

EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI

PROF DR FEHİMİ AKÇİÇEK

HEMATOLOJİ BİLİMDALİ

PROF DR GÜRAY SAYDAM

**Dasatinib Uygulanan KML Hücre Serilerinde Uyarılmış
Apoptozunda STAT5A ve STAT5B için Ortak Hedef olan
miRNA' ların Ekspresyon Profillerinin Çıkartılması**

UZM DR ASU FERGÜN YILMAZ

DANIŞMAN

DOÇ DR FİLİZ VURAL

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ-AMAÇ

2. GENEL BİLGİLER

1.1. Kronik myeloid lösemide tanım

1.2. Epidemiyoloji

1.3. Etiyoloji

1.4. Tarihçe

1.5. Tanı

1.6. Ayırıcı tanı

1.7. Klinik evreleme ve prognoz

1.8. Tedavi

1.1.1. Tirozin kinaz inhibitörleri

1.1.1.1. İmatinib

1.1.1.2. Nilotinib

1.1.1.3. Dasatinib

1.1.2. Allojeneik kök hücre nakli

1.9. Tedaviye yanıtın değerlendirilmesi

1.10. Patogenez

1.1.1. Ph kromozomu

1.1.2. BCR/ABL füzyon geni ve proteini

1.1.1.1. Abl geni ve ptoteini

1.1.1.2. Bcr geni ve proteini

1.1.1.3. Abl/bcr füzyon geni ve proteini

1.1.3. Patogenezde etkili olan Bcr/abl aracılı transformasyon mekanizmaları

1.1.1.1. Adezyon özelliklerinin değişimi

1.1.1.2. Apoptozun inhibisyonu

1.1.1.3. Mitojenik sinyal yolaklarının aktivasyonu

1.11. STAT 5'in genel özellikleri

1.12. Tumor hücre proliferasyonu ve apoptozda STAT'ların rolü

1.13. STAT'ların anjiogenezdeki rolü

1.14. Tumorün immun sistemden korunması

1.15. Anti- kanser tedavi hedefi olarak STAT'lar

1.16. miRNA

1.1.1. miRNA'ların tarihçesi ve terminolojisi

1.1.2. miRNA'ların hedef genleri

1.1.3. miRNA'ların etkileri

3. MATERYAL METOD

1.1. Lösemik hücre hattı

1.1.1. K562 hücre hattının özellikleri

1.1.2. K562 hücre hattında kullanılan besiyeri ve kültür işlemi

1.1.3. Dondurulmuş hücre hattının çözülmesi

1.1.4. Hücre hattının pasajlanması

1.1.5. Hücre sayımı ve canlılığı

1.2. İlaç uygulaması

1.3. Apoptoz testi

1.4. *in silico* Analiz ile STAT5A ve STAT5B' nin Ortak Hedefi olan miRNA' ların Belirlenmesi ve Ekspresyon Profillerinin Çıkarılması

1.5. mi RNA izolasyonu

1.6. İstatistiksel analiz

4. SONUÇLAR

5. TARTIŞMA

6. KAYNAKLAR

7. ÖZET

8. ABSTRACT

TABLolar:

Tablo 1: Dünya Sağlık Örgütü akselere faz tanımı

Tablo 2: Dünya Sağlık Örgütü blastik faz tanımı

Tablo 3: Kronik myeloid lösemi risk tanımlaması

Tablo 4: Yanıt tanımları

Tablo 5: "miRBase release 19" web sitesine göre STAT5A ve -5B'nin ortak hedefi olduğu miRNA'lar

Tablo 6: Dasatinib uygulanmamış hücre kültüründe hedef miRNA'lar ve referans genlerin amplifikasyona girdikleri döngü sayısı

Tablo 7: Dasatinib uygulanmış hücre kültüründe hedef miRNA'lar ve referans genlerin amplifikasyona girdikleri döngü sayısı

Tablo 8: Hedef miRNA'lardaki kontrol gruplarına göre ekspresyon değişiklikleri

ŞEKİLLER:

Şekil 1: Ph kromozomu

Şekil 2: Kronik myeloid lösemi periferik yayma bulguları

Şekil 3: imatinib mesilat

Şekil 4: 2. Kuşak tirozin kinaz inhibitörleri ve imatinib mesilatın kimyasal yapılarının karşılaştırılması

Şekil 5: dasatinibin kimyasal yapısı

Şekil 6: abl proteinin yapısı

Şekil 7: bcr proteinin yapısı

Şekil 8: bcr/abl geninin başlıca formları

Şekil 9: bcr/abl geni tarafından kontrol edilen başlıca transformasyon mekanizmaları

Şekil 10: mitojenik sinyal yolları

Şekil 11: JAK/STAT sinyal iletim yolağı

Şekil 12: STAT moleküllerinin yapısı

Şekil 13: mi RNA biyogenezi

Şekil 14: hücre canlılığının değerlendirilmesi

Şekil 15: STAT 5a ve 5b'yi hedef alan aday miRNA'ların ekspresyon profilleri

GRAFİKLER:

Grafik 1: Dasatinib uygulanmış hücre kültüründe saatlere göre tanımlanan IC_{50} değerleri

Grafik 2: Belirlenen dasatinib dozu uygulanan ve uygulanmayan (kontrol grubu) gruplar arasındaki apoptoz oranları

Grafik 3: Hedef miRNA'ların kontrol grubuna göre ekspresyon değişiklikleri

Grafik 4: STAT 5a ve 5b'yi hedef alan aday miRNA'ların "scatter plot" ve "volcane" grafiklerindeki ekspresyon profilleri

KISALTMALAR:

Abi: abelson murin lösemi

AKHN: Allojenik kök hücre nakli

AML: akut myeloid lösemi

ALL: akut lenfoblastik lösemi

ATP: adenosin trifosfat

Bcr: *break point cluster region*

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

ELN: European Leukemia Net

EPO: eritropoetin

FDA: *food and drug administration*

FISH: floresan insitu hibridizasyon

G- CSF: Granulosit koloni stimule edici faktör

GM- CSF: granulosit- makrofaj koloni stimule edici faktör

HY: hematolojik yanıt

IFN: interferon

KML: kronik myeloid lösemi

KLL: kronik lenfositik lösemi

MAP: *mitogen activated protein*

MMY: major moleküler yanıt

MY: moleküler yanıt

Myc: *myelositomatozis*

PDGF: *platelet derived growth factor* – trombosit kaynaklı büyüme faktörü

Ph: Philadelphia kromozomu

PI: fosfotidil inositol

PIAS: *protein inhibitors of activated STATs*- aktive STAT'ların protein inhibitörleri

RT- PCR: ters transkriptaz polimerize zincir reaksiyonu

SCOCS: *suppresor of cytokin signaling*- sitokin sinyalleşme supresörler

STAT: *signal transducer and activator of transcription*

SY: Sitogenetik yanıt

THY: Tam hematolojik yanıt

TPO: trombopoetin

UTR: *untranslated region*- translasyona uğramayan bölge

VEGF: vasküler endotelial büyüme faktörü

ÖNSÖZ

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı'nda aldığım yan dal uzmanlık eğitimim boyunca her türlü bilgi ve tecrübesinden yararlandığım değerli hocalarım, başta tez danışmanım Doç Dr Filiz Vural olmak üzere Prof Dr Filiz Büyükkeçeci, Prof Dr Murat Tombuloğlu, Prof Dr Seçkin Çağırğan, Prof Dr Mahmut Töb , Prof Dr Güray Saydam, Prof Dr Ayhan Dönmez ve Doç Dr Fahri Şahin'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Beraber çalışmaktan keyif aldığım, iyi ve kötü günlerimde yanımda olan tüm çalışma arkadaşlarıma, tezin her aşamasında bana yardım eden ve destek olan  ağda  Aktan ve Burçin Kaymaz'a teşekkür ederim.

Yan dal uzmanlık eğitimim süresince bana sabırla destek olan e im Barış Yılmaz ve oğlum Can'a sonsuz teşekkür ederim.

1.GİRİŞ-AMAÇ

Kronik myeloid lösemi (KML) myeloid öncül hücrelerin klonal çoğalması ile karakterize kök hücre hastalığıdır. 9 ve 22. kromozomlar arasında resiprokal translokasyon ile tanımlanan Philadelphia (Ph) kromozomu KML'nin oluşmasında temel sitogenetik etken olduğu belirlenmiştir. Bu translokasyon sonucunda, 9.q34 kromozomu üzerindeki tirozin kinaz “Abelson murine lösemi” (c-ABL) geni 22.q11 kromozomu üzerindeki “Break point cluster Region” (BCR) geni ile 22. kromozom üzerinde birleşir ve [t(9,22) (q34; q11) Bcr/Abl füzyon geni oluşur. Normalde inaktif bir protoonkogen olan c-abl, translokasyon sonrasında onkogenik özellik kazanır ve Bcr-Abl füzyon proteinini kodlar. Bcr/Abl füzyon geni, kontrolsüz tirozin kinaz aktivitesi gösterir; hücre proliferasyonu, maturasyonu ve adezyon sinyal yollarını aktive ve apoptozu inhibe ederek malign hücre transformasyonuna yol açar ve KML patogenezinin temelini oluşturur. Patogeneizde etkili olan Bcr-Abl aracılı malign transformasyon mekanizmaları; adezyon özelliklerinin değişimi, apoptozis inhibisyonu, mitoz sinyal ileti yollarının aktivasyonu şeklinde özetlenebilir. Bu sinyal ileti yolları; Ras ve MAP kinaz yolağı, fosfotidilinositol-3 kinaz (PI3K), myc ve jak-stat’tır.

JAK/STAT sinyal iletim yolağında bulunan sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatörü (*signal transducer and activator of transcription*; STAT) proteinleri, sitokin, büyüme faktörü veya peptid reseptörlerinden aldıkları sinyaller ile aktive olan ve bu sinyalleri çekirdeğe ileten sessiz (*latent*) sitoplazmik transkripsiyon faktörleri olarak işlev görürler. Aktive olduklarında önce fosforillenerek, sonra da dimerleşerek çekirdeğe yönelirler ve hedef genin promoter bölgesine bağlanarak "gen ekspresyon" değişimine neden olurlar. STAT'lar, hücre proliferasyonu, anjiogenez ve çeşitli proteinlerin ifadenmelerinin düzenlenmesinden sorumludur. Bu nedenle, anormal aktivasyonları çoğu zaman hücresel transformasyona neden olur. STAT protein ailesinin yedi üyesi bulunur: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B ve STAT6. Özellikle STAT3 ve STAT5, kontrolsüz çoğalan, apoptozu uğramayan, immun sistemden kaçan ve anjiogenezi uyaran tümör hücrelerinde yüksek oranda ifadenirler ve bu şekilde karsinogeneizde etkili olurlar. Bu özelliklerinden dolayı kanser tedavisinde terapötik hedefler haline gelmişlerdir. STAT sinyalleşmesini baskılama yollarından biri aktivasyonunu sağlayan değişik tirozin kinazları bloke ederek apoptozu uyarmaktır. Ancak tirozin kinaz reseptörleri STAT moleküllerine spesifik değildir. STAT sinyalleşmesini engelleyebilmek için bilinen spesifik düzenleyicileri hedef olarak seçmek alternatif bir tedavi yolu olabilir. Bunlara örnek olarak Sitokin sinyalleşme baskılayıcıları (*suppressor of cytokine signalling*; SOCS) ve aktive STAT’ların protein inhibitörleri (*protein*

inhibitors of activated STATs; PIAS) verilebilir. Kanser tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen yeni tedavi stratejilerinde küçük sentetik moleküler inhibitörler yanında, shRNA ve siRNA'lar da önem kazanmıştır. Gelecekte siRNA uygulamasının özellikle imatinibe dirençli KML hastalarında alternatif bir tedavi seçeneği olabileceği düşünülmektedir. Ancak, son zamanlarda miRNA'lara karşı kullanılan anti-miR oligonükleotidlerin kullanımı da gündeme gelmiştir. Günümüze kadar miRNA biyogenezinin aydınlatılmasına yönelik çalışmalar olmasına karşın, miRNA'ların, biyolojik yolları nasıl düzenledikleri henüz tam olarak bilinmemektedir. Özellikle, STAT5a ve 5b'nin ortak hedefleri olan miRNA ve anti-miRNA tedavilerini araştıran yeterli çalışma yoktur.

miRNA'lar, endojen olarak sentezlenen yaklaşık 19-24 nükleotid uzunluğunda olup protein kodlamayan küçük RNA'lardır. En karakteristik özellikleri hedef mRNA'nın 3' -UTR (Untranslated region=Translasyona uğramayan bölge)'sine bağlanarak translasyon baskılanmasına ya da parçalanmasına neden olmalarıdır. Böylece, genlerin modülasyonunda, hücresel gelişim, farklılaşma, proliferasyon, metabolizma, immünite ve ölüm gibi oldukça geniş bir biyolojik yollar aralığındaki birçok olayla ilişkilidirler. Bugün, birçok fizyolojik sürecin miRNA'lar tarafından düzenlendiğini biliyoruz. Bu yüzden, miRNA'ların anormal ifadenme kalıpları hücre biyolojisinde önemli birçok mekanizmayı etkileyebilmektedir ve bunun sonucunda da enfeksiyon, kardiyovasküler, nörodejeneratif hastalıklar ve kanserler gelişebilmektedir. Karsinogenezle ilgili miRNA'lar onkogen veya tümör baskılayıcı gen olarak fonksiyon görmektedirler. Yapılan çalışmalarda miRNA'lar, tümör hücrelerinde hem baskılandığı hem de yüksek oranda ifadelenebildikleri gösterilmiştir. Yine bu alandaki gelişmeler, bazı miRNA'ların solid tümörlerin hepsinde arttığını, bir kısmının kanser tipine spesifik olarak artış gösterdiğini bildirmiştir. Bazı miRNA'ların ise prognozla ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Bu bilgiler miRNA'ları tanı, tedavi ve prognozun belirlenmesinde olası hedefler haline getirmiştir.

Literatürde, KML gelişiminde önemi bilinen JAK/STAT yolu ve STAT5a ve 5b'nin hedefi olan miRNA'lar ve etki mekanizmaları hakkında yeterli bilgi mevcut değildir.

Biz çalışmamızda; dasatinib uygulanmış K562 kronik myelositer lösemi hücre hattında, uyarılmış apoptozda, STAT5a ve 5b'nin ortak hedefi olan miRNA'ların ifadenmesini araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

KRONİK MYELOİD LÖSEMI

1.1. Tanım:

Kronik myeloid lösemi (KML) myeloid öncül hücrelerin klonal çoğalması ile karakterize kök hücre hastalığıdır (1). KML; 2008 Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflamasına göre; “Myeloproliferatif Neoplaziler ” arasında yer alır (2).

KML'nin temel sitogenetik özelliği 9. ve 22. kromozomlar arasındaki resiprokal translokasyon sonucu gelişen Philadelphia (Ph) kromozomudur. Resiprokal translokasyon sonrası oluşan bcr/Abl füzyon geni kontrolsüz tirozin kinaz aktivitesi gösterir. Tirozin kinaz aktivitesi; hücre proliferasyonunu, maturasyonunu ve adezyon sinyal yollarını aktive ederek ve apoptozu baskılar ve malign hücre transformasyonuna yol açarak KML patogenezinin temelini oluşturur (3).

KML günümüzde moleküler düzeyde en iyi tanımlanmış lösemi tipidir. Aynı zamanda biyolojik ajan olan interferon kullanılarak lösemik klonun baskılandığı ve sağkalımın uzatıldığı ilk neoplastik hastalık olma özelliğini de taşımaktadır (4)

2.2 Epidemiyoloji:

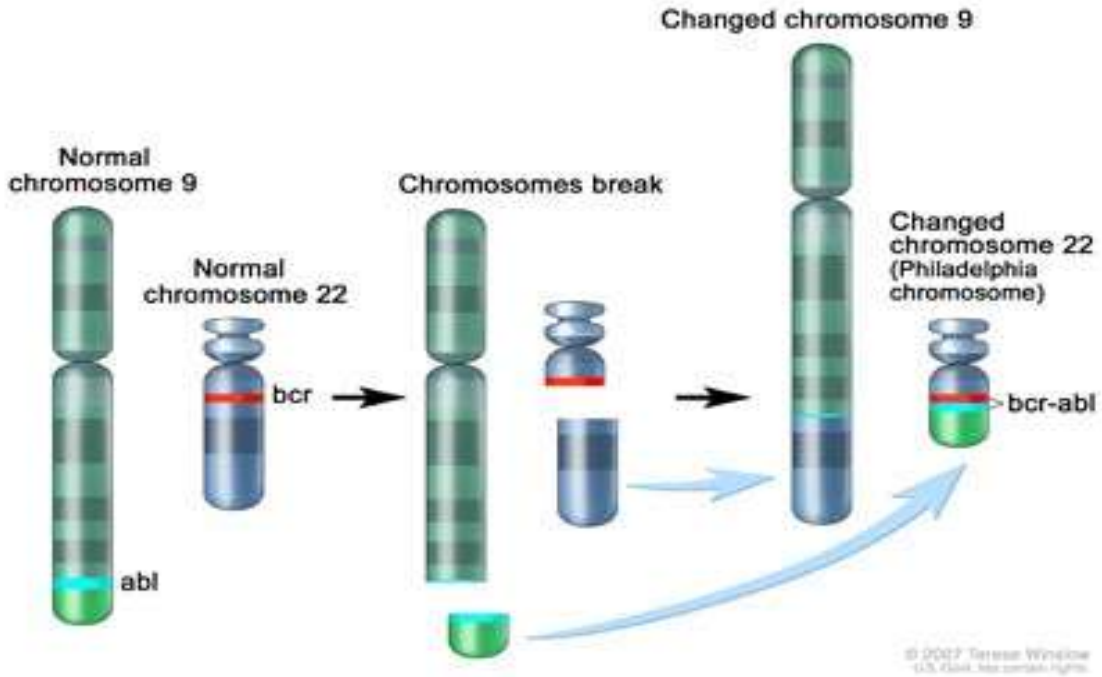
KML, tüm erişkin lösemilerin %20'sini oluşturur. Yıllık insidansı yaklaşık 1 - 2/100.000'dir. Hastalık erkeklerde kadınlara oranla biraz daha sıktır. Yaşamın 5.ve 6. dekatlarında sık görülür ve yaşla birlikte insidansı artar. Olguların ancak % 10 kadarı 20 yaş ve altındadır. (1)

2.3 Etiyoloji:

Olguların çoğu sporadik olup, etyolojide suçlanan izole tek bir ajan bulunmamaktadır. Ailesel bir predisposan veya viral bir etiyoloji ile birlikteliği kesin olarak gösterilememekle birlikte iyonize radyasyona maruz kalmanın KML riskini arttırdığı bildirilmiştir. Japonya'da 1945 yılındaki atom bombası patlamasından sonra KML insidansı artmıştır. Ancak nükleer endüstrilerde çalışanlarda, akıllayıcı ajan maruziyeti ya da radyoterapi sonrası KML riskinde artış gösterilememiştir. Bu veriler doza bağımlı bir etki olabileceğini düşündürmektedir (5).

2.4 KML'nin tarihçesi:

İlk olarak 1845 yılında Dr. Rudolf Virchow ve Dr. John Hughes Bennett adında iki patolog tarafından splenomegali ve lökositozu olan ve bu bulguları açıklayacak başka bir nedeni bulunmayan 2 hastada birbirinden bağımsız olarak tanımlanmıştır (6,7). Yaklaşık 100 yıl sonra; 1960 yılında Peter Nowell ve David Hungerford, KML hastalarında, kromozomal delesyon olarak düşünülen akrosentrik kromozom varlığını tanımlamışlardır. Bu durum tarihte bir kromozomal anormalliğin spesifik bir maligniteyle bağlantısının kurulmasının ilk örneğidir. 1973 yılında Dr. Janet Rowley tarafından kromozom 9'daki Abl protoonkogenin 22.kromozomdaki Bcr geni yakınına resiprokal translokasyonu gösterilmiştir. Bu yeni belirleyici, keşfedildiği şehrin onuruna Philadelphia kromozomu (Ph) olarak adlandırılmıştır (şekil1). Daha sonra abl ve bcr genleri tanımlanmış ve Bcr/Abl füzyon proteininin tirozin kinaz aktivitesi olduğu ve onkogeneizde kilit rolü oynadığı gösterilmiştir. 2001 yılında Druker ve ark. tirozin kinaz aktivitesinin inhibisyonunun KML tedavisinde etkili olacağını düşünerek, bir tirozin kinaz inhibitörü (STI571) geliştirmişlerdir. STI571, KML ve kanser tedavisinde bir dönüm noktasıdır (8-10).



