üç aşamada özetlenir. Apoptoz moleküler olarak ölüm reseptörleri aracılığıyla gerçekleştirilen ekstrinsik yolak ve mitokondri tarafından yönlendirilen intrinsik yolaklar kullanılarak iki şekilde aktive edilebilir (61, 62).

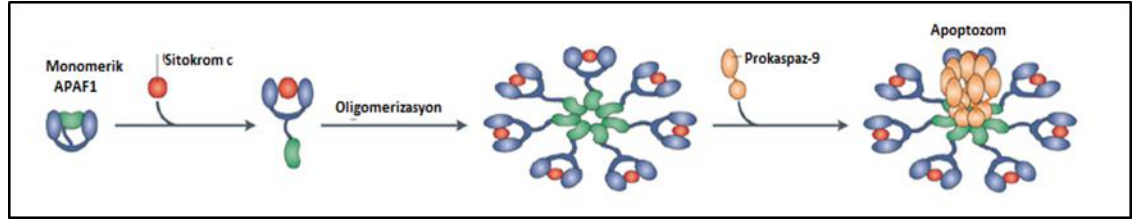
2.8.2.1.1. Ekstrinsik Yolak

Ölüm reseptörü yolağı olarak da adlandırılmaktadır (62). Tümör nekroz faktör (TNF) ligand süperailisinin üyelerinden APO3L, TNF- α , FAS-L ve TRAIL ligandlarının hücre yüzeyindeki TNF reseptör süperailisinin üyeleri olan APO3, TNFR, FAS ve DR4 /DR5 gibi spesifik ölüm reseptörlerine bağlanmasıyla tetiklenir (52, 55). Ligand-reseptör etkileşimi, FADD ya da TRADD olarak adlandırılan hücre içi proteinlerin aracılığıyla çok proteinli ölüm meydana getiren sinyal kompleksini (DISC -multi-protein death-inducing signaling complex) oluşturur. c-FLIP yapı ve

sekans bakımından CASP8' e benzerlik gösterir ve konsantrasyonuna bağlı olarak CASP8 aktivasyonunu artırabilir ya da inhibe edebilir. DISC agregasyonu hücre yıkımına aracılık eden ekstrinsik yolağın temel proteazı olan CASP8' in katalitik aktivitesini serbest bırakacak konformasyonel değişikliklere neden olur (62, 55).

2.8.2.1.2. İntrinsik Yolak

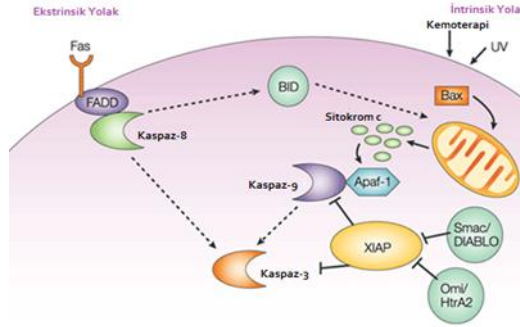
Apoptotik uyarana bağlı olarak mitokondriyal yüzeydeki aile içi protein etkileşimlerinde değişiklikler meydana getirerek sitokrom c salınımını belirleyen “pro ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri” tarafından kontrol edilir (61). Hücre içi reaktif oksijen seviyesi artışı, DNA hasarı, katlanmamış protein yanıtı ve büyüme faktörlerinin eksikliği gibi etmenler bu yolağı tetikler (62). Onarılamayacak boyuttaki DNA hasarı karşısında hücre içi mekanizma genomun gardiyanı olarak adlandırılan p53 geninin transkripsiyonunu stimüle eder (52, 55). Bu gen ölüm kaskadını başlatmak üzere PUMA, BIM ve NOXA gibi diğer proteinlerin sentezini uyarır (52, 55). Bu başlatıcı olaylar mitokondriyal membranlar arasındaki boşluktan sitozole pro-apoptotik proteinlerin (sitokrom c ve SMAC/DIABLO) salınmasını yöneten mitokondriyal geçirgenliği artırır (62). SMAC/DIABLO sitozolik apoptoz inhibitör proteinler (IAP) ile antagonistiktir (62, 55). Sitosolik sitokrom c, başlatıcı CASP9 ve efektör kaspazlardan oluşan apoptozom kompleksini aktive eder (Şekil 9) (61, 55).



Şekil 9: Apoptozom kompleksinin yapısı (63)

Sitokeratinlerin ve poli ADP-riboz polimerazın, kaspaz tarafından kesilmesi ve endonükleazların aktivasyonu geri dönüşü olmayan bir kaskadı oluşturur ve apoptotik cisimlerin şekillendirilmesini yönetir, plazma membranının dış yüzeyinde, fagositler tarafından ölü hücrenin tanınmasını sağlayan fosfatidilserinlerin açığa çıkmasını da sağlar (61).

Aktif CASP8 (ölüm reseptör yolağı) ve CASP9 (mitokondriyal yolak) sırayla mobilize CASP3, CASP6, CASP7 proteinleri üzerinden çok sayıda proteinin parçalanmasına neden olur ve hücresel yıkımı sağlayan DNAazları aktive eder (Şekil 10). Pek çok faktör hangi ölüm yolağının aktive edileceğini belirler. Apoptozda geri dönüşü olmayan nokta apoptotik cisimciklerin oluşumudur (52, 55, 62).



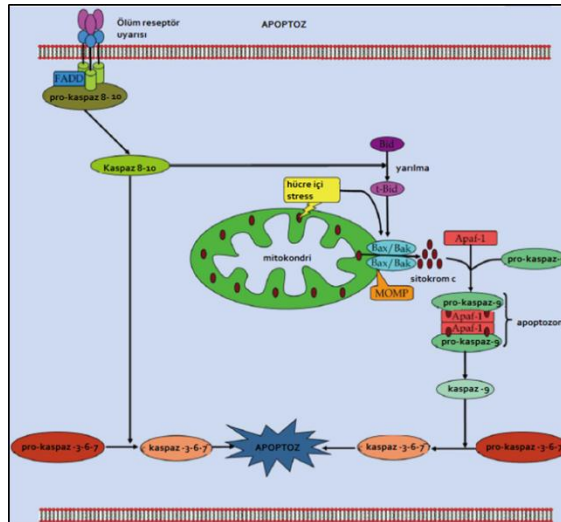
Şekil 10: Ekstrinsik ve intrinsik yollar (64)

2.8.2.2. Apoptozda Görev Alan Gen Aileleri

Yaralanma tarafından uyarılan ya da fizyolojik uyarana cevap olarak gerçekleşen apoptozdan “Kaspaz” ve “Bcl-2” protein aileleri sorumludur (65).

2.8.2.2.1. Kaspazlar

Apoptotik fenotipin altında çoğunlukla kaspaz aktivasyonu yatmaktadır. Kaspazlar birbiriyle sıkı ilişkili bir grup proteazı içermektedir. Sistein-aspartik asit-proteazları anlamına gelen kaspazların bu şekilde adlandırılmalarının sebebi aktif merkezlerinde bulunan sistein ve hedef bölgesinin dört amino asitten oluşan kesin olarak tanımlanmış 1. ve 4. pozisyonlarda aspartat içeren motiftir (65). Kaspazlar hücre membranında sitokin- reseptör bağlanmasıyla ya da hücrenin içinde oluşan ölüm sinyali ile aktifleşen bir kaskadı oluşturur. CASP8 ve CASP10 TNF ailesinin spesifik hücre dışı ligandlarının reseptörlere bağlanmasıyla (ekstrinsik yolak), CASP9 ise mitokondriyal membran aracılığıyla (intrinsik yolak) aktive olur (55, 65). Bu başlatıcı kaspazların özellikle CASP3, CASP6 ve CASP7’ den oluşan bir grup efektör kaspazı aktive etmesiyle birçok hücre bileşenine ait protein senkronize olarak parçalanır (Şekil 11) (66). Bu parçalanma apoptozun karakteristik morfolojik değişikliklerinin oluşumundan sorumludur. Apoptotik hücrelerin kabarcıklaşması RHOKinaz izoformu olan ROCK1’ in kaspaz ile parçalanması sonucu meydana gelir (55, 65). En önemli kaspaz substratları arasında, yıkımıyla hücrenin temas kaybı ve toparlanmasına yol açan hücre iskelet proteinleri ve fokal adezyon kinaz (FAK) da bulunmaktadır. Kaspaz tarafından aktive edilen, DNaz sitoplazmik şaperon inhibitörü (ICAD) parçalanmasıyla sitoplazmada nükleaz salınır ve nükleer lokalizasyon sinyalinin açığa çıkmasını sağlar. Böylece nükleusa ulaşan katlanmamış nükleaz, nükleer DNA’nın kondensasyonu ve parçalanmasından sorumludur. Ayrıca kaspazlar apoptotik hücrelerin makrofajlar tarafından yutulmasını sağlayacak hedef sinyalleri oluşturan nükleotitlerin salınmasını sağlar. Kaspazların kesim bölgesini oluşturan karakteristik 4- aminoasit motifleri türler arasında korunmuştur. Birbirinden farklı canlılarda aynı proteinlerin yer alması, apoptozun merkezinde yer alan senkronize moleküler olayların hücre tipine ve substrata özelleşmenin yattığını göstermektedir (65).



BH1, BH2, BH3 olmak üzere üç BH alanına sahip BAX ve BAK proteinleri, mitokondriyal geçirgenlik ve CASP9 aktivasyonunu yöneten mitokondriden sitokrom c çıkışı için kritiktir (55, 62). Aile üyelerinin iki güçlü pro-apoptotik molekül olan BAX ve BAK ile etkileşimiyle heterodimer oluşturması hücre canlılığını destekler (65). “Sadece BH3” alanına sahip olan BID, BAD, BIM, BMF, BIK gibi diğer pro-apoptotik üyeler hücre hayatta kalımı için zorunlu olan BCL2L1 (BCL-xL), BCL2L2 (BCL-w), MCL-1, BCL2A1 proteinlerini içeren anti-apoptotik Bcl-2 proteinlerine bağlanarak onların inhibisyonunu gerçekleştirmektedir (55, 62). “Sadece BH3” proteinlerinin artışı hızlıca mitokondriyal dış membranın çevresinde BAX/BAK oligomer şekillenmesi ve yüksek geçirgenlikli porlar oluşmasına neden olarak mitokondrinin geçirgenliğinin artmasını indüklemektedir. Bu olay kritik moleküllerin membranlar arası boşluktan mitokondriyal mikro çevreye çıkmasına neden olmaktadır (65). Bu moleküller arasındaki sitokrom c ve SMAC/DIABLO, mitokondriyal çevrede bulunan APAF-1 ile birlikte CASP9’ u aktive ederek intrinsik yolağın aktifleştirilmesini sağlayarak hücreyi ölüme götürmektedir (52, 65). Sadece BH3 grubunun üyeleri apoptozu tetikleme özellikleri bakımından farklılık göstermektedirler. BIM büyüme faktörü azalmasının, PUMA ise DNA hasarının indüklediği apoptozda kritiktir. Bu proteinlerin eksikliğinde hücre apoptotik uyarılara karşı daha korumalı durumdadır (62). Çeşitli yaralanma durumlarına karşı yanıt sinyallerini sadece BH3 proteinleri oluşturarak tehlike ve stres durumlarında sensör rolü oynamaktadır (65).

2.8.2.3. Apoptozda Rol Alan Genler

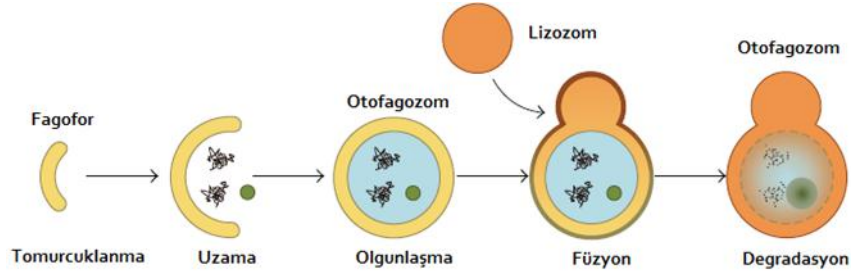
Ölüm alanı reseptörleri CRADD, FADD, TNF, TNFRSF10B genleri; DNA hasarı genleri ABL1, CIDEA, CIDEB, TP53, TP73; hücre dışı sinyaller olan CFLAR, DAPK1, TNFRSF25 genleri apoptozu indüklemektedir. Ayrıca BAD, BAK1, BAX, BCL10, BCL2L11, BCLAF1, BID, BIK, BNIP1, BNIP3, BNIP3L, CASP1, CASP10, CASP14, CASP2, CASP3, CASP4, CASP6, CASP8, CD27, CD70, DFFA, FAS, FASLG, GADD45A, HRK, LTA, NOD1, PYCARD, TNFRSF10A, TNFRSF9, TNFRSF10, TNFRSF8, TP53BP2, TRADD, TRAF3 genleri de apoptozu indüklemektedir. AKT1, BAG1, BAG3, BAG4, BAX, BCL2, BCL2A1, BCL2L1, BCL2L10, BCL2L2, BFAR, BIRC3, BIRC6, BIRC8, BNIP1, BNIP2, BNIP3, BNIP3L, BRAF, CD27, CD40LG, CFLAR, DAPK1, FAS, HRK, IGF1R, MCL1, NAIP, NOL3, RIPK2, TNF, XIAP genleri anti apoptotik proteinleri kodlamaktadır. BAG1, BAG3, BAG4, BCL10, BCL2, BCL2A1, BCL2L1, BCL2L10, BCL2L2, BFAR, BIRC3, BIRC6, BIRC8, BNIP1, BNIP2, BNIP3, BNIP3L, BRAF, CASP3, CD27, CD40LG, CFLAR, CIDEA, DAPK1, DFFA, FAS, IGF1R, MCL1, NAIP, NOL3, TP53, TP73, XIAP genleri apoptozun negatif; ABL1, AKT1, BAD, BAK1, BAX, BCL2L11, BCLAF1, BID, BIK, BNIP3, BNIP3L, CASP1, CASP10, CASP14, CASP2, CASP4, CASP6, CASP8, CD70, CIDEB, CRADD, FADD, FASLG, HRK, LTA, NOD1, PYCARD, RIPK2, TNF, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF25, TNFRSF9, TNFRSF10, TNFRSF8, TP53, TP53BP2, TRADD, TRAF2, TRAF3, TRAF4 genleri ise pozitif düzenleyicileridir (69).

2.8.3. Otofaji

Otofaji, tek veya çok hücreli ökaryotların, hücresel homeostazı korumak ve metabolik stresi azaltmak için protein ve genellikle mitokondri gibi organellerin lizozomal yıkımını içeren, yüksek

ölçüde düzenlenen, kritik katabolik bir biyolojik süreçtir (70, 71). Besin kıtlığı, hipoksi, endoplazmik retikulum (ER) stresi, anormal hücre gelişimi, UV radyasyonu, DNA hasarı, reaktif oksijen türlerinin oluşumu, katlanmamış protein yanıtı ve mikrobiyal enfeksiyon gibi hücrel koşullar otofajiyi tetiklemektedir (72). Öte yandan otofaji çeşitli uyarınlara bağılı olarak kaspaz aktivasyonu ya da DNA fragmentasyonuna ihtiyaç duymadan gerçekleşen tip II hücre ölümünü de tetiklemektedir (71). Bu sürecin devamlılığı nörodejenerasyon, yaşlanma, kanser gibi çeşitli patolojik olaylarla ilişkilidir (70).

Kendini- yeme terimi ilk kez Christian De Duve tarafından kullanılmıştır (71, 72). Otofajik hücre ölümü başlangıçta hücrenin mikroskopik özellikleri ile tanımlanmıştır. Otofajik hücreler genellikle tipik hücre özelliklerini kaybederek, sitoplazmik içerik ve hücre içi organelleri içine alan çok tabakalı membrana sahip otofagozom adı verilen hücre içi kabarcık yapılarını oluşturmaktadır. Otofagozomlar lizozomlarla birleşerek otolizozomları oluşturmakta ve hücre içeriğini lizozomal proteazlarla parçalamaktadırlar (Şekil 13) (73). Günümüzde ise otofaji, sitoplazmik makro molekül ve organellerin degradasyon amacıyla lizozomlara dağıtıldığı hücrel yolağı tanımlamaktadır (70).



Şekil 13: Otofajinin şematik gösterimi (70)

Fonksiyon ve lizozomlara dağıtıma göre makrotofaji, mikrotofaji, şaperon-aracılı otofaji olarak en az üç farklı otofaji şekli tanımlanmıştır. Mikrotofaji, sitoplazmik bileşenlerin lizozomal membran invajinasyonuna hapsedilip, içeriğin lizozomal enzimlerle sindirilmesidir. Şaperon aracılı otofajide, sitoplazmik bileşen sitosolik şaperonlar tarafından lizozomal zarlar üzerinde bulunan reseptörlere transloke edilir (74). Bununla birlikte genellikle otofaji, kargonun otofagozom olarak adlandırılan yeni sentezlenen çift zarlı vezikül içinde bulunduğu ve lizozomla birleşerek otolizozomu oluşturduğu ve burada lizozomal enzimlerle vezikül içeriğinin parçalandığı makrotofajiyi tanımlamak için kullanılmaktadır. Otofagozom çift membranlı veziküldür ve otofajinin en önemli morfolojik belirteçidir. Otofagozom, endoplazmik retikulum membranından köken alan fagofordan şekillenir. Fagofor degradasyona uğrayacak materyalin etrafına doğru genişler ve otofagozom olarak adlandırılan karakteristik çift membranlı vezikülü oluşturur. Olgun otofagozom lizozomla füzyon yaparak otolizozomları oluşturur, otolizozomlar içinde lizozomal hidrolazlar ve lümen mikro çevresinin asidifikasyonu ile iç membran ve vezikül içindeki materyal degrades edilir (70). Bu degradasyon hasar görmüş ve istenmeyen hücrel organel ve moleküllerin yıkımını gerçekleştirir ve hücrel enerji açığa çıkmasını sağlayarak yeni moleküllerin biyosentezinin gerçekleştirilmesine olanak tanıyarak hücreye fayda sağlar (73).

Mayalar üzerinde yapılan deneyler otofaji genlerinde mutasyon taşıyan hücrelerin besin kıtlığı gibi stres durumlarında hızlı şekilde ölüme gittiğini göstermiştir. Böylece otofajik fonksiyonların hücre canlılığı üzerinde pozitif etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Bu durum otofajinin bir ölüm mekanizması olup olmadığı konusunda çelişki oluşturmaktadır. Ancak otofaji insanlar gibi yüksek ökaryotik canlılarda mayalarda olduğundan çok daha karmaşık yollarla ilişkili kompleks yapıdadır ve geri dönüşü mümkün olmayacak kadar büyük hücresel hasarlarda aktif bir ölüm mekanizması olarak görev yapmaktadır. Çevresel koşullara bağlı olan otofajinin hücre yaşaması ya da hücre ölümü yanıtını seçme yeteneği ayrıca büyük ölçüde apoptotik mekanizmanın işlevsel olup olmamasıyla da ilişkilidir. Otofaji ile apoptoz kimi zaman antagonistik kimi zaman agonistik olarak işlev görürler. Bu iki süreçte yer alan proteinlerin çoğunun ortak olması ölüm uyarılarına yanıtta bu iki mekanizmanın hücrenin kaderini belirleyen anahtarlar gibi görev aldığını düşündürmektedir(73).

Otofaji besin kıtlığına hücresel yanıtla ortaya çıkmış, evrimsel olarak apoptozdan daha eski ve daha iyi korunmuş fizyolojik bir olaydır (71). Tek hücreli mayalardan yüksek ökaryotlara kadar tüm metazoalarda yaşam ile ölüm arasındaki dengeyi sağladığından sıkı bir şekilde denetlenmek zorundadır (73). Otofaji apoptozun tersine hem yaşamı destekleyen hem de ölüme götüren iki farklı fonksiyona sahiptir (75). Stres ya da hasara yanıt olarak otofaji hücreyi hasarı onaracak ya da daha büyük zarardan koruyacak şekilde kararlı tutmakla uğraşır. Hücresel hasar çok büyük olduğunda ise apoptoz doku veya organizma homeostazını korumak amacıyla devreye girerek hasarlı hücreyi ortadan kaldırır. Apoptoz mekanizmasının hasarlı olduğu durumlarda otofaji mekanizması bu hasarlı hücreyi ortadan kaldırmak için yedek bir mekanizma olarak işlev görmektedir. Kanseri hücrelerinin bozulmuş apoptotik mekanizmaları, hücreleri otofaji aracılığıyla ortadan kaldırabilmeyi güncel bir terapötik hedef haline getirmektedir (73).

2.8.3.1. Otofajinin Moleküler Mekanizması

Otofajik yolağın moleküler olarak yürütülmesi – otofagozamların oluşumu, olgunlaşması ve degradasyonu- ilk kez mayalarda keşfedilen spesifik otofaji ilişkili proteinlerin (ATG) birlikte görev almasına ihtiyaç duyar (70). ATG proteinleri multiprotein komplekslerinin organizasyonunu gerçekleştirerek otofajinin tüm aşamalarında yer aldığından sadece bir tanesinin bile inhibe edilmesi otofajik kaskadın yürütülmesini engellemektedir (70, 73).

Otofajiyi düzenleyen çok sayıda yolak karakterize edilmiştir (70). Bunlardan en iyi bilineni besin değişimine yanıt olarak fagoforun oluşmaya başlamasını sağlayan, besin ve büyüme faktörlerinin varlığında otofajiyi durdurarak otofajik yolağın anahtar regülatörü olan mTOR' a yanıt veren bir serin/treonin kinaz protein kompleksi tarafından düzenlenir (70). Yüksek ökaryotlarda mTOR, mTOR kompleks 1 (mTORC1) ve mTOR kompleks 2 (mTORC2) olmak üzere iki farklı multiprotein kompleksi halinde bulunur. mTOR aktivitesi ekstraselüler ve intraselüler mikro çevreden gelen uyarılarla tetiklenen çeşitli sinyalleşme yolları aracılığıyla kontrol edilir. AMPK hücresel enerji durumunun bir diğer belirtecidir ATP/AMP oranındaki azalmaya yanıt oluşturur (72). Besin kıtlığı durumunda AMPK doğrudan mTOR'u fosforilleyerek inhibe eder ve bu inhibisyon ULK1 fosforilasyonunu azaltarak otofagozom oluşumunu teşvik eder (70). Ayrıca AMPK, TSC2 fosforilasyonu ile doğrudan otofaji aktivasyonunu da gerçekleştirir (72). Fagofor oluşmaya başlaması sınıf I ve sınıf III PI3K enzimlerinin aktivitesi arasındaki dengeyle sağlanır. Aktif enzim VPS34 (sınıf

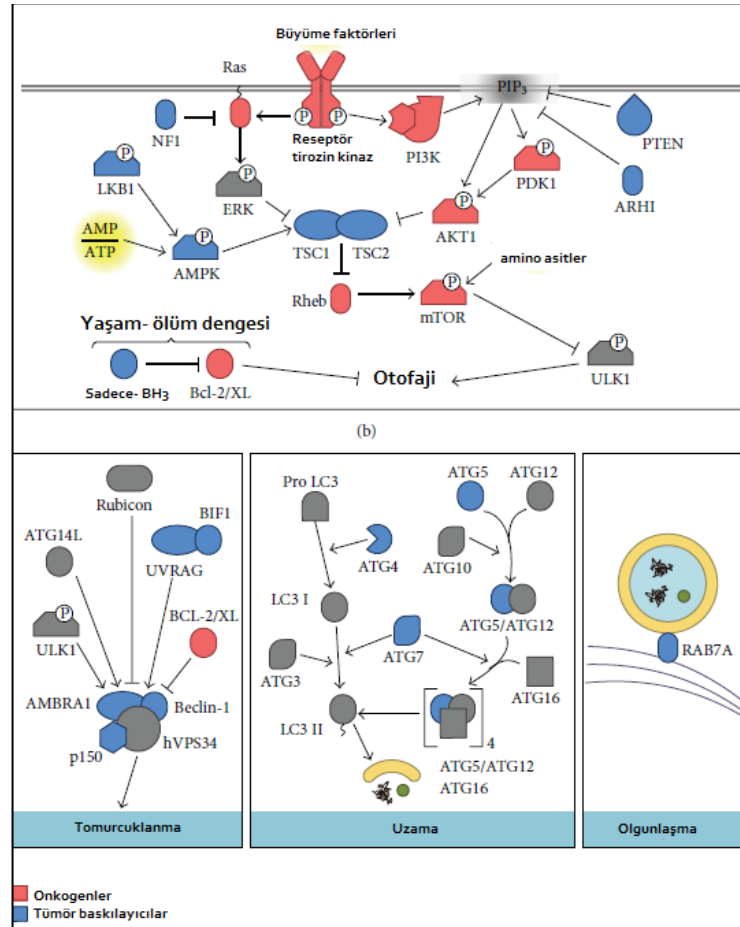
I PI3K), BECN1 (Beclin1) ve ATG14 ile PI3K kompleksi oluşturur ve bu kompleks DFCEP1 ve WIPI gibi efektör proteinleri çağırarak başlangıç sinyali oluşturarak PI3 üretimini katalizler (70). Otofajinin başlatılmasında anahtar rol oynayan BECN1, CASP3 substratıdır. CASP3 aktive olduğunda BECN1 ikiye bölünerek otofajiyi başlatma özelliğini kaybeder ve C-terminal bölgesi mitokondriye yerleşerek hücreleri apoptoza duyarlı hale getirir (73). Fagofor membranının uzaması ve bunu takip eden kapatma işlemi iki ubiquitin-benzeri bağlantının oluşumuna ihtiyaç duyar. İlk olarak ATG7 ve ATG10'un ardışık aktivitesi ile ATG12, ATG5'e bağlanır. ATG5-ATG12 kompleksi ATG16L ile etkileşim kurarak kompleks oluşturur (70). İkincisi, LC3'ün C terminal bölgesinin sistein proteaz olan ATG4 proteazı ile parçalanır; ATG7 ve ATG3 aktiviteleri aracılığıyla lipid fosfatidiletanolamin ile bağlantı oluşturur. LC3-PE bağlantısı gerçekleştiğinde fagofor oluşumu ve ardından otofagozoma dönüşüm süreci başlar (73). LC3'ün işlenmemiş formu olan LC3I sitoplazma içinde diffüze olurken, LC3II özellikle oluşmakta olan otofagozomlarda birikerek otofajinin takibini sağlayan bir belirteci oluşturur. Otofagozom sonunda kapanır ve lizozomla birleşir. Bu füzyon sürecinin diğer bazı regülatörleri lizozomal proteinler LAMP-1 ve LAMP-2, küçük GTP-bağlayan protein RAB7 ve AAA-tip ATPaz SKD1'dir (70). Otofagozom- lizozom füzyonu otofagozomal içeriğin tamamen degrade olmasını sağlayan hidrolazların aktivasyonu ile sonuçlanır. LC3 ayrıca doğrudan SQSTM1 (p62) ubiquitin bağlayan protein ile etkileşim kurarak poliubikutinlenmiş proteinlerin yok edilmesine olanak tanır (73). VPS34/ BECN1 kompleksiyle etkileşim kuran UVRAG proteini bir otofaji regülatörüdür (72). AMBRA1 BECN1 ile bağlantı kurarak otofajiyi stimüle eder (73). ER stresi otofaji ilişkili genleri etkiler. ER stresi ilişkili proteinler olan PERK ya da EIF2 α , otofajiyi inhibe eder. Otofaji IP3 ve IP3R'ler ile doğrudan regüle edilir. Inositol monofosfatların çeşitli ajanlarla inhibisyonu otofajiyi indükler. Ayrıca IP3R-BECN1-BCL2 etkileşimi otofaji meydana gelmesi için yeterlidir.

