

T.C
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KRONİK MYELOİD LÖSEMİ TEDAVİSİNDE KULLANILAN BAZI
İLAÇLARIN LÖSEMİ KÖK HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN GENOM
DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI**

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi
Çağla KAYABAŞI

DANIŞMAN: Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ

Bornova/İZMİR
2012

T.C
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KRONİK MYELOİD LÖSEMİ TEDAVİSİNDE KULLANILAN BAZI
İLAÇLARIN LÖSEMİ KÖK HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN GENOM
DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI**

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi
Çağla KAYABAŞI

DANIŞMAN: Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ

Bornova/İZMİR
2012

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

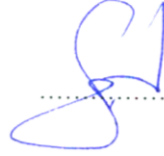
(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof. Dr. Cumhur GÜNDÜZ
(Danışman)



Üye : Prof. Dr. Güray SAYDAM



Üye : Doç. Dr. Zuhale EROĞLU



Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih: 22.08.2012

ÖNSÖZ

*Yüksek lisans eğitimim süresince, en iyi şekilde yetişmemi sağlayan, bu tez çalışmasının planlanması ve yürütülmesinin yanı sıra her aşamasında sabırla ve özveriyle yardımcı olan, gerek akademik alanda gerekse sosyal hayatımda karşılaştığım sorunları içtenlikle dinleyen, bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren değerli hocam ve tez danışmanım Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı **Sn. Prof. Dr. Cumhuri GÜNDÜZ**' e,*

*Bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren anabilim dalımızın değerli öğretim üyeleri **Sn. Doç. Dr. Zuhal EROĞLU** ve **Sn. Doç. Dr. Buket KOSOVA**' ya,*

*Çalışmalarım boyunca ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgileriyle yönlendiren değerli hocam Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahiliye Anabilim Dalı Hematoloji Bilim Dalı Başkanı **Sn. Prof. Dr. Güray SAYDAM**' a,*

*Bölüme başladığım ilk andan itibaren pozitif enerjisini hissettiğim, tüm birikimlerini benimle paylaşan, her zaman destek olup cesaretlendiren, sorunlarım ve sevinçlerimde yanımda olan ablam **Sn. Arş. Gör. Dr. Çığır BİRAY AVCI**' ya,*

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

*Eğitimimde bilgilerini benimle paylaşıp, yardımcı olan **Uzm. Dr. Sn. Nur SELVİ**' ye, **Araş. Gör. Sn. Burçin TEZCANLI KAYMAZ**' a, **Araş. Gör. Sn. Vildan BOZOK ÇETİNTAŞ**' a, **Araş. Gör. Sn. Aslı TETİK VARDARLI**' ya ve **Araş. Gör. Sn. Duygu AYGÜNEŞ**' e,*

*Yüksek lisans eğitimimin her aşamasında her konuda desteklerini yanımda hissettiğim, yardıma ihtiyacım olduğunda yanımda olan **Arş. Gör. Sn. Sunde YILMAZ SÜSLÜER**' e ve **Dok. Öğr. Sn. Zeynep Özlem DOĞAN ŞİĞVA**' ya,*

*Deneyimleri ve arkadaşlıklarıyla yanımda olan doktora öğrencileri **Sn. Ali Şahin KÜÇÜKASLAN**' a, **Sn. Çağdaş AKTAN**' a, **Sn. Ayşegül DALMIZRAK**' a, **Sn. Müsteyde YÜCEBAŞ**' a,*

*Çalışmalarımda kullanacağım imatinib dirençli hücre hattı sağlayan İYTE Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü öğretim üyesi **Sn. Doç. Dr. Yusuf BARAN**' a,*

*Yüksek lisans sürecinin her anını beraber yaşadığımız, fikirleriyle ve yorumlarıyla bana yol gösteren, tezimin her aşamasında destekleyen ve moral veren, samimiyetlerini her an hissettiğim dostlarım yüksek lisans öğrencileri **Sn. Tuğçe BALCI**, **Sn. Zeynep MUTLU**, **Sn. Mertkaya ARAS**, **Sn. Selin YEŞİL** ve **Sn. Cansu ÇALIŞKAN**' a,*

*Laboratuvarlarda bize yardımcı olan tekniker **Sn. Hale GÜNDÜZ**' e, her işe koşturan çok değerli sekreterlerimiz **Sn. Gönül SAKLICA**' ya, **Sn. Anıl KARAKAŞ**' a, değerli personelimiz **Sn. Salih TOROĞLU**' ya,*

*Hayatım boyunca sorgusuzca hep elimden tutan, sonsuz sevgisini, güvenini, desteğini hissettiğim, benim için hiçbir fedakarlıktan kaçınmadan bütün eğitim hayatım boyunca her an yanımda olan, bütün süreçleri benimle birlikte yaşayan biricik annem **Sn. Sevgi KUTLUDUR**' a,*

*Sevgisi ve desteği ile yanımda olan babam **Sn. Melik KAYABAŞI**' ya,*

*Hayatı boyunca bize emek vermiş, tez sürecinde ihtiyacım olan bir şey olur mu diye gözümün içine bakan, sevgisiyle bana güç veren canım anneannem **Sn. Necla KUTLUDUR**' a, benim için bir sürü fedakarlıkta bulunan, koşulsuz sevgilerini hissettiren dayım **Sn. Semih KUTLUDUR**' a, yengem **Sn. Vildan KUTLUDUR**' a ve tüm aileme,*

*Ve her koşulda, her zaman yanımda olan, sevgileriyle içimi ısıtan, umutsuzluğa kapıldığım anlarda bana enerji veren, yardımcı olmak için ellerinden geleni yapan, beni cesaretlendiren canım kuzenlerim **Sn. Elif PARMAKSIZ** ve **Sn. Tuvan KUTLUDUR**' a, biricik dostum **Sn. Müge KUYUMCU**' ya ve çok değerli arkadaşlarıma,*

Teşekkür Ederim...

Çağla KAYABAŞI

16.08.2012

İÇİNDEKİLER

BÖLÜM I

1.1. GİRİŞ	1
1.2. GENEL BİLGİLER	3
1.2.1. Lösemi	3
1.2.1.1. Akut Lösemiler	4
1.2.1.1.1. Akut Lenfoblastik Lösemi	5
1.2.1.1.2. Akut Myeloid Lösemi	5
1.2.1.2. Kronik Lösemiler	6
1.2.1.2.1. Kronik Lenfositik Lösemi	6
1.2.1.2.2. Kronik Myeloid Lösemi	6
1.2.1.2.2.1. KML' nin Aşamaları	7
1.2.1.2.2.1.1. KML' de Kronik Faz	7
1.2.1.2.2.1.2. KML' de Akseler Faz	8
1.2.1.2.2.1.3. KML' de Blastik Faz	8
1.2.1.2.2.2. KML' de Moleküler Biyoloji	9
1.2.1.2.2.2.1. Philadelphia Kromozomu	9
1.2.1.2.2.2.1.1. ABL Proto-Onkogeni	10
1.2.1.2.2.2.1.2. BCR Geni	10
1.2.1.2.2.2.1.3. BCR-ABL Füzyon Geni ve Proteini	11
1.2.1.2.2.2.2. BCR-ABL Geninin Kontrol Ettiği Malign Transformasyon Mekanizmaları	12
1.2.1.2.2.2.3. Varyant Ph Kromozomları	14
1.2.1.2.2.2.3.1. Ph (-) ve BCR-ABL Füzyon Geni Pozitif KML	15
1.2.1.2.2.2.4. Tirozinkinaz İnhibitörleri	15
1.2.1.2.2.2.4.1. Imatinib	18
1.2.1.2.2.2.4.1.1. Imatinibin Farmakolojisi	19
1.2.1.2.2.2.4.1.2. Imatinib' in Yarattığı İnhibitör Etkinin Temelleri	19
1.2.1.2.2.2.4.1.3. Imatinib Direnci	21
1.2.1.2.2.2.4.2. Dasatinib	23
1.2.1.2.2.2.4.2.1. Dasatinib' in Farmakolojisi	23
1.2.1.2.2.2.4.2.2. Dasatinib' in Yarattığı İnhibitör Etkinin Temelleri	24
1.2.1.2.2.2.4.2.3. Dasatinib Direnci	25
1.2.1.2.2.2.4.3. Ponatinib	25
1.2.1.2.2.2.4.3.1. Ponatinib' in Farmakolojisi	26
1.2.1.2.2.2.4.3.2. Ponatinib' in Yarattığı İnhibitör Etkinin Temelleri	26
1.2.2. Kök Hücre	27
1.2.2.1. Embriyonik Kök Hücre	30
1.2.2.2. Embriyonik Olmayan Kök Hücre	31
1.2.2.2.1. Erişkin Kök Hücre	32
1.2.2.2.2. Hematopoetik Kök Hücre	33
1.2.2.3. Kanser Kök Hücre	35
1.2.2.3.1. Lösemi Kök Hücre	36
1.2.2.3.2. KML' de İlaç Direncinde Kök Hücrelerin Rolü	37

1.2.3. mikroRNA	39
1.2.3.1. miRNA Genleri ve Yapısı	40
1.2.3.2. miRNA'NIN İşlenmesi- RISC Kompleksi	40
1.2.3.3. miRNA Çalışma Prensipleri	43
1.2.3.4. Kanserde miRNA	45
1.2.3.4.1. Onkogenik ve Tümör Supresör miRNALAR	46
1.2.3.4.2. Anormal miRNA Değişimi	47
1.2.3.4.3. Onkogenezi	48
1.2.3.4.4. Hücre Döngüsünün Düzenlenmesi	49
1.2.3.4.5. Gelişme ve Metastaz	50
1.2.3.5. Hematopoezde miRNA	51
1.2.3.6. Kronik Myeloid Lösemide miRNA	51
1.2.4. Hücre Ölüm Mekanizmaları	52
1.2.4.1. Apoptoz	53
1.2.4.2. Nekroz	56
1.2.4.3. Otofaji	57
1.2.4.3.1. Otofaji Mekanizması	59
1.2.4.3.2. Otofaji Kontrol Mekanizmaları	61
1.2.4.3.3. Otofaji Apoptoz İlişkisi	62
1.2.4.3.4. Otofaji Kansere İlişkisi	63
1.2.4.3.4.1. Otofaji Lösemi İlişkisi	64
1.2.5. Hücre Modelleri	65

BÖLÜM II

2.1. GEREÇ VE YÖNTEM	68
2.1.1. Hücre Kültürü	68
2.1.2. Hücre Canlılık Testi	70
2.1.3. Sitotoksikite Analizi	71
2.1.4. Apoptoz Analizleri	72
2.1.4.1. Annexin V Yöntemi	73
2.1.4.2. Mitoprobe JC-1	75
2.1.5. Otofaji	77
2.1.6. miRNA Profillemesi	79
2.1.6.1. Total RNA izolasyonu	80
2.1.6.1.1. RNA miktarlarının ölçümü ve kalite kontrolü	82
2.1.6.2. İşaretleme	83
2.1.6.3. Hibridizasyon	84
2.1.6.4. Array Analizi	85

BÖLÜM III

3.1.BULGULAR	87
3.1.1. Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi	87
3.1.1.1. Imatinib WST-1 Testi	87
3.1.1.1.1. Imatinibin K562 Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin WST-1 İle Değerlendirilmesi	87
3.1.1.1.2. Imatinibin HL-60 Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin WST-1 İle Değerlendirilmesi	88
3.1.1.1.3. Imatinibin K562/ima3 Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin WST-1 İle Değerlendirilmesi	89
3.1.1.1.4. Imatinibin NCI-BL 2171 Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin WST-1 İle Değerlendirilmesi	89
3.1.1.1.5. Imatinibin İnsan Lösemi Kanseri Kök Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin WST-1 İle Değerlendirilmesi	90
3.1.1.2. Dasatinib WST-1 Testi	91
3.1.1.2.1. Dasatinibin K562 Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin WST-1 İle Değerlendirilmesi	91
3.1.1.2.2. Dasatinibin HL-60 Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin WST-1 İle Değerlendirilmesi	91
3.1.1.2.3. Dasatinibin K562/ima3 Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin WST-1 İle Değerlendirilmesi	92
3.1.1.2.4. Dasatinibin NCI-BL 2171 Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin WST-1 İle Değerlendirilmesi	93
3.1.1.2.5. Dasatinibin İnsan Lösemi Kanseri Kök Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin WST-1 İle Değerlendirilmesi	93
3.1.1.3. Ponatinib WST-1 Testi	94

3.1.1.3.1. Ponatinibin K562 Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin WST-1 İle Değerlendirilmesi	94
3.1.1.3.2. Ponatinibin HL-60 Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin WST-1 İle Değerlendirilmesi	95
3.1.1.3.3. Ponatinibin K562/ima3 Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin WST-1 İle Değerlendirilmesi	95
3.1.1.3.4. Ponatinibin NCI-BL 2171 Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin WST-1 İle Değerlendirilmesi	96
3.1.1.3.5. Ponatinibin İnsan lösemi kanser Kök Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin WST-1 İle Değerlendirilmesi	97
3.1.2. Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin Hücreler Üzerindeki Apoptotik Etkilerinin Değerlendirilmesi	97
3.1.2.1. Imatinib, Dasatinib ve Ponatinibin K562 Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik Etkileri	98
3.1.2.2. Imatinib, Dasatinib ve Ponatinibin HL-60 Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik Etkileri	99
3.1.2.3. Imatinib, Dasatinib ve Ponatinibin K562/ima3 Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik Etkileri	101
3.1.2.4. Imatinib, Dasatinib ve Ponatinibin NCI-BL 2171 Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik Etkileri	103
3.1.2.5. Imatinib, Dasatinib ve Ponatinibin İnsan Lösemi Kanser Kök Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik Etkileri	105
3.1.3. Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin Hücreler Üzerindeki Otofajik Etkilerinin Değerlendirilmesi	107
3.1.3.1. Imatinib, Dasatinib ve Ponatinibin K562 Hücre Hattı Üzerindeki Otofajik Etkileri	108
3.1.3.2. Imatinib, Dasatinib ve Ponatinibin HL-60 Hücre Hattı Üzerindeki Otofajik Etkileri	108
3.1.3.3. Imatinib, Dasatinib ve Ponatinibin K562/ima3 Hücre Hattı Üzerindeki Otofajik Etkileri	108

3.1.3.4. Imatinib, Dasatinib ve Ponatinibin NCI-BL 2171 Hücre Hattı Üzerindeki Otofajik Etkileri_____	109
3.1.3.5. Imatinib, Dasatinib ve Ponatinibin İnsan Lösemi Kanseri Kök Hücre Hattı Üzerindeki Otofajik Etkileri_____	109
3.1.4. Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin Hücrelerde Oluşturduğu miRNA Ekspresyon Değişimleri_____	110
3.1.4.1. Imatinib, Dasatinib ve Ponatinibin K562 Hücrelerinde Oluşturduğu miRNA Ekspresyon Değişimleri_____	110
3.1.4.2. Imatinib, Dasatinib ve Ponatinibin HL-60 Hücrelerinde Oluşturduğu miRNA Ekspresyon Değişimleri_____	113
3.1.4.3. Imatinib, Dasatinib ve Ponatinibin K562/ima3 Hücrelerinde Oluşturduğu miRNA Ekspresyon Değişimleri_____	117
3.1.4.4. Imatinib, Dasatinib ve Ponatinibin NCI-BL 2171 Hücrelerinde Oluşturduğu miRNA Ekspresyon Değişimleri_____	119
3.1.4.5. Imatinib, Dasatinib ve Ponatinibin İnsan Lösemi Kanseri Kök Hücrelerinde Oluşturduğu miRNA Ekspresyon Değişimleri_____	122
BÖLÜM IV	
4.1. TARTIŞMA_____	124
BÖLÜM V	
5.1. SONUÇ VE ÖNERİLER_____	141
BÖLÜM VI	
6.1. ÖZET_____	145
6.2. ABSTRACT_____	147
BÖLÜM VII	
7.1. YARARLANILAN KAYNAKLAR_____	149
ÖZGEÇMİŞ_____	175

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: BCR-ABL mutasyonları_____	22
Tablo 2: Hücre kültüründe kullanılan ekipmanlar ve maddeler_____	70
Tablo 3: miRNA işaretleme reaksiyonu kimyasal hacimleri_____	83
Tablo 4: Imatinibin K562 hücrelerinde miRNA ekspresyonlarına etkisi____	111
Tablo 5: Dasatinibin K562 hücrelerinde miRNA ekspresyonlarına etkisi____	112
Tablo 6: Ponatinibin K562 hücrelerinde miRNA ekspresyonlarına etkisi____	112
Tablo 7: Imatinibin HL-60 hücrelerinde miRNA ekspresyonlarına etkisi____	114
Tablo 8: Dasatinibin HL-60 hücrelerinde miRNA ekspresyonlarına etkisi____	115
Tablo 9: Ponatinibin HL-60 hücrelerinde miRNA ekspresyonlarına etkisi____	116
Tablo 10: Imatinibin K562/ima3 hücrelerinde miRNA ekspresyonlarına etkisi_____	117
Tablo 11: Dasatinibin K562/ima3 hücrelerinde miRNA ekspresyonlarına etkisi_____	117
Tablo 12: Ponatinibin K562/ima3 hücrelerinde miRNA ekspresyonlarına etkisi_____	118
Tablo 13: Imatinibin NCI-BL 2171 hücrelerinde miRNA ekspresyonlarına etkisi_____	119
Tablo 14: Ponatinibin NCI-BL 2171 hücrelerinde miRNA ekspresyonlarına etkisi_____	121
Tablo 15: Imatinibin LSC hücrelerinde miRNA ekspresyonlarına etkisi____	122
Tablo 16: Ponatinibin LSC hücrelerinde miRNA ekspresyonlarına etkisi____	123

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Hematopoetik farklılaşma	3
Şekil 2: 9. kromozom ile 22. kromozom arasındaki karşılıklı translokasyon ve Philedelphia kromozomunun oluşumu	9
Şekil 3: BCR proteini ve fonksiyonel bölgeleri	11
Şekil 4: KML'de t(9;22)(q34;q11) translokasyonu transkripsiyon ürünleri	12
Şekil 5: Aktif ve inaktif tirozin kinaz	16
Şekil 6: İmatinibin 2 boyutlu yapısı	19
Şekil 7: İmatinibin etki mekanizması	20
Şekil 8: Dasatinibin 2 boyutlu yapısı	24
Şekil 9: Ponatinibin 2 boyutlu yapısı	26
Şekil 10: Kök hücrelerin genel özellikleri	28
Şekil 11: Farklılaşma potansiyellerine göre kök hücreler	29
Şekil 12: Elde edikleri kaynaklara göre kök hücreler	30
Şekil 13: Blastosist	31
Şekil 14: Kemik iliği kökenli kök hücrelerin değişik hücre türlerine dönüşümü	32
Şekil 15: Hematopoetik kök hücreden farklılaşan hücreler	33
Şekil 16: İnsan normal ve lösemik hematopoetik hiyerarşinin şematik gösterimi	37
Şekil 17: pre-miRNA yapısı	42
Şekil 18: miRNA biyogenezi	43
Şekil 19: miRNA ve mRNA'nın 3' UTR bölgesinin baz eşleşmesi	44
Şekil 20: RISC mRNA ilişkisi	44
Şekil 21: Otofaji Çeşitleri	59
Şekil 22: İnsan lösemi kanser kök hücre inverted mikroskop görüntüleri	69
Şekil 23: Annexin V-EGFP yönteminde floresan mikroskopunda	74
Şekil 24: Mitoprobe JC-1 yönteminde floresan mikroskopunda FITC ile görüntülenmiş hücreler	76
Şekil 25: Premo Autophagy Tb/GFP TR-FRET LC3B Expression Kit mekanizması	78
Şekil 26: BacMam ile transfekte olmuş hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü	78
Şekil 27: Premo Autophagy Tb/GFP TR-FRET LC3B Expression Kit protokolü	79
Şekil 28: miRNA mikrodizin tarama görüntüsü	86
Şekil 29: K562 hücrelerinde imatinibin IC ₅₀ dozu	88
Şekil 30: HL-60 hücrelerinde imatinibin IC ₅₀ dozu	88
Şekil 31: K562/ima3 hücrelerinde imatinibin IC ₅₀ dozu	89
Şekil 32: NCI-BL 2171 hücrelerinde imatinibin IC ₅₀ dozu	90
Şekil 33: İnsan lösemi kanser kök hücrelerinde imatinibin IC ₅₀ dozu	90
Şekil 34: K562 hücrelerinde dasatinibin IC ₅₀ dozu	91
Şekil 35: HL-60 hücrelerinde dasatinibin IC ₅₀ dozu	92
Şekil 36: K562/ima3 hücrelerinde dasatinibin IC ₅₀ dozu	92
Şekil 37: NCI-BL 2171 hücrelerinde dasatinibin IC ₅₀ dozu	93
Şekil 38: İnsan lösemi kanser kök hücrelerinde dasatinibin IC ₅₀ dozu	94
Şekil 39: K562 hücrelerinde ponatinibin IC ₅₀ dozu	94
Şekil 40: HL-60 hücrelerinde ponatinibin IC ₅₀ dozu	95

Şekil 41: K562/ima3 hücrelerinde ponatinibin IC ₅₀ dozu	96
Şekil 42: NCI-BL 2171 hücrelerinde ponatinibin IC ₅₀ dozu	96
Şekil 43: İnsan lösemi kanser kök hücrelerinde ponatinibin IC ₅₀ dozu	97
Şekil 44: Imatinib, dastinib ve ponatinibin K562 hücrelerindeki apoptotik etkisinin Annexin V sonuçları	98
Şekil 45: Imatinib, dastinib ve ponatinibin K562 hücrelerindeki apoptotik etkisinin JC-1 Mitoprobe sonuçları	99
Şekil 46: Imatinib, dastinib ve ponatinibin HL-60 hücrelerindeki apoptotik etkisinin Annexin V sonuçları	100
Şekil 47: Imatinib, dastinib ve ponatinibin HL-60 hücrelerindeki apoptotik etkisinin JC-1 Mitoprobe sonuçları	101
Şekil 48: Imatinib, dastinib ve ponatinibin K562/ima3 hücrelerindeki apoptotik etkisinin Annexin V sonuçları	102
Şekil 49: Imatinib, dastinib ve ponatinibin K562/ima3 hücrelerindeki apoptotik etkisinin JC-1 Mitoprobe sonuçları	103
Şekil 50: Imatinib, dastinib ve ponatinibin NCI-BL 2171 hücrelerindeki apoptotik etkisinin Annexin V sonuçları	104
Şekil 51: Imatinib, dastinib ve ponatinibin NCI-BL 2171 hücrelerindeki apoptotik etkisinin JC-1 Mitoprobe sonuçları	105
Şekil 52: Imatinib, dastinib ve ponatinibin insan lösemi kanser kök hücrelerindeki apoptotik etkisinin Annexin V sonuçları	106
Şekil 53: Imatinib, dastinib ve ponatinibin insan lösemi kanser kök hücrelerindeki apoptotik etkisinin JC-1 Mitoprobe sonuçları	107
Şekil 54: Imatinib, dasatinib ve ponatinibin K562, HL-60, K562/ima3, NCI-BL 2171 ve insane lösemi kanser kök hücre hatları üzerindeki otofajik etkisi	109
Şekil 55: Imatinib, dasatinib ve ponatinibin K562 hücrelerindeki miRNA ekspresyon değişimlerinin ısı haritası	113
Şekil 56: Imatinib, dasatinib ve ponatinibin HL-60 hücrelerindeki miRNA ekspresyon değişimlerinin ısı haritası	116
Şekil 57: Imatinib, dasatinib ve ponatinibin K562/ima3 hücrelerindeki miRNA ekspresyon değişimlerinin ısı haritası	119
Şekil 58: Imatinib, dasatinib ve ponatinibin NCI-BL 2171 hücrelerindeki miRNA ekspresyon değişimlerinin ısı haritası	121
Şekil 59: Imatinib, dasatinib ve ponatinibin insan lösemi kanser kök hücrelerindeki miRNA ekspresyon değişimlerinin ısı haritası	123

KISALTMALAR

°C: *Santigrat*

μ: Mikro

ABC: ATP bağlayıcı kaset

ABL: Abelson

AbTKİ: Humanize edilmiş antikor tirozin kinaz inhibiötü

ADP: Adenozindifosfat

ATP: Adenozintrifosfat

PKB: Protein kinaz B

Akt: Fosfotidilinositol 3-kinaz

ALL: Akut lenfoblastik lösemi

AML: Akut myeloblastik lösemi

AP24534: Ponatinib

APO-1: Apoptoz Antijeni - 1

APO3L: Apo3 Ligand

Atg: Otofaji ilişkili protein

ATM: Ataxia telangiectasia mutant

Bad: BCL2-ilişkili ölüm promotörü

Bax: Bcl-2 ilişkili X proteini

BCL-2: Lenfoma B hücresi - 2

BCR: Breakpoint cluster region

BMS-354825: Dasatinib

CD: Siklin Bağımlı

Cdk: Siklin bağımlı kinaz

CFU: Koloni oluşturan birim

CO₂: Karbondioksit

Crkl: Crk benzeri Protein

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole /4',6-diamid-2-fenilindol

kD : kilodalton

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksiribonükleik asit

DR: Tümör nekroz faktör reseptörü

dsRNA: Çift iplikli RNA

EBV: Epstein-Barr virus
EGFP: Epidermal Büyüme Faktörü Proteini
Erk: Sinyalle regüle olan ekstraselüler kinaz
Exp: Eksportin
FBS: Fötal sığır serumu
FE: fosfotidiletanolamin
FGF-4: Fibroblast Büyüme Faktörü-4
FGFR1: Fibroblast büyüme faktör reseptörü 1
FITC: Fluorescein isothiocyante
GAP: GTPaz aktive edici protein.
GDP: Guanozindifosfat
GEF: Guanin nukleotid değiştirme faktörü
GFP: Yeşil Florasan Protein
gr: Gram
Grb: Büyüme faktörü reseptör bağlanma proteini
GTP: Guanozintrifosfat
HIV: İnsan bağışıklık yetmezliği virüs
HL-60: İnsan promyelositik lösemi hücre dizisi
IC₅₀: İnhibitör konsantrasyon oranı
ICE-benzeri proteaz: İnterlökin-1 dönüştürücü enzim benzeri proteaz
Ig: Immunoglobulin / Antikor
IM: Imatinib
IUPAC: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
İnv: İnversiyon
iso: İzokromozom
Jak: Janus Kinaz
Jnk: c-Jun N-terminal kinazlar
K562/ima3: imatinib dirençli kronik Myeloid lösemi hücre hattı
K562: Kronik Myeloid lösemi hücre hattı
Kaspas: Sistein-aspartik asit proteaz
kb: Kilobaz
KLL: Kronik Lenfositik Lösemi
KML: Kronik Myeloid Lösemi
KMTKİ: Küçük moleküllü tirozin kinaz inhibiötü

L: Litre
LC3: Mikrotübül ilişkili protein 1 hafif zincir 3
log: Logaritma
LSC: Lösemi kök hücre
LTC-IC: Uzun süreli kültür başlatan hücre
M: Molar
MAP: Mikrotübül ilişkili protein
MDR: Çoklu ilaç direnci
miRNA: micro Ribonükleik asit
mRNA: mesajcı Ribonükleik asit
MSY: Majör sitogenetik yanıt
mTOR: Memeli rapamisin hedefi
Myc: Myelositomatozis onkogeni
n: Nano
NCI-BL 2171: Sağlıklı B-Lenfosit hücre hattı
nt: Nükleotid
Oct4: oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü 4
PAS: Otofaji oluşum merkezi
PCDC4: Programlanmış hücre ölümü 4
PDGFR α : Platelet-derived büyüme faktör reseptörü alfa
Ph: Philadelphia kromozomu
pH: Hidrojen Gücü
PI: Propidium iyodür
PI3F: Phosphoinositol 3-fosfat
PTEN: Fosfataz ve tensin homologu protein
Ran: RAS-iliskili nükleer protein
RISC: RNA ile indüklenen susturma kompleksi
RNA: Ribonükleik asit
rpm: Dakikadaki devir sayısı
s: saniye
Sapk: Stres ile aktive edilmiş protein kinaz
SCF: Kök Hücre Faktörü
SCID: Şiddetli kombine bağışıklık yetmezliği
SL-IC: SCID farelerde lösemi kök hücre

SNP: Tek nükleotid polimorfizmi
SRC: SCID farelerde yeniden popülasyon oluşturan hücre
STAT: Sinyal dönüştürücü ve Trankripsiyon Aktivatörü
STI571: İmatinib
THY: Tam hematolojik yanıt
TKİ: Tirozin kinaz inhibitörü
TNF: Tümör nekroz faktör
TNFR: Tümör nekroz faktör reseptörü
TRAIL: TNF- ilişkili Apoptoz İndükleyici Ligand
TRAILR: TNF- ilişkili Apoptoz İndükleyici Ligand Reseptörü
FRET: Florasan rezonans enerjisi transferi
TSY: Tam sitogenetik yanıt
Tyr: Tirozin
USF2: Yukarı uyarıcı faktör 2
UTR: Çevrilmeyen (okunmayan) Bölge
UV: Ultraviyole
VEGFR2: Damarsal endotel büyüme faktörü 2
WST-1: Hücre proliferasyonu ve canlılık ajanı
ZAP70: Zeta-zincir-ilişkili protein kinaz 70

BÖLÜM I

1.1. GİRİŞ

Kronik myeloid lösemi (KML) olgularının %90'dan fazlasında (9;22) translokasyonu sonucu oluşan Philadelphia (Ph) kromozomu gözlenir. Bu translokasyon sonucu KML' de lösemik fenotipin gelişmesinden sorumlu BCR-ABL füzyon proteini oluşmaktadır. KML, primitif pluripotent kök hücrenin klonal bir hastalığıdır ve kan kök hücrelerinde oluşan mutasyonlar sonucu kontrolsüz ve klonal olarak çoğalmaları ile normal işlevlerini görememeleri sonucu meydana gelir.

Kök hücreler, farklı hücre tiplerine dönüşebilme potansiyeline ve kendini yenileyebilme gücüne sahip olan hücrelerdir. Kanseri kök hücresi ise tümörlerde veya hematolojik kanserlerde bulunan ve normal kök hücre ile benzer özelliklere sahip, özellikle belirli bir kanser örneğinde bulunan tüm hücre tiplerini oluşturma yeteneği olan kanser hücreleridir.

BCR-ABL tirozin kinazın inhibitörü olan imatinib mesilat, p210 onkoproteinin ATP bağlanan bölgesine spesifik olarak bağlanan bir fenilaminopirimidin türevidir. Imatinib mesilat ile çoğu olguda tam hematolojik, tam sitogenetik ve majör moleküler yanıt elde etmek başıarsa da bazı olgularda yanıt alınamamakta ya da zamanla imatinib mesilata karşı oluşturulan direnç nedeniyle elde edilen yanıtın kaybı gözlenmektedir.

Imatinibe gelişen dirençte etkili mekanizmaların başında BCR-ABL gen mutasyonları gelmektedir. Bu mutasyonlar sonucu imatinib, ABL kinaza katalitik olarak aktif olmayan bir konformasyonda bağlanmaktadır. Imatinibe direnç seviyeleri değişen 55' ten fazla kinaz domain mutasyonu tespit edilmiştir. Imatinibe karşı gelişen direnç ve intolerans kronik myeloid lösemide nilotinib ve dasatinib gibi ikinci jenerasyon tirozin kinaz inhibitörlerinin geliştirilmesi fikrini doğurmuştur. Ancak bu ilaçlara da direnç gelişmiş ve bu dirençten sorumlu 20 yeni kinaz domain mutasyonu belirlenmiştir. Bu durum yeni ilaç üretimi gereksinimi ortaya çıkarmıştır. Üçüncü jenerasyon tirozin kinaz inhibitörü olan ponatinib (AP24534) yeni geliştirilmiş bir ilaçtır. Ponatinib hem yabanıl tip hem de T315I mutant ABL1 otofosforilasyonunu inhibe etmekte ve ayrıca SRC ailesi kinazları, KIT, VEGFR2, PDGFR α , FGFR1 gibi kinazları da inhibe etmektedir.

Lökomogenezde ilk olarak KLL' de miR-15a ve miR-16-1 delesyonlarının keşfedilmesini takiben akciğer, meme, prostat ve gastrointestinal kanserler gibi en yaygın kanserler de dahil olmak üzere tüm kanser tiplerinde miRNA deregülasyonu gösterilmiştir. Bu düzensizlikler, onkogen ve tümör süpresör miRNA deregülasyonuna neden olan delesyon, amplifikasyon, mutasyon, transkripsiyonel disregulasyon ve epigenetik değişiklikler gibi birçok mekanizmadan kaynaklanabilir. miRNA' ların birçok hedefinin olması, bazı spesifik hedeflerin düzenlemesi ile tümörögenezde görev almaktadır.

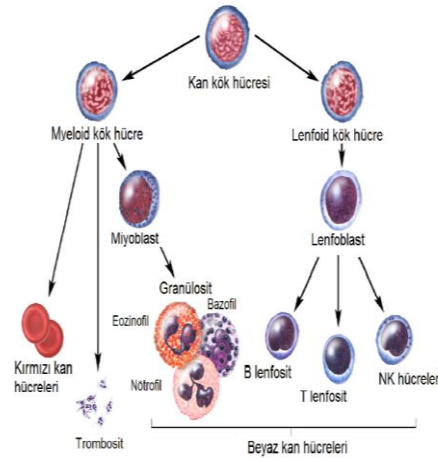
Çalışmamızda, Ph+, Ph-, kontrol, imatinib dirençli ve lösemi kök hücre hatları imatinib, dasatinib ve ponatinibe maruz bırakılması ile tüm genom

miRNA değişimlerinin, sitotoksik, apoptotik ve otofajik etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. İlaç direncinin oluşumunda önemli bir faktör olan lösemi kök hücrelerinin imatinib, dasatinib ve ponatinibe maruziyeti ile hücrelerin sağkalımları ve ilaç dirençleri karşılaştırılacaktır. Bu çalışmaların sonucunda, KML tedavisinin moleküler mekanizmasındaki handikapların daha iyi anlaşılabilceğine inanmaktayız.

1.2. GENEL BİLGİLER

1.2.1. LÖSEMİ

Hematopoetik kök hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasıyla olgun lenfositler, granülositler, monositler, megakaryositler, trombositler ve eritrositler gibi periferel kan hücrelerinin oluşması hematopoez olarak bilinmektedir. Hematopoez Şekil 1' deki gibi bir süreçte gerçekleşmektedir (4).



Şekil 1. Hematopoetik farklılaşma (114)

Her farklılaşma aşamasının farklı büyüme faktörleri tarafından kontrol edilmesiyle, lenfoid kök hücreler lenfositlere, myeloid kök hücre ise nötrofil, bazofil, eozinofil, monosit, eritrosit ve trombositlere farklılaşmaktadır (4, 56).

Lösemi; hematopoetik hücrelerin malin transformasyonu sonucu ortaya çıkan, kan ve kemik iliği hücrelerinde gözlenen, heterojen neoplastik hastalıklar grubudur. Özellikle beyaz kan hücrelerinin mutasyona uğrayarak kontrol dışı çoğalmaları sonucu ortaya çıkan lösemi, hastalığı oluşturan hücre dizisinin tipine göre myeloid ya da lenfoid olarak 2 grupta ve proliferen olan kan hücresinin olgunlaşma durumuna göre akut ya da kronik olarak 2 grupta sınıflandırılmaktadır (32, 56).

Çoğu lösemik olguda, çok sayıda lösemik hücre kana yayılmıştır ve karaciğer, dalak, lenf gangliyonları gibi birçok organın infiltrasyon nedeniyle büyümesine yol açabilmektedir. Lösemide her ne kadar yeterinden fazla hücre oluşumu gözlenirse de bu hücreler, olması gerektiği gibi olgunlaşp farklılaşmadığından işlevsel hücre sayısı azalmaktadır. Bu durumu takiben de anemi, trombositopeni, nötropeni gibi hastalıklar gözlenmektedir (68, 139).

1.2.1.1. Akut Lösemiler

Çocukluk çağı lösemilerinin %97'sini oluşturan akut lösemiler, olgunlaşmamış kan hücrelerinin aşırı çoğalması sonucu oluşmaktadır. Dolayısıyla akut lösemilerde, düşük sayıda olgun hücre gözlenirken lökosit öncüllerinin sayısı yüksektir (139).

Akut lösemi hücrelerinin özelliği, farklılaşma yeteneğini kaybetmiş olmalarıdır. Lösemik kök hücrelerin farklılaşmasında meydana gelen bir

engel nedeniyle lösemik blast hücrelerinin olgunlaşma aşaması kısalmaktadır. Transforme kök hücrelerin klonal artışı ve işlevsel son hücreye farklılaşamamaları, lösemik blastların kemik iliğinde birikimine daha sonrasında ise periferik kana geçerek diğer dokulara yayılmasına neden olmaktadır. Ayrıca kemik iliğinde lösemik blast birikimine bağlı olarak, kemik iliğinde normal hücreler de baskılanmaktadır (56, 139).

1.2.1.1.1. Akut Lenfoblastik Lösemi

Çocukluk çağında en çok görülen malinite olan akut lenfoblastik lösemi (ALL), gelişimlerinin erken safhasında duraklayan lenfoid öncül hücrelerinin aşırı çoğalmasıyla karakterizedir. Kemik iliğinde çoğalıp normal hematopoetik hücrelerin yerini alarak normal kan hücrelerinin yapılmasına engel olmaktadır. Genellikle spesifik kromozomal translokasyonlarından ve anormal gen ekspresyonundan dolayı meydana gelmektedir (35, 116, 117). t(9;22), t(4;11), t(1;19), t(12;21) gibi translokasyonlar hastalıkla ilişkilendirilmektedir (127,184)

1.2.1.1.2. Akut Myeloid Lösemi

Akut myeloid lösemi (AML), erişkin yaş grubunda en çok görülen lösemi tipidir. AML' deki malin hücreler; gelişimlerinin erken safhasında duraklayan myeloid öncül hücreleridir (184). Inv(16), t(16;16), t(18;21), t(15;17) gibi kromozomal mutasyonlarla, 3., 5. ve 7. kromozomlarda meydana gelen anomaliler AML ile ilişkilendirilmektedir (8, 184).

1.2.1.2. Kronik Lösemiler

Kronik lösemiler genellikle erişkin yaşlarda gözlenen, olgunlaşmış kemik iliği hücrelerinin artışı sonucu ortaya çıkan hastalıklardır. Aşırı artış gösteren bu hücreler olgun görünüme sahip olmalarına rağmen, normal olgun kan hücrelerinin fonksiyonlarını yerine getiremeyen hücrelerdir (56). Kronik lösemilerde farklılaşma gözlenmektedir. Akut lösemilere göre nispeten yavaş ilerlemektedir (139).

1.2.1.2.1. Kronik Lenfositik Lösemi

Kronik lenfositik lösemi (KLL) genellikle B-lenfosit kökenlidir. Hastalığın klinik seyri evresine göre değişiklik göstermektedir (3). Olgun görünüme sahip B lenfositler kemik iliği, periferik kan ya da lenf düğümünde birirmektedir. Hücrelerde CD19, CD5, CD23 ekspresyonu gerçekleşse de, CD22, FMC7, CD79b, sIgM, IgD ekspresyonu düşüktür (92). CD38 ve ZAP70 ekspresyonları KLL belirteci olarak kabul edilmektedir (49).

Trizomi 12 ve 13q14, 11q22-23 (ATM), 17p13 (p53), 6q21 delesyonları hastalıkta sık rastlanan anomalilerdir (4%11. 3%78).

1.2.1.2.2. Kronik Myeloid Lösemi

Kronik Myeloid Lösemi (KML); kronik granülositik lösemi adıyla da bilinen, moleküler düzeyde en iyi karakterize edilmiş, myeloid hücreleri ile ilişkili lösemi tipidir. Değişime uğramış primitif pluripotent hücre kaynaklı klonal bir hastalıktır. Hastalık Philadelphia (Ph) kromozomu ile ilişkilendirilmiştir ve spesifik bir kromozom anomalisinin saptandığı ilk

hastalıktır (66, 229).

KML, tüm lösemi olgularının %25'ini, erişkinde gözlenen lösemilerin %15 kadarını oluşturmakta ve yıllık olarak 100.000' de 1-2 olgu olarak ortaya çıkmaktadır. Ortalama olgu yaşı 45-55 olarak saptanmıştır. Hastaların %12-30'u 60 yaş veya üzerindedir. Cinsiyet farkı olmamakla beraber erkeklerde biraz daha sık gözlenmektedir. Hastalıktaki genel klinik bulgular; halsizlik, kilo kaybı, abdominal şişkinlik, kanama, purpura, splenomegali, lökositoz, anemi ve trombositozdur (65, 99, 206).

KML, kronik faz, akselere faz ve blastik faz olarak adlandırılan 3 fazlı bir hastalıktır (131). Hastalığa %80 oranında kronik fazda tanı konmaktadır (97).

1.2.1.2.2.1. KML' nin Aşamaları

1.2.1.2.2.1.1. KML' de Kronik Faz

Periferik kanda; miyeloblast oranı %3'den küçüktür. Lökositoz, $20 \times 10^9/L$ ile $500 \times 10^9/L$ arasında değişmekle birlikte, genellikle $130 \times 10^9/L$ ile $225 \times 10^9/L$ arasındadır. Kemik iliğinin perifere çıkmasından ötürü nötrofil seri elemanları ağırlıkta olup, özellikle parçalı, band, metamyelosit ve myelosit egemenliği vardır.

Mutlak bazofili genellikle gözlenmektedir ve buna eozinofili de eşlik edebilmektedir. Mutlak monositoz olmasına karşın, nötrofiller çok yüksek olduğundan relatif monositopeni olarak görülmektedir. Trombositoz da genellikle gözlemlenmektedir. Lökosit alkalin fosfataz skoru 13'den küçüktür (119).

Kemik iliğinde ise; miyeloblast oranı nadiren %5'i geçmektedir. Nötrofil seri myeloid elemanlar baskındır. Hipersellülerdir. Megakaryositler normalden küçük fakat artmış sayıdadırlar (119).

Kronik fazda yapılan sitogenetik ve moleküler bulgularda gözlenen Philadelphia kromozomu tanımı doğrulamaktadır. Hastaların %1'inden azında Ph kromozomu yoktur. Bu Ph kromozomu negatif (-) KML veya atipik KML olarak adlandırılır, daha ağır seyreder (119).

Kronik faz genellikle 2-4 sene sonra akselere veya blastik faza geçer. Blastik faza geçiş ani veya yavaş olabilir. Kronik fazın blastik faza ilerlemesi ilk yıl %5 ve sonraki yıllarda %20- 25'dir. Blastik faza ilerleyen hastaların morfolojik olarak 2/3'ü akut miyeloblastik lösemi ve 1/3'ü akut lenfoblastik lösemidir (119).

1.2.1.2.2.1.2. KML' de Akseler Faz

Bu faz blastik faz öncesinde görülmektedir. Periferik kan veya kemik iliğinde blast oranı %10'dan büyüktür. Bazofil sayısı %20'nin üzerindedir. Blastlarda %30'un altındadır. Sıklıkla hemoglobin düzeyi 7,0 gr/dL'nin altındadır. Trombosit sayısı $100 \times 10^9/L$ altındadır. Devamlı ateş, kemik ağrısı ve kemik iliğinde retikülin artışı ile karakterizedir (119).

1.2.1.2.2.1.3. KML' de Blastik Faz

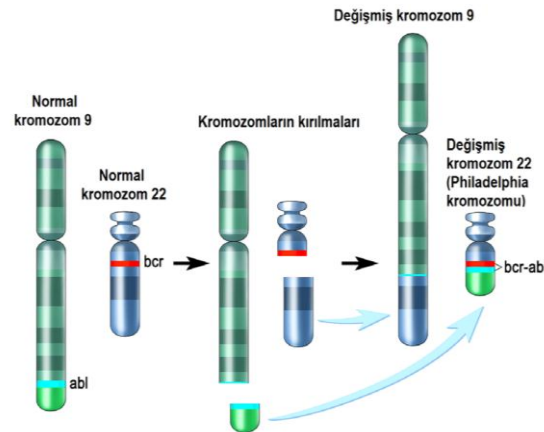
Bu fazda lökosit sayısı tedavi ile zorlukla kontrol altına alınmaktadır. Periferik kan ve kemik iliğinde miyeloblast oranı %30'u, bazofil ve eozinofil oranı %20'yi geçmektedir. Lökosit alkalin fosfataz skoru yükselmektedir.

Anemi ve trombositopeni derinleşmektedir. İkinci Philadelphia kromozomu, trizomi 8, iso(17q), +9 ve Y kromozom kaybı gibi ek kromozomal anomaliler ortaya çıkmaktadır. Bazı hastalarda ani bir fibrotik faz görülebilir, agnojenik myeloid metaplazinin son dönemini andırır. Bu durum ya blast fazına geçişte kısa bir dönemi içerebilir ya da hastalar akut lösemiye dönüşmeksizin kaybedilebilir (119).

1.2.1.2.2.2. KML' de Moleküler Biyoloji

1.2.1.2.2.2.1. Philadelphia Kromozomu

KML $t(9;22)(q34;q11)$ translokasyonu ile karakterizedir. Yani diğer bir deyişle KML hastalarının genelinde 9. ve 22. kromozomların uzun kolları arasındaki dengeli resiprokal translokasyon sonucu oluşan “Philedelphia kromozomu” görülmektedir. Şekil 2’de görüldüğü gibi, 22. kromozom üzerindeki BCR (Breakpoint cluster region) geni ile 9. kromozom üzerindeki tirozin kinaz işlevine sahip Abelson (ABL) proto-onkogeninin birleşmesi BCR-ABL kimerik onkogenini meydana getirmektedir (65, 131, 149,197).



Şekil 2. 9. kromozom ile 22. kromozom arasındaki karşılıklı translokasyon ve Philedelphia kromozomunun oluşumu (115)

1.2.1.2.2.1.1. ABL Proto-Onkogeni

Kromozom 9q34 üzerinde lokalize olan ABL geni 11 ekzon içerir ve 230 kilobaz (kb) uzunluğundadır ve moleküler ağırlığı 145 kilodalton olan reseptör olmayan tirozin kinazı (p145^{ABL}) kodlar. Genellikle ABL genindeki kırılma noktası ekzon 2'nin 5' ucunu içermektedir. BCR geninin 12. ve 16. ekzonları arasındaki major breakpoint cluster region (M-BCR) bölgesine transpoze olur (65, 66).

ABL proteini sinyal iletiminde, hücre büyümesinin düzenlenmesinde ve otofajinin ileri aşamalarının regülasyonunda önemli role sahiptir (2, 6). ABL ekspresyonu hem sitoplazmik hem de nükleer lokalizasyonludur ve sürekli (97, 119).

1.2.1.2.2.1.2. BCR Geni

Kromozom 22q11 de lokalize olan BCR geni, 4,5 kb ve 6,7 kb uzunluğunda iki transkripti olan, 23 ekzon içeren ve 130 kb uzunluğunda olan bir gendir. BCR proteini; 1271 aminoasit uzunluğunda, farklı fonksiyonel domainler içeren kompleks bir sinyal proteinidir. BCR2, BCR3, BCR4 olarak adlandırılan psödogenleri vardır (97, 119).

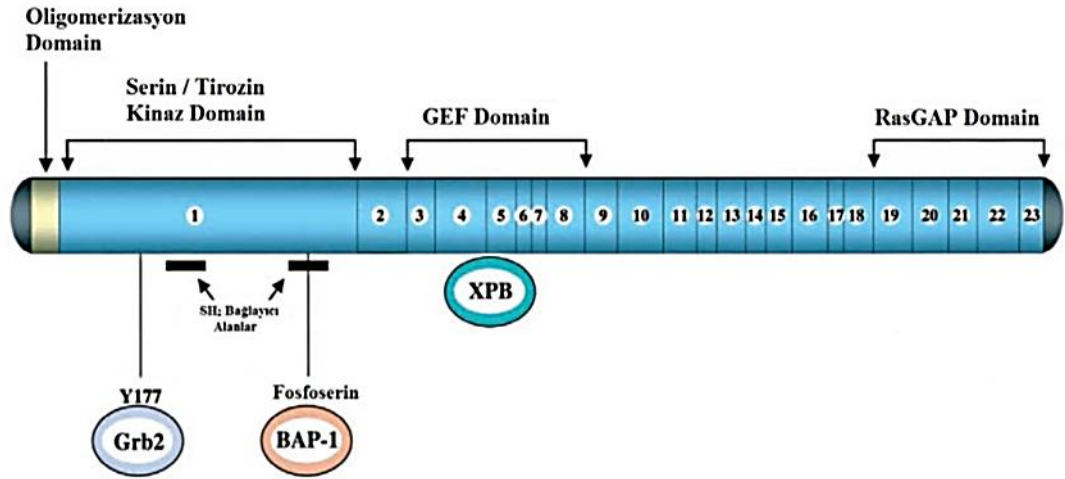
BCR ekspresyonu sürekli ve beyin ve hematopoetik hücrelerde yüksek seviyededir (143).

Fonksiyonel BCR proteini kodlayan BCR geninin birinci ekzonu önemlidir çünkü bu ekzon serin/treonin kinaz domaini, merkezi bir GEF bölgesi, karboksi terminal ucunda GAP bölgesi içerir (Şekil 3). Transloke olan

ABL geninin promotör aktivitesinin regülasyonunu sağlayan bölge, BCR geninin 5' ucundaki 1kb uzunluğundaki proteine dönüşmeyen bölgedir. Transkripsiyon faktörleri BCR geninin akış yukarısındaki -644. ve -718. nükleotit pozisyonlarına bağlanarak transkripsiyon regülasyonunu sağlamaktadırlar (143).