Şekil 1: Ph Kromozomu

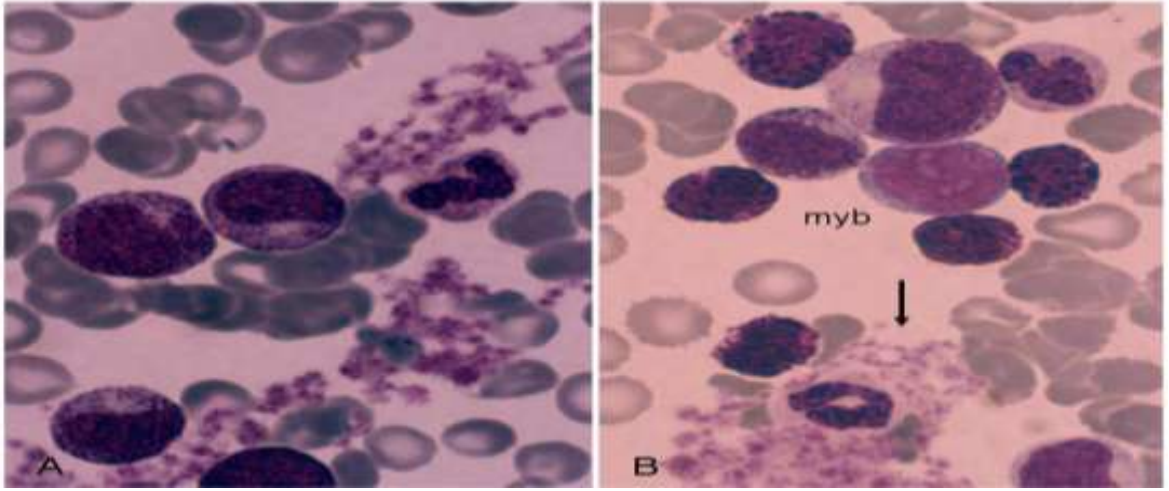
2.5 Tanı:

Diğer tüm hastalıklarda olduğu gibi ayrıntılı öykü ve fizik muayene sonrası yapılan tam kan sayımı, biyokimya tetkikleri tanı koymada ilk aşamadır. İlk başvuruda hastaların çoğu kronik evrededir. İlk tanı anında asemptomatik olabilmekle beraber anemi ve splenomegaliye bağlı semptomlar; halsizlik, iştahsızlık, kilo kaybı ve karında dolgunluk hissi görülebilir. Nadiren kanama ve trombozlar ve lökostatiz sonrası gelişen multiorgan yetmezliği tablosu ile hastalar başvurabilirler.

Fizik muayenede hepatomegali ve splenomegali bulgusu ekstramedullar hematopoez ve KML hücre infiltrasyonu ile ilişkili olabilir. Lenfadenopati nadirdir ve akselere faz veya blastik faza geçişi düşündürülebilir. Kanda, kemik iliği aspirasyon ve biyopside sitogenetik ve polimerize zincir reaksiyonu (PCR) ile Ph kromozomu ve bcr/abl'nin gösterilmesi ile tanı konur.

Laboratuvar tetkiklerinden tam kan sayımında saptanan lökositoz KML'nin en tipik bulgusudur. Lökosit sayısı 15.000–500.000/ μ l arasında değişir. Ancak hemen daima 25.000/ μ l üzerindedir ve olguların yarısında 100.000/ μ l'nin üzerindedir. Tedavi edilmeyen hastalarda total lökosit sayısı progresif olarak artar. Tanı anında olguların 1/3'ü ile 1/2'sinde trombositoz saptanmasına rağmen, trombosit değeri normal, yüksek veya azalmış olabilir. Ancak trombositopeni varlığında öncelikle akselere ve blastik faza geçiş düşünölmelidir. Trombositlerde sayısal olarak artma mevcut olmasına karşın fonksiyonları azalmıştır. Agregasyon bozukluğu ve trombosit depo havuzunda eksiklikler görülebilir. Buna rağmen tromboz ve/veya kanama nadiren izlenen komplikasyonlardır.

Hastalarda hafif anemi sıklıkla bulunur. Periferik kan yaymasında, myeloid serinin matür veya matüre yakın tüm elemanlarındaki artışın yanı sıra kemik iliğine ait tüm elemanlar görülebilir. Kronik faz KML'de blast oranı % 3'ün altında iken akselere faz ve blastik fazda bu oran sırasıyla %1-20 ve > % 20 arasında değişir. Bazofil ve eozinofil sayısında artış kötü prognoz belirleyicisidir.



Şekil 2: KML, periferik yayma A) artmış trombosit ve granüler seri elemanlar, B) blast izlenmekte.

Kemik iliği hiperselüler olup yağ hücrelerinde azalma görülür. Myeloid /eritroid hücre oranı artmıştır (20-30/1). Eosinofil ve bazofillerde artış eşlik edebilir. Megakaryositler normal veya sayıca artmış olup displastiktir. Blast sayısı hastalığın fazına göre değişiklik gösterir.

Standart bantlama yöntemi ile yapılan sitogenetik analizde KML olgularının %90-%95'de Ph kromozomu pozitif olarak gösterilmektedir [t(9;22)(q34; q11)]. Ph kromozomu gösterilmeyen KML düşünülen olgularda ek moleküler yöntemler ile (floresan insitu hibridizasyon[FISH], southern blot ve ters transkriptaz polimerize zincir reaksiyonu [RT-PCR]) Bcr/Abl yeniden yapılanması saptanabilir. Bu bulgunun normal sitogenetik analizle bulunmaması genellikle küçük bir bölgenin translokasyonu yönünde değerlendirilebilir. Olgularda takip sırasında yeni kromozomal anomaliler ortaya çıkabilir, bu progresyon ile ilişkilidir (11-14)

2.6 Ayırıcı Tanı:

Lökemoid reaksiyon, kronik myelomonositik lösemi ve diğer myeloproliferatif neoplaziler (kronik nötrofilik lösemi, kronik eosinofilik lösemi, Polisitemia Vera, Esansiyel Trombositoz ve Primer Myelofibroz) ayırıcı tanıda akla gelmelidir. Ph kromozom varlığı tanı için patognomniktir.

2.7 Klinik evreleme ve prognoz:

KML klinik olarak üç evreye ayrılır. Kronik faz, akselere faz ve akut faz (blastik kriz fazı).

Akselere ve blastik faz DSÖ kriterleri aşağıda verilmiştir.

Akselere faz:

- . Periferik kan lökositlerinin ve/veya çekirdekli kemik iliği hücrelerinin %10-19'unun blast olması
- Periferik kandaki bazofillerin >%20
- Tedavi ile ilişkisiz kalıcı trombositopeni < 100.000/mm³ veya tedaviye yanıtız kalıcı trombositoz > 1x10⁶/mm³
- Tedaviye yanıtız ve giderek artan dalak boyutu ve lökosit sayısı
- Sitogenetik olarak klonal dönüşüm olması

Tablo 1.DSÖ KML akselere faz tanımı**Blastik faz:**

- Periferik kan lökositlerinin veya kemik iliğindeki çekirdekli hücrelerinin >%20'sinin blast olması
- Ekstramedüller blastik proliferasyon
- Kemik iliği biyopsisinde gruplar halinde blastların olması

Tablo 2 .DSÖ KML blastik faz tanımı

Tedavi edilmeyen olgularda, myeloid hiperplazi ve splenomegali ile karakterize kronik fazı akselere faz ve blastik faz izler. Ortalama 3-4 yıllık bir kronik fazdan sonra akselere fazdan geçerek blastik transformasyon görülür. Akselere fazda ateş, kemik ağrıları, kilo kaybı gibi belirtilerle lökositoz, lökositozda ve spenomegalide tedaviye direnç, trombositoz veya trombositopeni, bazofili ve lökosit alkalen fosfataz (LAP) skorunda ve blast oranında artma görülür. Olguların çoğunda myeloid, küçük bir kısmında lenfoid lösemi gelişebilir. Bu fazda konstitüsyonel semptomlar çok belirgindir ve dalak daha da büyür, sternal duyarlılık ve kemik ağrıları görülebilir. Derin bir anemi, trombositopeni ve tedaviye direnç ile karakterizedir. Blastik

transformasyonda prognoz çok kötüdür. Blastik faz birkaç ay sürüp ölümle sonuçlanır. Bu fazda trizomi 8, iso(17q), +19 ve Y kromozomu kaybı, daha az sıklıkta trizomi 19, trizomi 21, kromozom 7 ve 17 gibi ek kromozom anomalileri görülebilir (15,16).

Günümüzde, tirozin kinaz inhibitörlerinin tedaviye girmesi ile birlikte blastik faz çok daha nadir görülmektedir. Tedaviye direnç gelişimi de prognozla ilişkili bulunmuştur.(17)

Tedavide imatinib kullanımından önce, KML kronik faz hastalarında prognostik risk değerlendirmesi temel olarak Sokal skoru ve Hasford (Euro) skoru olarak isimlendirilen iki sisteme dayandırılmıştır ve tedavi öncesi değerler dikkate alınarak saptanmıştır.

I-Sokal risk skoru Hesaplanması	Risk Sınıflandırması
$0.0116 \times [\text{yaş (yıl)} - 43.4] + 0.0345 \times (\text{dalak} - 7.51) + 0.188 \times [(\text{trombosit sayısı} / 700)^2 - 0.563] + 0.0887 \times (\text{blast} - 2.10)$	Düşük risk <0.8
	Orta risk 0.8-1.2
	Yüksek risk >1.2
II-Euro, Hasford risk skorlaması (modifiye Sokal)	Risk Sınıflandırması
Yaş $\geq$ 50 ise $0.666 + (0.042 \times \text{dalak boyutu})$ + trombosit sayısı > 1500 x10 ⁹ /L ise $1.0956 + (0.0584 \times \text{blast})$ +bazofil sayısı > %3 ise $0.20399 + (0.0413 \times \text{eozinofiller}) \times 100$	Düşük risk ≤ 780
	Orta risk 781-1480
	Yüksek risk >1480

Tablo 3. KML Risk Skorlamaları

2.8. KML Tedavisi:

Amaç öncelikle hastalığa ait semptom ve bulguları kontrol altına almak ve sonrasında kür sağlamaktır. Lökosit sayısı çok yüksek KML hastalarında lökostataz/hipervizkozite sendromu bulguları varsa lökoferez uygulanabilir (17)

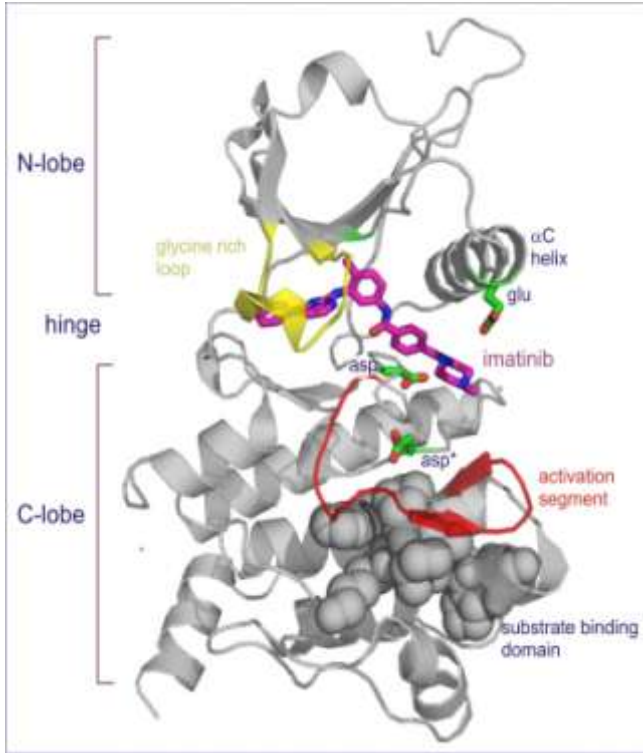
KML tedavisinde başlangıçta hastalığın biyolojik seyrini değiştirmeyen hücre sayısını azaltıcı sitotoksik tedaviler (başlıca hidroksiüre ve busulfan) kullanılmıştır. Günümüzde hidroksiüre, lökostatik komplikasyonları önlemek amacıyla tirozin kinaz inhibitörlerinin kullanılmasına kadar kısa süreli kullanılabilir. Ph kromozomu üzerine etkisi yoktur (17). 1980'li yıllarda ise İnterferon (IFN) ve IFN/ ARA-C kombinasyonu kullanılmaya başlanmıştır. Hastalığın seyri ve kaderi 1998 yılında tirozin kinaz inhibitörlerinin tedavide kullanılmaya başlanmasıyla değişmiştir. İlk tirozin

kinaz inhibitörü olan imatinib mesilat KML tedavisinde bir dönüm noktası olmuş ve ardından direnç gelişimi üzerine ikinci kuşak tirozin kinazlar geliştirilmiştir. Ancak günümüz bilgileri ile tüm gelişmelere rağmen bilinen tek küratif tedavi allojeneik kök hücre naklidir; ancak mortalite ve morbiditesinin yüksek olması nedeniyle tirozin kinazlara dirençli olgular dışında tedavideki yeri oldukça azalmıştır (18) .

2.8.1Tirozin kinaz inhibitörleri:

2.8.1.1 İmatinib:

Platelet-derived growth factor (PDGF) reseptörünü hedef alan spesifik bir tirozin kinaz inhibitörüdür. İmatinib, "Food and Drug Administration" (FDA) tarafından Mayıs 2001'de IFN tedavisine refrakter KML tedavisi ve Şubat 2003'te yeni tanı KML tedavisi için onaylanarak kullanıma girmiştir. İmatinib, daha önceki standart tedavilerle karşılaştırıldığında, uzun dönemde süregelen yüksek yanıt oranları ve iyi yan etki profili nedeniyle, kronik faz KML'nin standart tedavisi olarak kabul edilmiştir



Şekil 3: imatinib mesilat

Faz 1 ve 2 çalışmalarında IFN tedavisine göre daha kısa sürede daha iyi ve daha uzun süren yanıtların elde edilmesi sonrasında çok merkezli prospektif faz 3 IRIS çalışması yapılmıştır. Bu

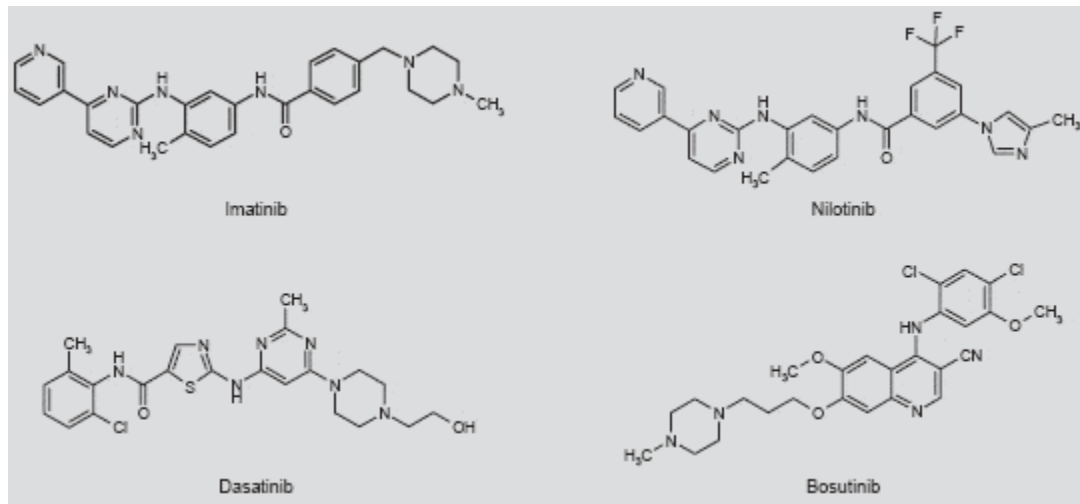
çalışmada İmatinib, IFN+ARA-C ile karşılaştırılmış ve 18. ayda tam hematolojik yanıt (HY), majör sitogenetik yanıt (SY), tam SY ve akselere veya blastik faza progresyonsuz yaşam olasılığı açısından anlamlı olarak üstün bulunmuş ve yanıtların devamlı olduğu gösterilmiştir. (19-24)

Tedavi, genel olarak iyi tolere edilir. Yan etkiler arasında kas iskelet şikayetleri, ödem, plevral efüzyon, assit, kilo alımı bulantı, kusma, ishal, makülopapüler cilt döküntüsü, halsizlik, baş ağrısı, doza bağımlı hepatotoksisite ve miyelosupresyon sayılabilir (25-26).

İmatinib tedavisi sırasında rastlanan en önemli sorunlardan biri de imatinib direncidir. Direnç görüldüğü zamana göre primer ve sekonder olarak adlandırılır. Primer direnç hastada istenilen yanıt oranlarına ulaşamamasıdır. Sekonder direnç ise yanıt alınan hastada yanıt kaybının gelişmesidir.

Direnç mekanizmaları arasında oluşan mutasyonlar sonucu imatinibin hücre dışına atılması veya hücre içi biyoyararlanımının azalması sayılabilir (27-30).

En sık gözlenen ve en yüksek derecede in vitro ve klinik direnç ile ilişkili olan mutantlar; imatinib bağlanma bölgesinde bulunan Y253H, F317L, T315I ve adenosin trifosfat (ATP) bağlama bölgesinde bulunan E255K'dir. T315I mutasyonu, ikinci kuşak tirozin kinaz inhibitörleri olan dasatinib ve nilotinib tedavisine dirençlidir. T315I mutasyonu olan olgular için yeni tedavi ajanları geliştirilmektedir ve bu ajanlarla ilişkili faz I ve faz II çalışmalar devam etmektedir. Bu olgularda allojeneik kök hücre transplantasyonu önerilmektedir.



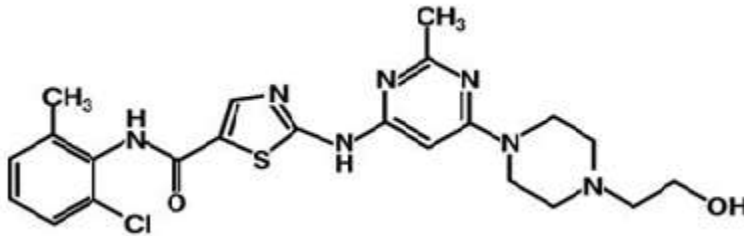
Şekil 4: ikinci kuşak tirozin kinaz inhibitörleri ve imatinib mesilatın kimyasal yapılarının karşılaştırılması

2.8.1.2 Nilotinib:

Bir aminoprimidin olan Nilotinib, Abl'ye yüksek oranda selektif olup, in vitro olarak Bcr/Abl'yi inhibisyonunda spesifik değildir fakat İmatinib'e kıyasla 30 kat daha potenttir. Yapılan çalışmalar sonucu imatinibe dirençli olan ve yeni tanı vakalarda etkin olduğu gösterilmiştir (31-33). Yeni tanı KML hastalarında (ENESTnd -Evaluating Nilotinib Efficacy and Safety in Clinical Trials of Newly Diagnosed Ph+ CML Patients -çalışması) kronik faz KML'li hastalarda ilk seçenek olarak nilotinib ve imatinib'in etkinliği karşılaştırılmaktadır(34). Bu çalışmada nilotinibin major moleküler yanıt (MMY) oranları daha yüksek, akselere ve blastik faza geçme oranları anlamlı oranda düşüktür. Yapılan çalışmalar ve elde edilen sonuçlar sonrasında nilotinib 1. basamak tedavi için FDA onayı almıştır (ağustos 2010).

Nilotinib, yan etki profili tolere edilebilen oral bir ajandır. En yaygın grade 3/4 yan etkiler; trombositopeni (%20-33), nötropeni (%13-31), bilirubin yüksekliği (%7) ve serum lipaz yüksekliğidir (%5-15). Diğer sık yan etkileri döküntü, kaşıntı, baş ağrısı, bulantı ve yorgunluktur. Nilotinib ayrıca kardiyak ventriküler repolarizasyonu uzatarak, QT intervalinde doz bağımlı uzamaya neden olur.

2.8.1.3 Dasatinib:



Şekil 5. Dasatinibin kimyasal yapısı

Dasatinib (BMS-354825) tiyazolkarboksamid yapısında bir tirozin kinaz inhibitörüdür. Abl kinaz bölgesine aktif ve inaktif konformasyonda bağlanarak Bcr/Abl tirozin kinaz ve benzer yapıdaki Src ailesi kinazlarını inhibe eder. PDGFR, C-kit ve Ephrin-A reseptör kinaz'ı da güçlü şekilde inhibe edebilir. Dasatinib, İmatinib'den yaklaşık olarak 300 kat daha potenttir, ancak T315I mutasyonunda etkin değildir (35 - 38). Dasatinib BCR/ABL'nin ATP bağlanma bölgesine bağlanarak tirozin fosforilasyonunu ve hücre içi sinyal ileti yolağını inhibe ederek hücre büyümesinde duraklama ve apoptoza neden olur (39).