Otofaji lenfosit aktivasyonunu düzenlemede de önemli bir role sahiptir. ATG5 susturulması sonucu T hücre reseptörü bağlanmasıyla hücre proliferasyonu gerçekleşmemektedir. T hücre aktivasyonu otofajiyi NFKB-bağımlı BECN1 transkripsiyonu aracılığıyla artırır. T hücresi aktivasyonu IP3'ün yanı sıra ROS da meydana getirir. ROS seviyesi kalsiyum sinyallerini düzenler ve ayrıca otofajiyi indükler (71).

2.8.3.2. Otofajinin Tümör Baskılayıcılar ve Onkogenlerle Kontrolü

Otofajinin düzenlenmesinde rol alan proteinlerin çoğu tümör baskılayıcı ve onkogen yapıdadırlar. Bu nedenle otofajik yolların çoğu kanser gelişim mekanizmaları ile çakışır durumdadır. PTEN, AMPK, LKB1 ve TSC1/2 gibi tümör baskılayıcı genler mTOR'u negatif regüle ederek otofajiyi uyarırken, sınıf I PI3K, RAS, RHEB ve AKT gibi mTOR'u aktive eden onkogenlerin otofajiyi inhibe etmesi otofajinin bir tümör baskılayıcı mekanizma olarak düşünülmesine neden olmaktadır. Bu hipoteze uygun şekilde otofajinin inhibisyonu oksidatif stres, genomik instabilite ve tümörigenezise neden olur. Sınıf III PI3K kompleksinin bir parçası olarak otofajiyi teşvik eden BECN1 çeşitli kanserlerde bozuklukları tanımlanmış olan bir tümör baskılayıcıdır. BECN1' i fosforilleyerek BECN1 /BCL-2 kompleksinin dağılmasını ve böylece otofajiye yönelmeyi sağlayan ölüm ilişkili protein kinaz (DAPK) da çeşitli insan kanserlerinde metilasyonla susturulmuş durumda bulunan bir tümör baskılayıcıdır. Çeşitli hematolojik malignansilerde artmış ifade durumunda bulunan BCL-2 ve BCL-XL antiapoptotik BCL-2 ailesi üyeleridir ve hücre ölümünü otofaji bağımsız şekilde

düzenlemektedirler. BCL-2 ve BCL-XL, mitokondriyal dış membran geçirgenliği (MOMP) ile BAK/BAX bağımlı por şekillenmesi aracılığıyla hücre ölümünü baskılayarak, kanser hücrelerinin canlılığını ve gelişimini destekler. Ayrıca apoptoz inhibisyonu ile onkogenik görev yapan bu genler otofajinin negatif regülatörleridir. Bu proteinler doğrudan mTOR yolağında yer almamakla birlikte BECN1 BH3 alanı ile etkileşim kurarak ER içinde inaktif kompleks oluşturmasını sağlarlar. mTOR kinazı, otofajinin en önemli negatif regülatörüdür. Kinaz aktivitesi ile hücre gelişimini düzenleyen pek çok yolağın tetiklediği proteinleri aktive eder. Bunlar hem tümör baskılayıcı hem onkogenik yapıdaki proteinlerdir. Bütün bunlara rağmen otofaji, hipoksi ve besin kıtlığı gibi tümör gelişimini destekleyen ve kemoterapiye direnci arttıran stres koşulları altında sitoprotektif (hücre koruyucu) fonksiyon görmektedir. Otofajinin kanser hücrelerinin hızlı hücre proliferasyonu tarafından tetiklenen hücresel stres ya da artmış metabolik gereksinimlerine yanıt olabilecek önemli bir katabolik mekanizma olması nedeniyle tümör gelişimini desteklediği düşünülmektedir. Bununla birlikte otofaji, hasarlı organel ve proteinlerin birikimini önleyerek tümör baskılayıcı mekanizma olarak da fonksiyon görmektedir. Bu açıdan otofajinin kanser gelişimi ve progresyonundaki rolü tartışmalıdır (70). Otofajinin epigenetik kontrolü hücre ölümünde önemli rol oynar. Kanser hücrelerinde epigenetik modifikasyonlar otofajiyi negatif regüle eden AKT-1, BCL-2 ve RAS gibi onkogenlerle ilişkilidir, bu da otofajinin tümör baskılayıcı olarak kabul edilmesine neden olur (76).



Şekil 14: Otofajinin moleküler mekanizması (70)

2.8.3.3. Otofaji ve Apoptoz İlişkisi

Otofaji ve apoptoz bazı çalışmalarda yakından ilişkili olmakla birlikte bazı koşullarda karşıt rollere sahiptir (77). Apoptozun bazı çalışmalarda otofaji inhibisyonuna ihtiyaç duyduğu bazı çalışmalarda da otofajinin hücre yaşamı ve ölümü arasında anahtar rolü oynadığı gösterilmiştir (78-81). ATG3-ATG12 kompleksinin mitokondri dış membranına lokalize olmasıyla mitokondriyal homeostazı düzenlenir. Bu proteinler mitokondri aracılı apoptozda da rol almaktadır (73). LC3ün CASP8 aktivasyonu aracılığıyla apoptoza da yardım ettiği güncel olarak çalışılmıştır (73).

Otofajide rol oynayan apoptotik proteinlerin en önemlilerinden olan anti-apoptotik Bcl-2 ailesi üyeleri BCL2 ve Bcl-xL temel otofajik faktör BECN1 ile etkileşim kurarak otofajiyi inhibe eder. Mcl-1 ve v-Bcl-2 gibi ailenin diğer üyeleri de BECN1 ile VPS34'ün oluşturduğu kompleksi inhibe ederek açlık indüklü otofajiyi baskılar. Büyük bölümü mitokondri, az bir bölümü ise ER membranına lokalize şekilde bulunan Bcl-2 ailesi proteinlerinden sadece ER- üzerindeki Bcl-2 ailesi proteinleri otofajiyi inhibe edebilmektedir. Bunun nedeni proteinlerin anti otofajik fonksiyon görebilmesi için ER membranında bulunan IP3 gibi bir faktöre ihtiyaç duymasıdır. Bcl-2'nin otofaji üzerindeki bir diğer inhibisyon mekanizması ise hücre içi Ca^{+2} homeostazı ile ilişkilidir. Sitosolik Ca^{+2} artışı otofajiyi indükler. BCL-2 ER' daki Ca^{+2} seviyesini azaltarak stres indüklü sitosolik Ca^{+2} seviyesi artışını engelleyerek otofajiyi baskılar. BAK ve BAX proteinlerinin hataları hücrenin intrinsik apoptotik yolakla ölmesini engeller ancak otofajik hücre ölümüne yönlendirir. Bu iki protein BECN1 ile etkileşim kuran Bcl-2 ailesi proteinleri ile ilişkili olduğundan doğrudan apoptozu etkiler, ayrıca PTEN aktivitesini düşürerek AKT-mTOR yolağı aktivasyonu ile otofajiyi inhibe ederler. Sadece BH3 proteinlerinden, BNIP3 proteini yüksek ifade edildiği durumda olduğunda otofagozom birikimini yönetir, BAD ve EGL1 açlık indüklü otofajiyi artırır. Ca^{+2} bağımlı sistein proteazlar olan kalpainler hem apoptozda hem otofajide rol oynar. Hücre döngüsü durdurulması ve apoptozu tetikleyen en önemli stres algılayıcı molekül olan p53 otofajide de çeşitli şekillerde görev alır. Etki mekanizmalarından bir tanesi AMPK aktivasyonu aracılığıyla TSC1 ve TSC2 protein kinazlarının aktivasyonu ve mTOR'un inhibe edilmesidir. Ayrıca p53-aracılı otofaji p53'ün transkripsiyonel hedeflerinden biri olan lizozomal protein DRAM molekülünün transkripsiyonel aktivasyonu aracılığıyla gerçekleştirilir. Cip/Kip ailesi Cdk inhibitörlerinden birisi olan p27Kip1 hücrenin metabolik stres altında apoptoz ya da otofajiye girmesini yönetir. Tümör hücrelerinin apoptozdan kaçarak otofaji aracılığıyla sağkalımlarını yöneten mekanizma bu protein aracılığıyla gerçekleşir. DAPK, ER stresine yanıt aracılığıyla gerçekleşen mekanizmaların tetiklemesi ile apoptoz ve otofajide rol alır. JNK, BCL-2/BECN1 kompleksi ile etkileşim kurarak kısa süreli açlık durumunda otofaji, uzun dönem açlık durumunda ise apoptoz aracılığıyla hücre ölümünde rol oynar (73).

2.8.3.4. Otofajide Rol Alan Genler

AMBRA1 (NYW1), ATG12, ATG16L1, ATG4A, ATG4B, ATG4C, ATG4D, ATG5, ATG9A, ATG9B, BECN1, GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2, IRGM, MAP1LC3A, MAP1LC3B, RGS19, ULK1, WIPI1 genleri otofajik vakuol oluşumuyla; ATG4A, ATG4B, ATG4C, ATG4D, GABARAP genleri protein hedeflemesiyle ilgilidir. ATG10, ATG16L1, ATG16L2, ATG3, ATG4A, ATG4B, ATG4C, ATG4D, ATG7, ATG9A, GABARAP, GABARAPL2, RAB24 genleri protein taşınımından; DRAM1, GABARAP, LAMP1, NPC1 otofagozomu lizozom bağlanmasından; ATG3,

ATG7, HDAC6 ubiquitinasyondan; ATG4A, ATG4B, ATG4C, ATG4D proteaz aktivitesinden sorumludur. AKT1, APP, ATG12, ATG5, BAD, BAK1, BAX, BCL2, BCL2L1 (BCL-X), BECN1, BID, BNIP3, CASP3, CASP8 (FLICE), CDKN1B (p27KIP1), CDKN2A (p16INK4), CLN3, CTSB, CXCR4, DAPK1, DRAM1, EIF2AK3, FADD, FAS (TNFRSF6), HDAC1, HTT, IFNG, IGF1, INS, MAPK8 (JNK1), MTOR, NFKB1, PIK3CG, PRKAA1, PTEN, SNCA, SQSTM1, TGFB1, TGM2, TNF, TNFSF10 (TRAIL), TP53 genleri tofaji ve apoptozun ko-regülasyonunu sağlamaktadır. Otofaji ve hücre döngüsünün ko-regülasyonundan ise BAX, CDKN1B (p27KIP1), CDKN2A (p16INK4), IFNG, PTEN, RB1, TGFB1, TP53 genleri sorumludur. EIF2AK3, IFNG, LAMP1 hücre içi patojenlerle, CTSD, CTSS, DRAM2 (TMEM77), EIF4G1, ESR1 (ERa), GAA, HGS, MAPK14, PIK3C3 (VPS34), PIK3R4, RPS6KB1, TMEM74, ULK2, UVRAG hücre içi sinyallere yanıt olarak; HSP90AA1, HSPA8 şaperon aracılı otofajiden sorumludur (82).

2.9. Ruxolitinib ve Etki Mekanizmaları

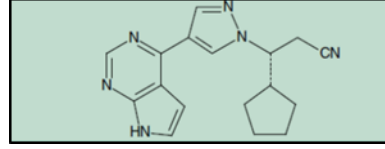
Miyelofibroz özellikle yaşlı insanları etkileyen, aşamalı olarak ilerleyen kemik iliği fibrozu, yetersiz hematopoiez, sitopeni, anemi, splenomegali (dalak büyümesi) gibi semptomlarla karakterize bir hastalıktır (83). Klonal bir hastalık olan MF, bu karakterize özelliklerinin yanı sıra gece terlemesi, ateş, kilo kaybı gibi yapısal semptomlarla birlikte erken ölüm riski de taşımaktadır (84). MF terimi primer miyelofibrozu hastaları tanımlamakla birlikte; fenotipik olarak PV ve ET' yi takip eden post-PV MF ve post-ET MF hastalıklarını da tanımlamak için kullanılmaktadır (85). Ayrıca primer MF büyük ölçüde AML' ye dönüşme riski taşımaktadır (86). MF için kullanılmakta olan tedavi yöntemleri hem palyatif (yatıştırıcı) açıdan hem de iyileştirici özellikleri bakımından yeterli değildir. MF ilişkili anemi gibi rekombinant eritropoietin, androjenler ve talidomid gibi ilaçlarla ya da transfüzyonla tedavi edilir. MF ilişkili splenomegalinin ise hidroksiüre gibi mevcut ilaçlarla tedavisi zor olduğundan pek çok hasta splenektomi / splenektomi (dalağın cerrahi yolla çıkartılması) işlemine ya da zorlu radyoterapi sürecine maruz kalmaktadır. Hastalığın ileri evrelerinde uygulanan allojenik kök hücre nakli ise önemli ölçüde mortalite ve morbidite ile ilişkilendirilmiştir. MF tedavisinde kullanılan standart yöntemlerin hastalık semptomlarını yönetmede etkili olmaması bu yöndeki gereksinimi ortaya koymuştur (87, 88).

Ph- MPN gruplarından biri olan MF' un moleküler patogenezi tam olarak aydınlatılmamış olsa da büyük ölçüde görülen birkaç mutasyon tanımlanmıştır. Birbirinden bağımsız grupların 2005 yılında JAK2 geninde 617. kodondaki valinin fenilalanine dönüşmesine neden olan bir 1849. nükleotit olan guaninin (G) timine (T) dönüştüğü JAK2V617F mutasyonunu keşfetmişlerdir. Bu mutasyonların çeşitli tip miyeloproliferatif neoplazmlı hastaların büyük çoğunluğunda bulunduğu (PV'da % 95, ET'de %50 PMF'de %20) rapor edilmesi JAK' ları önemli bir konu olarak gündeme getirmiştir (89).

JAK olarak bilinen Janus kinaz ailesi yedi tane JAK homoloji (JH) alanı ile karakterize edilmiş JAK1, JAK2, JAK3 ve non-reseptör (reseptör olmayan) tirozin kinaz 2 (TYK2) tirozin kinazlarından oluşur. JAK ailesi kinazları; STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B ve STAT6 transkripsiyon faktörlerini içeren STAT' larla birlikte JAK-STAT sinyal iletim yolağını oluşturur (90). JAK/STAT sinyal iletim yolağı gen ekspresyonunu düzenleyen etkili ve karmaşık bir sistemdir (91). Sitokinler, hormonlar ya da büyüme faktörleri gibi çeşitli etkenlerle reseptörün uyarılması JAK

aktivasyonuna, bu da STAT' ların seçici olarak fosforillenmesine neden olur. Fosforillenen STAT' lar dimerize olarak nükleusa yönelir ve gen regülasyonunu düzenlemek üzere hedef genin promotör bölgesine bağlanırlar (92). JAK/STAT yolağının aktivasyonu aracılığıyla hücre bölünmesi, hücre göçü ve apoptozun uyarılması (92), bu sinyal yolağındaki bozuklukların MF' u da içeren hematolojik malignansilerin oluşumuyla ilişkilendirilmesine neden olmuştur.

Ruxolitinib (INCB018424) güçlü, seçici JAK1 ve JAK2 inhibitörüdür. Temel etkisi JAK' ın STAT' ı fosforile edebilmesini önleyerek hücre bölünmesini engelleme ve apoptoz indüksiyonudur (93). Ruxolitinib tirozin kinaz inhibitörü olma özelliği ile MF tedavisinde kullanılmaya başlayan ilk ajandır. Moleküler yapısı Şekil 15' te görüldüğü gibi olan ruxolitinibin bazı özellikleri Tablo 2' de gösterilmiştir (94). Ruxolitinibin 2011 Kasım ayında FDA tarafından onaylanarak klinikte kullanılan şekli ise bir fosfat grubu eklenmiş olan ruxolitinib fosfattır, Tablo 3' te gösterildiği gibi görünüş ve moleküler ağırlık gibi bazı özellikleri değişmiş durumdadır (95).



Şekil 15: Ruxolitinibin moleküler yapısı (94)

Tablo 2: Ruxolitinibin kimyasal özellikleri (94)

<i>INCB numarası</i>	INCB018424, INC424
<i>CAS numarası</i>	941678-49-5
<i>Etki şekli</i>	JAK1 JAK2 inhibitörü
<i>Moleküler ağırlığı</i>	306.37 g/mol
<i>Molekül formülü</i>	C ₁₇ H ₁₈ N ₆
<i>Görünüş</i>	Açık sarı renkte toz
<i>Saklama</i>	-20°C' de 2 yıl
<i>IUPAC adlandırması</i>	(R)-3-(4-(7H-pyrrolo[2,3d]pyrimidin-4-yl)-1H-pyrazol-1yl)-3-cyclopentylpropanenitrile

Tablo 3: Ruxolitinib fosfatın kimyasal özellikleri (95)

<i>Klinikte kullanılan şekli</i>	Ruxolitinib fosfat
<i>Klinikteki adı</i>	Jakafi (Novartis)
<i>Lisans kurum/ tarih</i>	FDA/ Kasım 2011
<i>CAS numarası</i>	1092939-17-7
<i>Moleküler ağırlığı</i>	404.36 g/mol
<i>Molekül formülü</i>	C ₁₇ H ₁₈ N ₆ .H ₃ O ₄ P
<i>Görünüş</i>	Açık pembe toz

İnsan JAK1 (837-1142), JAK2 (828-1132), JAK3 (781-1124), Tyk2 (873-1187) kinaz alanları N-terminal epitop etiketleri kullanılarak PCR’ da çoğaltılmış, SF21 hücreleri aracılığıyla rekombinant proteinlerinin üretimi gerçekleştirilmiş, bu rekombinant proteinlere 200 nM ruxolitinib uygulanarak ruxolitinibin IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. JAK2 için 2.8 nM, JAK1 için 3.3 nM, JAK3 için 428 nanomolar Tyk2 için 19 nM olarak belirlenen değerlerle birlikte ruxolitinib seçici ve güçlü JAK1 ve JAK2 inhibitörü olarak değerlendirilmiştir. IL-6 ve TPO ile stimüle edilmiş heparinli tam kan yöntemleri kullanılarak arttırılmış ruxolitinib dozu uygulanması sonucunda fosforile STAT3 ile “enzim-bağılı immunosorbent yöntemleri” aracılığıyla IC₅₀ değerleri JAK1 için (IL-6 aracılığıyla) 282 nM, JAK2 için (TPO aracılığıyla) 281 nM olarak belirlenmiştir. JAK2V617F-pozitif hücrelere ruxolitinib uygulanmasının canlılık, büyüme, çoğalmayı azalttığı gösterilmiştir. JAK2V617F-pozitif hücrelere 150, 400, 1000 nM ruxolitinib uygulanmasıyla kontrole göre sırasıyla 4.3, 7.2 ve 13.2 kat apoptoz artışı olduğu gösterilmiştir. PV’ lı JAK2V617F-pozitif hastalardan elde edilen hücrelerle yapılan çalışmalarla ruxolitinibin eritroid ve miyeloid progenitörlerin gelişimini doz bağımlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir. IC₅₀ değeri eritroid progenitörler için 223 nM, miyeloid progenitörler için 444 nM olarak bulunmuştur (96).

Fare modellerinde miyelofibroz oluşturulmuştur. MF fareler iki gruba ayrılmış ve gruplardan birine 3 hafta boyunca ruxolitinib uygulaması yapılmıştır. Ruxolitinib almayan farelerde 15. günden itibaren ölümler başlamış ve 20. günde farelerin neredeyse %90’ ında ölüm gözlenmiştir. Ruxolitinib uygulaması farelerin ölüm oranını büyük ölçüde azaltmıştır. Dalak büyüklüklerinin incelenmesiyle ruxolitinib uygulamasının splenomegaliyi belirgin ölçüde azalttığı görülmüştür. Dalaktan elde edilen örneklerin PCR’ da çoğaltılmasıyla JAK2V617F sıklığının yaklaşık %33 oranında azaldığı belirlenmiştir. Histolojik incelemeler sonucunda malign hücrelerin oranını azalttığı da belirlenmiştir. Bütün bu çalışmalar ruxolitinibin miyelofibroz tedavisinde kullanılabileceği fikrini oluşturmuştur (96).

Ruxolitinibin JAK2 V617F–pozitif ve negatif primer miyelofibroz ya da post-esansiyel trombositemi ve post-polisitemiya vera miyelofibroz hastalarında faz 1 ve 2 çalışmaları yapılmıştır. Başlangıç dozu olarak günde iki kere 25 mg ya da tek doz 100 mg Ruxolitinib alan 153 hastanın tamamında ortalama 14.7 ayda etki görülmüştür. Günde 2 kez 15 mg uygulanan başlangıç dozu en etkili ve güvenli doz olarak belirlenmiştir. Bu dozda 33 hastanın 17’ sinde (% 52) 12 ay veya daha fazla süren hızlı bir objektif yanıt (splenomegalinin azalması) gözlenmiş ve bu tedavi sonucunda evre 3 ve 4 hastaların sadece %10’ undan az bir bölümünde mielosüpresyon gibi yan etkiler gözlenmiştir. Kilo kaybı, yorgunluk, gece terlemeleri ve kaşıntı gibi zayıf düşürücü belirtileri olan hastalarda hızlı bir iyileşme görülmüştür. Klinik faydalar yaygın miyelofibrozsizde yükseltilmiş enflamatuvar sitokinlerin dolaşımdaki seviyelerinin belirgin azalması ile ilişkilendirilmiştir. Günde iki kez 15 mg ve günde iki kez 25 mg ruxolitinib alan hastalarda splenomegalide %50 ve daha fazla azalma ile klinik iyileşme gösterilmiştir. 6 ay boyunca günde iki kez 10-25 mg dozunda INCB018424 alan hastaların gece terlemesi, kaşıntı, karın ağrısı, kemik veya kas ağrısı semptomlarında en az %50 azalma oluşmuştur. Günde iki kez 10 mg ile 25 mg INCB018424 alan hastalarda, vücut kütle indeksine bağlı olarak ağırlık artışı görülmektedir (97). Tüm bu olumlu sonuçlar ruxolitinibin MF tedavisinde kimyasal ajan olarak kullanılmasına olanak tanımıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Hücre Kültürü Çalışmaları

Sahip oldukları kullanım avantajları, hücre hatlarını laboratuvar çalışmaları ve kanser araştırmalarının *in vitro* basamaklarında öncelikli tercih edilen modeller haline getirmiştir. Ticari olarak elde edilebilmeleri ve etik sorun oluşturmamalarının yanında uygun olmayan koşullarda korudukları çoğalma yetenekleri, donmuş stoklar halinde bir süre depolanabilir ve çözme işleminin ardından tekrar kullanılabilir olmaları, hücrelerinin aynı genetik homojeniteye sahip ve en önemlisi kolay kullanılabilir olmaları hücre hatları kullanımının en önemli avantajları olarak sayılabilir. Tez kapsamında insan kronik miyeloid lösemi hücresi olarak kullanılan K-562 (CCL-243) hücre hattı ve kontrol hücresi olarak kullanılan sağlıklı insan B lenfositlerinden oluşan NCI-BL 2171 (CRL-5969) hücre hattı ATCC’ den temin edilmiştir (Tablo 4) (Tablo 5).

Tablo 4: K-562 hücre modeli özellikleri

<i>Büyüme Özellikleri:</i>	Süspansiyon
<i>Organizma:</i>	<i>Homo sapiens</i> (insan)
<i>Morfoloji:</i>	Lenfoblast
<i>Kaynak:</i>	Kemik iliği
<i>Hastalık:</i>	Kronik Miyeloid Lösemi (KML)
<i>Tumorigenik:</i>	Evet
<i>Antijen Ekspresyonu:</i>	CD7 (%25)
<i>Yaş:</i>	53
<i>Cinsiyet:</i>	Kadın
<i>Yorumlar:</i>	Philadelphia kromozomu pozitif

Tablo 5: NCI-BL2171 hücre modeli özellikleri

<i>Büyüme Özellikleri:</i>	Süspansiyon
<i>Organizma:</i>	<i>Homo sapiens</i> (insan)
<i>Morfoloji:</i>	B lenfosit
<i>Kaynak:</i>	Periferik kan
<i>Yaş:</i>	50
<i>Cinsiyet:</i>	Erkek

Hücrelerin Kültür Koşullarında Çoğaltılması ve Takibi

Hücrelerin kültür ortamında *in vitro* olarak yaşatılması ve çoğaltılması için gereken maddeleri içeren uygun besiyerleri ticari olarak temin edilmiştir. K-562 ve NCI-BL 2171 hücre hatları için 2mM L-Glutamin (Biological industries Cat.No: 03-020-1B), %1 penisilin-streptomisin (Biological

industries Cat.No: 03-031-1B) içeren, %10 fetal bovin serum (FBS) (Biological industries Cat.No: 04-127-1A) ile desteklenmiş olan L-Glutamin içeren RPMI 1640 (Biological industries Cat.No: 01-104-1A) besiyeri kullanılmıştır. Süspanse yapıdaki hücreler dikey konumdaki 25cm²'lik filtreli kapaklı flasklar (Corning Cat.No: 430639) içinde kültüre edilmiştir. Yapılacak çalışmaların gerektirdiği doğrultuda uygun sayıda çoğalana kadar hücreler %95 nem ve %5 CO₂ içeren etüvde (Thermo Electron Corporation's Class 100) 37°C sabit sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Kullanılmayacak hücreler dondurularak -86°C'de saklanmış, kullanılacağı zaman tekrar çözme işlemi uygulanmıştır.