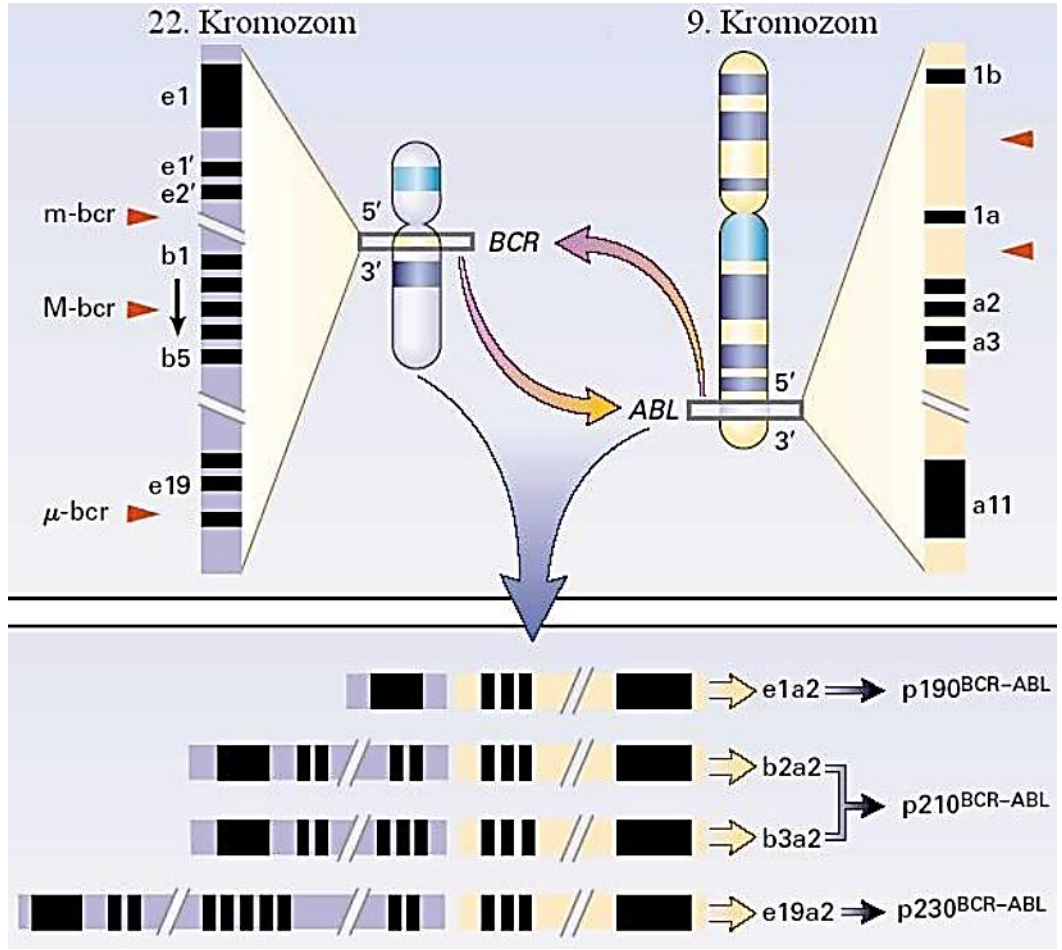
1.2.1.2.2.1.3. BCR-ABL Füzyon Geni ve Proteini

Bu translokasyonda; ABL ekzon 2 ve 11 (a2-a11), BCR geninin ekzon 2 ve 16 (b1-b5) arasındaki kırılma bölgesine yerleşir (Şekil 4). Gen füzyonu sonucu BCR-ABL kimerik geni ve bu genin kodladığı, sırasıyla 190, 210 ve 230 kd olan kimerik proteinler p190 BCR-ABL, p210 BCR-ABL, p230 BCR-ABL proteinleri oluşmaktadır (65).



Şekil 3. BCR proteini ve fonksiyonel bölgeleri (143)

BCR-ABL proteininin oluşumu, hematopoetik hücreleri G fazından S fazına geçmeye stimüle etmektedir (65).



Şekil 4. KML'de t(9;22)(q34;q11) translokasyonu transkripsiyon ürünleri (65)

1.2.1.2.2.2. BCR-ABL Geninin Kontrol Ettiği Malin Transformasyon Mekanizmaları

BCR-ABL proteini, onkogenik sinyal iletiminde görevli proteinlerle etkileşime girerek, apoptozu engelleyip otofajiyi indükleyerek, büyüme faktörlerine bağımlılığı azaltarak, inhibitör proteinleri degrade ederek ve hücrelerin adhezyon özelliklerini kaybetmelerine neden olarak malin transformasyona katkıda bulunmaktadır (6, 54,161).

KML öncül hücreleri β 1-integrinin adhezyon inhibitörü ekprese ederek, kemik iliği stroma hücrelerine ve ekstraselüler matrikse adhezyonu engellemekte ve böylece proliferasyonda artış sağlamaktadırlar (54).

BCR-ABL proteini farklı mitoz sinyal ileti yolları üzerinden malin transformasyonu kontrol etmektedir;

RAS ve MAP Kinaz Yolları

Tirozin 177'nin otofosforilasyonu, adaptör molekül büyüme faktörü reseptör bağlanma proteini (Grb-2) için bağlanma bölgesi oluşturmaktadır. Grb-2 SOS proteinine bağlandıktan sonra, Ras' ı GTP bağlı aktif formunda stabilize etmektedir. Shc ve Crkl de Ras'ı aktive edebilen diğer adaptör molekülüdür. İki molekül de BCR-ABL' nin substratıdır. Ras'ın aktivasyonu Ph(+) lösemilerin patogenezinde önemlidir. Sitokin sitümülasyonu Ras aktivasyonuna ve serin-treonin kinaz Raf' ın hücre membranına göçüne neden olmaktadır. Raf proteini serin-treonin kinaz Mek1/Mek2 ve Erk üzerinden sinyal kaskadı oluşturarak, transkripsiyonunun aktivasyonunu sağlamaktadır. Ayrıca Ras üzerinden gelen sinyal önce GTP-GDP değişim faktörü Ras tarafından Gckr'e (germinal center kinase related), daha sonra Jnk/Sapk' e iletilmekte ve malin transformasyonu etkilemektedir (2).

JAK - STAT Yolu

Normalde JAK, sitokin bağlanmasıyla aktif forma geçmiş reseptör olmayan tirozin kinazlarla ilişki kurarak fosforile olmakta ve STAT proteini aktif formdaki JAK proteinine bağlanarak dimer oluşturmaktadır. Dimer oluşturan STAT proteinleri nukleusa geçip DNA'ya bağlanarak

transkripsiyonu başlatmaktadır (2). KML hücrelerinde ise BCR-ABL, STAT1 ve STAT5 transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu direk olarak sağlayarak, JAK aktivasyonu ve sitokinlerden bağımsız bir şekilde transkripsiyonu başlatabilmektedir (12).

PI-3 Kinaz Yolu

BCR-ABL, Fosfotidilinositol-3 (PI-3) kinaz, Cbl, Crk ve Crkl gibi aktivatör moleküllerle multimerik kompleks oluşturmaktadır. Bu kompleks PI-3 aktivasyonuna neden olmaktadır. Bu kaskaddaki bir diğer önemli serin-tirozin kinaz Akt'dır. Akt Bad proteinini fosforilleyerek inaktif forma geçmesini ve antiapoptotik molekülleri bağlayamamasını sağlamaktadır (12).

MYC Yolu

Birçok kanserde, BCR-ABL Myelositomatoz onkogeni'ne (Myc) bağlanarak aşırı Myc ekspresyonuna neden olmaktadır. Sinyal ras/raf, siklin bağımlı kinazlar (cdck) ve E2F transkripsiyon faktörü üzerinden Myc promotörü aktive etmektedir (54).

1.2.1.2.2.3. Varyant Ph Kromozomları

KML hastalarının % 5 - 10 kadarında varyant Ph kromozomu oluşmaktadır. Bunlar t(V;22) veya t(V;9) şeklinde gösterilmektedir. t(9;22) yanında başka translokasyonların da görüldüğü kompleks varyant translokasyonlar da vardır (117).

1.2.1.2.2.3.1. Ph (-) ve BCR-ABL Füzyon Geni Pozitif KML

Kromozomal değişikliklerin submikroskopik düzeyde olduğu ve konvansiyonel sitogenetik çalışmalarda Ph kromozomun negatif gibi görüldüğü KML hastaları vardır. Bu durum kriptik translokasyon veya maskelenmiş Ph kromozomu olarak adlandırılmaktadır. Bununla birlikte Ph negatif, BCR-ABL pozitif KML olarak adlandırılan durumda, sitogenetik olarak herhangi bir anomali gözlenmemekte ancak moleküler düzeyde KML için karakteristik BCR-ABL füzyon geni tespit edilmektedir (36, 72). BCR-ABL moleküler düzenlemesinin gerçekten olmadığı Ph(-) vakalar farklı bir grupta incelenmekte olup kronik nötrofilik lösemi veya atipik KML olarak adlandırılmaktadırlar (118).

1.2.1.2.2.4. Tirozin kinaz İnhibitörleri

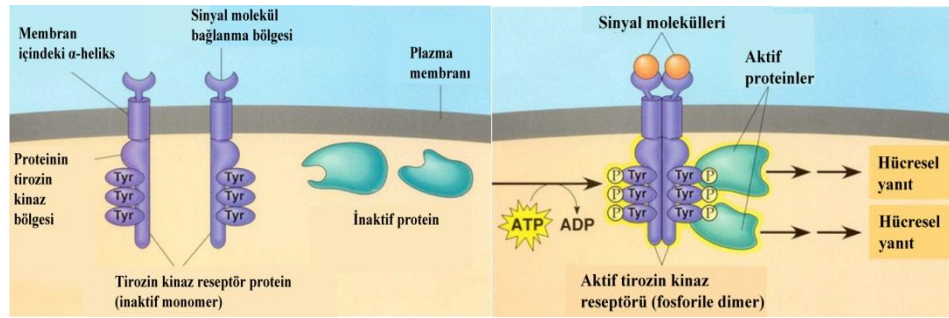
Hücre sel proliferasyon, diferansiyasyon, hücre hareketi ve hücre canlılığı gibi olaylarda önemli rol alan tirozin kinazlar; adenosin trifosfatın (ATP) yapısındaki fosfat grubunun polipeptitlerde bulunan tirozin rezidülerine transferini sağlamaktadırlar (136).

Birçok hastalığın tedavisinde, direkt ya da indirekt yollarla tirozin kinaz inaktivasyonu sağlanması amaçlanmıştır. Direkt inhibisyonda tirozin kinazı inhibe eden küçük moleküllerden yararlanılırken, indirekt yöntemde tirozin kinaz yollarını inhibe eden monoklonal antikorlardan yararlanılmaktadır.

Tirozin kinaz aktivite inhibisyonu ile tedavi ilk olarak, BCR-ABL tirozin kinazını inhibe eden ‘imatinib mesilat’ ın KML tedavisinde kullanılmasıyla gündeme gelmiştir (136).

Tirozin kinazlar bipolar yapıdadırlar. N-terminal lobda ATP ve magnezyum bağlanma bölgesi ve katalitik bölge bulunurken, C-terminal lob aktivasyon halkasına sahiptir (89).

Tirozin kinazlar, reseptör yapıda olan ve reseptör yapıda olmayanlar şeklinde iki farklı tiptedir. Reseptör yapıda olan tirozin kinaz glikoproteinleri, bir adet N-terminal ekstraselüler ligand bağlanma bölgesine, bir adet transmembran bölgesinde sabit olan alfa helikse ve bir adet katalitik bölgeyi içinde bulunduran sitozolik C-terminal yapısına sahiptirler (Şekil 5). Reseptör yapıda olmayan tirozin kinazlarda ise transmembran yapılar yoktur ve hücre içinde çeşitli lokalizasyonlarda bulunabilmektedirler (136, 267).



Şekil 5. İnaktif ve aktif tirozin kinaz (113)

Reseptör yapıdaki tirozin kinazların ekstraselüler bölgesine ligand bağlanarak aktivasyona neden olmakta ve kinaz aktivasyon bölgesindeki regülatör tirozinin otofosforilasyonu sağlanmaktadır. Aktive olmuş reseptör yapıdaki tirozin kinaz sinyal proteinlerini hücre membranına toplayarak çoklu sinyal yollarını aktive etmektedir (208).

Reseptör yapıda olmayan tirozin kinazlar hücresel inhibitör proteinler ve lipidler aracılığıyla ya da intramoleküler otoinhibisyonla inaktif olarak

tutulmaktadırlar (239). Aktif forma geçmeleri ya transmembran reseptörlere bağlanarak oligomerizasyon ve otofosforilasyon ile ya da diğer kinazlar tarafından transfosforilasyon ile gerçekleşmektedir.

Kanserlerde tirozin kinazları kodlayan genlerin translokasyonu sonucu oluşan füzyon protein, ligand bağlanması ve aktivasyon sinyali olmayan durumlarda da tirozin kinazların otofosforilasyonuna neden olmakta ve tirozin kinaz aktivasyonu oluşturmaktadır. KML' de bulunan reseptör yapıda olmayan tirozin kinaz olan BCR-ABL bu yapıya örnektir. BCR içinde bulunan bir oligotetramerizasyon bölgesi, oligomerizasyon ve otofosforilasyon oluşumunu sağlayarak ABL otoinhibisyonunu ortadan kaldırmaktadır (221).

Tirozin kinazların farmakolojik olarak inhibisyonu, tirozin kinaz dimerizasyon blokajı ile, antikorlar yardımıyla tirozin kinaz sinyalizasyonunun engellenmesi ile ve ısı şok proteinlerinin bağlanması sonucu tirozin kinazların stabilizasyon regülasyonu ile sağlanabilmektedir. Ancak asıl ön plana çıkan inhibisyon mekanizması; küçük moleküllerin ATP veya substratların bağlanma bölgesine müdahale etmesidir. Bu inhibitörlerin bazıları 'suisid substratları' olarak görev yaparak enzimin geri dönüşümsüz olarak inaktivasyonuna yol açarlar (140).

Tirozin kinaz inhibitörleri (TKİ), tirozin kinazın katalitik bağlanma bölgesine yarışmalı ATP inhibisyonu ile bağlanarak etki göstermektedirler (96).

TKİ'leri, reseptör tirozin kinaz ve onun ligandlarına karşı geliştirilmiş 'humanize edilmiş antikor TKİ (AbTKİ)'ler ve 'küçük molekül TKİ (KMTKİ)'ler

olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. AbTKİ'ler kanser hücresinin ekstraselüler yerleşimli büyüme faktörü reseptörlerini hedef almaktadırlar. Spesifik antijenlere bağlanmaları, antikorların reseptöre bağlanmasını engellemektedir. KMTKİ'ler ise hem reseptör hem de reseptör yapıda olmayan tirozin kinazları, kinaz bölgesinin ve sinyal kaskadındaki substratın fosforilasyonunu engelleyip, intraselüler kinaz bölgesinin aktivitesini bloke ederek inhibe etmektedirler.

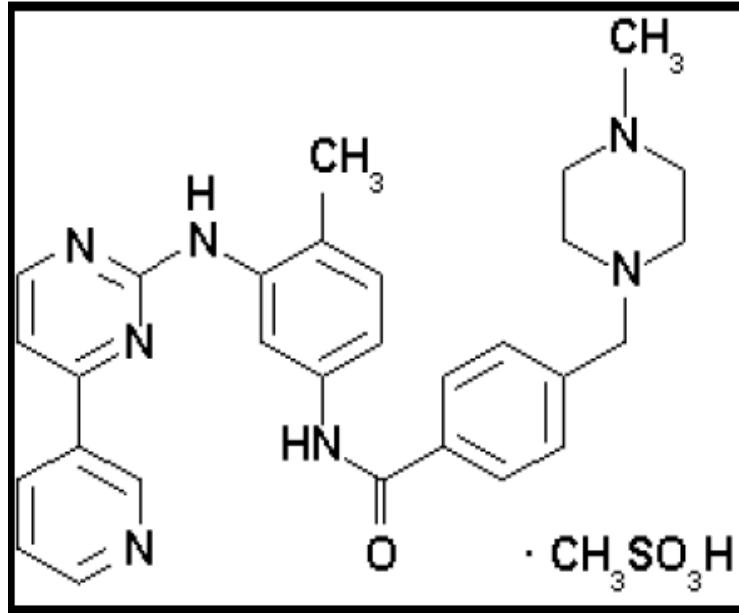
KMTKİ'ler substrat fosforilasyonunu 3 temel mekanizma ile bloke etmektedirler. Tip 1 inhibitörler, aktif olan kinazın ATP cebine bağlanmak için ATP ile yarışır ve seçicilikleri düşüktür. İmatinibin de içinde bulunduğu grup olan tip 2 inhibitörler tip 1'e göre daha seçicidirler ve ATP cebi ve sadece kinaz inaktif olduğunda bulunan komşu kısım olmak üzere kinaz üzerindeki iki ayrı bölgeye bağlanmaktadır. Üretilmeleri oldukça zor olan tip 3 inhibitörler ise, substrat tanıma bölgesi gibi ATP cebinden uzak bir bölgeye bağlanmaktadır, seçiciliği en yüksek olan gruptur (37).

1.2.1.2.2.2.4.1. İmatinib

İmatinib mesilat (IM; Gleevec, Glivec, STI571); 2-fenilaminopirimidin türevi olarak üretilmiş küçük moleküllü kinaz inhibitörüdür (Şekil 6). Tirozin kinaz aktivitesindeki bozuklukların insan kanser patojenezinde merkezi rol oynadıklarının gösterilmesiyle imatinib (Glivec, STI571, Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland) kronik myeloid lösemide Bcl-Abl protein tirozin kinazı spesifik olarak inhibe etmek için geliştirilmiştir (24, 95,128).

1.2.1.2.2.4.1.1. Imatinibin Farmakolojisi

Imatinibin moleküler formülü $C_{30}H_{35}N_7O_4S$, moleküler ağırlığı ise 589.7084 g/mol' dür. Üç hidrojen verici, 10 hidrojen alıcıdır. IUPAC adı; 4-[(4-Metil-1piperazinil)metil]-[4-metil-3-[[4-(3-piridinil)-2 pirimidinil]amino]- fenil] benzamid metansulfonat]) (111).



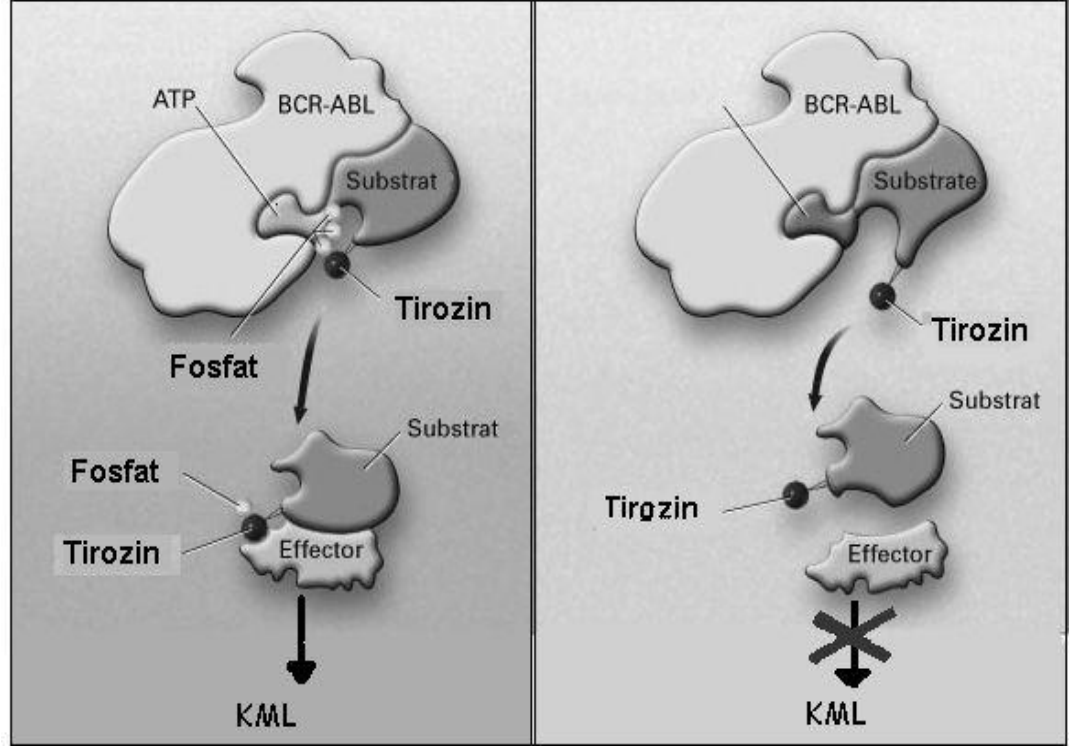
Şekil 6. Imatinibin 2 boyutlu yapısı (61)

1.2.1.2.2.4.1.2. Imatinib' in Yarattığı İnhibitör Etkinin Temelleri

Imatinib, platelet-derived growth factor (PDGF) reseptörünü hedef alan, Ph(+) KML'li hastaların füzyon ürünlerini ve gastrointestinal stromal tümörlerde artmış ekspresyonu olan c-Kit (CD117)'i inhibe eden bir tirozin kinaz inhibitörüdür (205).

PDGF reseptörünün veya c-Kit'in spesifik inhibitörü olarak geliştirilen imatinib aynı zamanda tüm ABL tirozin kinazların güçlü ve kısmi olarak seçici

inhibitörüdür. İmatinib substratın BCR-ABL bağımlı fosforilasyonunu bozmaktadır. İmatinib epidermal growth faktör reseptörü, FLT1 ve FLT3 gibi tirozin kinazları etkilemez, imatinib ile inhibisyonu sağlanan tek tirozin kinaz c-Kit' tir (100).



Şekil 7. Imatinibin etki mekanizması (19)

Imatinib, ABL kinaz bölgesindeki aminoasitlere bağlanarak ATP bağlanmasını bloke etmekte, BCR-ABL otofosforilasyonunun ve substrat fosforilasyonunun inhibisyonunu gerçekleştirmektedir. Böylece hücrelerin proliferasyonunu ve BCR-ABL onkoproteininin etkilerini engellemektedir (Şekil 7) (22, 74, 244).

Imatinib yalnızca inaktif formdaki tirozin kinaza bağlanabilmektedir. Kinaz molekülünün merkezindeki aktivasyon halkası fosforillendikten sonra aktivasyon halkası genişlemekte ve bilinen tüm kinazlarda benzer olan aktif forma geçmektedir. Imatinibin spesifitesini sağlayan, inaktif formun protein

kinazlar içerisinde büyük değişiklik göstermesidir (87).

p210 onkoproteinin ATP bağlanan bölgesindeki aminoasitlere, ancak kinazın aktivasyon ilmek yapısı kapalı olduğunda spesifik olarak bağlanabilmektedir. Imatinibin tirozin kinaza konformasyonal spesifik bağlanması imatinibin seçiciliğini arttırmaktadır (207). Imatinib bağlanmasıyla, ABL' nin fosfat bağlayan ilmek yapısının pürüzsüz şekli bozulur. Böylece proteinin ATP bağlayamayan inaktif konformasyonda kalmasını sağlar. Böylece tirozin otofosforilasyonu engellenir ve dolayısıyla substrat fosforilasyonu gerçekleşmez, lökomogenezi başlatan sinyal yollarının kapanması sağlanır (57, 167).

Imatinib, erken kronik faz hastalarda yaklaşık % 100 hematolojik yanıt ve % 87 sitogenetik yanıt, blastik kriz safhasındaki hastalarda ise % 8 hematolojik yanıt ve %16 sitogenetik yanıt indüklediği rapor edilmiştir (14).

1.2.1.2.2.2.4.1.3. Imatinib Direnci

Imatinib kullanımında gözlenen en önemli sorun birincil dirençtir. Birincil direnç 3. ayda tam hematolojik yanıt (THY) ve 6. ayda majör sitogenetik yanıt (MSY) veya 12. ayda tam sitogenetik yanıt (TSY) elde edilememesi olarak tanımlanmaktadır. Birincil direnç doz bağımlı olup, dozun arttırılmasıyla giderilebilmektedir (249). Kazanılmış direnç ise elde edilen hematolojik, sitogenetik veya moleküler yanıtın kaybolmasıdır (147). Imatinib ile elde edilen yüksek hematolojik ve sitogenetik yanıtı rağmen, Ph(+) lösemili hastalarda zamanla gelişen bu ikincil direnç büyük bir problem oluşturmaktadır (75).

İmatinib direnç gelişiminde etkili mekanizmalar;

- BCR-ABL geninde, imatinib bağlantı bölgesi, ATP bağlanma bölgesi, aktivasyon bölgesi, katalitik cep bölgesi olmak üzere 4 farklı bölgede meydana gelen mutasyonların tirozin kinaz aktivasyonuna neden olması,

İmatinib direnci olan KML hastalarında en az 50 tanımlanmış nokta mutasyonu vardır (Tablo 1.)(21). Nokta mutasyonlarının sıklığı sırasıyla: T315I %15, Y253H %5, E255K %15, F317L %3 olarak bildirilmektedir (213).

Tablo 1. BCR-ABL mutasyonları (236)

Abl tip 1a	Abl tip 1b	Bcr-Abl'de yerleşim
M244V	M263V	p-loop
L248V	L267R	p-loop
G250E	G269E	p-loop
Q252H	Q271H	p-loop
Q252R	Q271R	p-loop
Y253H	Y272H	p-loop
Y253F	Y272F	p-loop
E255K	E274K	p-loop
E255V	E274V	p-loop
S417Y	S4436Y	c-terminal lob
E459K	E478K	c-terminal lob
F486S	F505S	c-terminal lob
V289A	V308A	aktif bölge
F311T	F330T	aktif bölge
T315I	T334I	aktif bölge
F317L	F336L	aktif bölge
M351T	M370T	SH2 temas
F359V	F378V	aktif bölge
F382L	V398I	aktivasyon loop
L387M	L406M	aktivasyon loop

- Yüksek imatinib dozlarında, BCR-ABL gen amplifikasyonları sonucu BCR-ABL proteininde artış,

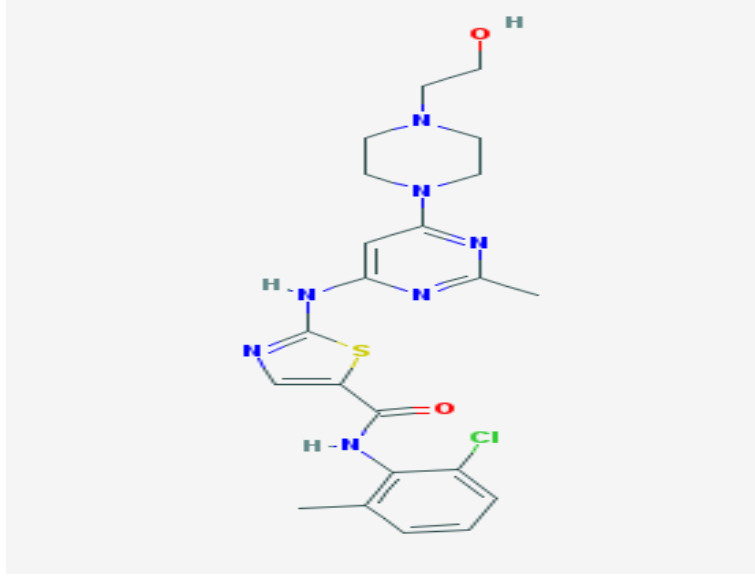
- BCR-ABL bağımsız kinaz yollarının, özellikle SRC-kinaz, aktivasyonunun tirozin kinazlara olan bağımlılığının azalması,
- Imatinibin asit α -1-glikoproteine bağlanması plazmadaki imatinib düzeyini düşürerek etkiyi azaltması,
- Imatinib glikoprotein P-170 substratıdır. Glikoprotein P-170' in fazla eksprese olduğu hücrelerde düşük imatinib oranı,
- Lösemi kök hücreleri kaynaklı klonal değişim ve sekonder mutasyonlar (57).

1.2.1.2.2.4.2. Dasatinib

Dasatinib (BMS-354825, Sprycel, Bristol-Myers Squibb); imatinib uygulamasının KML hastalarının tedavisinde etkisiz kaldığı durumlarda kullanılan ikinci jenerasyon tirozin kinaz inhibitörüdür (152).

1.2.1.2.2.4.2.1. Dasatinib' in Farmakolojisi

Dasatinibin moleküler formülü $C_{22}H_{26}ClN_7O_2S$, moleküler ağırlığı ise 488.00554 g/mol' dür. Üç hidrojen verici, 9 hidrojen alıcıdır (Şekil 8). IUPAC adı; N-(2-kloro-6-metilfenil)-2-[[6-[4-(2-hidroksietil)piperazin-1-yl]-2-metilpirimidin-4-yl]amino]-1,3-tiyazol-5-karboksamid (110).



Şekil 8. Dasatinibin 2 boyutlu yapısı (109)

1.2.1.2.2.4.2.2. Dasatinib' in Yarattığı İnhibitör Etkinin Temelleri

Dasatinib, in vitro ortamda mutasyona uğramamış BCR-ABL kinazı imatinibe göre 325 kez daha fazla inhibe etmektedir (152). BCR-ABL, Src, c-KIT, efrin ve platelet kaynaklı büyüme faktör reseptörü dahil olmak üzere çok hedefli bir kinaz inhibitörüdür (230). Imatinibden farklı olarak ABL kinaza hem aktif hem de inaktif konformasyondayken bağlanabilmektedir. Imatinibden daha az katı bağlanma koşullarına sahiptir (47, 263).

Dasatinib' in BCR-ABL kinaz mutasyonlarından, Src ailesi kinazlarını tutan alternatif sinyal yollarının aktivasyonundan ve çoklu ilaç direnç (MDR) geninin aşırı ekspresyonundan kaynaklanan imatinib direncini yenebileceği gösterilmiştir (250).

Dasatinib, imatinib tedavisine cevap vermeyen hastaların yaklaşık %50' sinde tam sitogenetik yanıt oluşturmaktadır (152).

Dasatinib ATP bölgesine iki kısmıyla bağlanır. Aminotiazol kısmı ATP' nin bağlanacağı bölgeyi işgal eder. 2-kloro-6-metil fenil halkası tiazol karboksami grubuna diktir ve T315 yanındaki, ATP ile işgal edilmemiş genellikle hidrofobik cebe derinlemesine yerleşir. Piperazin grubu destek bölgesinin görünür yüzeyine işaret eder. ABL ve dasatinib arasında 3 belirgin hidrojen bağı bulunur. Bir çift Hidrojen bağı ATP bağlanma bölgesinin destek alanında oluşur. Bunlardan bir tanesi asatinibin aminotiazol halkasının 3-nitrojen' i ile M318' in amid nitrojen arasında, diğeri dasatinibin 2-amino hidrojen M318'in karbonil oksijeni arasında oluşur. Üçüncüsü ise 315T yan zincirindeki hidroksil oksijen ile dasatinibin amid nitrojeni arasında oluşur. Dasatinib ayrıca destek bölgenin temeliyle 2 tane heteroaromatik CH___O=C etkileşimi kurmada da görev alır. Diğer ilişkiler temel olarak van der Waals etkileşimleriyle kurulmaktadır (152).

1.2.1.2.2.2.4.2.3. Dasatinib Direnci

Hücre hattı modellerinde düşük konsantrasyondaki dasatinib, imatinib dirençli kinaz bölgesindeki 19 mutasyondan 18' inde, tirozin kinaz inhibisyonunu sağlayabilmektedir (214). İnhibisyonun gerçekleşmesini engelleyen tek mutasyon, ABL tirozin kinaz ATP-bağlanma cebindeki T315I mutasyonudur. Bu mutasyon imatinibe ve dasatinibe karşı direnç oluşuma neden olmaktadır (174).

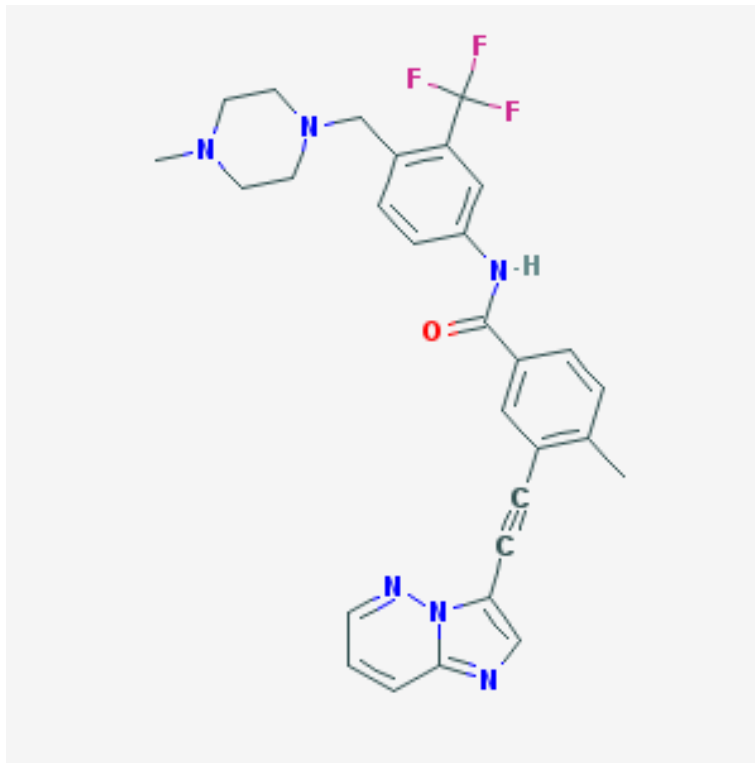
1.2.1.2.2.2.4.3. Ponatinib

Ponatinib (AP24534); birinci ve ikinci jenerasyon tirozin kinaz inhibitörlerinin KML hastalarının tedavisinde etkisiz kalmasından dolayı

geliştirilen üçüncü jenerasyon tirozin kinaz inhibitörüdür.

1.2.1.2.2.4.3.1. Ponatinib' in Farmakolojisi

Ponatinibin moleküler formülü $C_{29}H_{27}F_3N_6O$, moleküler ağırlığı ise 532.55949 g/mol' dür. Bir hidrojen verici, 8 hidrojen alıcıdır (Şekil 9). IUPAC adı; 3-(2-imidazo[1,2-b]piridazin-3-iletinil)-4-metil-N-[4-[(4metilpiperazin-1-il)metil]-3-(triflorometil)fenil]benzamid (108).



Şekil 9. Ponatinibin 2 boyutlu yapısı (107)

1.2.1.2.2.4.3.2. Ponatinib' in Yarattığı İnhibitör Etkinin Temelleri

Birinci ve ikinci jenerasyon ilaçların, lösemi kök hücrelerini imha edememeleri ve T315I mutasyonuna karşı yetersiz kalması üçüncü jenerasyon ilaçların geliştirilmesini gerekli kılmıştır. Ponatinib hala faz çalışmaları sürmekte olan bir ilaçtır.

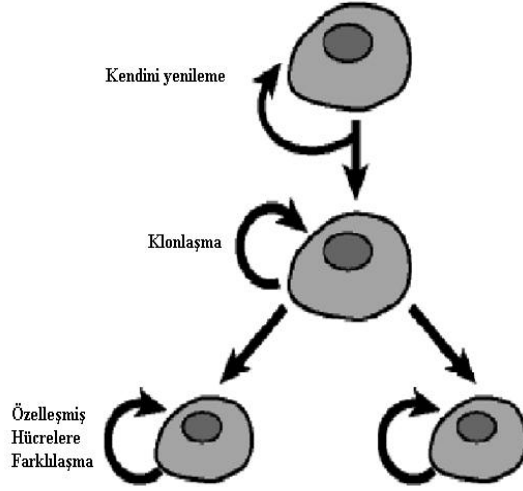
Ponatinib; imatinib, dasatinib ve nilotinibin aksine T315 ile hidrojen bağı kurmaya ihtiyaç duymayan bir iskele şeklinde geliştirilmiştir. Böylece T315I mutasyonundaki izolösin rezidüsünün yan zincirine uyum sağlayabilmektedir. Ponatinibin bu yapısal engellemeye adapte olmasını uzun ve esnek etinil trikarbon bağlayıcısı sağlamaktadır.

Ponatinib, imatinibin de olduğu gibi, ancak inaktif konformasyondaki tirozin kinaza bağlanabilmektedir. Bu bağlanma 5 farklı aminoasit rezidüsü ile Hidrojen bağı kurarak gerçekleşmektedir. Imatinibden farklı olarak ponatinib I315 rezidüsüne, yalnızca etinil zinciri sayesinde oluşan van der waals etkileşimi ile bağlanmaktadır. Hem yabanıl tip hem T315I mutant ABL1 otofosforilasyonunu inhibe etmektedir. Ponatinib SRC ailesi kinazları, KIT, VEGFR2, PDGFR α , FGFR1 gibi kinazlarda da aktivite gösterebilmektedir. Ponatinib, hem yabanıl tip hem T315I mutant BCR-ABL ekspresyonu olan BaF3 hücrelerinde ve KML hastalarından alınan hücrelerde büyümeyi baskılar ve apoptoza yönlendirir (178).

1.2.2. KÖK HÜCRE

Primitif hücreler olan kök hücreleri diğer hücrelerden ayıran en önemli fark, kendi kendilerini yenileyebilme, farklılaşabilme ve klonal olma özelliklerinin hepsine birden sahip olmalarıdır (Şekil 10). Bu özellikleri sayesinde kök hücreler hem sayıları sabit tutmakta hem de gerektiğinde farklılaşarak, farklılaşmış hücrelerin çoğalmasını sağlayabilmektedirler.

Özel bir işlev görmek için farklılaşmış pek çok vücut hücresinin aksine kök hücreler uygun uyarı alana kadar farklılaşmadan kalabilmektedir.



Şekil 10. Kök hücrelerin genel özellikleri (183)

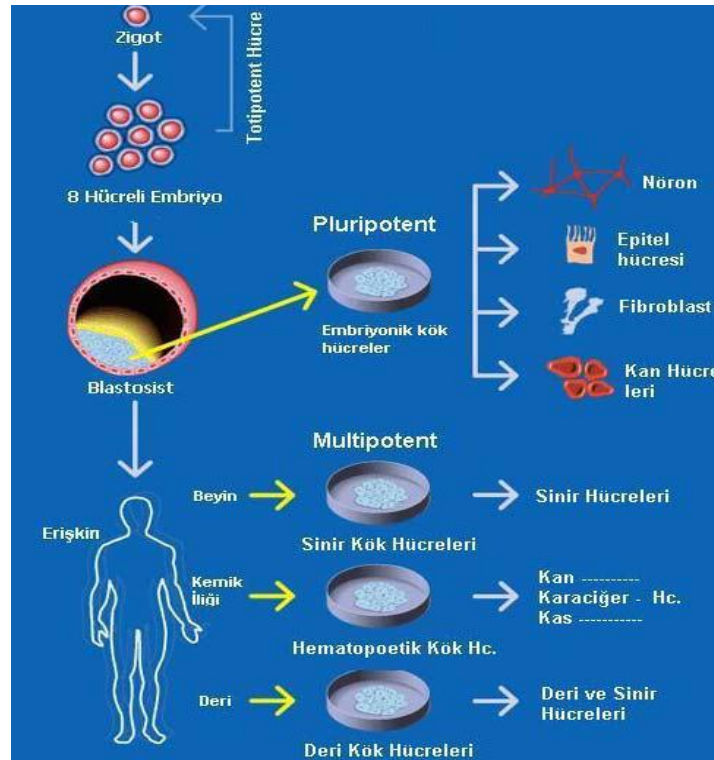
Kök hücreler gösterdikleri farklılaşma potansiyellerine göre totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent kök hücreler olarak sınıflandırılmaktadırlar (153).

Totipotent kök hücre: Sınırsız farklılaşmaya yeteneğini vurgulan, *totus*: tam, bölünmemiş ve *potentia*: güç, potansiyel anlamına gelen kelimelerden türemiştir. Embriyonik dönemde zigottan, 4-8 hücreli blastomer aşamasına kadar oluşan bütün hücreler totipotenttir ve uygun koşullarda yeni canlıyı ve göbek kordonu, amniyon kesesi, plasenta gibi yapıları oluşturabilmektedirler (177, 215).

Pluripotent kök hücre: Blastosist evresindeki embriyodaki hücreler ve fetüsdeki gonad kökenli hücreler pluripotent özelliktedirler. Bu hücreler 200'e yakın endodermik, mezodermik ve ekzodermik hücreye *in vivo* ya da *in vitro* koşullarda farklılaşabilmektedir. Ancak totipotent hücreler gibi ekstraembriyonik tabakaları oluşturamadıklarından dolayı tek başlarına yeni bir canlıyı oluşturamamaktadırlar (23, 166, 201, 232).

Multipotent kök hücreler: Somatik ya da erişkin kök hücresi olarak tanımlanan bu hücreler biraz daha özelleşmiş görevlere sahiptirler. Sadece kendi kökeninde bulunan özelleşmiş hücrelere farklılaşabilmektedirler. Kemik iliğinde bulunan hematopoetik kök hücresi, kırmızı ve beyaz kan hücreleri, trombositler gibi pek çok farklı kan hücresine kaynaklık etmektedir (Şekil 11). (13, 153, 210, 218, 232)

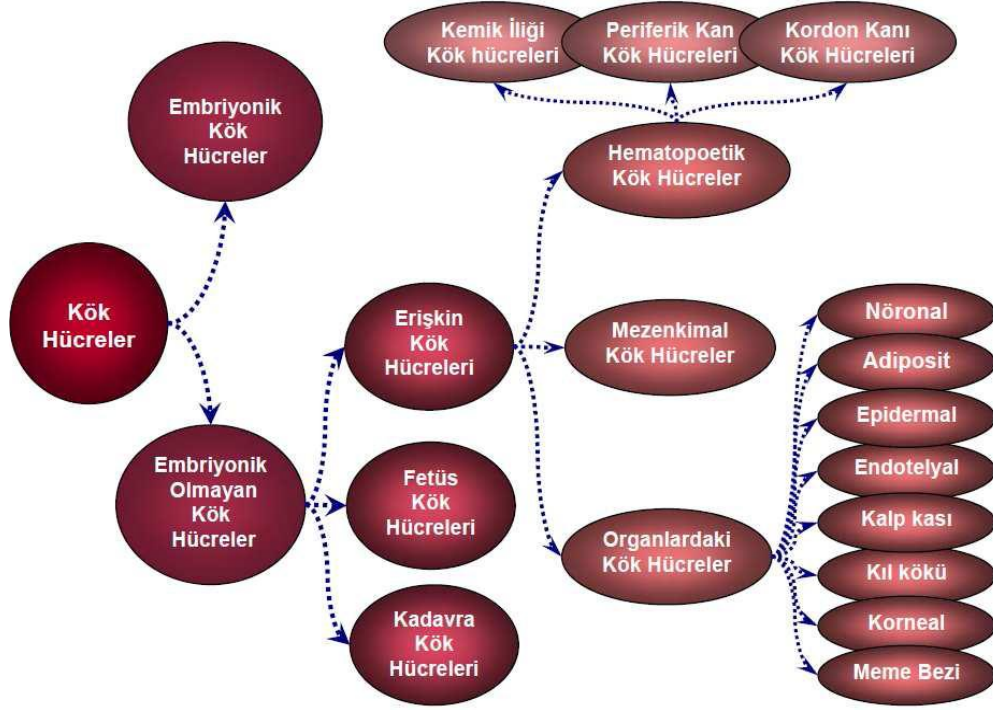
Unipotent kök hücreler: Korneal kök hücreler gibi sadece bir çeşit hücre grubuna farklılaşabilen hücrelerdir ve “*progenitor hücre*” veya “*prekürsör hücreler*” şeklinde tanımlanmaktadır. Doku yenilenmesinde de rol almaktadırlar (51, 262).



Şekil 11. Farklılaşma potansiyellerine göre kök hücreler (177)

Kök hücreler elde edildiği kaynaklara göre ise, embriyonik ve embriyonik olmayan kök hücreler (nonembriyonik) olarak

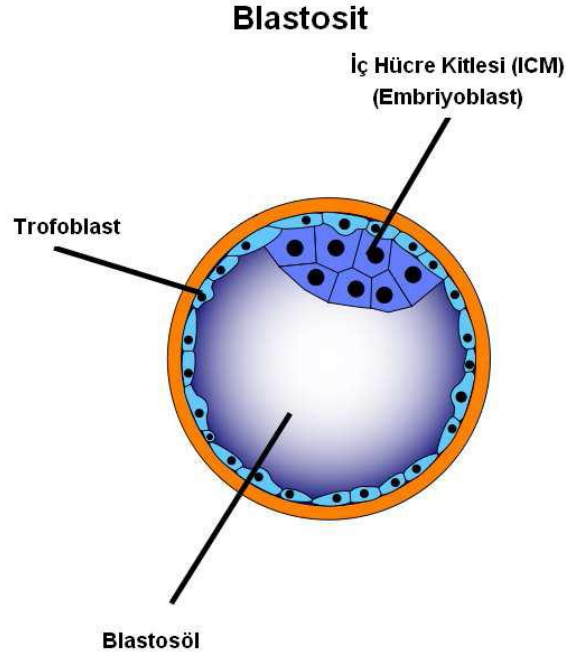
adlandırılmaktadırlar (Şekil 12). Erişkin kök hücreleri kolay kültüre edilmelerinden ve çok çeşitli hücrele hatlarına farklılaşabilmelerinde ötürü en çok çalışılan kök hücre kaynaklarıdır (183).



Şekil 12. Elde edikleri kaynaklara göre kök hücreler (183)

1.2.2.1. Embriyonik Kök Hücre

İnsan embriyonik kök hücrelerinin elde edildiği embriyolar, 4-5 günlük blastosist adı verilen 3 katmanlı hücrelerdir; Trofoblast blastosisti kaplayan katmandır. Blastosistin içinde bulunan boşluk olan blastosöl ve onun bir ucunda bulunan ve embriyonik kök hücrelerin elde edildiği iç hücre kitlesi (Şekil 13) (243). Özel kültür koşulları altında çoğaltılarak elde edilen insan blastosist kökenli pluripotent kök hücre hatları, normal karyotipe, spesifik yüzey antijenlerine ve yüksek telomeraz aktivitesine sahiptir (232).



Şekil 13. Blastosist (243).

Embriyonik kök hücrelerin pluripotentliğinin kültür ortamında da sürdürülmesi, gerekli maddeler eklenmiş medyum bulunan ortamda, farklılaşmış hücrelerden oluşan bir besin katmanı üzerinde kültüre edilmeleriyle sağlanmaktadır. Bu dış faktörler, Oct4, Nanog, Sox2 transkripsiyon faktörleriyle de ilişkili hücre içi transkripsiyon ağının sürdürülmesini sağlayarak pluripotentliği korumaktadırlar. Bu üç transkripsiyon faktörü kök hücrelerin farklılaşmama özelliğinin sağlanması ve sürdürülmesi için gereklidir (1, 124, 203, 225)

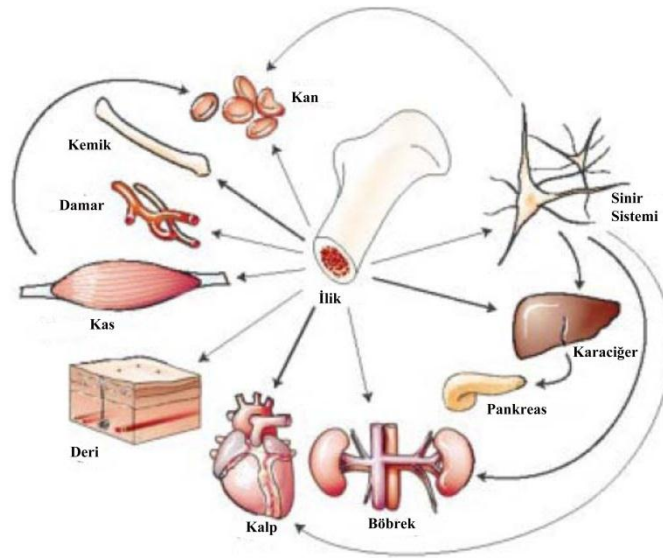
1.2.2.2. Embriyonik Olmayan Kök Hücre

Embriyonik olmayan kök hücreler erişkin kök hücreleri, fetüs kök hücreleri ve kadavra kök hücreleri olmak üzere üç ana başlık altında

toplanabilmektedir (183).

1.2.2.2.1. Erişkin Kök Hücre

Erişkin kök hücreler, embriyonik kök hücrelere göre daha az hücre tipine farklılaşabilen, farklılaşmış dokularda bulunan farklılaşmamış hücrelerdir. Erişkin kök hücreler genellikle bölünerek progenitör ya da prekürsör hücreleri oluşturmaktadır. Hasar gören dokuların tamirinde görevli hücreleri ve ölen hücrelerin yerine geçecek hücrelere farklılaşmaktadırlar. Örneğin kemik iliği hücreleri, kan ve immün sistem hücrelerinin yanı sıra beyin, iskelet, kas, karaciğer, böbrek gibi diğer doku hücrelerine de farklılaşabilmektedir (104, 141) (Şekil 14).