Çalışmalarda, imatinib dirençli vakalarda 1x100 mg / gün dozunda etkili ve iyi tolere edilebildiği görülmüştür ve yapılan DASSASION çalışması ile birinci basamak kullanımda da imatinibe üstünlüğü gösterilmiştir (40-42).

İmatinib sadece inaktif formda BCR/ABL'ye bağlanırken dasatinib hem aktif hem de inaktif formlarında bağlanabilmektedir. Dasatinibin diğer bir özelliği ise imatinibi hücre dışına atan ve hücre içi konsantrasyonunu azaltarak etkisini azaltan *efflux* mekanizmalarına karşı dirençli olmasıdır. Bu mekanizma ile imatinibe direnç geliştirmiş olgularda dasatinib etkin olabilmektedir (39).

Genel olarak iyi tolere edilebilir. Yan etkileri arasında kemik iliği supresyonuna bağlı pansitopeni, ödem, sıvı retansiyonu, plevral efüzyon, miyozit, döküntü, bulantı, kusma sayılabilir (42). İn vitro veriler dasatinibin kardiyak ventriküler repolarizasyonu (QT aralığı) uzatma potansiyeli olduğunu göstermektedir. Hipokalemi veya hipomagnezemili, konjenital uzun QT sendromlu, antiaritmik ilaçlar alan veya QT uzamasına yol açan başka tıbbi ürünler alan ya da kümülatif yüksek doz antrasiklin tedavisi gören hastalarda dasatinib dikkatli kullanılmalıdır.

Dasatinibin CYP3A4 substratı olması nedeniyle sitokrom enzim sistemini inhibe eden ya da indükleyen ilaçlarla birlikte kullanımı plazma konsantrasyonlarında değişikliğe neden olabilir (42).

2.8.2 Allojeneik kök hücre nakli

KML tedavisinde allojeneik kök hücre nakli (AKHN), tirozin kinazlara verilen yanıtların uzun süreli ve yüksek olması ve bu tedavilerin iyi tolere edilebiliyor olması nedeniyle yapılma sıklığı giderek azalmaktadır. Özellikle T315I mutasyonu olan ve tüm tirozin kinazlara dirençli olan vakalarda düşünülmesi uygun olacaktır.

2.9 Tedaviye Yanıtın Değerlendirilmesi:

2013 Yılı European Leukemia Net (ELN) kriterlerine göre KML tedavisine yanıt; hematolojik yanıt, sitogenetik yanıt ve moleküler yanıt olarak incelenmektedir (43).

Tam hematolojik yanıt (THY)

- Lökosit sayısı < 10.000/ μ L
- Periferik kanda bazofil < %5
- Periferik kanda miyeloblast, promiyelosit, miyelosit görülmemesi
- Trombosit sayısı < 450.000/ μ L
- Dalağın ele gelmemesi

-Sitogenetik Yanıt (SY)

- Tam sitogenetik yanıt (SY): Ph + metafazın olmaması
- Parsiyel sitogenetik yanıt: Ph + metafaz %1- %35
- Minör sitogenetik yanıt: Ph + metafaz %36 - %65
- Minimal sitogenetik yanıt: Ph + metafaz %66 - %95
- Sitogenetik yanıtsızlık: > %95 Ph + metafaz

Not: En az 20 metafaz değerlendirilmelidir.

Kemik iliğinde metafaz elde edilemediğinde tam sitogenetik yanıt tanımı en az 200 çekirdek skorlaması ile yapılmış interfaz FISH çalışmasına dayanabilir.

-Moleküler Yanıt (MY)

- Tam moleküler yanıt: RT/ PCR veya nested PCR yöntemi kullanıldığında ardışık iki ölçüm ile Bcr/Abl kimerik mRNA'sının saptanmaması (10^{-4} duyarlılığında)
- Majör moleküler yanıt (MMY): Bcr-Abl/Abl oranının uluslararası skalaya göre $\leq$ %0,1 olması

	Optimal	Suboptimal	Başarısız
3.ay	THY, ve en az minör SY (Ph+ $\leq$ %65)	SY YOK (Ph $\geq$ %95)	THY yok
6. ay	En az parsiyel SY	Parsiyel SY yok (Ph+ $\geq$ %35)	SY YOK (Ph $\geq$ %95)
12. ay	Tam SY	Parsiyel SY (Ph + %1- %35)	Parsiyel SY yok (Ph+ $\geq$ %35)
18.ay	MMY	MMY yok	Tam SY yok
Herhangi bir zaman	Stabil veya derinleşen MMY	MMY kaybı	THY kaybı Tam SY kaybı

Tablo 4: ELN yanıt tanımları

2.10 Patogenez:

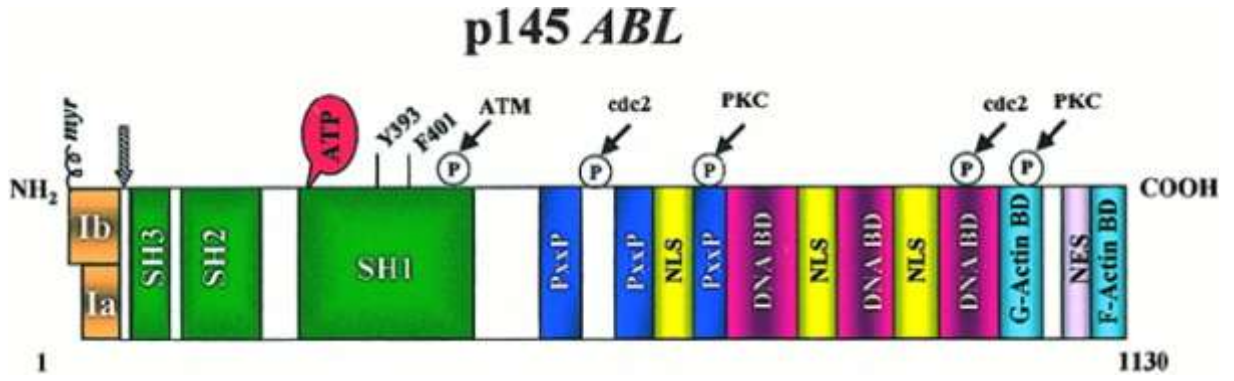
2.10.1 Ph kromozomu:

Ph kromozomu, kanserle ilişkisi ispatlanmış ilk kromozom anomalisi olup KML'nin belirleyici sitogenetik bulgusu olarak kabul edilmiştir. Bu karşılıklı translokasyon, 9. ve 22. kromozomların uzun kolları arasında gerçekleşmektedir. Bu translokasyon sonucunda, 9.q34 kromozomu üzerindeki tirozin kinaz "Abelson murine lösemi" (c-ABL) geni 22.q11 kromozomu üzerindeki "Break point cluster Region" (BCR) geni ile 22. kromozom üzerinde birleşir ve (t(9,22) (q34; q11)) Bcr/Abl füzyon geni oluşur. Normalde inaktif bir protoonkogen olan c-abl, translokasyon sonrasında onkogenik özellik kazanır ve oluşan bcr/abl füzyon geni 210 kd'luk p210 Bcr-Abl füzyon proteinini kodlar. Bu yeni oluşan füzyon proteini, tirozin kinaz aktivitesine sahiptir ve lösemik fenotipin gelişmesinden sorumludur. Normal şartlarda kontrol altında olan Abl proteini tirozin kinaz aktivitesi, Bcr dizisi eklendiğinde kontrolsüz hale gelir. Kontrolsüz tirozin kinaz aktivitesi; hücre proliferasyonu, maturasyonu ve adezyon sinyal yollarını aktive ve apoptozisi inhibe ederek malign hücre transformasyonuna yol açar ve KML patogenezinin temelini oluşturur (3,44). Bu translokasyon kliniğe, myeloid serinin aşırı proliferasyonu, periferik kanda olgun myeloid serinin artışına bağlı lökositoz ve splenomegali şeklinde yansır. KML vakalarının %1'den azında Ph(-)'tir ve daha agresif seyreder (5,44,45)

2.10.2 Bcr-Abl Füzyon Geni ve proteini;

2.10.2.1 abl geni ve proteini:

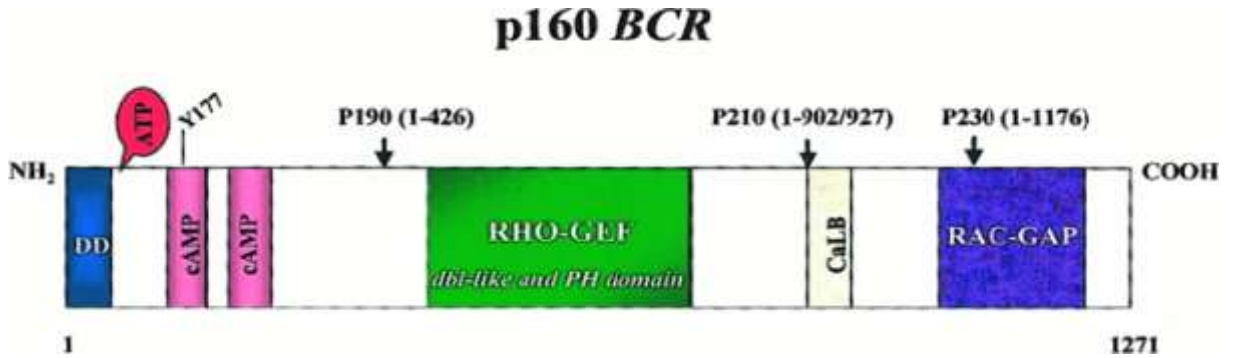
Abl geni, Abelson Mürin Lösemi Virüsünün (A-MuLV) transformasyon geni olan v-abl onkogeninin insandaki homologudur. Tirozin kinaz protoonkogenlerinin Src ailesine üyedir, 9q34.1'de lokalizedir. 145 Kd ağırlığında bir protein oluşumundan sorumludur. ABL proteini nonreseptör protein kinaz olup hem sitoplazma hem de nükleus içerisinde bulunarak iki kompartman arasında geçişe izin verir. Normal Abl proteini, çekirdekte, hücre siklusunun G1 fazında tutulmasını sağlayarak hücre büyümesinin baskılar ve apoptozu indükler. Bunun sonucunda, hücre proliferasyonunun düzenlenmesi, adhezyon ve hücre ölümü gibi çeşitli hücresel işlevleri düzenler (3).



Şekil 6: Abl proteininin yapısı (3)

2.10.2.2 BCR geni ve proteini:

Bcr geni, breakpoint cluster region, Ph (+) KML'ye spesifik kromozomal kırık bölgesine verilen isimdir. 22q11.2. kromozomu üzerinde yerleşmiş olup 23 exondan oluşmaktadır. BCR geninin ilk ekzonu 160 kd ağırlığında BCR proteini kodlar. Bu protein serin treonin kinaz aktivitesine sahip birkaç işlevsel bölgesi olan sitoplazmik bir proteindir. N-terminalinden itibaren ilk 426 aminoasitlik bölge özellikle önemlidir çünkü BCR geninin 1. ekzonu tarafından kodlanır ve tüm Bcr-Abl füzyon proteini izoformlarında yer alan tek polipeptit dizisidir. Bu kısım proteinin serin/threonin kinaz bölgesini ve iki adet serin/threonin'ce zengin bölgeyi içerir (46,47).

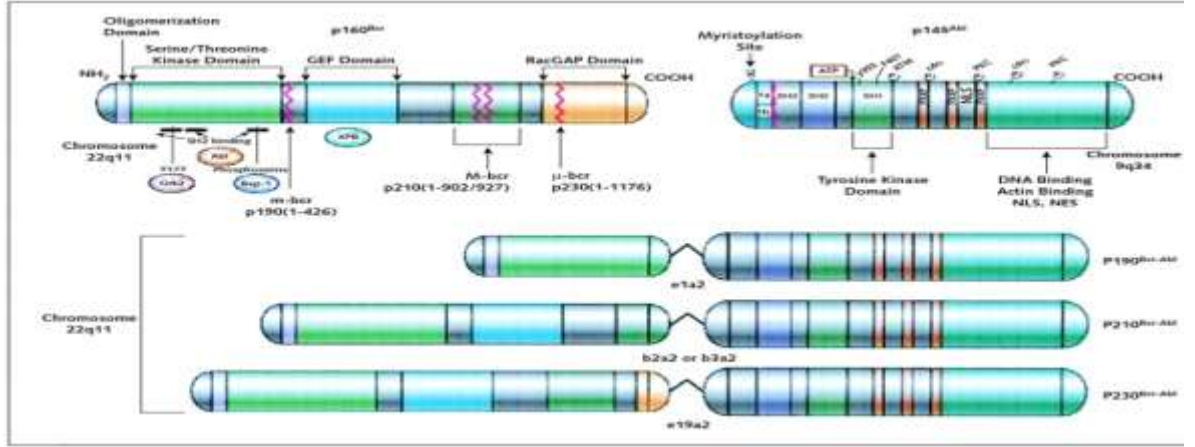


Şekil 7: BCR proteininin yapısı (3)

2.10.2.3 abl/bcr füzyon geni ve proteini:

abl/bcr füzyon geni oluşumu sırasında gerçekleşen kırılma bölgeleri ABL'de sabit BCR' de ise değişkendir. Kırılma bölgelerine göre füzyon proteinleri farklılık gösterir. Kırılma bölgesi ve oluşan füzyon proteini hastalığın seyrini ve kliniği belirler. KML olgularının çoğunda (95%) ve Ph (+) akut lenfositik lösemi (ALL) hastalarının 1/3'ünde BCR geni major BCR olarak adlandırılan 12. ve 16. exonlar arasındaki 5.8 kb lik bir bölgeden kırılmaktadır. Kırılmanın bu bölgede meydana gelmesi ile 210 kD moleküler ağırlığında BCR-ABL füzyon proteini oluşur. KML hastalarının çok az bir kısmında ve ALL'in 2/3'ünde kırılma e2 ekzonunda oluşmakta ve 190 Kd ağırlığında BCR-ABL

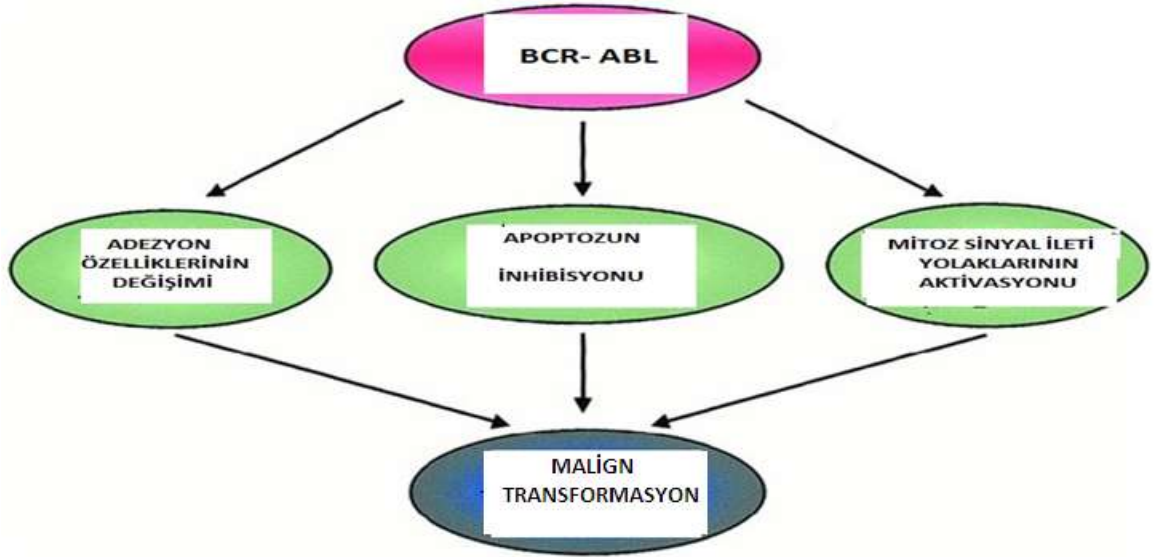
proteinini kodlamaktadır. Kırılmanın e19 ekzonunda olmasıyla ise 230kd ağırlığında olan BCR-ABL proteinini kodlamaktadır (48 - 52).



Şekil 8: BCR-ABL geninin başlıca formları.

2.10.3 Patogeneizde etkili olan BCR/ABL aracılı malign transformasyon mekanizmaları:

- 1) Adezyon özelliklerinin değişimi
- 3) Apoptozis inhibisyonu
- 2) Mitoz sinyal ileti yollarının aktivasyonu
 - A) Ras ve MAP Kinaz Yolağı
 - B) Fosfotidilinositol-3 kinaz (PI3K)
 - C) Myc yolağı
 - D) Jak-Stat Yolağı



Şekil 9: BCR/ABL geni tarafından kontrol edilen malign transformasyon mekanizmaları

2.10.3.1 Adezyon özelliklerinin değişimi:

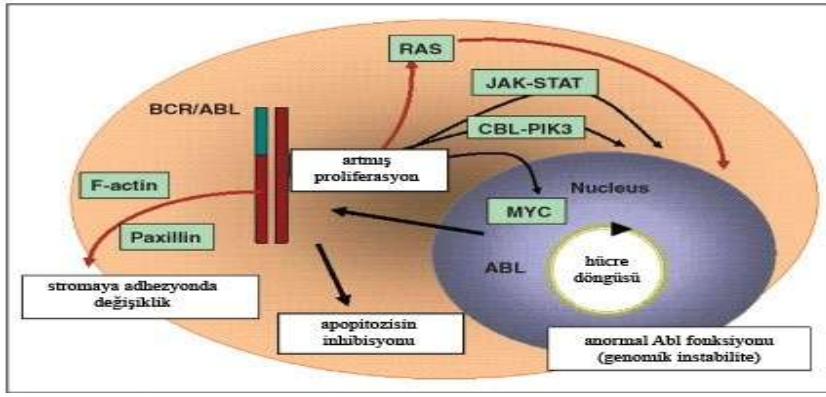
Adezyon molekülleri, hücrelerin özgül olarak dokulara yönelmelerinde, birbirlerini tanımalarında, embriyogenez, hücre büyümesi, hücre farklılaşması ve inflamasyon gibi olayların düzenlenmesinde görev alır. Normal hematopoezde öncül hücreler kemik iliği stroma hücrelerine ve ilgili ekstraselüler matrikse tutunur. Matriks, fibronektin gibi stromal hücrelerce sentezlenen ve öncül hücrelerin yüzeylerinde eksprese olan reseptörler için adeziv ligand fonksiyonu gören proteinlerden oluşur. Adezyon, öncül hücrelerin sitokin salgılayan hücrelerin yakınında bulunabilmesi için şarttır. Böylece hematopoetik öncüller, sitokinler ile iletilen lokal sinyalleri almak üzere birarada tutulurlar. KML Ph(+) öncül hücrelerin kemik iliği stroma hücrelerine ve ekstraselüler matrikse adezyonları azalır. Böylece bu öncül hücreler, normal adeziv progenitörlere sağlanan sinyallerden yoksun kalırlar.

2.10.3.2 Apoptozun inhibisyonu

Apoptoz, hücrenin yaşam döngüsü boyunca yapım-yıkım dengesinin sürdürülmesini sağlar. Genetik olarak planlanmış hücre ölümü olarak tanımlanmış apoptoz, belirli bir hücre klonunun genişlemesini sınırlar. Fare ve insan hücre hatlarına eksojen olarak BCR-ABL transfeksiyonu, büyüme faktörü geri çekilmesiyle indüklenen apoptoz inhibe etmiştir.

2.10.3.3 Mitojenik sinyal yollarının aktivasyonu:

BCR-ABL mitojenik potansiyele sahip birçok sinyal yolağını (Ras ve MAP kinaz yolları, Jak-Stat yolağı, PI-3 Kinaz yolağı, Myc yolağı) aktive etmektedir.