Hücrelerin canlılık ve proliferasyonlarının düzenli olarak takibi ve kontrolü için inverted (Olympus-CKX41) ve ışık (Olympus-CH30) mikroskopları kullanılmıştır. Hücrelerin ortam değişimi, pasaj, dondurma ve çözme işlemleri laminar akım kabini (ESCO Class II, Biological Safety Cabinets) gerçekleştirilerek çalışmaların kontaminasyondan uzak, steril olması sağlanmıştır.

Hücrelerin Pasajlanması

Hücreler mililitredeki hücre sayısı 10⁵- 10⁶ aralığında sabit tutulacak şekilde çoğalma hızına bağlı olarak pasajlanmıştır. Ayıca 2 günde bir düzenli olarak ortam değişimleri gerçekleştirilmiştir. Pasajlama ya da ortam değiştirme işlemi uygulanacak olan hücreler 15 ml' lik santrifüj tüplerine alınarak 1200 rpm' de 5 dakika santrifüjde (Thermo Scientific Heraeus Labofuge 400) santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminin ardından süpernatant uzaklaştırılmış, hücre pelleti tekrar süspanse edilerek üzerine taze besiyeri eklenmiştir. Hücre sayısına bağlı olarak besi yeri eklenen hücreler uygun sayıda flaska ekilmiştir.

Hücrelerin Dondurulması

Deneylerde kullanılmayacak fazla hücreler dondurularak, ileri dönemde kullanılmak üzere yaşlanmaları önlenerek muhafaza edilmeleri sağlanmıştır. Dondurulacak olan hücreler 15 ml' lik santrifüj tüplerine alınarak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminin ardından süpernatant uzaklaştırılmış, hücre pelleti tekrar süspanse edilerek üzerine buz üzerinde hazırlanan ve bekletilen 1: 9 oranında DMSO (Dimetilsülfoksit) (Amresco Cat.No:N182): FBS içeren karışımdan 800 µl eklenerek buz üzerinde bulunan kriyotüplere aktararak -86°C'ye kaldırılmıştır.

Hücrelerin Çözülmesi

-86°C'de ya da sıvı azot içerisinde muhafaza edilen hücrelerin deneyde kullanılabilir hale getirilmesi için hücrelere çözme işlemi uygulanmıştır. Çözülecek olan hücreleri içeren kriyotüpler buz üzerine alınmış, 15 ml' lik santrifüj tüplerine taze besiyeri eklenmiştir. Cam pipet ve puar aracılığıyla besiyeri yavaş yavaş kriyotüplere eklenerek, donmuş hücrelerin yavaş olarak çözülmesi sağlanmıştır. Çözülen hücreler yine cam pipet ve puar aracılığıyla içinde taze besiyeri bulunan 15 ml' lik santrifüj tüplerine alınarak 1200 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminin ardından süpernatant uzaklaştırılmış, hücre pelleti tekrar süspanse edilerek üzerine taze besiyeri eklenmiş ve aynı koşullarda bir santrifüj işlemi daha gerçekleştirilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak pellet tekrar süspanse edilmiş ve üzerine taze besiyeri eklenerek flasklara ekim işlemi uygulanmıştır.

3.2. Hücre Canlılık Testi

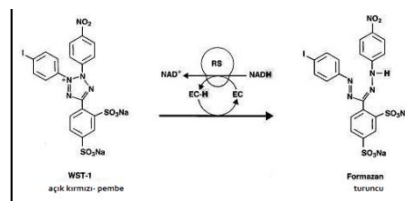
Kültüre edilen hücrelerinin canlılık yüzdesinin ve sayısının kontrol edilmesi Tripan mavisi boyası (Biological industries Cat.No: 03-102-1B) testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Testin temel prensibi ışık mikroskobu ile bakıldığında ölü hücrelerin boyayı içlerine alarak mavi renkte, boyayı almayan canlı hücrelerin ise parlak şeffaf renkte görülmesidir. Kontrol edilecek olan hücrelerden 50µl alınarak 50µl tripan mavisi boyası ile karıştırılmış uygun miktarda karışım Neubauer lamına aktarılmıştır. Işık mikroskobu altında lamın 4x4'lük karelerden oluşan 4 adet alanında bulunan hücreler sayılarak ortalamaları alınmış, canlı hücre sayısı toplam hücre sayısına oranlanarak hücrelerin canlılık yüzdesi hesaplanmıştır. Canlı hücre sayısı dilüsyon faktörü ile birlikte 2×10^4 ile çarpılarak mililitredeki canlı hücre sayısı hesaplanmıştır.

3.3. Etken Maddenin Kullanıma Hazır Hale Getirilmesi

Tez çalışmaları kapsamında kullanılacak olan Ruxolitinib etken maddesi Novartis' ten temin edilmiştir. Moleküler ağırlığı 404.37 g/mol olan etken madde son konsantrasyonu 10 mM olacak şekilde 1 ml DMSO içinde çözülmüştür. Stok etken madde çözeltisi K-562 insan KML ve NCI-BL 2171 sağlıklı hücrelerine 100 nM ile 100 µM aralığında uygulanmıştır. Çalışmalar herhangi bir dozun uygulanmadığı kontrol gruplarına paralel olarak yürütülmüştür.

3.4. Sitotoksite Testleri

Ruxolitinib etken maddesinin K-562 insan KML ve NCI-BL 2171 sağlıklı B lenfositleri üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi amacıyla WST-1 testi uygulanmıştır. Hücre proliferasyonu reaktifi WST-1 (Roche, Cat.No: 11644807001), hücre proliferasyonu, canlılığı, sitotoksitenin spektrofotometrik olarak ölçümünü sağlayan radyoaktif olmayan kullanıma hazır kolorimetrik bir testtir. Büyüme faktörleri, sitokinler, mitojenler ve besinlere yanıt olarak hücre proliferasyonunun ölçülmesi, anti-kanser ya da diğer farmasötik bileşiklerin sitotoksik etkilerinin analizi, hücre büyümesini inhibe eden moleküllerin etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılmaktadır. Kararlı bir tetrazolyum tuzu olan WST-1 (Water soluble Tetrazolium salt-suda çözünebilir tetrazolyum tuzu) canlı hücrelerde mitokondri solunum zincirine ait süksinat-tetrazolyum redüktaz sistemi tarafından glikolitik NAD(P)H üretimine bağlı olarak çözülebilir formazana parçalanmaktadır. Bu nedenle, oluşan formazan boyanın miktarı, kültür içinde metabolik olarak aktif olan hücrelerin sayısı ile doğrudan ilişkilidir. 96 kuyucuklu platelere ekilen süspanse veya adherent hücreler yıkanma ya da toplanma gibi herhangi bir ön işleme ihtiyaç duyulmaksızın 30 dk - 4sa arası WST-1 ile inkübe edildikten sonra oluşan formazan boya miktarı spektrofotometre ile ölçülür. Ölçülen absorbans değeri canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır.



Şekil 16: WST-1 testinin prensibi

Sitotoksiste deneyleri için en uygun hücre sayısını belirlemek amacıyla deney seti kurulmuştur. Doksanaltı kuyucuklu plaklarda 50µl RPMI ve 50µl $2 \times 10^6 - 6.25 \times 10^4$ hücre/ml yoğunluk aralığında hücreler ekilmiştir.

Sitotoksiste deneyi bu sonuçlar doğrultusunda her hücre için üç gün ve üç tekrarlı olacak şekilde kurulmuştur. K-562 ve NCI-BL 2171 hücre hatları 6×10^5 hücre/ml yoğunluğunda her kuyucuğa 50µl hacminde ayrı ayrı 96 kuyucuklu plaklara ekilmiştir. Ruxolitinib etken maddesi 100µM – 100nM doz aralığında her kuyucuktaki son hacim 100µl olacak şekilde hücreler üzerine eklenmiştir. Etken maddenin uygulanmadığı son yatay sıradaki hücre grubu kontrol olarak alınmıştır. Hücrelerin etken madde ile 24., 48. ve 72. saatlerdeki inkübasyonlarının ardından her kuyucuğa 10µl WST-1 solüsyonu eklenmiş, 15 dakikada bir Multiskan FC (Thermo) mikropalak okuyucusu kullanılarak formazan boya oluşumunun kalitatif değeri 450 ve 620 nm’ de fotometrik olarak ölçülmüştür. Ruxolitinib etken maddesinin K-562 ve NCI-BL 2171 hücreleri üzerindeki IC_{50} değeri GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc) yazılımı kullanılarak hesaplanmıştır.

3.5. Apoptoz Analizleri

Ruxolitinibin hücre hatları üzerindeki apoptotik etkisinin belirlenmesi amacıyla etken maddenin IC_{50} dozu hücre hatlarına uygulandıktan sonra 24., 48. ve 72. saatlerde iki farklı yöntem kullanılarak apoptoz analizleri gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar akım sitometrisi cihazı (BD Accuri C6) ve cihaza ait yazılımla değerlendirilmiştir. Etken maddenin uygulanmadığı gruplar kontrol grubu olarak alınmıştır.

3.5.1. JC-1 Yöntemi

JC-1 yöntemi (The BD MitoScreen Kit, BD Biosciences Pharmingen Cat.No: 551302) akım sitometrisi ile apoptoz ve mitokondriyal membran potansiyeli ($\Delta\psi$) değişimi arasındaki ilişkiyi kullanan analiz yöntemidir. Mitokondri sitokrom c aracılığıyla apoptozda kritik role sahiptir. Mitokondriyal solunum zincirinde oksitleme reaksiyonları esnasında üretilen enerji mitokondriyal zarın üzerinde negatif bir elektro-kimyasal gradyan olarak saklanır ve polarize $\Delta\psi$ olarak tanımlanır. Depolarize $\Delta\psi$ oluşumu sitokrom c salınımı için bir ön koşul olarak apoptoz sırasında meydana gelen ilk olaydır. JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide) hücrelere nüfuz edebilen membranı geçebilen, $\Delta\psi$ probu olarak kullanılan lipofilik katyonik florokromdur ve floresansı $\Delta\psi$ 'nin bir yansımasıdır. JC-1 $\Delta\psi$ duyarlı olarak ilk J-agregat oluşturan (1st J-aggregate-forming cationic dye) boya anlamına gelmektedir. JC-1 floresans emisyon spektrumu $\Delta\psi$ durumuna göre belirlenen konsantrasyonuna bağlıdır. JC-1 her biri farklı emisyon spektrumuna sahip iki farklı agregat veya monomerler formunda bulunabilir. JC-1 düşük konsantrasyonda monomerleri, yüksekte ise agregatları oluşturur. İki durum da akış sitometrisinin yeşil kanalında (FL-1) floresans sergiler. Canlı hücreler, JC-1 ile inkübe edildiğinde, JC-1 monomerler olarak plazma zarına nüfuz eder. Mitokondriye JC-1 alınması $\Delta\psi$ tarafından tetiklenir. Normal, sağlıklı bir mitokondride $\Delta\psi$ polarizedir ve JC-1 hızlı bir şekilde mitokondri tarafından alınır. Bu alım mitokondri içinde JC-1 agregatlarının oluşumuna yol açacak şekilde JC-1'in konsantrasyonunu yükseltir. JC-1 agregatları akış sitometrisinde kırmızı (FL-2) kanal içinde ölçülen kırmızı ışık emisyonunu artırır. Sağlıklı hücreler polarize $\Delta\psi$ sahiptir ve dolayısıyla FL-1, FL-2 kanallarının ikisi de floresan gösterir. FL-2 kanalındaki

flüoresans azalması depolarize $\Delta\psi$ göstergesidir. Depolarize $\Delta\psi$ ise apoptoz nedeniyle değiştirilmiş/bozulmuş mitokondriyal fonksiyonu işaret eder. JC-1 480-590 nm referans aralığında okunur, monomerler en iyi 527, agregatlar ise 590 nm’ de belirgindir.

Ruxolitinibin hücreler üzerindeki apoptotik etkisinin mitokondri membran potansiyel değişimi aracılığıyla değerlendirilmesi, etken maddenin IC₅₀ dozu uygulanan hücreler JC-1 yöntem protokolü doğrultusunda gerçekleştirilen işlemlerin ardından akım sitometrisinde (BD Accuri C6) 20.000 hücrenin sayımı ile gerçekleştirilmiştir.

JC-1 Yöntemi Kit Reaktiflerinin Hazırlanması

10x Çalışma Tamponunun Seyreltilmesi

I.10x çalışma tamponu 37°C’lik su banyosunda, içinde herhangi bir tuz kristali kalmayacak şekilde nazikçe çözülmüştür.

II.10x çalışma tamponu 1:10 oranında deiyonize H₂O ile dilüe edilmiştir.

III. Dilüsyon 5 dk vortekslenmiştir.

JC-1 Stok Solüsyonunun Hazırlanması

I. Liyofilize JC-1 reaktifinin 1 tüpüne oda sıcaklığında bulunan 125µl DMSO eklenmiştir.

II. Tüp alt üst edilerek reaktifin tamamen çözünmesi sağlanmıştır.

III. Stok solüsyon ışık almamak koşuluyla -20°C’de 6 aya kadar muhafaza edilebilmektedir.

JC-1 Çalışma Solüsyonunun Hazırlanması

I. 1x çalışma tamponu 37°C’ye getirilmiştir.

II. JC-1 stok solüsyonu tampon kullanılarak 1:100 oranında dilüe edilmiştir.

III. Dilüsyon 5 dk vortekslenmiştir.

JC-1 Yöntem Protokolü

I. K-562 ve NCI- BL 2171 hücre hatları ruxolitinibin IC₅₀ dozuna 24, 48 ve 72 saat süreyle maruz bırakılmıştır.

II. Her uygulama zaman grubu ve hücre grubu için 5x10⁵ hücre/ml santrifüj tüplerine toplanmıştır.

III. Hücreler 5 dk 400g’ de santrifüjlenmiştir.

IV. Santrifüjlenen hücrelerden süpernatant kısmı dikkatlice uzaklaştırılmıştır.

V. Her bir gruba 0.5ml JC-1 çalışma solüsyonu eklenerek pipetlenmiştir.

VI. Hücreler 37°C’de 15dk inkübe edilmiştir.

VII. Her bir tüpe 2ml 1x çalışma tamponu eklenerek pipetlenmiş, 5dk 400g’ de santrifüjlenmiştir.

VIII. Santrifüjlenen hücrelerden süpernatant kısmı dikkatlice uzaklaştırılmıştır.

IX. Her bir tüpe 1ml 1x çalışma tamponu eklenerek pipetlenmiş, 5dk 400g’ de santrifüjlenmiştir.

X. Santrifüjlenen hücrelerden süpernatant kısmı dikkatlice uzaklaştırılmıştır.

XI. Her bir tüpe 0.5ml 1x çalışma tamponu eklenerek pipetlenmiştir.

XII. Hücreler akım sitometrisi ile analiz edilmiştir.

3.5.2. Annexin V Yöntemi

Plazma membranında meydana gelen değişiklikler apoptoza uğrayan hücrelerin ilk özelliklerinden biridir. Apoptotik hücrelerde bir zar fosfolipidi olan fosfatidilserin (PS), plazma membranının iç kısmından dışına doğru transloke olur. Annexin V, PS için yüksek bir afiniteye sahip olan, 35-36 kDa'lık bir Ca^{+2} bağımlı fosfolipid bağlayıcı proteindir ve yüzeyinde PS bulunduran hücrelere bağlanır. Annexin V erken apoptotik süreçte oluşan PS'ye yüksek derecede spesifik olduğundan apoptotik hücreler için hassas bir probtur. Akım sitometrisinde hücrelerin tanımlanması için Fluorescein Isothiocyanate (FITC) ile konjuge edilir. PS'nin dışa bölgeye doğru hareket etmesi DNA fragmentasyonu gibi nükleer değişimlerden önce ortaya çıktığından yöntem apoptotik hücreleri erken evrede tanımlaması açısından spesifiktir. Dış hücre yüzeyine PS translokasyonu geç apoptotik ya da nekrotik hücrelerde de meydana geldiğinden erken apoptotik hücrelerin ayrımı vital bir boya olan Propidium iodide (PI) ile sağlanır. Annexin V-FITC (BD Pharmingen Cat.No: 556420) kiti kullanılarak erken apoptotik hücreler (Annexin V-FITC pozitif, PI negatif) ile geç apoptotik ve nekrotik hücrelerin (Annexin V-FITC ve PI pozitif) ayrımı gerçekleştirilmektedir.

Ruxolitinibin hücreler üzerindeki apoptotik etkisinin hücre membranındaki PS aracılığıyla değerlendirilmesi, etken maddenin IC_{50} dozu uygulanan hücreler Annexin V yöntem protokolü doğrultusunda gerçekleştirilen işlemlerin ardından BD ACCURI C6 (BD Biosciences Pharmingen) akım sitometrisinde 20.000 hücrenin sayısı ile gerçekleştirilmiştir.

Annexin V Yöntemi Kit Reaktiflerinin Hazırlanması

I. 10x Annexin V Bağlanma Tamponu 1:10 oranında distile H_2O ile dilüe edilmiştir.

Annexin V Yöntem Protokolü

I. K-562 ve NCI- BL 2171 hücre hatları ruxolitinibin IC_{50} dozuna 24, 48 ve 72 saat süreyle maruz bırakılmıştır.

II. Her uygulama zaman ve doz grubu ve hücre grubu için 5×10^5 hücre /1ml santrifüj tüplerine toplanmıştır.

III. Hücreler 5dk 400g' de santrifüjlenmiştir.

IV. Santrifüjlenen hücrelerden süpernatant kısmı dikkatlice uzaklaştırılmıştır.

V. Her bir gruba 1ml soğuk DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Biological industries Cat.No: 02-020-1) eklenerek pipetlenmiştir.

VI. Hücreler 5 dk 400g' de santrifüjlenmiştir.

VII. Santrifüjlenen hücrelerden süpernatant kısmı dikkatlice uzaklaştırılarak yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem toplam iki defa uygulanmıştır.

VIII. Her bir tüpe 100µl 1x Bağlanma Tamponu, 5µl FITC Annexin V ve 5µl PI eklenerek pipetlenmiştir. Kontrol olarak kullanılmak üzere bir gruba hiç boya uygulanmamış, bir gruba yalnızca FITC Annexin V diğer bir gruba da yalnızca PI uygulanmıştır.

IX. Karışımlar nazikçe vorteksenerek karanlıkta 25°C'de 15 dk inkübasyona bırakılmıştır.

X. Her bir tüpe 400µl 1x Bağlanma Tamponu eklenerek pipetlenmiştir.

XI. Hücreler akım sitometrisi ile analizler gerçekleştirilmiştir.

3.6. Otofaji Analizi

Otofaji hücre canlılığı ve sağlığını korumak için hasar görmüş ya da ihtiyaç duyulmayan hücresel içeriğin geri dönüşüme uğratıldığı sıkı şekilde düzenlenen katabolik bir süreçtir. En iyi karakterize edilmiş otofaji belirteci LC3B'dir. Sitoplazmada serbest halde bulunan LC3B-I otofagozom yapısına katılarak LC3B-II haline dönüşmektedir. Çalışmada kullanılan Premo TM Autophagy Tb/GFP TR-FRET LC3B Expression Kiti (Invitrogen Cat.No: A14070) hücrelerin otofaji sırasındaki GFP-etiketli LC3B ekspresyon aktivitelerini Tb-tabanlı TR-FRET immünoassay yaklaşımı ile ölçer. Kitin temel prensibinde; uygun konsantrasyondaki hücreler LC3B-GFP BacMam ile karıştırılarak 96 kuyucuklu plakalara ekilir. Sonraki gün, hücreler sitosolik LC3B-I'in otofagozom ilişkili LC3B-II'ye dönüşümünü başlatmak üzere otofajiyi indükleyen madde ile muamele edilir. Lizozomal inhibitör klorokin otofagozoma dönüşümü bloke ederek LC3B-II birikimine neden olmaktadır. İstenen zaman noktasında hücreler LC3B-II için güçlü bir seçicilik gösteren bir belirleme antikoru varlığında lizize edilir. Otofaji aktivitesini ölçmek için, LC3B-II 'nin rölatif seviyeleri, GFP-etiketli LC3B-II ile Tb-etiketli belirleme antikoru bağlandığında meydana gelen Tb/GFP TR-FRET yapısını saptayabilen bir floresan plak okuyucu kullanılarak ölçülür. Bu protokol, klorokin ya da diğer test bileşiğinin varlığında veya yokluğunda, LC3B GFP BacMam reaktifinin titrasyonunun test edilmesini sağlar.

BacMam Transdüksiyonu

- I. Çalışmanın birinci gününde K-562 ve NCI-BL 2171 hücreleri ortamdan toplanarak 1200 rpm'de 5dk santrifüjlenmiş ve fenol-kırmızı içermeyen ortamda (DMEM, with D-Glucose 4500mg/l (high Glucose), w/o Sodium Pyruvate, w/o L-Glutamine, w/o Phenol Red Cat.No:01-053-1A) 3.3×10^5 hücre/ml olacak şekilde tekrar süspanse edilmiştir.
- II. Dört defa 3:1 BacMam seri dilüsyonu fenol-kırmızı içermeyen ortam ile hazırlanmıştır.
- III. Hacim/ hacim titrasyon aralığı ~% 10 ile % 0.1 arasında olacak şekilde hücrelere BacMam eklenmiştir.
- IV. Şekil 16' da gösterilen yerleşme düzeniyle beyaz opak plakaya BacMam titrasyon değerleri ve hücreler, Tablo 6 ve Tablo 7'de gösterilen miktarlarda eklenmiştir.
- V. Hücreler GFP etiketli LC3B ekspresyonunu sağlamak için 37 °C'de % 5CO₂ ortamında 24 saat inkübe edilmiştir.

Tablo 6: Otofaji çalışma içeriğinin hazırlanması

<i>Çalışma İçeriği</i>	Miktar (96'lık plakada kuyucuk başına)
<i>BacMam/hücreler</i>	60 mikrolitre
<i>5X klorokin</i>	15 mikrolitre
<i>"Tam" 6x liziz tamponu</i>	15 mikrolitre
<i>Toplam</i>	90 mikrolitre

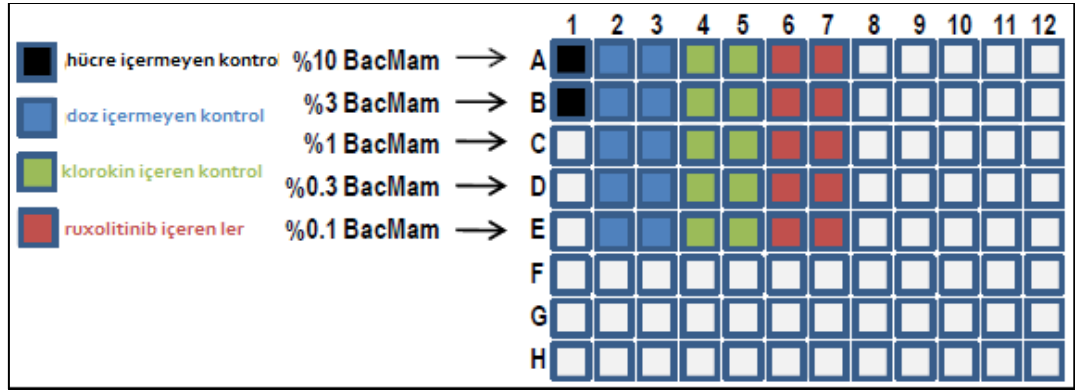
Tablo 7: “Tam” 6x liziz tamponunun hazırlanması

“Tam” 6x liziz tamponu için	
6x liziz tamponu	1mililitre
Protez inhibitörü	30 µL
Tb-Anti-LC3B antikoru	6µL

Madde Uygulanması

I. İkinci gün, 5x son konsantrasyonlarında klorokin ve ruxolitinin IC_{50} dozu plaka düzeninde gösterildiği gibi uygun kuyucuklara eklenmiştir (Şekil 16).

II. 24 sa 37°C'de % 5CO₂ ortamında inkübe edilmiştir.



Şekil 17: Otofaji plakası planı

TR-FRET Analizi

I. Üçüncü gün, tam 6x liziz tamponu (Proteaz inhibitörü ve Antikor eklenmiş) hazırlanmıştır.

II. Tamponun uygun hacminin ilave edilmesiyle hücreler lizize edilmiştir.

III. Plakalar ışıktan korunacak şekilde oda sıcaklığında 1-2 sa boyunca inkübe edilmiştir.

IV. Plakalar Tb TR-FRET uyumlu plaka okuyucu (Varioskan Flash Multimode, Thermo) ile 515 nm ve 488 nm dalga boylarında okutulmuştur.

V. Her bir kuyucuk için TR-FRET emisyon oranı (GFP akseptörü / Tb donör emisyon değerleri) (515 nm/488 nm) hesaplanarak veriler analiz edilmiştir.

3.7. Gen Ekspresyonu Değişim Analizleri

Ruxolitinin etken maddesinin IC_{50} dozunun 24., 48. ve 72. saatlerde K-562 lösemi ve NCI- BL 2171 kontrol hücre hatlarının gen ifade düzeylerinde oluşturduğu değişiklikler, doz uygulanmayan kontrol gruplarıyla karşılaştırılarak analiz edilmiştir.

3.7.1. Total RNA İzolasyonlarının Yapılması

Ruxolitinibin IC₅₀ dozu 24, 48 ve 72 saat boyunca hücrelere uygulanmış, doz uygulanmayan hücreler kontrol olarak alınarak, RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Cat. No: 74134) aracılığıyla tüm hücre gruplarından RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

Yöntem, hücrelerin RNaz'ları hızlı bir şekilde inaktif hale getirerek RNA'nın bozulmadan izolasyonunu gerçekleştiren yüksek guanidin-izotiyosiyanat içeren tampon içinde lizize ve homojenize edilmesinin ardından, lizatın önce DNA'yı seçici bir şekilde uzaklaştıran yüksek tuz içeriğine sahip dönüş kolonundan, ardından etanol uygulanmasıyla birlikte RNA'yı bağlayan membrandan oluşan dönüş kolonundan geçirilmesiyle izolasyonuna dayanmaktadır.