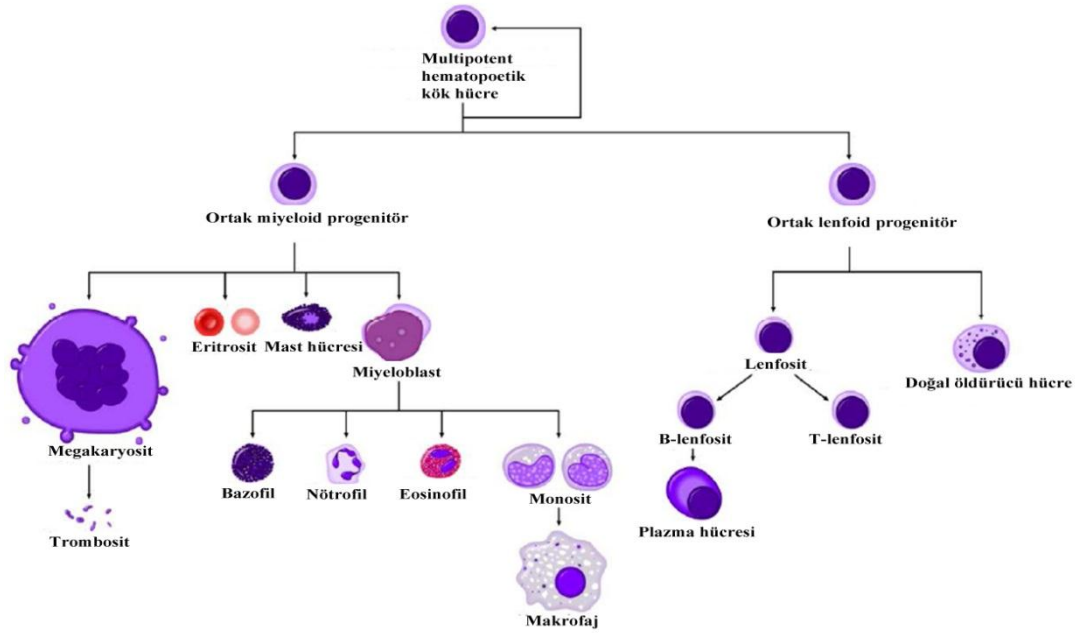


Şekil 14. Kemik iliği kökenli kök hücrelerin değişik hücre türlerine dönüşümü (193)

Erişkin kök hücreler; hematopoetik kök hücreler, mezenkimal kök hücreler ve organlardaki kök hücreler olarak 3 alt gruba ayrılmaktadır (183).

1.2.2.2.1.1. Hematopoetik Kök Hücre

Genellikle kök hücre çalışmaları, kemik iliği, kordon kanı, periferik kan ve plasenta olmak üzere 4 farklı kaynaktan elde edilen hematopoetik kök hücreler ile yapıldığından, en iyi tanımlanan erişkin kök hücrelerdir. Kendini yenileme ve bütün kan hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip farklılaşmamış, multipotent, primitif hücrelerdir (228). Eritrositler, granülositler, monositler, trombositler gibi olgun periferik kan hücreleri, kemik iliğindeki progenitör hücrelerden farklılaşmaktadır (Şekil 15) (4).



Şekil 15. Hematopoetik kök hücreden farklılaşan hücreler (183)

Dokudaki toplam hücrelerin yaklaşık % 0,005' ini oluşturan hematopoetik kök hücrelerin büyük çoğunluğu kemik iliğinde bulunmaktadır (217, 226, 247).

Hematopoetik kök hücrenin özelliklerini ve kemik iliğinde varlığının ilk

bulgusunu fare modellerinde 1963 yılında Till ve McCulloch tarafından tanımlandı (220). Daha sonra yapılan çalışmalarda hematopoetik kök hücrenin kendini yenileyebilme yeteneğinin keşfi ile kök hücre araştırmalarının başlangıcını oluşturmuştur.

CD34 yüzey antijeni kök hücreler için ayırtedicidir. Hematopoetik kök hücreler için diğer indikatif yüzey reseptörü, nöral ve iskelet kası dokularında da eksprese edilen CD133' dür (231). İnsanlarda hematopoetik kök hücre lin^- ve $CD34^+CD38^-$ hücre alt grubunda yoğunlaşmaktadır (45).

Kök hücrelerle progenitör hücreleri birbirinden ayıran tek özellik, kök hücreler bölünüp ayrı yeni kök hücre ve olgun kan hücresine farklılaşabilme kapasitesine sahip ayrı yavru hücre oluşturma yeteneğine sahip olmasıdır. Yavru hücreler daha farklılaşmışlardır ve her hücre bölünmesiyle proliferasyon kapasitelerini kaybetmektedirler (43).

Göbek bağından izole edilen $CD45^+/Lin^-$ hematopoetik kök hücreler, FGF-4, SCF, Flt3 ilaveli medyumda kültüre edildiğinde Oct-4 ve Nanog ekspresyonunu düzenlenmekte ve mezenkimal hücrelere, nöral oligodendrositlere farklılaşabilmektedir (199).

Hematopoetik kök hücreler ve öncü hücrelerin çoğu G_0 fazında olmakla birlikte, çoğalma ve yapım sürecini devam ettirmektedirler. Normal süreçte olgun ve progenitör hücrelerdeki apoptoz oranı denge halindeyken kanama, enfeksiyon gibi kan hücrelerine ihtiyaç durumunda kemik iliğinde depolanmış kan hücreleri kullanılmakta ve durgun hematopoetik kök hücreler büyüme faktörleri ile uyarılarak olgun kan hücrelerine farklılaşmaktadır. Kan ihtiyaç

durumu normale döndüğünde antiapoptotik ve proliferatif süreç yavaşlayarak hematopoez kinetiği de normale dönmektedir.

1.2.2.3. Kanser Kök Hücresi

Yaklaşık 150 yıl önce Rudolph Virchow ve Julius Cohnheim (44, 242) gibi patologlar kanserin uykudaki embriyonik doku kalıntılarının aktivasyonundan kaynaklanabileceği yorumu yaparak “Kanser-kök hücre hipotezi” ini ilk defa ileri sürmüşlerdir.

Günümüzdeki bulgular, kanserin yoğun genetik mutasyonlar sonucunda malin transformasyona uğrayan tek bir hücreden kaynaklandığını göstermektedir (86). Kanser kök hücreleri büyümeyi düzenleyen mekanizmalardan bağımsız çoğalabilme yeteğindedirler (95).

“Kanser kök hücre” kendini yenileme yeteneğine sahip bir kanser hücresi olarak tanımlanan bir deyimdir (5). Kanser kök hücreleri, ilk olarak hematolojik malinitelerde kanıtlanmıştır. Hücre ayırma, doku kültürü, transjenik hayvan ve fare ksenograft tekniklerindeki gelişmeler sayesinde kanser başlatıcı hücrelerin identifikasyonu, izolasyonu ve fonksiyonel analizleri yapılmıştır.

Organizmadaki en uzun süre yaşayan hücreler olan kök hücrelerin tümörojenik hale gelmek için gerekli mutasyonları biriktirmeleri olasıdır. Normal kök hücreler ile kanser kök hücreleri kendini yenileyebilme ve farklılaşabilme gibi ortak özellikler taşımasına rağmen kanser kök hücreleri bozulmuş proliferasyon ve yayılma yetenekleri bakımından ise farklılıklar göstermektedir (10).

Migrasyona uğrayan kanser kök hücreleri tümör gelişimindeki kaskadda rol oynayan hormonlar, büyüme faktörleri, sitokinler ve integrinlerden etkilenmektedir. Onkojenik sinyal yollarını aktive ederek farklı bölgelerde tümör oluşumuna neden olmaktadır. Tedavi olarak kanser kök hücrelerin hedef alınması, çoğu lokal ve metastatik kanserin gelişimi açısından önemli olabilir (120).

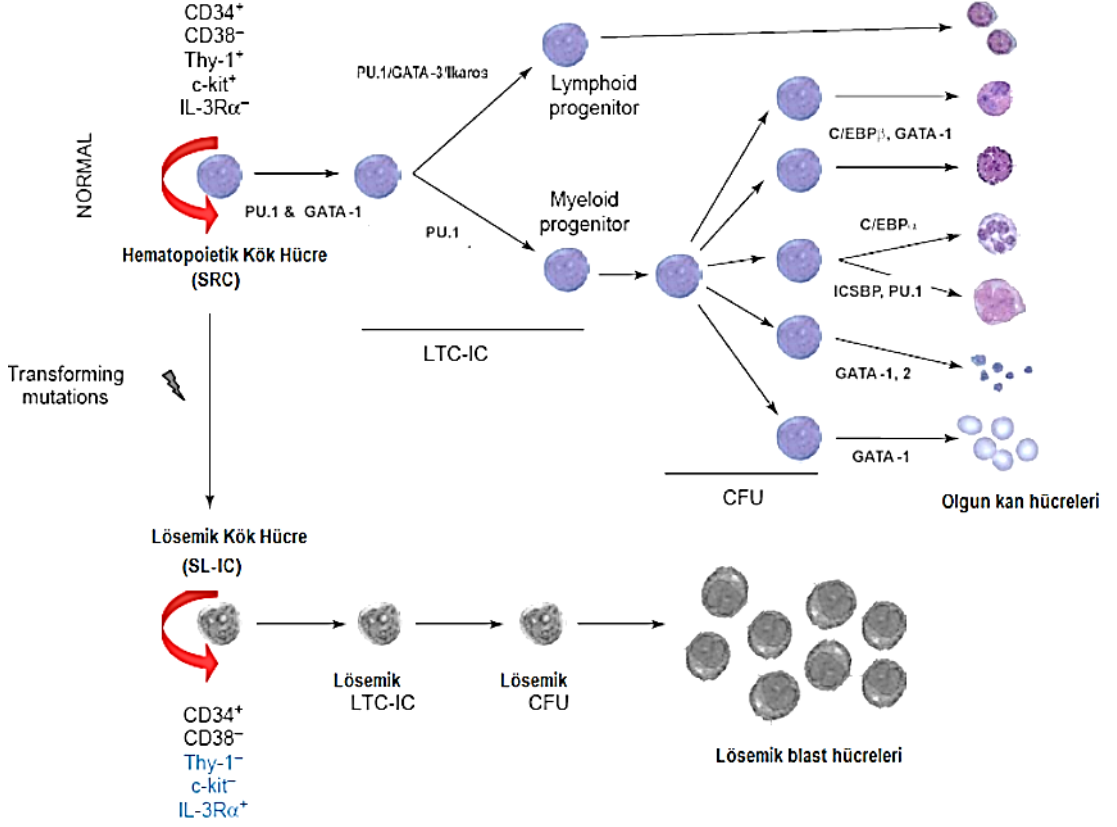
1.2.2.3.1. Lösemi Kök Hücre

Lösemi kök hücreleri için ilk bulgu 1994'de John Dick ve arkadaşları tarafından (142) rapor edilmiştir. AML'li hastalardan elde edilen nadir $CD34^+CD38^-$ SCID farelere infüzyonu sonucunda lösemik blast üretimine neden olduğunu göstermişlerdir. Sonunda, myeloid lösemilerin çoğu primitif seviyede hematopoezin bozulmasından kaynaklandığı ve lösemi kök hücrelerin normal hematopoetik kök hücrelerin malinant türevleri olduğu önerilmiştir (Şekil 16).

AML' de lösemi kök hücre miktarında hastadan hastaya göze çarpan değişiklikler bulunmaktadır. Sonuç olarak $CD34^+CD38^-$ AML hücreleri doğrudan normal hematopoetik kök hücrelere benzer değildir. Normal hematopoetik kök hücrelerin yüzeyinde bulunmayan IL-3R- α (CD123) yüzey reseptörü AML kök hücreleri yüzeyinde bulunmaktadır (126).

Kanserde klonalite ve klonal gelişimle ilgili ilk bulgular KML çalışmalarından sağlanmıştır (173). KML kök hücreler, normal ilikteki progenitör hücrelerle karşılaştırıldığında, blast krizindeki KML hastalarında ve imatinib dirençli KML hastalarında granülosit ve makrofaj progenitör hücre

havuzu genişlemiş, BCR-ABL ifade edilmiş ve nükleer katenin seviyesi arttığı gözlenmiştir (121).



SRC: immün yetmezlik gösteren farelerde (SCID) yeniden popülasyon oluşturan hücre, SL-IC: SCID farelerde lösemi-başlatan hücre, LTC-IC: uzun süreli kültür başlatan hücre, CFU: koloni oluşturan birim

Şekil 16. İnsan normal ve lösemik hematopoetik hiyerarşinin şematik gösterimi (245).

1.2.2.3.2. KML' de İlaç Direncinde Kök Hücrelerin Rolü

Cerrahi, çeşitli tipte kemoterapi, hormon tedavisi ve radyoterapi gibi tedavi seçeneklerinin etkinliklerinin yanında bazı sınırlamaları da vardır. Tedavi direnci, hastalığın tekrarlaması ve metastatik hastalık için halen sonuç

veren bir tedavinin olmaması günümüz tedavi seçeneklerinin doğru hücreleri hedefleyemediğini düşündürmektedir.

Önceden, tümördeki birkaç hücrenin genetik değişiklik geçirmesiyle ilaç direncinin ortaya çıktığı düşünülmekteydi. Kanseri kök hücre modeline göre; G_0 fazında olan sessiz hücreler olan kanser kök hücreleri, ilaçların dışarı atılmasında görev alan ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcı proteinlerine sahip olmaları ve yüksek DNA tamir etme kapasiteleri sayesinde doğal olarak kemoterapiye dirençlidirler (103).

İlaç direncini açıklamak için oluşturulan başka bir modelde, tümör hücre ölümü ile ilişkili uyarıların, sessiz kök hücrelerin bölünmesini indüklediği öne sürülmektedir. Akabinde bu progenitör hücreler kemoterapi direnç fenotipine sahip yeni hücrelere farklılaşmakta ve bunun sonucunda yüzde tedavi başarısız olmaktadır (52).

BCR-ABL hematopoetik kök hücreleri transforme edebilmekte ancak yönelmiş myeloid progenitörleri transforme edememektedir. Bu da kronik faz KML'nin bir hematopoetik kök hücre hastalığı olarak düşünülmesini sağlamaktadır. KML'de $CD34^+CD38^-Lin^-$ lösemik kök hücreler yüksek seviyede BCR-ABL ifade etmektedir. Kronik fazdan blastik faza geçişte, lösemik kök hücreler kendilerine hayatta kalma avantajı sağlayan, programlı hücre ölümüne karşı direnç kazandıran ve çoğalma avantajı veren bazı genetik ve epigenetik anomaliler oluşturmaktadırlar (52).

Özet olarak; kullanılan ilaçların lösemi kök hücrelerine etki etmemesinde lösemi kök hücreleri hücre döngüsünün duraklama fazında

kalmaları ön plana çıkmaktadır. Bu nedenle genellikle, geleneksel hücre döngüsü kemoterapi ilaçları lösemi kök hücrelerini etkili bir şekilde hedef alamamaktadır (91). Diğer bir direnç sebebi de lösemi kök hücrelerinin mutasyon ve epigenetik değişimlere uğrayarak, ilaç direnç oluşumuna ve hastalığın nüksetmesine öncülük etmeleridir (196). Ayrıca primitif lösemi kök hücrelerinin MDR1 gibi doğal hayatta kalma mekanizmalarının olması da direnç oluşumuna katkıda bulunmaktadır (125).

İlaç tedavisi sırasında KML nüksetmesinden lösemi kök hücreleri sorumludur (178). Analizler göstermektedir ki; imatinib KML kök hücreleri üzerinde sitotoksik değil sitostatik etki yaratmaktadır. Bu nedenle lösemi kök hücrelerinin ablasyonu, tümör popülasyonun daimi olarak yok edilmesi için gereklidir (83).

1.2.3. mikroRNA

İnsan genomunun % 65'inin transkribe olduğu tahmin edilmesine rağmen bugün için % 2'den az kısmının proteine çevrildiği bilinmektedir. Komplementer DNA (cDNA) kütüphanelerinin sistematik sekanslanması ve transkriptom çalışmaları, tüm transkribe olan RNAlar ın en azından yarısının protein kodlamayan RNA molekülleri olduğunu göstermiştir. Protein kodlamayan RNA moleküllerinden biri olan mikroRNAlar ilk olarak 1993 yılında *C. elegans*ta bulunmuş ve daha sonra insanlarda da bu miRNAların homologları ortaya konmuştur (7,11,145, 251).

miRNA' lar gelişim, hücre farklılaşması, apoptoz ve proliferasyon gibi kritik biyolojik olaylarda yer alırlar. Son dönemlerde yapılan çalışmalar,

spesifik mikroRNA' ların lösemi patogenezindeki önemini kanıtlamaktadır (15).

1.2.3.1. miRNA Genleri ve Yapısı

MikroRNA' lar, genellikle tüm metazoa ökaryotlarda eksprese olan ve yüksek oranda korunan kodlanmayan kısa regülatör (~22 nt) RNA' lardır (172).

miRNA' lar diğer genler gibi DNA üzerinden transkribe edilmekte ve proteine dönüştürülmeden küçük RNA molekülleri halinde gen regülasyonunda görev almaktadırlar (69, 90). miRNA genleri polisistronik olarak transkribe edilmektedir ve Y kromozomu hariç bütün kromozomlarda dağılmışlardır.

miRNAlar kodlandıkları genomik bölgeye göre üç gruba ayrılmaktadır:

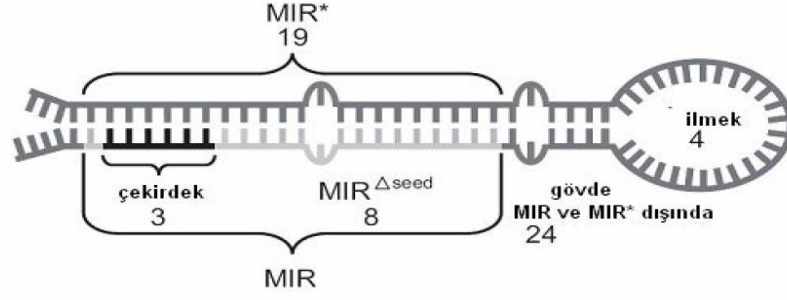
1. İçinde bulundukları genin promotorunu paylaştıkları için bu genle aynı ekspresyon paterni gösteren, protein kodlayan transkripsiyon birimlerindeki intronik miRNAlar
2. Protein kodlamayan transkripsiyon birimlerindeki intronik miRNAlar
3. Protein kodlamayan transkripsiyon birimlerindeki ekzonik miRNAlar (129, 211).

1.2.3.2. miRNA'NIN İşlenmesi- RISC Kompleksi

miRNAlar, genomik DNA'da ilgili miRNA geninden binlerce baz uzunluğunda primer transkript (pri-miRNA) olarak RNA polimeraz II enzimi

tarafından sentezlenmektedirler. Oluşturulan transkript “cap” ve poli(A) kuyruğuna sahiptir. Birbirini izleyen üç süreç ile matür miRNA oluşumu gerçekleşmektedir. İlk aşamada, DNA’dan bilgi aktarımı ile oluşan binlerce baz uzunluğundaki pri- miRNA, yaklaşık 70 nükleotidlik prekürsör miRNA (pre-miRNA) haline getirilmekte, ikinci aşamada pre-miRNA nükleus dışına taşınmakta ve üçüncü aşamada ise bu prekürsör, yaklaşık 21-25 nükleotidlik olgun miRNA’ya çevrilmektedir;

1. aşama “Cropping”; pri-miRNA, çift zincir RNA (dsRNA) spesifik endonükleaz olan Drosha isimli enzim ile kesilerek pre-miRNA oluşturulmaktadır. 160 kD’luk bir nükleer Ribonükleaz III endonükleaz olan Drosha, yaklaşık 200 nükleotitlik pri-miRNA’yı farklı yapı ve dizide olmalarına bakmaksızın 70–80 nükleotitlik parçalara bölerek pre-miRNA’yı ortaya çıkarmaktadır. Bu oluşan parçalar stem-loop biçimindedirler. Pre-miRNA yapısı çekirdek bölgesi, çekirdeğin dışında kalan olgun miRNA bölgesi (MIRΔseed), olgun miRNA ile baz eşleşmesi oluşturan gövde bölgesi (MIR*), olgun miRNA(MIR) ve MIR* kapsamayan gövde bölgesi, ilmek bölgesi olmak üzere 5 kısımdan oluşmaktadır (Şekil 17). Çekirdek bölgesi miRNA’nın 5’ucundaki 2-8 nükleotitleri arasındaki bölgedir ve bu bölge mRNA’yı tanıyarak baz eşleşmesi oluşturan bölge olduğu için ayrı bir önem taşımaktadır.



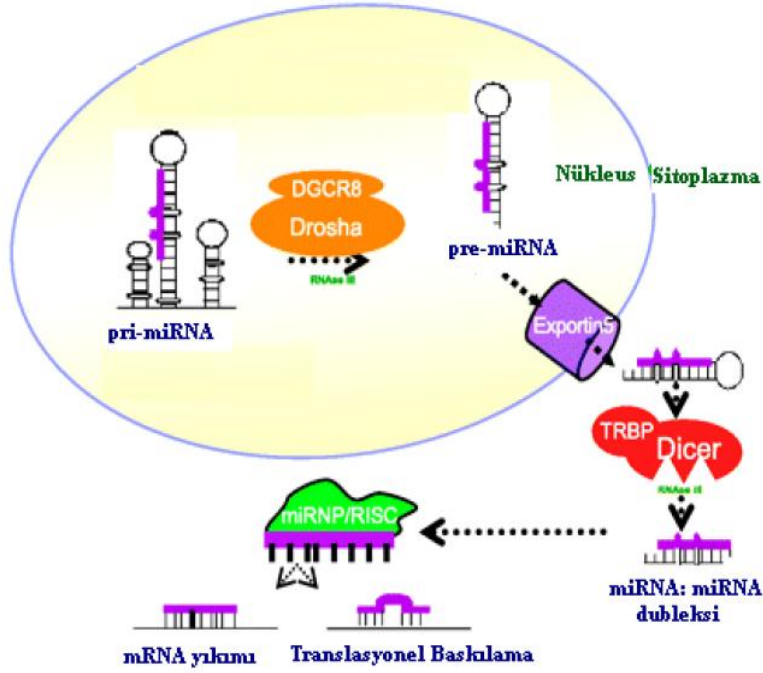
Şekil 17. pre-miRNA yapısı (204)

2. aşama export (taşınma); nukleusta oluşan pre-miRNA sitoplazmaya Exportin -5 (exp5) aracılığıyla taşınmaktadır. Exportin5 bir Ran-GTP temelli nukleo/sitoplazmik kargo transporter molekülüdür. Exp5/ranGTP ile pre-miRNA heterotrimerik yapı oluşturmakta ve bu yapı pre-miRNA'nın yapısını stabilleştirerek sitoplazmaya taşınmasını sağlamaktadır. Zar deliklerinden geçip sitoplazmaya gelindiğinde RanGTP RanGDP'ye hidrolize olarak pre-miRNA'nın serbest kalması sağlanmaktadır.

3. aşama dicing; sitoplazmaya taşınan pre-miRNA, helikaz ve dsDNA bağlanma bölgesi içeren bir RNaz III olan Dicer tarafından 18-22 nükleotid uzunluğunda küçük, çift dal RNA dubleks (miRNA:miRNA*) haline getirilmektedirler. Bu dubleks yapıda hem olgun miRNA dalı hem de onun komplementeri (miRNA*) birlikte bulunmaktadır. Daha sonra olgun miRNA, RNA ile indüklenen susturma kompleksine (RISC) katılmaktadır (Şekil 18) (55,69, 76, 129,160,204,211).

Olgun miRNAlar işlevlerini gerçekleştirmek için ihtiyaç duydukları proteinlerle birleşerek ribonukleoprotein yapıdaki RISC' i oluşturmaktadır. Bu yapıya katılan tanımlanmış proteinler, hedefi kesen endonükleazlar olan

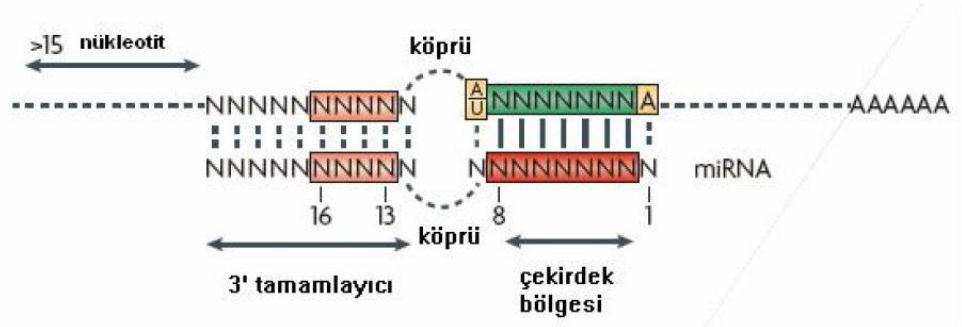
Argonaute ailesi proteinleridir. Argonaute protein ailesinin üyeleri iki domain içermektedir; bunlardan Dicer'a benzeyen PAZ domaini tek zincir RNA'nın 3' ucuna bağlanmaktadır. Olgun miRNA bu yapıya tek zincirli olarak katılmaktadır. Olgun miRNA'nın komplementeri olan ikinci zincir degradesi olmaktadır (55,69).



Şekil 18. miRNA biyogenezi (134)

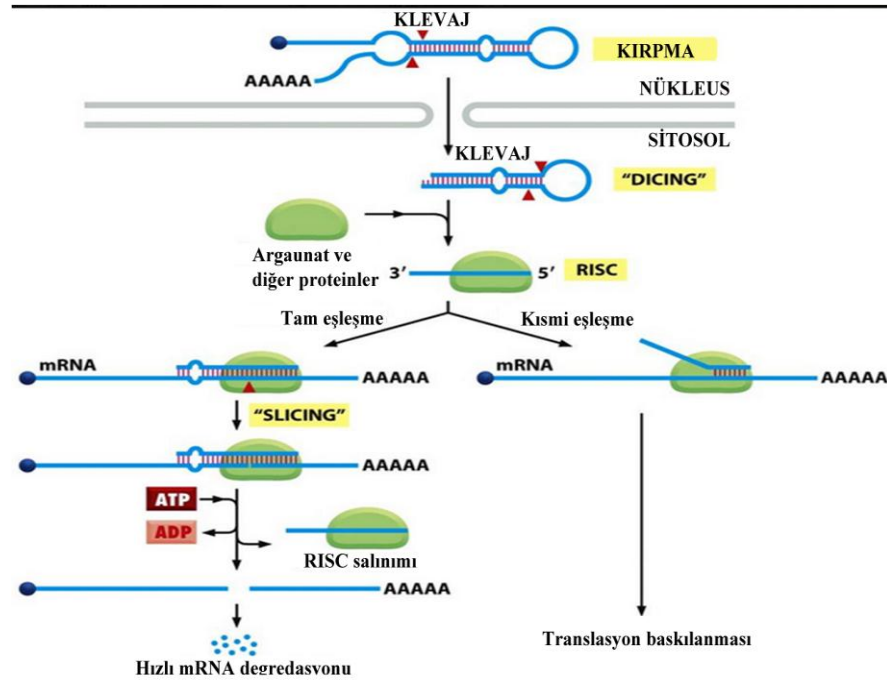
1.2.3.3. miRNA Çalışma Prensipleri

miRNA'lar mRNA'ların 3' UTR bölgeleriyle baz eşleşmesi yaparak bu mRNA'ların degradasyonunu sağlayarak ve ya traslasyona uğramalarını engelleyerek post-transkripsiyonel olarak gen ekspresyonunu kontrol eden moleküllerdir (Şekil 19). miRNA'lar hedefi bulmakta ve miRISC yapısını hedefe yönlendirmektedirler. mRNA degradasyonunu veya translasyonun durmasını sağlayan RISC yapısını oluşturan diğer proteinlerdir (69).



Şekil 19. miRNA ve mRNA'nın 3' UTR bölgesinin baz eşleşmesi (69)

MikroRNA' larla mRNA 3' UTR bölgesi arasında yüksek oranda komplementerlik varsa mRNA degrede edilmekte, komplementerlik azsa mRNA'nın translasyonu baskılanmaktadır (Şekil 20). miRNAlar, mRNA yıkımı ya da translasyonel represyon ile hedef gen aşağı-regülasyonunu kontrol etmektedirler. (76).



Şekil 20. RISC mRNA ilişkisi (112)

1.2.3.4. Kanserde miRNA

miRNAlar, gen ifadesinde kritik bir rol üstlenmektedirler ve düzensizlikleri hastalıkların patogeneğinde önemli sonuçlara yol açmaktadırlar (62). miRNA moleküllerinin yarısından fazlasının insan genomunda, kanser ile ilişkilendirilmiş gen bölgelerinde veya kırılğan bölgelerde bulunduğu saptanmıştır (30).

miRNAların gelişme, hücre büyümesi, farklılaşma, sağkalım, apoptoz, senesens ve metabolizma gibi yaşamsal süreçler üzerinde etkili olduğunun belirlenmesi kanserle olan ilişkisinin araştırmaya yönlendirmiştir (62). Bunun üzerine Calin ve ark. miRNA genleri ve kanser arasındaki ilişkiyi ortaya koyan ilk çalışmayı yapmıştır (29).

Çeşitli kanserlerde rol oynayan bi protein olan c-myc proteinini aşırı üreten bir fare türünde yapılan araştırmalar miRNA'nın kanser gelişmesine etki ettiğini göstermiştir. Lenfomalarda bulunan miRNA'ları özellikle çok miktarda üretmek üzere tasarlanmış farelerde 50 gün içinde kanser gelişmiş ve bunlar iki hafta ardından ölmüşlerdir.

miRNA ifade düzeylerinin normal ile tümör dokularında karşılaştırılması yoluyla, miRNA anlatım düzeylerinin farklı kanserlerde önemli farklılıklar gösterdiği saptanmıştır (268). Kanserlerin sınıflandırılmasında miRNA profillerinden yararlanılmasıyla, hekimler bir kanser dokusunu analiz edip onun hangi dokudan yayılmış olduğunu anlayabilecek ve özgün doku tipine göre tedavi planlayabileceklerdir.

Kanserde etkili miRNALAR protein kodlayan genlerde olduğu gibi “tümör baskılayıcı” miRNALAR ve “onkogenik” miRNALAR olarak iki gruba ayrılmıştır (266).

1.2.3.4.1. Onkogenik ve Tümör Supresör miRNALAR

Çeşitli kanser türlerinde ekspresyon düzeyleri azaldığı için bazı miRNALARın tümör baskılayıcı miRNA’ lar olduğu düşünülmüştür ve fonksiyonel çalışmalar yapıldığında bunların genelde onkogenleri hedef aldıkları görülmüştür. Tümör baskılayıcı miRNA’ lar normalde, onkogenleri engellemekte ve farklılaşmayı sağlayan genleri aktive etmekte, hücre çoğalmasını uyan ya da apoptozu baskılayan proteinlerin mRNAlarına bağlanarak bunların miktarını azaltmaktadırlar. (27,38,41). Dolayısıyla tümör baskılayıcı miRNA’nın ekspresyonunun azalması onkogenin ekspresyonunun artmasına ve tümör oluşumuna sebep olmaktadır. Kanserli hücreler kromozomal düzenlenmeler, mutasyonlar ve epigenetik değişimler ile, tümör baskılayıcı miRNA’ ları inaktive etmektedirler. Tümör baskılayıcı miRNA’ lar genellikle kanserde delesyona uğramış bölgelerde lokalize olmaktadır.(31,55,48,64,146).

Ekspresyon çalışmalarında, çeşitli kanser türlerinde ekspresyonu azalan miRNALAR onkogenik miRNALAR olarak düşünülür. Bunlara “onkomir” adı verilir. Onkogenik miRNALAR normalde hücre çoğalmasını baskılayan ve apoptozu kontrol eden genlerin mRNAlarına bağlanır ve onların etkinliğini azaltır. Bu miRNA’ ların kromozomal translokasyonlar ya da genomik artışlar nedeniyle aktivitelerinin artması, hedefleri olan tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonlarının azalmasına, dolayısıyla tümör oluşum ve gelişimine sebep

olmaktadır (39, 48, 55).

miRNA ile mRNA arasındaki komplementerliğini etkileyen mutasyonlar ve ya polimorfizmler translasyonu etkileyerek kanser oluşumuna katkıda bulunabilmektedirler (219).

Protein kodlayan genleri düzenleyen epigenetik kontrol mekanizmalarının miRNA' ları da düzenlemektedir. Bazı miRNA gen bölgelerinin kanserlerde hipermetile olduğu bulunmuştur. Histon asetillenme ve metillenmesi ile geçici düzenlemeler, gen bölgelerinin damgalanması ile kalıcı düzenlenmeler gerçekleşmektedir (134).

1.2.3.4.2. Anormal miRNA Değişimi

miRNA ekspresyonu, kromozom anomalileri, epigenetik değişimler, mutasyonlar ve polimorfizmler (SNP) gibi insan kanserlerinde bulunan çeşitli mekanizmalar ve miRNA biyogenezindeki defektler ile değişikliğe uğrayabilmektedir.

Kromozomal Anomaliler

miRNA' lar kanserde sıklıkla değişime eğilimli belirli genomik bölgelerde bulunmaktadır. Bu bölgeler, ya bir tümör supresör geni bulundurabilen heterozigot bölgenin küçük bir kısmının kaybını ya da onkogen ve ya kırılgen bölgeleri içerebilen amplifikasyonun küçük bir bölümünü içerebilmektedir. Kolay kırılan bölgeler, kardeş kromatid değişimleri, translokasyonlar, delesyonlar ve plazmid DNA' nın amplifikasyonu ve entegrasyonu için ve insan papilloma virüs gibi tümör ilişkili virüslerin insersiyonu için öncelikli

bölgelerdir. Kanserin spesifik tiplerinde miRNA' ları içeren genomik bölgelerdeki kayıp ya da artışların malinitelerin sebeplerinde payı olduğunu bilinmektedir (28).

Epigenetik Değişimler

Güncel bulgular epigenetik anomalilerin miRNA ekspresyonuna etki ettiğini göstermektedir. miRNA genlerinin genomik sekansının kapsamlı analizi bu genlerin neredeyse yarısının CpG adaları ile ilişkili olduğunu göstermektedir. Diğer yandan 5 hücre hattında çeşitli miRNA ilişkili CpG adalarının analizi, normal ve malin hücrelerde miRNA gen metilasyonunun yüksek frekansta algılanabilir olduğunu göstermiştir.

1.2.3.4.3. Onkogeneze

Bugüne kadar, bütün tümör türlerinde değişmiş miRNA analizleri üzerine yürütülen yüksek işlem hacmi analizleri, miRNA' ların tümör süpresör genler ve onkogenlerin regülasyonu ile tümörigeneze müdahale ettiği fikrini vermektedir. "miR-17-92 polisistron" memeli onkogeni olarak miRNA' nın ilk örneği durumundadır. Bu miRNA grubu, çeşitli lenfoma ve solid tümörlerde amplifiye olan 13q31.3 genomik lokusunda yerleşiktir. B-hücreli lenfomalı E-myc transgenik farelerde miR-17-92 grubunun ekspresyonu, hastalığın başlangıcı ve ilerlemesini hızlandırmıştır. Bu farelerde miR-17-92 grubunun transkripsiyonu direkt olarak c-Myc tarafından transaktive edilmektedir. c-Myc, genellikle ilgili promotör bölgeler ile direkt olarak etkileşerek kanser hücrelerinde aşırı ifade olan bir transkripsiyon faktörüdür (98).

miR-17-92 grubu ve onun paraloğu olan miR-106b-25, transkripsiyon

faktörlerinden E2F ailesinin fonksiyonları ile sıkı ilişkide gibi gözükmemektedir. Gerçekten de, grubun her üyesi, E2F tarafından aktive olmaktadır. Bu bilgi, miR-17-92 grubunun tümör oluşumundaki ilerletici rolünü desteklemesine rağmen, bulgular, bu miRNA' ların fonksiyon kaybının kanser hücreleri için avantaj olabileceğini göstermektedir. Over kanseri, meme kanseri ve melanomada 13q31.3 lokusunda heterozigotluk kaybı tespit edilmiştir. Bu bulgularla uyumlu olarak, miR-17' nin meme kanseri hücre hatlarına girişi, bu hücrelerin proliferasyon seviyesini düşürmektedir (58). Bu etki, östrojen reseptörü ve E2F1' in transkripsiyonel kofaktörü olan AIB1 geninin inhibisyonuna dayandırılabilir. Çünkü aynı miRNA, hücresel içeriğe bağlı olarak hem pro hem de anti-tümörjenik aktiviteye sahiptir.

Tek miRNA olarak, onkogenik role sahip ilk örnek miR-155'dir. miR-155, Hodgkin ve Burkitt lenfoma gibi lenfoma türlerinde aşırı ifade olmaktadır (58).

1.2.3.4.4. Hücre Döngüsünün Düzenlenmesi

miRNA' lar, hücresel yaşam ve ölüm evrelerini düzenleyen proteinlerin ekspresyonuna müdahale ederek tümör oluşumuna katkıda bulunmaktadır. miR-221/222, bazı tümörlerde yukarı modülasyona uğrar ve iki negatif hücre döngüsü proteinini, p27Kip1 ve p57Kip2 proteinlerini hedefleyerek Cdk/Siklin kompleksine bağlanarak G1/S fazını engellemektedir. miR17-92 ve miR-106b-25 grupları, p21Waf/Cip1'i hedefleyerek hücre proliferasyonunu ilerletir (189).

Diğer taraftan, kanserde hücre döngüsü kontrolünde aşağı modülasyona uğrayan miRNA' lar, siklin veya CDK seviyelerinde azalmaya

sebepler olmaktadır. Örneğin, hepatosellüler karsinomada aşağı regüle olan miR-122' nin; siklin G1' i hedeflediği bildirilmiştir. Siklin G1' in kaybı, karsinogen müdahalenin ardından özellikle düşük tümör tekrarlama oranı ile ilişkilidir (85). Benzer olarak, miR-15a/16 grubu siklin D1, siklin D3, siklin E1 ve CDK6 miktarında azalmaya sebep olur, miR-16 ailesinin azalan seviyeleri, çoklu hücre döngüsü ilerletici genlerinin birikimini tetiklemektedir (151). Ek olarak, bu iki miRNA apoptoza katkıda bulunur, apoptotik inhibitör Bcl-2 seviyesinin azalmasına katkıda bulunmaktadır. Bir çalışma, kronik lenfositik lösemide bu proteinin yüksek seviyesinin düşük miR-15a/16 seviyeleri ile ilişkili olduğunu göstermiştir (42). miR-17-92 ve miR 106b-25 grubu üyeleri de, proapoptotik faktör Bim' i inhibe ederek apoptoza katkıda bulunmaktadır (189, 240).

1.2.3.4.5. Gelişme ve Metastaz

miRNA' ların, tümör oluşumu, ilerlemesi ve metastaz aşamalarındaki rolü de ispatlanmıştır. miR21 ve miR-10b gibi miRNA' ların önemli rolü olduğu düşünülmektedir. miR-21, onkogen gibi fonksiyon gösterir ve tümör oluşumuna katkı sağlar, tümör süpresör geni TPM1 regülasyonunda görev almaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, meme kanseri ve malin hepatositlerde miR-21 baskılanmasının özellikle invazyon ve metastazda azalmaya sebep olduğunu göstermektedir. İki yeni keşfedilen miR-21 hedefi, programlanmış hücre ölümü 4 (PCDC4) ve maspin, bu konuyu kapsamaktadır (272).

1.2.3.5. Hematopoezde miRNA

miRNA' lar, normal hematopoezde çok önemli rol oynar çünkü neredeyse her aşamada hematopoetik farklılaşmayı düzenlemektedirler ve miRNA ekspresyon anomalileri, hematolojik maliniteleri içeren birçok hastalık ile ilişkilidirler. miRNA' lar tam aydınlanmamış mekanizmaları yoluyla onkogen ve tümör süpresör görevi görmektedirler. Bununla birlikte, miRNA' ların tümör oluşumundaki rollerini anlamamıza olanak sağlayan bazı ipuçları vardır. İlk olarak belirtildiği şekilde miRNA' lar hedef transkriptlerinin ekspresyonlarını aşağı-regüle eder ve ya degradasyonlarını indüklemektedirler. Onkogenik miRNA' lar, tümör baskılayıcı mRNA' ların ekspresyonlarını hedef alarak onları saf dışı bırakmaktadır. Onkogenik miRNA' ların artmış miktarları tümör baskılayıcı proteinlerin ekspresyonunu durdurup, hücre proliferasyonunu artırır ve/veya hücre ölümünü baskılamaktadır. Diğer yandan, tümör baskılayıcı miRNA' lar onkoprotein kodlayan mRNA' ları hedef almaktadır. Bu miRNA' ların artmış seviyeleri, onkoprotein benzeri hücrelerin hayatta kalmaları ve çoğalmalarında artışa sebep olmaktadır. Normal hematopoezde miRNA ekspresyonu, fare ve insan hematopoetik dokularda çalışılmıştır ve bu küçük, kodlanmayan RNA' ların hematopoezin hemen hemen her aşamasında kritik roller aldıkları gösterilmiştir. Ayrıca, insan ve fare hematopoetik hücrelerinin miRNA ekspresyonlarında bazı farklılıklar vardır (195).

1.2.3.6. Kronik Myeloid Lösemide miRNA

KML hücre hatlarında, miR-17-92 kümesinin yukarı-regülasyonu, kırılma noktası kümelenme bölgesi-c-abl onkogeni (BCR-ABL) ve c-MYC, v-

myc myelositomatoz viral onkogen homoloğu (c-MYC) ile indüklenen transaktivasyonun bir sonucu olarak tanımlanmıştır. Özellikle, pri-miR-17-92 ekspresyonu erken kronik fazda BCR-ABL-MYC yolağı ile indüklenebilir ancak, blast krizindeki KML hastaları için bu durum geçerli değildir. miR17 ve miR20 E2F1' i negatif bir feedback ilimkte hedeflerken: miR-17-92 kümesi ekspresyonu E2 transkripsiyon faktörü ailesinin (E2F1-3) 3 üyesi ile regüle edilebilir (252). İlginç bir şekilde, E2F3 bağlanması predominantken, miR-17-92 normal hücrelerde hücre proliferasyonunu indükler: neoplastik dokuda ise E2F1 bağlanması apoptozu indükler. E2F ve MYC, miR-17-92 kümesi ekspresyonu için regülör sinyal oluşturarak birbirlerini transaktive ederler. Normal kontrollerle kıyaslandığında, KML' li hastalardaki mononükleer ve CD34⁺ hücrelerindeki miRNA ekspresyon profillerinde, KML hücrelerinde miR-96 yukarı-regüle olurken, miR-10a, miR-150 ve miR-151' in aşağı-regüle olduğu saptanmıştır. miR-10a' nın aşağı-regülasyonu BCR-ABL1 aktivitesine bağımlı değildir ancak, yukarı-akış transkripsiyon faktörü 2' nin aşırı ekspresyonu ile ilişkilidir. Bu durum, miR-10a' nın, USF2 ekspresyonunu arttırarak KML' de hücre proliferasyonuna katkıda bulunduğunu işaret etmektedir.

1.2.4. HÜCRE ÖLÜM MEKANİZMALARI

Yakın zamana kadar hücre ölümünün programlı ve programsız hücre ölümü olmak üzere 2 yolla gerçekleştiği ve apoptozun tek programlı hücre ölümü olduğu düşünülmekteydi. Ancak 1960 yılından beri alternatif programlı hücre ölüm yollarının olduğu bilinmektedir.

1990'da Clark ve arkadaşları programlı hücre ölümünü morfolojik olarak

üçü ayırmışlardır. Hücre ölümünün morfolojik sınıflandırılmasında apoptoz tip 1 hücre ölümü, otofaji tip 2 hücre ölümü ve morfolojik olarak nekroza benzeyen non-lizozomal parçalanma ise tip 3 hücre ölümüdür (82).

1.2.4.1. Apoptoz

Kerr ve ark.'nın yaptıkları çalışmayla 1971 yılında 'büzüşme nekrozu' olarak tanımlanmasının ardından 1972 yılında ayrı düşmek anlamına gelen 'apoptoz' terimi literatüre kazandırılmıştır. Apoptoz ile ilgili çalışmalar hızlanması ise 1983 yılında Duke ve arkadaşlarının apoptozda endonükleazların aktive olarak DNA kırıklarına neden olduğunu göstermesiyle başlamıştır, apoptozu pozitif ve negatif yönde düzenleyen proteinler belirlenmesiyle devam etmiştir (238).

Apoptoz genetik olarak kontrol edilen, hasta ve gerekmeyen hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, RNA, protein sentezi, enerjiye gereksinim duyan bir olaydır. Canlı organizmalarda apoptoz; embriyonal gelişme, metamorfoz, erişkinde hormona bağımlı involüsyon, sürekli çoğalan hücre gruplarında hücre azalması, immun hücrelerin seçimi, tümörlerde hücre ölümü, sitotoksik T-hücreleri ile oluşturulan hücre ölümü gibi çok sayıda fizyolojik ve patolojik olayda izlenebilmektedir (60, 132, 182).

Organizmada homeostazın korunması için hücrelerin doğru zamanda doğru miktarda apoptozla gitmesi ve bu dengenin bozulmaması gerekmektedir. Kanseri, viral enfeksiyonlar, otoimmün hastalıklar ve rejenerasyonda apoptozun proliferasyondan az olduğu; nörodejeneratif hastalıklar, iskemi/reperfüzyon hasarı, karaciğer yetmezliği gibi distrofik

durumlarda ise apoptozun proliferasyondan fazla olduğu gözlenmiştir (105, 132).

Ölümcül bir uyarıdan sonra apoptozun başlama süresi hücre tiplerine göre farklılık gösterse de, apoptoza ait morfolojik değışiklikler hepsinde benzer olup, 2-4 saat içinde gelişir.

Apoptotik hücrelerde mikrovillus benzeri yüzey organellerinin ve hücre-hücre tutunma moleküllerinin kaybı gözlenmektedir. Hücre su kaybederek büzülmesi ve sitoplazma yoğunlaşır. Sitoplazmik baloncuklar ve apoptotik cisimlerinin oluşumu gözlenmektedir. Kromatinler nukleus membranına yakın bölgelerde yoğunlaşır ve DNA apoptotik hücrelere özgü bantlaşmalar gösterir. Hücresel membranlar bütünlüklerini korurlar ve endoplazmik retikulum dışındaki organeller genel olarak sağlamdırlar (60, 132, 182).

Hücre membranının iç tabakasında yer alan fosfatidil serinin, aminofosfolipid transferaz enzimiyle membranın dış yüzüne göç etmesi apoptotik hücrelerin komşu hücreler tarafından tanınıp fagozite edilmelerini sağlamaktadır. Hücreler fagozite edildiklerinden dolayı apoptozda iltihaplanma gözlenmemektedir (105, 132).

Apoptoz DNA hasarı, hücre içi kalsiyum seviyesinde artış, hücre içi pH'da düşme, metabolik bozukluklar ve hücre siklus bozuklukları gibi hücre içi sinyallerle uyarılabilmesinin yanı sıra çevresel yaşam sinyallerinin ve büyüme faktörlerinin yetersizliğı, ölüm reseptörlerinin aktivasyonu, toksinler ve radyasyon gibi hücre dışı sinyallerle de uyarılabilmektedirler. Hücreye gelen apoptotik sinyaller hücre içi proteaz sistemi olan kaspazların ve ICE-

benzeri proteazların aktivasyonuna neden olmaktadır. ICE-benzeri proteazlar granzimlerle aktive olmaktadır. Normalde inaktif halde bulunan kaspazlar ise apoptozdaki hücreler tarafından aktif hale geçmekte ve kaspaz kaskadı oluşmaktadır. Kaspazlar hücre için esansiyel proteinleri sistein ve aspartik asit aminoasitlerinden keserek onarılamaz hale getirirler. Kaspazların aktivasyonu, mitokondriyal (intrinstik) yolak ve hücre ölüm reseptör (ekstrinstik) yolağı ile sağlanabilmektedir (93, 138).

Ölüm reseptör yolağında, CD95 (APO-1/Fas), TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) –R1, TRAIL-R2, TNF-R1, DR3 ve DR6 gibi tümör nekroz faktör reseptörleri (TNFR) çok büyük önem taşımaktadır. Fas proteinini az miktarda ifade eden inaktif T-lenfositler aktivasyona neden olan bir antijenle karşılaştıklarında daha fazla miktar Fas proteini, ve tümör nekroz faktör (TNF), APO3L, TRAIL gibi Fas ligandı sentezlemeye başlamaktadırlar. Sentezlendiğinde işlevsiz olan Fas proteinleri birkaç gün sonra fonksiyonel hale gelip ligandlarına bağlanabilmektedirler. Bağlanma sonucu Fas proteini taşıyan hücreler apoptoza girmek için gerekli sinyali oluşturmaktadır. Bu sinyal prokaspaz-8 ve prokaspaz-10'un aktivasyonu sağlamasından sonra kaspaz-8, prokaspaz-3'ün aktivasyonunu sağlamakta ve kaspaz kaskadı oluşmaktadır (25,132).