Şekil 10: Mitojenik sinyal yolları

a) MAP Kinaz ve Ras/Raf/MEK/ERK Sinyal İletim Yolu:

MAP (Mitogen-activated protein kinases) kinazlar, ökaryotik hücrelerde, hücre membranından çekirdeğe bilgi aktarılmasında önemli görevi olan proteinlerdir. Sinyal iletim yolları, embriyogenez, canlılık, çoğalma, diferansiyasyon ve apoptoz işlevlerinin düzenlenmesinde rol alır. Kansere hücrelerinde MAP kinaz yolağının aktivasyonu gözlenebilir. Ras ve Raf protoonkogendir. Ras'ın aktivasyonu Ph (+) lösemilerin patogeneğinde önemlidir (53-56)

b) PI-3 Kinaz/Protein Kinaz B Sinyal İletim Yolu:

Fosfatidilinositol-3 (PI-3) kinaz enzim aktivitesi Ph pozitif hücrelerin çoğalması için gereklidir. Bcr/Abl füzyon proteini, aktivatör moleküllerle birleşerek PI-3 kinazın aktivasyonuna neden olur.(50,53)

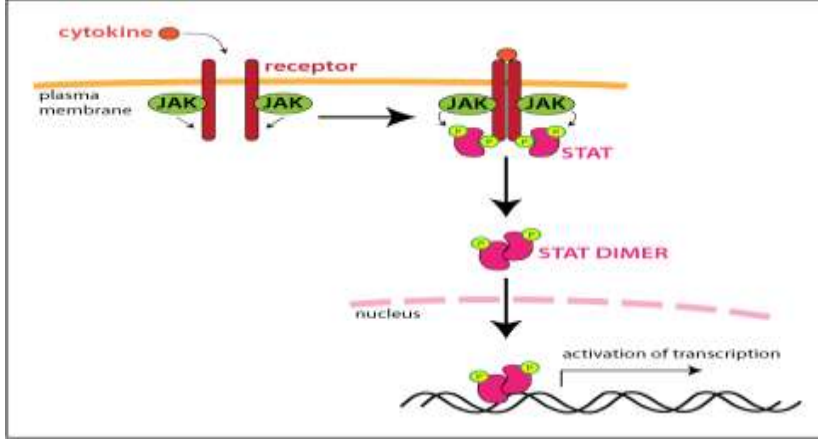
c) Myc Sinyal İletim Yolu:

Transkripsiyon faktörleri özel DNA regülatör bölgelerine bağlanarak DNA replikasyonu ve hücre bölünmesi için gerekli genlerin transkripsiyonunu sağlar. Nükleer transkripsiyon faktörlerini etkileyen mutasyonlar sıklıkla malign transformasyona eşlik eder. Miyelositomatozis onkogeni (Myc) tüm ökaryotik hücrelerde ifadenirken büyüme uyarısı alan hücrelerde ifadenmeleri artar ve geçici yükselmenin arkasından miktarı hemen azalır. Birçok insan malignitesinde Myc onkogeninin ürünü olan onkoproteinin aşırı ifadenmesi gösterilmiştir ki bu da hedef genlerin sürekli transkripsiyonu ve onkojenik transformasyonuna neden olmaktadır.

d) JAK/STAT Sinyal İletim Yolu:

Sinyal ileticisi ve transkripsiyon aktivatörü (*signal transducer and activator of transcription*; STAT) proteinleri, sitokin, büyüme faktörü veya peptid reseptörlerinden aldıkları sinyaller ile

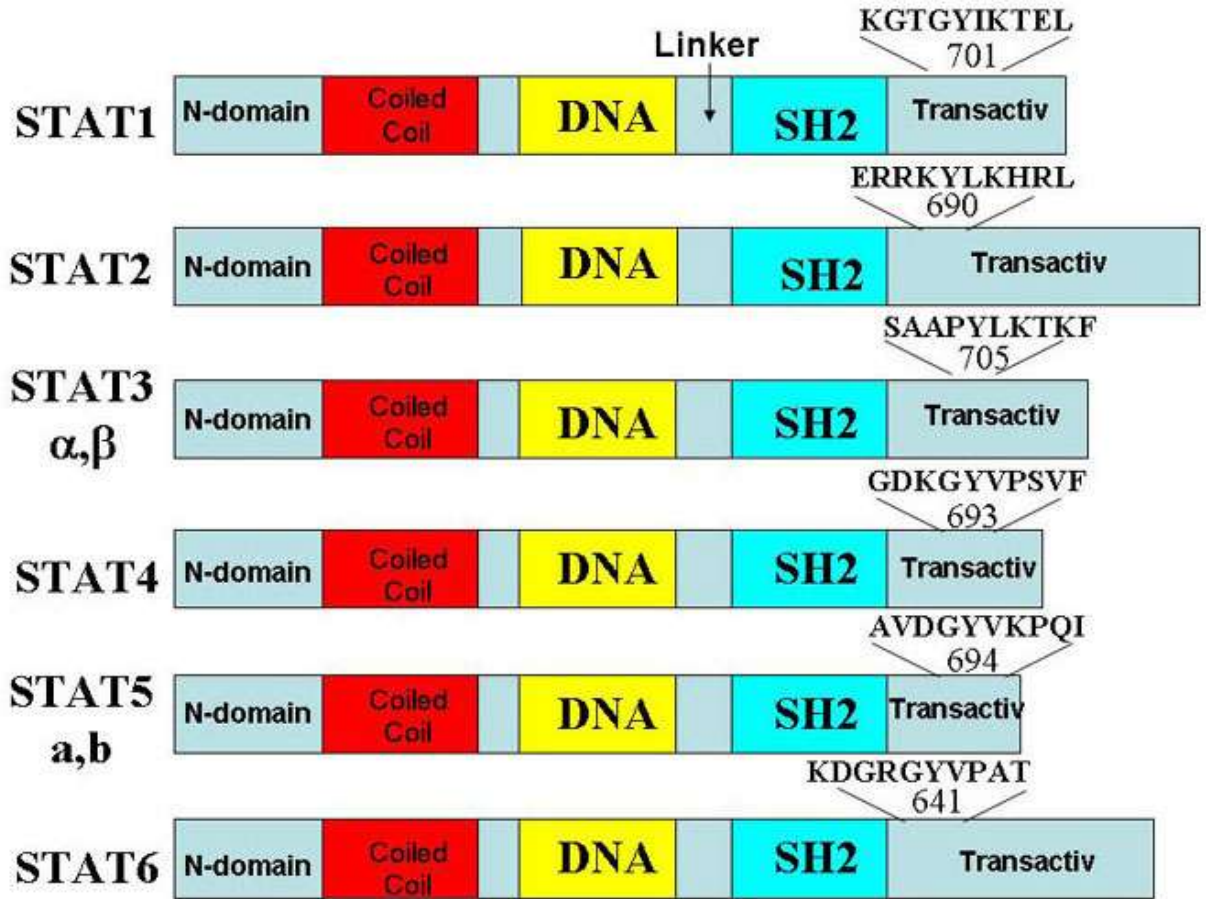
aktive olan ve bu sinyalleri çekirdeğe ileten sessiz (*latent*) sitoplazmik transkripsiyon faktörleri olarak işlev görürler (57). Aktive olduklarında önce fosforillenerek, sonra da dimerleşerek çekirdeğe yönelirler ve hedef genin promoter bölgesine bağlanarak "gen ekspresyon" değişimine neden olurlar (57,58). STAT'lar hücre proliferasyonu, angiogenez ve çeşitli proteinlerin ifadelenmelerinin düzenlenmesinden sorumludur. Bu nedenle, anormal aktivasyonları çoğu zaman hücresel transformasyona neden olur (59,60).



Şekil 11: JAK/STAT Sinyal İletim Yolağı: Bu yolak, ekstrasellüler polipeptidlerden alınan sinyalleri nukleusta bulunan hedef genlerin promoterlerine iletmekle görevlidir. JAK/STAT sinyalleşmesi, immunité fonksiyonlarını, gelişim, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması ve apoptozis gibi pek çok hücresel fonksiyonu düzenler. Yolağın primer elemanları, sessiz transkripsiyon faktörleri olan STAT proteinleridir. STAT' lar aktivasyon öncesinde fosforile değillerdir ancak sitoplazmada dimerleştikten sonra aktive olarak fosforile forma geçerler. Aktif paralel STAT dimerleri, nukleusa girerek özgül DNA hedeflerine bağlanırlar. STAT' ların aktivasyonu, nukleer protein tirozin fosfatazların STAT' ları defosforile etmesiyle sonlanır ve defosforile STAT tekrar sitoplazmaya geri döner.

Memelilerde, JAK1, JAK2, JAK3 ve tirozin Kinaz 2 (Tyk2) olmak üzere 4 tip JAK bulunmaktadır. Sitokinlerin ilgili reseptöre bağlanması ile JAK aktive olur ve aktivasyon uygun STAT molekülünün ilişkili promotor bölgeye bağlanması ile devam eder.

STAT protein ailesinin yedi üyesi bulunur: STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B ve STAT6. Özellikle STAT3 ve STAT5, kontrolsüz çoğalan, apoptoza uğramayan, immun sistemden kaçan ve angiogenezi uyaran tümör hücrelerinde yüksek oranda ifadelenirler (57). Devamlı olarak aktif olan STAT proteinleri antiapoptotik yolları uyarak karsinogenezde etkili olur.



Şekil 12: STAT moleküllerinin yapıları

Bcr-Abl kimerik proteini, JAK/STAT yolunun sürekli aktif olmasına yol açar ve hematopoietik hücrelerde büyüme faktöründen bağımsız olarak çoğalma ve transformasyonu indükler. BCR-ABL pozitif hücrelerde, STAT5 Bcl-XL geninin transkripsiyonunu sağlayarak anti-apoptotik bir fonksiyon gösterir (50).

Çalışmamızda temel olarak STAT 5 alındığı için STAT 5a ve 5b üzerinde özel olarak durulacaktır.

2.11 STAT5'in genel özellikleri:

STAT5a, meme bezi gelişiminde rol alan prolaktin sinyal iletiminden sorumludur, STAT5B ise, büyüme hormonu sinyal iletiminde görevlidir (61,62). Her iki STAT5 geninin delesyonu, hematopoietik gelişim bozukluğuna neden olmaktadır (63,64). İnterlökin 3 (IL3), granülosit makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF), granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF), eritropoietin (EPO), trombopoietin (TPO) gibi hematopoietik hücre proliferasyonunu ve gelişimini uyaran çeşitli hematolojik sitokinler, hormonlar ve büyüme faktörleri STAT5'leri aktive

edilebilir (64). STAT5 proteinlerinin, tümör hücrelerindeki ifadenmelerinin baskılanması apoptozu başlatabildiklerinden dolayı bu proteinlerin kanser tedavisinde önemli birer terapötik hedef olabileceği düşünülmektedir.

2.12 Tümör hücre proliferasyonu ve apoptozda STAT'ların rolü:

STAT3 ve STAT5'in birçok değişik tümör tipinde *BCL-XL* ifadenmesi ile hücre apoptozunu düzenledikleri gösterilmiştir (65 – 67). *BCL-2* ailesinin bir diğer anti-apoptotik etkili üyesi *MCL1* de hem STAT3 hem de STAT5'in hedefidir. Tümör hücrelerinde bu STAT'lerden herhangi biri baskılanırsa, *MCL1* ifadenmesinin azaldığı ve tümör hücresinde apoptozunun başladığı bildirilmiştir (68,69).

2.13 STAT'ların anjiogenezdeki rolleri:

Hücrelerin, kontrolsüz çoğalabilme ve apoptozdan kaçabilme özellikleri, kanser gelişimi için yeterli değildir, kanser hücrelerinin büyümesi ve yayılabilmesi için yeni damar oluşumuna, yani anjiogenezin varlığına ihtiyaç vardır. Anjiogenez oluşumu ile yeni gelişen tümör hücreleri O₂ ve besinleri kullanarak tümör büyür ve yayılır. Aktif onkogen proteinleri, anjiogenezi uyarma görevleri vardır (70-72). Kan damarı oluşumunu uyaran en önemli sinyallerden biri de vasküler endotelial büyüme faktördür (VEGF). Kanser hücreleri, normal hücrelere oranla artmış düzeylerde VEGF oluştururlar (73). 2002 de Niu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada STAT3'ün anjiogenez ve VEGF üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalar, gelecekte STAT 3'e karşı geliştirilen ajanlar kanser tedavisinde antianjiogenik etkileri ile nedeniyle kullanılabilecek umut vaat edici moleküller olabilir (74).

2.14 Tümörün immun sistemden korunması:

Hematopoez esnasında kemik iliği hücrelerinde STAT3 geninin dokuya özgü olarak baskılandığı, inflamatuvar sitokinlerin ifadenmelerinin arttığı yüksek ve miyeloid hücrelerin dramatik olarak yayılma gösterdiği bilinmektedir (75). Tümörlerdeki ve immun hücrelerdeki kalıcı STAT3 sinyalleşmesi kanser hücrelerinin immun sistemden kaçıp, korunmalarında etkili olduğu yapılan çalışmalarla desteklenmektedir (76,77).

2.15 Anti- kanser tedavisi hedefi olarak STAT'lar:

Tümör gelişimi; kanser hücrelerinin kontrolsüz çoğalabilmesi, apoptoza karşı koyabilmesi, anjiogenez özelliğini kazanabilmesi ve immün sistemden korunabilmesiyle gerçekleşir. STAT3, birçok insan kanserinde hücrelerinde kalıcı aktivasyon göstermekte ve tüm bu malign olayların düzenlenmesinde etkili olmaktadır. STAT3 ve STAT5'in her ikisinin de kontrolsüz çoğalma ve sağ kalımla ilgili genleri dolaylı veya doğrudan etkiledikleri gösterilmiştir. STAT3'ün anjiogenez ve immün sistemden korunma üzerindeki bilinen etkileri STAT'ları ideal bir kanser tedavi hedefi yapmaktadır (56).

Birçok onkolojik sinyal yolağının son basamaklarında aynı transkripsiyon faktörleri yer alırlar. Transkripsiyon faktörleri bu yönleriyle gen ekspresyon desenlerini aktive eden ve maligniteye yol açan en son kontrol noktalarını oluşturmaktadırlar. Bu özellikleri ile transkripsiyon faktörleri, kanser tedavilerinde hedef moleküller olmuşlardır (78). İdeal bir kanser tedavisinde; hedef moleküller, ilaçlarla spesifik olarak baskılanabilmeli ve tümör hücreleri, normal hücrelere oranla hedef genin ya da proteinin aktivitesine daha çok bağımlı olmalıdır. Tüm bu kriterler göz önüne alındığında, STAT3 ve STAT5' in hemen hepsini yerine getirdikleri görülür.

İdeal terapötik hedefin özelliklerinden biri de, tümör hücrelerine spesifik olmasıdır. Yani, gen bloke edildiğinde normal hücrelere zarar vermeyip, kanser hücrelerini öldürmelidir.

Melanomlu bir faredeki STAT3 sinyalleşmesini engellemek amacıyla özel bir gen terapisi vektörü tasarlanmış ve bu vektör, hem vektörü içeren hem de içermeyen komşu tümör hücrelerinde yüksek oranda apoptozuna neden olmuştur. Ayrıca, STAT3 inhibitörleri normal hücrelerin apoptozuna yol açmadığı gözlenmiştir. Böylelikle STAT3' ün insanlarda da uygun bir hedef olabileceği düşünülmüştür (79). STAT3 ve STAT5 arasında var olan birçok benzerlik nedeniyle STAT 3'teki bu gelişmeler STAT 5'i de olası bir hedef haline getirmiştir çünkü devamlı aktif olan STAT3 ve STAT5 sinyalleşmesinin engellenmesiyle tümör hücre apoptozunun gerçekleştiğini gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur (80).

STAT sinyalleşmesini baskılama yollarından biri de aktivasyonunu sağlayan değişik tirozin kinazları bloke ederek apoptozu uyarmaktır (81). Ancak tirozin kinaz reseptörleri STAT moleküllerine spesifik değildir. Yani, doğrudan STAT moleküllerini hedef alan moleküllerden farklı olarak başka hedef molekülleri de mevcuttur. STAT sinyalleşmesini engelleyebilmek için bilinen spesifik düzenleyicileri hedef olarak seçmek alternatif bir tedavi yolu olabilir. Sitokin sinyalleşme suppressörleri (*suppressor of cytokine signalling*; SOCS), STAT'ların negatif düzenleyicisi olarak JAK kinaz reseptörlerine bağlanıp STAT aktivasyonunu baskılar (82, 83). Diğer bir negatif düzenleyici ise aktive STAT' ların protein inhibitörleri (*protein inhibitors of activated STATs*; PIAS)'dir ki bunlar doğrudan STAT proteinleriyle etkileşirler (84). STAT'lar çeşitli nükleer

proteinler ile etkileşerek de transkripsyonu düzenleyebilirler. Bahsedilen tüm bu moleküller potansiyel ilaç hedeflerini oluşturmaktadırlar.

Kanser tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen yeni tedavi stratejilerinde küçük sentetik moleküler inhibitörler yanında, shRNA ve siRNA'lar da önem kazanmıştır. Gelecekte siRNA uygulamasının özellikle imatinibe dirençli KML hastalarında alternatif bir tedavi seçeneği olabileceği düşünülmektedir. Ancak, son zamanlarda miRNA'lara karşı kullanılan anti-miR oligonükleotidlerin kullanımı da gündeme gelmiştir. Günümüze kadar miRNA biyogenezinin aydınlatılmasına yönelik çalışmalar olmasına karşın, miRNA'ların biyolojik yolları tam olarak nasıl düzenledikleri henüz tüm ayrıntısı ile bilinmemektedir ve özellikle STAT5a ve 5b'nin ortak hedefleri olan miRNA ve anti-miRNA tedavilerini araştıran yeterli çalışma yoktur.

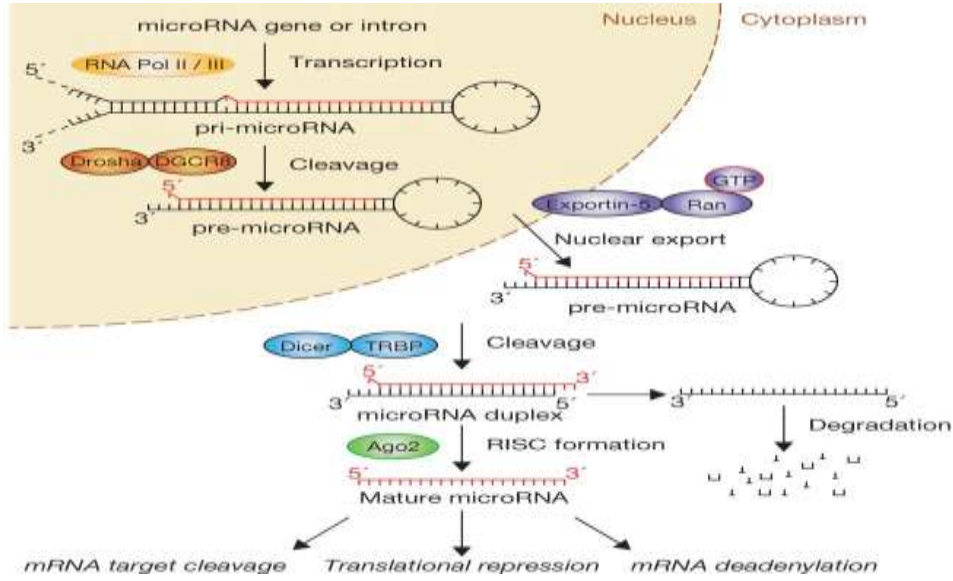
2.16 miRNA:

miRNA'lar endojen olarak sentezlenen yaklaşık 19-24 nükleotid uzunluğunda protein kodlamayan küçük RNA'lardır. En karakteristik özellikleri hedef mRNA'nın 3' -UTR (**Un**translated region=Translasyona uğramayan bölge)'sine bağlanarak translasyon baskılanmasına ya da parçalanmasına neden olmalarıdır (85). Böylece, genlerin modülasyonunda, hücresel gelişim, farklılaşma, proliferasyon, metabolizma, immünite ve ölüm gibi oldukça geniş bir biyolojik yollar aralığındaki birçok olayla ilişkilidirler (86). Çeşitli hücresel fonksiyonlarda yer alan miRNA disregülasyonunun, kanser ve viral faktörler ile uyarılmış insan hastalıkları ile olan ilişkileri de her geçen gün daha net bir şekilde anlaşılmaktadır (87,88).

İlk defa "*Caenorhabditis elegans*" hücrelerinde keşfedilmelerinden bu yana insan genomunda 1000'den fazla miRNA belirlenmiştir (89).

Olgun miRNA'ların uzun öncül moleküllerden oluşması temel olarak 3 aşamada gerçekleşmektedir. Karakteristik olarak gövde loop'u veya prekürsörlerden türerler. Saç tokasına benzer şekillerde olan prekürsörler pri-miRNA olarak adlandırılır ve RNA polimeraz 2 tarafından transkripte edilirler. Bu transkriptler önce pre-miRNA (prekürsör) adlı kısa sap-ilmik yapılarına, sonra da fonksiyonel (olgun) miRNA'lara dönüşürler (90).