RNeasy Plus Mini Kit Reaktiflerinin Hazırlanması

I. 1ml RLT Plus tamponuna 10µl β-merkaptoetanol eklenmiştir.

II. RPE Buffer absöü etanol ile 1:4 hacim oranında dilüe edilerek çalışma solüsyonu hazırlanmıştır.

RNeasy Plus Mini Kit Protokolü

I. K-562 ve NCI- BL 2171 hücre hatları ruxolitinibin IC₅₀ dozuna 24, 48 ve 72 saat süreyle maruz bırakılmıştır.

II. Her uygulama zaman grubu ve kontrol grubu için 2x10⁶ hücre / ml santrifüj tüplerine toplanmıştır.

III. Hücreler 5dk 300 g' de santrifüjlenmiştir.

IV. Santrifüjlenen hücrelerden süpernatant kısmı dikkatlice uzaklaştırılmıştır.

V. Her bir gruba 350µl RLT Plus Tamponu eklenerek vortekslenmiştir.

VI. Homojenize lizatlar 2ml tüp içine yerleştirilen gDNA eleyici dönüş kolonuna aktararak 30 s 8000 g' de santrifüjlenmiştir.

VII. gDNA eleyici dönüş kolonu uzaklaştırılarak tüpe 350µl %70' lik etanol pipetlenmiştir

VIII. 700µl örnek 2ml tüp içine yerleştirilen RNeasy dönüş kolonuna aktararak 15s 8000 g' de santrifüjlenmiştir.

IX. Tüp içindeki kısım uzaklaştırılarak 500 µl RPE tamponu kolona eklenerek 15 s 8000g' de santrifüjlenmiştir.

X. Tüp içindeki kısım uzaklaştırılarak 500 µl RPE tamponu kolona eklenerek 2 dk 8000 g' de santrifüjlenmiştir.

XI. Kolonun altına yeni bir tüp koyularak 1 dk 8000 g' de santrifüjlenmiş, kolonun kuruması sağlanmıştır.

XII. Kolonun altına 1.5 ml ependorf tüp koyularak 50 µl RNase içermeyen H₂O eklenmiş, 1 dakika 8000 g' de santrifüjlenerek RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.7.2. RNA'nın Safflık ve Kalite Kontrolünün Yapılması

İzole edilen RNA örneklerinin konsantrasyonlarının ölçülmesi ve saflık değerlerinin belirlenmesi NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) cihazı ve yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçümler her RNA örneğinden 1µl kullanılarak A₂₆₀:A₂₈₀ ve A₂₆₀:A₂₃₀ nanometre dalga boylarındaki absorbanslarda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA örneklerinin ekspresyon analizlerinde kullanılabilir olması için A₂₆₀:A₂₈₀ nanometre dalga boylarındaki absorbans oranının 1.8- 2.0 aralığında, A₂₆₀:A₂₃₀ nanometre dalga boylarındaki absorbans oranının ise 1.7' den büyük olması

beklenmiştir. RNA örneklerinin miktar ölçümü ise 260 nm’ de dalga boyunda $\mu\text{g} / \text{ml}$ cinsinden gerçekleştirilmiş ve A_{260} ölçümü ile belirlenen konsantrasyon değerinin $40 \mu\text{g} / \text{ml}$ yüksek olması beklenmiştir.

3.7.3. cDNA Sentezinin Gerçekleştirilmesi

Saflık değerleri ve miktarları ölçülen RNA örneklerini gerçek-zamanlı PCR tabanlı gen ekspresyon değişimi analizlerinde kullanılabilir hale getirmek için her bir RNA örneğinin komplementer DNA’sı RT² First Strand Kit (Qiagen Cat. No:330401) kullanılarak sentezlenmiştir.

RT² First Strand Kit Protokolü

I. Her örnek için son miktar $0.5\mu\text{g}$ RNA olacak şekilde genomik DNA eliminasyon karışımı Tablo 8’ de gösterildiği gibi hazırlanmıştır.

Tablo 8: Genomik DNA eliminasyon karışımı hazırlanması

Bileşen	Miktar (1 örnek için)
RNA	0.5 mikrogram
GE Tamponu	2 mikrolitre
RNase içermeyen H_2O	Değişken
Toplam Hacim	10 mikrolitre

II. Karışımlar 42°C ’de 5dk inkübe edilerek hemen ardından hızlı bir şekilde buz üzerine alınarak 1dk buz üzerinde tutulmuştur.

III. Tablo 9’ da gösterildiği şekilde ters transkripsiyon karışımı hazırlanmıştır.

Tablo 9: Ters transkripsiyon karışımının hazırlanması

Bileşen	Miktar (1 örnek için)
5x BC3 Tamponu	4 mikrolitre
Kontrol P2	1 mikrolitre
RE3 Miks	2 mikrolitre
RNase içermeyen H_2O	3 mikrolitre
Toplam Hacim	10 mikrolitre

IV. $10\mu\text{l}$ genomik DNA eliminasyon karışımı içeren her bir tüpe $10\mu\text{l}$ ters transkripsiyon karışımı eklenerek nazikçe pipetlenmiştir.

V. Örnekler 42°C ’de 15 dk inkübe edilerek hemen ardından hızlı bir şekilde 95°C ’de 5 dk tutularak reaksiyon sonlandırılmıştır.

VI. Her bir örneğe $91\mu\text{l}$ RNase içermeyen H_2O eklenerek pipetlenmiştir.

3.7.4. Gerçek Zamanlı PCR Çalışmalarının Yapılması

Gerçek zamanlı PCR gen ekspresyon analizinde kullanılan yüksek duyarlılıktaki güvenilir kantitatif bir moleküler yöntemdir. Konvansiyonel PCR cihazlarının sağladığı uygun sıcaklık değişim döngüleri sağlama özelliklerinin, spesifik problemlerle birlikte bulunan floresan boyalarla birleştirilmesi ile ortaya çıkan bu hassas sistemler, amplifikasyon ürünlerinin artışının gerçek zamanlı olarak ölçümünün gerçekleştirilip takibinin yapılmasını sağlamış, PCR ürünlerinin değerlendirilmesi için jel elektroforezi gibi işlemlere ihtiyacı ortadan kaldırarak çok sayıda örneğin hızlı ve kontaminasyon riskinden uzak şekilde analizinin gerçekleştirilmesine olanak tanımıştır.

Tez çalışmamız kapsamında bulunan gen ekspresyonlarının değişiminin belirlenmesi çalışmalarında 96 ve 384 kuyucuklu plakalar ile çalışan gerçek zamanlı PCR cihazı (LightCycler 480 Instrument II, Roche) ile SYBR Green metodu kullanılmıştır. SYBR Green boyası sadece çift sarmallı DNA'nın küçük oluşuna bağlanarak 497 nm'de dalga boyundaki mavi ışığı emerek 520 nm dalga boyunda yeşil ışık yansıtan bir DNA- boya kompleksi oluşturabilen, dayanıklı yapıda bir boyadır. Tez çalışmamız kapsamında kullanılan RT² SYBR Green qPCR Mastermiks (Qiagen, Cat.No: 330502) gerçek zamanlı PCR tampon çözeltisi, HotStart DNA Taq polimeraz enzimi ve çift sarmal DNA'nın her iki oluşuna da bağlanarak ışımaya yapabilecek şekilde modifiye edilmiş SYBR Green boyası içermektedir.

Hazır tasarım PCR profilleri yolaklar ya da hastalık mekanizmaları gibi biyolojik süreçlerle ilişkili hem nadir hem de sık bulunan genlerin kombinasyonunu bulunduran ve bir dizi internal kontrole sahip kullanışlı sistemlerdir. Tez çalışmamızda ruxolitinibin IC₅₀ dozunun uygulandığı hücre gruplarından ve doz uygulamasının yapılmadığı kontrol hücre gruplarından elde edilen ve ardından cDNA sentezi gerçekleştirilen örnekler apoptoz (Qiagen,Cat.No: 330231 PAHS-012ZA), otofaji (Qiagen,Cat.No: 330231 PAHS-084ZA) ve lösemi (Qiagen,Cat.No: 330231 PAHS-0137ZA) ilişkili genleri taşıyan 96 kuyucuklu hazır tasarımlı üç farklı PCR profili ile çalışılmıştır. 96 kuyucuklu plakalarda 84 kuyucuk hastalık ya da yolak ile ilişkili genleri içermektedir. Bunun yanı sıra internal kontrol olarak her plate; verilerin normalizasyonunu sağlamak için beş adet housekeeping gen, transkribe olmamış genomik DNA kontaminasyonunun tespitini sağlayan bir adet genomik DNA kontrolü, ters transkripsiyon reaksiyonunun kontrolünü sağlayan üç adet ters transkripsiyon kontrolü ve taşıdığı yapay DNA sekansı ile PCR etkinliğini test eden üç adet pozitif PCR kontrolü bulundurmaktadır.

Kullanılan PCR Plakalarının Gen Düzenleri

Tablo 10: Apoptoz plakasının gen dizilimi

ABL1 A01	AIFM1 A02	AKT1 A03	APAF1 A04	BAD A05	BAG1 A06	BAG3 A07	BAK1 A08	BAX A09	BCL10 A10	BCL2 A11	BCL2A1 A12
BCL2L1 B01	BCL2L10 B02	BCL2L11 B03	BCL2L2 B04	BFAR B05	BID B06	BIK B07	BIRC2 B08	BIRC3 B09	BIRC5 B10	BIRC6 B11	BNIP2 B12
BNIP3 C01	BNIP3L C02	BRAF C03	CASP1 C04	CASP10 C05	CASP14 C06	CASP2 C07	CASP3 C08	CASP4 C09	CASP5 C10	CASP6 C11	CASP7 C12
CASP8 D01	CASP9 D02	CD27 D03	CD40 D04	CD40LG D05	CD70 D06	CFLAR D07	CIDEA D08	CIDEB D09	CRADD D10	CYCS D11	DAPK1 D12
DFFA E01	DIABLO E02	FADD E03	FAS E04	FASLG E05	GADD45A E06	HRK E07	IGF1R E08	IL10 E09	LTA E10	LTBR E11	MCL1 E12
NAIP F01	NFKB1 F02	NOD1 F03	NOL3 F04	PYCARD F05	RIPK2 F06	TNF F07	TNFRSF10A F08	TNFRSF10B F09	TNFRSF11B F10	TNFRSF1A F11	TNFRSF1B F12
TNFRSF21 G01	TNFRSF25 G02	TNFRSF9 G03	TNFRSF10 G04	TNFRSF8 G05	TP53 G06	TP53BP2 G07	TP73 G08	TRADD G09	TRAF2 G10	TRAF3 G11	XIAP G12
ACTB H01	B2M H02	GAPDH H03	HPRT1 H04	RPLP0 H05	HGDC H06	RTC H07	RTC H08	RTC H09	PPC H10	PPC H11	PPC H12

Tablo 11: Apoptoz plakasında bulunan genler

Pozisyon	Sembol	Tanım
A01	ABL1	C-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase
A02	AIFM1	Apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated, 1
A03	AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
A04	APAF1	Apoptotic peptidase activating factor 1
A05	BAD	BCL2-associated agonist of cell death
A06	BAG1	BCL2-associated athanogene
A07	BAG3	BCL2-associated athanogene 3
A08	BAK1	BCL2-antagonist/killer 1
A09	BAX	BCL2-associated X protein
A10	BCL10	B-cell CLL/lymphoma 10
A11	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
A12	BCL2A1	BCL2-related protein A1
B01	BCL2L1	BCL2-like 1
B02	BCL2L10	BCL2-like 10 (apoptosis facilitator)
B03	BCL2L11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
B04	BCL2L2	BCL2-like 2
B05	BFAR	Bifunctional apoptosis regülatör
B06	BID	BH3 interacting domain death agonist
B07	BIK	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)
B08	BIRC2	Baculoviral IAP repeat containing 2
B09	BIRC3	Baculoviral IAP repeat containing 3
B10	BIRC5	Baculoviral IAP repeat containing 5
B11	BIRC6	Baculoviral IAP repeat containing 6
B12	BNIP2	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 2
C01	BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3
C02	BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like
C03	BRAF	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
C04	CASP1	Caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase
C05	CASP10	Caspase 10, apoptosis-related cysteine peptidase
C06	CASP14	Caspase 14, apoptosis-related cysteine peptidase
C07	CASP2	Caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase
C08	CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase
C09	CASP4	Caspase 4, apoptosis-related cysteine peptidase
C10	CASP5	Caspase 5, apoptosis-related cysteine peptidase
C11	CASP6	Caspase 6, apoptosis-related cysteine peptidase
C12	CASP7	Caspase 7, apoptosis-related cysteine peptidase
D01	CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase
D02	CASP9	Caspase 9, apoptosis-related cysteine peptidase
D03	CD27	CD27 molecule
D04	CD40	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5
D05	CD40LG	CD40 ligand
D06	CD70	CD70 molecule
D07	CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator
D08	CIDEA	Cell death-inducing DFFA-like effector a
D09	CIDEB	Cell death-inducing DFFA-like effector b
D10	CRADD	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain
D11	CYCS	Cytochrome c, somatic
D12	DAPK1	Death-associated protein kinase 1
E01	DFFA	DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide
E02	DIABLO	Diablo, IAP-binding mitochondrial protein
E03	FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain
E04	FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
E05	FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
E06	GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
E07	HRK	Harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain)
E08	IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
E09	IL10	Interleukin 10
E10	LTA	Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)
E11	LTBR	Lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)
E12	MCL1	Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)
F01	NAIP	NLR family, apoptosis inhibitory protein

F02	NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
F03	NOD1	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1
F04	NOL3	Nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)
F05	PYCARD	PYD and CARD domain containing
F06	RIPK2	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2
F07	TNF	Tumor necrosis factor
F08	TNFRSF10A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a
F09	TNFRSF10B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
F10	TNFRSF11B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b
F11	TNFRSF1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
F12	TNFRSF1B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B
G01	TNFRSF21	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21
G02	TNFRSF25	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25
G03	TNFRSF9	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9
G04	TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
G05	TNFSF8	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8
G06	TP53	Tumor protein p53
G07	TP53BP2	Tumor protein p53 binding protein, 2
G08	TP73	Tumor protein p73
G09	TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain
G10	TRAF2	TNF receptor-associated factor 2
G11	TRAF3	TNF receptor-associated factor 3
G12	XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
H01	ACTB	Actin, beta
H02	B2M	Beta-2-microglobulin
H03	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H04	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
H05	RPLP0	Ribosomal protein, large, P0
H06	HGDC	Human Genomic DNA Contamination
H07	RTC	Reverse Transcription Control
H08	RTC	Reverse Transcription Control
H09	RTC	Reverse Transcription Control
H10	PPC	Positive PCR Control
H11	PPC	Positive PCR Control
H12	PPC	Positive PCR Control

Tablo 12: Otofaji plakasının gen dizilimi

AKT1 A01	AMBRA1 A02	APP A03	ATG10 A04	ATG12 A05	ATG16L1 A06	ATG16L2 A07	ATG3 A08	ATG4A A09	ATG4B A10	ATG4C A11	ATG4D A12
ATG5 B01	ATG7 B02	ATG9A B03	ATG9B B04	BAD B05	BAK1 B06	BAX B07	BCL2 B08	BCL2L1 B09	BECN1 B10	BID B11	BNIP3 B12
CASP3 C01	CASP8 C02	CDKN1B C03	CDKN2A C04	CLN3 C05	CTSB C06	CTSD C07	CTSS C08	CXCR4 C09	DAPK1 C10	DRAM1 C11	DRAM2 C12
EIF2AK3 D01	EIF4G1 D02	ESR1 D03	FADD D04	FAS D05	GAA D06	GABARAP D07	GABARAPL1 D08	GABARAPL2 D09	HDAC1 D10	HDAC6 D11	HGS D12
HSP90AA1 E01	HSPA8 E02	HTT E03	IFNG E04	IGF1 E05	INS E06	IRGM E07	LAMP1 E08	MAP1LC3A E09	MAP1LC3B E10	MAPK14 E11	MAPK8 E12
MTOR F01	NFKB1 F02	NPC1 F03	PIK3C3 F04	PIK3CG F05	PIK3R4 F06	PRKAA1 F07	PTEN F08	RAB24 F09	RB1 F10	RGS19 F11	RPS6KB1 F12
SNCA G01	SQSTM1 G02	TGFB1 G03	TGM2 G04	TMEM74 G05	TNF G06	TNFSF10 G07	TP53 G08	ULK1 G09	ULK2 G10	UVRAG G11	WIP1 G12
ACTB H01	B2M H02	GAPDH H03	HPRT1 H04	RPLP0 H05	HGDC H06	RTC H07	RTC H08	RTC H09	PPC H10	PPC H11	PPC H12

Tablo 13: Otofaji plakasında bulunan genler

Pozisyon	Sembol	Tanım
A01	AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
A02	AMBRA1	Autophagy/beclin-1 regulator 1
A03	APP	Amyloid beta (A4) precursor protein
A04	ATG10	ATG10 autophagy related 10 homolog (S. cerevisiae)
A05	ATG12	ATG12 autophagy related 12 homolog (S. cerevisiae)
A06	ATG16L1	ATG16 autophagy related 16-like 1 (S. cerevisiae)
A07	ATG16L2	ATG16 autophagy related 16-like 2 (S. cerevisiae)

A08	ATG3	ATG3 autophagy related 3 homolog (S. cerevisiae)
A09	ATG4A	ATG4 autophagy related 4 homolog A (S. cerevisiae)
A10	ATG4B	ATG4 autophagy related 4 homolog B (S. cerevisiae)
A11	ATG4C	ATG4 autophagy related 4 homolog C (S. cerevisiae)
A12	ATG4D	ATG4 autophagy related 4 homolog D (S. cerevisiae)
B01	ATG5	ATG5 autophagy related 5 homolog (S. cerevisiae)
B02	ATG7	ATG7 autophagy related 7 homolog (S. cerevisiae)
B03	ATG9A	ATG9 autophagy related 9 homolog A (S. cerevisiae)
B04	ATG9B	ATG9 autophagy related 9 homolog B (S. cerevisiae)
B05	BAD	BCL2-associated agonist of cell death
B06	BAK1	BCL2-antagonist/killer 1
B07	BAX	BCL2-associated X protein
B08	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
B09	BCL2L1	BCL2-like 1
B10	BECN1	Beclin 1, autophagy related
B11	BID	BH3 interacting domain death agonist
B12	BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3
C01	CASP3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine peptidase
C02	CASP8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine peptidase
C03	CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)
C04	CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)
C05	CLN3	Ceroid-lipofuscinosis, neuronal 3
C06	CTSB	Cathepsin B
C07	CTSD	Cathepsin D
C08	CTSS	Cathepsin S
C09	CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4
C10	DAPK1	Death-associated protein kinase 1
C11	DRAM1	DNA-damage regulated autophagy modulator 1
C12	DRAM2	DNA-damage regulated autophagy modulator 2
D01	EIF2AK3	Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3
D02	EIF4G1	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 1
D03	ESR1	Estrogen receptor 1
D04	FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain
D05	FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
D06	GAA	Glucosidase, alpha; acid
D07	GABARAP	GABA(A) receptor-associated protein
D08	GABARAPL1	GABA(A) receptor-associated protein like 1
D09	GABARAPL2	GABA(A) receptor-associated protein-like 2
D10	HDAC1	Histone deacetylase 1
D11	HDAC6	Histone deacetylase 6
D12	HGS	Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate
E01	HSP90AA1	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1
E02	HSPA8	Heat shock 70kDa protein 8
E03	HTT	Huntingtin
E04	IFNG	Interferon, gamma
E05	IGF1	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
E06	INS	Insulin
E07	IRGM	Immunity-related GTPase family, M
E08	LAMP1	Lysosomal-associated membrane protein 1
E09	MAP1LC3A	Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha
E10	MAP1LC3B	Microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta
E11	MAPK14	Mitogen-activated protein kinase 14
E12	MAPK8	Mitogen-activated protein kinase 8
F01	MTOR	Mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)
F02	NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
F03	NPC1	Niemann-Pick disease, type C1
F04	PIK3C3	Phosphoinositide-3-kinase, class 3
F05	PIK3CG	Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide
F06	PIK3R4	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 4
F07	PRKAA1	Protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit
F08	PTEN	Phosphatase and tensin homolog
F09	RAB24	RAB24, member RAS oncogene family
F10	RB1	Retinoblastoma 1
F11	RGS19	Regulator of G-protein signaling 19

F12	RPS6KB1	Ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1
G01	SNCA	Synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor)
G02	SQSTM1	Sequestosome 1
G03	TGFB1	Transforming growth factor, beta 1
G04	TGM2	Transglutaminase 2
G05	TMEM74	Transmembrane protein 74
G06	TNF	Tumor necrosis factor
G07	TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
G08	TP53	Tumor protein p53
G09	ULK1	Unc-51-like kinase 1 (C. elegans)
G10	ULK2	Unc-51-like kinase 2 (C. elegans)
G11	UVRAG	UV radiation resistance associated gene
G12	WIP1	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 1
H01	ACTB	Actin, beta
H02	B2M	Beta-2-microglobulin
H03	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H04	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
H05	RPLP0	Ribosomal protein, large, P0
H06	HGDC	Human Genomic DNA Contamination
H07	RTC	Reverse Transcription Control
H08	RTC	Reverse Transcription Control
H09	RTC	Reverse Transcription Control
H10	PPC	Positive PCR Control
H11	PPC	Positive PCR Control
H12	PPC	Positive PCR Control

Tablo 14: Lösemi plakasının gen dizilimi

ABL1 A01	AKT1 A02	ALOX5 A03	APAF1 A04	BAALC A05	BCL2 A06	BCR A07	BMPR1B A08	BTG3 A09	CADM1 A10	CCL3 A11	CD34 A12
CDC42EP3 B01	CDH1 B02	CDH13 B03	CDKN1A B04	CDKN1B B05	CDKN1C B06	CDKN2B B07	CEBPB B08	CSF3 B09	CTGF B10	CTNNB1 B11	CXCL10 B12
DAPK1 C01	DKK3 C02	DLC1 C03	EGR3 C04	FGR C05	FOXO3 C06	GAS2L3 C07	GATA1 C08	GRB2 C09	HCK C10	HDAC1 C11	HIC1 C12
HSP90AA1 D01	IFNA1 D02	IKZF3 D03	IL10 D04	IL12A D05	IL1R1 D06	IL4 D07	IL6 D08	IL8 D09	JAK2 D10	JUN D11	JUNB D12
LMO1 E01	LMO2 E02	LYL1 E03	MCL1 E04	MEIS1 E05	MERTK E06	MLH1 E07	MN1 E08	MTOR E09	NFKB1 E10	NPM1 E11	NR4A3 E12
PML F01	PRKCB F02	PTEN F03	RAC2 F04	RGS12 F05	RUNX1 F06	RUNX2 F07	RUNX3 F08	SFRP2 F09	SFRP4 F10	SFRP5 F11	SHC1 F12
SMO G01	SOCS1 G02	SPI1 G03	STAT1 G04	STAT3 G05	STAT5A G06	STAT5B G07	TAL1 G08	TLX1 G09	TLX3 G10	TP53 G11	WIF1 G12
ACTB H01	B2M H02	GAPDH H03	HPRT1 H04	RPLP0 H05	HGDC H06	RTC H07	RTC H08	RTC H09	PPC H10	PPC H11	PPC H12

Tablo 15: Lösemi plakasında bulunan genler

Pozisyon	Sembol	Tanım
A01	ABL1	C-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase
A02	AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
A03	ALOX5	Arachidonate 5-lipoxygenase
A04	APAF1	Apoptotic peptidase activating factor 1
A05	BAALC	Brain and acute leukemia, cytoplasmic
A06	BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2
A07	BCR	Breakpoint cluster region
A08	BMPR1B	Bone morphogenetic protein receptor, type IB
A09	BTG3	BTG family, member 3
A10	CADM1	Cell adhesion molecule 1
A11	CCL3	Chemokine (C-C motif) ligand 3
A12	CD34	CD34 molecule
B01	CDC42EP3	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3
B02	CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
B03	CDH13	Cadherin 13, H-cadherin (heart)
B04	CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
B05	CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)

B06	CDKN1C	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)
B07	CDKN2B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)
B08	CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta
B09	CSF3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)
B10	CTGF	Connective tissue growth factor
B11	CTNNB1	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa
B12	CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10
C01	DAPK1	Death-associated protein kinase 1
C02	DKK3	Dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)
C03	DLC1	Deleted in liver cancer 1
C04	EGR3	Early growth response 3
C05	FGR	Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog
C06	FOXO3	Forkhead box O3
C07	GAS2L3	Growth arrest-specific 2 like 3
C08	GATA1	GATA binding protein 1 (globin transcription factor 1)
C09	GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2
C10	HCK	Hemopoietic cell kinase
C11	HDAC1	Histone deacetylase 1
C12	HIC1	Hypermethylated in cancer 1
D01	HSP90AA1	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1
D02	IFNA1	Interferon, alpha 1
D03	IKZF3	IKAROS family zinc finger 3 (Aiolos)
D04	IL10	Interleukin 10
D05	IL12A	Interleukin 12A
D06	IL1R1	Interleukin 1 receptor, type I
D07	IL4	Interleukin 4
D08	IL6	Interleukin 6 (interferon, beta 2)
D09	IL8	Interleukin 8
D10	JAK2	Janus kinase 2
D11	JUN	Jun proto-oncogene
D12	JUNB	Jun B proto-oncogene
E01	LMO1	LIM domain only 1 (rhombotin 1)
E02	LMO2	LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)
E03	LYL1	Lymphoblastic leukemia derived sequence 1
E04	MCL1	Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)
E05	MEIS1	Meis homeobox 1
E06	MERTK	C-mer proto-oncogene tyrosine kinase
E07	MLH1	MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)
E08	MN1	Meningioma (disrupted in balanced translocation) 1
E09	MTOR	Mechanistic target of rapamycin (serine/threonine kinase)
E10	NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
E11	NPM1	Nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)
E12	NR4A3	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3
F01	PML	Promyelocytic leukemia
F02	PRKCB	Protein kinase C, beta
F03	PTEN	Phosphatase and tensin homolog
F04	RAC2	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 2
F05	RGS12	Regulator of G-protein signaling 12
F06	RUNX1	Runt-related transcription factor 1
F07	RUNX2	Runt-related transcription factor 2
F08	RUNX3	Runt-related transcription factor 3
F09	SFRP2	Secreted frizzled-related protein 2
F10	SFRP4	Secreted frizzled-related protein 4
F11	SFRP5	Secreted frizzled-related protein 5
F12	SHC1	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1
G01	SMO	Smoothed, frizzled family receptor
G02	SOCS1	Suppressor of cytokine signaling 1
G03	SPI1	Spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene spi1
G04	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa
G05	STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
G06	STAT5A	Signal transducer and activator of transcription 5A
G07	STAT5B	Signal transducer and activator of transcription 5B
G08	TAL1	T-cell acute lymphocytic leukemia 1
G09	TLX1	T-cell leukemia homeobox 1

G10	TLX3	T-cell leukemia homeobox 3
G11	TP53	Tumor protein p53
G12	WIF1	WNT inhibitory factor 1
H01	ACTB	Actin, beta
H02	B2M	Beta-2-microglobulin
H03	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H04	HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
H05	RPLP0	Ribosomal protein, large, P0
H06	HGDC	Human Genomic DNA Contamination
H07	RTC	Reverse Transcription Control
H08	RTC	Reverse Transcription Control
H09	RTC	Reverse Transcription Control
H10	PPC	Positive PCR Control
H11	PPC	Positive PCR Control
H12	PPC	Positive PCR Control

Gerçek zamanlı PCR Çalışma Protokolü

I. Tamamen çözünmüş olan RT² SYBR Green mastermiks vortekslenmiştir, 10- 15 sn nazıkçe santrifüjlenmiştir.

II. PCR bileşenleri 0.5ml ependorf tüp içinde Tablo 16’ da gösterilen miktarlarda hazırlanmıştır.

Tablo 16: PCR bileşenlerinin hazırlanması

<i>Bileşen</i>	<i>Miktar (1 örnek için)</i>
<i>RT² SYBR Green Mastermiks</i>	1350 mikrolitre
cDNA sentez reaksiyonu	102 mikrolitre
RNase içermeyen H ₂ O	1248 mikrolitre
<i>Toplam Hacim</i>	2700 mikrolitre

III. Karışım nazıkçe santrifüjlenerek yükleme rezervuarına eklenmiş ardından 8 kanallı çoklu pipet kullanılarak her kuyucuğa 25µl karışım pipetlenmiştir.