Mitokondriyal yolaktaki ana değişiklik mitokondri membran geçirgenliğinin bozulmasıdır. Mitokondri iç zarında bulunan ve ATP sentezinde görev alan sitokrom c membran geçirgenliğinin artması sonucu mitokondriden sitoplazmaya salınır. Sitokrom c' nin mitokondriden salınımıyla ilişkili olan Bcl-2 ve onunla rekabet eden Bax ve Bad proteinleri arasındaki

dengeinin bozulmasıyla apoptoz uyarılmaktadır. Bcl-2 mitokondriden Sitokrom c çıkışını önleyerek apoptozu engellerken, Bad, Bcl-2' ye bağlanarak, Bax ise, Sitokrom c çıkışını sağlayarak apoptozu teşvik etmektedir. Sitokrom c, apoptotik proteaz aktive edici faktör (Apaf-1) ve prokaspaz-9 ile apoptozom kompleksini oluşturmaktadır. Apoptozom kompleksi prokaspaz-9'u aktive kaspaz-9'a dönüştürmekte ve kaspaz-9 prokaspaz-3'ün aktivasyonunu sağlamaktadır (132, 192).

Son dönemlerde bulunan endoplazmik retikulum aracılı yolda ise, hücre içinde kalsiyum artışıyla endoplazmik retikulum membranında yer alan kaspaz-12 aktive ve kaspaz 9 üzerinden kaspaz kaskadının aktivasyonunu sağlamaktadır (227).

1.2.4.2. Nekroz

Nekroz, hipoksi, anoksi, fiziksel ve kimyasal hasar, hipertermi, kompleman aktivasyonu, UV ışık gibi zararlı uyarılar sonucu kazara oluşan patolojik hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır (132, 137).

Nekrozun başlatılması ve kontrolünde, programlı kontrol mekanizmalarının etkili olduğunun gösterilmesiyle 2005'de Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD)' de hücre membran bütünlüğünün bozulduğu, hücrede şişme ve organellerde parçalanmanın görüldüğü morfolojik bir terim olarak tanımlanması uygun görülmüştür (137).

Nekrozda hücrede ilk gözlenen değişiklik hücrenin ve mitokondrilerin şişmesidir. Hücre zarı düzgünleşmekte membran bütünlüğünün bozulmaktadır. Apoptozdan farklı olarak membran geçirgenliğinin artmasıyla

sitoplazmanın ve nukleus içeriğinin hücreler arası boşluğa salınması nedeniyle inflamatuvar olaylar gözlenmektedir (132).

1.2.4.3. Otofaji

Kelime anlamı olarak kendi kendini (oto) yeme (faji) anlamına gelen otofaji, hücresel komponentlerin lizozomal mekanizma tarafından degrade edilmesini sağlayan, genetik olarak kontrol edilen fizyolojik bir işlemdir. Dolayısıyla, organellerin geri dönüşümü sağlanmakta ve enerji üretiminin sürdürülmesi için monomerler üretilmektedir(59).

Otofajinin 1960'lı yıllara tanımlansa da, 1990'larda Oshumi ve arkadaşları, mayalarda yaptıkları çalışmada otofajiyle bağlantılı genleri tanımlayana kadar genetik temeline yönelik çalışmalar yapılmamıştır (82).

Otofajinin tüm ökaryotik canlılarda gerçekleşen, hücrelerin gereksiz, aşırı oranda, hasarlı organellerini ve makromoleküllerini yıktığı, evrimsel süreçte korunmuş bir olaydır. Otofaji sırasında yıkıma uğratılacak organel ve proteinler sitoplazmada oluşturulan preotofagozom membran sistemi ile çevrelenir. Daha sonra çift katlı membranlı kesecikler içine hapsedildiğinde de preotofagozomlar, otofagozom adını alırlar. Otofagozomların lizozomlarla birleşmesiyle makromoleküller lizozomal enzimlerle yıkıma uğratılırlar ve ATP ve yeni proteinlerin sentezi için kullanılırlar. Böylece hücreler kendi organel ve proteinlerini enerji üretimi için kullanarak besin yokluğu ve büyüme faktör çekilmesi gibi metabolik stres durumlarına adapte olup, canlılıklarını sürdürebilmektedir (82, 105, 216).

Otofaji eksikliğinde ubiquitinlenmiş proteinlerin ve deforme organellerin

birikmesi, hücresel dejenerasyona neden olmaktadır (159). Kas hastalıkları, kanser, enfeksiyon hastalıkları ve Huntington, Alzheimer, Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklarda otofajik bozukluklar gözlenmektedir (202).

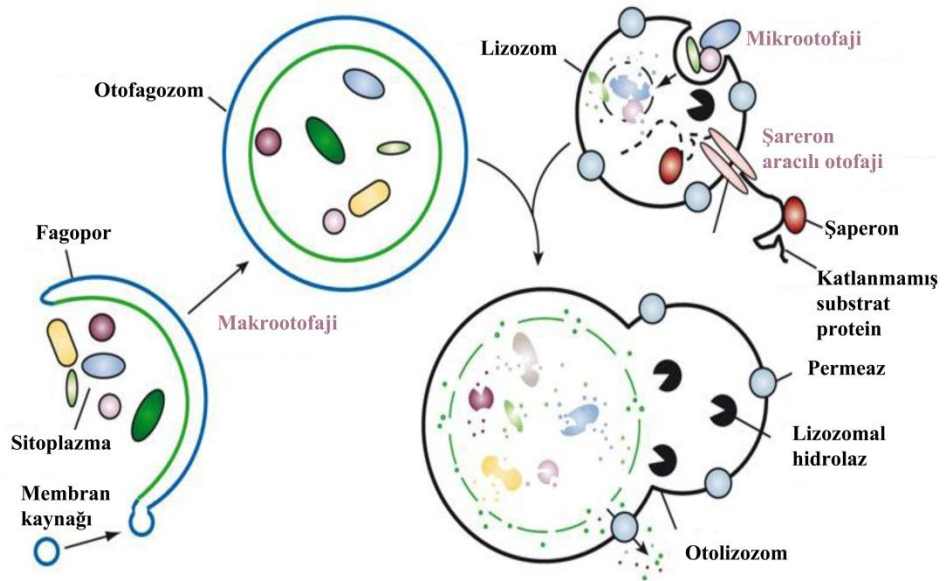
Metabolizmanın düzenlenmesi, hücre farklılaşması, yaşlanma gibi fizyolojik hücresel olaylarda ve bağışıklık sisteminde rol alan otofajinin aynı zamanda hücre hayatta kalımı ve ölümü arasında karmaşık bağlantılar olduğu son yıllarda ortaya konmuştur. Otofaji hücre içinde uzun dönem devam ettiğinde ve apoptoz mekanizmaları bozuk hücreler ölüme zorlandığında, otofajinin hücrelerde bir hücre ölüm çeşidi olarak kullanıldığı öne sürülmüştür (82, 105, 216).

Makrootofaji, mikrootofaji ve şaperon aracılı otofaji olmak üzere 3 farklı otofaji mekanizması tanımlanmıştır (Şekil 21). Makrootofaji, protein parçalarının ve hasar görmüş organellerin parçalanmasında en önemli rolü oynamaktadır ve otofagozomların oluşumuyla karakterizedir. Makrotofajik yıkım işlemi 4 fazda ilerlemektedir. İlk faz besin, oksijen, hormon, büyüme faktörü ve enerji miktarı, ısı, hücre yoğunluğu, kemoterapik ve radyoterapik tedavilerin algılanmasında ortaya çıkan sinyal kaskadları aracılığıyla oluşan hücresel stresle başlayan indüksiyon fazıdır. İkinci fazda sitozol ve organeller otofagofor olarak bilinen PI3-P'ce zengin endoplazmik retikulum membranlarının bir araya gelerek oluşturduğu membran ile çevrelenmekte ve otofagozom denen çift katlı membranlı kesecik oluşmaktadır. Üçüncü fazda otofagozom lizozom ile birleşerek hidrolazları bulunduran otolizozom yapısını oluşturmaktadır. Son faz ise makromoleküllerin lizozomal enzimler ile yıkılıp, yeniden döngüye girmeleriyle tamamlanmaktadır (50). Otofagozomlar

maktadır.(26, 163).

Mikrotofaji, az miktarlardaki sitoplazma içeriğinin direk olarak lizozom aracılığıyla pinositozu olarak tanımlanmaktadır (26, 163).

Şaperon aracılı otofaji ise, diğer otofaji çeşitlerine göre daha seçicidir. Sadece KFERQ benzeri aminoasit motifleri içeren proteinler, HSC70 içeren şaperonlar tarafından tanınıp lizozom membranına taşınmakta ve yıkıma uğratılmaktadır. Lizozom membranında bulunan LAMP-2 şaperon KFERQ motifli protein kompleksini tanımasıyla protein katlantıları açılmakta ve yıkıma uğratılacak proteinler membranı geçerek yıkılmaktadır (26, 163).



Şekil 21. Otofaji Çeşitleri (163)

1.2.4.3.1. Otofaji Mekanizması

Mayalarda yapılan çalışmalar sonucu bulunan ve ökaryotlarda da

karşılığı bilinen otofajik zarların oluşumunda ve bunların uzayarak kesecik haline gelmesinde rol oynayan proteinler "otofaji ile bağlantılı proteinler" (Atg proteinleri) olarak adlandırılmışlardır (77, 261).

Hücrede otofagozom oluşumu "otofaji oluşum merkezi" (Preautophagosomal structure, PAS) adı verilen ve memelilerde endoplazmik retikulum ile golgi cisimciğinin arasında olduğu düşünülen bölgede başlamaktadır. Otofaji ile bağlantılı proteinlerden ilk basamakta görev yapan Atg6 (memelilerdeki Beklin-1) proteinidir ve sınıf III fosfoinositol 3-fosfat (PI3F) kinaz Vps34' ün aktivitesini düzenlemektedir. PI3F kesecik oluşumunda rol oynayan proteinleri kendisine bağlayarak otofaji oluşum merkezine yönlendirmektedir ve otofagozom membranının çekirdeği oluşturmaktadır. Membranların uzaması ve kesecik halini alması Atg12–Atg5 ve Atg8- fosfatidiletanolamin konjugasyon sistemi olan 2 übikitin benzeri sistem tarafından kontrol edilir. Atg12-Atg 5 konjugasyon yolağı Atg proteinleri farklı 2 enzim sayesinde birbirlerine kovalent olarak izolasyon membranının dış yüzeyine bağlanmaktadır. İkinci übikitin benzeri sistemde ise bir fosfotidiletanolamin (FE) yağ molekülü, Atg8 (memelilerde LC3) proteininin sondan 6.aminoasiti olan glisinene kovalent olarak bağlanmaktadır. Diğer übikitin kompleksleri Atg8/LC3' ün FE' ye bağlanması için gereklidir. Ayrıca FE' nin bağlanacağı glisin aminoasitleri ortaya çıkabilmesi için LC3' ün C-ucunda bulunan 5 aminoasit Atg4 proteazı ile uzaklaştırılmalıdır. LC3 FE bağlanınca çözülebilir halde bulunan sitoplazmik formundaki LC3-I, otofagozom ilişkili membrana bağlı formu LC3-II' e dönüşmektedir. Atg4 kesecik oluşumu sonrasında görevi tamamlanan LC3 proteinlerini yağdan kopararak yeniden kullanılmalarını sağlamaktadır.

Otofagozom daha sonra lizozomla birleşerek yıkım gerçekleşmektedir (67, 77, 256).

Sentez sonrasında LC3 proteolitik reaksiyonlar sonrasında sitoplazmik lokalizasyonda bulunan LC3-I' e dönüşmektedir. LC3 II' nin artmış seviyeleri hücrelerde otofagozom oluşumu ile ilişkilidir. Bu nedenle LC3-II geç dönem otofaji indikatörü olarak kullanılırken, izolasyon membranlarının PAS' da toplanması aşamasında kontrol mekanizması olarak görev alan beclin-1 ise erken dönem otofaji indikatörü olarak kullanılmaktadır (158).

1.2.4.3.2. Otofaji Kontrol Mekanizmaları

Otofaji kontrolünde 2 önemli sinyal yolağı, sınıf III ve sınıf I phosphoinositol 3 fosfat (PI3F) rol oynamaktadır. Sınıf III phosphoinositol 3 fosfat (PI3F) kinaz otofajik keseciğin oluşumunu başlatırken sınıf I otofajiyi negatif yönde kontrol etmektedir.

Sınıf I fosfotidilinositol 3-kinaz (PI3K)/ protein kinaz B (Akt/PKB), mitojenik uyarılarla aktive edilen ve hücre büyümesini uyaran sinyal yolağıdır. Sınıf I fosfotidilinositol 3-kinaz (PI3K)/ protein kinaz B /Akt yolağının aktif haldeki Akt'nin otofajik aktivitenin inhibisyonunda önemli rol oynayan TOR protein kompleksini aktive ederek otofajiyi baskıladığı bilinmektedir. (PI3K)/Akt/mTOR sinyal yolağını inhibe eden tümör baskılayıcı bir gen olan PTEN, (PI3K)/Akt/mTOR sinyal yolağının inhibisyonu ile hücreleri otofajiye götürmektedir (223).

Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) protein kompleksi; hücrelerde protein sentezi ve hücre proliferasyonunu kontrol eden bir kinaz

sistemidir. mTOR hücre döngüsünde G₁'den S fazına geçişte önemli olan mRNA' ların transkripsiyonunu sağlayan serin/tironin kinaz sistemi üyesidir. mTOR; protein sentezi, transkripsiyon ve ribozom oluşumu gibi anabolik olayları aktive ederek ve RNA yıkımı, otofaji gibi katabolik olayları inhibe ederek hücre çoğalmasını sağlamaktadır. Hücresel stres durumlarında mTOR molekülünün baskılanması ile hücrelerde otofaji aktif hale gelmektedir. mTOR otofaji kontrolünün ilk basamaklarından itibaren devrededir (70).

Otofagozom oluşumunda önemli olan diğer faktör BARdomain içeren endofilin ailesi üyesi bir protein olan Bif-1, Beklin1-Sınıf III PI3K kompleksine bağlanarak membranların kıvrılmalarını sağlar. Lipit fosforilasyonu ve otofagozom uzamasında gerekli faktörleri ortama bağlamada görevlidir (70).

1.2.4.3.3. Otofaji Apoptoz İlişkisi

Apoptoz ve otofaji morfolojik özellikler ve mekanizma bakımından farklılık gösteren olaylar olsa da, bu iki hücre ölüm çeşidi arasında karmaşık bir ilişkinin olduğunu ortaya konmuştur. Apoptoz ve otofaji arasındaki ilişkiyi açıklamaya yönelik dört farklı görüş ortaya atılmıştır. Bunlardan ilki otofajinin, apoptotik hücre ölümünün baskılandığı koşullarda, hücreleri ölüme getiren mekanizma olduğudur (258). İkinci görüş, otofajinin de apoptozla koordineli olarak hücre ölümüne yol açabildiğini savunmaktadır.

Apoptoz temel olarak nükleus değişiklikleri ve kromatinin yıkımı üzerine giderken, otofaji sitoplazmik materyallerin yıkımı ile başladığından sitoplazmik organellerce zengin ve büyük çekirdeği olan hücrelerde koordine

bir şekilde çalışarak hücreyi ölüme getirmeleri anlamlıdır (194).

Üçüncü görüş, otofajinin hücre ölümünden kaçış mekanizması olarak apoptozu baskılayıp, hücrenin hayatta kalmasını sağladığıdır. Otofaji stres, ilaç, radyasyon gibi etkenlere maruz kalan hücrelerde anormal ve hasarlı hücre elemanlarının yıkımını sağlayarak hücrenin ölüme gitmesini engellemektedir. Diğer yandan otofaji inhibe edildiğinde hücrelerde apoptotik hücre ölümü artmaktadır (18).

Dördüncü görüş ise, otofaji kendi başına ölüme yol açmamakta, apoptozu yardım etmediği yani otofajinin apoptoz öncesi bulunması gereken ön koşul olduğudur. Otofaji, apoptotik süreçte besin yokluğunda hücre zarı tomurcuklanması, apoptozom kompleksinin oluşumu, fosfatidilserinin hücre dışı zarına transferi gibi ATP gereksinimi duyan olaylara ATP sağlamaktadır (63).

1.2.4.3.4. Otofaji Kanseri İlişkisi

Tümör gelişiminde, aşırı büyüme faktör sinyalizasyonu ve yapısal PI3K/AKT/mTOR aktivasyonu oluşturarak hücrede protein sentezi ve proliferasyonu arttırmaktadır. Bu sebeple hücrede enerji ihtiyacı oluşmasından ve sınırlı anjiyogenezden dolayı besin ve büyüme faktörü yokluğunda tümör hücrelerinde otofajide artış olduğu, hücrelerin ölümden otofaji ile kaçtığı ve hücrelerdeki otofaji inhibe edildiğinde, hücrelerin apoptoz ile öldüğü gözlenmiştir (20, 33, 50, 154).

Deneyisel modellerde otofajinin spesifik ilaçlarla inhibisyonu malin glioma hücrelerinin radyoterapiye yanıtlarını artırması otofajinin hayatta

kalma mekanizması olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilmiştir. Lenfoma fare modelinde otofaji inhibisyonu apoptoz indüksiyonunu arttırmaktadır. Ayrıca adjuvan tedavide, otofaji inhibitörleri kanser hastaları için apoptozu indükleyen antikanser tedavilerinin etkisini arttırmaktadır (50).

Sonuç olarak güncel çalışmalar otofajinin kanser hücrelerinin sağkalımını baskı altında tutabileceğini işaret etmektedir. Bu nedenle, otofajinin kanser patogenezindeki rolünün aydınlatılması ile, yeni terapötik müdahale noktaları ortaya çıkarılabilmektedir (59).

1.2.4.3.4.1. Otofaji Lösemi İlişkisi

Lösemi tedavisi son yıllarda çok ilerlemiş olmasına rağmen, tanımlayıcı ve eksiksiz bir tedavi halen bulunmamaktadır. Lösemide sıklıkla otofaji deregüle edildiğinden, ilerideki buluşların klinik yansımaları olacağı açıktır (59).

ABL kinazın otofajinin son basamaklarını regüle ettiği bilinmektedir. ABL kinaz inhibisyonu hücrelerde otofagozom birikimine ve otofajini baskılanmasına neden olmaktadır (235).

Birçok açıdan KML, lösemi kök hücreleri, onkogen bağımlılığı ve hedefli tedaviler için bir model hastalık ve paradigmayı temsil etmektedir. Tirozin kinaz inhibitörlerinin KML tedavisinde kullanılmasının başlanmasıyla, hastalığı tedavi etmek için oral olarak uygulanan, toksik olmayan ajanların kullanıldığı bir yola çıkılmış olundu. Kronik fazdaki hastaların tedavisindeki en büyük engel onkogen bağımlı olmayan ve tirozin kinaz inhibitörlerine dirençli olan kanser kök hücre popülasyonudur. Tirozin kinaz inhibitörlerinin KML kök

hücrelerini koruyan otofaji prosesini indüklediğinin keşfedilmesi, tirozin kinaz inhibitörleri ve otofaji inhibitörlerinden klorokinin kombine kullanılmasının KML tedavisinde etkili sonuçlar doğurabileceğini düşündürmektedir (101).

1.2.5. HÜCRE MODELLERİ

KML Modeli Hücre Hattı; **K562**

Büyüme Özellikleri:	Süspansiyon
Organizma:	Homo sapiens (insan)
Morfoloji:	Lenfoblast
Kaynak:	Kemik iliği
Hastalık:	Kronik Myeloid Lösemi (KML)
Tumorigenik:	Evet
Antijen Ekspresyonu:	CD7 (%25)
Yaş:	53
Cinsiyet:	Kadın
Yorumlar:	K-562 devamlı hücre hattı 53 yaşında kronik myeloid lösemili bir kadının plevral efüzyonundan, terminal blast krizindeyken elde edilmiştir. Hücre popülasyonu yüksek oranda farklılaşmamış olarak karakterize edilmiştir. Anderson ve arkadaşlarının yüzey membranları üzerinde yaptıkları çalışmaya göre, K-562' nin insan eritrolösemi serisi olduğu sonucuna varılmıştır. K-562 hücre hattı, "doğal öldürücü" yönteminin yüksek duyarlılıkta in vitro hedefi olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. K-562 blastları multipotansiyel, hematopoetik malin hücrelerdir ve spontane olarak eritrositik, granülositik ve monositik serilerin farkedilebilir progenitörlerine farklılaşabilirler. Karyotipik çalışmalarda Philadelphia kromozomu tespit edilmiştir ve hat EBNA negatiftir.
Üretme:	Bu hücre hattı için besiyortamı olarak Iscove's Modified Dulbecco's (IMDM) kullanılacaktır. 4mM L-glutamin, 4500 mg/L glukoz, ve 1500 mg/L sodyum bikarbonat eklenerek besiyeri modifiye edilecektir. Tam büyüme ortamı elde etmek için baz ortama, final konsantrasyonda %10 fetal sıgır serumu eklenecektir.
Atmosfer:	Hava, %95; karbondioksit (CO ₂), % 5
Sıcaklık:	37,0°C
Subkültür elde etme:	Kültürün sağkalımı için taze ortam ilave edilecek ve ya değiştirilecek. Yeni kültürler 1 X 10 ⁵ canlı hücre/ml ile başlanacak. Subkültürat 1 X 10 ⁶ hücre/ml.
Medyum yenileme:	Her 2 - 3 günde bir
Dondurma ortamı:	Tam büyüme ortamı %95; DMSO, %5
Stoklama sıcaklığı:	Sıvı nitrogen buhar sıcaklığı (9)

Imatinib Dirençli Hücre Hattı; **K562/ima3**

3 µM imatinibe direnç gösteren K562 hücre hattıdır.

Kontrol Grubu Hücre Hattı; **NCI-BL2171**

Büyüme :	Süspansiyon
Organizma:	<i>Homo sapiens</i> (insan)
Morfoloji:	Lenfblast
Kaynak:	Periferel kan
Hücre tipi:	B lenfoblast; Epstein-Barr virus (EBV) ile transforme edilmiş.
Yaş:	50
Cinsiyet:	Erkek
Etnik köken:	Beyaz ırk
Üretme:	Baz besiyeri RPMI-1640 Medyum, (Catalog No. 30-2001). Final konsantrasyonda %10 olacak şekilde FBS eklenecektir.
Sıcaklık:	37,0°C
Subkültür:	Kültürün devamlılığı taze medium ilave edilerek veya tamamen değiştirilerek sağlanacaktır. Kültüre 1x10 ⁵ canlı hücre/ml olacak şekilde başlanıp, 1-3 x 10 ⁶ hücre/ml hücre sayısına ulaşıldığında pasaj işlemi gerçekleştirilecektir.
Medyum Yenileme:	Hücre yoğunluğuna göre her 3-4 günde bir medyum değiştirilecektir.
Dondurma ortamı:	Kültür ortamı, %95; DMSO, %5 olacak şekilde ayarlanıp, buz içinde kriyotüplerde dondurulacaktır.
Saklama sıcaklığı:	Sıvı nitrojen buhar fazı (9)

Philadelphia Kromozomu Negatif Lösemi Hücre Hattı; **HL-60**

Büyüme özellikleri:	Süspansiyon
Organizma:	<i>Homo sapiens</i> (insan)
Morfoloji:	Miyeloblastik
Kaynak:	Peripheral kan
Hastalık:	Akut promiyelositik lösemi
Hücre tipi:	Promiyeloblast
Tümörigenik:	Evet
Onkogen:	myc +
Yaş:	36
Cinsiyet:	Bayan
Köken:	Beyaz
Açıklamalar:	HL-60 S.J. Collins tarafından 36 yaşında akut promiyelositik lösemili beyaz ırk bir bayanın periferel kan hücrelerinden lökoferez ile elde edilmiştir. HL-60 hücreleri spontane olarak farklılaşabilir ve farklılaşma butirat, hipoksantin, forbol mristik asit (PMA, TPA), dimetilsülfoksit (DMSO, 1% to 1.5%), aktinomisin D, ve retinoik asid tarafından stimule edilebilir. Hücreler kemotaktik uyarılara fagositik aktivite ve yanıt sergilerler. Bu hat myc onkogen ekspresyonu için pozitifdir.
Üretme:	Baz medyum olarak Iscove's Modified Dulbecco's Medium, (Catalog No. 30-2005). Büyüme ortamına final konsantrasyonda %20 fetal sıgır serumu ilave edilecektir.
Atmosfer:	Hava, %95; Karbondioksit, %5
Sıcaklık:	37,0°C

Subkültür: Kültürün devamlılığı taze medyum ilave edilerek ve ya tamamen değiştirilerek sağlanacaktır. Alternatif olarak, kültürler santrifüj sonrası süspansiyonda 1×10^5 canlı hücre/ml olacak şekilde taze besiyeri ile devam ettirilecektir.
Hücre konsantrasyonunun 1×10^6 hücre/ml'yi geçmemesi sağlanacaktır.
Medyum yenileme: 2-3 günde bir
Dondurma ortamı: Kültür ortamı, %95; DMSO, %5 olacak şekilde ayarlanıp, buz içinde kriyotüplerde dondurulacaktır
Saklama sıcaklığı: Sıvı nitrojen buhar fazı (9)

İnsan Lösemi Kanseri Kök Hücre Hattı

Organizma: Homo sapiens (insan)
Kaynak: İnsan lösemi kanser dokusu
Donörler: Kan donör enfeksiyöz hastalık paneli (ABO/RH, Hepatit B yüzey antijeni, HIV1 ve 2, Sifilis, hepatit B çekirdek, İnsan T Lenfosit Virüs 1 ve 2, Hepatit C Virüs, Antibodi incelemeleri, HIV 1 HCV için Nükleik Amplifikasyon Testi, Batı Nil Virüsü ve Antibodies to Trypanosoma cruzi için antibody testi) uygulanmıştır.
Kültür medyum: Celprogen İnsan (Parental) Lösemi Kanseri Kök Hücre Tam Büyüme Medyum
Flask: İnsan (Parental) Lösemi Kanseri Kök Hücre Ekstraselüler Matriksi kaplı flask
Ortam değişikliği: 48 saatte (medium pembeden sarıya dönünce)
Subkültür: 24-48 saatte bir İnsan (Parental) Lösemi Kanseri Kök Hücre Ekstraselüler Matriksi üzerinde
Büyüme: %95 tutunan %5 süspanse hücreler karışıktır.
Sıcaklık: 37°C
CO₂: %5
Pozitif markerlar: Oct-4, CD133(3-5%), telomeraz, AP, CA199, CEA
Saklama koşulları: Sıvı nitrojen buhar fazı (34)

BÖLÜM II

2.1. GEREÇ VE YÖNTEM

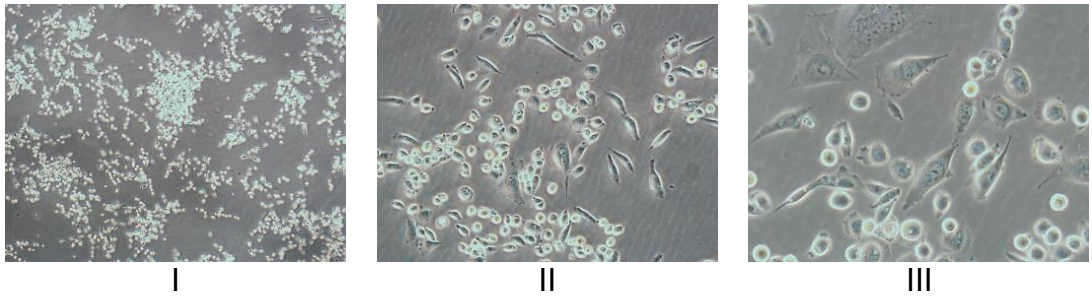
2.1.1. Hücre Kültürü

Hücre hatları, laboratuvar çalışmalarında ve in vitro kanser araştırmalarında model olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Hücre hattı kullanımının bir takım avantajları bulunmaktadır. Muamele edilmeleri kolaydır ve sınırlı koşullarda bile limitsiz üreyebilme yeteneğindedirler. Ayrıca, yüksek derecede homojenite gösterirler ve donmuş stoklardan kolaylıkla kullanılabilir hale getirilebilirler.

In vitro koşullarda gerçekleştirilen hücre kültürü çalışmalarında kullanılan besi ortamı, hücrelerin in vitro koşullar altında yaşayabilmeleri, büyüebilmeleri ve proliferasyonu için uygun olmalı ve gerekli maddeleri içermelidir. Hücre hatları uygulanacak işlemlere hazırlamak için 25 ve 75 cm² lik flasklar içerisine ekildiler. Kültür ortamı olarak lösemi kök hücre hattı için Celprogen İnsan (Parental) Lösemi Kanser Kök Hücre Tam Büyüme Medyumu, HL-60 ve NCI-BL 2171 hücre hatları için RPMI 1640 (Biological Industries), K562 hücre hattı için Iscove's Modified Dulbecco's Medium, %10 Fetal Sığır Serum (FBS), 2mM L-glutamin, %1 Penisilin/Streptomisin (Biological Industries) kullanıldı. İnsan lösemi kanser kök hücre hattı diğer hücre hatlarından farklı olarak, İnsan (Parental) Lösemi Kanser Kök Hücre Ekstraselüler Matriksi kaplı flasklarda büyütüldü. Hücrelerden yeterli üreme

elde edilen kadar 37°C' de %95 nem ve %5 CO₂'li etüvde inkübe edildi. Hücrelerin proliferasyonu, pasajları ve takip işlemleri Inverted Mikroskop kullanılarak düzenli olarak takip edildi.

Çalışmamızda hücre hatlarından, K562 hücre hattı Ph+ kronik myeloid lösemi modeli, HL-60 hücre hattı Ph- lösemi modeli olarak ve kontrol grubu olarak NCI-BL2171 lösemi olmayan normal hücre hattı kullanıldı. Imatinib dirençli hücre hattı K562/ima3 hücre hattı Doç. Dr. Yusuf BARAN' dan (İYTE) temin edildi. Ayrıca ticari olarak elde edilen insan lösemi kanser kök hücre hattı (Cat no: 36111-38P-T75, Celprogen) kullanıldı (Şekil 22).



Şekil 22. İnsan lösemi kanser kök hücre inverted mikroskop görüntüleri

I. 5X büyütme II. 10X büyütme III. 20X büyütme

Hücrelere logaritmik doz aralığında (1nM-100µM) imatinib (Cat no: S1026, Selleckchem), dasatinib (Cat no: S1021, Selleckchem) ve ponatinib (Cat no: S1490, Selleckchem) etken maddeleri uygulandı ve ajan verilmeyen hücre dizileri de kontrol grubu olarak paralel değerlendirildi. Imatinib 120 mM, dasatinib ve ponatinib 48 mM olacak şekilde DMSO' da çözüldü. Çalışmamızda kulanlar cihazlar ve kimyasallar Tablo 2' de verildi

Tablo 2. Hücre kültüründe kullanılan ekipmanlar ve maddeler

15 ve 50 ml falkon tüp (Corning)	İnsan (Parental) Lösemi Kanser Kök Hücre Ekstraselüler Matriksi kaplı 6' lı ve 96' lı mikrolak (Celprogen)
25 ve 75 cm ² lik flask (Corning)	İnsan (Parental) Lösemi Kanser Kök Hücre Tam Büyüme Medyum (Celprogen)
6' lı mikrolak (Corning)	İnsan lösemi kanser kök hücre hattı (Celprogen)
96' lı mikrolak (Corning)	K-562 hücre hattı (ATCC)
96' lı mikrolak Opak (Corning)	K-562/ima3 hücre hattı (Doç. Dr. Yusuf Baran)
Annexin V-EGFP Apoptosis Detection Kiti (Biovision)	Kloroform (Sigma)
Cell Proliferation Reagent WST-1 (Roche)	Laminar Air Flow
CO ₂ 'li incubator	L-glutamin (Biological Industries)
Dasatinib (Selleckchem)	Mitoprobe JC-1 Kit (Life Technologies)
Derin dondurucu	NCI-BL2171 hücre hattı (ATCC)
DMSO (Sigma)	Neubauer Lam
E-Plate (Roche xCELLigence System)	Penisilin/Streptomisin (Biological Industries)
Etanol (Sigma)	pH-metre
Filtre 0,2 µm (Millipore)	Pipetman seti (0,1–1000µl)
Fluoresan mikroskop	Ponatinib (Selleckchem)
Fötal bovine serum (Biological Industries)	Premo Autophagy Tb/GFP TR-FRET LC3B Expression Kit (Life Technologies)
Hassas terazi	Proteaz inhibitörü (Roche)
HL-60 hücre hattı (ATCC)	RPMI 1640 (Biological Industries)
Human GenoExplorer microRNA kit (Genosensor)	Santrifüj
Imatinib (Selleckchem)	Shaker
Inverted mikroskop	Soğutmalı Santrifüj
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Biological Industries)	Total RNA İzolasyon Kiti (Roche)
Işık mikroskobu	Tripan Blue (Biological Industries)
İnsan (Parental) Lösemi Kanser Kök Hücre Ekstraselüler Matriksi kaplı 75 cm ² lik flask (Celprogen)	Vortex

2.1.2. Hücre Canlılık Testi

Kültüre edilen hücrelerin canlılıklarını ve sayılarını takip etmek amacıyla, Tripan mavisi boyası testi kullanıldı. Buna göre, 50 µl süspanse hücrelere 50 µl boya karıştırılarak, ışık mikroskobu altında hücrelerin canlılığı

ve sayısı "Neubauer" lam kullanılarak değerlendirildi. Bu amaçla, "Neubauer" lamda bulunan 4x4' lük karelerden oluşmuş 4 alan sayıldı. Tripan mavisi boyasını membran bütünlüğü bozulduğundan dolayı boyayı içine alıp mavi renkte görünen hücreler ölü, boyayı içine almayanlar ise canlı olarak değerlendirildi. Canlı hücre toplamının ortalaması alınarak dilüsyon faktörü ve 2×10^4 ile çarpılmasıyla, ml başına düşen canlı hücre sayısı saptandı. Aynı işlem ölü hücreler için de gerçekleştirildiğinde, ml başına düşen ölü hücre sayısı belirlendi. Hücre canlılığı ise, toplam hücre sayısının canlı hücrelere % olarak oranlanmasıyla belirlendi.

Lösemi ve normal hücre hatlarındaki hücre sayısının validasyonu Innovatis tip Cedex XS adlı cihaz ile gerçekleştirildi.

1. Eşit hacimde hücre ile Tripan mavi boyası karıştırıldı. (Örneğin 10µl hücre 10µl Tripan mavisi)
2. Cedex ölçüm Slide'ına 10µl karışım eklendi.
3. Slide cihazın içerisine yerleştirildi.
4. Cedex yazılımında gerekli isim, dilüsyon, tekrar sayısı girilerek, ölçüm başlatıldı.
5. Sonuçlar, toplam hücre sayısı, stoktaki ölü ve canlı hücre sayıları, canlılık yüzdesi, agregat oranı, ortalama hücre çapı olarak alındı.

2.1.3. Sitotoksisite Analizi

Ticari olarak temin edilen etken maddelerin tüm hücre hatlarında ayrı ayrı sitotoksisitesini belirlemek üzere WST-1 (WST-1 Cell Proliferation

Reagent,-Roche) yöntemi uygulandı. WST-1, radyoaktif madde içermeyen ve hücre proliferasyonunun, canlılığının veya kemoduyarlılığının spektrofotometrik olarak ölçülmesini sağlayan bir solüsyondur. Bu yöntemin temeli metabolik olarak aktif olan canlı hücrelerin, sarı olan tetrazolium tuzlarını keserek turuncu formazan boyası rengine dönüştürmesine dayanmaktadır. WST-1 ile hücre canlılığı tespit edildi.

Model lösemi hücreleri 96-kuyucuklu platelerde başlangıç yoğunluğu 1 ml'de 1×10^6 hücre olacak şekilde ayarlanıp her kuyucuğa 100 μ l hücre dağıtıldı. Her hücre hattına 1 nM-100 μ M aralığında etken maddeler ayrı ayrı eklendi. Son sıraya etken madde verilmedi, kontrol olarak kabul edildi. 24, 48 ve 72. saat inkübasyondan sonra her kuyucuğa 20 μ L WST-1 solüsyonu eklendi ve 15 dakika inkübe edildi. On beş dakikalık inkübasyon süresinden sonra oluşan turuncu formazan boyasının kantitatif ölçümü 15 dk' da bir mikropalak okuyucusunda (Multiskan FC, Thermo) 450 nm absorbands 620 referans aralığında ölçülecek ve kolometrik olarak değerlendirildi. Etken maddelerin IC_{50} değerleri Sigmoidal doz-cevap eğrisi analizi ile "Calculus" (Biosoft) yazılımında hesaplandı.

2.1.4. Apoptoz Analizleri

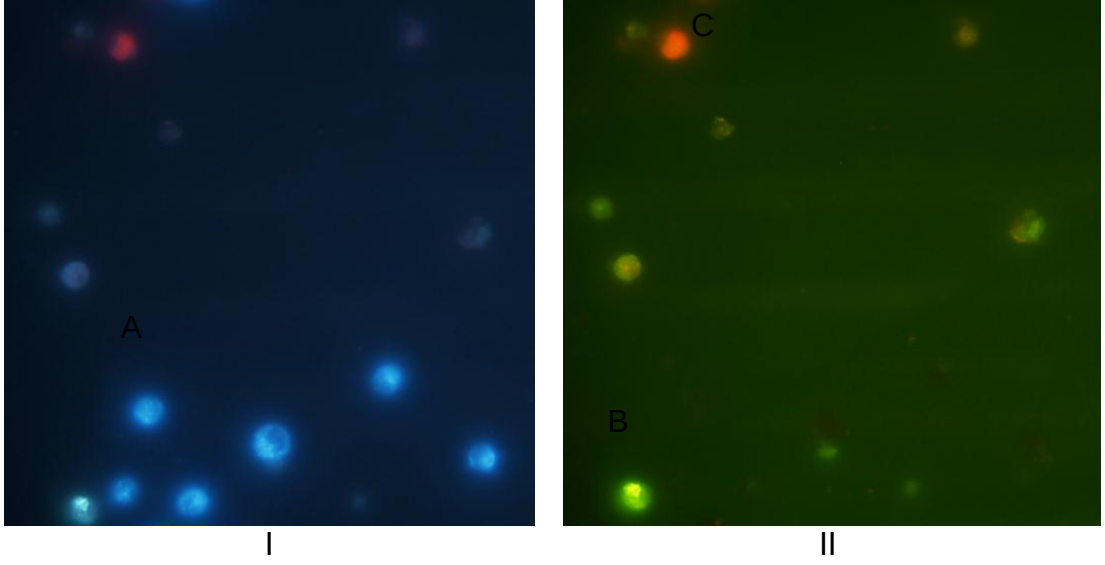
Etken maddelerin IC_{50} dozlarının hücre hatları üzerindeki apoptotik etkileri muameleden sonra 24., 48. ve 72. saatlerde çalışıldı. Etken madde ile muamele edilmeyen grup kontrol grubu olarak alındı. Apoptoz analizleri 2 farklı yöntem ile 3 replikalı olarak çalışıldı.

2.1.4.1. Annexin V Yöntemi

Apoptoz indüksiyonu sırasında meydana gelen ilk olaylardan biri sitoplazma membranının iç yüzünden dışına doğru fosfatidilserin birikmesi ve stabilizasyonudur. Dış yüzeyde, fosfatidilserin fagositoz için hedef hücrelerin belirlenmesinde görev yapmaktadır. Anneksin-V fosfatidilserine spesifik olarak bağlanan 35 kilodaltonluk bir proteindir. Sağlam hücrelerin fluorokroma bağlı anneksin-V ile boyanması apoptozun erken dönemlerindeki hücreleri belirler. Membran bütünlüğünü ölçen canlı/ölü hücre diskriminatörü propidium iyodür (PI) ile birlikte kullanıldığında, erken apoptotik hücreler (sadece anneksin-V pozitif olanlar) geç apoptotik/nekrotik hücrelerden (anneksin-V ve PI pozitif) ayrıştırılabilir. Erken apoptotik faz oldukça hızlı gerçekleşebilir ve canlı ya da geç apoptotik/nekrotik hücreleri görünür hale getirerek ortadan kaybolabilir. Bu nedenle, geç apoptoz/nekroza girmeden önce erken apoptoza girdiklerini kanıtlamak için zamana bağımlı bir deney gerçekleştirmek oldukça gereklidir.

Boyanmamış hücreler canlıdır ve her iki açıdan da negatiftir; Sadece anneksin V ile boyanmış hücreler apoptotik hücrelerdir; yüzeylerinde fosfatidilserin ekspresyonu başlamıştır ancak, sitoplazmik membranlarının geçirgenliğine neden olan sürece henüz girmemişlerdir. Geç apoptotik hücreler yüzeylerinde fosfatidilserin eksprese ederler ve hasar görmüş membranlarından PI' yı içlerine alırlar. Annexin V EGFP Apoptosis Detection Kiti (Biovision), apoptoz başlangıcından sonraki gözlemlere dayanmaktadır: Çoğu hücre tipi plazma membranının iç yüzeyindeki fosfatidilserini hücre yüzeyine transloke eder. Hücre yüzeyine geldiği zaman fosfatidilserin,

fosfatidilserine yüksek affinite gösteren ve geliştirilmiş yeşil floresan proteini (Enhanced GreenFluoresan Protein-EGFP) ile işaretli Annexin V ile boyanarak kolaylıkla belirlenebilir (Şekil 23). Analiz, akım sitometresi ya da FITC filtresi kullanılarak floresan mikroskobu ile gerçekleştirilebilir. EGFP, diğer floresan ajanlara göre daha parlaktır ve ışığa karşı daha kararlıdır.



Şekil 23. Annexin V-EGFP yönteminde floresan mikroskobunda I. DAPI ile görüntülenmiş hücreler II. FITC ile görüntülenmiş hücreler **A.** Canlı Hücre **B.** Apoptotik Hücre **C.** Nekrotik Hücre

Annexin V-EGFP Yöntem Protokolü:

1. Hücreler etken maddelerin IC_{50} dozlarına 72. saate kadar maruz bırakıldı.
2. $1-5 \times 10^5$ hücre santrifüj edilerek toplandı.
3. Hücreler 500 μ l 1X Binding Buffer ile resüspanse edildi.
4. 5 μ l Annexin VEGFP ve 5 μ l propidyum iyodür eklendi.

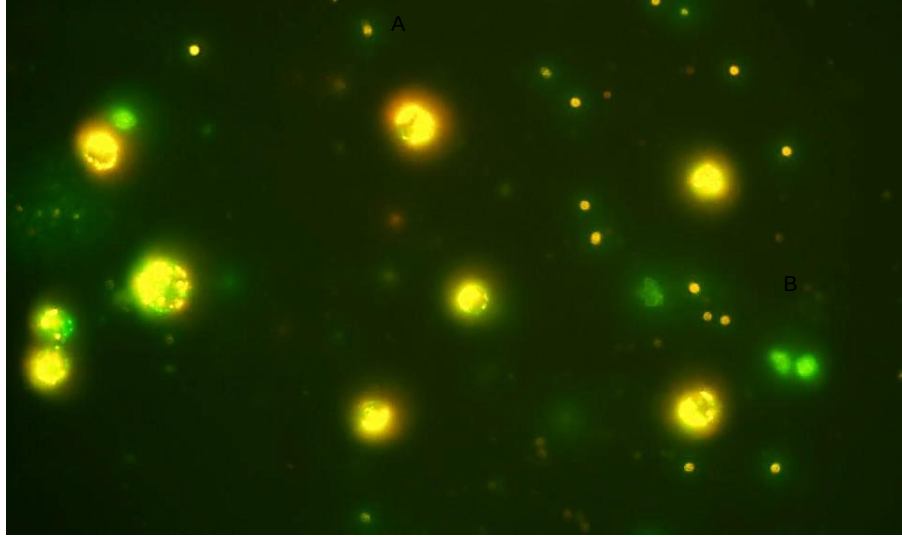
5. Beş dakika karanlıkta oda sıcaklığında bekletildi. Floresan mikroskopta incelendi ve dijital ortama anlınan görüntülerden en az 200 hücrenin analizi gerçekleştirildi.

2.1.4.2. Mitoprobe JC-1

JC-1, ilk olarak, mitokondriyal transmembran potansiyelinin sitofluorimetrik analizi için prob olarak kullanılmıştır ve canlı hücrelerdeki mitokondrilerin işaretlenmesinde en uygun madde olarak tanınmıştır. Canlı hücrelerde, sitoplazmaya monomer olarak girer. 570nm' de (yeşil floresan) emilir ve eksitasyondan sonra 490nm' de okunur. Mitokondriler tarafından alınır. Negatif yüklü, hiperpolarize mitokondri matriksi tarafından emilir ve 590nm' de (turuncu-kırmızı floresan) emilen J agregatları oluşturur. Bu iki yapı arasındaki değişim, JC-1' in sitoplazma tarafından alınmasına bağlıdır ve, J agregatlarının oluşumu ve emisyon spektrumunun yeşilden kırmızıya dönüşmesiyle sonuçlanan mitokondrial transmembran potansiyel (MTP) fonksiyonu olarak mitokondriyal birikime bağlıdır. JC-1, apoptozun en başlarında oluşan MTP değişikliklerinin analizi için kullanılan en iyi prob olarak bilinmektedir. Bu nedenle günümüzde, apoptotik hücre ölümüne doğru giden hücrelerin sayımı için de uygulanmaktadır. Apoptotik hücreler, yeşil floresandaki yükselme ve kırmızı floresandaki düşüş ile tanımlanmaktadır (Şekil 24).

Mitokondriyal transmembran potansiyeli, Mitoprobe JC-1 yöntemi ile belirlendi. Kullandığımız kit manüeline (Invitrogen) göre; 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1) ile etken maddenin IC₅₀ değerine maruz bırakılmış ve kontrol hücre süspansiyonları

boyandı. JC-1' in değeriendirilmesi floresan mikroskop "tri-bandpass" filtre ile yapıldı ve dijital ortama anlınan görüntülerden en az 200 hücrenin analizi gerçekleştirildi.



şekil 24. Mitoprobe JC-1 yönteminde floresan mikroskopunda FITC ile görüntülenmiş hücreler A. Canlı Hücre B. Apoptotik Hücre

Mitoprobe JC-1 Yöntem Protokolü:

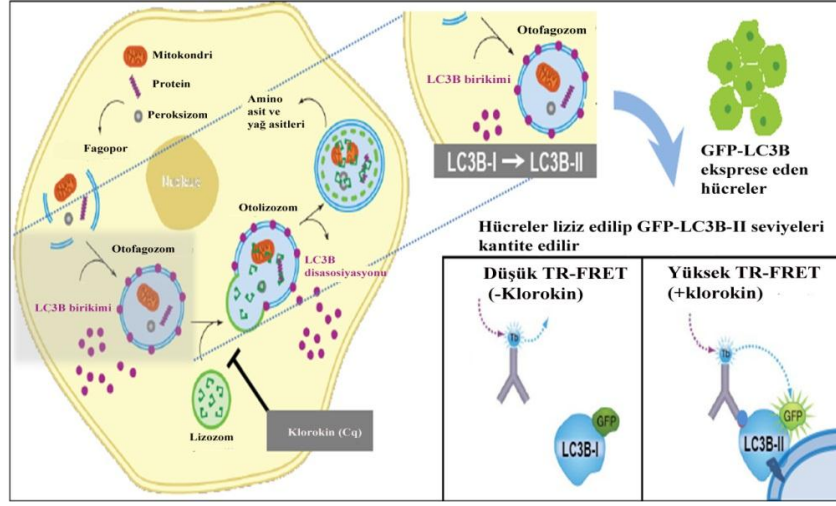
1. Hücreler etken maddelerin IC₅₀ dozlarına 72. saate kadar maruz bırakıldı.
2. 1-5 x 10⁵ hücre santrifüj edilerek toplandı.
3. Hücreler 1000 µl serumsuz ortam ile resüspanse edildi.
4. 10 µl JC-1 eklendi.
5. Karanlıkta 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde 15-30 dk bekletildi.
6. Santrifüj edilerek hücreler toplandı.

7. 100 µl PBS ile resüspanse edildi ve floresan mikroskopta incelendi

2.1.5. Otofaji

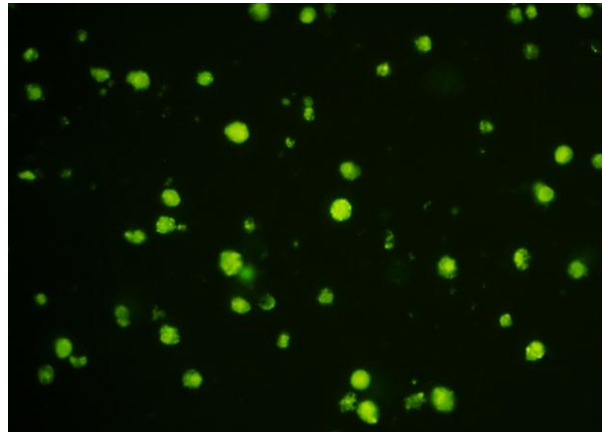
Otofaji, organeller, proteinler ve makromoleküller gibi hasar görmüş, istenmeyen hücre bileşenlerinin sindirilerek hücrenin canlılığını sağlayan bir süreçtir ancak, aşırı otofaji indüksiyonu “tip II programlı hücre ölümü” olarak adlandırılan non-apoptotik bir hücre ölümünü başlatır. LC3B molekülü otofajizom oluşumuyla ortaya çıkan bir molekül olduğundan otofajinin belirlenmesinde indikatör olarak kullanılmaktadır. Otofaji Premo Autophagy Tb/GFP TR-FRET LC3B Expression Kit kullanılarak analiz edildi. Serbest halde bulunan LC3B molekülü (LC3B-I) otofajizom yapısına katılır (LC3B-II). LC3B-II molekülüne bağlanmış yeşil Floresan proteini (LC3B-GFP) füzyonu üreten hücrelerde, TR-FRET immunoassay kullanılarak otofaji aktivitesi ölçüldü.