- 1) primer miRNA transkriptinin (pri-miRNA) kendisini kodlayan genlerden jenerasyonu,
- 2) hücre çekirdeğinde pri-miRNA'dan miRNA prekürsör formuna (pre-miRNA) kısmi geçişi,
- 3) sitoplazmaya translokasyon sırasında matur bir miRNA oluşması ile gerçekleşen olgunlaşma süreci



Şekil 13: miRNA biyogenezi

2.16.1 miRNA tarihçesi ve terminolojisi:

1993 yılında, *lin-4* miRNA'sı Lee ve Wightman tarafından "*Caenorhabditis elegans*" üzerindeki çalışmalarda embriyonik süreci bozan mutasyonların genetik taraması sırasında belirlenmiştir. Daha sonraki yıllarda deneysel ve bilgisayar tabanlı analizlerle bitki, hayvan ve virüslerdeki miRNA'lar keşfedilmiştir. Bugün miRBase veritabanında insanlar için 1.872 öncü ve 2.578 olgun miRNA tanımlanmıştır (91-92).

Yeni tanımlanan miRNA'ların terminolojisinde dikkat edilmesi gereken bazı özellikler bulunmaktadır. Deneysel olarak miRNA oldukları gösterilmiş olanların başlarına —mir|| takısı ardından bir tire (-) işareti ve sonrasında da sayı verilmektedir. Sayı verilirken en son yayınlanan miRNA dikkate alınır. "mir" şeklinde küçük 'r' ile yazılmış ise pre-miRNA'yı; büyük 'R' ile yazılmışsa olgun miRNA'yı temsil eder. miRNA'ların başlarına hangi türe ait olduklarını belirten ekler konur.

2.16.2 miRNA'ların Hedef Genleri

Aynı miRNA'lar farklı RNA'ları hedef alabilirler. Bunun terside olabilmektedir yani bir RNA farklı miRNA'ların hedefi olabilir. miRNA'lar farklı hedef RNA'ları farklı bölgeleriyle tanır. Hedeflerin farklı olması nedeniyle aynı miRNA farklı dokularda farklı sonuçlara neden olabilir. Örnek olarak aynı miRNA bir hücrede apoptozu baskımlarken başka bir hücrede uyarabilmektedir. Tüm bu

bağlanma bölgeleri internet tabanlı biyoinformatik araçların miRNA hedef genlerini belirlemek için oluşturdukları *in silico* algoritmaların temelini oluştururlar.

2.16.2.1 miRNA Hedef Genlerini Belirlemede Kullanılan Biyoinformatik Veritabanları:

Biyoinformatik analizler hedef mRNA'yı tanımlamak için genetik ve biyokimyasal bilgileri birleştirir. miRNA:mRNA eşleşmesini belirleyebilen birçok biyoinformatik araç vardır. Ancak, bu araçlar yalnızca olası hedef genleri verdiklerinden ilgili genlerin gerçekten miRNA'nın hedefi olup olmadığının doğrulanması gerekir.

2.16.3 miRNA'ların etkileri:

Bugün, birçok fizyolojik sürecin miRNA'lar tarafından düzenlendiğini biliyoruz. Bu yüzden, miRNA'ların anormal ifadenme kalıpları hücre biyolojisinde önemli birçok mekanizmayı etkileyebilmektedir ve bunun sonucunda da enfeksiyon, kardiyovasküler, nörodejeneratif hastalıklar ve kanserler gelişebilmektedir.

miRNA'lar, viral enfeksiyonlarda, konak savunmasında, immün hücre popülasyonunun gelişmesinde, olgunlaşmasında, hayatta kalmasında ve fonksiyonel olmasında düzenleyici olarak yer alabilirler (93) IFN-beta'nın anti-viral etki mekanizması, çeşitli hücresel miRNA'ları indükleyerek HCV replikasyonunu sınırlaması ile gerçekleştiği düşünülmektedir (94). HBV ve HCV ile enfekte hastalarda miR-122'nin plazma düzeylerinin artış göstermesi, bu grup hastalarda miRNA'nın biyomarkır olarak değerlendirilebileceğini kuvvetle desteklemektedir (95). miRNA-196'nın, insan hepatositlerinde in-vitro şartlarda HCV ekspresyonunu baskıladığı gösterilmiştir (96).

Enfeksiyonların yanı sıra çeşitli kanser genetiğinde de miRNA'ların varlığı araştırılmıştır. miRNA'ların oluşum basamağında meydana gelen değişiklikler sonrasında karsinogenez gelişebileceğini, hatta, insanda tanımlanan miRNA'ların % 50'sinden fazlasının tümör gelişimi sırasında translokasyon, delesyon ve amplifikasyon ile ilişkili olabilecek kromozomal bölgelerde lokalize oldukları bilinmektedir (97,98). Bu miRNA'lar onkogen veya tümör baskılayıcı gen olarak fonksiyon görmektedirler.

Yapılan çalışmalarda miRNA'lar tüm tümör hücrelerinde hem baskılanabilmekte hem de yüksek ifadelenebilmektedir. Yine bu alandaki gelişmeler bazı miRNA'lar tüm solid tümörlerde artarken bazılarının spesifik olarak arttığını göstermiştir. Calin ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada kronik lenfositik lösemi (KLL) hastalarının çoğunda 13q14 bölgesinin delesyona uğradığını belirlemişlerdir. Analizlerin sonucunda miR-15a ve miR-16-1' in bu bölge üzerinde kodlandıkları bulunmuştur (99). Sağlıklı kontrol gruplarının serumlarında hastalığa özgü bazı miRNA'ların

olmayışı ve farklı hastalıklarda farklı miRNA'ların saptanması, insanlarda hasta serumlarında hastalıklara özgü miRNA'ların var olabileceğini düşündürmüştür. Bu çalışma ile ekstrasellüler miRNA'ların analizi sağlanarak kanserlerin tanısına yönelik kullanılabileceği gösterilmiştir (100). Bu küçük moleküllerin kanser tanı, tedavi ve prognozda hedef moleküller olabileceği düşünülmektedir (101). "triple" negatif meme kanserli olgular üzerinde yapılan bir çalışmada, 27 miRNA'nın varlığı lenfnodu metastazları ile ilişkili olabileceği sonucunu ortaya koymuştur (102). Meme kanseri dışında akciğer, mide, pankreas ve prostat kanserleri üzerinde yapılan çalışmalar da farklı miRNA varlıklarının prognozla ilişkili olduğunu göstermiştir (103 – 107).

Literatürde lenfoma hastalarında da miRNA'ların tanı ve prognozda etkili olabileceğine dair yayınlar ve derlemeler bulunmaktadır (108-110). Lenfoma patogeneğinde miRNA'ların etkisinin daha iyi anlaşılması ile bu moleküller gelecekte lenfoma tedavisinde kullanılmaya aday moleküllerdir; düzeyleri azalan mirRNA'lar için replasman ve artanlar için ise antagonistlerin kullanılması umut vaat edici tedavi yaklaşımı olabileceği düşünülmektedir.

3. MATERYAL / METOD:

Çalışmamızda; dasatinib ile muamele edilmiş K562 kronik myelositer lösemi hücre hattında, indüklenmiş apoptozda, STAT5a ve 5b'nin ortak hedefi olan miRNA'ların ekspresyonlarının çıkarılması amaçlandı.

3.1. Lösemik Hücre Hattı Ve Hücre Kültürü

3.1.1. K562 KML hücre hattının özellikleri:

K562 hücreleri, kronik miyeloid lösemisinin blastik kriz evresinden kaynaklanan miyeloid seri hücre dizileridir. Glutasyon sistemi, oksidatif stres, eritroid farklılaşma ve anti-kanser tedavilerinin geliştirilmesi ile ilgili çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Elektron mikroskopunda bakıldığında K562 hücreleri kolay bağıntılı, düzgün şekilli, kısa mikrovillüslü, farklılaşmış lösemik hücrelerine benzer şekilde görülebilir. Giemsa ile hazırlanmış preparatlarda K562 hücreleri yaklaşık 20 µM çapında iki ya da daha fazla parçalı nükleuslu farklılaşmamış blast hücreleri olarak tanımlanabilir. Kültür ortamında süspansiyon olarak büyüyen K562 hücrelerinin iki kat artma süreleri ortalama 12 saattir.

K562 hücrelerinde, normal kromozom sayısının yaklaşık 1,5 katı kromozom bulunur. Bu hücre serisinde bcr/abl füzyon geni ifadenmesi nedeniyle apoptozise karşı direnç vardır. Hücre kültüründe kolayca çoğaltılabilen K562 hücrelerinin sitotoksikite ve apoptozis çalışmaları için kullanımı yaygındır. Kültürde spontan olarak apoptozise gitmeyen K562 hücrelerinde farklı maddelerle apoptozisi indüklemek başarılı sonuçlar elde edilmesini sağlar.

3.1.2. K562 hücre hattında kullanılan besiyeri ve kültür işlemleri:

Bu çalışmada, KML hücre hattı olan K562, 37°C'de ve %5 CO₂'li nemlendirilmiş inkübatörde, stabil %1 L-glutamin içeren RPMI-1640 besiyerine (Kibutz Beit Haemeh, 25115, Israel), %10 ısı ile inaktive edilmiş fetal sıgır serumu (Life Technologist) ve 10.000 ünite/ml penisilin eklenerek çoğaltıldı. Hücre kültür işlemleri, ultraviyole ile sterilize edilen Laminar Hood (Nu Aire, USA) içerisinde gerçekleştirildi.

3.1.3. Dondurulmuş hücre hattının çözülmesi:

Kriyotüpler içinde -80°C 'de %10 dimetilsülfoksit (DMSO) ile dondurulmuş olan hücre hattı, azot tankından çıkartıldıktan sonra 37°C 'de çözüldü. İşlem öncesinde Hood 30 dakika ultraviyole ile sterilize edildi ve ardından içi alkol ile temizlendi. Çözülen hücrelerin üzerine 10 ml besiyeri eklendikten sonra 1000 devir/dk.'da 10 dakika santrifüj uygulandı. 37°C 'de DMSO'nun hücreler üzerine olan toksik etkisi, hücre canlılığının azalmasına neden olacağından, bu işlemler mümkün olduğunca seri şekilde yapıldı. Santrifüj sonrasında üstte kalan süpernatant atılarak, kalan hücre çökeltisi üzerine taze besiyeri eklenerek homojenize edildi. Daha sonra, toksik maddelerin uzaklaştırılması için tekrar santrifüj işlemi yapıldı. Yine süpernatant atıldıktan sonra, hücre çökeltisi 10-15 ml'lik taze besi yeri eklenerek homojenize edilip, 50 ml'lik flasklara steril olarak aktarıldı.

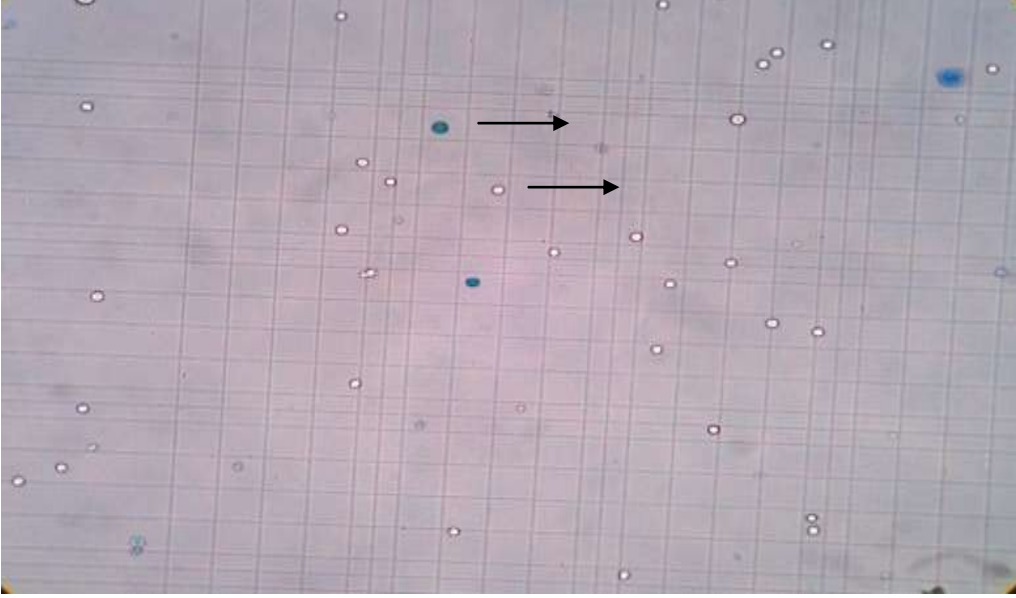
3.1.4. Hücre hattının pasajlanması:

Hazırlanan flasklar inkübatöre yerleştirildikten sonra, hücre hattının canlılığını koruması ve devamlılığın sağlanması amacıyla ikilenme zamanına (doubling time) uygun olarak pasajlama işlemi yapıldı. Bu süre K562 hücre hattı için 48 saat olarak belirlenmiş olup, pasajlama işlemi için öncelikle flask içindeki hücreler besiyeri ile birlikte 50 ml'lik falcon tüplere aktarıldı. 1000 devir/dk'da 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atılarak, hücre çökeltisi üzerine besiyeri eklenerek yavaşça vortekslendi ya da pipetleme yapıldı. Her pasaj sırasında yaklaşık 2 milyon hücre/10 ml. besiyerinde olacak şekilde flasklara aktarım yapıldı. Pasaj yapılan hücreleri içeren flasklar inkübatöre yerleştirilerek çoğalmaya bırakıldı.

3.1.5. Hücre sayımı ve canlılığın değerlendirilmesi:

Hücre sayısı; besiyerinin mililitresi (ml) başına ya da tutunulmuş yüzeyin santimetre küpü (cm^3) başına düşen hücre sayısı olarak belirtilebilir. Hücre sayısına göre yapılan işlemlere bağlı olarak hücre kültürünün durumunu izlemek mümkün olur. Hücre sayımı otomatik sayım cihazı (Cellometer) ile yapılabileceği gibi, bizim çalışmamızda Hemositometre (sayma odacığı) metodu kullanıldı. En sık kullanılan Neubauer hemositometresi iki eşdeğer bölgeye sahiptir ve lamel doğru pozisyonda ise sayma odacığının derinliği 0,1 mm'dir. Hücre süspansiyonu odacığa mikropipetler yardımıyla yerleştirildi ve mevcut hücre sayısına göre hücreler karelerin üçlü çizgilerle çevrelenmiş olduğu merkezi bölgelerde sayılabilir. Sol ve üst üçlü çizgilerdeki hücreler sayıma dahil edilir. Bu bölmelerin alanı 1 mm^2 'dir. Böylece hacmi $0,1\text{ mm}^3$ olur. Bu alandaki tüm hücreler sayılırsa N: $0,1\text{ mm}^3$ 'teki mevcut hücre sayısı ve 1 ml yani 1 cm^3 'teki hücre sayısı: $2\text{N} \times 10^4$ olur.

Hücre süspansiyonu trypan blue gibi bir canlılık boyası ile dilüe edildiğinde, canlı hücreler boyayı metabolize edip hücre dışına attıklarından beyaz, küçük, yuvarlak ve refraktil olarak görünürler. Ölü hücreler ise membranları boyaya geçirgen olduğundan şiş, büyük ve koyu mavi hale gelirler. Bu özellikler doğrultusunda hücreler, inverted mikroskop kullanılarak, canlılık, çoğalma ve enfeksiyon yönünden değerlendirildi.



Şekil 14: Tripan Mavisi Boyası İle K562 Hücrelerinin Sayımı (ÖH: Ölü hücre, CH: Canlı hücre, 10x)

3.2 ilaç Muamelesi

Dasatinib'in daha önce belirlediğimiz IC_{50} dozu (3,31 ng), tüm deneylerde 24 – 72 saat süreyle uygulandı.

3.3 Apoptoz Testi

Apoptoz oranı, Kaspaz-3 testi yöntemine göre yapıldı.

Kaspaz-3 Testi Kiti

1×10^6 hücre sayıldı, toplanıp santrifüjlendi ve pellet üzerine 50 μ l soğuk hücre lizis tamponu eklendi. Bu aşamadan sonra, pellet -80 °C de saklandı. Sonrasında, ilgili kit prosedürü uygulandı.

3.4 *in silico* Analiz ile STAT5A ve STAT5B' nin Ortak Hedefi olan miRNA'ların Belirlenmesi ve Ekspresyon Profillerinin Çıkarılması

miRBase release 19 web sitesinin en güncel verilerine göre STAT5A ve -5B' nin ortak hedefi olduğu 23 adet miRNA ve bu miRNA' lara ait sekanslar aşağıda verilmektedir (tablo 5).

hsa-miR-1224-3p	hsa-miR-149*	hsa-miR-1914*	hsa-miR-3170	hsa-miR-4287
hsa-miR-1224-5p	hsa-miR-15a*	hsa-miR-1915	hsa-miR-3175	hsa-miR-449b*
hsa-miR-1321	hsa-miR-185	hsa-miR-2276	hsa-miR-423-5p	hsa-miR-509-3-5p
hsa-miR-518a-5p	hsa-miR-550	hsa-miR-650	hsa-miR-877*	hsa-miR-940
hsa-miR-527	hsa-miR-589*	hsa-miR-765		

Tablo 5: miRBase release 19 web sitesine göre STAT5A ve -5B' nin ortak hedefi olduğu miRNA'lar

Buna göre, IC₅₀ dozunda Dasatinib ile 24-72 saat süreyle muamele edilmiş ilaçlı hücreler ile kontrol grubu hücrelerden 72 saat sonunda total RNA izole edildi. İzole edilen RNA'ların miktarı ve saflıkları "NannoDrop" cihazında spektrofotometrik olarak belirlendikten sonra; RNA' lardan cDNA sentezi gerçekleştirildi.

Bir sonraki aşama, 96 kuyucuklu plakalara liyofilize halde gömülü olan hedef miRNA'lara özgöl olarak dizayn edilmiş "Taqman hidroliz problemleri"üzerine, cDNA'ların eklenmesi oldu. Bir plakada, 23 adet miRNA ile kontrol miRNA' lar bulunmakta ve bir plakaya triplike olacak şekilde gömülü durumdadırlar. Her bir örnek, x3 biyolojik replike şeklinde gerçek zamanlı qRT-PCR cihazı ABI 7500 Fast ile çalışılarak, gruplar arası ekspresyon değışimleri istatistiksel olarak değeriendirildi. Detaylı protokol aşağıda verilmektedir:

miRNA İzolasyonu Kit İçeriğı: Eritme Tamponu, Mi Tamponu, Yıkama Tamponu 1, Toplama Tamponu, RNA kolonları, 2 ml toplama tüpleri.

miRNA İzolasyon protokolü

a. Örneklerin Hazırlanması

1. En fazla 1x10⁶ hücre pelleti 1.5 ml Eppendorf tüpe alınır ve üzerine 1 ml ksilen eklenerek vorteks yapıldı.
2. 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı; bu süreçte ara ara vorteks yapıldı.
3. 14-16000 devir/dakikada 3 dakika santrifüj yapılarak bir pellet elde edildi ve supernatant uzaklaştırıldı

4. Pellet üzerine 1ml etanol eklendi ve alt üst ederek karıştırıldı.
5. 14-16000 devir/dakikada de 3 dakika santrifüj yapıldı, supernatant uzaklaştırıldı.
6. 4. ve 5. Basamak tekrarlandı.
7. Tüpün ağzı açılarak 37⁰C' de 15 dakika inkübasyona bırakıldı; böylelikle etanolün buharlaşması sağlandı.

b. Eritme Basamağı

8. Pellet üzerine 200 µl Eritme tamponu eklendi ve pellet tamamen çözününceye kadar vorteks yapıldı.
9. 10 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı; bu esnada örnek başına 50 µl toplama tamponu 65⁰C' ye ısınmaya bırakıldı.

c. RNA Presipitasyonu

10. 1.5 ml Eppendorf tüpüne 20 µl mi tamponu eklendi.
11. Bunun üzerine 180 µl ddH₂O doyurulmuş fenol ve 40 µl kloroform eklendi.
12. 2 dakika vorteks yapıldıktan sonra 14-16000 devir/dakikada de 3 dakika santrifüj yapıldı.
13. Üst faz temiz bir tüpe alındı, hacmin %35 kadarı absolu etanol eklendi ve iyice çalkalandı.

d. RNA Bağlanması

14. RNA kolonu, 2 ml toplama tüpüne yerleştirildi ve etanol ilave edilmiş karışım kolona transfer edildi.
15. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyon sonrasında 14-16000 devir/dakikada de 3 saniye santrifüj yapıldı
16. Hacmin %70 i kadar etanol eklendi ve iyice karıştırıldı.
17. Temiz bir RNA kolonu, yeni 2 ml toplama tüpüne yerleştirildi ve etanol ilave edilmiş karışım kolona transfer edildi.
18. Oda sıcaklığında 1dakika inkübasyon sonrasında 14-16000 devir/dakikada de 3 saniye santrifüj yapıldı; böylece miRNA RNA kolonunun membranına bağlandı.

e. Yıkama

19. RNA kolonuna 200 µl yıkama tamponu eklendi ve 1dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldıktan sonra; 14-16000 devir/dakikada 1 dakika santrifüj yapıldı.
20. RNA kolonu temiz bir tüpe alındı

f. Elüsyon

21. Kolonun ortasına 50 µl önceden ısıtılmış toplama tamponu eklenerek; oda sıcaklığında 3 dakika inkübasyona bırakıldı ve 14-16000 devir/dakikada de 3 dakika santrifüj yapılarak miRNA elde edilmiş oldu

GenoExplorer™ miRNA First-Strand cDNA Core Kit ve GenoExplorer™ miRNA qRT-PCR Kit

İçerikleri: Poly(A) uzatma karışımı, RT bağlanma karışımı, bağlanma tamponu, 2x RT karışımı, 2x GenoExplorer, SYBR Green qPCR karışımı.

cDNA ve qRT-PCR Basamakları

I. Bölüm: Uzama Basamağı

0.2 ml lik tüp içine 10ng – 1µg arası izole edilen RNA + 3 µl Poly(A) uzatma karışımı + DNase/RNase içermeyen su eklendi = toplam hacim 10 µl

İyice karıştırdıktan sonra, 37 °C' de 30 dakika inkübe edilip, 95 °C' ye ısıtıldı

II. Bölüm: cDNA Sentezi Basamağı

2 µl birinci bölümde elde edilen RNA + 8 µl RT bağlanma karışımı = 10 µl 46°C' de 10' inkübe edilip buz üzerine alındı ve üzerine 10 µl 2x first-strand karışımı eklendi. Sonrasında, 46°C' de 60 dakika inkübe edilip 95 °C' de 5 dakika ısıtılarak buz üzerine kondu ve –20 °C' de saklandı.