IV. Plakalar ince, optik, yapışkan filmle sıkıca kapatılmıştır

V. Plakalar oda sıcaklığında 1000 g’ de 1 dk santrifüjlenmiştir.

VI. Plakalar LightCycler 480 cihazında Tablo 17’ de görülen PCR programında çalıştırılmıştır. Değişim oranı 1.5°C/ s ayarlanmıştır.

Tablo 17: PCR program protokolü

<i>Döngü Sayısı</i>	<i>Süre</i>	<i>Sıcaklık</i>	<i>Yorum</i>
1	10 dakika	95°C	Hot Start DNA Taq polimeaz aktivasyonu
45	15 saniye	95°C	Floresan dataların elde edilmesi
	1 dakika	60°C	

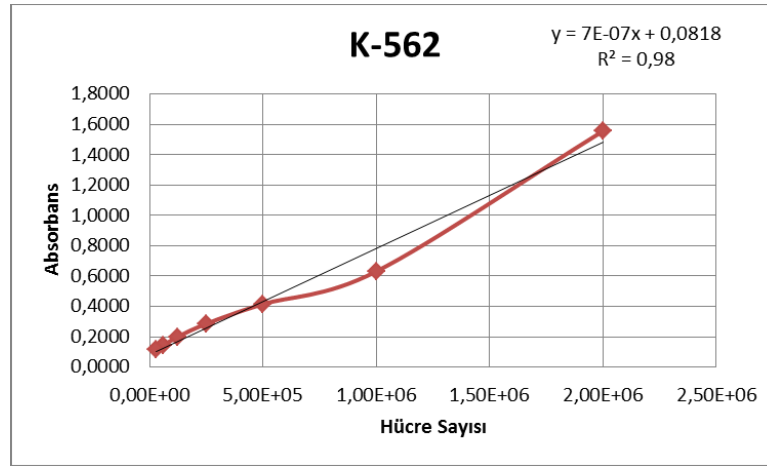
VII. LightCycler 480 Quantification software (kantifikasyon yazılımı) kullanılarak her bir kuyucuk için eşik döngüsü (CT) değeri “second derivate max” seçeneği ile hesaplanmış, verilerin kantitasyonu gerçekleştirilmiştir.

VIII. Verilerin analizi “SABiosciences PCR Array Data Analysis” sistemine girilerek $\Delta\Delta^{CT}$ yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

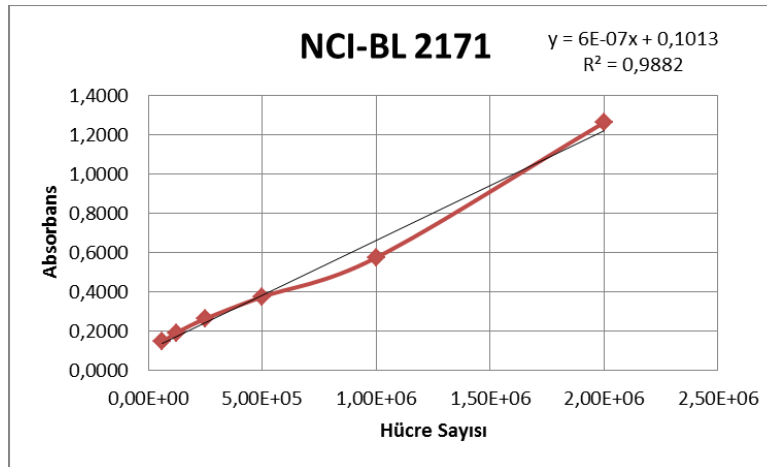
4. BULGULAR

4.1. Deneylerde Kullanılacak Uygun Hücre Konsantrasyonunun Belirlenmesi

WST-1 testi aracılığıyla sitotoksite testinde kullanılacak olan K-562 ve NCI-BL 2171 hücrelerinin gerekli absorbans değerini veren en uygun konsantrasyonu belirlenmiştir. Hücreler kuyucuklara seri dilüsyon uygulanarak 2×10^6 - $6,25 \times 10^4$ hücre/ ml yoğunluğunda olacak şekilde 100 µl ekilmiştir. Her kuyucuğa 10 µl WST-1(Roche, Cat.No: 11644807001) tuzu eklenmesinin ardından 15dk aralıklarla Multiskan FC (Thermo) mikropalak okuyucusu kullanılarak formazan boya oluşumunun kalitatif değeri 450 ve 620 nm’ de fotometrik olarak ölçülmüştür. Sonuçlar GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc) yazılımı ile değerlendirilmiştir. K-562 ve NCI-BL 2171 sağlıklı hücre hattının kendini ikileme zamanı da göz önünde bulundurularak 1,00 absorbans değeri veren hücre sayısı her iki hücre hattı için de 1×10^6 hücre/ml olarak hesaplanmıştır (Grafik 1) (Grafik 2).



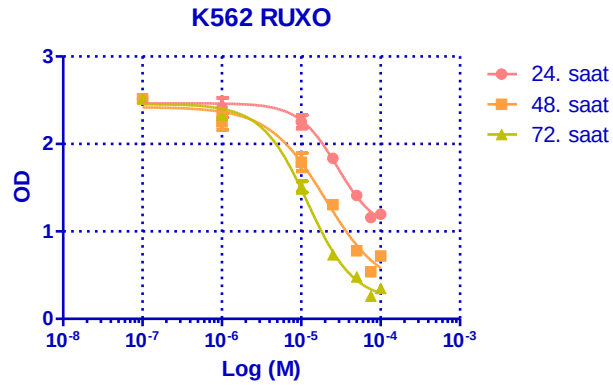
Grafik 1: K-562 hücrelerinin absorbans değeri



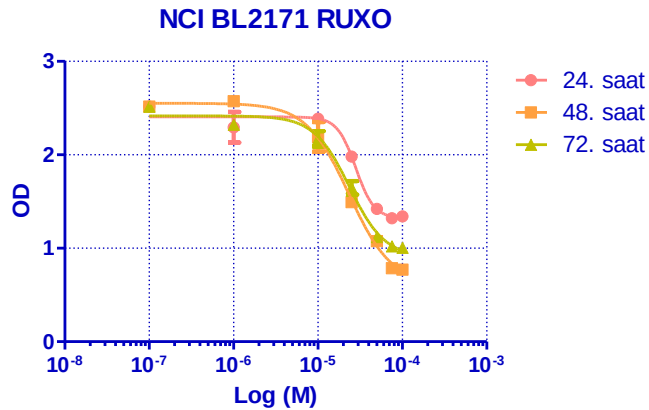
Grafik 2: NCI-BL 2171 hücrelerinin absorbans değeri

4.2. Ruxolitinibin K-562 ve NCI-BL 2171 Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkisinin Değerlendirilmesi

Ruxolitinib etken maddesinin K-562 ve NCI-BL 2171 üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi amacıyla her hücre için üç gün ve üç tekrarlı olacak şekilde kurulan WST-1 testi kullanılmıştır. K-562 ve NCI-BL 2171 hücre hatları ayrı ayrı 96 kuyucuklu plakalara 1×10^6 hücre/mililitre yoğunluğunda olacak şekilde 50 μ l/ kuyucuk hacminde ekilmiştir. Hazırlanan 10 mM ruxolitinib stok çözeltisinden 100 μ M, 75 μ M, 50 μ M, 25 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 100 nM'lık dilüsyonlar son hacim 100 μ l / kuyucuk olacak şekilde hücreler üzerine eklenmiştir. Etken maddenin uygulanmadığı hücre grubu kontrol olarak alınmıştır. Hücrelerin etken madde ile 24., 48. ve 72. saatlerdeki inküsyonlarının ardından her kuyucuğa 10 μ l WST-1 solüsyonu eklenmiş, 15 dakikada bir Multiskan FC (Thermo) mikropalak okuyucusu kullanılarak formazan boya oluşumunun kalitatif değeri 450 ve 620nm'lerde fotometrik olarak ölçülmüştür. Ruxolitinib etken maddesinin K-562 ve NCI-BL 2171 hücrelerinin proliferasyonunu yüzde elli oranında inhibe eden dozu (inhibitory concentration) yani IC_{50} değeri GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc) yazılımı kullanılarak 48. saatte sırasıyla 20 ve 23.6 μ M olarak bulunmuştur (Grafik 3) (Grafik 4).



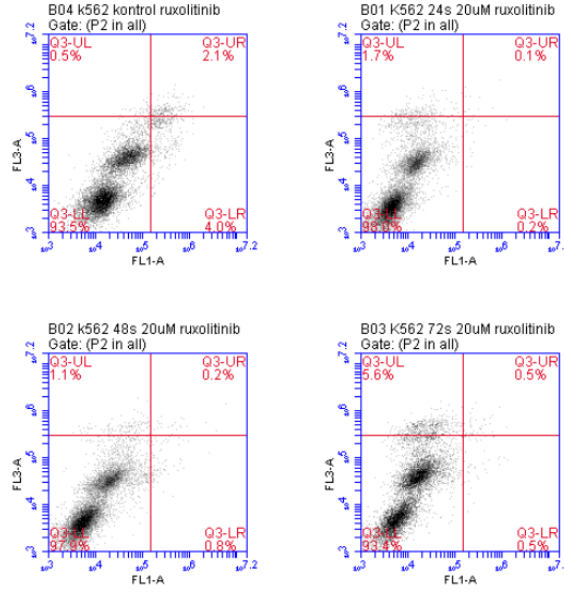
Grafik 3: K-562 hücrelerinde ruxolitinibin IC_{50} dozu



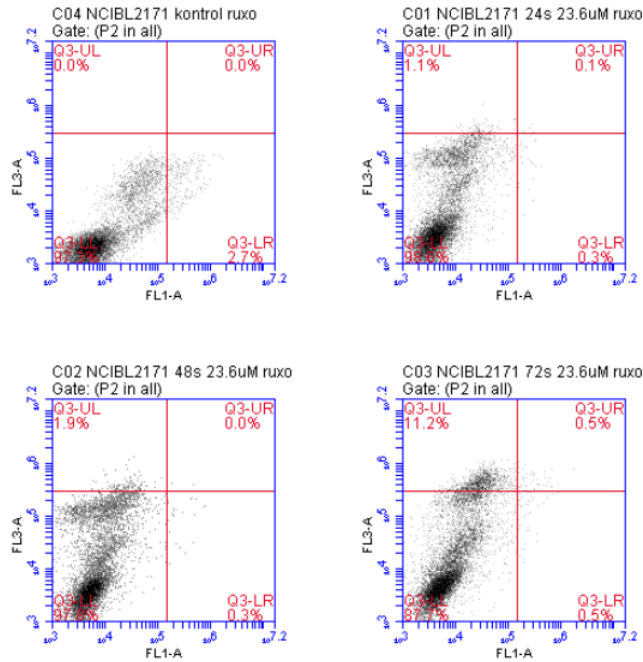
Grafik 4: NCI-BL 2171 hücrelerinde ruxolitinibin IC_{50} dozu

4.3. Ruxolitinibin K-562 ve NCI-BL 2171 Hücreleri Üzerindeki Apoptotik Etkilerinin Değerlendirilmesi

Ruxolitinibin IC₅₀ dozunun K-562 ve NCI-BL 2171 hücre hatları üzerindeki apoptotik etkileri etken maddenin uygulanmasının 24., 48. ve 72. saatlerinde Annexin V ve JC-1 olmak üzere iki farklı yöntem kullanılarak belirlenmiştir. Annexin V analizine göre kontrol grubu hücrelerinde ve ruxolitinibin IC₅₀ dozunun 24, 48 ve 72 saat uygulandığı K-562 hücrelerinde canlılık oranı sırasıyla, %93.5, %98.0, %97.9 ve %93.4 (Grafik 5); NCI- BL 2171 hücrelerinde ise canlılık oranı sırasıyla, %97.3, %98.6, %97.8 ve %87.7'dir (Grafik 6).

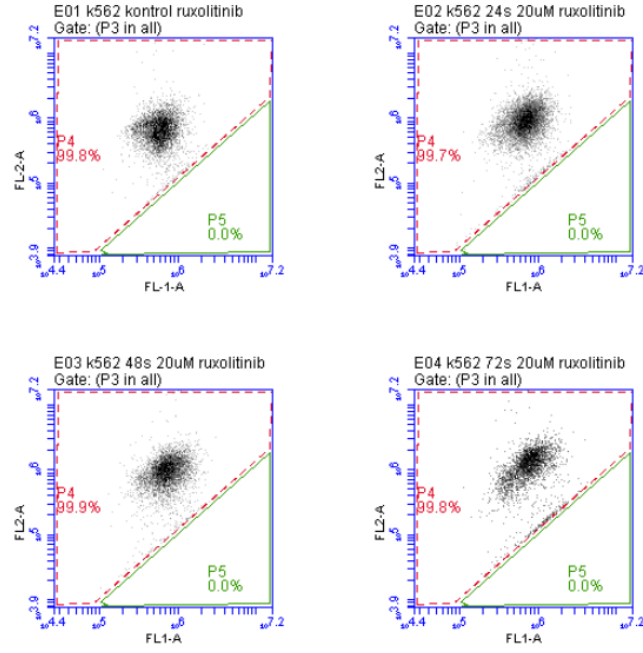


Grafik 5: Annexin V yöntemine göre ruxolitinibin K -562 hücrelerindeki apoptotik etkisi

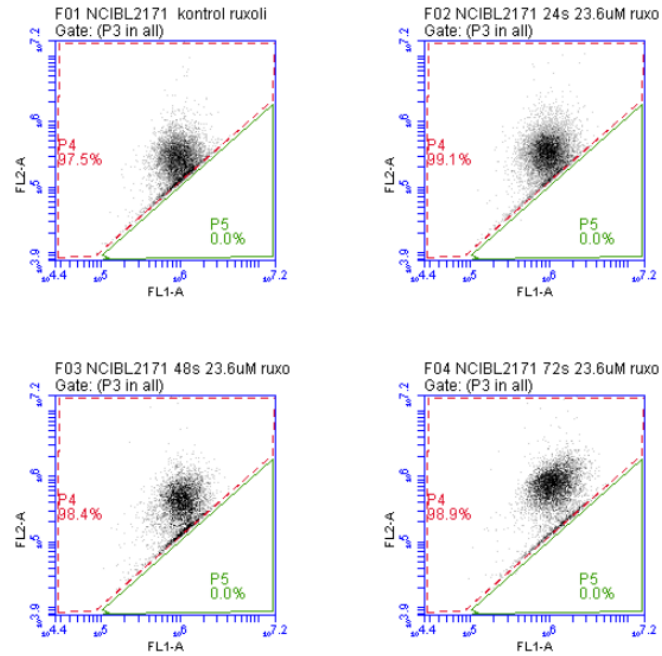


Grafik 6: Annexin V yöntemine göre ruxolitinibin NCI- BL 2171 hücrelerindeki apoptotik etkisi

JC-1 analizine göre kontrol grubu hücrelerinde ve ruxolitinibin IC₅₀ dozunun 24, 48 ve 72 saat uygulandığı K-562 ve NCI-BL 2171 hücrelerinde canlılık oranı %99' un üzerindedir. (Grafik 7) (Grafik 8).



Grafik 7: JC-1 yöntemine göre ruxolitinibin K -562 hücrelerindeki apoptotik etkisi

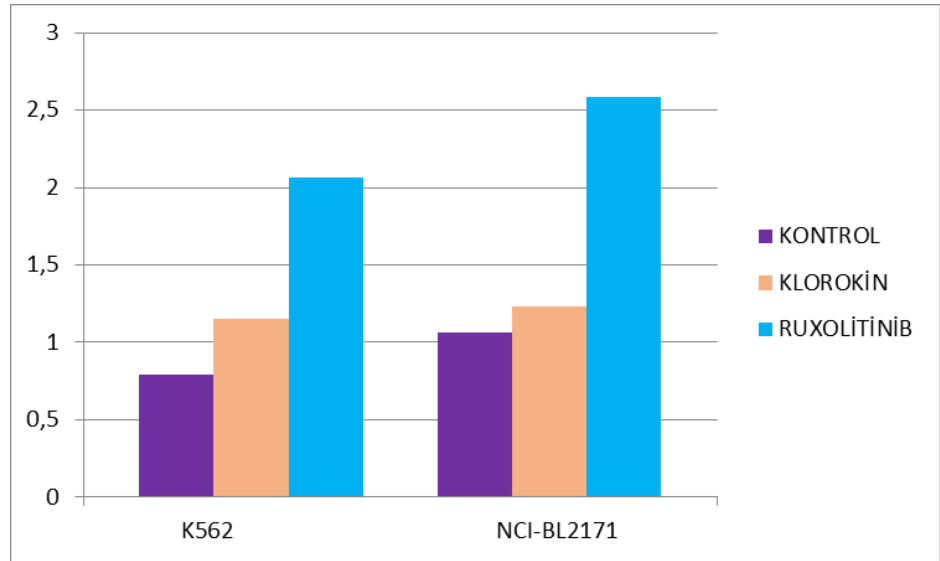


Grafik 8: JC-1 yöntemine göre ruxolitinibin NCI- BL 2171 hücrelerindeki apoptotik etkisi

Birbiriyle örtüşen apoptoz analizi sonuçlarına göre ruxolitinibin IC₅₀ dozu olan miktarlarının K-562 ve NCI- BL 2171 hücre hatları üzerinde 24, 48 ve 72 saat uygulamalar sonucu herhangi bir apoptozu indükleyici etkisi bulunmamaktadır.

4.4. Ruxolitinibin K-562 ve NCI-BL 2171 Hücreleri Üzerindeki Otofajik Etkilerinin Değerlendirilmesi

Ruxolitinibin IC₅₀ dozunun K-562 ve NCI-BL 2171 hücre hatları üzerindeki otofajik etkisi 48. saatte değerlendirilmiştir. Ruxolitinib etken maddesi veya klorokin ile muamele edilmeyen hücreler kontrol grubu olarak alınmıştır. Lizozomal inhibitör klorokin, otofagozoma dönüşümü bloke ederek LC3B-II birikimine neden olduğundan klorokin ile muamele edilen hücreler pozitif kontrol olarak kabul edilmiştir. LC3B-II artışı otofajinin baskılandığının bir göstergesidir. Klorokin ile muamele edilmiş hücrelerle, etken maddelerle muamele edilmiş hücreler karşılaştırılmış ve en yüksek LC3B-II artışı gösteren BacMam konsantrasyonları seçilmiştir. Ruxolitinibin otofajiyi baskılama ya da indükleme dereceleri kontrol grubuna oranlanarak belirlenmiştir. Otofaji deneylerine 3,3x10⁵ hücre/ml olacak şekilde başlanılmıştır. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında K-562 hücrelerinde ruxolitinib otofajiyi 2,11 kat; NCI-BL 2171 hücrelerinde ise 1,79 kat indüklemektedir (Grafik 9).



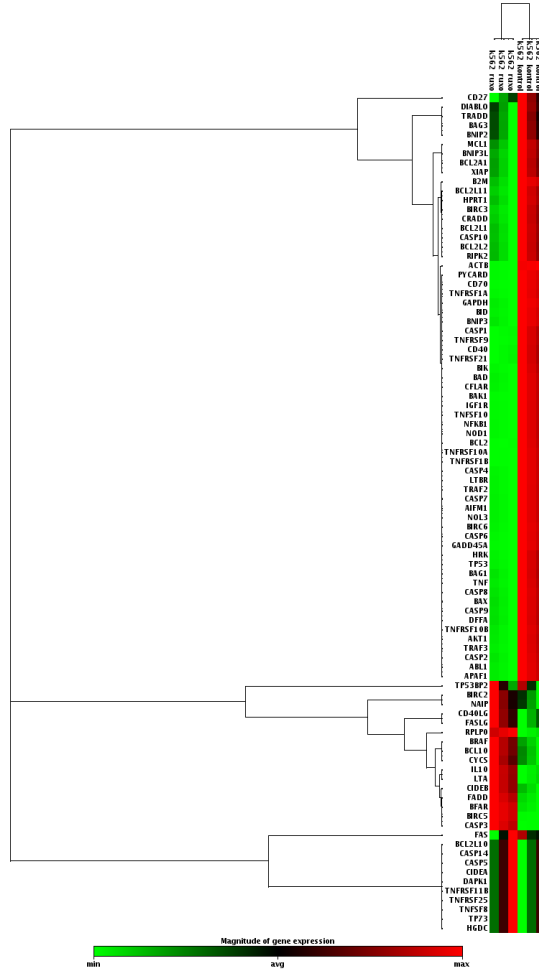
Grafik 9: Ruxolitinibin K-562 ve NCI-BL 2171 hücreleri üzerindeki otofajik etkisi

4.5. Ruxolitinibin K-562 ve NCI-BL 2171 Hücreleri Üzerinde Oluşturduğu Gen Ekspresyon Değişimlerinin Değerlendirilmesi

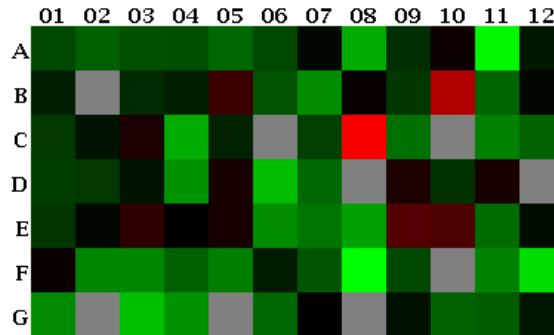
4.5.1. Ruxolitinibin K-562 ve NCI-BL 2171 Hücrelerinin Apoptoz İlişkili Genlerine Etkisi

Tablo 18: Ruxolitinibin K-562 hücrelerinin apoptik gen ekspresyonlarına etkisi

Gen Sembolü	Log 2 transformasyonu	p değeri
CASP3	6,64	0,000014
BIRC5	4,719999	0,000004
IL10	2,259996	0,000155
LTA	2,019987	0,0002
APAF1	-2,08988	0,000007
AKT1	-2,12973	0,00002
BID	-2,22972	0,000003
TNF	-2,27021	0,000029
TRAF3	-2,43987	0,000016
AIFM1	-2,54962	0,000009
NOL3	-2,54962	0,000009
CASP7	-2,58035	0,000008
TRAF2	-2,58035	0,000008
BIRC6	-2,64025	0,000004
BAD	-2,71028	0,000013
CFLAR	-2,74952	0,000013
TP53	-2,77992	0,00003
LTBR	-2,84996	0,000007
CASP4	-2,98965	0,000007
HRK	-3,12029	0,000038
PYCARD	-3,33061	0,000002
CASP6	-3,47073	0,000006
TNFRSF1A	-3,49005	0,000003
NFKB1	-3,55979	0,000015
NOD1	-3,59074	0,000015
TNFRSF21	-3,70087	0,000044
GADD45A	-3,77004	0,000005
BIK	-3,78986	0,000021
TNFSF10	-3,91921	0,000013
CD40	-3,95009	0,000042
IGF1R	-4,31043	0,000012
BAK1	-4,59074	0,000012
CASP1	-4,65109	0,000026
CD70	-5,04931	0,000002
TNFRSF9	-5,07826	0,000025
TNFRSF1B	-5,88683	0,000007
BCL2	-6,57347	0,00001
TNFRSF10A	-6,77992	0,000006

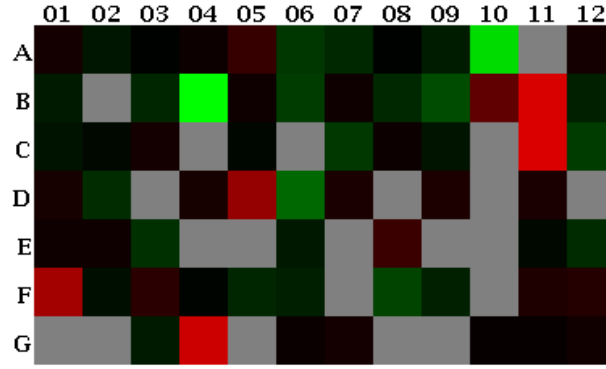


Grafik 10: Ruxolitinib uygulanan K-562 hücrelerinin apoptoz ilişkili genlerinin clustergram analizi