Etken maddelerin IC₅₀ dozlarının hücre hatları üzerindeki otofajik etkileri incelendi. İlaçla muamele edilmeyen grup kontrol grubu olarak alındı. Otofagozomu bloke ederek LC3B-II birikimine neden olan bir molekül olan klorokin ile muamele edilen grup ise otofajinin pozitif kontrolü olarak kabul edildi (Şekil 25). Otofaji analizleri 3 replikalı olarak çalışıldı.



Şekil 25. Premo Autophagy Tb/GFP TR-FRET LC3B Expression Kit mekanizması

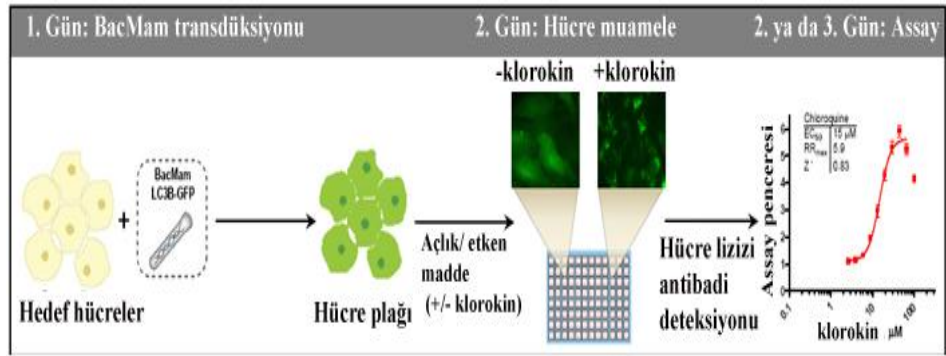
BacMam (Baculovirüs sistemi) medyum ile 1/3 oranında seri dilüsyonları yapıldı (%10, %3, %1, %0,3, %0,1). 1 ml'de $3,3 \times 10^5$ konsantrasyonundaki hücrelerin 630 µl'si ile 70 µl BacMam dilüsyonları ayrı ayrı karıştırıldı. Karışım opak 96 well plate'e 60'ar µl olarak dağıtıldı ve 24 saat karanlıkta %5 CO₂ 37°C'de inkübe edildi. Bu işlem sonucunda hücrelere yeşil floresan proteinin BacMam ile tranfeksiyonu sağlandı (Şekil 26).



Şekil 26. BacMam ile transfekte olmuş hücrelerin floresan mikroskop görüntüsü

24. saatin sonunda 15'er µl 5x klorokin, test kuyucuklarına da 15'er µl 5x IC₅₀ değerinde imatinib, dasatinib ve ponatinib dağıtıldı. 24 saat daha aynı koşullarda inkübasyona bırakıldı.

48. saatin sonunda 576 µl 6x lysis buffer, 17,5 µl proteaz inhibitörü ve 3,5 µl Tb-anti-LC3B antibody karışımı her kuyucuğa 15'er µl olacak şekilde dağıtıldı. 2 saat karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra TR-FRET immunoassay kullanılarak otofaji aktivitesi "Varioskan Flash Multimode" (Thermo) mikropalak okuyucuda belirlendi (Şekil 27). TR-FRET emisyon oranı (515 nm/488 nm) akseptör emisyon değerinin (515 nm) donör emisyon değerine (488 nm) bölünmesi ile elde edildi. Pozitif kontrol kuyucuklarındaki BacMam dilüsyonlarından en yüksek LC3B-II artışı gösteren dilüsyon oranı baz alınarak etken maddelerin otofaji üzerine olan etkileri yorumlandı.



Şekil 27. Premo Autophagy Tb/GFP TR-FRET LC3B Expression Kit protokolü

2.1.6. miRNA Profilleme

Etken maddelerin IC₅₀ dozları ile muamele edilen ve edilmeyen lösemi, kontrol ve kök hücre hatlarında miRNA array ile ekspresyon profili belirlendi.

Bu amaçla miRBase 16.0'yı tamamen kapsayan, ek olarak prekürsör ve matur miRNA'ları içeren içeren problemlara sahip olan "GenoExplore" miRNA Kit (Genosensor) mikrodizini kullanıldı. Her bir prob plaka üzerine triplik spotlanmıştır. Arrayin normalizasyonu ve kalite kontrolü, pozitif ve negatif kontrol problemleri ile yapılmaktadır. İşaretleme sistemi miRNA'nın 5' ucunun biotin ile işaretlenmesine dayanır. Hücre hatlarından miRNA ekspresyon profilinin belirlenebilmesi için total RNA izolasyonu yapıldı. Ardından küçük RNA'lar biyotin ile işaretlendi. Biyotininle işaretlenmiş örnekler GenoExplorer miRNA Biochip üzerine hibridize edildi. Daha sonra Nimblegen Array Scanner ile biyoçip tarandı. Daha sonra biyoinformatik analiz yapıldı. Mikroarray çalışması sonucunda ifadelerinde farklılık görülen miRNA'lar Real-Time PCR ile valide edildi.

2.1.6.1. Total RNA izolasyonu

Imatinib, dasatinib ve ponatinibin IC₅₀ dozu uygulanmış ve uygulanmamış hücre hatlarından total RNA izolasyonunda, 18 nükleotidin üzerindeki bütün RNA'ları saflaştırabilen böylece küçük RNA'ları (örn.miRNA) da izole edebilen miRNeasy Kiti (Qiagen) kullanıldı. Kit fenol / guanidinin tiyosiyanat'dan oluşan monofazik bir solüsyon (QIAzol Lysis Reagent) ile hücrelerin parçalanmasına ve total RNA'nın silika membran kolonla saflaştırılması temeline dayanmaktadır.

1. Plateledeki hücreler (1×10^7) santrifüj tüpüne alınarak 2500 rpm'de santrifüj yapıldı.

2. Pelet Üzerine 700 µl *QIAzol Lysis Reagent* eklendi. Lizat vorteksle veya pipetlenerek göründü. Hiçbir hücre pelet yığını kalmayıncaya kadar karıştırıldı.
3. Karışım Qiashredder'a aktarıldı 13000 rpm'de 2 dk santrifuj edildi.
4. 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
5. Kolon atılıp üzerin 150 µl kloroform eklendi ve çalkalandı.
6. 2-3 dk oda sıcaklığında inkübe edildi ve 4°C'de 13000 rpm'de 15 dk santrifuj edildi.
7. Renksiz faz yeni ependorfa aktarılarak üzerine hacminin 1,5 katı kadar %100'lük etanol eklendi.
8. Karışım RNeasy Mini spin kolonlara aktarıldı ve 13000 rpm'de 15 s santrifuj edildi.
9. 350 µl Buffer RWT eklenip 13000 rpm'de 15 s santrifuj edildi.
10. 10 µl DNase ve 70 µl Buffer RDD karışımı kolon üzerine eklenip 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
11. 350 µl RWT tampon eklenip 13000 rpm'de santrifuj yapıldı.
12. Kolon üzerine 500 µl *Buffer RPE* yıkama tampon eklendikten sonar 13000 rpm'de 15 s santrifüj edilerek iki kez yıkandı
13. Elüsyon atılırken kolon elüsyonla temas etmeyecek şekilde yeni bir toplama tüpüne aktarıldı. Herhangi bir yıkama tamponu veya elüsyon

artığını elimine etmek için yeni toplama tüpü içine yerleşik kolon, en yüksek hızda 1 dk. santrifüj edildi.

Total RNA'nın (küçük RNA'ları da içeren) elüsyonu için kolon 1,5 ml'lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildikten sonra 40 µl RNase-free su direkt olarak membran üzerine eklenerek 13000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi. Böylece miRNA gibi küçük RNA'ların da yer aldığı total RNA'yı içeren elüsyon elde edildi. Daha yüksek RNA konsantrasyonu elde etmek istenirse ilk elüsyonu kullanılarak aynı kolon üzerinden ikinci bir elüsyon gerçekleştirilebilir.

2.1.6.1.1. RNA miktarlarının ölçümü ve kalite kontrolü:

Elde edilen RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflıkları 260 / 280 nm dalga boylarında absorbanlarının ölçülmesiyle belirlendi. Ölçümler her bir örnekten 1,5µl kullanılarak Nanodrop, Thermo Scientific aletinde gerçekleştirildi. İzole edilen RNA'ların saflığı 260 nm ve 280 nm'deki absorbanlarının oranı ile kontrol edilerek, ideal saflıkta kaliteli RNA'nın A260/ A280 ve A260 /A230 absorbans oranının $\geq 1,8$ olması beklenildi. Nanodrop'la spektrofotometrik ölçümün yanı sıra RNA yeterli moleküler ağırlığa sahip olduğu doğrulanması ve degradasyonunun kontrolü için Agilent 2100 Bioanalyzer sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Analizler 250ng total RNA örneği ile Agilent Bioanalyzer ve RNA 6000 Nano Assay Reagent Kit kullanılarak gerçekleştirildi. Jel görüntüsünde 28S ve 18S ribozomal bantları keskin bir şekilde görünmelidir. Yeterli ağırlıkta olmayan ve degradasyon görülen örnekler çalışma dışı bırakılarak işaretleme ve hibridizasyon aşamalarına geçildi.

2.1.6.2. İşaretleme

Total RNA'nın işaretleme için "GenoExplorer miRNA labeling" kiti kullanıldı. miRNA'lar 5' uçlarından biyotin ile işaretlendi. Kitin seçici özelliği standart 3' ucundan işaretleme yerine, başlık yapısı içermeyen RNA'ların 5' ucundan işaretleme yapmasıdır. Bu sayede sağlam mRNA'lar işaretlenmezken, 5' başlık yapısı bulunmayan rRNA, tRNA, smallRNA, miRNA, siRNA ve snRNA'lar işaretlenmektedir. Streptavidin bağlı boya kit içinde bulunmaktadır ve hibridizasyon sonrası kullanıldı. İşlem için 2.5-10 µg total RNA kullanıldı.

- Buffer L buz üzerinde 15-20 dakikada çözüldü. Herhangibir kalıntı olması durumunda solüsyon 37°C'de çalkalanarak homojenizasyon sağlandı.
- Buffer L çözündükten sonra vortekslendi ve santrifüjlendi.
- Buffer L bir seferde kullanılacak miktarlar kadar alıktı.
- miRNA işaretleme reaksiyon karışımı aşağıdaki Tablo 3' e göre hazırlandı. Tüm işlemler buz üzerinde yapıldı ve viskoz Buffer L yavaşça pipetlendi.

Tablo 3. miRNA işaretleme reaksiyonu kimyasal hacimleri

Kimyasal	Hacim (µl)
Buffer L	7.0
RNA (2,5-10 µg)	Ayarlanacak
RNAase-free water	Ayarlanacak
Enzyme L	0.5
Total	20

- Reaksiyon karışımı pipetle alt-üst edilerek karıştırıldı.
- 20°C'de 3 saat inkübe edildi.
- Daha sonra 75°C'de 20 dakika inkübe edilerek, enzim inaktive edildi.

- Hibridizasyon aşamasına kadar buzda muhafaza edildi. İşaretli örnekler daha sonra kullanılmak üzere -70°C'de saklanabilir.

2.1.6.3. Hibridizasyon

“GenoExplorer” miRNA mikrodizini, 25mm x 75mm ölçülerinde cam slaytlardan oluşmaktadır. Mikrodizine amin-modifiye oligonükleotid proplar kovalent olarak bağlanmıştır. Biotinle işaretlenmiş miRNA örnekleri biyoçipe yüklenir ve hibridizasyon gerçekleşir. Ardından streptavidin ile muamele edilir ve ışımalar array tarayıcı ile toplanır.

- İşaretlenmiş RNA örnekleri kullanılacak Nimblegen HX1 mikserin hacmine uygun orandaki 2X hibridizasyon solüsyonu ve su ile karıştırıldı.

- Örnekler 95°C'de 5 dakika inkübe edilerek denatüre edildi.

- Santrifüjlenerek soğutuldu.

- HX1 mikser, mikrodizin üzerine yerleştirildi.

- Örnekler HX1 mikser içine yavaşça pipetlendi. Hava kabarcığı olması durumunda, kabarcıklar yavaşça itirilerek uzaklaştırılmaya çalışıldı. Mikserin yükleme bölümü kapatıldı.

- Mikrodizin 42°C'deki Nimblegen hibridizasyon fırını içerisine yerleştirilir ve karıştırma modu açıldı.

- 42°C'de 16 saat ve ya daha uzun süre inkübe edildi.

- Hibridizasyonun ardından mikrodizin hibridizasyon fırınından uzaklaştırıldı ve 42°C'deki Wash Buffer1 içinde yavaşça sallanarak, HX1 mikser çıkarıldı.

- Mikrodizin içerisinde, oda sıcaklığındaki Wash Buffer 1 olan yeni bir kap içine alınıp 5 dakika periyodik olarak yavaşça sallanarak yıkandı.

- Mikrodizin içerisinde, oda sıcaklığındaki Wash Buffer 2 olan yeni bir kap içine alınıp 30 saniye periyodik olarak yavaşça sallanarak yıkandı.

- Yıkanan mikrodizin NimbleGen mikroarray kurutucuda 3 dakika kurutuldu.

- Parafilm mikrodizin boyutuna uygun olarak hazırlandı.

- 1:250 oranında dilüe edilmiş SA-S boya solüsyonu, biyoçip üzerine yavaşça pipetlendi. Hava kabarcığı olması durumunda, kabarcıklar yavaşça ittilererek uzaklaştırılmaya çalışıldı.

- Mikrodizin 25°C'deki ısı plağı içerisine yerleştirildi.

- 25°C'de 30 dakika inkübe edildi.

- Hibridizasyonun ardından mikrodizin etüvden uzaklaştırıldı ve Wash Buffer1 içinde yavaşça sallanarak parafilm uzaklaştırıldı.

- Mikrodizin içerisinde, oda sıcaklığındaki Wash Buffer 1 olan yeni bir kap içine alınıp 5 dakika periyodik olarak yavaşça sallanarak yıkandı.

- Mikrodizin içerisinde, oda sıcaklığındaki Wash Buffer 2 olan yeni bir kap içine alınıp 30 saniye periyodik olarak yavaşça sallanarak yıkandı.

- Yıkanan mikrodizin NimbleGen mikroarray kurutucuda 3 dakika kurutuldu.

2.1.6.4. Array Analizi

Mikrodizin analizi nimblegen array scanner kullanılarak yapıldı. Mikrodizine uygun PMT ayarları yapıldı. Mikrodizinler SA-S boyasının sinyaline uygun olan 635 nm dalga boyuna tarandı (Şekil 28). Data analizi GenePix Pro 7 (Molecular Device) yazılımı ile gerçekleştirildi. Mikrodizin sonuçlarının gruplara göre karşılaştırılması CLC Main Workbench 5 (CLCBio)

ile gerçekleştirildi. Sonuçlara normalizasyon ve Log 2 transformasyonu uygulandı. İki grubun karşılaştırılması t-testi ile gerçekleştirildi. t-testinin yanlış anlamlılık vermesini önlemek için p değerlerine “False discovery rate” (FDR) düzeltmesi uygulandı ve düzeltilme yapılmış $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.



şekil 28. miRNA mikrodizin tarama görüntüsü

BÖLÜM III

3.1. BULGULAR

3.1.1. Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi

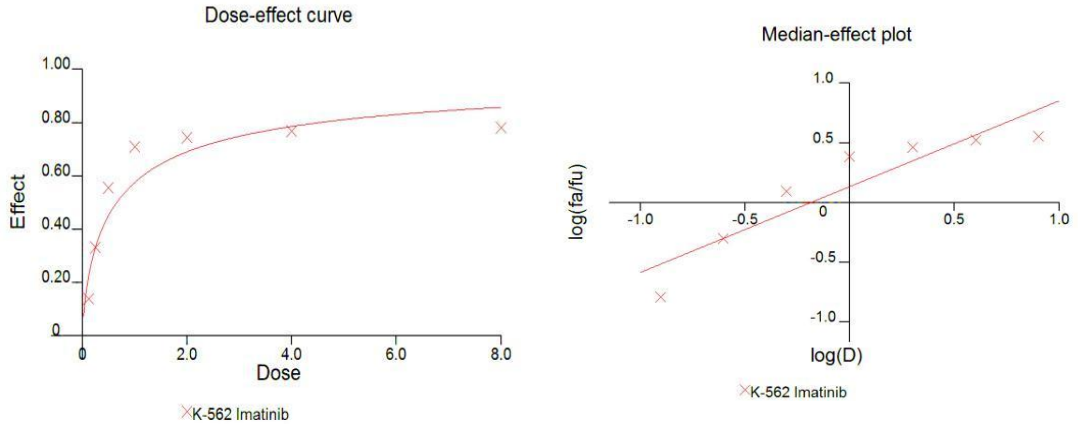
WST-1 ile sitotoksosite analizi, model kronik myeloid lösemi hücreleri olan K562, kontrol hücre modeli NCI-BL 2171, dirençli kronik myeloid lösemi hücre modeli K562/ima3, Philadelphia negatif lösemi modeli ve insan lösemi kanser kök hücre hattı ile hazırlandı. Farklı dilüsyon oranlarında imatinib, dasatinib ve ponatinib hücrelere verilerek sitotoksiteleri değerlendirildi. Etken madde içermeyen hücreler kontrol grubu olarak alındı. Tüm sitotoksosite deneylerine hücre sayısı 1 ml' de $1,25 \times 10^6$ hücre olacak şekilde başlanılmış ve 3 replikalı olarak çalışıldı. Etken maddelerin hücre proliferasyonunda % 50 azalmaya neden olan inhibitör konsantrasyonları yani, IC₅₀ dozları belirlendi.

3.1.1.1. Imatinib WST-1 Testi

3.1.1.1.1. Imatinibin K562 Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin WST-1 ile Değerlendirilmesi

Imatinibin IC₅₀ değerinin belirlenmesinde, imatinibin 0,125 µM, 0,25 µM, 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 4 µM, 8 µM'lık dilüsyonları 24, 48, 72. saatlerde WST-1 testi ile değerlendirildi. Imatinibin K562 hücre hattında IC₅₀ değeri 48. saatte

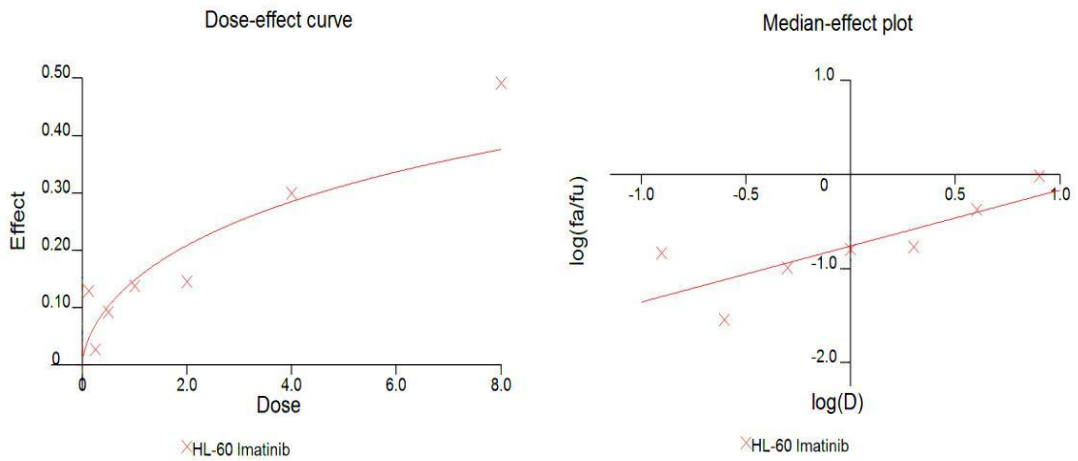
650 nM olarak belirlendi (Şekil 29).



Şekil 29. K562 hücrelerinde imatinibin IC₅₀ dozu

3.1.1.1.2. Imatinibin HL-60 Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin WST-1 İle Değerlendirilmesi

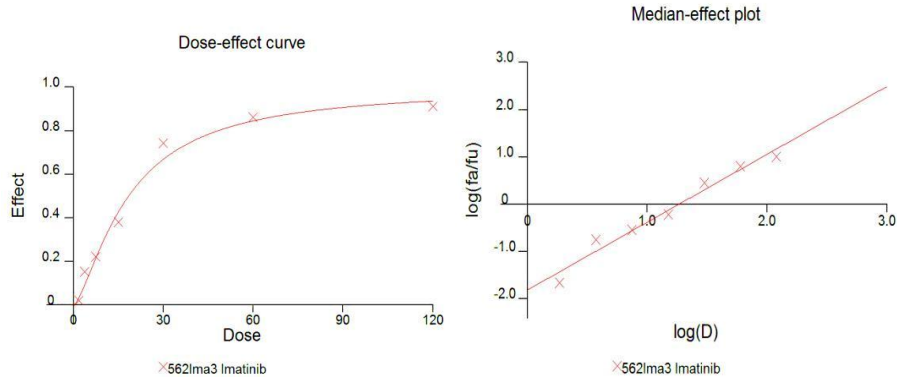
Imatinibin IC₅₀ değerinin belirlenmesinde, imatinibin 0,125 μ M, 0,25 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 4 μ M, 8 μ M'lık dilüsyonları 24, 48, 72. saatlerde WST-1 testi ile değerlendirildi. Imatinibin HL-60 hücre hattında IC₅₀ değeri 48. saatte 18 μ M olarak belirlenmdi (Şekil 30).



Şekil 30. HL-60 hücrelerinde imatinibin IC₅₀ dozu

3.1.1.1.3. Imatinibin K562/ima3 Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin WST-1 İle Değerlendirilmesi

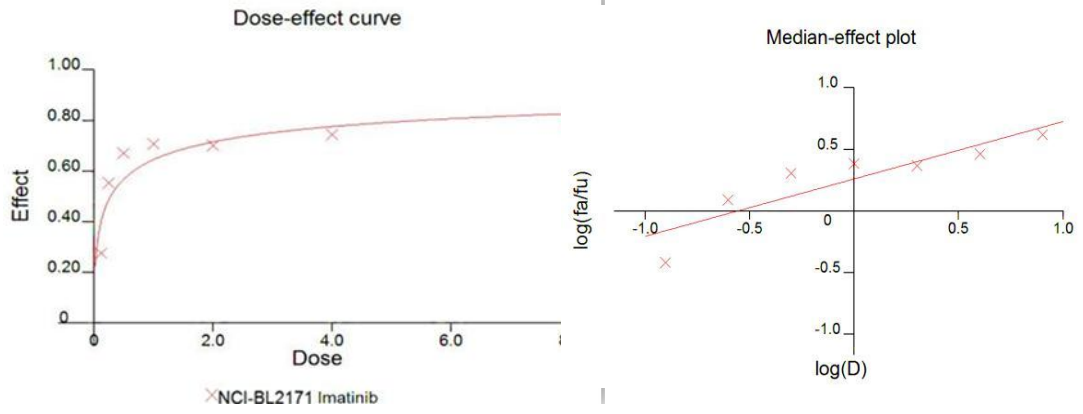
Imatinibin IC₅₀ değerinin belirlenmesinde, imatinibin 1,85 µM, 3,75 µM, 7,5 µM, 15 µM, 30 µM, 60 µM, 120 µM'lık dilüsyonları 24, 48, 72. saatlerde WST-1 testi ile değerlendirildi. Imatinibin K562/ima3 hücre hattında IC₅₀ değeri 48. saatte 18,35 µM olarak belirlendi (Şekil 31).



Şekil 31. K562/ima3 hücrelerinde imatinibin IC₅₀ dozu

3.1.1.1.4. Imatinibin NCI-BL 2171 Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin WST-1 İle Değerlendirilmesi

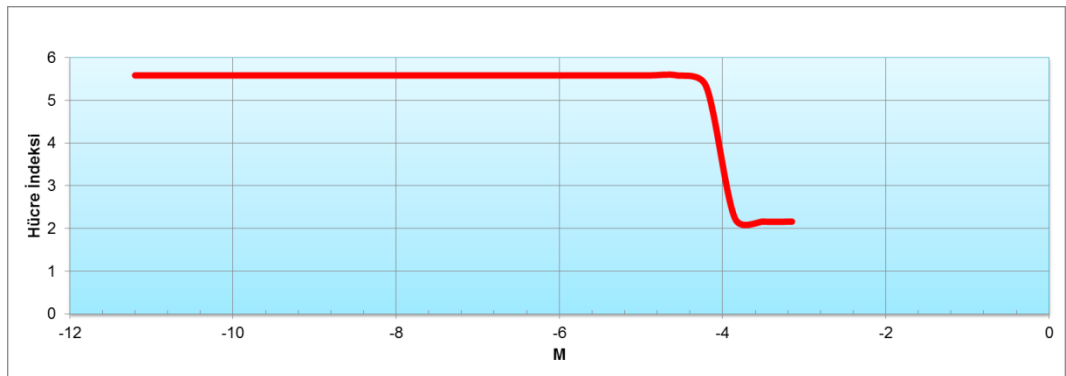
Imatinibin IC₅₀ değerinin belirlenmesinde, imatinibin 0,125 µM, 0,25 µM, 0,5 µM, 1 µM, 2 µM, 4 µM, 8 µM'lık dilüsyonları 24, 48, 72. saatlerde WST-1 testi ile değerlendirildi. Imatinibin NCI-BL 2171 hücre hattında IC₅₀ değeri 48. saatte 274 nM olarak belirlendi (Şekil 32).



Şekil 32. K562/ima3 hücrelerinde imatinibin IC₅₀ dozu

3.1.1.1.5. Imatinibin İnsan Lösemi Kanser Kök Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin WST-1 İle Değerlendirilmesi

Imatinibin IC₅₀ değerinin belirlenmesinde, imatinibin 0,001 μ M, 0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M'lık dilüsyonları 24, 48, 72. saatlerde WST-1 testi ile değerlendirildi. Imatinibin insan lösemi kanser kök hücre hattında IC₅₀ değeri 48. saatte 87,3 μ M olarak belirlendi (Şekil 33).

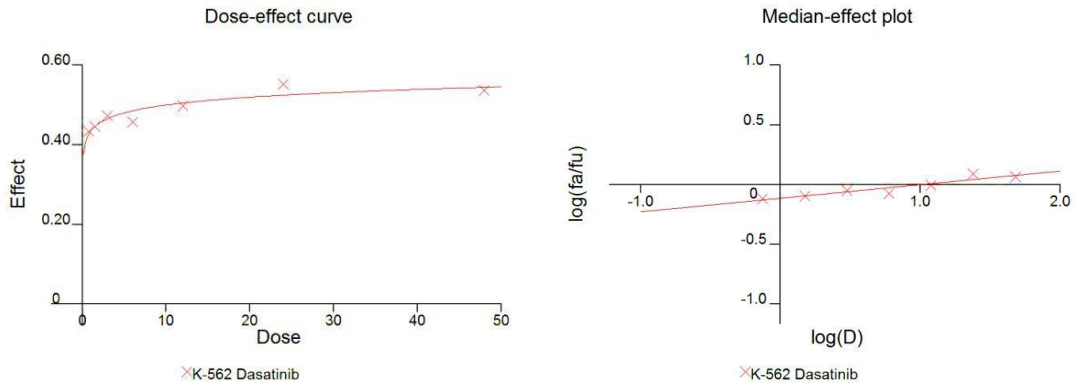


Şekil 33. İnsan lösemi kanser kök hücrelerinde imatinibin IC₅₀ dozu

3.1.1.2. Dasatinib WST-1 Testi

3.1.1.2.1. Dasatinibin K562 Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin WST-1 İle Değerlendirilmesi

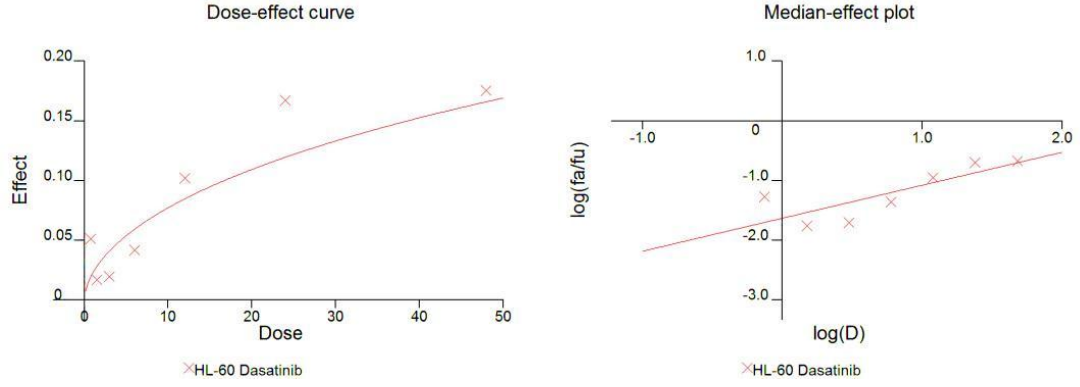
Dasatinibin IC_{50} değerinin belirlenmesinde, dasatinibin 0,75 nM, 1,5 nM, 3 nM, 6 nM, 12 nM, 24 nM, 48 nM'lık dilüsyonları 24, 48, 72. saatlerde WST-1 testi ile değerlendirildi. Dasatinibin K562 hücre hattında IC_{50} değeri 24. saatte 1,7 nM olarak belirlendi (Şekil 34).



Şekil 34. K562 hücrelerinde dasatinibin IC_{50} dozu

3.1.1.2.2. Dasatinibin HL-60 Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin WST-1 İle Değerlendirilmesi

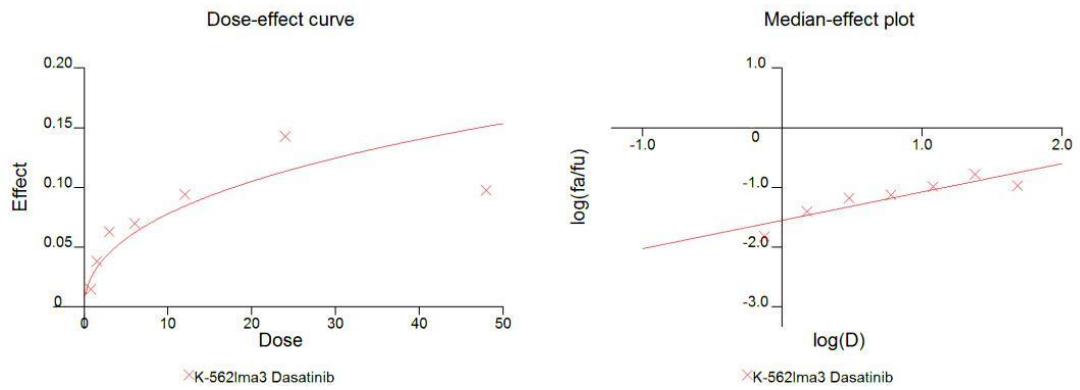
Dasatinibin IC_{50} değerinin belirlenmesinde, dasatinibin 0,75 nM, 1,5 nM, 3 nM, 6 nM, 12 nM, 24 nM, 48 nM'lık dilüsyonları 24, 48, 72. saatlerde WST-1 testi ile değerlendirildi. Dasatinibin HL-60 hücre hattında IC_{50} değeri 48. saatte 896 nM olarak belirlendi (Şekil 35).



Şekil 35. HL-60 hücrelerinde dasatinibin IC_{50} dozu

3.1.1.2.3. Dasatinibin K562/ima3 Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin WST-1 İle Değerlendirilmesi

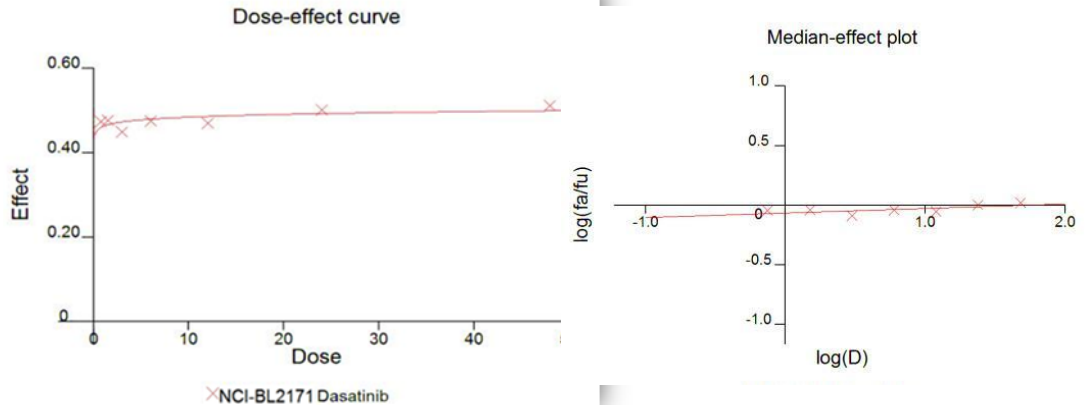
Dasatinibin IC_{50} değerinin belirlenmesinde, dasatinibin 0,75 nM, 1,5 nM, 3 nM, 6 nM, 12 nM, 24 nM, 48 nM'lık dilüsyonları 24, 48, 72. saatlerde WST-1 testi ile değerlendirildi. Dasatinibin K562/ima3 hücre hattında IC_{50} değeri 48. saatte 1,83 μM olarak belirlendi (Şekil 36).



Şekil 36. K562/ima3 hücrelerinde dasatinibin IC_{50} dozu

3.1.1.2.4. Dasatinibin NCI-BL 2171 Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin WST-1 İle Değerlendirilmesi

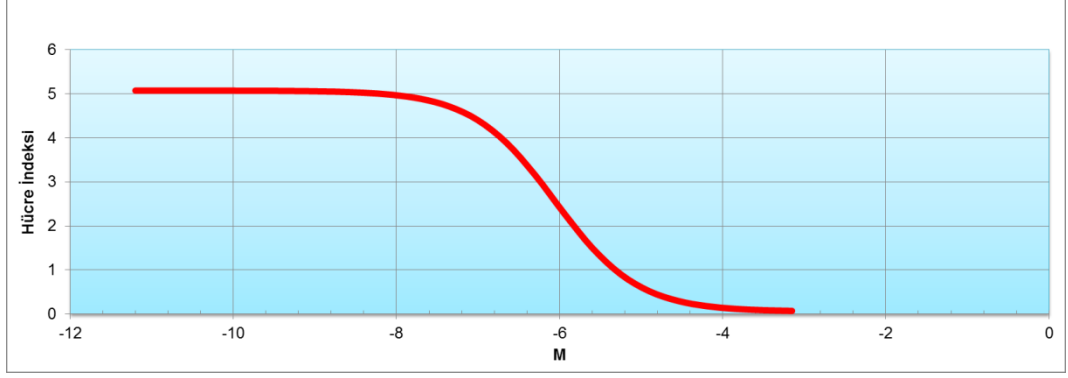
Dasatinibin IC_{50} değerinin belirlenmesinde, dasatinibin 0,75 nM, 1,5 nM, 3 nM, 6 nM, 12 nM, 24 nM, 48 nM'lık dilüsyonları 24, 48, 72. saatlerde WST-1 testi ile değerlendirildi. Dasatinibin NCI-BL2171 hücre hattında IC_{50} değeri 24. saatte 48 nM olarak belirlendi (Şekil 37).



Şekil 37. NCI-BL 2171 hücrelerinde dasatinibin IC_{50} dozu

3.1.1.2.5. Dasatinibin İnsan Lösemi Kanseri Kök Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin WST-1 İle Değerlendirilmesi

Dasatinibin IC_{50} değerinin belirlenmesinde, dasatinibin 0,001 μ M, 0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M'lık dilüsyonları 24, 48, 72. saatlerde WST-1 testi ile değerlendirildi. Dasatinibin insan lösemi kanser kök hücre hattında IC_{50} değeri 48. saatte 870 nM olarak belirlendi (Şekil 38).

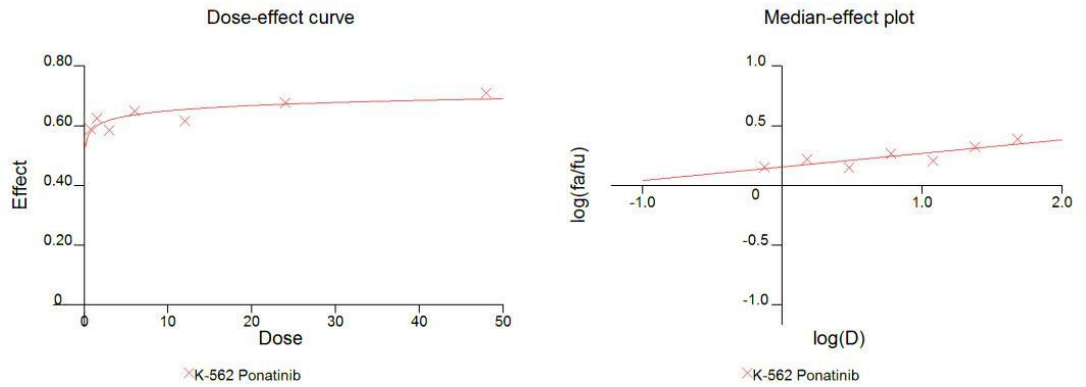


Şekil 38. İnsan lösemi kanser kök hücrelerinde dasatinibin IC₅₀ dozu

3.1.1.3. Ponatinib WST-1 Testi

3.1.1.3.1. Ponatinibin K562 Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin WST-1 İle Değerlendirilmesi

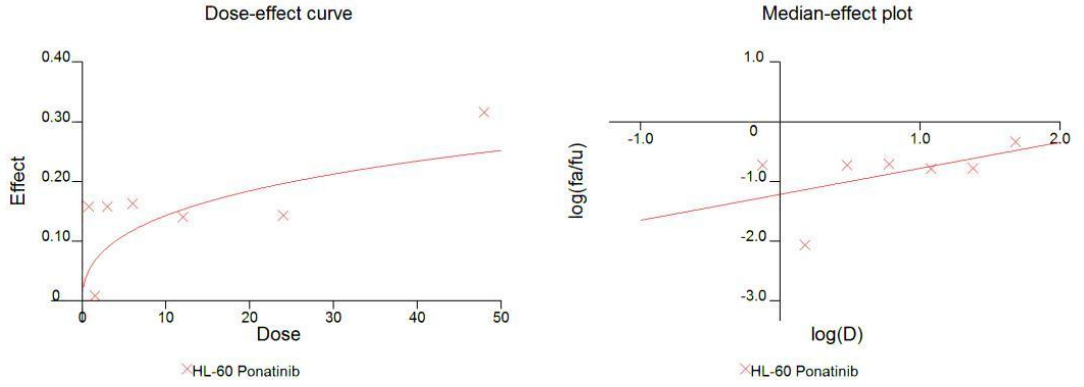
Ponatinibin IC₅₀ değerinin belirlenmesinde, ponatinibin 0,75 nM, 1,5 nM, 3 nM, 6 nM, 12 nM, 24 nM, 48 nM'lık dilüsyonları 24, 48, 72. saatlerde WST-1 testi ile değerlendirildi. Ponatinibin K562 hücre hattında IC₅₀ değeri 48. saatte 0,24 nM olarak belirlendi (Şekil 39).



Şekil 39. K562 hücrelerinde dasatinibin IC₅₀ dozu

3.1.1.3.2. Ponatinibin HL-60 Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin WST-1 İle Değerlendirilmesi

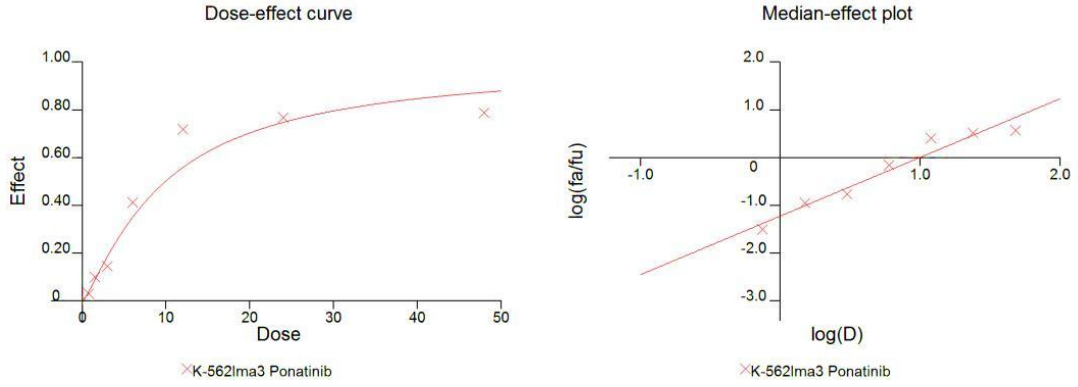
Ponatinibin IC_{50} değerinin belirlenmesinde, ponatinibin 0,75 nM, 1,5 nM, 3 nM, 6 nM, 12 nM, 24 nM, 48 nM'lık dilüsyonları 24, 48, 72. saatlerde WST-1 testi ile değerlendirildi. Ponatinibin HL-60 hücre hattında IC_{50} değeri 48. saatte 607 nM olarak belirlendi (Şekil 40).



Şekil 40. HL-60 hücrelerinde ponatinibin IC_{50} dozu

3.1.1.3.3. Ponatinibin K562/ima3 Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin WST-1 İle Değerlendirilmesi

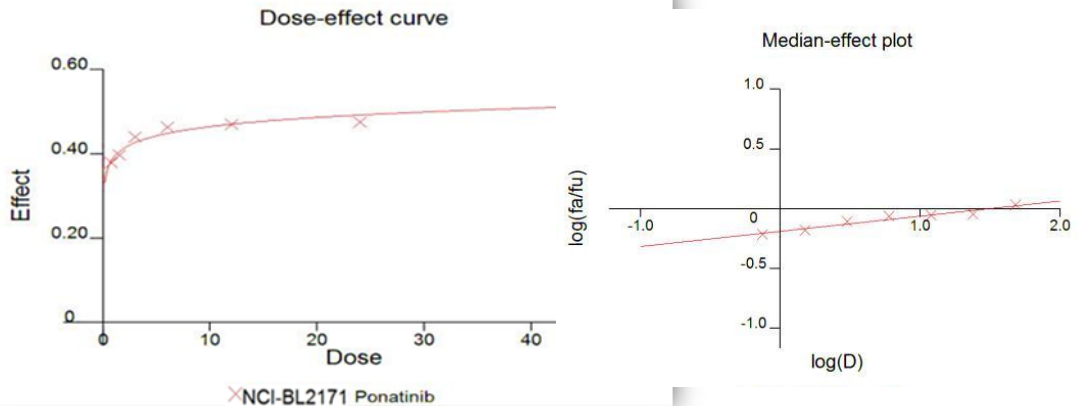
Ponatinibin IC_{50} değerinin belirlenmesinde, ponatinibin 0,75 nM, 1,5 nM, 3 nM, 6 nM, 12 nM, 24 nM, 48 nM'lık dilüsyonları 24, 48, 72. saatlerde WST-1 testi ile değerlendirildi. Ponatinibin K562/ima3 hücre hattında IC_{50} değeri 48. saatte 9,87 nM olarak belirlendi (Şekil 41).



Şekil 41. K562/ima3 hücrelerinde ponatinibin IC₅₀ dozu

3.1.1.3.4. Ponatinibin NCI-BL 2171 Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin WST-1 İle Değerlendirilmesi

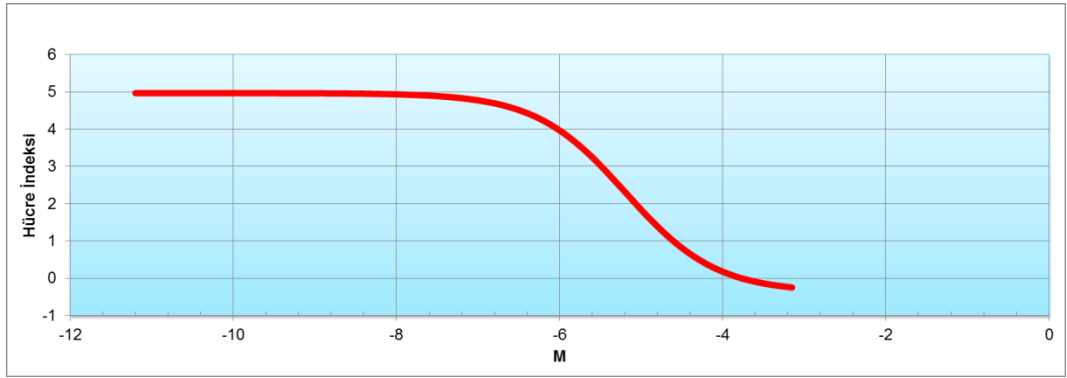
Ponatinibin IC₅₀ değerinin belirlenmesinde, ponatinibin 0,75 nM, 1,5 nM, 3 nM, 6 nM, 12 nM, 24 nM, 48 nM 'lık dilüsyonları 24, 48, 72. saatlerde WST-1 testi ile değerlendirildi. Ponatinibin NCI-BL 2171 hücre hattında IC₅₀ değeri 48. saatte 30 nM olarak belirlendi (Şekil 42).



Şekil 42. NCI-BL 2171 hücrelerinde ponatinibin IC₅₀ dozu

3.1.1.3.5. Ponatinibin İnsan lösemi kanser Kök Hücre Hattı Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin WST-1 İle Değerlendirilmesi

Ponatinibin IC₅₀ değerinin belirlenmesinde, ponatinibin 0,001 µM, 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM, 10 µM, 100 µM'lık dilüsyonları 24, 48, 72. saatlerde WST-1 testi ile değerlendirildi. Ponatinibin insan lösemi kanser kök hücre hattında IC₅₀ değeri 48. saatte 6,46 µM olarak belirlendi (Şekil 43).



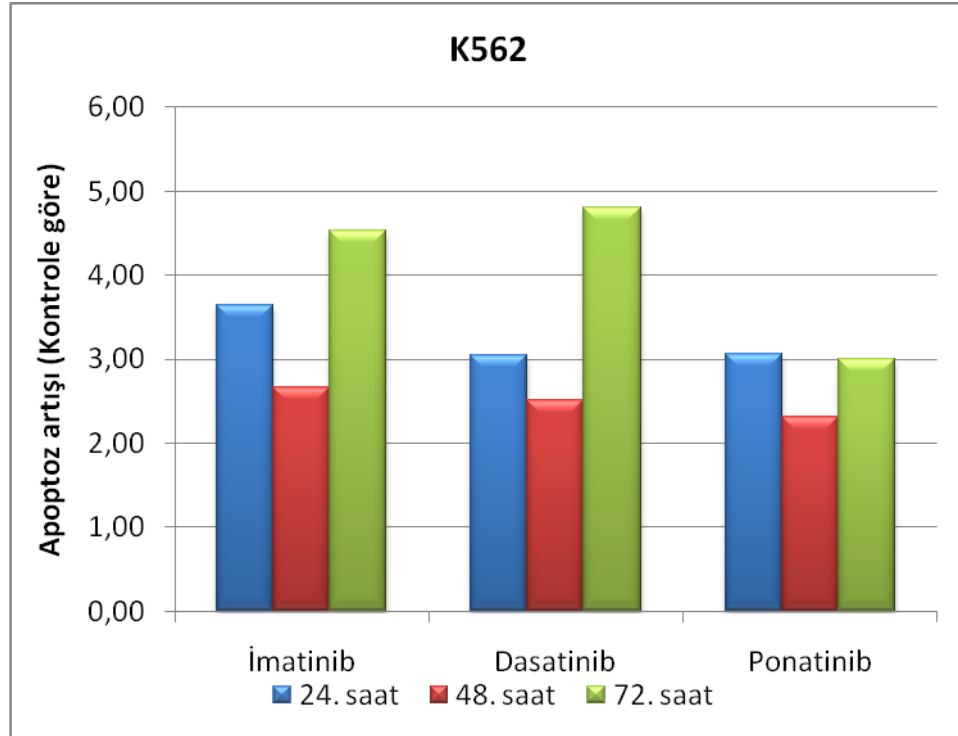
Şekil 43. İnsan lösemi kanser kök hücrelerinde ponatinibin IC₅₀ dozu

3.1.2. Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin Hücreler Üzerindeki Apoptotik Etkilerinin Değerlendirilmesi

Tirozin kinaz inhibitörlerinin IC₅₀ dozlarının hücre hatları üzerindeki apoptotik etkileri 24, 48 ve 72. saatlerde değerlendirildi. Tüm apoptoz deneylerine hücre sayısı 1 ml' de 5x10⁵ hücre olacak şekilde başlandı. Etken madde ile muamele edilmeyen hücreler kontrol grubu olarak kabul edildi. Kontrol grubuna göre etken maddelerin oluşturduğu apoptoz artışı belirlendi. Apoptoz analizleri Annexin V ve JC-1 Mitoprobe ile 2 replikalı olarak gerçekleştirildi.