III. Bölüm: qPCR Basamağı

2 µl Sentezlenen cDNA + 7.5 µl -2x GenoExplorer SYBR qPCR mix + 1 µl ileri primer + 1 µl geri primer + 3.5 µl DNase/RNase içermeyen su eklendi = toplam hacim 15 µl

PCR Protokolü

Denatürasyon: 94 °C de 15'

Kantitasyon: 94 °C de 30", 59 °C de 15", 72 °C de 30" x 30 – 50 siklus

Uzama: 72 °C de 1'

Soğuma: 4 °C

3.6 İstatistiksel analiz :

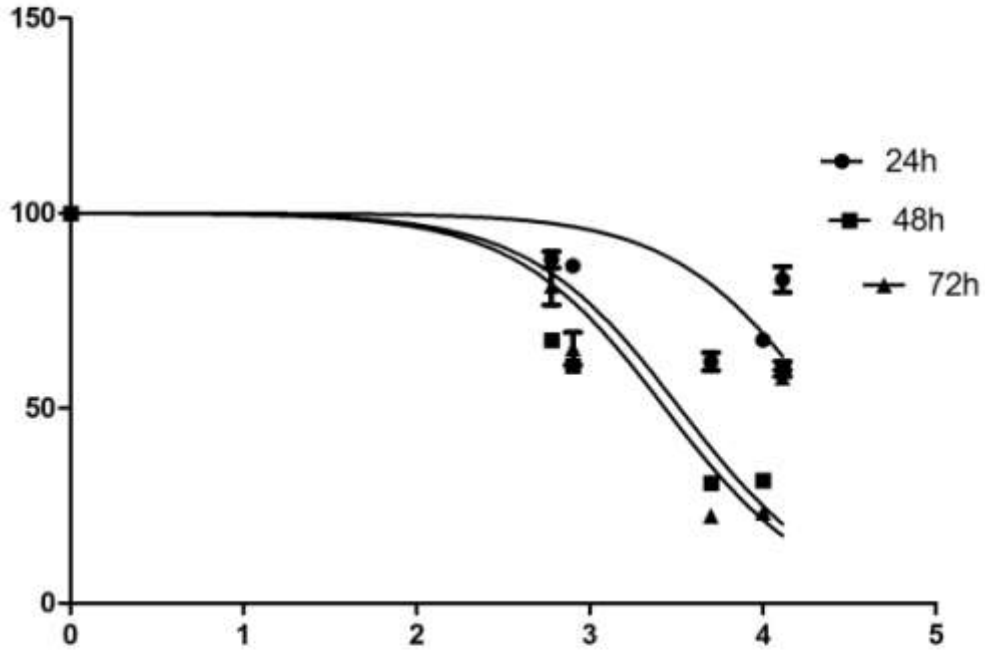
Verilerinin analizi $\Delta\Delta CT$ metodu ile yapıldı. Örnekler ve kontroller ayrı ayrı gruplandırıldı ve gruplar arasında gen ekspresyon farklılıkları belirlendi. Çalışmamızda miRNA' lar için kullanılan RNU-2, SNORD 44, SNORD 48, SNORD 47, SNORD 49a, SNORD 68 referans genleri kullanıldı.

Yapılan karşılaştırmalar sonrasında iki grup arasında ekspresyonları artan, azalan veya değişmeyen genler bir tabloda verilir. Testin anlamlılığı $p < 0.05'$ tir. Testler iki kere kuruldu.

4. SONUÇLAR:

STAT 5a ve 5b'nin ortak hedefi olan miRNA'lar "miRBase release 19 biyoinformatik" veritabanı ile belirlenmiştir. Tarama sonrasında 23 tane miRNA tespit edilmiştir.

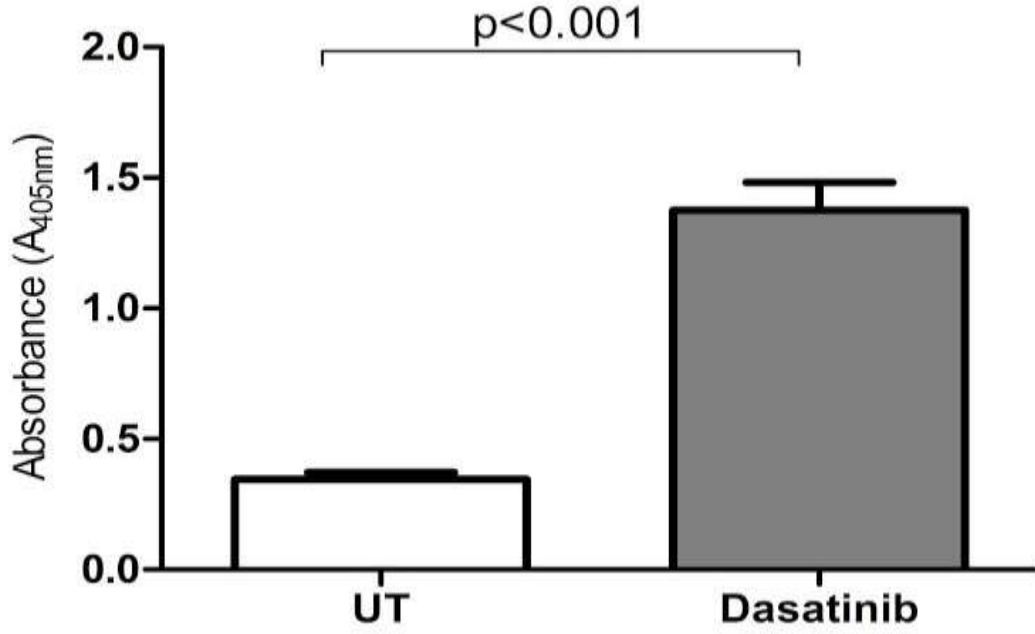
2012/TIP/076 no'lu "DASATİNİB İLE İNDÜKLENMİŞ KML HÜCRE DİZİSİ (K562) APOPTOZUNUN JAK-STAT YOLAĞI ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI" adlı projede dasatinibin IC₅₀ sonucu bulunmuş olup biz de çalışmamızda bu sonuçları temel alarak 48. saatteki IC₅₀ değeri olan 3,31 nm değerini kullandık.



	24h	48h	72h
IC50	22425	3314	2719

Grafik1: dasatinib uygulanmış hücre kültüründe saatlere göre tanımlanan IC₅₀ değerleri

Daha sonra belirlenmiş dasatinib dozu uygulanmış hücreler ve kontrol gruplarında apoptoz oranları hesaplandı. Dasatanib uygulanmış grupta apoptoz yaklaşık 4 kat fazla tespit edildi ($p < 0,001$)(grafik 2).



Grafik 2: belirlenen dasatinib dozu uygulanan ve uygulanmayan (kontrol grubu) gruplar arasındaki apoptoz oranları; [UT(untreated)]: tedavi edilmeyen grup

Hedef olarak seçilen miRNA'ların dasatinib uygulanmış ve uygulanmamış hücrelerde amplifiye olmaları sağlandı. Tablo 6 ve 7'de hedef miRNA'lar ve hangi döngü itibarıyla amplifiye oldukları verilmiştir. Her grup kendi içinde 2 kez çalışılmıştır. Döngüye erken giren miRNA'lar daha yüksek amplifiye olurken; geç girenler daha az amplifiye olduğu gösterildi.

miRNA	UT	UT	UT	UT	UT	UT
hsa-miR-1224-3p	28,49	29,88	29,24	26,97	27,95	28,51
hsa-miR-1224-5p	25,60	25,33	26,21	23,86	20,69	24,34
hsa-miR-1321	29,28	28,97	29,89	25,02	27,92	27,95
hsa-miR-149-3p	28,94	28,94	28,94	24,62	25,05	27,96
hsa-miR-15a-3p	27,88	27,70	27,30	25,55	25,66	25,31
hsa-miR-185-5p	30,52	29,46	29,93	27,72	27,93	27,93
hsa-miR-1914-3p	29,86	29,36	28,94	27,94	27,94	26,89
hsa-miR-1915-3p	26,06	26,01	25,97	28,86	28,94	28,93
hsa-miR-2276-3p	26,54	26,60	26,49	24,85	24,49	24,79
hsa-miR-3170	27,65	24,94	24,93	26,94	26,91	24,93
hsa-miR-3175	24,93	22,56	22,06	25,93	25,73	22,53
hsa-miR-423-5p	24,45	24,94	24,75	27,94	27,91	27,94
hsa-miR-4287	33,93	33,57	32,92	31,92	31,92	31,54
hsa-miR-449b-3p	27,89	26,43	26,74	27,59	27,94	26,74
hsa-miR-509-3-5p	30,94	31,94	32,61	33,83	33,94	34,40
hsa-miR-518a-5p	21,34	20,97	20,74	22,52	22,71	22,70
hsa-miR-527	24,93	21,89	25,50	22,93	22,93	21,93
hsa-miR-550a-3p	31,58	27,94	28,12	30,88	30,93	28,32
hsa-miR-589-3p	25,57	26,88	26,41	28,85	28,76	28,34
hsa-miR-650	21,99	22,14	22,53	24,90	25,94	25,94
hsa-miR-765	24,28	23,51	23,22	22,21	21,93	20,76
hsa-miR-877-3p	30,58	26,56	28,33	29,72	28,61	27,74
hsa-miR-940	21,00	21,46	21,95	25,24	25,96	25,96
hsa-miR-23a-3p	19,99	18,94	18,95	20,93	20,95	19,95
hsa-miR-23b-3p	31,84	31,54	30,92	30,93	29,92	28,92
RNU6-2	33,61	30,59	29,91	32,93	32,02	29,87
SNORD44	29,08	29,51	29,36	32,84	32,50	32,89
SNORD48	27,01	26,98	27,94	28,94	29,96	29,94
SNORD47	28,47	28,95	24,91	25,51	24,95	25,56
SNORD49A	31,41	24,31	27,94	30,53	30,94	27,95
SNORD68	28,95	29,98	30,92	30,92	31,93	30,54

Tablo 6: dasatinib uygulanmamış hücre kültüründe hedef miRNA'lar ve referans genlerin amplifikasyona girdikleri döngü sayısı; UT(unterated): dasatinib uygulanmamış grup

miRNA	T	T	T	T	T	T
hsa-miR-1224-3p	32,67	32,93	33,94	29,55	29,93	29,92
hsa-miR-1224-5p	30,60	30,29	31,94	26,57	27,95	27,94
hsa-miR-1321	34,93	34,83	36,86	31,41	30,93	30,92
hsa-miR-149-3p	29,55	29,72	30,95	28,26	28,94	28,85
hsa-miR-15a-3p	29,65	29,93	30,59	26,88	28,08	27,94
hsa-miR-185-5p	33,75	33,12	34,92	29,80	30,93	30,74
hsa-miR-1914-3p	29,93	30,93	31,68	29,49	29,77	28,94
hsa-miR-1915-3p	30,60	30,94	31,95	28,78	28,94	28,78
hsa-miR-2276-3p	28,64	28,79	28,93	26,31	26,93	26,95
hsa-miR-3170	28,64	28,79	28,82	26,76	27,93	27,93
hsa-miR-3175	30,30	29,58	30,94	25,28	25,96	25,93
hsa-miR-423-5p	33,09	32,62	32,94	28,34	28,82	28,93
hsa-miR-4287	36,10	35,96	36,93	33,39	33,96	32,91
hsa-miR-449b-3p	30,89	30,93	31,92	28,10	28,94	28,93
hsa-miR-509-3-5p	37,36	37,65	39,94	34,65	34,93	35,31
hsa-miR-518a-5p	19,59	20,82	22,94	21,68	23,93	22,85
hsa-miR-527	21,61	22,73	22,94	22,92	23,25	23,93
hsa-miR-550a-3p	33,94	33,70	34,84	29,91	30,84	30,94
hsa-miR-589-3p	29,93	29,33	30,68	27,99	28,90	27,94
hsa-miR-650	30,93	30,91	30,96	25,50	25,90	25,94
hsa-miR-765	26,76	27,71	27,93	24,86	25,52	25,92
hsa-miR-877-3p	32,19	31,08	33,93	29,07	29,74	29,93
hsa-miR-940	30,08	30,96	31,60	26,28	27,42	26,95
hsa-miR-23a-3p	21,92	20,77	23,96	20,29	20,52	19,93
hsa-miR-23b-3p	32,96	34,41	34,92	31,71	34,93	32,19
RNU6-2	37,36	37,92	37,93	32,92	33,75	33,94
SNORD44	37,29	37,34	41,94	32,46	33,33	32,94
SNORD48	31,07	31,30	33,94	31,32	31,83	31,93
SNORD47	30,92	30,72	31,76	27,94	28,93	28,28
SNORD49A	35,42	35,93	35,56	30,42	30,94	30,30
SNORD68	36,92	36,50	35,86	31,15	30,94	30,76

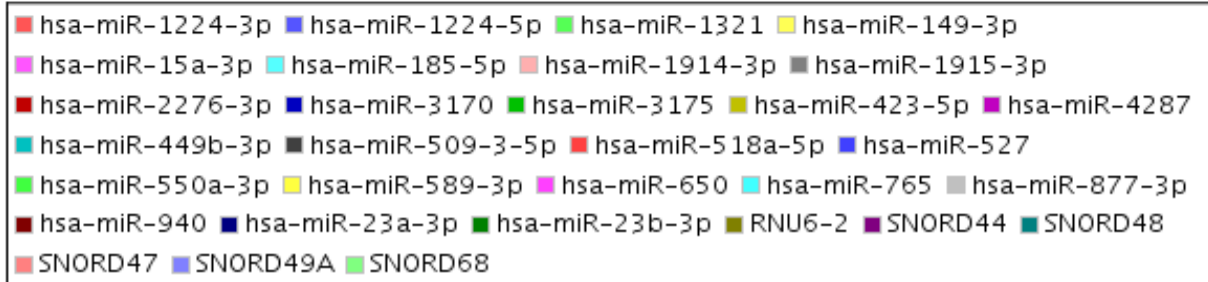
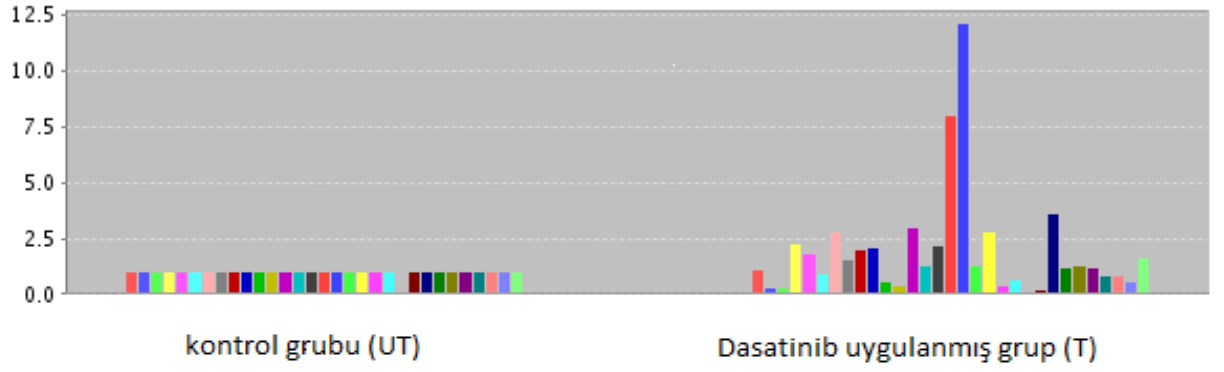
Tablo 7: dasatinib uygulanmış hücre kültüründe hedef miRNA'lar ve referans genlerin amplifikasyona girdikleri döngü sayısı; T (treated): dasatinib uygulanmış hücre kültürü

Hedef miRNA'ların artış ve azalış oranları " $\Delta\Delta CT$ metodu" ile kontrol grubu ve dasatinib uygulanmış örneklerde karşılaştırıldı. Sonuçta, hsa-miR-940, hsa- miR- 527 ve hsa- miR- 518a-5p olmak üzere 3 adet miRNA'nın diğerlerine göre öne çıktığı görüldü. Bunlardan, hsa-miR-940

kontrol grubuna göre 4.4 kat azalırken, hsa- miR- 527 ve hsa- miR- 518a-5p'nın sırasıyla 12.1 ve 8 kat arttığı dikkat çekti. Bu artış oranları istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$). hsa-miR-3170 ve hsa-miR-23a-3p kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı artmasına karşın bu artış 4 katı geçmedi (tablo 8 ve grafik 3).