	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ABL1	AIFM1	AKT1	APAF1	BAD	BAG1	BAG3	BAK1	BAX	BCL10	BCL2	BCL2A1
	-1,9401	-2,5496	-2,1297	-2,0899	-2,7103	-1,9002	-0,210062	-4,590745	-1,219942	0,3400495	-6,573467	-0,640029
B	BCL2L1	BCL2L10	BCL2L11	BCL2L2	BFAR	BID	BIK	BIRC2	BIRC3	BIRC5	BIRC6	BNIP2
	-0,7799	0,1900	-1,1001	-0,8100	1,5200	-2,2297	-3,789861	0,2100147	-1,43012	4,7199993	-2,640254	-0,219942
C	BNIP3	BNIP3L	BRAF	CASP1	CASP10	CASP14	CASP2	CASP3	CASP4	CASP5	CASP6	CASP7
	-1,5100	-0,4600	0,6700	-4,6511	-0,8799	0,1900	-1,709812	6,6400005	-2,98965	0,1900459	-3,470729	-2,580353
D	CASP8	CASP9	CD27	CD40	CD40LG	CD70	CFLAR	CIDEA	CIDEB	CRADD	CYCS	DAPK1
	-1,6602	-1,4901	-0,5199	-3,9501	0,6000	-5,0493	-2,749523	0,1900459	0,760008	-1,340075	0,5699771	0,1900459
E	DFFA	DIABLO	FADD	FAS	FASLG	GADD45A	HRK	IGF1R	IL10	LTA	LTBR	MCL1
	-1,4301	-0,1999	1,2200	-0,0399	0,6100	-3,7700	-3,120294	-4,310432	2,2599955	2,0199865	-2,84996	-0,299915
F	NAIP	NFKB1	NOD1	NOL3	PYCARD	RIPK2	TNF	TNFRSF10A	TNFRSF10B	TNFRSF11B	TNFRSF1A	TNFRSF1B
	0,2700	-3,5598	-3,5907	-2,5496	-3,3306	-0,7200	-2,270208	-6,779918	-1,90996	0,1900459	-3,490051	-5,886833
G	TNFRSF21	TNFRSF25	TNFRSF9	TNFSF10	TNFSF8	TP53	TP53BP2	TP73	TRADD	TRAF2	TRAF3	XIAP
	-3,7009	0,1900	-5,0783	-3,9192	0,1900	-2,7799	0,0299829	0,1900459	-0,420048	-2,580353	-2,439872	-0,599899

Grafik 11: Ruxolitinib uygulanan K-562 hücrelerinin apoptoz ilişkili genlerinin ısı haritası



	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ABL1 0,3125	AIFM1 -0,3174	AKT1 -0,0176	APAF1 0,1824	BAD 0,8025	BAG1 -0,8009	BAG3 -0,597496	BAK1 -0,030767	BAX -0,427595	BCL10 -3,287712	BCL2 0,3525326	BCL2A1 0,2925462
B	BCL2L1 -0,3874	BCL2L10 0,3525	BCL2L11 -0,5776	BCL2L2 -3,8181	BFAR 0,2226	BID -0,9075	BIK 0,1958515	BIRC2 -0,587489	BIRC3 -1,127526	BIRC5 1,4424924	BIRC6 3,2624933	BNIP2 -0,477542
C	BNIP3 -0,2775	BNIP3L -0,1075	BRAF 0,3125	CASP1 0,3525	CASP10 -0,0775	CASP14 0,3525	CASP2 -0,827512	CASP3 0,1824381	CASP4 -0,287536	CASP5 0,3525326	CASP6 3,2824991	CASP7 -0,907522
D	CASP8 0,3325	CASP9 -0,6574	CD27 0,3525	CD40 0,3225	CD40LG 2,2525	CD70 -1,5709	CFLAR 0,4025039	CIDEA 0,3525326	CIDEB 0,4325319	CRADD 0,3525326	CYCS 0,3825013	DAPK1 0,3525326
E	DFFA 0,2226	DIABLO 0,2125	FADD -0,7075	FAS 0,3525	FASLG 0,3525	GADD45A -0,3575	HRK 0,3525326	IGF1R 0,8825257	IL10 0,3525326	LTA 0,3525326	LTBR -0,127526	MCL1 -0,627494
F	NAIP 0,3525	NFKB1 0,3525	NOD1 -0,3974	NOL3 3,0892	PYCARD 0,3525	RIPK2 0,1625	TNF 0,3025238	TNFRSF10A 0,3525326	TNFRSF10B 0,3525326	TNFRSF11B 0,1024566	TNFRSF1A 0,0825664	TNFRSF1B 0,232538
G	TNFRSF21 -3,7009	TNFRSF25 0,1900	TNFRSF9 -5,0783	TNFSF10 -3,9192	TNFSF8 0,1900	TP53 -2,7799	TP53BP2 0,0299829	TP73 0,1900459	TRADD -0,420048	TRAF2 -2,580353	TRAF3 -2,439872	XIAP -0,599899

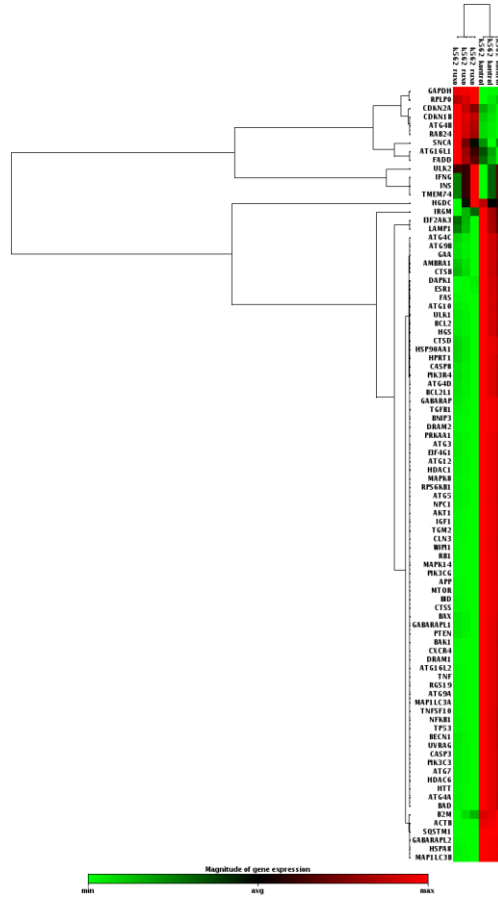
Grafik 13: Ruxolitinib uygulanan NCI- BL 2171 hücrelerinin apoptoz ilişkili genlerinin ısı haritası

4.5.2. Ruxolitinibin K-562 ve NCI-BL 2171 Hücrelerinin Otofaji İlişkili Genlerine Etkisi

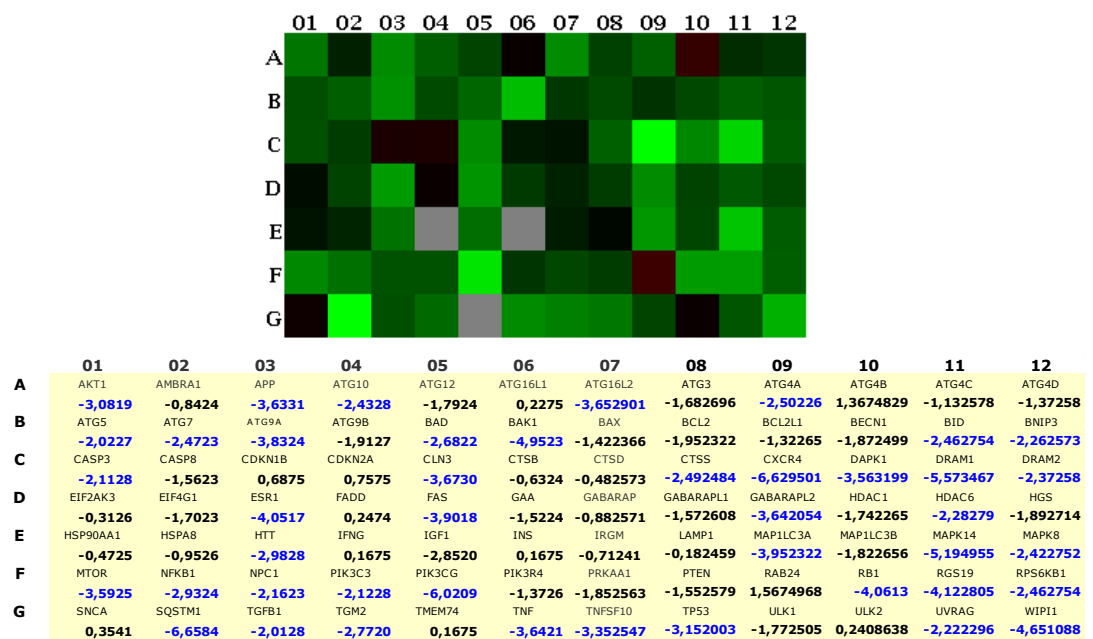
Tablo 20: Ruxolitinibin K-562 hücrelerinin otofajik gen ekspresyonlarına etkisi

Gen Sembolü	Log 2 transformasyonu	p değeri
TGFB1	-2,01275	0
ATG5	-2,02268	0,000003
CASP3	-2,11279	0,000006
PIK3C3	-2,12281	0,000006
NPC1	-2,1623	0,000003
UVRAG	-2,2223	0,00001
BNIP3	-2,26257	0
HDAC6	-2,28279	0,000005
DRAM2	-2,37258	0
MAPK8	-2,42275	0,000002
ATG10	-2,43284	0,000034
BID	-2,46275	0,000001
RPS6KB1	-2,46275	0,000002
ATG7	-2,47233	0,000004
CTSS	-2,49248	0,000001
ATG4A	-2,50226	0,000008
BAD	-2,68223	0,000007
TGM2	-2,77201	0,000002
IGF1	-2,85204	0,000002
NFKB1	-2,93236	0,00001
HTT	-2,98279	0,000006
AKT1	-3,08192	0,000001
TP53	-3,152	0,000009
TNFSF10	-3,35255	0,000009
DAPK1	-3,5632	0,00003
MTOR	-3,59248	0
APP	-3,63308	0
GABARAPL2	-3,64205	0
TNF	-3,64205	0,000005
ATG16L2	-3,6529	0,000005
CLN3	-3,673	0,000002
ATG9A	-3,83239	0,000004
FAS	-3,90185	0,000018
MAP1LC3A	-3,95232	0,000004
ESR1	-4,0517	0,000027
RB1	-4,0613	0,000001
RGS19	-4,12281	0,000004
WIP1	-4,65109	0,000002
BAK1	-4,95232	0,000006
MAPK14	-5,19496	0,000001
DRAM1	-5,57347	0,000003

PIK3CG	-6,02093	0,000001
CXCR4	-6,6295	0,000003
SQSTM1	-6,65836	0



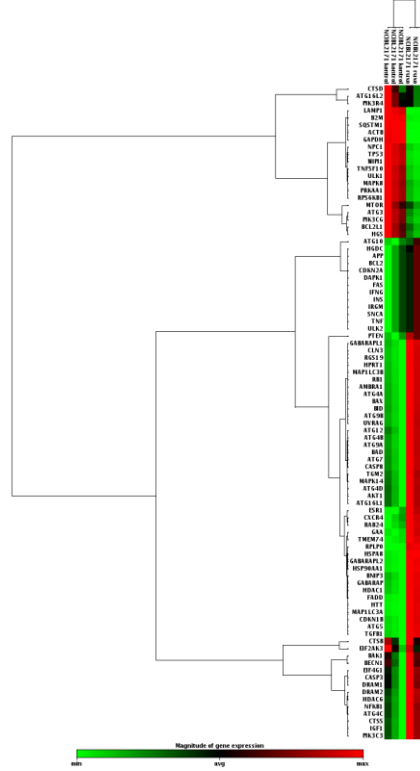
Grafik 14: Ruxolitinib uygulanan K-562 hücrelerinin otofaji ilişkili genlerinin clustergram analizi



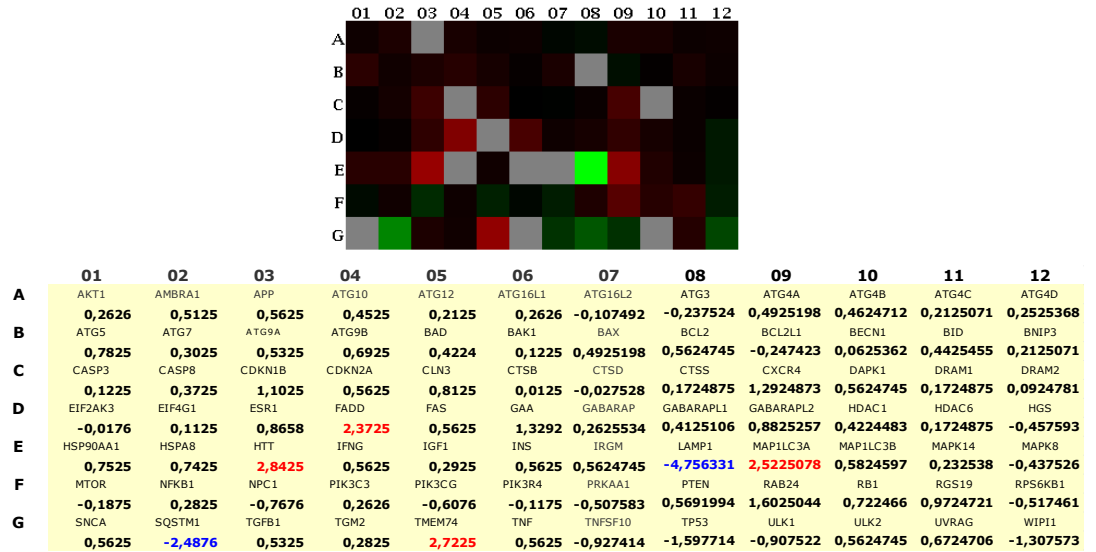
Grafik 15: Ruxolitinib uygulanan K-562 hücrelerinin otofaji ilişkili genlerinin ısı haritası

Tablo 21: Ruxolitinibin NCI-BL2171 hücrelerinin otofajik gen ekspresyonlarına etkisi

Gen Sembolü	Log 2 transformasyonu	p değeri
HTT	2,842496	0,000004
TMEM74	2,72251	0,000018
MAP1LC3A	2,522508	0,000005
FADD	2,372506	0,00001
SQSTM1	-2,48762	0
LAMP1	-4,75633	0,000002



Grafik 16: Ruxolitinib uygulanan NCI- BL 2171 hücrelerinin otofaji ilişkili genlerinin clustergram analizi

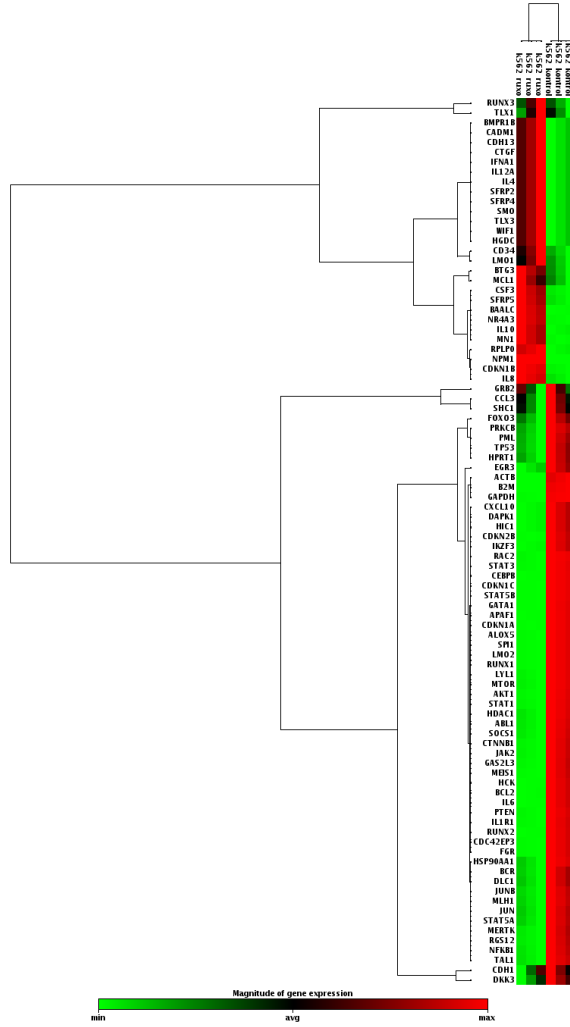


Grafik 17: Ruxolitinib uygulanan NCI- BL 2171 hücrelerinin otofaji ilişkili genlerinin ısı haritası

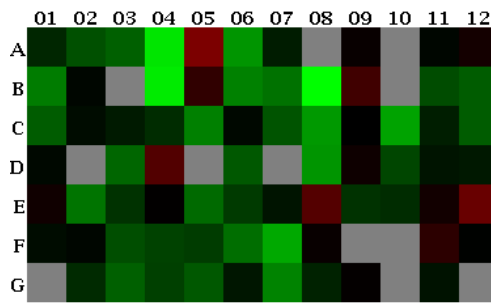
4.5.3. Ruxolitinibin K-562 ve NCI-BL 2171 Hücrelerinin Lösemi İlişkili Genlerine Etkisi

Tablo 22: Ruxolitinibin K-562 hücrelerinin lösemi ilişkili gen ekspresyonlarına etkisi

Gen Sembolü	Log 2 transformasyonu	p değeri
BAALC	5,086665	0,000017
NR4A3	4,276668	0,000012
MN1	3,499999	0,000045
IL10	3,416664	0,000049
CSF3	2,606655	0,000094
CDKN1B	2,016675	0
LYL1	-2,05349	0,000001
MTOR	-2,08314	0,000001
MERTK	-2,38308	0,00004
RGS12	-2,48358	0,000024
STAT1	-2,66292	0,000001
RAC2	-2,69339	0
JAK2	-2,91376	0,000007
CTNNB1	-3,17397	0,000006
PTEN	-3,25291	0,000002
AKT1	-3,28349	0,000001
GAS2L3	-3,46275	0,000009
IL1R1	-3,64386	0,000003
STAT3	-3,64386	0
CXCL10	-3,78389	0,000022
DAPK1	-3,8039	0,000021
HIC1	-3,82419	0,000021
SPI1	-3,93236	0,000001
ALOX5	-3,95232	0,000001
IKZF3	-4,21357	0,000013
MEIS1	-4,42353	0,000008
RUNX1	-4,52284	0
CDKN2B	-4,72929	0,000012
LMO2	-4,76415	0
CDC42EP3	-5,13289	0,000002
FGR	-5,32193	0,000002
CDKN1C	-5,38082	0
STAT5B	-5,47393	0
BCL2	-6,15843	0,000004
IL6	-6,2109	0,000004
GATA1	-6,36885	0
HCK	-6,74855	0,000004
RUNX2	-7,00231	0,000002
APAF1	-9,58727	0
CDKN1A	-9,70275	0
CEBPB	-10,4804	0



Grafik 18: Ruxolitinib uygulanan K-562 hücrelerinin lösemi ilişkili genlerinin clustergram analizi

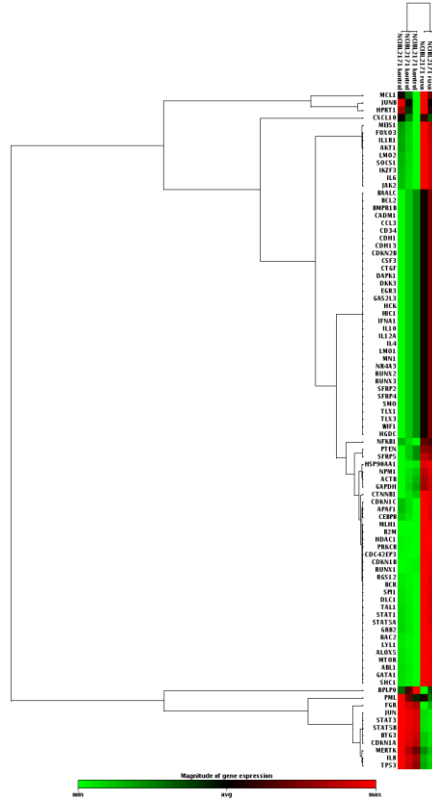


	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ABL1	AKT1	ALOX5	APAF1	BAALC	BCL2	BCR	BMPR1B	BTG3	CADM1	CCL3	CD34
	-1,5433	-3,2835	-3,9523	-9,5873	5,0867	-6,1584	-1,133211	1,5366498	0,3066122	1,5366498	-0,233278	0,8566272
B	CDC42EP3	CDH1	CDH13	CDKN1A	CDKN1B	CDKN1C	CDKN2B	CEBPB	CSF3	CTGF	CTNNB1	CXCL10
	-5,1329	-0,2633	1,5366	-9,7027	2,0167	-5,3808	-4,729292	-10,48036	2,6066554	1,5366498	-3,17397	-3,783887
C	DAPK1	DKK3	DLC1	EGR3	FGR	FOXO3	GAS2L3	GATA1	GRB2	HCK	HDAC1	HIC1
	-3,8039	-0,5133	-1,0834	-1,8334	-5,3219	-0,2934	-3,462754	-6,368849	-0,033274	-6,748554	-1,273343	-3,824188
D	HSP90AA1	IFNA1	IKZF3	IL10	IL12A	IL1R1	IL4	IL6	IL8	JAK2	JUN	JUNB
	-0,3234	1,5366	-4,2136	3,4167	1,5366	-3,6439	1,5366498	-6,210897	0,5766672	-2,91376	-0,793357	-1,02327
E	LMO1	LMO2	LYL1	MCL1	MEIS1	MERTK	MLH1	MN1	MTOR	NFKB1	NPM1	NR4A3
	0,6566	-4,7642	-2,0535	0,1066	-4,4235	-2,3831	-0,813246	3,4999989	-2,083141	-1,853084	0,7366482	4,2766679
F	PML	PRKCB	PTEN	RAC2	RGS12	RUNX1	RUNX2	RUNX3	SFRP2	SFRP4	SFRP5	SHC1
	-0,5233	-0,2633	-3,2529	-2,6934	-2,4836	-4,5228	-7,00231	0,3466449	1,5366498	1,5366498	1,8166816	-0,103302
G	SMO	SOC31	SPI1	STAT1	STAT3	STAT5A	STAT5B	TAL1	TLX1	TLX3	TP53	WIF1
	1,5366	-1,7632	-3,9324	-2,6629	-3,6439	-0,8834	-5,473931	-1,423526	0,1866273	1,5366498	-0,733363	1,5366498

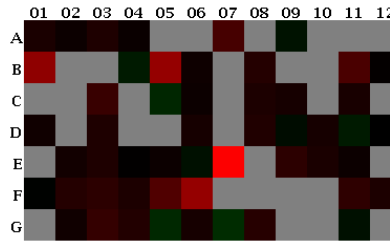
Grafik 19: Ruxolitinib uygulanan K-562 hücrelerinin lösemi ilişkili genlerinin ısı haritası

Tablo 23: Ruxolitinibin NCI-BL2171 hücrelerinin lösemi ilişkili gen ekspresyonlarına etkisi

Gen Sembolü	Log 2 transformasyonu	p değeri
MLH1	6,813334	0
RUNX1	4,033335	0,000002
CDKN1B	4,013337	0,000002
CDC42EP3	3,843331	0,000001
RGS12	2,163338	0,000012



Grafik 20: Ruxolitinib uygulanan NCI- BL 2171 hücrelerinin lösemi ilişkili genlerinin clustergram analizi



	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	ABL1	AKT1	ALOX5	APAF1	BAALC	BCL2	BCR	BMPR1B	BTG3	CADM1	CCL3	CD34
0,6734	0,3434	0,8134	0,2433	1,0533	1,0533	1,8933234	1,0533199	1,0533199	-0,456603	1,0533199	1,0533199	1,0533199
B	CDC42EP3	CDH1	CDH13	CDKN1A	CDKN1B	CDKN1C	CDKN2B	CEBPB	CSF3	CTGF	CTNNB1	CXCL10
3,8433	1,0533	1,0533	-0,6767	4,0133	0,3834	1,0533199	0,9633261	1,0533199	1,0533199	1,9933483	0,1133004	0,1133004
C	DAPK1	DKK3	DLC1	EGR3	FGR	FOXO3	GAS2L3	GATA1	GRB2	HCK	HDAC1	HIC1
1,0533	1,0533	1,4933	1,0533	-1,0365	0,3233	1,0533199	0,7233401	0,6133431	1,0533199	0,6632991	1,0533199	1,0533199
D	HSP90AA1	IFNA1	IKZF3	IL10	IL12A	IL1R1	IL4	IL6	IL8	JAK2	JUN	JUNB
0,4034	1,0533	0,7934	1,0533	1,0533	0,5634	1,0533199	0,8433407	-0,316708	0,5833265	-0,696658	0,0033144	0,0033144
E	LMO1	LMO2	LYL1	MCL1	MEIS1	MERTK	MLH1	MN1	MTOR	NFKB1	NPM1	NR4A3
1,0533	0,4933	0,8033	0,0334	0,3434	-0,4066	6,8133336	1,0533199	1,1533514	0,6933197	0,3033424	1,0533199	1,0533199
F	PML	PRKCB	PTEN	RAC2	RGS12	RUNX1	RUNX2	RUNX3	SFRP2	SFRP4	SFRP5	SHC1
-0,0466	0,9633	1,1600	0,7233	2,1633	4,0333	1,0533199	1,0533199	1,0533199	1,0533199	1,2166721	0,7432995	0,7432995
G	SMO	SOC3	SPI1	STAT1	STAT3	STAT5A	STAT5B	TAL1	TLX1	TLX3	TP53	WIF1
1,0533	0,4034	1,3633	0,9333	-1,0568	0,6033	-1,196608	0,9933483	1,0533199	1,0533199	-0,416577	1,0533199	1,0533199

Grafik 21: Ruxolitinib uygulanan NCI- BL 2171 hücrelerinin lösemi ilişkili genlerinin ısı haritası

5. TARTIŞMA

Kronik miyeloid lösemi 22q11.2 üzerinde bulunan BCR geni üzerindeki kesim bölgesi ile 9q34 üzerindeki Abelson onkogeninin (ABL) füzyonunu içeren dengeli t(9;22)(q34;q11.2) translokasyonu ile karakterizedir. Bu yeniden düzenlenme ile Philadelphia kromozomu olarak bilinen Bcr-Abl onkoproteinini kodlayan BCR-ABL füzyon onkogeni oluşmaktadır (98). Nowell ve Hungerford 1960 yılında, KML hastalarından alınan lökositlerde bulunan alışılmadık küçük bir kromozomu tanımlamışlardır. Sağlıklı lökositlerde bulunmayan bu anormal yapıya “Philadelphia kromozomu” adını vermişlerdir. Philadelphia kromozomunun keşfi ile ilk kez bir malignitenin gerçek bir genetik bozuklukla ilişkili olduğu somut olarak kanıtlanmıştır (99). Gelişen sitogenetik tekniklerle bu anormal kromozomun 9. ve 22. kromozomun uzun kolları arasında resiprokal bir translokasyonun sonucu meydana geldiği ve bu translokasyonun BCR-ABL füzyon proteini oluşumu ile sonuçlandığı ortaya koyulmuştur (100). t(9;22) translokasyonunun gen ürünü olarak üretilen füzyon proteininin potansiyel önemi tirozin kinazlar karakterize edilmeye başladıkça belirgin hale gelmiştir. Tirozin kinazların, adenosin trifosfatın (ATP) yapısındaki fosfat grubunun polipeptitlerde bulunan tirozin rezidülerine transferini sağlayarak hücre için kritik olan çoğalma, farklılaşma, canlılık ve hareket gibi olaylarda yer aldığı keşfedilmesi, enzimin düzenlenme bozukluklarının anormal hücre büyümesine neden olabileceğini göstermiştir (101, 102). Gerçekleştirilen ileri çalışmalar ile onkogenik BCR-ABL füzyonunun KML’ nin sonucu değil nedeni olduğu gösterilmiştir (103). Mevcut bu bilgiler rasyonel ilaç tasarımı farklı gelişmelerin meydana gelmesine neden olmuştur. Araştırmacılar özellikle BCR-ABL füzyon proteininin fonksiyonuna engel olacak ajanları hedeflemeye başlamışlardır. Bu arayış, BCR-ABL inhibitörü olarak imatinib mesilat’ ın (Gleevec) tanımlanmasına yol açmıştır ve çarpıcı bir şekilde KML hastalarının sağ kalımını ve yaşam kalitesini arttırmıştır (104-106). Birinci nesil tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib kullanımını takip eden dönemlerde bazı hastalarda çeşitli mutasyonlara bağlı olarak ilaç direnci gelişmiş ve/veya hastalar ilaca karşı duyarsızlaşmaya başlamışlardır. Bunu takiben ikinci nesil tirozin kinaz inhibitörleri olan nilotinib, dasatinib kullanılmaya başlamıştır (107, 108). Ponatinib, birinci ve ikinci nesil tirozin kinaz inhibitörlerine dirençli ya da duyarsız hastalarda kullanılabilirliği üzerinde faz üç çalışmaları devam etmekte olan üçüncü nesil tirozin kinaz inhibitörüdür (109).