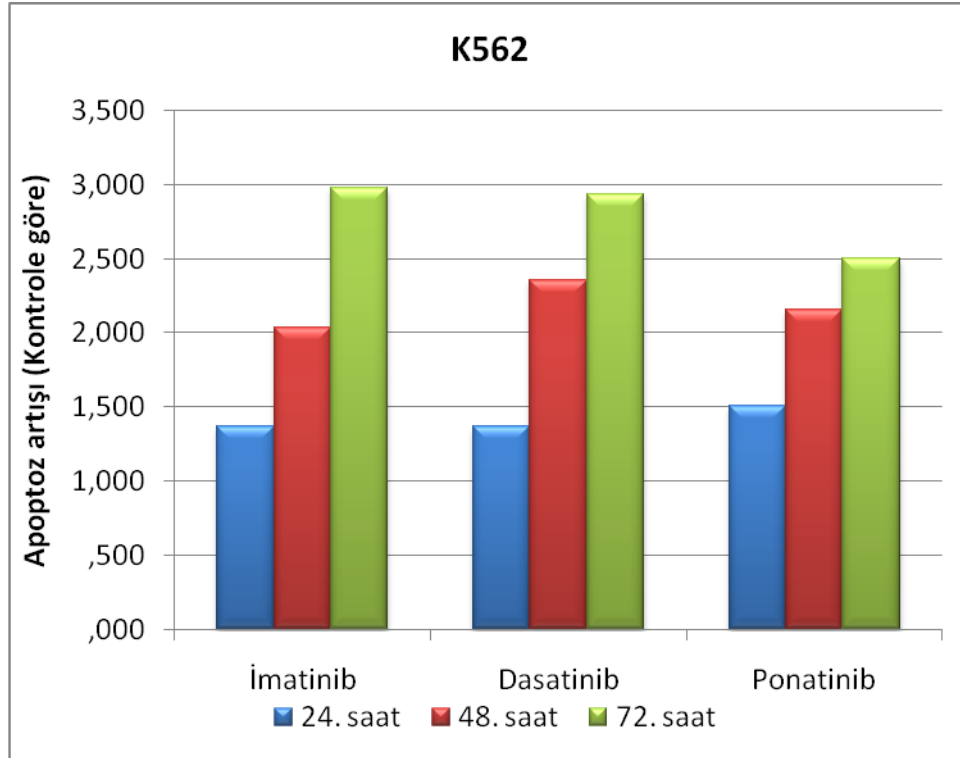
3.1.2.1. Imatinib, Dasatinib ve Ponatinibin K562 Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik Etkileri

Annexin V analiziyle, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında imatinib ile muamele edilen K562 hücrelerinde 24. saatte 3,65 kat, 48. saatte 2,67 kat, 72. saatte 4,53 kat; dasatinib ile muamele edilen K562 hücrelerinde 24. saatte 3,05 kat, 48. saatte 2,51 kat, 72. saatte 4,81 kat; ponatinib ile muamele edilen K562 hücrelerinde 24. saatte 3,07 kat, 48. saatte 2,32 kat, 72. saatte 3,00 kat apoptoz artışı gözlemlendi (Şekil 44).



Şekil 44. İmatinib, dasatinib ve ponatinibin K562 hücrelerindeki apoptotik etkisinin Annexin V sonuçları

JC-1 Mitoprobe analiziyle, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında imatinib ile muamele edilen K562 hücrelerinde 24. saatte 1,37 kat, 48. saatte 2,03 kat, 72. saatte 2,97 kat; dasatinible muamele edilen K562 hücrelerinde 24. saatte 1,35 kat, 48. saatte 2,35 kat, 72. saatte 3,07 kat; ponatinible muamele edilen K562 hücrelerinde 24. saatte 1,51 kat, 48. saatte 2,15 kat, 72. saatte 2,50 kat apoptoz artışı gözlemlendi (Şekil 45).

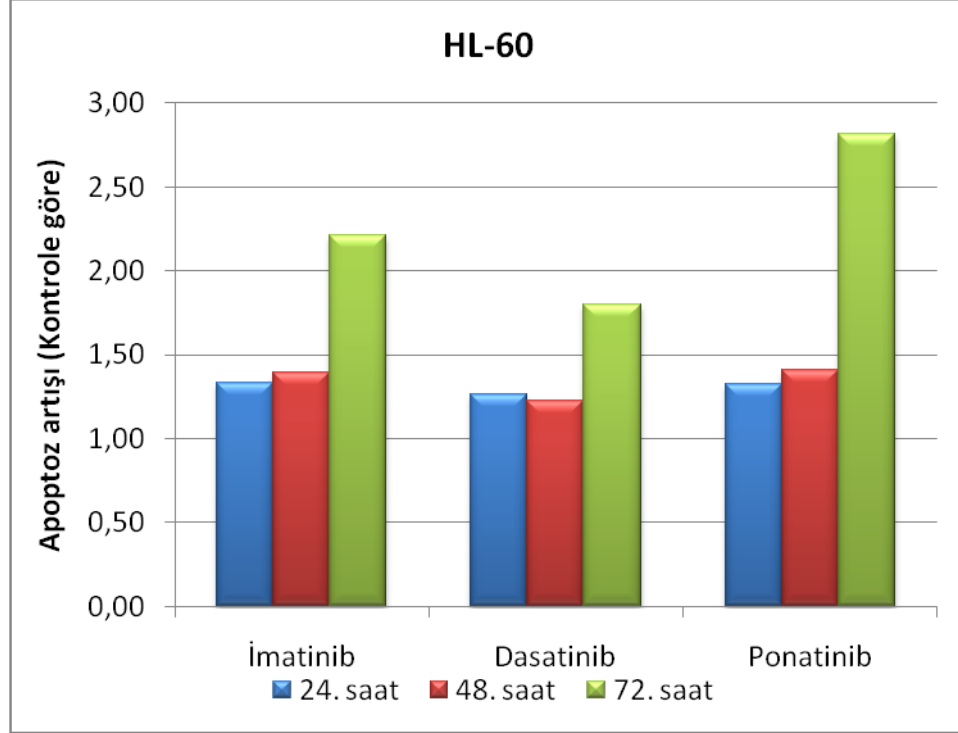


Şekil 45. İmatinib, dasatinib ve ponatinibin K562 hücrelerindeki apoptotik etkisinin JC-1 Mitoprobe sonuçları

3.1.2.2. İmatinib, Dasatinib ve Ponatinibin HL-60 Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik Etkileri

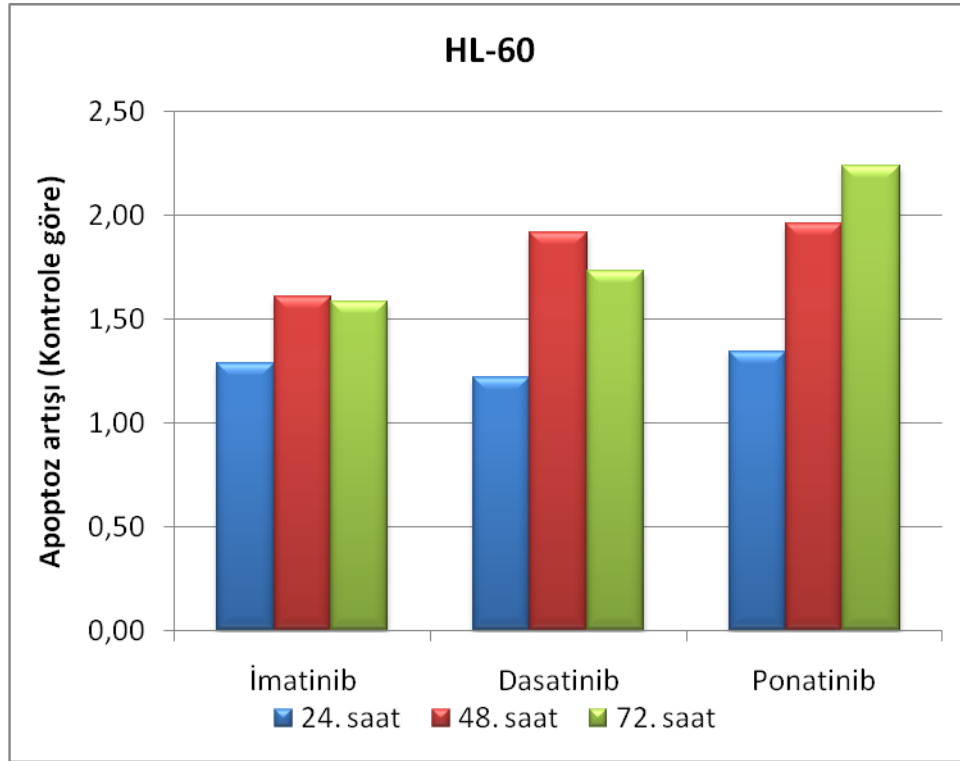
Annexin V analiziyle, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında imatinib ile muamele edilen HL-60 hücrelerinde 24. saatte 1,33 kat, 48. saatte 1,39 kat, 72. saatte 2,21 kat; dasatinible muamele edilen HL-60 hücrelerinde 24.

saatte 1,26 kat, 48. saatte 1,23 kat, 72. saatte 1,80 kat; ponatinible muamele edilen HL-60 hücrelerinde 24. saatte 1,32 kat, 48. saatte 1,41 kat, 72. saatte 2,82 kat apoptoz artışı gözlemlendi (Şekil 46).



Şekil 46. İmatinib, dastinib ve ponatibin HL-60 hücrelerindeki apoptotik etkisinin Annexin V sonuçları

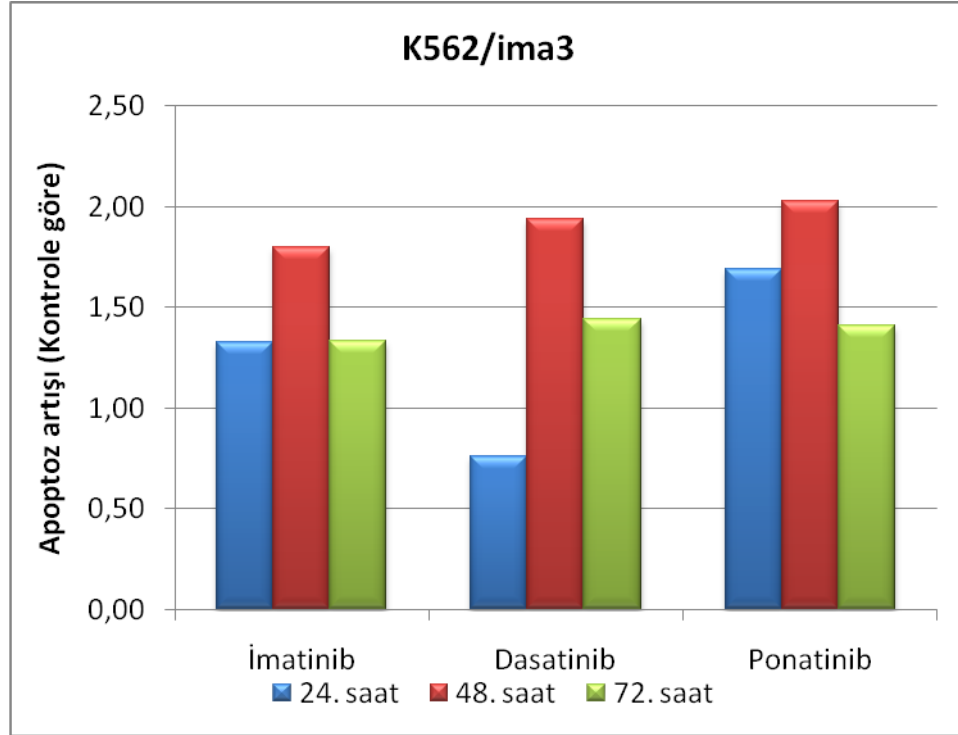
JC-1 Mitoprobe analiziyle, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında imatinib ile muamele edilen HL-60 hücrelerinde 24. saatte 1,29 kat, 48. saatte 1,61 kat, 72. saatte 1,58 kat; dasatinible muamele edilen HL-60 hücrelerinde 24. saatte 1,22 kat, 48. saatte 1,92 kat, 72. saatte 1,73 kat; ponatinible muamele edilen HL-60 hücrelerinde 24. saatte 1,34 kat, 48. saatte 1,96 kat, 72. saatte 2,23 kat apoptoz artışı gözlemlendi (Şekil 47).



Şekil 47. İmatinib, dastinib ve ponatinibin HL-60 hücrelerindeki apoptotik etkisinin JC-1 Mitoprobe sonuçları

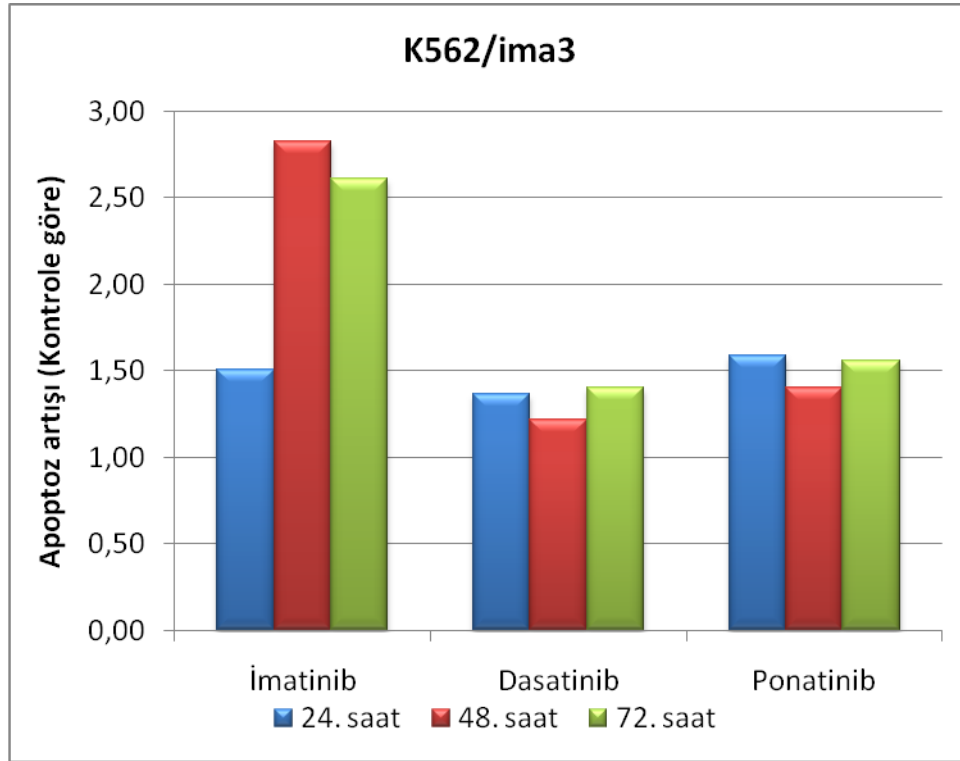
3.1.2.3. İmatinib, Dasatinib ve Ponatinibin K562/ima3 Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik Etkileri

Annexin V analiziyle, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında imatinib ile muamele edilen K562/ima3 hücrelerinde 24. saatte 1,33 kat, 48. saatte 1,80 kat, 72. saatte 1,34 kat; dasatinible muamele edilen K562/ima3 hücrelerinde 24. Saatte 0,76 kat, 48. saatte 1,94 kat, 72. saatte 1,44 kat; ponatinible muamele edilen K562/ima3 hücrelerinde 24. saatte 1,69 kat, 48. saatte 2,03 kat, 72. saatte 1,41 kat apoptoz artışı gözlemlendi (Şekil 48).



Şekil 48. İmatinib, dastinib ve ponatinibin K562/ima3 hücrelerindeki apoptotik etkisinin Annexin V sonuçları

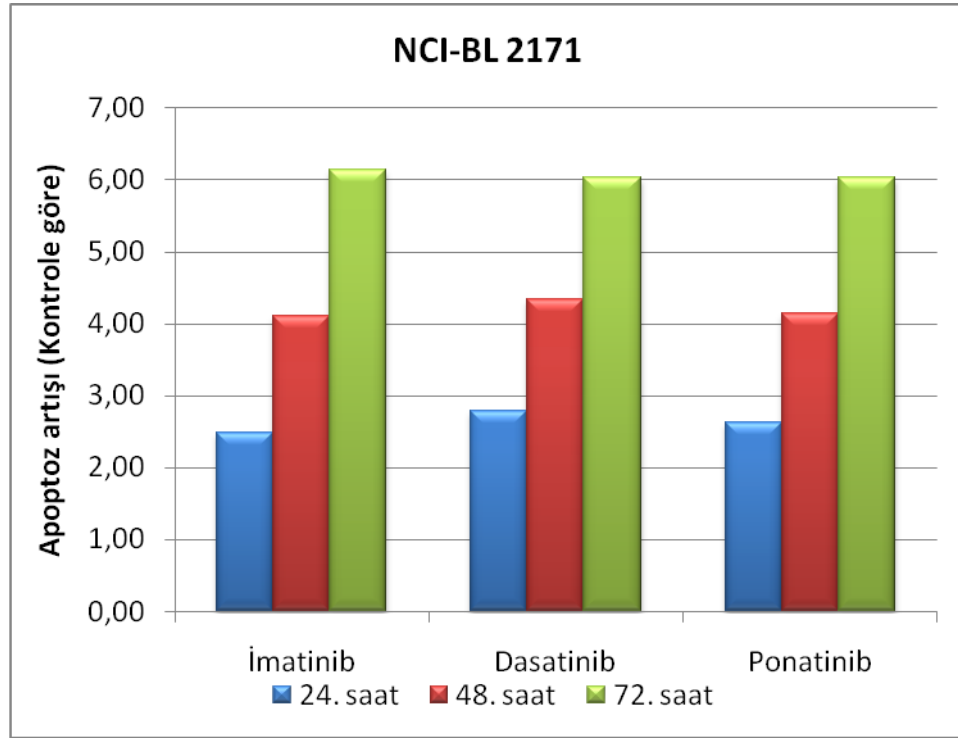
JC-1 Mitoprobe analiziyle, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında imatinib ile muamele edilen K562/ima3 hücrelerinde 24. saatte 1,51 kat, 48. saatte 2,82 kat, 72. saatte 2,61 kat; dasatinible muamele edilen K562/ima3 hücrelerinde 24. saatte 1,36 kat, 48. saatte 1,22 kat, 72. saatte 1,40 kat; ponatinible muamele edilen K562/ima3 hücrelerinde 24. saatte 1,59 kat, 48. saatte 1,40 kat, 72. saatte 1,56 kat apoptoz artışı gözlemlendi (Şekil 49).



Şekil 49. İmatinib, dastinib ve ponatinibin K562/ima3 hücrelerindeki apoptotik etkisinin JC-1 Mitoprobe sonuçları

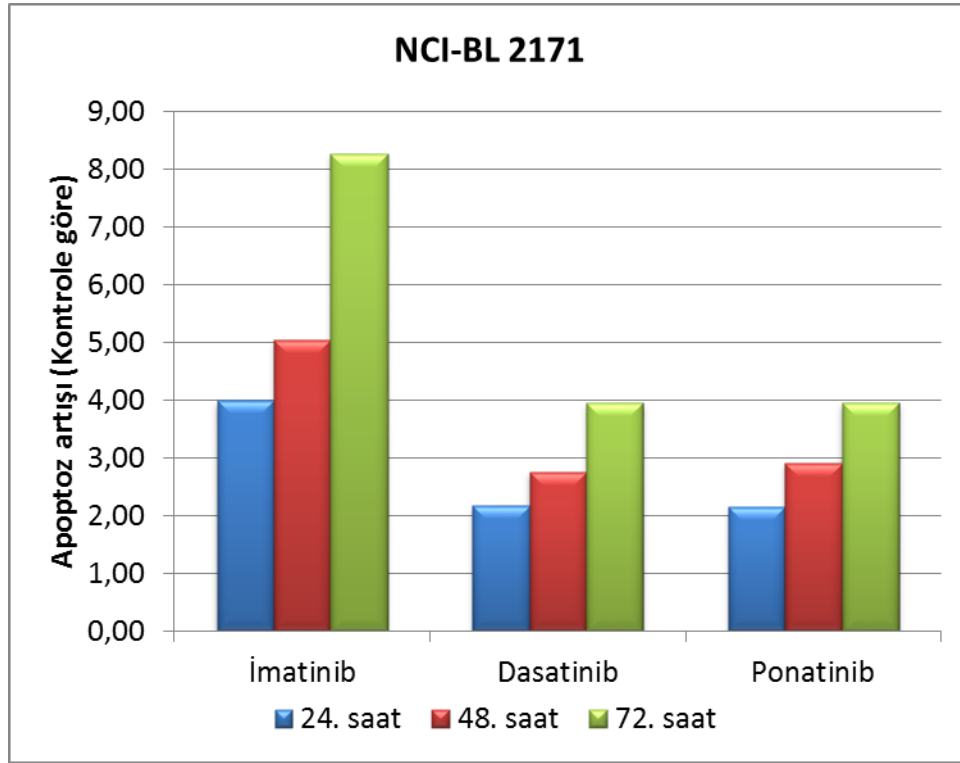
3.1.2.4. İmatinib, Dasatinib ve Ponatinibin NCI-BL 2171 Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik Etkileri

Annexin V analiziyle, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında imatinib ile muamele edilen NCI-BL 2171 hücrelerinde 24. saatte 2,48 kat, 48. saatte 4,11 kat, 72. saatte 6,14 kat; dasatinible muamele edilen NCI-BL 2171 hücrelerinde 24. saatte 2,79 kat, 48. saatte 4,33 kat, 72. saatte 6,04 kat; ponatinible muamele edilen NCI-BL 2171 hücrelerinde 24. saatte 2,62 kat, 48. saatte 4,15 kat, 72. saatte 6,03 kat apoptoz artışı gözlemlendi (Şekil 50).



Şekil 50. İmatinib, dastinib ve ponatibin NCI-BL 2171 hücrelerindeki apoptotik etkisinin Annexin V sonuçları

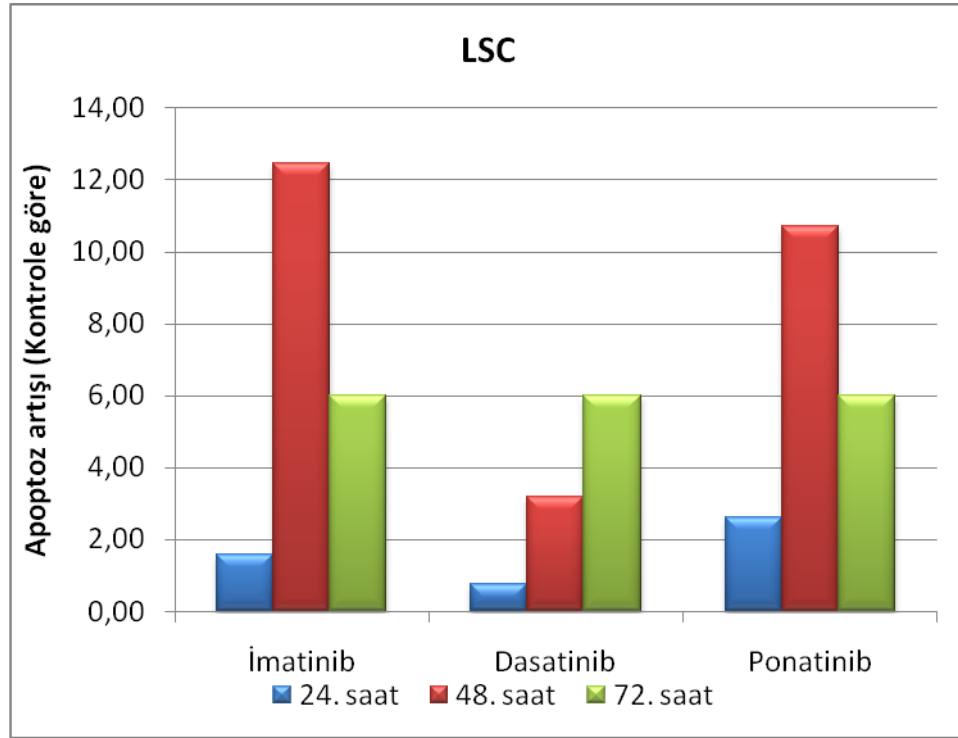
JC-1 Mitoprobe analiziyle, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında imatinib ile muamele edilen NCI-BL 2171 hücrelerinde 24. saatte 3,99 kat, 48. saatte 5,05 kat, 72. saatte 8,27 kat; dasatinible muamele edilen NCI-BL 2171 hücrelerinde 24. Saatte 4,04 kat, 48. saatte 2,75 kat, 72. saatte 3,71 kat; ponatinible muamele edilen NCI-BL 2171 hücrelerinde 24. saatte 4,25 kat, 48. saatte 3,11 kat, 72. saatte 3,95 kat apoptoz artışı gözlemlendi (Şekil 51).



Şekil 51. İmatinib, dasatinib ve ponatinib NCI-BL 2171 hücrelerindeki apoptotik etkisinin JC-1 Mitoprobe sonuçları

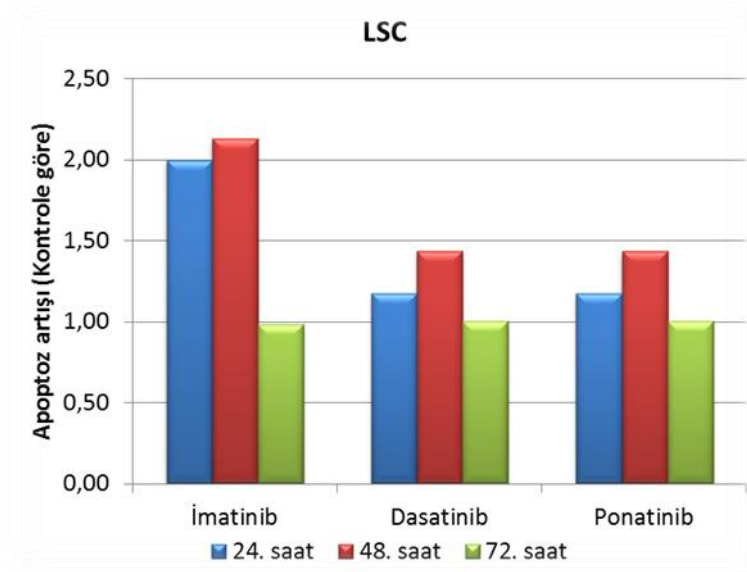
3.1.2.5. İmatinib, Dasatinib ve Ponatinibin İnsan Lösemi Kanseri Kök Hücre Hattı Üzerindeki Apoptotik Etkileri

Annexin V analiziyle, kontrol grubuyla imatinib ile muamele edilen insan lösemi kanser kök hücrelerinde; 24. saatte 1,59 kat, 48. saatte 12,45 kat, 72. saatte 6,00 kat; dasatinible muamele edilen insan lösemi kanser kök hücrelerinde 24. saatte 0,74 kat, 48. saatte 3,17 kat, 72. saatte 6,00 kat; ponatinible muamele edilen insan lösemi kanser kök hücrelerinde 24. saatte 2,61 kat, 48. saatte 10,72 kat, 72. saatte 6,00 kat apoptoz artışı gözlemlendi (Şekil 52).



Şekil 52. İmatinib, dastinib ve ponatibin insan lösemi kanser kök hücrelerindeki apoptotik etkisinin Annexin V sonuçları

JC-1 Mitoprobe analiziyle, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında karşılaştırıldığında imatinib ile muamele edilen insan lösemi kanser kök hücrelerinde 24. saatte 2,00 kat, 48. saatte 2,13. kat, 72. saatte 0,98 kat; dasatinible muamele edilen insan lösemi kanser kök hücrelerinde 24. saatte 1,17 kat, 48. saatte 1,43 kat, 72. saatte 1,00 kat; ponatinible muamele edilen insan lösemi kanser kök hücrelerinde 24. saatte 1,17 kat, 48. saatte 1,43 kat, 72. saatte 1,00 kat apoptoz artışı gözlemlendi (Şekil 53).



Şekil 53. İmatinib, dastinib ve ponatibin insan lösemi kanser kök hücrelerindeki apoptotik etkisinin JC-1 Mitoprobe sonuçları

3.1.3. Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin Hücreler Üzerindeki Otofajik Etkilerinin Değerlendirilmesi

Tirozin kinaz inhibitörlerinin IC₅₀ dozlarının hücre hatları üzerindeki otofajik etkisine 24. saatte bakıldı. Etken madde ve ya klorokin ile muamele edilmeyen hücreler kontrol grubu olarak alındı. Klorokin ile muamele edilen hücreler otofajinin pozitif kontrolü olarak kabul edildi. LC3B-II artışı otofajinin baskılandığının bir göstergesidir. Klorkinle muamele edilmiş hücrelerle, etken maddelerle muamele edilmiş hücreler karşılaştırıldı ve en yüksek LC3B-II artışı gösteren BacMam konsantrasyonları seçildi. Tirozin kinaz inhibitörlerinin otofajiyi baskılanma dereceleri kontrol grubuna oranlanarak değerlendirildi. Tüm otofaji deneylerine hücre sayısı 1 ml' de $1,1 \times 10^5$ hücre olacak şekilde başlandı ve 3 replikalı olarak çalışıldı.

3.1.3.1. Imatinib, Dasatinib ve Ponatinibin K562 Hücre Hattı Üzerindeki Otofajik Etkileri

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında; K562 hücrelerinde 30 µM klorokin otofajiyi 1,93 kat baskılarken, imatinibin 1,77 kat, dasatinibin 2,11 kat, ponatinibin 2,09 kat baskıladığı bulundu (Şekil 54).

3.1.3.2. Imatinib, Dasatinib ve Ponatinibin HL-60 Hücre Hattı Üzerindeki Otofajik Etkileri

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında; HL-60 hücrelerinde 30 µM klorokin otofajiyi 1,48 kat baskılarken, dasatinibin 1,95 kat, ponatinibin 1,60 kat baskıladığı bulundu. Imatinibin ise HL-60 hücrelerinde otofajiyi baskılamadığı, kontrolle karşılaştırıldığında 0,33 kat otofajiyi indüklediği gözlemlendi (Şekil 54).

3.1.3.3. Imatinib, Dasatinib ve Ponatinibin K562/ima3 Hücre Hattı Üzerindeki Otofajik Etkileri

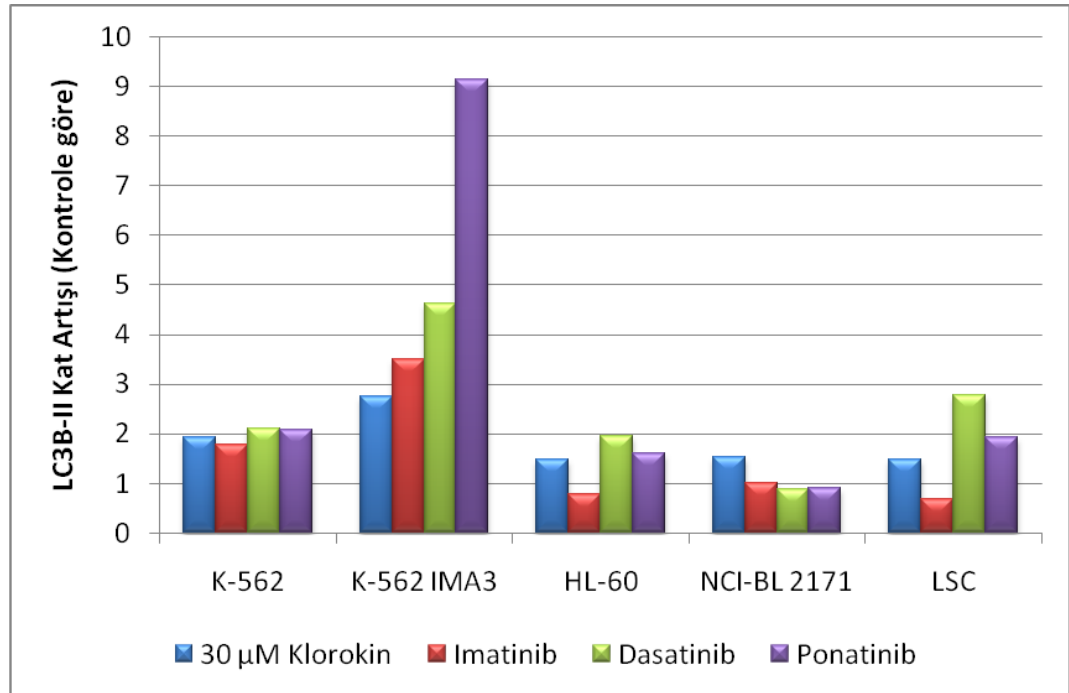
Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında; K562/ima3 hücrelerinde 30 µM klorokin otofajiyi 2,74 kat baskılarken, imatinibin 3,49 kat, dasatinibin 4,62 kat, ponatinibin 9,15 kat baskıladığı bulundu (Şekil 54).

3.1.3.4. Imatinib, Dasatinib ve Ponatinibin NCI-BL 2171 Hücre Hattı Üzerindeki Otofajik Etkileri

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında; NCI-BL 2171 hücrelerinde 30 µM klorokin otofajiyi 1,54 kat baskılarken, imatinib, dasatinib ve ponatinibin otofajiyi baskılamadığı bulundu (Şekil 54).

3.1.3.5. Imatinib, Dasatinib ve Ponatinibin İnsan Lösemi Kanseri Kök Hücre Hattı Üzerindeki Otofajik Etkileri

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında; İnsan Lösemi Kanseri Kök Hücre hücrelerinde 30 µM klorokin otofajiyi 1,48 kat baskılarken, imatinibin otofajiyi 1,47 kat indüklediği, dasatinibin 2,78 kat, ponatinibin 1,93 kat baskıladığı bulundu (Şekil 54).



Şekil 54. Imatinib, dasatinib ve ponatinibin K562, HL-60, K562/ima3, NCI-BL 2171 ve insan lösemi kanser kök hücre hatları üzerindeki otofajik etkisi

3.1.4. Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin Hücrelerde Oluşturduğu miRNA Ekspresyon Değişimleri

Tirozin kinaz inhibitörlerinin IC₅₀ dozlarının hücrelerde oluşturduğu miRNA ekspresyon değişimlerine 24 ve ya 48. saatlerde bakıldı. Tüm miRNA ekspresyon deneylerine hücre sayısı 1 ml' de 1x10⁶ hücre olacak şekilde başlandı ve süre sonunda hücrelerden izole edilen totalRNA 5 µg olarak kullanıldı. Etken madde ile muamele edilmeyen hücreler kontrol grubu olarak kabul edildi. Kontrol grubuna göre etken maddelerin oluşturduğu miRNA ekspresyon değişimleri belirlendi. miRNA arrayleri 3 replikalı olarak gerçekleştirildi.

3.1.4.1. Imatinib, Dasatinib ve Ponatinibin K562 Hücrelerinde Oluşturduğu miRNA Ekspresyon Değişimleri

Imatinibin IC₅₀ dozuna (650 nM) maruz bırakılan K562 hücrelerinde 48. saatteki miRNA değişimleri 1578 miRNA' yı içeren mikrodizin analizi ile değerlendirildi. Imatinibine maruz bırakılmayan K562 hücreleri ile (kontrol grubu) karşılaştırıldığında Imatinib K562' de hsa-mir-422a-pre ekspresyonunu 5 kat ve hsa-miR-19a* ekspresyonunu da 4,72 kat azalttığı saptandı. Otuz miRNA ekspresyonunu yaklaşık 2 – 6 kat arttırdığı belirlendi (Tablo 4, Şekil 55).

Tablo 4: Imatinibin K562 hücrelerinde miRNA ekspresyonlarına etkisi

miRNA	K562 Kontrol Transforme Ortalama	K562 Imatinib Transforme Ortalama	Kat Değişim	p	FDR p düzeltmesi
hsa-mir-422a-pre	11,10	2,22	-5,00	0,016	0,032
hsa-miR-19a*	12,58	2,67	-4,72	0,020	0,038
hsa-miR-520e	5,29	14,36	2,72	0,027	0,049
hsa-miR-1200	4,85	13,39	2,76	0,026	0,048
hsa-mir-523-pre	4,91	13,72	2,79	0,027	0,049
hsa-mir-555-Pre	5,18	14,54	2,81	0,025	0,046
hsa-mir-195-pre	4,80	13,98	2,92	0,023	0,043
hsa-miR-671-3p	4,38	12,92	2,95	0,018	0,034
hsa-miR-494-pre	4,32	12,81	2,97	0,020	0,038
hsa-miR-1226	4,85	15,31	3,15	0,013	0,025
hsa-miR-874	2,94	13,07	4,44	0,027	0,049
hsa-miR-4301	3,19	14,21	4,44	0,027	0,049
hsa-mir-023b-pre	2,91	13,54	4,65	0,022	0,041
hsa-miR-4259	2,84	13,44	4,74	0,020	0,038
hsa-mir-512-2-pre	2,89	13,67	4,74	0,021	0,039
hsa-miR-548b-5p	2,87	13,83	4,83	0,019	0,036
hsa-mir-345-pre	2,99	14,45	4,83	0,020	0,038
hsa-mir-222-pre	3,09	14,96	4,85	0,018	0,035
hsa-miR-718	2,80	13,65	4,88	0,018	0,034
hsa-miR-1299	2,82	13,86	4,93	0,018	0,035
hsa-mir-586-Pre	2,66	13,16	4,95	0,018	0,034
hsa-mir-522-pre	2,58	13,05	5,05	0,016	0,030
hsa-mir-340-pre	2,69	13,58	5,05	0,016	0,030
hsa-miR-338-5p	2,70	13,83	5,13	0,015	0,030
hsa-mir-519a-1-pre	2,41	12,57	5,21	0,014	0,028
hsa-mir-370-pre	2,45	13,37	5,46	0,016	0,031
hsa-miR-1269	2,26	13,03	5,78	0,009	0,018
hsa-miR-519d	2,15	12,70	5,92	0,009	0,019
hsa-miR-485-pre	2,27	13,53	5,99	0,008	0,017
hsa-mir-027b-pre	2,11	13,20	6,25	0,008	0,016
hsa-miR-520c-5p	2,26	14,29	6,33	0,006	0,013
hsa-miR-2115*	2,28	14,41	6,33	0,006	0,013

Dasatinibin IC₅₀ dozuna (1,70 nM, 24. saat) maruz bırakılan K562 hücrelerinde miR-1228 ekspresyonu 5,58 kat ve mir-371-3p ise 2,17 kat azaldığı saptandı (Tablo 5, Şekil 55).

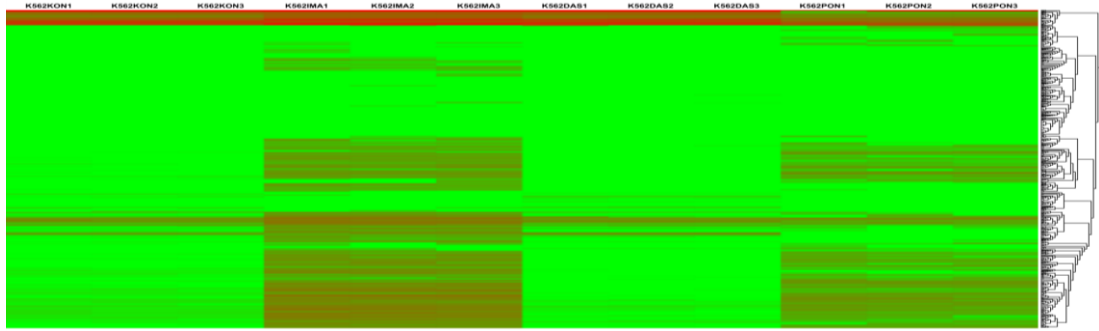
Tablo 5: Dasatinibin K562 hücrelerinde miRNA ekspresyonlarına etkisi

miRNA	K562 Kontrol Transforme Ortalama	K562 Dasatinib Transforme Ortalama	Kat Değişim	P	FDR p düzeltmesi
hsa-miR-1228	11,95	2,14	-5,58	0,010	0,048
hsa-mir-371-3p	11,02	5,08	-2,17	0,008	0,038

Ponatinibin IC₅₀ dozu (0,24 nM, 48. saat) ise mir-221 ekspresyonunu 4,58 kat azaltırken 20 miRNA ekspresyonunu 2 – 6 kat arttırdı (Tablo 6, Şekil 55).

Tablo 6: Ponatinibin K562 hücrelerinde miRNA ekspresyonlarına etkisi

miRNA	K562 Kontrol Transforme Ortalama	K562 Poatinib Transforme Ortalama	Kat Değişim	P	FDR p düzeltmesi
hsa-mir-221	17,34	3,79	-4,58	0,023	0,049
hsa-miR-525-5p	7,68	15,66	2,04	0,001	0,004
hsa-mir-106b-pre	7,28	14,93	2,05	0,007	0,016
hsa-mir-024-1-pre	7,69	15,79	2,05	0,004	0,009
hsa-miR-761	7,49	15,46	2,07	0,005	0,011
hsa-miR-374a*	7,30	15,43	2,11	0,006	0,014
hsa-miR-1293	5,26	14,98	2,85	0,022	0,047
hsa-miR-298	4,54	15,03	3,31	0,016	0,035
hsa-miR-1285	4,10	14,08	3,44	0,010	0,023
hsa-mir-588-Pre	4,34	15,16	3,50	0,011	0,024
hsa-miR-3187	4,24	15,39	3,64	0,017	0,037
hsa-mir-302c*	3,06	14,48	4,74	0,020	0,044
hsa-miR-1288	3,24	15,44	4,76	0,020	0,042
hsa-miR-519c-5p	2,98	14,72	4,93	0,017	0,037
hsa-miR-2117	3,23	15,91	4,93	0,017	0,037
hsa-miR-034c-5p	2,95	14,66	4,98	0,017	0,036
hsa-miR-9*	2,75	13,98	5,08	0,017	0,037
hsa-miR-30c-2*	2,72	15,91	5,85	0,009	0,021
hsa-mir-583	2,38	14,28	6,02	0,008	0,018
hsa-mir-214-pre	2,48	15,00	6,06	0,008	0,018
hsa-miR-2355	2,47	15,34	6,21	0,007	0,016



Şekil 55. Imatinib, Dasatinib ve Ponatinibin K562 Hücrelerindeki miRNA Ekspresyon Değişimlerinin ısı haritası

3.1.4.2. Imatinib, Dasatinib ve Ponatinibin HL-60 Hücrelerinde Oluşturduğu miRNA Ekspresyon Değişimleri

Imatinib 18 μ M dozu 48. saatte HL-60 hücrelerinde kontrole göre mir-554, mir-551a-Pre, mir-548a-1-Pre, miR-510 ve miR-93* ekspresyonlarını yaklaşık 5 kat baskılarken 27 miRNA ekspresyonunu 2,73 – 5,68 kat arttırdı (Tablo 7, Şekil 56).

Dasatinibin IC_{50} dozuna (896 nM, 48. saat) maruz bırakılan HL-60 hücrelerinde miR-378c ve miR-1244 ekspresyonları yaklaşık 4,5 kat azaldığı ve 22 miRNA ekspresyonunun ise 2 – 6 kat arttığı saptandı (Tablo 8, Şekil 56)

Tablo 7: Imatinibin HL-60 hücrelerinde miRNA ekspresyonlarına etkisi

miRNA	HL-60 Kontrol Transforme Ortalama	HL-60 Imatinib Transforme Ortalama	Kat Değişim	P	FDR p düzeltmesi
hsa-mir-554	2,08	12,35	-5,93	0,008	0,015
hsa-mir-551a- Pre	2,22	12,51	-5,65	0,010	0,018
hsa-mir-548a-1- Pre	2,67	12,70	-4,76	0,020	0,037
hsa-miR-510	2,41	11,33	-4,70	0,021	0,038
hsa-miR-93*	2,71	12,60	-4,64	0,022	0,039
hsa-miR-1293	14,38	5,26	2,73	0,027	0,047
hsa-mir-015a- pre	15,29	5,57	2,75	0,027	0,048
hsa-miR-208b	15,31	5,44	2,82	0,023	0,041
hsa-miR-520e	13,65	4,42	3,09	0,022	0,039
hsa-miR-298	14,23	4,54	3,13	0,021	0,038
hsa-miR-503-pre	14,89	4,72	3,15	0,017	0,031
hsa-miR-1285	13,30	4,10	3,24	0,013	0,025
hsa-miR-3187	13,99	4,24	3,30	0,026	0,045
hsa-mir-588-Pre	15,16	4,34	3,50	0,011	0,021
hsa-let-7i-pre	12,68	3,52	3,60	0,016	0,029
hsa-mir-370-pre	14,83	3,38	4,39	0,027	0,048
hsa-miR-1255a	13,55	3,03	4,46	0,026	0,045
hsa-mir-302c*	13,71	3,06	4,48	0,027	0,047
hsa-mir-135b- pre	14,14	3,07	4,61	0,023	0,041
hsa-mir-106a- pre	13,23	2,82	4,67	0,021	0,038
hsa-miR-519c- 5p	13,95	2,98	4,67	0,021	0,038
hsa-miR-2117	15,15	3,23	4,69	0,021	0,038
hsa-mir-597-Pre	14,22	3,02	4,72	0,021	0,038
hsa-miR-1288	15,35	3,24	4,74	0,020	0,037
hsa-miR-1307	12,52	2,61	4,78	0,021	0,039
hsa-miR-4325	12,13	2,51	4,83	0,021	0,038
hsa-miR-034c- 5p	14,37	2,95	4,88	0,018	0,033
hsa-miR-30c-1*	11,26	2,27	4,98	0,017	0,031
hsa-miR-9*	13,75	2,75	5,00	0,017	0,031
hsa-miR-1300	13,89	2,62	5,32	0,013	0,024
hsa-miR-30c-2*	14,45	2,72	5,32	0,013	0,024
hsa-mir-583	13,53	2,38	5,68	0,010	0,018

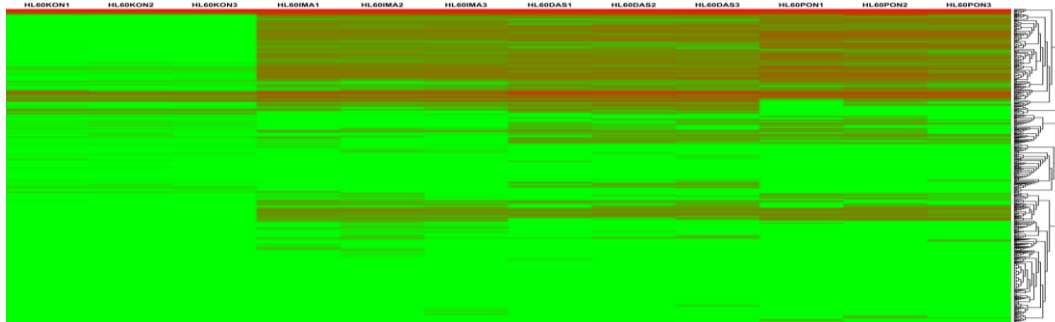
Tablo 8: Dasatinibin HL-60 hücrelerinde miRNA ekspresyonlarına etkisi

miRNA	HL-60 Kontrol Transforme Ortalama	HL-60 Dasatinib Transforme Ortalama	Kat Değişim	P	FDR p düzeltmesi
hsa-miR-378c	9,89	2,13	-4,64	0,024	0,042
hsa-miR-1244	11,87	2,61	-4,55	0,026	0,045
hsa-miR-106b- pre	7,28	14,65	2,01	0,009	0,017
hsa-miR-374a*	7,30	15,07	2,06	0,007	0,014
hsa-miR-208b	5,44	14,63	2,69	0,029	0,049
hsa-miR-486-3p	5,35	15,44	2,88	0,020	0,034
hsa-miR-3180- 3p	5,06	14,86	2,94	0,020	0,036
hsa-miR-520e	4,42	14,79	3,34	0,015	0,027
hsa-miR-298	4,54	15,25	3,36	0,015	0,028
hsa-miR-588-Pre	4,34	14,77	3,40	0,012	0,023
hsa-miR-3187	4,24	14,56	3,44	0,021	0,037
hsa-miR-135b- pre	3,07	13,33	4,35	0,029	0,049
hsa-miR-302c*	3,06	13,55	4,42	0,028	0,047
hsa-miR-3155	2,91	13,09	4,50	0,025	0,043
hsa-miR-1288	3,24	14,72	4,55	0,024	0,041
hsa-miR-2117	3,23	15,28	4,74	0,020	0,035
hsa-miR-034c- 5p	2,95	14,32	4,85	0,020	0,035
hsa-miR-4325	2,51	12,17	4,85	0,022	0,038
hsa-miR-597-Pre	3,02	14,85	4,93	0,017	0,031
hsa-miR-9*	2,75	13,69	4,98	0,017	0,030
hsa-miR-30c-2*	2,72	13,61	5,00	0,018	0,031
hsa-miR-519c- 5p	2,98	15,02	5,05	0,016	0,028
hsa-miR-3201	2,42	13,52	5,59	0,011	0,020
hsa-miR-583	2,38	14,75	6,21	0,006	0,013

Ponatinibin IC₅₀ dozu (607 nM, 48. saat) HL-60 hücrelerinde miR-221 ekspresyonunu yaklaşık 4,58 kat azaltırken ve 20 miRNA ekspresyonunun ise 2 – 6 kat arttığı saptandı (Tablo 9, Şekil 56)

Tablo 9: Ponatinibin HL-60 hücrelerinde miRNA ekspresyonlarına etkisi

miRNA	HL-60 Kontrol Transforme Ortalama	HL-60 Ponatinib Transforme Ortalama	Kat Değişim	P	FDR p düzeltmesi
hsa-mir-221	17,34	3,79	-4,58	0,023	0,049
hsa-miR-525-5p	7,68	15,66	2,04	0,001	0,004
hsa-mir-106b- pre	7,28	14,93	2,05	0,007	0,016
hsa-mir-024-1- pre	7,69	15,79	2,05	0,004	0,009
hsa-miR-761	7,49	15,46	2,07	0,005	0,011
hsa-miR-374a*	7,30	15,43	2,11	0,006	0,014
hsa-miR-1293	5,26	14,98	2,85	0,022	0,047
hsa-miR-298	4,54	15,03	3,31	0,016	0,035
hsa-miR-1285	4,10	14,08	3,44	0,010	0,023
hsa-mir-588-Pre	4,34	15,16	3,50	0,011	0,024
hsa-miR-3187	4,24	15,39	3,64	0,017	0,037
hsa-mir-302c*	3,06	14,48	4,74	0,020	0,044
hsa-miR-1288	3,24	15,44	4,76	0,020	0,042
hsa-miR-519c- 5p	2,98	14,72	4,93	0,017	0,037
hsa-miR-2117	3,23	15,91	4,93	0,017	0,037
hsa-miR-034c- 5p	2,95	14,66	4,98	0,017	0,036
hsa-miR-9*	2,75	13,98	5,08	0,017	0,037
hsa-miR-30c-2*	2,72	15,91	5,85	0,009	0,021
hsa-mir-583	2,38	14,28	6,02	0,008	0,018
hsa-mir-214-pre	2,48	15,00	6,06	0,008	0,018
hsa-miR-2355	2,47	15,34	6,21	0,007	0,016

**Şekil 56.** Imatinib, Dasatinib ve Ponatinibin HL-60 Hücrelerindeki miRNA Ekspresyon Değişimlerinin ısı haritası

3.1.4.3. Imatinib, Dasatinib ve Ponatinibin K562/ima3 Hücrelerinde Oluşturduğu miRNA Ekspresyon Değişimleri

Imatinibin 18,35 μ M dozu 48. saatte K562/ima3 hücrelerinde kontrole göre miR-3117 ve miR-548q ekspresyonlarını yaklaşık 5 kat baskılarken 6 miRNA ekspresyonunu 3,44 – 5,65 kat arttırdı (Tablo 10, Şekil 57).