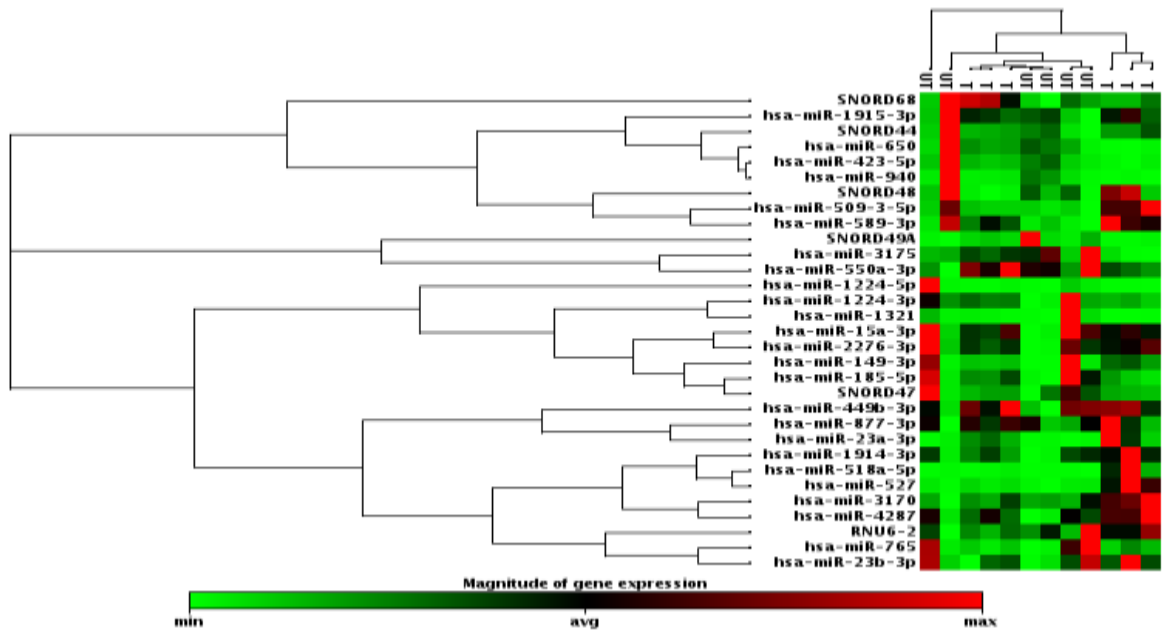
pozisyon	miRNA	değişim	p değeri
A1	hsa-miR-1224-3p	1,119	0,46556
A2	hsa-miR-1224-5p	-3,3198	0,282529
A3	hsa-miR-1321	-3,2179	0,256309
A4	hsa-miR-149-3p	2,2588	0,555742
A5	hsa-miR-15a-3p	1,8241	0,887159
A6	hsa-miR-185-5p	-1,1091	0,293338
A7	hsa-miR-1914-3p	2,8492	0,113099
A8	hsa-miR-1915-3p	1,5251	0,559666
A9	hsa-miR-2276-3p	2,0193	0,602148
A10	hsa-miR-3170	2,0713	0,049475
A11	hsa-miR-3175	-1,861	0,197593
A12	hsa-miR-423-5p	-2,5015	0,153291
A13	hsa-miR-4287	2,9668	0,058934
A14	hsa-miR-449b-3p	1,3338	0,065329
A15	hsa-miR-509-3-5p	2,2329	0,212423
A16	hsa-miR-518a-5p	8,0401	0,0428531
A17	hsa-miR-527	12,1304	0,041169
A18	hsa-miR-550a-3p	1,3307	0,587072
A19	hsa-miR-589-3p	2,8002	0,076596
A20	hsa-miR-650	-2,4699	0,197252
A21	hsa-miR-765	-1,5722	0,137123
A22	hsa-miR-877-3p	1,6766	0,201263
A23	hsa-miR-940	-4,411	0,143376
A24	hsa-miR-23a-3p	3,6441	0,027621
A25	hsa-miR-23b-3p	1,2345	0,936017
A26	RNU6-2	1,2884	0,809313
A27	SNORD44	1,1652	0,633747
A28	SNORD48	-1,2236	0,944214
A29	SNORD47	-1,1656	0,181332
A30	SNORD49A	-1,7224	0,32623
A31	SNORD68	1,6364	0,393241

Tablo 8: hedef miRNA'ların kontrol gruplarına göre ekspresyon değişiklikleri

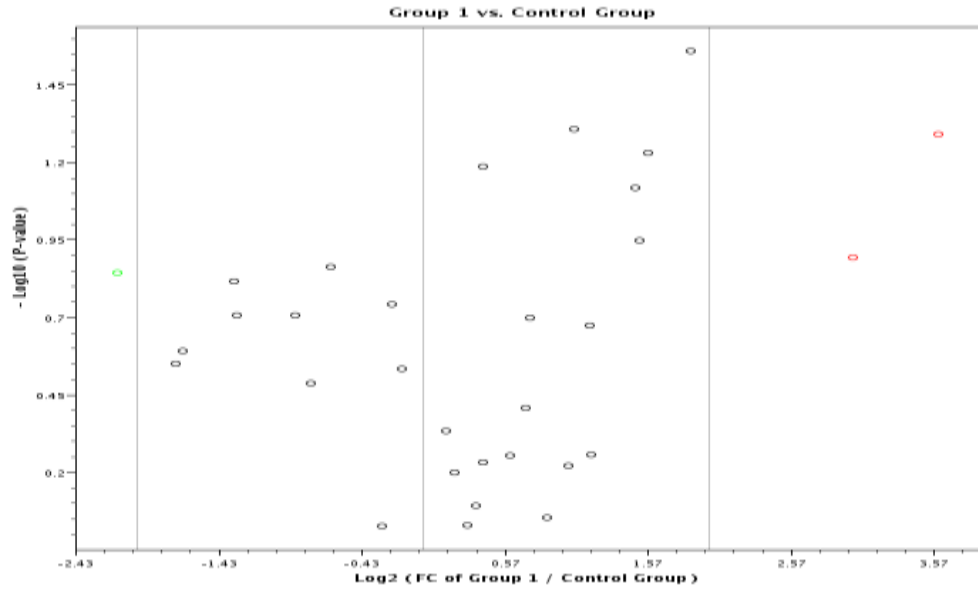
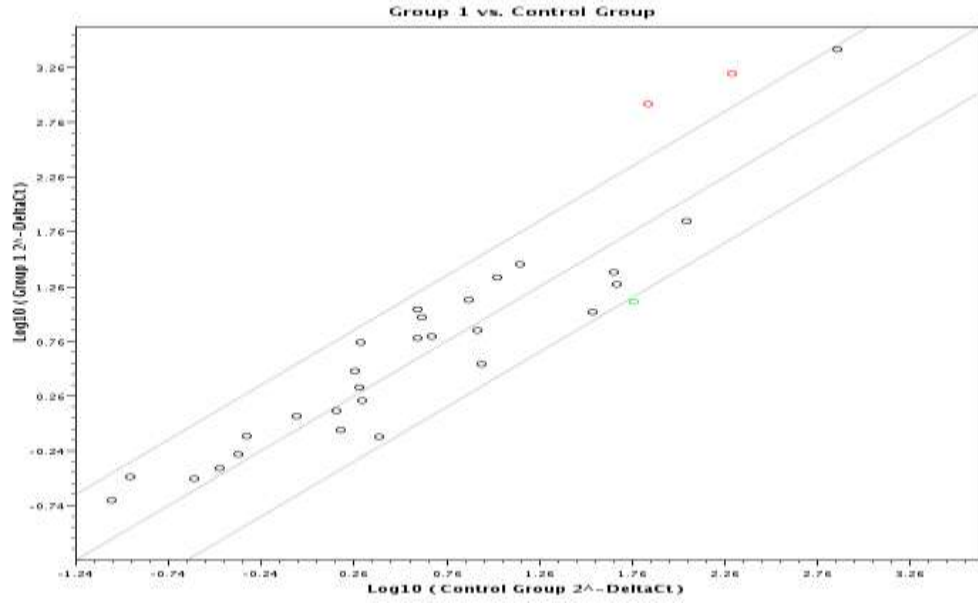


Grafik 3: Hedef miRNA'ların kontrol grubuna göre ekspresyon değişiklikleri

Hedef miRNA'lar ve referans genlerdeki "Hierarchical 2D Cluster Analizi" sonucu şekil 15'de verilmiştir. Burada yeşil renk azalan ve kırmızı renk artan ekspresyonu simgelemektedir (şekil 15, grafik 4)



Şekil 15: STAT 5a ve 5b'yi hedef alan aday miRNA'ların ekspresyon profilleri



Grafik 4: STAT 5a ve 5b'yi hedef alan aday miRNA'ların scatter plot ve volcano grafiklerindeki ekspresyon profilleri: Kırmızı ile gösterilen noktalar 8 ve 12 kat artış tespit edilen miRNA'ları (hsa- miR- 527 ve hsa- miR- 518a-5p); yeşil renk ile gösterilen nokta ise 4,4 kat azalma saptanan miRNA'yı (hsa-miR-940) temsil etmektedir.

5. TARTIŞMA:

KML, Ph kromozomuna bağılı gelişen kontrolsüz tirozin kinaz aktivitesi ile karakterize kronik myeloproliferatif bir hastalıktır. Tirozin kinaza karşı geliştirilen inhibitör ajanlar, KML tedavisinde bir dönüm noktası olmuştur. Olguların büyük bir kısmı tirozin kinaz tedavisine uzun süreli ve iyi yanıt veriyor olsa da bir kısım hastada primer ve sekonder direnç gelişimi halen sorun oluşturmaktadır. Genetik özelliği en iyi bilinen hastalıklardan biri olmasına karşın, KML’de yeni tedavi arayışları devam etmektedir.

STAT proteinleri, özellikle STAT3 ve STAT5 kontrolsüz çoğalan, apoptoz ve immun sistemden kaçan ve anjiogenezi uyaran tümör hücrelerinde yüksek oranda ifadelendiği çalışmalarda gösterilmiştir (57). KML’de Bcr-Abl kimerik proteini, JAK/STAT yolunun sürekli aktif olmasına ve hematopoietik hücrelerde büyüme faktöründen bağımsız olarak çoğalma ve transformasyona yol açar. Bu nedenle STAT5a ve 5b’yi baskılayan hedef moleküller KML tedavisinde yeni bir umut vaat etmektedir. Kanser tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen yeni tedavi stratejilerinde küçük sentetik moleküler inhibitörler yanında, shRNA, siRNA’lar ve son zamanlarda miRNA’lara karşı kullanılan anti-miR oligonükleotidlerin kullanımı gündeme gelmiştir.

miRNA’lar yaklaşık 22 nükleotidten oluşan, protein kodlamayan hedef mRNA’ların düzeylerini etkileyerek diferansiyasyon, hücre bölünmesi, apoptoz, migrasyon ve anjiogenez gibi birçok hücre fonksiyonunda etkili RNA dizileridir (111-113). Son yıllarda yapılan çalışmalar, bu küçük RNA dizilerinin birçok temel hücre mekanizmalarının düzenlenmesinin yanında kanserde patogenezinde de önemli roller üstlendikleri bildirilmektedir (114-115). miRNA’ların hematopoezde de etkili olduğu anlaşıldıktan sonra KML dahil olmak üzere akut myeloid lösemi (AML), ALL ve lenfoma gibi bir çok hematolojik malignanside etkileri araştırılmaya başlanmıştır (116-118). miRNA’ların downregülasyonu sonrası geliştiği gösterilen ilk malignitelerden biri de kronik lenfositik lösemi (KLL)’dir. Bu çalışmada mir15 ve 16’nın downregülasyonunun varlığı KLL hastalarının büyük kısmında gösterilmiştir (119). Bu çalışmadan sonra, Garzon ve arkadaşları, miR-191 ve 199’un AML hastalarında progresyonu olumsuz yönde etkiledikleri ve miRNA 29a’nın AML öncül hücrelerinde hücre çoğalmasını arttırarak AML gelişimde etkisi olduğunu bildirdiler (120 - 121).

mir -155’in, özellikle FLT3+ AML hastalarında yüksek oranda ifadelendiği gösterildikten sonra, anti-mir ajanların bu hastalarda etkin bir tedavi yöntemi olabileceği düşünülmüştür (122). Bir çalışmada, AML ile ALL hastaları karşılaştırıldığında, ALL’de miRNA 128a ve b’nin artmış, miRNA 223’ün ifadelenmesi saptanmıştır (123). Bu veriler ışığında miRNA’ların prognoz ve tedaviyi belirlemek dışında ayırıcı tanıda da faydalı olabileceği düşüncesi ortaya çıkmıştır.

Genetik olarak patogenezi diğer kanserlere göre çok daha iyi anlaşılmış olan KML’de miRNA çalışmalarının hedefi olmuştur. mi150 ve mir146a’nın KML’de ifadelenmesinin azaldığı ve imatinib sonrası tekrar fizyolojik düzeylere kadar arttığı gösterilmiştir (124). Agriie ve arkadaşları tarafından 2008 yılında miRNA-10a’nın kemik iliği kaynaklı CD34+ KML hücrelerinde sağlıklı kontrol grubuna oranla azalmış olduğu bulundu. Yine aynı yıllarda Venturini ve arkadaşları tarafından periferik kan CD34+ KML hücrelerinde miRNA 17-5p’nin arttığı bildirilmişken sonraki yıllarda Hussein ve arkadaşları tarafından bu veri doğrulanmadı (125-127).

KML’de azaldığı gösterilen diğer mirRNA’lar, mirRNA 203, mirRNA 328 (özellikle blastik krizde), mirRNA 181a’dır. Bunların içinden, 14q32.33 kromozomunda bulunan mirRNA 203’ün down regülasyonunun abl1 ve bcr/abl’nin artmış ifadelenmesi ile ilişkili olduğu gösterilmiş ve mirRNA-203’ün tedavi de potansiyel bir molekül olabileceği bildirilmiştir (128-130).

K562 KML hücre kültüründe yapılan bir çalışmada, mirRNA 31, 155, 564 ifadelenmelerinin azalmasına karşın sağlıklı kontrol grubunda ve KML dışı hücre hattında azalma olmadığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, imatinib verilen KML hücre hattında ifadelenmelerin azalmasının gösterilmesi ile bcr/abl tirozin kinaz aktivitesine bağımlı olduklarını düşündürmüştür ancak hangi mekanizmalar üzerinden bu etkilerini gerçekleştirdikleri aydınlatılamamıştır (131). Benzer şekilde Biz de çalışmamızda, K562 KML hücre hattında, hsa-miR-527 ve hsa-miR-518a-5p’nin arttığını ve hsa-miR-940’ın azaldığını gösterdik.

Literatürde miRNA’larla ilgili çoğunlukla ekspresyon analizleri çalışılmış ancak bu RNA dizilerinin hangi sinyal yolları üzerinden etki gösterdikleri net olarak açıklanamamıştır. Liu ve arkadaşları tarafından imatinibe dirençli K562 KML hücre hattında yapılan bir çalışmada miR 144/452 ifadelenmesinin myc bağımlı olarak baskılandığı, bu miRNA’ların yerine koyulması sonrasında direncin azaldığı ve apoptozun arttığı gözlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda, dirençli KML hastalarında miRNA, olası tedavi hedefi haline gelmiştir (132). Başka bir çalışmada yine KML patogenezinde bcr/abl/cmyc/mirna 19-92 yolağının etkili olabileceğine dair veriler sunulmuştur (133).

PI3 kinazı kodlayan genlerin de miRNA 19a, 181 ve 221’in hedefi olabileceğinin gösterilmesi üzerine KML patogenezinde önemi bilinen PI3 kinaz yolağının da miRNA’lar tarafından kontrol edildiği hipotezi ortaya koyulmuştur. Bahsedilen miRNA’ların düzeylerinin düşmesi, PI3K/AKT/mTOR yolağının aktivasyonuna neden olduğu ve bu mekanizmanın direnç ile ilişkili olabileceği ileri sürülmüştür (134). Bu çalışmalar ile miRNA’ların özellikle dirençli KML olgularında, yeni tedavi hedefleri olabileceği düşüncesi yaygınlaşmıştır. Bizim çalışmamızın

temelini oluşturan, kanser ve KML gelişiminde önemli rolleri olduğu bilinen JAK/STAT yolağında yer alan STAT 5a ve 5b'yi hedef alan miRNA'lar ile ilişkili araştırma yoktur.

Biz alışmamızda, KML hücre hattında dasatinib ile indüklenmiş apoptozda STAT 5a ve 5b'nin ortak hedefi olan miRNA profillerini çıkarmayı amaçladık. Yapılan analizler sonrasında 3 adet miRNA'da kontrol grubuna göre 4 kattan fazla değişim saptadık. Bunlardan hsa-miR-527 ve hsa-miR-518a-5p'da sırasıyla 12,1 ve 8kat artış saptanırken; hsa-miR-940'te 4,4 kat azalma saptandı (tablo 8). Bu miRNA'ların hematolojik kanserler ve KML patogenezindeki etkileri bilinmemektedir. Ancak bizim artmış ifadenme saptadığımız miR 527'nin, malign melanomda yapılan bir çalışmada kontrol gruplarına göre anlamlı bir fark göstermediği bildirilmiştir (135). Çalışmamızda öne çıkan ve 12 kat artış saptanan miRNA 518 ifadenmesinin sisplatin dirençli germ hücreli tumorlerde de gösterilmiş ve direnç mekanizmasıyla ilişkili olabileceğine işaret edilmiştir (136).

Sonuç olarak, KML gelişimde önemi bilinen STAT 5a / 5b'nin olası hedefi olduğu miRNA'lar tespit edilip; ekspresyon profilleri çıkartıldı. Validasyon basamağı ve sonrasında "mimic"ya da "inhibitör" miRNA transfeksiyon aşamalarından sonra elde edilecek veriler KML'nin tedavi ve patogenezinine ışık tutabilecek, yeni ve teröpotik potansiyele sahip miRNA'lar tanımlanabilecektir.

6. KAYNAKLAR:

1. Clinic manifestations and diagnosis of chronic myeloid leukemia (Last updated September 2010) , Author: RA Van Etten, MD, PhD, Section Editor: RA Larson, MD, Deputy Editor: RF Connor, MD, www.uptodate.com
2. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, IARC Press, Lyon 2008.
3. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000;96:3343-56
4. Talpaz M, Kantarjian HM, Mc Credie KB. Clinical investigation of human alpha interferon in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1987;69:1280-8
5. Wetzler M, Byrd JC, Clara D. Bloomfield (çeviri: Berksoy Şahin) Kronik Myeloid Lösemi, Harrison's Principles of Internal Medicine, fifteenth edition- 2001;6.2.111:709-14
6. Bennett JH. Case of hypertrophy of the spleen and liver in which death took place from suppuration of the blood. *Edinb Med Surg J* 1845;64:413-23
7. Virchow R. Weisses Blut Frorieps Notizen 1845;36:151-6
8. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 1960;132:1497-1501
9. Rowley JD. A new consistent abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. *Nature* 1973;243:290-3.
10. Marin D. Management of the new patient with CML in chronic phase. *Curr Hematol Malig Rep.* 2013 Mar;8(1):37-42
11. Güran, Ş. Hematolojik Hastalıklarda Sitogenetik, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Biyoloji Bilim Dalı, Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi, Temel Moleküler Hematoloji Kursu www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/sefikguran.pdf
12. Heim S, Mitelman F. Cancer cytogenetics 2nd Ed. Willey Liss. Inc. New York 1995
13. Silver RT. Chronic myeloid leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 2003;17:1159-73
14. McDonald D, Aguiar RC, Mason PJ, Goldman JM, Cross NC. A new myeloproliferative disorder associated with chromosomal translocations involving 8p11: a review. *Leukemia* 1995;9:1628-30
15. Hagop MK, Moshe T, Francis G, Susan O, Jorge C. New Insights into the Pathophysiology of Chronic Myeloid Leukemia and Imatinib Resistance. *Ann Intern Med* 2006;145:913-23

16. Chase A, Cross NC. Signal transduction therapy in haematological malignancies: identification and targeting of tyrosine kinases. Clin Sci (Lond) 2006;111:233–49
17. Dinçkol G. Nobel Tıp Kitapevleri, Klinik Hemotoloji Kitabı. 2003;199-214
18. Ebru K, Haznedaroğlu İC. Kronik Miyelositer Lösemi. Türkiye Klinikleri J Int Med Sci 2007;3:56-61
19. Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, et al. International STI571 CML Study Group. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. N Engl J Med 2002;346:645-52
20. Talpaz M, Silver RT, Druker BJ, et al. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. Blood 2002;99:1928-37
21. Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E, et al. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. Blood 2002;99:3530-9
22. O'Brien S, Guilhot F, Larson R, et al. The IRIS study: International randomized study of interferon and low-dose ara-C versus STI571 (imatinib) in patients with newly-diagnosed chronic phase chronic myeloid leukemia. N Engl J Med 2003; 348:994–1004
23. Druker B J, Guilhot F, O'Brien S, et al. on behalf of the IRIS study group. Long-term benefits of imatinib (IM) for patients newly diagnosed with chronic myelogenous leukemia in chronic phase (CML-CP): The 5-year update from the IRIS study. Journal of Clinical Oncology 2006;24(June 20 Supplement): 6506, 18S
24. Goldman JM, Hughes T, Radich J, et al. Continuing reduction in level of residual disease after 4 years in patients with CML in chronic phase responding to first line Imatinib in the IRIS study. Blood 2005;106:51, abstract 163
25. Baker DE. Imatinib meyslate. Rev Gastroenterol Disord 2002;2:75-86
26. Druker BJ. Imatinib and chronic myeloid leukemia: validating the promise of molecularly targeted therapy. Eur J Cancer 2002;38:70-6
27. O'Dwyer, ME, Mauro, MJ, Blasdel, C, et al. Clonal evolution and lack of cytogenetic response are adverse prognostic factors for hematologic relapse of chronic phase CML patients treated with imatinib mesylate. Blood. 2004 ;15;103(2):451-5
28. Kantarjian, HM, Talpaz, M, O'Brien, S, et al. Dose escalation of imatinib mesylate can overcome resistance to standard-dose therapy in patients with chronic myelogenous leukemia. Blood. 2003;15;101(2):473-5.
29. Kantarjian, H, Talpaz, M, O'Brien, S, et al. Prediction of initial cytogenetic response for subsequent major and complete cytogenetic response to imatinib mesylate therapy in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. Cancer 2003; 97:2225 - 8.