Ruxolitinibin K-562 hücreleri üzerindeki IC₅₀ dozu ile ilgili çalışmalar bulunmakla birlikte literatürde tespit edilmiş herhangi bir IC₅₀ değeri bulunmamaktadır. Ruxolitinibin NCI-BL2171 hücreleri üzerindeki IC₅₀ dozu ile ilgili ise literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda, ruxolitinibin hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisine WST-1 testi ile bakılmış, K-562 KML ve NCI-BL2171 sağlıklı B lenfosit hücrelerinde IC₅₀ dozu 48. saatte sırasıyla 20µM ve 23,6µM olarak saptanmıştır. Ruxolitinibin KML hücre üzerindeki sitotoksik etkisinin sağlıklı hücreler üzerindeki etkisine göre daha yüksek olması, etken maddenin kanser hücrelerine karşı kullanılabilirliğinde sağlıklı hücrelere daha az zarar vereceğine dair olumlu bir sonuç oluşturmaktadır diye düşünmekteyiz.

Kronik miyeloid lösemide BCR-ABL füzyon proteini pek çok lösemi ilişkili sinyal iletim yolağını aktive etmektedir. BCL-ABL1 ile ilişkilendirilen lösemik sinyal yollarından biri JAK/STAT yoluğdır. Normalde JAK, sitokin bağlanmasıyla aktiveşerek STAT proteinini

bağlamakta, STAT proteinini de dimer oluşturarak nükleusta transkripsiyonu başlatmaktadır. BCR-ABL füzyonu ise KML hücrelerinde STAT transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu direkt olarak sağlayarak, JAK aktivasyonu ve sitokinlerden bağımsız bir şekilde transkripsiyonu başlatmaktadır (110).

Ruxolitinib 2009 yılında Lin ve arkadaşlarının enantiyo-seçici sentez işlemleri sonucunda INCB018424 adıyla yeni bir JAK inhibitörü olarak keşfedilmiştir (111). Bunu izleyen dönemlerde yapılan çalışmalar ruxolitinibin JAK ailesi ve özellikle JAK2 üzerindeki inhibitör etkisinin araştırılması yönünde olmuştur. 2010 yılında Quintás-Cardama ve arkadaşlarının yaptığı geniş kapsamlı klinik öncesi çalışmada N-uç epitop etiketler kullanılarak rekombinant olarak Sf2 hücrelerinde üretilen insana ait JAK1, JAK2, JAK3 ve Tyk2 proteinlerinin seviyesini sırasıyla 3.3nM, 2.8nM, 428nM, 19nM konsantrasyonlarında %50 oranında inhibe ettiği belirtilmiştir (96). Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda ruxolitinibin temel hedefi olan JAK2, JAK2 ilişkili ve kronik miyeloid lösemide rol oynadığı bilinen genlerin ekspresyonuna olan etkisi gerçek zamanlı PCR ile araştırılmıştır. Ruxolitinibin IC₅₀ dozu uygulanan K-562 hücrelerinde JAK2 ekspresyonu kontrole göre log₂ transformasyonunda yaklaşık 3 kat azaltmıştır (-2.91376 kat). IC₅₀ dozu uygulanan NCI-BL2171 sağlıklı hücrelerinde ise anlamlı düzeyde bir JAK2 inhibisyonu meydana gelmemiştir (-1.4983 kat). JAK non-reseptör tirozin kinazlarının temel hedef molekülleri STAT' larıdır. JAK' lar uyarılara yanıt olarak STAT proteinlerini fosforilleyerek aktivasyonunu arttırmaktadır. Fosforile STAT molekülü dimerize olarak nükleusta hedef genin transkripsiyonunu arttırıcı etki meydana getirmektedir. Sitokin aracılı hematopoiezde rol oynayan bu mekanizmayı taşıyan JAK/STAT yolağının lökomogenezele ilişkili olduğu bilinmektedir (112). Yarılina ve arkadaşları makrofaj hücrelerinde ruxolitinibin TNF bağımlı STAT1 ekspresyon ve fosforilasyon seviyelerini azalttığını göstermişlerdir (113). Gerçekleştirdiğimiz ekspresyon çalışmasında buna paralel olarak ruxolitinibin IC₅₀ dozu uygulanan K-562 hücrelerinde STAT1 ekspresyon seviyesi yaklaşık 2.5 kat azalmıştır (-2.66292 kat). NCI-BL2171 sağlıklı hücrelerinde ise STAT1 ifadesinin azalması anlamlı düzeyde bulunmamıştır (-1.9097kat). Lösemik fenotip oluşumuyla ilişkili STAT1 ekspresyon seviyesinin azalması JAK2 ifadesinin azalması ile tetiklenebileceği gibi yine Yarılina ve arkadaşlarının çalışmasında belirtildiği gibi TNF ifadesindeki düşüş ile de ilişkilendirilebilir (113). Bu önermeyi destekler doğrultuda, tez çalışmamız kapsamında ruxolitinibin IC₅₀ dozu K-562 hücrelerinde TNF ifadesini yaklaşık 3.5 kat azaltmıştır (-3.64205 kat). TNF makrofajlarda kanser hücrelerine karşı savunma sisteminin önemli bir bileşeni olmakla birlikte, Gallipoli ve arkadaşlarının literatürdeki çalışmasına göre TNF ifadesi kronik miyeloid lösemi kök hücrelerinin canlılığı ve proliferasyonuna katkı sağlamaktadır (114). Tez çalışması dahilinde elde edilen TNF ekspresyonunun azalması ruxolitinibin kanser hücrelerinin canlılık ve farklılaşmasını inhibe ederek olumlu sonuç meydana getirebileceğini göstermektedir. TNF azalmasıyla korele şekilde TNF reseptörlerini kodlayan TNFSFR1A ve TNFSFR1B genlerinin ifadeleri sırasıyla 3.49005 ve 5.88683 kat azalmıştır. Bu iki reseptör ayrıca NFκB transkripsiyon faktörünün aktivatörüdür (115). Stein ve arkadaşları NFκB aktivasyonun BCL-ABL pozitif KML hücrelerinin ölmesini engelleyici yönde aktivite gösterdiğini raporlamışlardır (116). Ruxolitinib uygulamasının K-562 hücrelerinde NFκB1 gen ifadesini yaklaşık 3.5 kat azaltması bu sonuçla bağlantılı olarak değerlendirilebilir durumdadır (-3.55979 kat). Bununla

beraber tümör nekroz faktör reseptör süper ailesine bağlı bu iki genin kodladığı reseptörlerin, ölüm reseptörleri aracılığıyla tetiklenen apoptozda rol oynaması ifade azalmasının handikapını oluşturmaktadır. TRAF2 ve TRAF3, TNF reseptör ilişkili faktör ailesinin üyeleridir ve apoptoz inhibitörü proteinleri kodlamaktadırlar. TRAF2, NFKB ve MAPK8 ile kompleks oluşturarak, CD40 sinyalleşmesinde görevli olan TRAF3 ise LTR ile etkileşim kurarak NFKB aktivasyonu aracılığıyla apoptozu önlemektedir (117, 118). Luo ve arkadaşları CD40 ekspresyonunun blastik fazdaki KML hücrelerinde yüksek ifade edildiğini belirlemişlerdir (119). Çalışmamızda bu bilgilere paralel olarak ruxolitinib blastik dönemde elde edilmiş hücrelerden oluşan K-562 hücrelerinde TRAF2, TRAF3 ve CD40 ekspresyonlarını sırasıyla 2.58035, 2.43987 ve 3.95009 kat azaltmıştır. Wilson ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada hepatoselüler karsinom hücrelerine ruxolitinib uygulanması STAT1'in yanı sıra STAT3 aktivasyonunun da azalmasını sağlamaktadır (120). Ayrıca Hu ve arkadaşları da cisplatin ile kombine şekilde küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücrelerine ruxolitinib uygulanması sonucunda STAT3 aktivasyonunun azaldığını raporlamışlardır (121). Tez kapsamında ruxolitinib uygulanan K-562 hücrelerinde bu literatürlerle uyumlu olarak STAT3 ekspresyon seviyesinde kontrole göre yaklaşık 3.5 kat azalma meydana gelmiştir (-3.64386 kat). Quintás-Cardama ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ruxolitinibin IL-6 inhibitörü olduğu keşfedilmiştir (96). IL-6 sitokini hücre döngüsü, apoptoz gibi hücreyel düzenlemeler aracılığıyla inflamasyon, hematopoiez, onkogenez gibi pek çok olayda görev almaktadır. Ruxolitinib JAK/STAT yolağında yer alan STAT3 ekspresyonunun azalması aracılığıyla IL-6 ekspresyonunu düzenlemektedir. Çalışmamızda bu doğrultuda ruxolitinibin IL-6 ifade seviyesini 6.2109 kat azalttığı belirlenmiştir. Klejman ve arkadaşlarının yaptığı çalışma bu iki yolağın etkileşiminin HCK tirozin kinazı aracılığıyla meydana geldiğini göstermiştir. Hematopoietik hücre kinaz olarak da adlandırılan HCK aktivasyonu STAT5B ile etkileşim kurarak bu yolağı aktive etmektedir (122). Çalışmamızda bu verileri destekler şekilde HCK ekspresyonu 6.74855 kat, STAT5B aktivasyonu ise 5.47393 kat azalmıştır.

Tez çalışması kapsamında lösemi oluşumuyla ilişkilendirilmiş çeşitli genlerin ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. Chen ve arkadaşlarının ALOX5 gen ifadesinin lösemi kök hücreleri için vazgeçilmez olduğunu keşfetmesinin ardından bu gen kronik miyeloid lösemide önemli hedeflerden biri haline gelmiştir (123). Woessner ve arkadaşlarının K-562 hücrelerinde yaptığı çalışma Alox5 geninin lösemik fenotipte önemli bir hedef olduğunu kanıtlamıştır (124). Tez kapsamında bu çalışmalara benzer şekilde ruxolitinib uygulanması K-562 hücrelerinin ALOX5 ifadesini önemli ölçüde, yaklaşık 4 kat azaltmıştır (-3.95232 kat). CTNNB1 hematopoietik kök hücre gelişiminde önemli bir gen olmakla birlikte, ifadesi APC tümör baskılayıcısı tarafından yüksek denetim altında tutulmaktadır. Jamieson ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, CTNNB1 ifadesinin miyeloid progenitör hücrelerde de aktif olması blastik faza geçiş ve lösemi kök hücresinin kendini yenilemesi ile ilişkilendirilmiştir (125). Gerçekleştirdiğimiz çalışmada yeni bir terapötik lösemi hedefi olan CTNNB1 ifadesi ruxolitinib uygulanan K-562 hücrelerinde yaklaşık 3 kat baskılanmıştır (-3.17397 kat). BCL-ABL geninin lösemi oluşumunda CSF3 geninin etkisini baskılayarak normal hematopoiezi değiştirdiğini Perrotti ve arkadaşları göstermiştir (126). Çalışmamızda ruxolitinib K-562 hücrelerinde CSF3 geninin ekspresyonunu 2.606655 kat arttırarak, normal hematopoiezi destekler sonuç oluşturmuştur. Treanor ve arkadaşları LMO2 gen ekspresyonunun aşırı ifadesinin lenfoblast

olgunlaşmasını engelleyerek akut lenfoblastik lösemi oluşumuna neden olduğunu, ruxolitinib uygulamasının LMO2 ifadesini baskıladığını göstermişlerdir (127). Çalışmamızda ruxolitinib uygulaması K-562 hücrelerinin LMO2' ekspresyonunu 4.76415 kat azalttığı belirlenmiştir. Mullican ve arkadaşları NR4A3 geninin miyeloid kökenli lökomogenezde önemli bir tümör baskılayıcı olduğunu tanımlamışlardır (128). Çalışmamızda ruxolitinib uygulanan K-562 hücrelerinde NR4A3 tümör baskılayıcı geninin ifadesi 4.276668 kat artış göstermiştir. Thomas ve arkadaşları yaptıkları çalışmada RAC2 geninin BCR-ABL pozitif hücrelerin canlılığını destekleyici yönde aktivite gösterdiğini bulmuşlardır (38). Çalışmamızda RAC2 geninin ifadesi 2.69339 kat azalmıştır. Zhang ve arkadaşları CDKN1B (p27) geninin kronik miyeloid lösemi hücrelerinde tümör baskılayıcı rol oynadığını göstermişlerdir (130). Çalışmamızda ruxolitinib uygulaması sonucunda CDKN1B geninin ifadesi 2,016675 kat artmıştır. Weisberg ve arkadaşları CXCR4 geninin artışının KML hücrelerinin kemik iliği mikroçevresi ile iletişim kurarak tedavi ajanlarına karşı duyarsızlık geliştirmesine sebep olduğunu belirlemişlerdir (131). Çalışmamızda ruxolitinib uygulaması CXCR4 reseptör geninin 6.6295 kat azalmasını sağlamıştır. Rao ve arkadaşları histon deasetilaz 6 inhibisyonunun hsp90 şaperonu aracılığıyla KML örneklerinin canlılığını azalttığını ve proliferasyonunu engellediğini göstermişlerdir (129). Çalışmamız ruxolitinib uygulaması sonucu HDAC6 ifadesinin 2.28279 kat azaldığını göstermiştir. Krause ve arkadaşları tümör mikro çevresinde TGFB1 bulunmasının KML hücrelerinin ve KML kök hücrelerinin canlılığını koruduğunu belirlemişlerdir (132). Çalışmamızda ruxolitinib uygulaması sonucunda KML hücrelerinin TGFB1 ekspresyon seviyesi 2.01275 kat azalmıştır.

Literatürde ruxolitinibin kronik miyeloid lösemi hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi ile ilgili herhangi bir yayın bulunmamaktadır. Hepatositler ve hepatoselüler karsinom hücreleri (133, 120), kolon kanseri hücreleri (134) üzerinde bireysel olarak apoptotik etkisinden bahseden yayınlar yapılmış olmakla birlikte ruxolitinibin genellikle başka bir ajan ile kombine şekilde apoptotik etkisinin belirlendiği yayınlar bulunmaktadır. Cisplatinle kombine şekilde küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücreleri (121), dual Aurora inhibitörü ile kombine şekilde pankreatik hücreler (135), BEZ235 ile kombine şekilde miyeloproliferatif neoplazm hücreleri üzerinde (136, 137) ve nilotinib ile birlikte KML kök hücrelerinde apoptozu indüklediğini belirleyen çalışmalar dışında literatürde ruxolitinibi apoptozla ilişkilendiren çalışma bulunmamaktadır (138).

Quintarellia ve arkadaşları, ruxolitinibin K-562 üzerinde tek başına kullanıldığında herhangi bir sitotoksik ve apoptotik etki oluşturmadığını belirlemişlerdir. Çalışmamızda da buna paralel olarak 24, 48 ve 72 saat sürelerle ruxolitinibin IC₅₀ dozu uygulanan K-562 KML ve NCI-BL2171 sağlıklı B lenfositlerinde kontrole göre herhangi bir apoptotik artış meydana gelmemiştir (139). Bununla beraber ruxolitinib uygulaması apoptoz ilişkili bazı genlerin ekspresyonlarında artış meydana getirmiştir. NOL3 geni anti-apoptotik protein kodlamakta ve kaspaz2, kaspaz8 ve p53 genlerinin ifadesinin azalmasına yol açmaktadır. Carter ve arkadaşları AML hücreleri ile yaptıkları çalışmalarda NOL3 ekspresyonunu prognostik olarak belirlemişlerdir (140). Mak ve arkadaşları da aynı genin AML hastalarının ilaç direncinden sorumlu olabileceğini raporlamışlardır (141). KML ile ilişkilendirilmiş bir literatür çalışması olmamakla birlikte tez doğrultusunda ruxolitinib uygulaması sonucunda NOL3 ekspresyon seviyesinin yaklaşık 2.5 kat azaldığı belirlenmiştir (-2.54962 kat).

Kelly ve arkadaşları APOLLON olarak da adlandırılan, apoptotik proteinlerin ubiquitinasyonu aracılığıyla apoptoz inhibitörü olarak görev yapan, BIRC6 geninin KML' de tirozin kinaz inhibitörlerine karşı direnç gelişiminden sorumlu olabileceğini belirtmiştir (142). Ruxolitinib K-562 hücrelerinde BIRC6 ekspresyonunu kontrole göre yaklaşık 2.5 kat azaltmıştır (-2.64025 kat). CFLAR ya da c-FLIP, pek çok kanser türünde karsinogenez ve metastatik özellikle ilişkilendirilmiş, yapısal olarak CASP8' e benzeyen bir apoptoz regülatörüdür. Park ve arkadaşları imatinib dirençli K-562 hücrelerinde bu genin ifadesinin azalmasının apoptoza duyarlılığı arttırarak hücreyi ölüme götürdüğünü belirlemiştir (143). Çalışmamızda ruxolitinib K-562 hücrelerinde CFLAR ifadesini yaklaşık 2.5 kat azaltmıştır (2.74952). IGF1R tirozin kinaz aktivitesi gösteren ve pek çok malignanside ifadesi artmış durumda olan proteini kodlamaktadır. Shi ve arkadaşları bu genin ifadesinin ve dolayısıyla tirozin kinaz aktivitesinin baskılanmasının imatinib dirençli K-562 hücrelerinde apoptozu indüklediğini göstermişlerdir (144). Çalışmamızda ruxolitinib uygulanması bu sonuca benzer şekilde IGF1 ve IGF1R ekspresyon seviyesini sırasıyla 2.85204 ve 4.31043 kat azaltmıştır. CASP3 hem ölüm reseptörleri hem de mitokondri aracılığıyla gerçekleşen apoptozda görev alan, inhibisyonu lösemik fenotiple ilişkilendirilmiş kaspaz 3 apoptotik proteinini kodlamaktadır. Hu ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada ruxolitinib uygulanan küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücrelerinde kaspaz 3 proteinin artışı ve apoptozun indüklendiği belirtilmiştir (121). Ayrıca An ve arkadaşları ruxolitinib uygulamasının kolorektal kanser hücrelerini kaspaz 3 proteini aracılığıyla apoptoza yönlendirdiğini raporlamışlardır (134). Çalışmamızda ruxolitinib uygulaması CASP3 ekspresyonunu kontrole göre yaklaşık 6.5 kat gibi önemli bir düzeyde arttırmıştır (6.64 kat). Ruxolitinibin K-562 kronik miyeloid lösemi ve NCI-BL 2171 sağlıklı hücre hatları üzerinde apoptotik etki göstermemesine neden olan moleküler mekanizmalar ileri düzey ekspresyon analizlerinin gerçekleştirilmesi ile aydınlatılmalıdır. Çalışmamızda ruxolitinibin K-562 hücrelerinde, aynı apoptotik mekanizmada birbiri ardına yer alan iki kaspazdan, kaspaz 3'ün ifade seviyesini yaklaşık altı kat arttırırken kaspaz 6 ifadesini iki kat azaltması ruxolitinibin apoptotik mekanizmasının aydınlatılması konusunda bir fikir oluşturacaktır diye düşünmekteyiz.

Literatürde ruxolitinibin otofaji ile ilişkilendirildiği herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. mTOR inhibisyonu otofajik yolağın en önemli aktivatörlerinden biridir (145) . Çalışmamızda ruxolitinibin IC₅₀ dozu uygulanan K-562 ve NCI-BL 2171 hücrelerinde kontrole göre sırasıyla yaklaşık 2 ve 1,7 kat otofaji artışı gerçekleşmiştir. Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlara göre, otofaji ilişkili genlerin ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağının aktivasyonu otofajiyi baskılamakta ve tümörejenik etki göstermektedir. Evangelisti ve arkadaşları ALL hücrelerinde AKT1 ifadesinin artışının otofajiyi baskılayarak lösemi hücrelerinin sağ kalımını arttırdığını belirlemişlerdir (146). Fan ve arkadaşları KML hücrelerinde mTOR inhibisyonunun otofaji aracılığıyla hücre ölümünü desteklediğini göstermişlerdir, bu mekanizma AKT1 geninin inhibisyonuyla olmaktadır (147). Bartalucci ve arkadaşları ruxolitinibin PI3K/mTOR yolağını baskıladığını göstermelerine rağmen bunu otofaji ile ilişkilendirmemişlerdir (148). Çalışmamızda ruxolitinib K-562 hücrelerinde AKT1 geninin ifadesini 3.28349, mTOR geninin ifadesini ise 3.59248 kat azaltarak bu sonuçlarla uyum göstermiştir. Leger ve arkadaşları K-562 hücrelerinde MAPK8 ve MAPK14 ifadesinin azalmasının apoptozu arttırıcı yönde etki gösterdiğini belirtmişlerdir (149). Lee-

Sherick ve arkadaşları MERTK geninin de bu yolda görev alarak lösemi hücre canlılığını desteklediğini göstermişlerdir (150). Çalışmamızda AKT ile uyumlu şekilde MAPK8, MAPK14, MERTK ifadeleri sırasıyla 2.42275, 5.19496 ve 2.38308 kat azaltmıştır. mTOR kompleks 1 ile etkileşen RPS6KB1 tirozin kinazının ekspresyon seviyesi 2.46275 kat azalmıştır. BCL-2 geni BCL-2 ailesinin anti apoptotik üyesidir. Aynı zamanda BCL-2 apoptoz ve otofaji arasındaki karşılıklı etkileşimi sağlamaktadır (151). Peng ve arkadaşları yaptıkları çalışmada BCL-2 ifadesinin azalmasının prostat hücrelerinde otofajiyi indüklediği ve hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini göstermişlerdir (152). Çalışmamızda ruxolitinib BCL-2 geninin ifadesini 6.57347 kat azaltarak bu sonucu desteklemiştir.