Tablo 10: Imatinibin K562/ima3 hücrelerinde miRNA ekspresyonlarına etkisi

miRNA	K562/ima3 Kontrol Transforme Ortalama	K562/ima3 Imatinib Transforme Ortalama	Kat Değişim	p	FDR p düzeltmesi
hsa-miR-3117	2,02	11,14	-5,53	0,011	0,038
hsa-miR-548q	2,13	11,37	-5,35	0,013	0,044
hsa-miR-29b-1*	12,15	3,53	3,44	0,012	0,040
hsa-miR-25*	12,25	2,33	5,26	0,013	0,044
hsa-mir-204	11,23	2,11	5,32	0,013	0,043
hsa-miR-19b-1*	12,44	2,33	5,35	0,012	0,043
hsa-miR-510	11,90	2,15	5,56	0,011	0,038
hsa-miR-3184	11,83	2,09	5,65	0,010	0,035

Dasatinibin 18,30 μ M dozu 48. saatte K562/ima3 hücrelerinde kontrole göre mir-589-Pre, mir-026b-pre ve mir-217 ekspresyonlarını yaklaşık 5 kat baskılarken miR-150 ekspresyonunu 5,30 kat arttırdı (Tablo 11, Şekil 57).

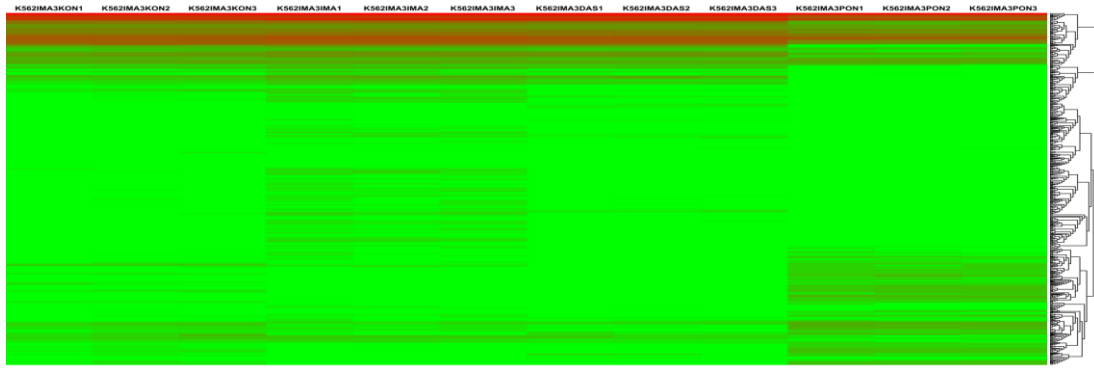
Tablo 11: Dasatinibin K562/ima3 hücrelerinde miRNA ekspresyonlarına etkisi

miRNA	K562/ima3 Kontrol Transforme Ortalama	K562/ima3 Dasatinib Transforme Ortalama	Kat Değişim	p	FDR p düzeltmesi
hsa-mir-589-Pre	11,45	2,01	-5,71	0,009	0,037
hsa-mir-026b-pre	11,43	2,12	-5,39	0,012	0,046
hsa-mir-217	10,91	2,08	-5,25	0,013	0,050
hsa-miR-510	2,15	11,38	5,29	0,013	0,050

Ponatinibin 9,87 nM dozu 48. saatte K562/ima3 hücrelerinde kontrole göre 14 miRNA ekspresyonlarını 3,38 – 5,44 kat baskılarken 14 miRNA ekspresyonlu da 2,46 – 5,35 kat arttırdı (Tablo 12, Şekil 57).

Tablo 12: Ponatinibin K562/ima3 hücrelerinde miRNA ekspresyonlarına etkisi

miRNA	K562/ima3 Kontrol Transforme Ortalama	K562/ima3 Ponatinib Transforme Ortalama	Kat Değişim	p	FDR p düzeltmesi
hsa-mir-629*	2,08	11,33	-5,44	0,011	0,035
hsa-mir-1910	2,20	11,90	-5,42	0,012	0,036
hsa-mir-218	2,50	12,49	-5,00	0,016	0,048
hsa-miR-766	2,78	13,72	-4,94	0,017	0,049
hsa-mir-302c	2,27	10,85	-4,77	0,020	0,057
hsa-mir-663-Pre	2,68	12,64	-4,72	0,020	0,058
hsa-miR-483-3p	2,97	12,48	-4,21	0,033	0,087
hsa-miR-885-3p	3,16	13,11	-4,16	0,034	0,090
hsa-miR-615-5p	3,07	12,33	-4,02	0,040	0,102
hsa-miR-146b-pre	2,75	10,99	-4,00	0,040	0,103
hsa-miR-541	2,98	11,86	-3,98	0,041	0,104
hsa-mir-139-pre	3,21	12,44	-3,87	0,046	0,114
hsa-mir-628-3p	3,16	12,23	-3,87	0,046	0,115
hsa-miR-484	3,41	13,06	-3,83	0,047	0,117
hsa-miR-4272	12,49	5,07	2,46	0,044	0,111
hsa-miR-548b-5p	14,09	5,69	2,48	0,046	0,116
hsa-miR-29b-1*	13,08	3,53	3,70	0,008	0,026
hsa-mir-027b-pre	13,36	3,41	3,92	0,043	0,110
hsa-miR-520a-5p	11,47	2,88	3,98	0,041	0,104
hsa-mir-512-2-pre	13,25	3,19	4,15	0,035	0,091
hsa-mir-659-Pre	13,07	3,08	4,26	0,031	0,084
hsa-mir-643-Pre	11,73	2,72	4,33	0,030	0,080
hsa-mir-323-pre	11,71	2,60	4,50	0,025	0,070
hsa-miR-513a-3p	10,19	2,27	4,50	0,028	0,077
hsa-mir-647	11,76	2,36	5,00	0,016	0,048
hsa-miR-518a-5p	11,51	2,25	5,10	0,015	0,045
hsa-miR-1277	12,53	2,37	5,29	0,013	0,039
hsa-mir-331-pre	12,07	2,25	5,35	0,012	0,038



Şekil 57. Imatinib, Dasatinib ve Ponatinibin K562/ima3 Hücrelerindeki miRNA Ekspresyon Değişimlerinin ısı haritası

3.1.4.4. Imatinib, Dasatinib ve Ponatinibin NCI-BL 2171 Hücrelerinde Oluşturduğu miRNA Ekspresyon Değişimleri

Imatinibin 274 nM dozu 48. saatte NCI-BL 2171 hücrelerinde kontrole göre miR-374b ekspresyonunu 4,47 kat baskılarken 50 miRNA ekspresyonunu 2,09 – 7,35 kat arttırdı (Tablo 13, Şekil 58).

Tablo 13: Imatinibin NCI-BL 2171 hücrelerinde miRNA ekspresyonlarına etkisi

miRNA	NCI-BL 2171 Kontrol Transformasyon Ortalama	NCI-BL 2171 Imatinib Transformasyon Ortalama	Kat Değişim	p	FDR p düzeltmesi
hsa-miR-374b	13,87	3,11	-4,47	0,026	0,048
hsa-mir-193a-pre	7,28	15,20	2,09	0,000	0,000
hsa-mir-637-Pre	7,35	16,12	2,19	0,025	0,047
hsa-mir-619-Pre	6,05	15,23	2,52	0,003	0,007
hsa-mir-221-pre	5,75	15,38	2,67	0,004	0,008
hsa-mir-340-3p	5,25	14,83	2,82	0,022	0,042
hsa-miR-518d-3p	5,33	15,64	2,93	0,019	0,037
hsa-mir-328	4,75	14,45	3,04	0,021	0,040
hsa-miR-493	5,00	15,35	3,07	0,015	0,029
hsa-miR-502-pre	4,56	14,77	3,24	0,018	0,034
hsa-miR-193b-pre	4,66	15,57	3,33	0,012	0,024

Tablo 13' ün devamı

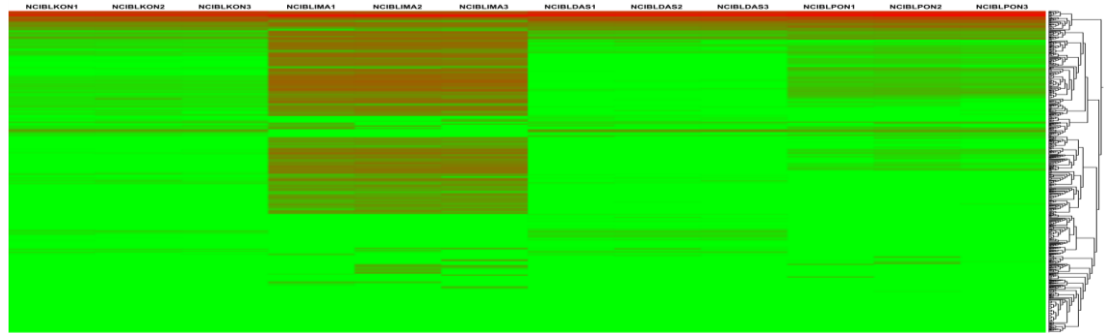
miRNA	NCI-BL 2171 Kontrol Transforme Ortalama	NCI-BL 2171 Imatinib Transforme Ortalama	Kat Değişim	p	FDR p düzeltmesi
hsa-miR-29b-2*	4,13	15,08	3,65	0,008	0,017
hsa-miR-371-5p	3,52	15,82	4,50	0,025	0,047
hsa-mir-189	3,02	13,80	4,57	0,024	0,044
hsa-miR-330-5p	3,02	13,86	4,59	0,023	0,044
hsa-mir-184	3,02	14,12	4,67	0,022	0,041
hsa-mir-147	2,85	13,41	4,69	0,026	0,048
hsa-mir-642-Pre	2,89	13,65	4,72	0,020	0,039
hsa-miR-28-3p	3,31	15,63	4,72	0,020	0,039
hsa-miR-4266	2,60	12,24	4,72	0,023	0,043
hsa-miR-1184	3,02	14,27	4,74	0,021	0,039
hsa-mir-184-pre	2,80	13,28	4,74	0,024	0,046
hsa-mir-367-pre	3,07	14,72	4,81	0,019	0,037
hsa-mir-182-pre	2,78	13,50	4,85	0,018	0,035
hsa-miR-485-5p	3,03	14,74	4,85	0,018	0,035
hsa-mir-624*	3,14	15,24	4,85	0,019	0,035
hsa-mir-647	3,05	14,98	4,90	0,018	0,035
hsa-mir-369-pre	2,95	14,61	4,95	0,017	0,032
hsa-miR-412	2,94	14,83	5,03	0,016	0,031
hsa-miR-668	2,79	14,13	5,05	0,016	0,030
hsa-miR-759	2,89	14,70	5,08	0,015	0,030
hsa-miR-500b	2,58	13,06	5,08	0,016	0,031
hsa-miR-938	2,79	14,24	5,10	0,015	0,029
hsa-miR-485-3p	2,84	14,65	5,15	0,014	0,028
hsa-mir-192-pre	2,73	14,29	5,24	0,013	0,026
hsa-mir-517a-pre	2,69	14,22	5,29	0,013	0,026
hsa-mir-023b-pre	2,76	14,71	5,35	0,013	0,025
hsa-miR-664*	2,48	13,37	5,41	0,016	0,031
hsa-mir-222-pre	2,93	16,04	5,46	0,011	0,022
hsa-miR-500-pre	2,58	14,46	5,62	0,010	0,020
hsa-mir-326	2,42	13,69	5,65	0,010	0,020
hsa-mir-638	2,31	13,52	5,85	0,009	0,018
hsa-mir-106a-pre	2,36	14,10	5,99	0,008	0,016
hsa-miR-15a*	2,48	15,32	6,17	0,007	0,014
hsa-mir-560	2,37	14,67	6,17	0,007	0,015
hsa-mir-523-pre	2,31	14,34	6,21	0,007	0,014
hsa-miR-1247	2,36	15,23	6,45	0,005	0,012
hsa-miR-409-pre	2,35	15,27	6,49	0,005	0,011
hsa-miR-1206	2,14	14,28	6,67	0,006	0,012
hsa-miR-494-pre	2,04	13,85	6,80	0,005	0,011
hsa-miR-125a-3p	2,07	15,21	7,35	0,003	0,007

Dasatinibin 48 nM dozu 24. saatte NCI-BL 2171 hücrelerinde kontrole göre miRNA ekspresyonlarında anlamlı bir etkisinin olmadığı saptandı.

Ponatinibin 30 nM dozu 48. saatte NCI-BL 2171 hücrelerinde kontrole göre 5 miRNA ekspresyonunu yaklaşık 5 kat arttırdı (Tablo 14, Şekil 58).

Tablo 14: Ponatinibin NCI-BL 2171 hücrelerinde miRNA ekspresyonlarına etkisi

miRNA	NCI-BL 2171 Kontrol Transforme Ortalama	NCI-BL 2171 Ponatinib Transforme Ortalama	Kat Değişim	p	FDR p düzeltmesi
hsa-miR-1247	12,00	2,36	5,08	0,015	0,049
hsa-mir-523-pre	11,94	2,31	5,15	0,015	0,048
hsa-miR-409-pre	12,56	2,35	5,35	0,012	0,041
hsa-mir-638	13,61	2,31	5,88	0,008	0,029
hsa-miR-125a-3p	12,39	2,07	5,99	0,008	0,027



Şekil 58. Imatinib, Dasatinib ve Ponatinibin NCI-BL 2171 Hücrelerindeki miRNA Ekspresyon Değişimlerinin ısı haritası

3.1.4.5. Imatinib, Dasatinib ve Ponatinibin Lösemi Kök Hücrelerinde Oluşturduğu miRNA Ekspresyon Değişimleri

Imatinibin 87 μ M dozu 48. saatte LSC hücrelerinde kontrole göre 10 miRNA ekspresyonunu 3,95 – 5,33 kat baskılarken 2 miRNA ekspresyonunu 2,93 – 3,47kat arttırdı (Tablo 15, Şekil 59).

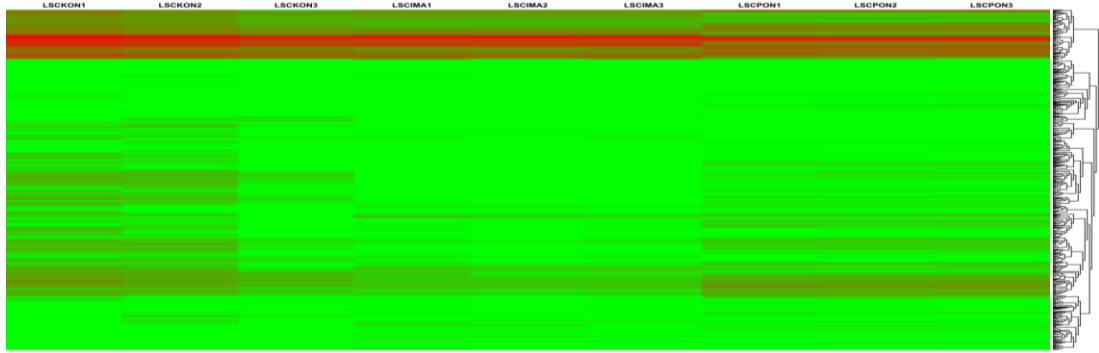
Tablo 15: Imatinibin LSC hücrelerinde miRNA ekspresyonlarına etkisi

miRNA	LSC Kontrol Transforme Ortalama	LSC Imatinib Transforme Ortalama	Kat Değişim	p	FDR p düzeltmesi
hsa-miR-100*	14,56	2,73	-5,33	0,003	0,017
hsa-miR-4294	15,13	2,86	-5,30	0,003	0,020
hsa-miR-922	14,41	2,80	-5,15	0,003	0,019
hsa-mir-517*	12,09	2,56	-4,73	0,004	0,026
hsa-mir-613	13,45	3,06	-4,40	0,011	0,043
hsa-mir-033-pre	14,43	3,31	-4,36	0,009	0,038
hsa-mir-379-pre	14,07	3,36	-4,19	0,012	0,045
hsa-miR-3131	14,47	3,46	-4,18	0,012	0,046
hsa-miR-1228	13,68	3,31	-4,13	0,012	0,045
hsa-miR-302d*	12,58	3,19	-3,95	0,013	0,048
hsa-miR-1249	3,76	11,03	2,93	0,004	0,024
hsa-miR-320e	4,05	14,03	3,47	0,003	0,017

Ponatinibin 870 nM dozu 48. saatte LSC hücrelerinde kontrole göre 5 miRNA ekspresyonunu 2,82 – 3,91 kat arttırdı (Tablo 16, Şekil 59).

Tablo 16: Ponatinibin LSC hücrelerinde miRNA ekspresyonlarına etkisi

miRNA	LSC Kontrol Transforme Ortalama	LSC Imatinib Transforme Ortalama	Kat Değişim	p	FDR p düzeltmesi
hsa-mir-200a- pre	4,38	12,40	2,82	0,012	0,048
hsa-miR-1323	4,17	12,10	2,90	0,009	0,038
hsa-miR-3165	4,06	11,77	2,90	0,013	0,050
hsa-miR-4285	3,49	10,97	3,14	0,002	0,010
hsa-mir-520c- pre	3,19	10,20	3,19	0,002	0,015
hsa-miR-1249	3,76	12,83	3,41	0,001	0,004
hsa-miR-320e	4,05	14,00	3,46	0,003	0,016
hsa-miR-508-3p	3,03	11,82	3,91	0,000	0,001



Şekil 58. Imatinib, Dasatinib ve Ponatinibin İnsan Lösemi Kanseri Kök Hücrelerindeki miRNA Ekspresyon Değişimlerinin ısı haritası

BÖLÜM IV

4.1. TARTIŞMA

Kronik myeloid lösemi, hematopoietik kök hücrenin klonal, malin bir hastalığı olup, BCR ve ABL genlerinin füzyonu ile sonuçlanan, 9 ve 22 nolu kromozomların translokasyonu ile karakterizedir (149). Translokasyon sonucu oluşan Philadelphia kromozomunun protein ürünü, tirozin kinaz aktivitesine sahip lösemik transformasyona neden olan bir protein kinazdır (197).

Imatinib, ABL spesifik aktivite gösteren 2- fenilaminopirimidin tirozin kinaz inhibitörüdür. p210 onkoproteinin ATP bağlanan bölgesindeki aminoasitlere, ancak kinazın aktivasyon ilmek yapısı kapalı olduğunda spesifik olarak bağlanabilir. Imatinibin tirozin kinaza konformasyonel spesifik bağlanması imatinibin seçiciliğini arttırmaktadır (207). Imatinib bağlanmasıyla, ABL' nin fosfat bağlayan ilmek yapısının pürüzsüz şekli bozulur. Böylece proteinin ATP bağlayamayan inaktif konformasyonda kalmasını sağlar. Böylece tirozin otofosforilasyonu engellenir ve dolayısıyla substrat fosforilasyonu gerçekleşmez, lökomogenezi başlatan sinyal yollarının kapanması sağlanır (57, 167).

Druker ve arkadaşları, BCR-ABL proteini lösemik hücrelere has olduğundan, bu hücrelerde yüksek düzeylerde eksprese edildiğinden ve

lösemiye indüklemek için mutlaka BCR-ABL tirozin kinaz aktivitesi gerektiğinden yola çıkarak imatinibin KML için ideal bir hedef olduğunu ortaya koymuşlardır. BCR-ABL içeren proliferen olan myeloid hücrelerin imatinib ile spesifik olarak inhibe edildiğı ve ya öldürüldüğünü ancak imatinibin normal hücrelere minimal zarar verdiğini göstermişlerdir (205).

Kosova ve ark. çalışmalarında, imatinib IC_{50} dozunu K562 KML hücre hattı için 280 nM, K562/ima3 imatinib dirençli KML hücre hattı için 14761 nM bulmuşlardır (133).

Başka bir çalışmada Gottschalk ve ark., K562 KML hücre hattı için imatinibin IC_{50} değerini 4,7 μ M olarak göstermişler ancak BCR-ABL negatif HC-1 hücrelerinde imatinibin etkisiz olduğunu ortaya koymuşlardır (80).

Ohtomo ve ark. yaptıkları çalışmada, 24-96. saatte ortamına 3-30 μ M imatinib eklenen HL-60 hücrelerinde eklenmeyenlere göre, hücre canlılığını 1,6 kat arttırdığını ortaya koymuşlardır. Nedenini tam olarak açıklayamamakla birlikte otofaji ile ilişkilendirmişlerdir (179).

Deguchi ve ark, imatinibin IC_{50} değerini K562 KML hücre hattı için 414,8 nM, HL-60 Philadelphia negatif lösemi hücre hattı için 2000 nM'dan büyük olarak saptamışlardır (53).

Çalışmamızda, WST-1 testi ile sitotoksositeye bakılmış, K562 KML hücrelerinde imatinibin IC_{50} dozu 650 nM olarak saptanmıştır. Saptadığımız imatinibin sitotoksitesi Kosova ve ark. nın ve Deguchi ve ark. nın belirledikleri sitotoksiteden yüksek Gottschalk ve ark., belirlediğinden düşüktür. Imatinibin sitotoksitesi HL-60 BCR-ABL negatif lösemi hücre hattı

için yüksek olup IC_{50} değerini 18 μM olarak saptanmıştır. Deguchi ve ark. IC_{50} değerini HL-60 hücre hattı için IC_{50} değerini 2000 nM'dan büyük olarak belirlemiş, Gottschalk ve ark. HC-1 BCR-ABL negatif lösemi hattı için imatinibin etkisiz olduğunu ortaya koymuşlardır.

Imatinib dirençli KML hücre hattı K562/ima3' de imatinibin IC_{50} değeri yüksek olarak (18350 nM) belirlenmiştir. Kosova ve ark., K562/ima3 hücre hattı için imatinib IC_{50} değerini 14761 nM bulmuşlardır. Sitotoksitedeki bu farklılığın, etken maddelerin farklı kimyasal yapılarıdaki analoglarının kullanılmış olabileceğinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Ohtomo ve ark. ise HL-60 hücrelerinde imatinibin sitotoksitesini belirleyemeyip proliferatif olarak değerlendirmesi etken maddenin etkinliğinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda sağlıklı B-lenfositlerden oluşan NCI-BL 2171 kontrol hücre hattındaki hücrelerin, kronik myeloid lösemi hücrelerine kıyasla imatinibe karşı daha hassas olduğu ve imatinib IC_{50} dozunun 274 nM olduğu saptanmıştır. Imatinibin TKİ etkisinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Copland ve ark., 72. saatte 5 μM imatinibin $CD34^+$ hücrelerde %69, $CD34^+$ $CD38^-$ hücrelerde ise %47 azalmaya neden olduğunu gözlemlemişlerdir. Aradaki farkı, daha ilksel hücreler olan $CD34^+$ $CD38^-$ hücrelerinde daha yüksek BCR-ABL transkripsiyonunun gözlenmesiyle de teyit edilen imatinib direnciyle ilişkilendirmişlerdir (46). İnsan lösemi kanser kök hücrelerinde imatinibin IC_{50} dozunu 87,3 μM olarak saptadık ve bu yüksek değerin kök hücrelerdeki imatinib direnci kaynaklı olduğunu düşünmekteyiz.

Park ve ark., imatinible muamele edilmeyen K562 hücrelerinin %3,8'i erken apoptotik, %2,6' sı geç apoptotik ya da nekrotik olarak belirlemişlerdir. 2,5 μ M imatinib ile muamele edilen K562 hücrelerinde ise kontrolle karşılaştırıldığında, 24. saatte %5,8 erken apoptotik %3,7 geç apoptotik ve ya nekrotik, 48. saatte %5,6 erken apoptotik %10,7 geç apoptotik ve ya nekrotik ve 72. saatte %9,1 erken apoptotik %29,8 geç apoptotik ve ya nekrotik hücre seviyelerine yükseldiğini ortaya koymuşlardır (185). Bu bulgular uygulanan doz farkı da gözetildiğinde bizim sonuçlarımızla örtüşmektedir.

Greene ve ark., HL-60 hücrelerinde 250 nM imatinibin tek başına apoptozu uyarmak için yeterli olmadığını ortaya koymuştur (88). Çalışmamızda Annexin V analiziyle, imatinibin IC₅₀ dozlarıyla muamele edilen K562 hücrelerinde HL-60 ve K562/ima3 hücrelerine göre yaklaşık 3 kat apoptoz indüksiyonu gözlenmiştir. NCI-BL 2171 hücrelerinde ise K562 hücrelerine yakın oranda apoptoz indüksiyonu görülmüştür. HL-60 ve K562/ima3 hücre hatları arasındaki bu benzerlik imatinibin BCR-ABL üzerinden etki gösterememesinden, NCI-BL 2171 hücrelerinde yüksek apoptoz oranının hücrelere uygulanan TKİ etkisinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. JC-1 Mitoprobe analiziyle, imatinib IC₅₀ dozu ile muamele edilen K562 hücrelerinde HL-60 hücrelerine göre yaklaşık 2 kat, K562/ima3 hücrelerine göre yaklaşık 1,5 kat apoptoz indüklendiği gözlenmiştir. NCI-BL 2171 hücrelerinde ise K562 hücrelerine göre yaklaşık 2 kat apoptoz indüksiyonu gözlenmiştir. İki yöntemden elde ettiğimiz sonuçlar arasındaki farklılığın apoptozu farklı evrelerini detekte etmelerinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Basciani ve arkadaşları, Kaposi sarkomunda imatinib tedavisi sonrasında görülen hücre ölümlerinin apoptoz-otofaji işbirliğine dayalı olduğunu göstermişlerdir (16). Klorokin otofagozomun lizozom ile birleşmesini bloke ederek otofajik degradasyonu baskılayan bir moleküldür. Mishima ve ark. çalışmalarında, K562 hücrelerini 0,5 μ M imatinible ve 0,5 μ M imatinib+25 μ M klorokinle ayrı ayrı muamele etmişler ve klorokin ile otofaji mekanizması bloke edilen grupta anlamlı olarak daha düşük hücre canlılığı gözlemişlerdir. Bu bilgiler ışığında, imatinible uyarılmış apoptozun yanında, otofajinin de KML hücre ölümünü hızlandırıcı bir etken olduğunu ve otofajinin baskılanmasının hücre ölümünü arttırdığını ortaya koymuşlardır. Ayrıca otofajinin BCR-ABL tirozin kinazı ile Ras/MAPK sinyali ile uyarıldığından ötürü, direnç mekanizmasının otofaji üzerinde etkili olduğunu öne sürmüşlerdir. Yabanıl tip BCR-ABL taşıyan BaF3 fare KML hücre hattında ve mutant BCR-ABL taşıyan BaF3 hücrelerine imatinibin farklı dozları tek başına ve klorokinle kombine olarak verildiğinde, klorokinle birlikte verilen yüksek imatinib dozlarının mutant BCR-ABL taşıyan BaF3 hücrelerinde bile hücre canlılığını ciddi oranda düşürdüğünü saptamışlardır (162).

Ohtomo ve ark. çalışmalarında, imatinib ile muamele edilen HL-60 hücrelerinde otofajinin indüklendiğini, hücrelerdeki otofagozom artışını elektron mikroskobu ile görüntüleyerek ortaya koymuşlardır (179). LC3B-II oluşmasıyla p62 baskılanır. p62 hem LC3 molekülü ile etkileşim bölgesi hem de ubiquitinlenmiş kargoları bağlamak için ubiquitin ilişkili bölge taşımaktadır. Bu yüzden p62 baskılanması, otofaji süresince LC3-p62 etkileşimiyle artmış degradasyonun göstergesidir (130, 165). Otofagozom oluşumunu bloke eden lizozomal proteaz inhibitörlerinin tek başına muamele edilmesine göre,

imatinib ile kombine muameleden sonra LC3B-II indüksiyonu çok daha fazla uyarılmıştır (164). Bu verilere dayanarak çeşitli hücrelerde imatinibe yanıt olarak otofajinin arttığını ve otofagozomların miktarındaki artışın tek başına otofaji akışının bloklanmasından kaynaklanmadığını ortaya koymuşlardır (179).

Çalışmamızda Mishima ve ark. bulgularını destekleyecek yönde, uygulanmamış kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında imatinib ile muamele edilmiş K562 hücrelerinde otofajiyi 1,93 kat baskılandığı, K562/ima3 hücrelerinde 2,74 kat baskılandığı bulunmuştur. Dirençli hücrelerde daha yüksek otofajik baskılanma nedenini direnç mekanizmasında hücre otofajiyi yüksek oranda kullandığından dolayı olduğunu düşünmekteyiz. NCI-BL 2171 kontrol hücre hattında anlamlı olarak otofaji represyonu ya da indüksiyonu gözlenmemiştir.

Çalışmamızda ayrıca HL-60 hücre hattının imatinible muamele edilmesi sonucu otofajinin kontrol hücrelerine göre %25'e yakın bir oranda indüklendiği ortaya konmuştur. Ohtomo ve ark. yaptıkları çalışmadaki bulguları da bu sonucu desteklemektedir. Lösemi kök hücrelerinde ise %50 oranında otofaji indüksiyonu gözlenmiştir. Bunun kök hücrelerin apoptozdan kaçış mekanizmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Dasatinib, imatinib uygulamasının KML hastalarının tedavisinde etkisiz kaldığı durumlarda kullanılan çok hedefli bir tirozin kinaz inhibitörüdür (152, 230). ABL kinaza hem aktif hem de inaktif konformasyondayken bağlanabilmektedir (47, 263). Hücre hattı modellerinde, imatinib dirençli kinaz bölgesindeki, dasatinibe karşı direnç oluşmasında da etkili olan T315I

mutasyonu dışındaki tüm mutasyonlara bağlanabilmekte ve inhibisyon sağlayabilmektedir (174, 214).

Deguchi ve ark. çalışmalarında, dasatinibin IC_{50} değerini K562 KML hücre hattı için 1,5 nM, HL-60 hücre hattı için imatinibe benzer şekilde 2000 nM'dan büyük olarak saptamışlardır. Ayrıca T315A, F317L, F317V, M351T ve T315I mutant BCR-CBL taşıyan BaF3 hücrelerinde de dasatinibin IC_{50} dozunu 2000 nM'dan büyük olarak saptamışlardır (53).

O'Hare ve ark. ise BaF3 hücreleri ile yaptıkları çalışmada, dasatinibin IC_{50} dozunu 0,8 nM olarak belirlemişler ve dasatinibin imatinibden 325 kat daha güçlü olduğunu ortaya koymuşlardır (175).

Nam ve ark. çalışmalarında 1 nM dasatinibi K562 ve HL-60 hücreleri ile muamele etmişler, 48. saat sonunda K562 hücrelerinin canlılığında %50 azalma gözlenirken, HL-60 hücre canlılığında yaklaşık %10 oranında artış gözlenmiştir (168).

K562 KML hücrelerinde dasatinibin IC_{50} dozu 1,7 nM olarak saptanmış ve imatinibten 382 kat daha etkili olduğu bulunmuştur. Deguchi ve ark. dasatinib için 1,5 nM olarak buldukları IC_{50} dozu ve O'Hare ve ark. ortaya koydukları dasatinibin imatinibe göre etki oranı bizim bulgularımızla da örtüşmektedir. HL-60 AML hücrelerinde dasatinibin IC_{50} dozunu 896 nM olarak saptadık. Bu değeri dasatinibin çok hedefli bir tirozin kinaz inhibitörü olmasından dolayı, BCR-ABL bulunmasa da diğer tirozin kinazlar üzerinden inhibisyonu sağlayarak gerçekleştirdiğine bağlamaktayız. Deguchi ve ark. bulgularıyla da desteklenecek şekilde K562/ima3 imatinib dirençli hücrelerde dasatinibin IC_{50} dozu 1830 nM olarak saptandı. Hücrelerdeki imatinib direncinin BCR-ABL kinaz bölgesi mutasyonlarından kaynaklanabileceğini,

bu mutasyonlardan T315I mutasyonunun dasatinibi etkisiz kıldığını ve hücrelerde dasatinibe de direnç geliştiğinden ötürü IC₅₀ dozunun yüksek olduğunu düşünmekteyiz.

NCI-BL 2171 kontrol hücre hattındaki hücrelerin, K562 lösemi hücrelerine göre imatinibe daha hassas olmalarının aksine, dasatinibe karşı hassasiyet göstermedikleri ortaya konmuştur. NCI-BL 2171 IC₅₀ dozu; K562 hücreleri IC₅₀ dozundan 28 kat daha yüksek olacak şekilde 48 nM olarak bulunmuştur. Bunun da tedavi sırasında dasatinibin sağlıklı hücrelere zarar vermemesi ve sadece lösemik hücreleri hedeflemesi açısından önemli bir sonuç olduğunu düşünmekteyiz.

Copland ve ark., CD34⁺CD38⁻ primitif KML hücrelerini 10 nM ve 150 nM dasatinib ile muamele etmişler ve 10 nM dasatinibin hücrelerde %33 azalmaya, 150 nM dasatinibin ise %60 azalmaya neden olduğunu ortaya koymuşlardır (46). Primitif sessiz lösemi kök hücrelerinin doğası itibariyle imatinibe (84) ve dasatinibe (46) direçli oldukları *in vitro* ortamda gösterilmiştir. Chomel ve Turhan kök hücreler üzerinde dasatinibin imatinibe göre daha etkili olduklarını söylemişlerdir (40).

Çalışmamızda lösemi kök hücrelerinde dasatinib IC₅₀ dozu 870 nM olarak saptanmıştır. Bu değer K562 hücrelerinin IC₅₀ dozuna kıyasla oldukça yüksek bir değerdir ve bunu sebebini lösemi kök hücrelerinin dasatinibe dirençli olmasına bağlamaktayız. Ama yine de lösemi kök hücrelerine karşı dasatinib, imatinibe göre 10 kat daha etkili olarak bulunmuştur.

Nam ve ark., K562 hücreleri üzerinde dasatinibin apoptotik etkisini Annexin V yöntemi ile araştırmış ve 1X10⁵/ml yoğunluğunda hücre için 0,5;

1; 10 nM dasatinibin sırasıyla yaklaşık olarak %25, %40, %60 oranında apoptozu uyardığını bulmuşlardır (168).

Fiskus ve ark., K562 ve LAMA-84 KML hücrelerini 2 nM' dan 10 nM' a kadar dasatinible muamele etmişler ve doza bağımlı olarak apoptozun uyarıldığını ortaya koymuşlardır. 10 nM dasatinibin K562 hücrelerinde %50, LAMA-84 hücrelerinde ise %90 oranında apoptozu indüklediğini bulmuşlardır. Benzer şekilde 5 nM ile 20 nM arası dasatinib ile muamele edilmiş BaF3 hücrelerinde de, en yüksek konsantrasyonda yaklaşık %70 apoptoz indüksiyonu olmak üzere, doza bağımlı apoptoz artışı gözlemlenmiştir (71).

Çalışmamızda Annexin V analiziyle, dasatinibin IC₅₀ dozlarıyla muamele edilen K562 hücreleri kontrolle karşılaştırıldığında 24., 48. ve 72. saatlerde sırasıyla 1,77 kat, 2,51 kat, 3,81 kat apoptotik artış gözlenmiştir. Hücrelerin dasatinible muamele süresi arttıkça, apoptoz indüksiyonu da arttırmıştır. Dasatinible muamele edilmiş HL-60 hücrelerinde kontrolle karşılaştırıldığında anlamlı bir apoptotik artış gözlenmemiştir. K562/ima3 hücrelerinde ise, dasatinible muamele edilmelerinin 48. ve 72. saatlerinde kontrole göre yaklaşık 2 kat apoptoz indüksiyonu gözlenmiştir. NCI-BL 2171 hücrelerinde K562 hücrelerinden 2 kat fazla oranda apoptoz indüksiyonu görülmüştür. NCI-BL 2171 hücrelerinde yüksek apoptoz oranının imatinible aynı mekanizmadan kaynakladığını düşünmekteyiz. JC-1 Mitoprobe analiziyle, dasatinibin IC₅₀ dozu ile muamele edilen K562 hücrelerinde 72. saatin sonunda kontrole göre 3 kat apoptoz indüksiyonu gözlenmiştir. Dasatinib K562 hücrelerinde apoptozu HL-60 hücrelerine göre yaklaşık 1,5 kat indüklemektedir. K562/ima3 hücrelerinde ise 72. saatin sonunda kontrole göre yaklaşık 1,5 kat apoptoz indüklendiği gözlenmiştir. NCI-BL 2171

hücrelerinde ise K562 hücrelerine göre yaklaşık 1,5 kat apoptoz indüksiyonu gözlenmiştir. İki yöntemden elde ettiğimiz sonuçlar arasındaki farkın apoptozu farklı yollar üzerinden detekte etmelerinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda dasatinibin hem K562 hem de HL-60 hücrelerinde kontrole göre otofaji yaklaşık 2 kat, lösemi kök hücrelerinde ise 2,5 kat baskıladığı gözlenmiştir. K562/ima3 imatinib dirençli hücrelerde ise otofaji klorokinle muamele edilmiş hücrelere göre 4,62 kat baskılanmıştır. NCI-BL 2171 sağlıklı kontrol hücrelerinde ise otofaji baskılanmamıştır. Dasatinibin HL-60, NCI-BL 2171 ve lösemi kök hücrelerinde otofaji üzerine olan etkisi ile çalışma bulunmamaktadır. Imatinibe benzer mekanizma ile otofajiye etki ettiğini düşünmekteyiz.

Ponatinibin faz çalışmaları sürmekte olan bir TKI' dır. T315I ile hidrojen bağı kurmaya gerek duymayan bir yapı şeklinde geliştirildiğinden T315I mutant ABL1 otofosforilasyonunu da inhibe edebilmektedir. Ponatinib, ancak inaktif konformasyondaki tirozin kinaza bağlanabilmektedir. Ponatinib SRC ailesi kinazları, KIT, VEGFR2, PDGFR α , FGFR1 gibi kinazlarda da aktivite gösterebilmektedir (178).

O'Hare ve arkadaşları, ponatinibin hem yabanıl tip hem T315I mutant BCR-ABL ekspresyonu olan BaF3 hücrelerinde ve KML olgularından alınan hücrelerde büyümeyi baskıladığını ve apoptoza yönlendirdiğini ortaya koymuşlardı. BaF3 hücrelerinde IC₅₀ dozlarını, yabanıl tip BCR-ABL bulunduran hücreler için 0,5 nM, T315I mutant BCR-ABL bulunduran hücreler için 12 nM olarak bulmuşlardır. Benzer bir şekilde myeloid blast krizindeki KML olgularından alınan hücrelerde ponatinibin IC₅₀ dozunu yabanıl tip BCR-

ABL bulunduran hücrler için 0,37 nM, T315I mutant BCR-ABL bulunduran hücreler için 2 nM olarak bulmuşlardır. Ponatinib IC₅₀ dozu KML hücre hatlarından K562 için 3,9 nM, KY01 için 0,4 nM, LAMA için 0,3 nM olarak belirlemişlerdir. BCR-ABL negatif lösemi hücre hatlarında anlamlı bir sonuç bulamamışlardır (178).

O'Hare ve ark. bir başka çalışmaları, ponatinibin K562 hücrelerinde büyümeyi inhibe ederken HL-60 hücrelerinde etmediklerini ortaya koymuşlardır. K562 hücrelerinin 24 saat 10 nM' dan 100 nM' a artan dozda ponatinible muamelesi sonucu, doza bağımlı olarak G₀/G₁ fazında akümülayon gözlerken, HL-60 hücrelerinde benzeri bir durum gözlememişlerdir (176).

Zhou ve ark. ise, BaF3 hücrelerinde ponatinib IC₅₀ dozunu 0,5 nM olarak bulmuşlardır ki bu değer imatinibden 520 kat, dasatinibden ise 1,6 kat düşük bir değerdir. T315I mutant BCR-ABL taşıyan BaF3 hücrelerinde ise IC₅₀ dozunu 11 nM olarak belirlemişlerdir (271).

Gozgit ve ark. AML hücre hatlarında yaptıkları çalışmada, ponatinibin IC₅₀ dozlarını MV4-11, Kasumi-1, KG1, EOL1 hücreleri için sırasıyla 2nM, 8nM, 17 nM, 0,5 nM olarak bulmuşlardır (81).

Çalışmamızda, K562 KML hücrelerinde ponatinibin IC₅₀ dozu 0,24 nM olarak saptanmış ve dasatinibden 8 kat daha etkili olduğu bulunmuştur. HL-60 AML hücrelerinde dasatinibin IC₅₀ dozu 607 nM olarak saptandı. Bu değeri ponatinibin çok hedefli bir tirozin kinaz inhibitörü olmasından dolayı, BCR-ABL bulunmasa da diğer tirozin kinazlar üzerinden inhibisyonu sağlayarak gerçekleştirdiğine bağlamaktayız. O'Hare ve ark.' nın çalışmaları, T315I mutant BCR-ABL taşıyan BaF3 hücrelerinde ponatinib

IC₅₀ değeri, yabanıl tip BaF3 hücrelerine göre 24 kat fazla olarak saptanırken, çalışmamızda K562/ima3 imatinib dirençli hücrelerde ponatinibin IC₅₀ dozu 9,37 nM olduğu ve K562 hücrelerinin den 41 kat fazla olduğu saptandı. Imatinib direncinin, potatinibin IC₅₀ değerini yükselttiği yapılan göstermiştir. Çalışmamızda da dirençli hücrede ponatinibin IC₅₀ değeri yüksek bulunmuştur.

NCI-BL 2171 kontrol hücre hattındaki hücrelerin, dasatinibe olduğu gibi ponatinibe karşı da hassasiyet göstermedikleri ortaya konmuştur. NCI-BL 2171 IC₅₀ dozu; K562 hücreleri IC₅₀ dozundan 125 kat daha yüksek olacak şekilde 30 nM olarak bulunmuştur. Bunun da tedavi sırasında ponatinibin sağlıklı hücrelere zarar vermemesi ve sadece lösemik hücreleri hedeflemesi açısından önemli bir sonuç olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda ponatinibin insan lösemi kanser kök hücreleri için IC₅₀ dozu 6,46 µM olarak saptanmış ve bu hücrelerde ponatinibe karşı doğal bir ilaç direnç mekanizması olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

O'Hare ve ark., K562 ve HL-60 hücrelerini farklı dozlarda ponatinibe 48 saat muamele etmişler ve Annexin V ile apoptozu gözlemlemişlerdir. K562 hücrelerinde 100 nM ponatinibin apoptozu indüklediğini ve indüksiyonun doza bağlı olarak arttığını, bunula beraber HL-60 hücrelerinde 10 µM ponatinibin bile apoptozu indüklediğini ortaya koymuşlardır (176).

Çalışmamızda Annexin V analiziyle, ponatinibin IC₅₀ dozlarıyla muamele edilen K562 hücreleri kontrolle karşılaştırıldığında 24., 48. ve 72. saatlerde sırasıyla 2,24 kat, 2,93 kat, 3,00 kat apoptotik artış gözlenmiştir. Ponatinibe muamele edilmiş HL-60 hücrelerinde kontrolle karşılaştırıldığında yaklaşık K562 hücreleri kadar apoptotik indüksiyon gözlenmiştir. O'Hare ve

ark.' nın çalışmasıyla sonuçlarımız çelişmektedir. K562/ima3 hücrelerinde ise, 72 saat boyunca kontrole göre yaklaşık 1,5 kat apoptotik artış gözlenmiştir. 72. saatte NCI-BL 2171 hücrelerinde K562 hücrelerinden 2 kat fazla oranda apoptoz indüksiyonu görülmüştür. NCI-BL 2171 hücrelerinde yüksek apoptoz oranının hücrelere uygulanan yüksek dozdan kaynaklandığını düşünmekteyiz. JC-1 Mitoprobe analiziyle de K562, HL-60, K562/ima3 hücre hatları için benzer sonuçlar bulunmuştur. NCI-BL 2171 hücrelerinde ise K562 hücrelerine göre yaklaşık 1,5 kat apoptoz indüksiyonu gözlenmiştir. NCI-BL 2171 hücrelerine ponatinib muamlesiyle elde ettiğimiz sonuçlar dasatinib ile benzerlik göstermektedir.

Ponatinib kontrole karşılaştırıldığında, K562 hücre hattında otofajiyi, dasatinib ile benzer olarak yaklaşık 2 kat, HL-60 hücrelerinde 1,5 kat, lösemi kök hücrelerinde ise yaklaşık 2 kat baskılamıştır. Imatinib ve dasatinib gibi NCI-BL 2171 kontrol hücrelerinde otofajik baskılanmayı indüklememiştir. K562/ima3 imatinib dirençli hücrelerde ise klorokine göre 9,15 kat gibi ciddi oranda bir otofaji baskılanması gözlenmiştir. Ponatinibin dirençli hücreler üzerindeki etkisinin apoptozdan çok otofaji üzerinden gerçekleştiği söylenebilir ve bunu direnç mekanizmasında bu yolağın aktif olması ile ilişkilendirmekteyiz.

Guogen ve ark. (156) miR-422a' nın MLH1 genini baskılayarak MutL α genini aşağı regüle ettiğini göstermişlerdir. Uhl ve ark. (237) B-hücre lenfomalarında miR-19a' nın ekspresyonunun periferik kandaki mononukleer hücrelere göre arttığını bulmuşlardır. Imatinib ile muamele edilmiş K562 hücrelerinde bu iki kanserlerde artmış miRNA ekspresyonunun yaklaşık 5 kat

azalmış olması imatinib tedavisinin miRNA üzerinden de etkili olabileceğini göstermektedir.

Watahiki ve ark. (248) mir-2115' in metastatik prostat kanserlerinde hiç eksprese olmadığını bulmuşlardır. K562' de imatinib maruziyetinde mir-2115 ekspresyonu 6,33 kat arttırmış, ponatinib maruziyetinde ise 5,99 kat artmış olması olumlu olarak değerlendirilmiştir.

Wu ve ark. (253) meme kanseri hücrelerinde tam patolojik yanıtta mir-1299 ekspresyonunun yüksek, tam patolojik yanıt olmadığı durumlarda düşük olduğunu göstermişlerdir. Schrauder ve ark. (209) meme kanseri hücrelerinde miR-718' in aşağı regüle olduğunu ve tümör süpresör özellik gösterdiğini bulmuşlardır. Imatinib K562 hücrelerinde mir-1299 ve miR-718 ekspresyonunu yaklaşık 5 kat arttırmış ve bu artışın tedaviye olumlu bir etkisi olarak değerlendirilmiştir.

Yan ve ark. (259) mir-1228' in MOAP1 proteini üzerinden apoptozu engellediğini göstermişlerdir. K562' de dasatinib ekspresyonunu 5,58 kat azalmış, LSC' de ise 4,13 kat azalmış ve dasatinibin apoptotik indüksiyonunda mir-1228 üzerinden de etkili olduğu şeklinde değerlendirilmiştir.

Son ve ark. (222) küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücrelerinde mir-371-3p' nin yukarı regüle olduğunu göstermişlerdir. Onkojenik özellik gösteren mir-371-3p K562' dasatinib uygulamasında 2,17 kat azalmış ve olumlu bir etki olarak değerlendirilmiştir.

Godlewski ve ark. (78) glioma hücrelerinde mir-451-pre' nin migrasyonu engellediğini Jin ve ark. (122) mir-1226 meme kanser hücrelerinde MUC1 proteinini aşağı regüle ederek apoptozu indüklediğini göstermiştir. mir-1226

ekspresyonu K562 ponatinibte 3,04 kat artmış, imatinibte 3,15 kat artmış ve mir-451-pre ekspresyonu da K562 ponatinibte 5,49 kat artmıştır. Ekspresyonu azalan bu iki miRNA' nın ekspresyonun artması olumlu olarak değerlendirilmiştir.