30. Soverini, S, Martinelli, G, Rosti, G, et al. ABL mutations in late chronic phase chronic myeloid leukemia patients with up-front cytogenetic resistance to imatinib are associated with a greater likelihood of progression to blast crisis and shorter survival: a study by the GIMEMA Working Party on Chronic Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 2005; 23:4100 - 9.
31. Golemovic M, Verstovsek S, Giles F, et al. AMN107, a novel aminopyrimidine inhibitor of Bcr-Abl, has in vitro activity against imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 2005;11:4941-7
32. Kantarjian H, Giles F, Wunderle L, et al. Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *N Engl J Med* 2006;354:2542-51
33. Kantarjian HM, Giles F, Gattermann N, et al. Nilotinib (formerly AMN107), a highly selective BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor, is effective in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance. *Blood* 2007;110:3540-6
34. Giuseppe S, Dong-Wook K, Surapol I, et al. for the ENESTnd Investigators. Nilotinib versus Imatinib for Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia *N Engl J Med* 2010;362:2251-9
35. Shah NP, Tran C, Lee FY, et al. Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science* 2004;305:399-401
36. Vajpai N, Strauss A, Fendrich G, et al. Solution conformations and dynamics of ABL kinase-inhibitor complexes determined by NMR substantiate the different binding modes of imatinib/nilotinib and dasatinib. *J Biol Chem* 2008;283:18292-302
37. Melnick JS, Janes J, Kim S, et al. An efficient rapid system for profiling the cellular activities of molecular libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:3153-8
38. Aguilera DG, Tsimberidou AM. Dasatinib in chronic myeloid leukemia: a review. *Therapeutical and Clinical Risk Management* 2009;5:281–9
39. Tokarski JS, Newitt JA, Chang CYJ, 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;66:5790-7
40. Hochhaus A, Baccarani M, Deininger M, et al. Dasatinib induces durable cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase with resistance or intolerance to imatinib. *Leukemia* 2008;22:1200-6
41. Shah NP, Kantarjian HM, Kim DW, et al. Intermittent target inhibition with dasatinib 100 mg once daily preserves efficacy and improves tolerability in imatinib-resistant and - intolerant chronic-phase chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2008;26:3204-12
42. Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, et al. Dasatinib versus Imatinib in Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* 2010;362:2260-70
43. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 2013 Aug 8;122(6):872-84.

44. Kantarjian HM, Melo JV, Tura S et al. Chronic myelogenous leukemia: disease biology and current and future therapeutic strategies. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 2000;90-109
45. Jabbour E, CortesJE, Ghanem H, et al. Targeted therapy in chronic myeloid leukemia. In: *Targeted Cancer Therapy*, Kurzrock R, Markman M (Eds), Humana Press 2008, p.87
46. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, et al. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* 1984;36:93-9
47. Maru Y, Witte ON. The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. *Cell* 1991;67:459–68
48. Kurzrock R, Kantarjian HM, Druker BJ, Talpaz M. Philadelphia chromosome positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann intern Med* 2003;138:819-30
49. Amabile M, Giannini B, Testoni N, et al. Real-time quantification of different types of bcr-abl transcript in chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2001;86:252-9
50. Baran Y, Gündüz Y. Kronik Myelositer Lösemi Genetiği. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2007;3:50-9
51. Kantarjian HM, Talpaz M, Dhingra K, et al. Significance of the P210 versus P190 molecular abnormalities in adults with Philadelphia chromosome-positive acute leukemia. *Blood* 1991;78:2411-8
52. Saglio G, Guerrasio A, Rosso C, et al. New type of Bcr/Abl junction in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1990;76:1819-24
53. Doğan L, Güç D. Sinyal iletimi mekanizmaları ve kanser. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2004;35:34-42
54. Platanias LC. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood* 2003;101: 4667-79
55. Kolch W. Meaningful relationships: The regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 2000;351:289-305
56. Lee JT, McCubrey JA. The Raf/MEK/ERK signal transduction cascade as a target for chemotherapeutic intervention in leukemia. *Leukemia* 2002;16:486-507
57. Yu H, Jove R. The STATs of cancer-new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer* 2004;4:97-105
58. Williams JG. Serpentine receptors and STAT activation: more than one way to twin a STAT. *Trends in Biochemical Sciences* 1999;24:333-4
59. Bowman, T., Garcia R, Turkson J, Jove R. et al. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000;19:2474-88

60. Buettner R, Mora LB, Jove R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res* 2002;8:945-54
61. Teglund S, McKay C, Schuetz E. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* 1998;93:841-50
62. Wakao H, Gouilleux F, Groner B. Mammary gland factor (MGF) is a novel member of the cytokine regulated transcription factor gene family and confers the prolactin response. *EMBO J* 1994;13:2182-91
63. Park SH, Liu X, Hennighausen L, et al. Distinctive roles of STAT5a and STAT5b in sexual dimorphism of hepatic P450 gene expression. Impact of STAT5a gene disruption. *J Biol Chem* 1999;274:7421-30
64. Teglund S, McKay C, Schuetz E et al. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell* 1998;93:841-50
65. Gesbert F, Griffin JD. Bcr/Abl activates transcription of the Bcl-X gene through STAT5. *Blood* 2000;96:2269-76
66. Grandis JR, Drenning SD, Zeng Q et al. Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo. *Proc Natl Acad* 2000;97:4227-32
67. Horita M, Andreu EJ, Benito A et al., Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. *J Exp Med* 2000;191:977-84
68. Huang M, Dorsey JF, Epling-Burnette PK et al. Inhibition of Bcr-Abl kinase activity by PD180970 blocks constitutive activation of Stat5 and growth of CML cells. *Oncogene* 2002;21:8804-16
69. Epling-Burnette PK, Liu JH, Catlett-Falcone R, et al. Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. *J Clin Invest* 2001;107:351-62
70. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996;86:353-64
71. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70
72. Rak J, Yu JL, Klement G, Kerbel RS.. Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2000;5:24-33
73. Grunstein J, Roberts WG, Mathieu-Costello O, et al. Tumor-derived expression of vascular endothelial growth factor is a critical factor in tumor expansion and vascular

function. *Cancer Res* 1999;59:1592-8

74. Niu G, Wright KL, Huang M, Song L, et al. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* 2002;21:2000-8
75. Lee CK, Raz R, Gimeno R, et al. Stat3 is a negative regulator of granulopoiesis but is not required for G-CSF-dependent differentiation. *Immunity* 2002;17:63-72
76. Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L, et al. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med* 2004;10:48-54
77. Yang AS, Lattime ET. Tumor-induced interleukin 10 suppresses the ability of splenic dendritic cells to stimulate CD4 and CD8 T-cell responses. *Cancer Res* 2003;63:2150-7
78. Darnell JE Jr. Transcription factors as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2002;2:740-9
79. Niu G, Heller R, Catlett-Falcone R, et al. Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor in vivo. *Cancer Res* 1999;59:5059-63
80. Battle TE, Frank DA. The role of STATs in apoptosis. *Curr Mol Med* 2002;2:381-92
81. Garcia R, Bowman TL, Niu G, Yu H, et al. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene* 2001;20:2499-513
82. Starr R, Hilton DJ. Negative regulation of the JAK/STAT pathway. *Bioessays* 1999;21:47-52
83. Naka T, Fujimoto M, Kishimoto T. Negative regulation of cytokine signaling: STAT-induced STAT inhibitor. *Trends in Biochemical Sciences* 1999;24:394-8
84. Shuai K. Modulation of STAT signaling by STAT-interacting proteins. *Oncogene* 2000;19:2638-44
85. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281-97
86. Elmen J, Lindow M, Schütz S, et al. LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* 2008; 452: 896-99
87. Garzon R, Calin GA, Croce CM. MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med* 2009;60:167-79
88. Gottwein E, Cullen BR. Viral and cellular microRNAs as determinants of viral pathogenesis and immunity. *Cell Host Microbe* 2008; 3: 375-87
89. Wong TS, Liu XB, Chung-Wai Ho A, et al. Identification of pyruvate kinase type M2 as potential oncoprotein in squamous cell carcinoma of tongue through microRNA profiling. *Int J Cancer* 2008; 123:251-7
90. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 2009;11:228-34

91. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75:843-54
92. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research* 2011;39:152-7
93. Lacellier CH, Dunoyer P, Arar K, et al. A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cell. *Science* 2005;308:557-60
94. Pedersen IM, Cheng G, Wieland S, et al. Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature* 2007;449:919-22
95. Zhang Y, Jia Y, Zheng R, et al. Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral alcohol and chemical-related hepatic diseases. *Clin Chem* 2010;56:1830-8
96. Ura S, Honda M, Yamashita T, et al. Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2009;49:1098-112
97. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006;6:857-66
98. Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007;23:175-205
99. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M et al., Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:15524-9
100. Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008;18:997-1006
101. Tang J, Ahmad A, Sarkar FH. MicroRNAs in Breast Cancer Therapy. *Curr Pharm Des* 2014 Jan 28 (baskida)
102. Avery-Kiejda KA, Braye SG, Mathe A, Forbes JF, Scott RJ. Decreased expression of key tumour suppressor microRNAs is associated with lymph node metastases in triple negative breast cancer. *BMC Cancer* 2014 Jan 31;14:51
103. Zheng G, Xiong Y, Xu W, et al. A two-microRNA signature as a potential biomarker for early gastric cancer. *Oncol Lett* 2014 7:679-84
104. Jia H, Zhang Z, Zou D, et al. MicroRNA-10a Is Down-Regulated by DNA Methylation and Functions as a Tumor Suppressor in Gastric Cancer Cells. *PLoS One* 2014 Jan 31;9 (baskida)
105. Wang X, Yu H, Lu X, et al. miR-22 suppresses the proliferation and invasion of gastric cancer cells by inhibiting CD151. *Biochem Biophys Res Commun* 2014 Feb 1 (baskida)
106. Miao L, Xiong X, Lin Y, Cheng Y, Lu J, Zhang J. Cheng N miR-203 inhibits tumor cell migration and invasion via caveolin-1 in pancreatic cancer cells. *Oncol Lett* 2014;7:658-62
107. Shi M, Xie D, Gao Y, Xie K. Targeting MiRNAs for Pancreatic Cancer Therapy. *Curr Pharm Des* 2014 Jan 28 (baskida)

108. Ikeda S, Tagawa H. Dysregulation of microRNAs and their association in the pathogenesis of T-cell lymphoma/leukemias. *Int J Hematol* 2014 Feb 25 (baskıda)
109. Troppan K, Wenzl K, Deutsch A, Ling H, Neumeister P, Pichler M. MicroRNAs in Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Implications for Pathogenesis, Diagnosis, Prognosis and Therapy. *Anticancer Res* 2014;34:557-64
110. Pan Y, Meng M, Zhang G, Han H, Zhou Q. Oncogenic MicroRNAs in the Genesis of Leukemia and Lymphoma. *Curr Pharm Des* 2014
111. Hatfield SD, Shcherbata HR, Fischer KA, et al. Stem cell division is regulated by the microRNA pathway. *Nature* 2005;435:974-8
112. Hatfield SD, Ruohola-Baker H. MicroRNA and stem cell function. *Cell Tissue Res* 2008;331:57-66
113. Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res* 2005;33:1290-7
114. Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435:834-8
115. Farazi TA, Spitzer JI, Morozov P, Tuschl T. miRNAs in human cancer. *J Pathol* 2011;223:102-15
116. Ramkissoon SH, Mainwaring LA, Ogasawara Y, et al. Hematopoietic-specific microRNA expression in human cells. *Leuk Res* 2006;30:643-7
117. Zhao H, Wang D, Du W, Gu D, Yang R. MicroRNA and leukemia: tiny molecule, great function. *Crit Rev Oncol Hematol* 2010;74:149-55
118. Babashah S, Sadeghizadeh M, Tavirani MR, Farivar S, Soleimani M. Aberrant microRNA expression and its implications in the pathogenesis of leukemia. *Cell Oncol* 2012;35:317-34
119. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:15524-9
120. Garzon R, Volinia S, Liu CG, et al. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood* 2008;111:3183-9
121. Han YC, Park CY, Bhagat G, et al. .microRNA-29a induces aberrant self-renewal capacity in hematopoietic progenitors, biased myeloid development, and acute myeloid leukemia. *J Exp Med* 2010;207:475-89
122. Garzon R, Garofalo M, Martelli MP, et al. Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:3945-50
123. Mi S, Lu J, Sun M, et al. MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:19971-6

124. Flamant S, Ritchie W, Guilhot J, et al. Micro-RNA response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 2010;95:1325-33
125. Agirre X, Jiménez-Velasco A, San José-Enériz E, et al. Down-regulation of hsa-miR-10a in chronic myeloid leukemia CD34+ cells increases USF2-mediated cell growth. *Mol Cancer Res* 2008;6:1830-40
126. Venturini L, Battmer K, Castoldi M, et al. Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34+ cells. *Blood* 2007;109:4399-405
127. Hussein K, Büsche G, Muth M, et al. Göhring G, Kreipe H, Bock O. Expression of myelopoiesis-associated microRNA in bone marrow cells of atypical chronic myeloid leukaemia and chronic myelomonocytic leukaemia. *Ann Hematol* 2011;90:307-18
128. Bueno MJ, Pérez de Castro I, et al. Genetic and epigenetic silencing of microRNA-203 enhances ABL1 and BCR-ABL1 oncogene expression. *Cancer Cell* 2008;13:496-506
129. Eiring AM, Harb JG, Neviani P, et al. D.miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell* 2010;140:652-65
130. Zimmerman EI, Dollins CM, Crawford M, et al. Lyn kinase-dependent regulation of miR181 and myeloid cell leukemia-1 expression: implications for drug resistance in myelogenous leukemia. *Mol Pharmacol* 2010 ;78:811-7
131. Rokah OH, Granot G, Ovcharenko A, et al. Downregulation of miR-31, miR-155 and miR-564 in chronic myeloid leukemia cells. *PLoS One* 2012;7:35501
132. Liu L, Wang S, Chen R, et al. Myc induced miR-144/451 contributes to the acquired imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia cell K562. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;425:368-73
133. Venturini L, Battmer K, Castoldi M, et al. Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34+ cells. 2007;109:4399-405
134. Machova PK, Lopotova T, Klamova H, et al. Expression patterns of microRNAs associated with CML phases and their disease related targets. *Cancer* 2011;10:41
135. Kappelmann M, Kuphal S, Meister G, Vardimon L, Bosserhoff AK. MicroRNA miR-125b controls melanoma progression by direct regulation of c-Jun protein expression. *Oncogene*. *Oncogene* 2013;32:2984-91
136. Port M, Glaesener S, Ruf C, et al. Micro-RNA expression in cisplatin resistant germ cell tumor cell lines. *Mol Cancer* 2011;10:52

7. ÖZET

Kronik myeloid lösemi (KML), myeloid öncül hücrelerin klonal çoğalması ile karakterize kök hücre hastalığıdır. KML'nin patogenezi oluşturan phlelphia kromozomu olarak tanımlanan t(9;22) sonucu oluşan Bcr/Abl füzyon genidir. Bcr/Abl füzyon geni kontrolsüz tirozin kinaz aktivitesi gösterir. Hastalığın patogeneziinde birçok sinyal ileti yolağının etkili olduğu bilinmektedir. Bu yollardan biri de JAK/STAT yolağı ve özellikle STAT 3 ve 5'tir. Bu nedenle STAT'lar tirozin kinaz inhibitörlerine direnç gösteren KML tedavisinde iyi birer terapötik hedef haline gelmişlerdir. KML hastalarında tirozin kinaz inhibitörlerinin uygulamaya girmesi bir dönüm noktası olmasına rağmen gelişen direnç, halen bir sorun oluşturmaktadır. Bu nedenle bu hastalar için yeni tedavi seçenekleri araştırılmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen yeni tedavi stratejilerinde patogenezi ve direnç mekanizmaları da göz önüne alınarak, bu yollara spesifik küçük sentetik moleküler inhibitörlerin geliştirilmesi önem kazanmıştır. Bu inhibitörlerden biri de miRNA'lardır. Bu küçük RNA dizilerinin birçok hücresel fonksiyonda ve karsinogeneziinde etkili oldukları düşünülmektedir. Günümüze kadar miRNA biyogeneziinin aydınlatılmasına yönelik çalışmalar olmasına karşın, miRNA'ların biyolojik yolları nasıl düzenledikleri tam olarak bilinmemektedir. Ayrıca KML patogeneziinde önemli role sahip STAT5a ve 5b'nin ortak hedefi oldukları, miRNA ve anti-miRNA tedavilerini araştırır yeterli çalışma yoktur.

Bu çalışmada öncelikle; bir tirozin kinaz inhibitörü olan dasatinib'in KML hücre modeli K562'de, hücre apoptozu üzerine etkilerini belirlenmeyi amaçladık. Sonrasında dasatinib verilmiş hücrelerle, kontrol grubu hücreleri arasında, "*in silico*" analizle hedef genlerimiz STAT5a ve 5b'nin ortak hedefi olabileceği öngörülen miRNA'ların ifadenme profillerini belirlemeyi amaçladık. Sonuçta, "miRBase release 19 biyoinformatik" veritabanı ile STAT 5a ve 5b'nin ortak hedefi olabileceği 23 tane miRNA saptandı. Bu miRNA'ların K562 KML hücre serilerindeki ifadenmelerine bakıldı. Hedef miRNA'ların artış ve azalış oranları " $\Delta\Delta CT$ metodu" ile kontrol grubu ve dasatinib uygulanmış örneklerde karşılaştırıldı. Sonuçta, hsa-miR-940, hsa-miR-527 ve hsa-miR-518a-5p olmak üzere, 3 adet miRNA'nın kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği gözlemlendi. Bunlardan, hsa-miR-940 kontrol grubuna göre 4.4 kat azalırken, hsa-miR-527 ve hsa-miR-518a-5p'nin sırasıyla 12.1 ve 8 kat arttığı dikkat çekti.

Sonuç olarak, KML patogeneziinde önemi bilinen STAT 5a /5b'nin olası hedefi olduğu miRNA'lar saptanıp; ekspresyon profilleri çıkartıldı. Validasyon basamağı ve sonrasında "mimic" ya da "inhibitör" miRNA transfeksiyon aşamalarından sonra elde edilecek veriler KML'nin tedavi ve patogeneziine ışık tutabilecek, yeni ve terapötik potansiyele sahip miRNA'lar tanımlanabilecektir.

8. ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia (CML), is a hematopoietic stem cell disorder which is characterized of uncontrolled proliferation of myeloid precursor cells. The additional genetic lesion oft(9;22) named Phledelphia chromosome and its result of bcr/abl fusion gene occupy the pathogenesis of CML. Bcr/Abl fusion gene has a limitless tyrosine kinase proptert and induces several signal transduction pathways. Among these pathways, one of the most important one in the pathogenesis of CML is JAK/STAT and STAT 5a and 5b. For this reason, STAT molecules become alternative therapeutic targets for the treatment of CML patientswhich are resistant to thyrosine kinase inhibitors.

The tyrosine kinase inhibitors were major advance in the treatment of CML. Despite of success of tyrosine kinase inhibitors, the emergence of resistance still constitutes a major problem. So new signal transduction pathway specific small synthetic molecular inhibitors become important for the treatment of CML. One of these molecules is miRNAs. These small RNA chains are responsible for many cellular functions and carsinogenesis. Upto date, although there are increasing data explaining the biogenesis of miRNAs, the mechanism how they can control biologic pathways can not be explained completely. In addition, there is not satisfying data investigating the miRNAs and anti miRNA treatment targeting STAT 5a and 5b molecules which are important in the pathogenesis of CML.

In this study, we first searched the effect of a tyrosine kinase inhibitor, dasatinib, on apoptosis in CML cell line K562. Then 23 miRNAs which possibly target both STAT5a ve 5b were identified by "*in silico*"analyses. The expressions of these miRNAs were determined in CML cell line K562. The down and upregulation of the miRNAs were compared with the control group and dasatinib treated group by " $\Delta\Delta$ CT method". Expression of hsa-miR-940, hsa- miR- 527 and hsa- miR- 518a-5p were statistically different in between 23 miRNAs. The level of hsa-miR-940 was decreased 4,4 times and the levels of hsa- miR- 527 and hsa- miR- 518a-5pwere incresed 12,1 and 8 times respectively in the dasatinib treated group compared to control group.

In conclusion, we determined the expression profiles of miRNAs targeting STAT 5a / 5b which has an important role in the pathogenesis of CML. Obtained datas after the validation and transfection of "mimic"and "inhibitor"miRNAs steps, couldlead to determine the new therapeutic targets in CML patients.