BCR-ABL onkogeninin meydana gelmesi pek çok lösemi ilişkili yolağı aktive etmektedir. BCR-ABL tirozin kinaz inhibitörlerinin kronik miyeloid lösemisinin tedavisinde önemli etkileri olmakla birlikte sadece BCR- ABL TKI' lerinin kullanılması ile meydana gelebilen duyarsızlaşma ve direnç oluşumu en büyük handikaplardır. Önceleri INCB018424 ya da INC424 olarak adlandırılan Ruxolitinib etkili ve seçici bir oral JAK1 ve JAK2 inhibitördür. Etkili bir JAK1 ve JAK2 inhibitörü olan ruxolitinibin dalak boyutunu küçülttüğü ve miyelofibroziste temel semptomları azalttığının bilinmesi, JAK-STAT yolağını inhibe ederek lösemilerin tedavisi için potansiyel olarak ümit veren bir ajan olduğunu göstermektedir (153). BCR-ABL tirozin kinaz inhibitörlerine duyarsız ya da dirençli kronik lösemi hastalarında ruxolitinibin BCR-ABL tirozin kinaz inhibitörleriyle kombine olarak otofajiyi ve apoptozu arttırıcı etkisinden yararlanmaya yönelik çalışmaların geliştirilmesinin klinik olarak anlamlı kullanılabilirlik oluşturacağını öngörmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda; ruxolitinibin, kronik miyeloid lösemi hücreleri ve sağlıklı NCI-BL 2171 hücreleri üzerindeki sitotoksik etki seviyesi, apoptoz ve otofaji indüksiyonu ve tüm bu oluşumların mRNA ekspresyon seviyesinde oluşturduğu değişiklikleri araştırdık. Ruxolitinibin K-562 ve NCI-BL 2171 hücre hatlarında IC_{50} değeri 48. saatte sırasıyla 20 μ M ve 23,6 μ M olarak belirlenmiştir. Ruxolitinibin IC_{50} dozu uygulanan K-562 ve NCI- BL 2171 hücrelerinde herhangi bir apoptoz artışı oluşturduğu tespit edilmemiştir. Bu duruma apoptotik kaskad içinde birlikte çalışan genlerin bazılarının ifade seviyelerinin azalmasının neden olduğunu düşünmekteyiz. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında K-562 hücrelerinde ruxolitinibin IC_{50} dozu otofajiyi 2,11 kat; NCI-BL 2171 hücrelerinde ise 1,79 kat indüklemektedir. Otofaji indüklenmesinin, otofajik sistemde yer alan temel gen olan mTOR geninin ifade seviyesindeki azalma ve bu gen ile ilişkili AKT gibi kritik genlerin ifadelerindeki değişimler aracılığıyla meydana geldiği öngörülmektedir. Bu bulgu çalışılan gen ekspresyon seviyeleriyle de desteklenmektedir. Ruxolitinibin gen ekspresyon seviyelerinde yaptığı etkilerle ilgili literatürde henüz çok fazla yayın bulunmamaktadır. Ancak yaptığımız çalışmalar sonucunda elde ettiğimiz ekspresyon verileri ruxolitinibin moleküler etki mekanizması hakkında literatüre güncel bilgiler oluşturarak katkı sağlayacaktır. Miyelofibroz tedavisinde 2011 yılından bu yana büyük katkı sağlamış olan JAK 2 inhibitörü ruxolitinibin, kronik miyeloid tedavisinde kullanılan BCR-ABL tirozin kinaz inhibitörleri ile bir arada kullanımının, bu tirozin kinaz inhibitörlerine karşı direnç ya da duyarsızlık gelişimine karşı büyük bir kullanım avantajı oluşturacağını düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. GLOBOCAN 2012 Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012, Web page, Available from: <http://globocan.iarc.fr/default.aspx>
2. Ruddon RW. Cancer Biology. New York: Oxford University Press; 2007
3. Hartl DL, Ruvolo M. Genetics Analysis of Genes and Genomes. Massachusetts: Jones & Bartlett Learning; 2012
4. Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Bretscher A, Ploegh H et al. Molecular Cell Biology. New York: WH Freeman and Company; 2011
5. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular Biology of the Cell. New York: Garland Science; 2008
6. Sigerist HE. The Historical Development of the Pathology and Therapy of Cancer. Bull N Y Acad Med 1932; 642-53.
7. Granchi C, Fancelli B, Minutolo F. An update on therapeutic opportunities offered by cancer glycolytic metabolism. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2014; 4915–4925
8. Atıcı E. Tıp tarihinde kanser ve lösemi. Türk Onkoloji Dergisi 2007; 197-204
9. Cotter SM. Hematology. Wyoming: Teton NewMedia; 2001
10. Wickrema A, Kee B editors. Molecular Basis of Hematopoiesis. New York: Springer; 2009
11. Info Center. In Stem Cell Information [World Wide Web site]. National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 2010 [cited Thursday, November 13, 2014] Available from: <http://stemcells.nih.gov/info/Pages/Default.aspx>
12. Rodak BF. Hematology: Clinical Principles and Applications. Philadelphia: Elsevier Health Sciences; 2007
13. Schmaier AH, Petruzzelli LM. Hematology for the Medical Student. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2003
14. Leonard B. Leukemia: A Research Report. Pennsylvania: Diane Publishing; 1998
15. Bozzone DM. Biology of cancer series, Leukemia. New York: Infobase Publishing; 2009
16. Goldsmith C. Leukemia. Colorado: Twenty-First Century Books; 2011
17. Nowell PC. Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective. J. Clin. Invest. 2007; 2033–2035
18. Peacock J, Asselin B. Perspectives on disease and illness: Leukemia. Minnesota: Capstone; 2000
19. Burke JM. Dx/Rx oncology series: Leukemia. Canada: Jones & Bartlett Publishers; 2012
20. SABiosciences Web Site, http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAHS-137Z.html
21. Nagarajan L. editor. Acute Myelogenous Leukemia: Genetics, Biology and Therapy. New York : Springer; 2010.
22. Advani AS, Lazarus HM. Adult Acute Lymphocytic Leukemia: Biology and Treatment. New York : Springer; 2010.
23. Moreau IB. editor. Chronic Lymphocytic Leukemia: New Research. New York: Nova Publishers; 2008

24. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002; 2292-2302
25. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;937-51
26. Mughal TI. *Chronic Myeloid Leukemia: A Handbook for Hematologists and Oncologists*. London: CRC Press; 2013
27. Druker BJ. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood*. 2008; 4808-4817
28. Jones D. *Neoplastic Hematopathology: Experimental and Clinical Approaches*. New York: Springer; 2010
29. Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol* 2002; 76-94
30. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1999; 341:164-172.
31. Cardama AQ, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*; 2009; 1619-30
32. Hantschel O, Superti-Furga G. Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;33-44.
33. Pendergast AM, Quilliam LA, Cripe LD. BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell*. 1993;75:175-185.
34. Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2005;5:172-183.
35. Sattler M, Mohi MG, Pride YB. Critical role for Gab2 in transformation by BCR/ABL. *Cancer Cell*. 2002;1:479-492.
36. Skorski T, Kanakaraj P, Nieborowska-Skorska M. Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. *Blood*. 1995; 726-736.
37. Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1072:129-157.
38. Thomas EK, Cancelas JA, Chae HD. Rac guanosine triphosphatases represent integrating molecular therapeutic targets for BCR-ABL-induced myeloproliferative disease. *Cancer Cell*. 2007;12:467-478.
39. Cortes J, Deininger M. *Chronic Myeloid Leukemia*. London: CRC Press; 2013
40. Gaiger A, Henn T, Horth E. Increase of bcr- abl chimeric mRNA expression in tumor cells of patients with chronic myeloid leukemia precedes disease progression. *Blood*. 1995;86:2371-2378.
41. Hu Y, Liu Y, Pelletier S. Requirement of Src kinases Lyn, Hck and Fgr for BCR-ABL1-induced B-lymphoblastic leukemia but not chronic myeloid leukemia. *Nat Genet*. 2004;36:453-461.

42. Chang JS, Santhanam R, Trotta R, Neviani P, Eiring AM, Briercheck E, et.al. High levels of the BCR/ABL oncoprotein are required for the MAPK-hnRNP-E2 dependent suppression of C/EBPalpha-driven myeloid differentiation. *Blood*. 2007;994-1003
43. Suzuki K, Ono R, Ohishi K, Masuya M, Kataoka I, Liu B, Nakamori Y, et.al. IKAROS isoform 6 enhances BCR-ABL1-mediated proliferation of human CD34+ hematopoietic cells on stromal cells. *Int J Oncol*. 2012;53-62
44. Dash AB, Williams IR, Kutok JL. A murine model of CML blast crisis induced by cooperation between BCR/ABL and NUP98/HOXA9. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 7622-7627.
45. Neviani P, Santhanam R, Trotta R. The tumor suppressor PP2A is functionally inactivated in blast crisis CML through the inhibitory activity of the BCR/ABL-regulated SET protein. *Cancer Cell*. 2005; 355-368.
46. Dungarwalla M, Matutes E, Dearden CE. Prolymphocytic leukaemia of B- and T-cell subtype: a state-of-the-art paper. *Eur J Haematol*. 2008 ; 469-76
47. Zhang D, Loughran TP. Large granular lymphocytic leukemia: molecular pathogenesis, clinical manifestations, and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;652-9
48. Qayyum S, Choi JK. Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma; PhD; *Arch Pathol Lab Med*. 2014;282-6
49. Kreitman RJ. Immunoconjugates and new molecular targets in hairy cell leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;660-6
50. Bansode YV, Admane V, Goroshi M, Katria P. Plasma cell leukaemia a rare cause of disproportionate anaemia in a patient presenting as CKD. *J Assoc Physicians India*. 2014; 271-3.
51. Sangiuliano B, Pérez NM, Moreira DF, Belizário JE. Cell Death-Associated Molecular-Pattern Molecules: Inflammatory Signaling and Control. Hindawi Publishing Corporation *Mediators of Inflammation*. 2014
52. Nunes T, Bernardazzi T, Souza HS. Cell Death and Inflammatory Bowel Diseases: Apoptosis, Necrosis, and Autophagy in the Intestinal Epithelium. Hindawi Publishing Corporation *Mediators of Inflammation*. 2014
53. Vitale I, Galluzi L, Castedo M, Kroemer G. Morphological aspects of mitotic catastrophe, apoptosis, necrosis and autophagic vacuolization. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2011; 385-392
54. Thompson HJ, Strange R, Schedin PJ. Apoptosis in the genesis and prevention of cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1992;1:597-602.
55. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine Web Site, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>
56. Kerr JF. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol*. 1971;13-20.
57. Kerr JF, Wyllie AH, Curriar AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 1972; 26, 239
58. Gerschenson LE, Rotello RJ. Apoptosis: a different type of cell death. *The FASEB Journal*. 1992;2450- 5

59. Sen S, D'Incalci M. Apoptosis: Biochemical events and relevance to cancer chemotherapy. *FEBS Journal*. 1992; 122-7
60. Agostini M, Tucci P, Melino G. Cell death pathology: Perspective for human diseases. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2011; 451–455
61. Ward TH, Cummings J, Dean E, Greystoke A, Hou JM, Backen A, et.al. Biomarkers of apoptosis. *British Journal of Cancer*. 2008; 841 – 846
62. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell Death in Disease: Mechanisms and Emerging Therapeutic Concepts. *N Engl J Med*. 2009;1570–1583.
63. Ow YLP, Green DR, Hao Z, Mak TW. Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2008; 532-542
64. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002; 401-410
65. Wyllie AH. Where, O Death, Is Thy Sting?" A Brief Review of Apoptosis Biology. *Mol Neurobiol*. 2010; 4–9
66. Wu H, Che X, Zheng Q, Wu A, Pan K, Shao A, et.al. Caspases: A Molecular Switch Node in the Crosstalk between Autophagy and Apoptosis. 2014; 10(9): 1072-1083
67. Crescenzi M, Seto M, Herzig GP, Weiss PD, Griffith RC, Korsmeyer SJ. Thermostable DNA polymerase chain amplification of t(14;18) chromosome breakpoints and detection of minimal residual disease. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1998; 4869-4873
68. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008; 231-241
69. SABiosciences Web Site, http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAHS-012A.html
70. Ávalos Y, Canales J, Bravo-Sagua R, Criollo A, Lavandero S, Quest AFG. Tumor Suppression and Promotion by Autophagy. *BioMed Research International*. 2014;1-15
71. Harr MW, Distelhorst CW. Apoptosis and Autophagy: Decoding Calcium Signals that Mediate Life or Death. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;1-18
72. Strozyk E, Kulms D. The Role of AKT/mTOR Pathway in Stress Response to UV-Irradiation: Implication in Skin Carcinogenesis by Regulation of Apoptosis, Autophagy and Senescence. *Int. J. Mol. Sci*. 2013, 14, 15260-15285
73. Fan YJ, Zong WX. The cellular decision between apoptosis and autophagy. *Chin J Cancer*. 2013; 121-29
74. Maiese K, Chong ZZ, Shang YC, Wang S. Targeting disease through novel pathways of apoptosis and autophagy. *Expert Opin Ther Targets*. 2012; 1203–1214
75. Minina EA, Bozhkov PV, Hofius D. Autophagy as initiator or executioner of cell death. *Trends in Plant Science*. Article in press.
76. Sarkar S, Horn G, Moulton K, Oza A, Byler S, Kokolus S, et.al. Cancer Development, Progression, and Therapy: An Epigenetic Overview. *Int. J. Mol. Sci*. 2013, 14, 21087-21113
77. Pattingre S, Tassa A, Qu X. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*. 2005; 122:927–939.

78. Carayol N, Vakana E, Sassano A. Critical roles for mTORC2- and rapamycin-insensitive mTORC1-complexes in growth and survival of BCR-ABL-expressing leukemic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107:12469–12474.
79. Luo S, Rubinsztein DC. Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL. *Cell Death Differ*. 2010; 17:268–277.
80. Maiese K. The many facets of cell injury: angiogenesis to autophagy. *Curr Neurovasc Res*. 2012; 9:1–2
81. McPhee CK, Logan MA, Freeman MR. Activation of autophagy during cell death requires the engulfment receptor Draper. *Nature*. 2010; 24465:1093–1096.
82. SABiosciences Web Site, http://www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAHS-084Z.html
83. Mesa RA, Shieldsb A, Harec T, Erickson-Viitanenc S, Sunc W, Sarlisc NF, et.al. Progressive burden of myelofibrosis in untreated patients: Assessment of patient-reported outcomes in patients randomized to placebo in the COMFORT-I study. *Leuk Res*. 2013; 911-6.
84. Mesa RA, Kantarjian H, Tefferi A, Dueck A, Levy R, Vaddi K, et.al. Evaluating the Serial Use of the Myelofibrosis Symptom Assessment Form for Measuring Symptomatic Improvement. *Cancer*. 2011; 4869-4877
85. Mascarenhas J, Mughal TI, Verstovsek S. Biology and Clinical Management of Myeloproliferative Neoplasms and Development of the JAK Inhibitor Ruxolitinib. *Current Medicinal Chemistry*, 2012, 19, 4399-4413
86. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, Morra E, Rumi E, Pereira A, et.al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood*. 2010 Mar 4;115(9):1703-8
87. Tefferi A, Pardanani A. Serious Adverse Events During Ruxolitinib Treatment Discontinuation in Patients With Myelofibrosis. *Mayo Clin Proc*. 2011;86(12):1188-1191
88. Tefferi A . How I treat myelofibrosis. *Blood*. 2011; 117: 3494-3504
89. Tefferi A . The history of myeloproliferative disorders: before and after Dameshek. *Leukemia*. 2008, 3–13
90. Seavey MM, Dobrzanski P. The many faces of Janus kinase. *Biochemical Pharmacology*. 2012, 1136–1145
91. Rawlings JS, Rosler KM, Harrison DA. The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science*. 2004;117, 1281-1283
92. Nicolas CS, Amici M, Bortolotto ZA, Doherty A, Csaba Z, Fafouri A, et.al. The role of JAK-STAT signaling within the CNS. *Landes Bioscience*. 2013; e22925 1-10
93. Ostojic A, Vrhovac R, Verstovsek S. Ruxolitinib: a new JAK1/2 inhibitor that offers promising options for treatment of myelofibrosis. *Future Oncol*. 2011; 7(9), 1035–1043
94. Yang LPH, Keating GM. Ruxolitinib In the Treatment of Myelofibrosis. *Drugs* 2012; 72 (16): 2117-2127
95. Ruxolitinib, Pan JAK Inhibitor www.invivogen.com/inhibitors

96. Quintás-Cardama A, Vaddi K, Liu P, Manshouri T, Li J, Scherle PA. Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010 115: 3109-3117
97. Verstovsek S, Kantarjian H, Mesa RA, Pardanani AD, Cortes-Franco J, Thomas DA, et.al. Safety and Efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 Inhibitor, in Myelofibrosis. *N Engl J Med* 2010;363:1117-27.
98. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management. *Am J Hematol*. 2014 May;89(5):547-56.
99. Nowell P, Hungerford D. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia [abstract]. *Science*. 1960;132:1497
100. Rowley JD. 1973. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 243:290-293.
101. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature*. 1985. 315:550–554
102. Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N Engl J Med*. 2005. 353:172–87.
103. Konopka JB, Watanabe SM, Witte ON. An alteration of the human c-abl protein in K562 leukemia cells unmasks associated tyrosine kinase activity. *Cell*. 1984. 37:1035–1042.
104. Buchdunger E. Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative. *Cancer Res*. 1996. 56:100–104.
105. Sawyers CL. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood*. 2002. 99:3530–3539.
106. Manley P, Cowan-Jacob S, Mestan J. Advances in the structural biology, design and clinical development of Bcr-Abl kinase inhibitors for the treatment of chronic myeloid leukaemia. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005.1754
107. Jabbour E, Cortes J, Kantarjian H. Nilotinib for the treatment of chronic myeloid leukemia: An evidence-based review. *Core evidence*. 2009. 4: 207-213.
108. Okarski JS, Newitt JA, Chang CY, Cheng JD, Wittekind M, Kiefer SE, et.al. The Structure of Dasatinib (BMS-354825) Bound to Activated ABL Kinase Domain Elucidates Its Inhibitory Activity against Imatinib-Resistant ABL Mutants. *Cancer Research*. 2006. 66 (11): 5790–5797.
109. O'Hare T, Shakespeare WC, Zhu X, Eide CA, Rivera VM, Wang F, et al. AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer Cell*. 2009. 16(5):401–12.
110. Bahadori M. New Advances in RNAs, *Arch Iran Med*. 2006. 11(4):435-443.
111. Lin Q, Meloni D, Pan Y, Xia M, Rodgers J, Shepard S, et. al. Enantioselective synthesis of Janus kinase inhibitor INCB018424 via an organocatalytic aza-Michael reaction. *Org Lett*. 2009 May 7;11(9):1999-2002.

112. Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*. 2002 Feb 20;285(1-2):1-24.
113. Yarilina A, Xu K, Chan C, Ivashkiv LB. Regulation of inflammatory responses in tumor necrosis factor-activated and rheumatoid arthritis synovial macrophages by JAK inhibitors. *Arthritis Rheum*. 2012 Dec;64(12):3856-66.
114. Gallipoli P, Pellicano F, Morrison H, Laidlaw K, Allan EK, Bhatia R, et.al. Autocrine TNF- α production supports CML stem and progenitor cell survival and enhances their proliferation. *Blood*. 2013 Nov 7;122(19):3335-9.
115. Wullaert A, Heyninck K, Beyaert R. Mechanisms of crosstalk between TNF-induced NF-kappaB and JNK activation in hepatocytes. *Biochem Pharmacol*. 2006 Oct 30;72(9):1090-101.
116. Stein SJ, Baldwin AS. NF- κ B suppresses ROS levels in BCR-ABL(+) cells to prevent activation of JNK and cell death. *Oncogene*. 2011 Nov 10;30(45):4557-66.
117. Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr. NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science*. 1998 Sep 11;281(5383):1680-3.
118. Ni CZ, Welsh K, Leo E, Chiou CK, Wu H, Reed JC, Ely KR. Molecular basis for CD40 signaling mediated by TRAF3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Sep 12;97(19):10395-9.
119. Luo X, Zhang J, Liu X, Du Q, Xu N, Xu L, et.al. Identification of differentially expressed genes related to blastic crisis in chronic myeloid leukemia. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2012 Jun;32(6):840-2. Abstract
120. Wilson GS, Tian A, Hebbard L, Duan W, George J, Li X, Qiao L. Tumoricidal effects of the JAK inhibitor Ruxolitinib (INC424) on hepatocellular carcinoma in vitro. *Cancer Lett*. 2013 Dec 1;341(2):224-30.
121. Hu Y, Hong Y, Xu Y, Liu P, Guo DH, Chen Y. Inhibition of the JAK/STAT pathway with ruxolitinib overcomes cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer NSCLC. *Apoptosis*. 2014 Nov;19(11):1627-36.
122. Klejman A, Schreiner SJ, Nieborowska-Skorska M, Slupianek A, Wilson M, Smithgall TE, et.al. The Src family kinase Hck couples BCR/ABL to STAT5 activation in myeloid leukemia cells. *EMBO J*. 2002 Nov 1;21(21):5766-74.
123. Chen Y, Hu Y, Zhang H, Peng C, Li S. Loss of the Alox5 gene impairs leukemia stem cells and prevents chronic myeloid leukemia. *Nat Genet*. 2009 Jul;41(7):783-92.
124. Woessner DW, Lim CS. Disrupting BCR-ABL in combination with secondary leukemia-specific pathways in CML cells leads to enhanced apoptosis and decreased proliferation. *Mol Pharm*. 2013 Jan 7;10(1):270-7.
125. Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL, et.al. Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. *N Engl J Med*. 2004 Aug 12;351(7):657-67.
126. Perrotti D, Cesi V, Trotta R, Guerzoni C, Santilli G, Campbell K, et.al. BCR-ABL suppresses C/EBPalpha expression through inhibitory action of hnRNP E2. *Nat Genet*. 2002 Jan;30(1):48-58.

127. Treanor LM, Zhou S, Janke L, Churchman ML, Ma Z, Lu T, et.al. Interleukin-7 receptor mutants initiate early T cell precursor leukemia in murine thymocyte progenitors with multipotent potential. *J Exp Med*. 2014 Apr 7;211(4):701-13.
128. Mullican SE, Zhang S, Konopleva M, Ruvolo V, Andreeff M, Milbrandt J,et.al. Abrogation of nuclear receptors Nr4a3 and Nr4a1 leads to development of acute myeloid leukemia. *Nat Med*. 2007 Jun;13(6):730-5.
129. Rao R, Fiskus W, Yang Y, Lee P, Joshi R, Fernandez P, et. al. HDAC6 inhibition enhances 17-AAG--mediated abrogation of hsp90 chaperone function in human leukemia cells. *Blood*. 2008 Sep 1;112(5):1886-93.
130. Zhang H, Peng C, Hu Y, Li H, Sheng Z, Chen Y, et. al. The Blk pathway functions as a tumor suppressor in chronic myeloid leukemia stem cells. *Nat Genet*. 2012 Jul 15;44(8):861-71.
131. Weisberg E, Azab AK, Manley PW, Kung AL, Christie AL, Bronson R,et.al. Inhibition of CXCR4 in CML cells disrupts their interaction with the bone marrow microenvironment and sensitizes them to nilotinib. *Leukemia*. 2012 May;26(5):985-90.
132. Krause DS, Fulzele K, Catic A, Sun CC, Dombkowski D, Hurley MP,et.al. Differential regulation of myeloid leukemias by the bone marrow microenvironment. *Nat Med*. 2013 Nov;19(11):1513-7.
133. Hazem SH, Shaker ME, Ashamallah SA, Ibrahim TM. The novel Janus kinase inhibitor ruxolitinib confers protection against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity via multiple mechanisms. *Chem Biol Interact*. 2014 Sep 5;220:116-27.
134. An HJ, Choi EK, Kim JS, Hong SW, Moon JH, Shin JS, et.al. INCB018424 induces apoptotic cell death through the suppression of pJAK1 in human colon cancer cells. *Neoplasma*. 2014;61(1):56-62.
135. Yang H, Lawrence HR, Kazi A, Gevariya H, Patel R, Luo Y, et.al. Dual Aurora A and JAK2 kinase blockade effectively suppresses malignant transformation. *Oncotarget*. 2014 May 30;5(10):2947-61.
136. Bartalucci N, Tozzi L, Bogani C, Martinelli S, Rotunno S, Villeval JL, et.al. Co-targeting the PI3K/mTOR and JAK2 signalling pathways produces synergistic activity against myeloproliferative neoplasms. *J. Cell. Mol. Med*. Vol 17, No 11, 2013 pp. 1385-1396
137. Fiskus W, Verstovsek S, Manshouri T, Smith JE, Peth K, Abhyankar S,et.al. Dual PI3K/AKT/mTOR inhibitor BEZ235 synergistically enhances the activity of JAK2 inhibitor against cultured and primary human myeloproliferative neoplasm cells. *Mol Cancer Ther*. 2013 May;12(5):577-88.
138. Gallipoli P, Cook A, Rhodes S, Hopcroft L, Wheadon H, Whetton AD,et.al. JAK2/STAT5 inhibition by nilotinib with ruxolitinib contributes to the elimination of CML CD34+ cells in vitro and in vivo. *Blood*. 2014 Aug 28;124(9):1492-501.
139. Quintarellia C, Angelisa BD, Errichielloa S, Carusoa S, Espositoa N, Colavita I, et.al. Selective strong synergism of Ruxolitinib and second generation tyrosine kinase inhibitors to overcome bone marrow stroma related drug resistance in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia Research* 38 (2014) 236– 242.

140. Carter BZ, Qiu YH, Zhang N, Coombes KR, Mak DH, Thomas DA, et.al. Expression of ARC (apoptosis repressor with caspase recruitment domain), an antiapoptotic protein, is strongly prognostic in AML. *Blood*. 2011 Jan 20;117(3):780-7.
141. Mak PY, Mak DH, Ruvolo V, Jacamo R, Kornblau SM, Kantarjian H, et.al. Apoptosis repressor with caspase recruitment domain modulates second mitochondrial-derived activator of caspases mimetic-induced cell death through BIRC2/MAP3K14 signalling in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2014 Nov;167(3):376-84.
142. Kelly KR, Ecsedy J, Medina E, Mahalingam D, Padmanabhan S, Nawrocki ST, et.al. The novel Aurora A kinase inhibitor MLN8237 is active in resistant chronic myeloid leukaemia and significantly increases the efficacy of nilotinib. *J Cell Mol Med*. 2011 Oct;15(10):2057-70.
143. Park SJ, Kim MJ, Kim HB, Kang CD, Kim SH. Sensitization of imatinib-resistant CML cells to TRAIL-induced apoptosis is mediated through down-regulation of Bcr-Abl as well as c-FLIP. *Biochem J*. 2009 Apr 28;420(1):73-81.
144. Shi P, Chandra J, Sun X, Gergely M, Cortes JE, Garcia-Manero G, et.al. Inhibition of IGF-IR tyrosine kinase induces apoptosis and cell cycle arrest in imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia cells. *J Cell Mol Med*. 2010 Jun;14(6B):1777-92.
145. Dunlop EA, Tee AR. mTOR and autophagy: A dynamic relationship governed by nutrients and energy. *Semin Cell Dev Biol*. 2014 Aug 23. pii: S1084-9521(14)00242-0. doi: 10.1016/j.semcdb.2014.08.006.
146. Evangelisti C, Ricci F, Tazzari P, Chiarini F, Battistelli M, Falcieri E, et. al. Preclinical testing of the Akt inhibitor triciribine in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *J Cell Physiol*. 2011 Mar;226(3):822-31.
147. Fan J, Dong X, Zhang W, Zeng X, Li Y, Sun Y, et.al. Tyrosine kinase inhibitor Thiotanib targets Bcr-Abl and induces apoptosis and autophagy in human chronic myeloid leukemia cells. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014 Dec;98(23):9763-75.
148. Bartalucci N, Guglielmelli P, Vannucchi AM. Rationale for targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in myeloproliferative neoplasms. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2013 Sep;13 Suppl 2:S307-9.
149. Leger DY, Liagre B, Beneytout JL. Low dose leflunomide activates PI3K/Akt signalling in erythroleukemia cells and reduces apoptosis induced by anticancer agents. *Apoptosis*. 2006 Oct;11(10):1747-60.
150. Lee-Sherick AB, Eisenman KM, Sather S, McGranahan A, Armistead PM, McGary CS, et.al. Aberrant Mer receptor tyrosine kinase expression contributes to leukemogenesis in acute myeloid leukemia. *Oncogene*. 2013 Nov 14;32(46):5359-68.
151. Luo S, Rubinsztein DC. Atg5 and Bcl-2 provide novel insights into the interplay between apoptosis and autophagy. *Cell Death Differ*. 2007 Jul;14(7):1247-50.
152. Peng X, Li W, Yuan L, Mehta RG, Kopelovich L, McCormick DL. Inhibition of proliferation and induction of autophagy by atorvastatin in PC3 prostate cancer cells correlate with downregulation of Bcl2 and upregulation of miR-182 and p21. *PLoS One*. 2013 Aug 1;8(8):e70442.

153. Naqvi K, Verstovsek S, Kantarjian H, Ravandi F. A potential role of ruxolitinib in leukemia. *Expert Opin. Investig. Drugs* (2011) 20(8):1159-1166.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Denizli’ de doğdum. İlköğrenimimi Acıpayam Cumhuriyet İlköğretim Okulu’ nda, orta öğrenimimi Acıpayam Anadolu Lisesi’nde tamamladım. Lisans eğitimimi 2007-2011 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü’nde gerçekleştirdim. 2012 yılında ÖYP Araştırma Görevlisi olarak Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’ nda göreve başladım. 2013 yılı Şubat ayından bu yana yılında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimi yapmaktayım.

e- posta: goker.bb@gmail.com