Seong-Yeon ve ark. (186) mir-29a mir-29b mir-29c' nin p58 ve CDC42'yi hedef alarak p53' ü aktive ettiğini, Lee ve ark. (144) baş ve boyun tümörlerinde mir-204' ün tümör baskılayıcı olarak rol oynayıp metaztasi baskıladığını göstermişlerdir. K562/ima3 imatinibte miR-29b-1* ekspresyonu 3,44 kat, mir-204 ekspresyonu 5,32 kat artmıştır.

Haller ve ark. (94) mir-629*'un gastrointestinal kanser hücrelerinde aşırı eksprese olduğunu, Yi ve ark. (260) mir-663' ün farklı tümörlerde onkogen ya da tümör baskılayıcı olarak farklı görevlerde olabileceğini ve nazofaringal karsinoma hücrelerinde yukarı regüle olduğunu ortaya koymuşlardır. K562/ima3 ponatinib mir-629* ekspresyonunu 5,44 kat ve mir-663 ekspresyonunu 4,72 kat azalmıştır. Bunun yanında Xu ve ark. (257) prostat kanserinde aşağı regüle olduğunu bulduğu mir-1277' nın ekspresyonu K562/ima3 ponatinibde 5,29 kat artmıştır.

Zhao ve ark. Meme (270) kanserli olgularda sağlıklı kişilere göre artmış mir-589 ekspresyonu saptamış Roldo ve ark. (200) miR-26b-pre endokrin ve asinar tümörlerde aşırı eksprese olduğunu gözlemlemişlerdir. Onkojenik özellik gösteren bu iki miRNA ekspresyonu K562/ima3 hücre hattında dasatinib uygulaması ile yaklaşık 5 kat azalmış olup dasatinib tedavisinin de miRNA üzerinden de etkili olduğunu göstermektedir.

Zeng ve ark. (264) mir-100* aşırı ekspresyonunun mezenkimal kök hücreleri farklılaşmasını engellediğini, Marcucci ve ark. (157) AML

hücrelerinde mir-302d*' nin aşağı regülasyonunun 'stemness' ilişkili olduğunu, Toffanin ve ark. (234) miR-517*' nin hepatoselular karsinomada tümörogenezi desteklediğini, Ou ve ark. (181) mir-613' ün aktif halde proliferasyonu inhibe eden LXR α üzerinden proliferasyonu etkilediğini, Pollari ve ark. (191) meme kanserinde mir-379-pre' nin CDK6' yı aşağı regüle etmesiyle proliferasyonun arttığını ve Fuster ve Andres (73) mir-033' ün aşağı regüle ettiği p53' ün hematopoetik kök hücrelerin kendini yenileyebilmesinde etkili olduğunu ortaya koymuşlardır. Çalışmamızda imatinible muamele edilen lösemi kanser kök hücrelerinde miR-100*, miR-302d*, miR517*, miR-613, miR-379-pre, miR-033-pre ekspresyonlarının sırasıyla 5,33; 3,95; 4,73; 4,40; 4,19; 4,36 kat azaldığı saptandı.

Zhai ve ark. (265) renal karsinoma hücrelerinde mir-508-3p' nin tümör baskılayıcı olarak rol oynadığını ve proliferasyonu baskıladığını, Rippe ve ark. (198) kök hücreyi karakterize eden mirna' lardan biri olan mir-520c' nin prostat kanserinde aşağı düzenlenmesinin migrasyonu ve invazyonu arttırdığını ve Xia ve ark (255) nazofaringal karsinoma hücrelerinde mir-200a aşırı ekspresyonunun ZEB-2 aşağı regülasyonunun hücre büyümesi, migrasyonu ve invazyonunu engellediğini ortaya koymuşlardır. Çalışmamızda ponatinible muamele edilen lösemi kanser kök hücrelerinde mir-508-3p, mir-520c ve mir-200a' nın ekspresyonlarının sırasıyla 3,91; 3,19; 2,82 kat artış gösterdiği saptandı.

Sonuç olarak imatinib, dasatinib ve ponatinib lösemi kanser modellerinde ve dirençli kanser modelinde apoptozu indüklerken otofajiyi de baskılamaktadır. Bu bulgu oldukça ilginçtir. Çünkü tedavi amaçlı etken madde uygulanması kanser hücrelerinin yeni savaşma metodları

geliştirmesine neden olmaktadır. Ayrıca üç nesil TKİ' leri onkogenik miRNA ekspresyonlarını baskılamakta, tümör süpresör özellikli miRNA ekspresyonlarını indüklemektedir. Bu bulgular imatinib, dasatinib ve ponatinibin miRNA aracılı tedavi etkinliğini de göstermektedir. KML tedavisi için TKİ' lerinin uygulanmasında moleküler defektleri yenebilecek ve hücreleri tedavinin etkisinden kaçmasını önleyebilecek miRNA' ın uygulaması preklinik çalışmalarla desteklendiğinde oldukça ümit vermektedir.

BÖLÜM V

5.1. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda; ponatinibin, kronik myeloid lösemi hücrelerinde ve lösemi kök kök hücrelerinde imatinib ve dasatinibden farklı olarak sitotoksik etki düzeyinde, apoptoz indüksiyonunda, otofaji baskılanmasında ve miRNA ekspresyon düzeyinde ne gibi değişikliklere neden olduğunu araştırdık.

Imatinibin K562 hücre hattında IC_{50} değeri 48. saatte 650 nM olarak belirlenmiştir. Imatinibin HL-60 hücre hattında IC_{50} değeri 48. saatte 18 μ M olarak belirlenmiştir. Imatinibin K562/ima3 hücre hattında IC_{50} değeri 48. saatte 18,35 μ M olarak belirlenmiştir. Imatinibin NCI-BL 2171 hücre hattında IC_{50} değeri 48. saatte 274 nM olarak belirlenmiştir. Imatinibin insan lösemi kanser kök hücre hattında IC_{50} değeri 48. saatte 87,3 μ M olarak belirlenmiştir.

Dasatinibin K562 hücre hattında IC_{50} değeri 24. saatte 1,7 nM olarak belirlenmiştir. Dasatinibin HL-60 hücre hattında IC_{50} değeri 48. saatte 896 nM olarak belirlenmiştir. Dasatinibin K562/ima3 hücre hattında IC_{50} değeri 48. saatte 1,83 μ M olarak belirlenmiştir. Dasatinibin NCI-BL2171 hücre hattında IC_{50} değeri 24. saatte 48 nM olarak belirlenmiştir. Dasatinibin insan lösemi kanser kök hücre hattında IC_{50} değeri 48. saatte 870 nM olarak belirlenmiştir.

Ponatinibin K562 hücre hattında IC_{50} değeri 48. saatte 0,24 nM olarak belirlenmiştir. Ponatinibin HL-60 hücre hattında IC_{50} değeri 48. saatte 607 nM olarak belirlenmiştir. Ponatinibin K562/ima3 hücre hattında IC_{50} değeri 48. saatte 9,87 nM olarak belirlenmiştir. Ponatinibin NCI-BL 2171 hücre hattında IC_{50} değeri 48. saatte 30 nM olarak belirlenmiştir. Ponatinibin insan lösemi kanser kök hücre hattında IC_{50} değeri 48. saatte 6,46 μ M olarak belirlenmiştir.

Imatinib ile muamele edilen K562 hücrelerinde 24. saatte 3,65 kat, 48. saatte 2,67 kat, 72. saatte 4,53 kat; dasatinible muamele edilen K562 hücrelerinde 24. saatte 3,05 kat, 48. saatte 2,51 kat, 72. saatte 4,81 kat; ponatinible muamele edilen K562 hücrelerinde 24. saatte 3,07 kat, 48. saatte 2,32 kat, 72. saatte 3,00 kat apoptoz artışı gözlenmiştir.

Imatinib ile muamele edilen K562/ima3 hücrelerinde 24. saatte 1,33 kat, 48. saatte 1,50 kat, 72. saatte 1,67 kat; dasatinible muamele edilen K562/ima3 hücrelerinde 24. Saatte 0,91 kat, 48. saatte 1,94 kat, 72. saatte 2,17 kat; ponatinible muamele edilen K562/ima3 hücrelerinde 24. saatte 1,35 kat, 48. saatte 1,35 kat, 72. saatte 1,41 kat apoptoz artışı gözlenmiştir.

Imatinib ile muamele edilen insan lösemi kanser kök hücrelerinde 24. saatte 1,59 kat, 48. saatte 12,45 kat, 72. saatte 6,00 kat; dasatinible muamele edilen insan lösemi kanser kök hücrelerinde 24. saatte 0,74 kat, 48. saatte 3,17 kat, 72. saatte 6,00 kat; ponatinible muamele edilen insan lösemi kanser kök hücrelerinde 24. saatte 2,61 kat, 48. saatte 10,72 kat, 72. saatte 6,00 kat apoptoz artışı gözlenmiştir.

Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında; K562 hücrelerinde 30 μ M klorokin otofajiyi 1,93 kat baskılarken, imatinibin 1,77 kat, dasatinibin 2,11 kat, ponatinibin 2,09 kat baskıladığı bulunmuştur. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında; HL-60 hücrelerinde 30 μ M klorokin otofajiyi 1,48 kat baskılarken, dasatinibin 1,95 kat, ponatinibin 1,60 kat baskıladığı bulunmuştur. Imatinib ise HL-60 hücrelerinde otofajiyi baskılamamış, kontrole karşılaştırıldığında 0,77 kat otofaji gözlenmiştir. K562/ima3 hücrelerinde 30 μ M klorokin otofajiyi 2,74 kat baskılarken, imatinibin 3,49 kat, dasatinibin 4,62 kat, ponatinibin 9,15 kat baskıladığı bulunmuştur. İnsan Lösemi Kanseri Kök Hücre hücrelerinde 30 μ M klorokin otofajiyi 1,48 kat baskılarken, imatinibin otofajiyi 1,47 kat indüklediği, dasatinibin 2,78 kat, ponatinibin 1,93 kat baskıladığı bulunmuştur.

TKİ'leri miRNA ekspresyonları üzerine etkileri değerlendirilmiş ve Imatinib K562' de hsa-mir-422a-pre ekspresyonunu 5 kat ve hsa-miR-19a* ekspresyonunu da 4,72 kat azalttığı saptanmıştır. Otuz miRNA ekspresyonunu yaklaşık 2 – 6 kat arttırdığı belirlenmiştir. Dasatinibin IC₅₀ dozuna (1,70 nM, 24. saat) maruz bırakılan K562 hücrelerinde miR-1228 ekspresyonu 5,58 kat ve mir-371-3p ise 2,17 kat azaldığı saptanmıştır. Ponatinibin IC₅₀ dozu (0,24 nM, 48. saat) ise mir-221 ekspresyonunu 4,58 kat azaltırken 20 miRNA ekspresyonunu 2 – 6 kat arttırmıştır.

Imatinib direnç gelişiminde miRNA'ların etkisi değerlendirilmiş ve Imatinibin 18,35 μ M dozu 48. saatte K562/ima3 hücrelerinde kontrole göre miR-3117 ve miR-548q ekspresyonlarını yaklaşık 5 kat baskılarken 6 miRNA ekspresyonunu 3,44 – 5,65 kat arttırmıştır. Dasatinibin 18,30 μ M dozu 48. saatte K562/ima3 hücrelerinde kontrole göre mir-589-Pre, mir-026b-pre ve

mir-217 ekspresyonlarını yaklaşık 5 kat baskılarken miR-150 ekspresyonunu 5,30 kat arttırmıştır. Ponatinibin 9,87 nM dozu 48. saatte K562/ima3 hücrelerinde kontrole göre 14 miRNA ekspresyonlarını 3,38 – 5,44 kat baskılarken 14 miRNA ekspresyonlu da 2,46 – 5,35 kat arttırmıştır.

Lösemi kök hücrelerinin üç nesil TKİ' lere miRNA yanıtı da değerlendirilmiştir. Imatinibin 87 µM dozu 48. saatte LSC hücrelerinde kontrole göre 10 miRNA ekspresyonunu 3,95 – 5,33 kat baskılarken 2 miRNA ekspresyonunu 2,93 – 3,47 kat arttırmıştır. Ponatinibin 870 nM dozu 48. saatte LSC hücrelerinde kontrole göre 5 miRNA ekspresyonunu 2,82 – 3,91 kat arttırmıştır.

Sonuç olarak imatinib, dasatinib ve ponatinib lösemi kanser modellerinde ve dirençli kanser modelinde apoptozu indüklerken otofajiyi de baskılamaktadır. Bu bulgu oldukça ilginçtir. Çünkü tedavi amaçlı etken madde uygulanması kanser hücrelerinin yeni savaşma metodları geliştirmesine neden olmaktadır. Ayrıca üç nesil TKİ' leri onkojenik miRNA ekspresyonlarını baskılamakta, tümör süpresör özellikli miRNA ekspresyonlarını indüklemektedir. Bu bulgular imatinib, dasatinib ve ponatinibin miRNA aracılı tedavi etkinliğini de göstermektedir. KML tedavisi için TKİ' lerinin uygulanmasında moleküler defektleri yenebilecek ve hücreleri tedavinin etkisinden kaçmasını önleyebilecek miRNA' ın uygulaması prelinik çalışmalarla desteklendiğinde oldukça ümit vermektedir.

BÖLÜM VI

6.1. ÖZET

KRONİK MYELOİD LÖSEMİ TEDAVİSİNDE KULLANILAN BAZI İLAÇLARIN LÖSEMİ KÖK HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN GENOM DÜZEYİNDE ARAŞTIRILMASI

Kronik myeloid lösemi (KML) olgularının %90'dan fazlasında (9;22) translokasyonu sonucu lösemik fenotipin gelişmesinden sorumlu BCR-ABL füzyon proteini oluşmaktadır

BCR-ABL tirozin kinazın inhibitörü olan imatinib mesilat, ikinci jenerasyon nilotinib ve dasatinib çoğu olguda tam hematolojik, tam sitogenetik ve majör moleküler yanıt elde etmek başarlarsa da bazı olgularda yanıt alınamamaktadır. Üçüncü jenerasyon tirozin kinaz inhibitörü olan ponatinib hem yabanıl tip hem de T315I mutant ABL1 otofosforilasyonunu inhibe etmektedir

Çalışmamızda, Ph+, Ph-, kontrol, imatinib dirençli ve lösemi kök hücre hatları imatinib, dasatinib ve ponatinibe maruz bırakılması ile sitotoksik, apoptotik ve otofajik etkileri ile tüm genom miRNA değişimlerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Imatinib, dasatinib ve ponatinib IC₅₀ değerleri belirlenmiş ve K562 hücre

hattında sırasıyla 650 nM, 1,70 nM ve 0,24 nM bulunmuştur. Imatinib dirençli hücre hattı K562/ima3' te Imatinib 1,8 µM, dasatinib 896 nM ve ponatinib 9,87 nM IC₅₀ değerleri belirlenmiştir. Bu üç etken maddenin IC₅₀ dozları apoptozu indüklediği saptanmıştır. Ayrıca aynı dozlar lösemi hücrelerinde otofajiyi de baskılamaktadır baskılamaktadır.

TKİ' leri miRNA ekspresyonları üzerine etkileri ve Imatinib direnç gelişiminde miRNA' ların etkisi değerlendirilmiştir. Onkojenik özellikli miRNA ekspresyonlarının baskılandığı saptanmıştır.

Sonuç olarak imatinib, dasatinib ve ponatinib lösemi kanser modellerinde ve dirençli kanser modelinde apoptozu indüklerken otofajiyi de baskılamaktadır. Bu bulgu oldukça ilginçtir. Çünkü tedavi amaçlı etken madde uygulanması kanser hücrelerinin yeni savaşma metodları geliştirmesine neden olmaktadır. Ayrıca üç nesil TKİ' leri onkojenik miRNA ekspresyonlarını baskılamakta, tümör süpresör özellikli miRNA ekspresyonlarını indüklemektedir. Bu bulgular imatinib, dasatinib ve ponatinibin miRNA aracılı tedavi etkinliğini de göstermektedir. KML tedavisi için TKİ' lerinin uygulanmasında moleküler defektleri yenebilecek ve hücreleri tedavinin etkisinden kaçmasını önleyebilecek miRNA' ın uygulaması prelinik çalışmalarla desteklendiğinde oldukça ümit vermektedir.

6.2. ABSTRACT

INVESTIGATION OF CERTAIN DRUGS EFFECTS THAT USED IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA TREATMENT ON LEUKEMIA STEM CELLS AT THE GENOME LEVEL

BCR-ABL fusion protein, responsible for developing of leukemic phenotype as a result of (9;22) translocation, is occurred in more than 90% of Chronic Myeloid Leukemia (CML) cases.

BCR-ABL tyrosine kinase inhibitor imatinib mesilat, second generation tyrosine kinase inhibitors nilotinib and dasatinib are exact haematologic, exact cytogenetic and major molecular response were achieved successfully even some of the cases did not response. Third generation tyrosine kinase inhibitor ponatinib inhibits both wild type and T315I mutant ABL1 autophosphorylation.

In our study, it is aimed to investigate cytotoxic, apoptotic and autophagic effects and whole genom miRNA alterations in Ph+, Ph-, control, imatinib-resistant and leukemia stem cell lines by imatinib, dasatinib and ponatinib exposure.

IC₅₀ values of imatinib, dasatinib ve ponatinib were determined and it is found 650 nM, 1,70 nM and 0,24 nM in K562 cells respectively. Imatinib 1,8 µM, dasatinib 896 nM and ponatinib 9,87 nM IC₅₀ values were determined in Imatinib-resistant cell line K562/ima3. It is determined that IC₅₀ doses of these three compounds induced apoptosis. Also same doses repress autophagy in leucemia cells.

TKI 's effects on the expression of miRNA and miRNA in the development of resistance to imatinib' s was evaluated. miRNA expressions with oncogenic property were suppressed.

As a result, imatinib, dasatinib, and ponatinib, induce apoptosis and suppress autophagy in the same time in leukemia cancer and in resistant cancer model. This finding is quite interesting. Because application of the active ingredient for the treatment of cancer cells to cause the development of new methods for fighting. In addition, three-generation TKI 's to suppress the expression of oncogenic miRNA, induces the expression of tumor suppressor miRNA featured. These findings demonstrate the efficacy of imatinib, dasatinib and ponatinib in miRNA-mediated treatment. Co-application of TKI and miRNAs that can overcome molecular defects and prevent the leukemic cells escape from the cure in the treatment of CML become very promising with the support of preclinical studies.

BÖLÜM VII

7.1. YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Adachi, K., Suemori, H., Yasuda, S.Y., Nakatsuji, N., Kawase, E. (2010). Role of SOX2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells, *Genes Cells*, 15, 455-470
2. Akçora D. (2007). İmatinib Tedavisi Alan Kronik Myeloid Lösemi Hastalarında T315I, E255K ve M351T Mutasyonlarının Saptanması, Ankara Üniveristesi Sağlık Bilimleri Enstütüsü
3. Aktan, M. (2000). İçinde Topuz, E., Aydın, A., Karadeniz A.N.editörler, Kronik Lenfositik Lösemi. Klinik Onkoloji, İstanbul: İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları.s264-277.
4. Alberts, B., Johnson, A., Lewia, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. Hücrenin moleküler biyolojisi, 4. Baskı, sayfa: 1283-1292.
5. Al-Hajj, M., Clarke, M.F. (2004). Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene*; 23: 7274-82.
6. Altman, B.J., Jacobs, S.R., Mason, E.F., Michalek, R.D. , MacIntyre, A.N., Coloff, J.L., Ilkayeva, O., Jia, W., He Y.W., Rathmell J.C.Autophagy is essential to suppress cell stress and to allow BCR-Abl-mediated leukemogenesis.
7. Ambros, V., Chen, X. (2007). The regulation of genes and genomes by smallRNAs, *Development*, 134(9):1635-1641.
8. Ar, M.C., Öngören, Ş., Ferhanoğlu, B., Aydın, Y., Eşkazan, E., Soysal, T., Ülkü, B., Başlar, Z., Çetin, G. (2008). Akut Lösemiler, Hematoloji Ders Kitabı, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, 111-138
9. American Type Culture Collection (ATCC), www.atcc.org

10. Ateş, Halil. (2009). Lösemik Kök Hücrelerde Erken Embriyonik Kök Hücre Transkripsiyon Faktörlerinin Ekspresyonunun Araştırılması, Doktora Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 95s
11. Bahadori, M. (2008). New Advances in RNAs, Arch Iran Med., 11(4):435-443.
12. Baran, Y. (2007). Kronik myeloid lösemi genetiği, Türkiye Klinikleri J Int Med Sci, 3(2):50-55.
13. Barlow, S., Brooke, G., Chatterjee, K., Price, G., Pelekanos, R., Rossetti, T., Doody, M., Venter, D., Pain, S., Gilshenan, K., Atkinson, K. (2008). Comparison of human placenta- and bonemarrow-derived multipotent mesenchymal stem cells, Stem Cells Dev., 17(6):1095-107.
14. Barnes, D.J., Palaiologou, D., Panousopoulou, E., Schultheis, B., Yong, A.S.M., Wong, A., Pattacini, L., Goldman, J.M., Melo, J.V. (2005). Bcr-Abl expression levels determine the rate of development of resistance to Imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia, Cancer Research, 65(19):8912–8919.
15. Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell, 116, 281-97
16. Basciani, S., Vona, R., Matarrese, P., Ascione, B., Mariani, S., Cauda, R., Malorni, W., Straface, E., Lucia, M.B. (2007). Imatinib interferes with survival of multidrug resistant Kaposi's sarcoma cells. FEBS Lett. 581:5897–5903
17. Bassan, R., Gatta, G., Tondini, C., Willemze, R. (2004). Adult acute lymphoblastic leukemia, Criticals in Oncology\Hematology, 50:223-261
18. Bauvy, C., Gane, P., Arico, S., Codogno, P., Ogier-Denis, E. (2001). Autophagy delays sulindac sulfide-induced apoptosis in the human intestinal coloncancer cell line HT-29. Exp Cell Res. 268:139-149.
19. Bilen, Y. (2009). Philadelphia pozitif kronik myelositer lösemihastalarında imatinib mesilata alınan klinik, hematolojik, sitogenetik ve moleküler yanıtında değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi, 52s
20. Boya, P., González-Polo, R.A., Casares, N., Perfettini, J.L., Dessen, P., Larochette, N., Métivier, D., Meley, D., Souquere, S., Yoshimori, T.,

- Pierron, G., Codogno, P., Kroemer, G. (2005). Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol.* 25:1025–1040.
21. Branford, S., Hughes, T. (2006). Detection of BCR-ABL mutations and resistance to imatinib mesylate. In: Iland, H., Hertzberg, M., Marlton, P., eds. *Myeloid Leukemia: Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press; *Methods in Molecular Medicine*, vol 125.
 22. Branford, S., Rudzki, Z., Walsh, S., Parkinson, I., Grigg, A., Szer, J., Taylor, K., Herrmann, R., Seymour, J.F., Arthur, C., Joske, D., Lynch, K., Hughes, T. (2003). Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis, *Blood*, 102(1):276–283.
 23. Brignier, A.C., Gewirtz, A.M. (2010). Embryonic and adult stem cell therapy, *J Allergy Clin Immunol.*, 125(2 Suppl 2):S336-44.
 24. Buchdunger, E., Zimmermann, J., Mett, H., Meyer, T., Müller, M., Druker, B.J., Lydon, N.B. (1996). Inhibition of the Abl protein-tyrosine kinase in vitro and in vivo by a 2-phenylaminopyrimidine derivative, *Cancer Res*, 56:100-104
 25. Budihardjo, I., Oliver, H., Lutter, M., Luo, X., Wang, X. (1999). Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 15:269-290.
 26. Bursch, W., Karwan, A., Mayer, M., Dornetshuber, J., Fröhwein, U., Schulte-Hermann, R., Fazi, B., Di Sano, F., Piredda, L., Piacentini, M., Petrovski, G., Fésüs, L., Gerner, C. (2008). Cell death and autophagy: cytokines, drugs, and nutritional factors. *Toxicology*. 254:147-157.
 27. Calin, G.A. and Croce, C.M. (2006). microRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer*, 6, 857-866 p.
 28. Calin, G.A., Croce, C.M. (2006). MicroRNAs and chromosomal abnormalities in cancer cells, *Oncogene*, 25, 6202–6210
 29. Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F. and Croce, C.M. (2002). Frequent deletions and down regulation of microRNA genes miR-15 and miR-16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *PNAS*, 99, 15524 -15529 p.

30. Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D. ve ark. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 101: 2999-3004.
31. Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M. and Croce, C.M. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers, *PNAS*, 101, 2999-3004 p.
32. Cancer Research Website. (2008). American Association for CancerResearch, <http://www.aacr.org/>
33. Carew, J.S., Nawrocki, S.T., Cleveland, J.L. (2007). Modulating autophagy for therapeutic benefit. *Autophagy*;3: 464-7.
34. celprogen.com
35. Charrin, C. (1996).Cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia: correlations with hematologic findings outcome, A Collaborative Study of the Group Francais de Cytogenetique Hematologique Blood, 87: 3135-42
36. Chase, A., Huntly, B.J.P., Cross, N.C.P. (2001). Cytogenetics of chronic myeloid leukaemia, *Best Pract Res Clin Haematol*, 14.553–571.
37. Chen, M.H., Kerkelä, R. (2008). Force T. Mechanisms of cardiac dysfunction associated with tyrosine kinaseinhibitor cancer therapeutics. *Circulation*; 118: 84–95.
38. Cho, R.W., Wang, X.H., Diehn, M., Shedden, K., Chen, G.Y., Sherlock, G. ve ark. (2008). Isolation and molecular characterization of cancer stem cells in MMTV-Wnt-1 murine breast tumors. *Stem Cells*;26:364-71.
39. Cho, W.C. (2007). OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol Cancer*; 6: 60.
40. Chomel, J. C., Turhan, A.G., Chronic myeloid leukemia stem cells in the era of targeted therapies: resistance, persistence and long-term dormancy. *Abl Kinase Domain Mutants, Cancer Res* 2005; 65(11): 4500-5
41. Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Ageilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder,

- H., Volinia, S., Liu, C.G., Kipps, T.J., Negrini, M. and Croce, C.M.(2005). miR-15 and miR- 16 induce apoptosis by targeting BCL2, PNAS, 10, 39, 13944- 13999 p.
42. Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C.G., Kipps, T.J., Negrini, M., Croce, C. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2, Proc Natl Acad Sci USA, 102, 13944–13949.
 43. Clarke, M.F. (2004). Chronic myelogenous leukemia: identifying the hydra's heads, N Engl J Med., 351:634-636.
 44. Cohnheim, J.(1867). Ueber entzündung und eiterung. Path. Anat. Physiol. Klin. Med.; 40: 1-79.
 45. Conget, P.A., Minguell, J.J.(1999). Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. J Cell Physiol; 181: 67-73.
 46. Copland, M., Hamilton, A., Elrick, L.J., Baird, J.W., Allan, E. K., Jordanides, N., Barow, M., Mountford J. C., Holyoake, T.L., Dasatinib (BMS-354825) targets an earlier progenitor population than imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction.(2006). Blood, 107(2006): 4532-4539
 47. Cortes, J., Rousselot, P., Kim, D.W. et al. (2007). Dasatinib induces complete hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in blast crisis, Blood, 109: 3207 – 3213.
 48. Cowland, J.B., Hother, C. and Gronbek, K.(2007). MicroRNAs and cancer, APMIS, 115, 1090-1106 p.
 49. D'Arena, G., Tarnani, M., Rumi, C. ve ark. (2007). Prognostic significance of combined analysis of ZAP-70 and CD38 in chronic lymphocytic leukemia. Am J Hematol;82:787–791.
 50. de Bruin, E.C., Medema, J.P. (2008). Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. Cancer Treat Rev;34: 737-49.

51. de Kretser D.J. (2007). Totipotent, pluripotent or unipotent stem cells: a complex regulatory enigma and fascinating biology, *Law Med.*, 15(2):212-8.
52. Dean, M., Fojo, T., Bates, S.(2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer*;5(4):275-84.
53. Deguchi, Y., Kimura, S., Ashihara, E., Niwa, T., Hodohara, K., Fujiyama, Y., Maekawa, T. (2008). Comparison of imatinib, dasatinib, nilotinib and INNO-406 in imatinib-resistant cell lines, *Leukemia Research*, 32 (2008) 980–983
54. Deininger, M., Buchdunger, E., Druker, B.J. (2005). The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia, *Blood*, 105(7):2640-2653.
55. Di Leva, G., Calin, G.A. and Croce, M.C. (2006). MicroRNAs: Fundamental Facts and involvement in human diseases, *Birth Defects Research*, 78, 180-189 p.
56. Dinçol, G., Pekçelen, Y., Atamer, T., Sargın, D., Nalçacı, M., Aktan, M., Beşışık, S. (2003). *Klinik Hematoloji, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul*
57. Durak B. (2008).Direnç mekanizmaları saptanması ve değerlendirme, XXXIV. Ulusal Hematoloji Kongresi, Çeşme, 11. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu ve Yurtdışı Konuşmacı Metinleri, sf 51.
58. Eis, P.S., Tam, W., Sun, L., Chadburn, A., Li, Z., Gomez, M.F., Lund, E., Dahlberg, J.E. (2005). Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas, *Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 3627–3632.
59. Ekiz, H. A., Can, G., Baran, Y. (2012). Role of autophagy in the progression and suppression of leukemias, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 81 275–285
60. Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *ToxicolPathol.* 35: 495–516.
61. Ergüven, M. (2009). İmatinibin İndometazin, Lityum, Selisiklib ve Noskabin İle Kombinasyonunun T98G İnsan Glioblastoma Hücrelerine Etkisinin İn Vitro İncelenmesi, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 138s
62. Erson, A.E., Petty, E.M. (2008). MicroRNAs in development and disease. *Clin Genet*; 74: 296-306.

63. Espert, L., Denizot, M., Grimaldi, M., Robert-Hebmann, V., Gay, B., Varbanov, M., Codogno, P., Biard-Piechaczyk, M. (2006). Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV envelope proteins to CXCR4. *J Clin Invest.* 116:2161-2172.
64. Fabbri, M., Ivan, M., Cimmino, A., Negrini, M. and Calin, G.A. (2007). Regulatory mechanisms of microRNAs involvement in cancer: the strange case of Dr Jekyll and Mr Hyde, *Expert Opin. Biol. Ther.*, 7, 1009-1019 p.
65. Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., O'Brien, S., Kurzrock, R., Kantarjian, H.M. (1999). The biology of chronic myeloid leukemia. *NEJM*; 341(3): 164-172.
66. Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., O'Brien, S., Kurzrock, R., Kantarjian, H.M. (1999). The biology of the chronic leukemias, *N Eng J Med*, 341:164-172
67. Ferraro, E., Cecconi, F. (2007). Autophagic and apoptotic response to stress signals in mammalian cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 462:210–219.
68. Fialkow, P.J., Demmon, A.M., Jacobson, R.J. (1978). Chronic myelocytic leukemia, *Journal of clinical investigation*, 62:823-825
69. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N. and Sonenberg, N. (2008). Mechanism of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?, *Nature Reviews Genetics*, Advance online publication, 102-114 p.
70. Fimia, G.M., Piacentini, M. (2010). Regulation of autophagy in mammals and its interplay with apoptosis. *Cell. Mol. Life Sci.* 67:1581–1588.
71. Fiskus, W., Pranpat, M., Balasis M., Cotreatment with Vorinostat (Suberoylanilide Hydroxamic Acid) Enhances Activity of Dasatinib (BMS-354825) against Imatinib Mesylate-Sensitive or Imatinib Mesylate-Resistant Chronic Myelogenous Leukemia Cells. (2006) *Clin Cancer Res* 12(2006):5869-5878
72. Fugazza, G., Garuti, A., Marchelli, S., Miglino, M., Bruzzone, R., Gatti, A.M. et al. (2005). Masked Philadelphia chromosome due to atypical BCR/ABL localization on the 9q34 band and duplication of the der(9) in

- a case of chronic myelogenous leukemia, *Cancer Genet Cytogenet*, 163:173- 175.
73. Fuster, J.J, Andrés, V., A. (2010). Role for miR-33 in p53 regulation: New perspectives for hematopoietic stem cell research, *Cell Cycle*.1;9(17):3397-8.
 74. Gambacorti, C., Gunby, R., Piazza, R. (2003). Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukemias, *Lancet Oncology*, 4:75–85.
 75. Gambacorti-Passerini, C.B., Gunby, R.H., Piazza, R., Galletta, A., Rostagno, R., Scapozza, L. (2003). Molecular mechanisms of resistance to imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukemias, *Lancet Oncol*, 4:75–85.
 76. Garzon, R., Fabbri, M., Cimmino, A., Calin, G.A., Croce, C.M. (2006). MicroRNA expression and function in cancer, *Trends Mol Med.*, 12(12):580-587.
 77. Glick, D., Barth, S., Macleod, K.F. (2010). Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*. 221:3–12.
 78. Godlewski, J., Nowicki, M.O., Bronisz, A., Nuovo, G., Palatini, J., De Lay, M., Van Brocklyn, J., Ostrowski, M.C., Chiocca, E.A., Lawler, S.E. (2010). MicroRNA-451 Regulates LKB1/AMPK Signaling and Allows Adaptation to Metabolic Stress in Glioma Cells, *Mol Cell*, 37(5):620-32
 79. Golestaneh, A.F., Atashi, A., Langroudi, L., Shafiee, A., Ghaemi, N., Soleimani, M. (2012). miRNAs expressed differently in cancer stem cells and cancer cells of human gastric cancer cell line MKN-45, *Cell Biochem Funct.*, 30(5):411-8
 80. Gottschalk, S., Anderson, N., Hainz, C., Eckhardt, S.G., Serkova, N.J. (2004). Imatinib (STI571)-Mediated Changes in Glucose Metabolism in Human Leukemia BCR-ABL–Positive Cells, *Clinical Cancer Research* 6661, Vol. 10, 6661–6668
 81. Gozgit, J. M., Wong, M.J., Wardwell S., Potent Activity of Ponatinib (AP24534) in Models of FLT3-Driven Acute Myeloid Leukemia and Other Hematologic Malignancies. *Mol Cancer Ther* 10(2011):1028-1035
 82. Gozuacik, D., Kimchi, A. (2004). Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene*. 23:2891-2906.

83. Graham, S.M., Jorgensen, H.G., Allan, E. et al. (2002). Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro, *Blood*, 99:319-325.
84. Graham, S. M., Jørgensen, H.G., Allan, E., Pearson, C., Alcorn, M. J., Richmond L., Holyoake T.L., Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* 99(2002): 319-325
85. Gramantieri, L., Ferracin, M., Fornari, F., Veronese, A., Sabbioni, S., Liu, C.G., Calin, G.A., Giovannini, C., Ferrazzi, E., Grazi, G.L., Croce, C.M., Bolondi, L., Negrini, M. (2007). Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma, *Cancer Res*, 67, 6092–6099.
86. Grander, D. (1998). How do mutated oncogenes and tumor supressor genes cause cancer? *Med. Oncol.*; 15: 20-26.
87. Greco, A., Roccato, E., Miranda, C., Cleris, L., Formelli, F., Pierotti, M.A. (2001). Growthinhibitor effect of STI571 on cells transformed by the COL1A1/PDGFB rearrangement, *Int J Cancer*, 92:354–360.
88. Greene, L.M., Kelly, L., Onnis, V., Campiani, G., Lawler, M., D. Clive Williams, D.C., Zisterer D. M.(2006).STI-571 (Imatinib Mesylate) Enhances the Apoptotic Efficacy of Pyrrolo-1, 5-Benzoxazepine-6, a Novel Microtubule-TargetingAgent, in Both STI-571-Sensitive and -Resistant Bcr-Abl-Positive Human Chronic Myeloid Leukemia Cells, *JPET* 321 (2007):288–297
89. Griffith, J., Black, J., Faerman, C., Swenson, L., Wynn, M., Lu, F. et al. (2004). The structural basis forautoinhibition of FLT3 by the juxtamembrane domain. *Mol Cell*; 13: 169–78.
90. Grosshans, H. and Filipowicz, W. (2006). The expanding world of small RNAs, *Nature*, 451, 414-416 p.
91. Guan, Y., Gerhard, B., Hogge, D.E. (2003). Detection, isolation, and stimulation of quiescent primitive leukemic progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia (AML), *Blood*, 101:3142-3149.
92. Guipaud, O., Deriano, L., Salin, H. ve ark. (2003). B-cell chronic lymphocytic leukaemia: a polymorphic family unified by genomic features. *Lancet Oncol*; 4: 506–514.

93. Gupta, S., Agrawal, A., Agrawal, S., Su, H., Gollapudi, S. (2006). A paradox of immunodeficiency and inflammation in human aging: lessons learned from apoptosis. *Immun Ageing*. 3:5.
94. Haller, F., von Heydebreck, A., Zhang, J.D., Gunawan, B., Langer, C., Ramadori, G., Wiemann, S., Sahin, O. (2010). Localization- and mutation-dependent microRNA (miRNA) expression signatures in gastrointestinal stromal tumours (GISTs), with a cluster of co-expressed miRNAs located at 14q32.31, *J Pathol*, 220(1):71-86
95. Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer, *Cell*, 100:57-70
96. Hartmann, J.T., Haap, M., Kopp, H.G., Lipp, H.P. (2009). Tyrosine kinase inhibitors - a review on pharmacology, metabolism and side effects. *Curr Drug Metab.*; 10: 470–81.
97. Haznedaroğlu, İ.C. (2007). Kronik myeloid lösemi, *Türkiye Klinikleri J Int MedSci*, 3(2):56-61.
98. He, L., Thomson, J.M., Hemann, M.T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W., Hannon G.J., Hammond, S.M. (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene, *Nature*, 435, 828–833.
99. Heim, S., Mitelman, F. (1995). *Cancer cytogenetics*, 2. Baskı, Sayfa: 33-36
100. Heinrich, M.C., et al. (2000). Inhibition of c-kit receptor tyrosine kinase activity by STI 571, a selective tyrosine kinase inhibitor, *Blood*, 96(3): p. 925-32.
101. Helgason, G. V., Karvela, M. ve Holyoake, T. L. (2011) Kill one bird with two stones: potential efficacy of BCR-ABL and autophagy inhibition in CML, *Blood*, 118: 2035-2043
102. Herzog, E.L., Chai, L., Krause, D.S. (2003). Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*; 102: 3483-93.
103. Hirschamann-Jax, C., Foster, A.F., Wulf, G.G. et al. (2004). A distinct “side-population” of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*;101:14228-33.
104. Hodgkinson, T., Yuan, X.F., Bayat A. (2009). Adult stem cells in tissue engineering, *Expert Rev Med Devices.*, 6(6):621-40.

105. Hotchkiss, R.S., Strasser, A., McDunn, J.E., Swanson, P.E. (2009). Cell Death, NEngl J Med. 361:1570-1583.
106. <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/BCR.html> (Erişim Tarihi: 25.09.2010).
107. http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=123596&loc=ec_rcs(Son erişim tarihi: Mayıs 2012)
108. http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=24826799&loc=ec_rcs(Son erişim tarihi: Haziran 2012)
109. http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=24826799&loc=ec_rcs(Son erişim tarihi: Mayıs 2012)
110. http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=3062316&loc=ec_rcs(Son erişim tarihi: Haziran 2012)
111. http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=3062316&loc=ec_rcs(Son erişim tarihi: Haziran 2012)
112. <http://uhrakahraman.blogspot.com/2010/11/mirna-ve-kanser.html>(Son erişim tarihi: Nisan 2012)
113. <http://withfriendship.com/user/sathvi/receptor-tyrosine-kinase.php>(Son erişim tarihi: Nisan 2012)
114. <http://www.meb.uni-bonn.de/cancer.gov/Media/CDR0000526538.jpg> (Erişim Tar.: 25.09.2010)
115. <http://www.meb.uni-bonn.de/cancer.gov/Media/CDR0000533336.jpg> (Erişim Tar.:25.09.2010)
116. http://www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/08_04_2006_ridvan_ali_08-45_09-10.pdf (Erişim Tarihi: 10.10.2010)
117. Huret, J.L. (1990). Complex translocations, simple variant translocations and Phnegative cases in chronic myelogenous leukaemia, Hum Genet, 85.565–568.
118. Imbert, M., Bain, B., Pierre, R., Vardiman, J.W., Brunning, R.D., Flandrin, G. (2001). Chronic neutrophilic leukaemia. In: World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Jaffe E., Harris N.L., Stein H., Vardiman J.W. eds., Lyon, France, 27–28.
119. İlhan, O. (2012). Kronik Myelositer Lösemi. www.osmanilhan.com/

120. İnan, S. ve Özbilgin, K. (2007). Kök Hücre : Biyolojik ve Klinik Yaklaşım, Sağlıkta Birlik Dergisi Cilt 1 Sayı 5.
121. Jamieson, C.H., Ailles, L.E., Dylla, S.J. et al. (2004) Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML, *N Engl J Med.*, 351:657-667.
122. Jin, C., Rajabi, H., Kufe, D. (2010). miR-1226 targets expression of the mucin 1 oncoprotein and induces cell death, *Int J Oncol.*, 37(1): 61–69.
123. Jindra, P.T., Bagley, J., Godwin, J.G., Iacomini, J. (2010). Costimulation-Dependent Expression of MicroRNA-214 Increases the Ability of T Cells To Proliferate by Targeting Pten, *The Journal of Immunology*, 185: 990–997
124. Johnson, B.V., Shindo, N., Rathjen, P.D., Rathjen, J., Keough, R.A. (2008). Understanding pluripotency--how embryonic stem cells keep their options open *Mol Hum Reprod.*, 14(9):513-20.
125. Jordan, C.T., Guzman, M.L. (2004). Mechanisms controlling pathogenesis and survival of leukemic stem cells, *Oncogene*, 23:7178-7187.
126. Jordan, C.T., Upchurch, D., Szilvassy, S.J., Guzman, M.L. et al. (2000). The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia*; 14: 1777-84.
127. Kantarjian, H.M., Cortes, J.E., O'Brien, S., Luthra, R., Giles, F., Verstovsek, S., Faderl, S., Thomas, D., Garcia-Manero, G., Rios, M.B., Shan, J., Jones, D., Talpaz, M. (2004). Long-term survival benefit and improved complete cytogenetic and molecular response rates with imatinib mesylate in Philadelphia chromosome-positive chronic-phase chronic myeloid leukemia after failure of interferon-alpha, *Blood*, 104(7):1979-88
128. Kilic, T., Alberta, J.A., Zdunek, P.R., Acar, M., Iannarelli, P., O'Reilly, T., Buchdunger, E., Black, P.M., Stiles, C.D. (2000). Intracranial inhibition of platelet-derived growth factor-mediated glioblastoma cell growth by an orally active kinase inhibitor of the 2-phenylaminopyrimidine class, *Cancer Res*, 60:5143-5150
129. Kim, V.N. and Nam, J. (2006). Genomics of microRNA, *Trends in Genetics*, 22, 165-173 p.

130. Kirkin, V., McEwan, D.G., Novak, I. , Dikic, I. (2009). A role for ubiquitin in selectiveautophagy, Mol. Cell 34, 259–269.
131. Koca, E., Haznedaroglu, İ.C.(2005). Imatinib mesylate and the management ofchronic myeloid leukemia (CML). Turk J Haematol; 22(4):161-172.
132. Kosova, B. (2011). Apoptoz, Tıbbi Biyoloji Ders Notu, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
133. Kosova, B., Tezcanlı, B., Ekiz, H.A., Çakır, Z., Selvi, N., Dalmızrak, A., Kartal, M., Gunduz, U., Baran, B. (2010). Suppression of STAT5A increases chemotherapeutic sensitivity in imatinib-resistant and imatinib-sensitive K562 cells, Leukemia & Lymphoma, Early Online, 1–7
134. Kovancılar, M. (2011). Metastatik prostat kanserli hastaların plazmalarında mikroRNA analizi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 56s
135. Körbling, M. ve Anderlini, P. (2001). Peripheral Blood Stem Cell Versus Bone MarrowAllotransplantation: Does The Source Of Hematopoietic Stem Cells Matter?, Blood Journal, 15:2900-8.
136. Krause, D.S., Van Etten, R.A. (2005). Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. N Engl J Med;353:172–87.
137. Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., Hengartner, M., Knight, R.A., Kumar, S., Lipton, S.A., Malorni, W., Nuñez, G., Peter, M.E., Tschopp, J., Yuan, J., Piacentini, M., Zhivotovsky, B., Melino, G.; Nomenclature Committeeon Cell Death 2009. (2009). Classification of cell death: recommendations ofthe Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Cell Death Differ.
138. Kröber, A., Seiler, T., Benner, A. ve ark. (2002). VH mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. Blood;100:1410-1416.
139. Kumar, V., Cotran, R.S., Robbins, S.L. (2000). Hematopoietik ve Lenfoid Sistem Çevikbaş U. Çeviri editörü, Temel Patoloji. İstanbul:Nobel Tıp Kitabevi; pp341-392.
140. Kwak, E.L., Sordella, R., Bell, D.W., Godin-Heymann, N., Okimoto, R.A., Brannigan, B.W. et al. (2005). Irreversible inhibitors of the EGF

- receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 7665–70.
141. Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M. et al. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vitro. *Nature Med*; 6 1229-1234.
 142. Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B. et al. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukemia after transplantation into SCID mice. *Nature*; 367: 645-58.
 143. Laurent, E., Talpaz, M., Kantarjian, H. ve Kurzrock, R. (2001, March 15). BCR Gene and Philadelphia Chromosome-positive Leukemogenesis, *CANCER RESEARCH* 61, 2343–2355
 144. Lee Y., Yang, X., Huang, Y., Fan, H., Zhang, Q., et al. (2010). Network Modeling Identifies Molecular Functions Targeted by miR-204 to Suppress Head and Neck Tumor Metastasis, *PLoS Comput Biol*, 6(4): e1000730
 145. Lee, R.C., Feinbaum, R.L. and Ambros, V. (1993). The C. Elegans heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, 5, 843-854 p.
 146. Lehmann, U., Hasemeier, B., Römermann, D., Müller, M., Langer, F. And Kreipe, H. (2007). Epigenetic inactivation of microRNA genes in mammary carcinoma, *Verh Dtsch Ges Pathol*, 91, 214-220 p.
 147. Litzow, M.R. (2006). Imatinib Resistance Obstacles and Opportunities, *Arch Pathol Lab Med.*, 130:669-679
 148. Li, B.A. (2012). A novel tumor suppressor miRNA miR-520e contributes to suppression of hepatoma, *Acta Pharmacol Sin.*, 33(1):3-4
 149. Lichty, B.D., Keating, A. ve ark. (1998). Expression of p210 and p190 BCR-ABL due to alternative splicing in chronic myelogenous leukaemia, *British Journal of Haematology*, 103, 711–715
 150. Liu, L., Jiang, Y., Zhang, H., Greenlee, A.R., Han, Z. (2010). Overexpressed miR-494 down-regulates PTEN gene expression in cells transformed by anti-benzo(a)pyrene-trans-7, 8-dihydrodiol-9, 10-epoxide, *Life Sci.*, 86(5-6):192-8

151. Liu, Q., Fu, H., Sun, F., Zhang, H., Tie, Y., Zhu, J., Xing, R., Sun, Z., Zheng, X. (2008). miR-16 family induces cell cycle arrest by regulating multiple cell cycle genes, *Nucleic Acids Res*, 36, 5391–5404.
152. Lombardo, L.J., Lee, F.Y., Chen, P. et al. (2004). Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)- 2 - (6 - (4 - (2 - hydroxyethyl) - piperazin - 1 - yl) - 2 - methylpyrimidin - 4 - ylamino) thiazole - 5 - carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays, *J Med Chem*, 47:6658-61.
153. Lowell, S. (2000). Stem cells show their potential. *Trends Cell Biol*; 10: 210-211.
154. Lum, J.J., Bauer, D.E., Kong, M., Harris, M.H., Li, C., Lindsten, T., Thompson, C.B. (2005). Growth factor, regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*. 120:237–248.
155. Manfè, V., Biskup, E., Rosbjerg, A., Kamstrup, M., Skov, A.G., et al. (2012). miR-122 Regulates p53/Akt Signalling and the Chemotherapy-Induced Apoptosis in Cutaneous T-Cell Lymphoma, *PLoS ONE*, 7(1): e29541
156. Mao G, Lee S, Ortega J, Gu L, Li GM. (2012). Modulation of microRNA processing by mismatch repair protein MutL α , *Cell Research*, 22, 973-985
157. Marcucci, G., Mrózek, K., Radmacher, MD., Garzon, R., Bloomfield, CD, . (2011). The prognostic and functional role of microRNAs in acute myeloid leukemia, *Blood* 117(4):1121-9.
158. Martinet, W., De Meyer, G.R., Andries, L., Herman, A.G., Kockx, M.M. (2006). Detection of Autophagy in Tissue by Standard Immunohistochemistry Possibilities and Limitations. *Autophagy* 2:55-57.
159. Martinez-Vicente, M., Cuervo, A.M. (2007). Autophagy and neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike. *Lancet Neurol*. 6:352-361.
160. Mendell, J.T. (2005). MicroRNAs: Critical regulators of development, cellular physiology and malignancy, *Cell Cycle*, 4, 1179 -1184 p.
161. Michael, W.N.D., John, M.G., Junia, V.M. (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia, *Blood*, 96(10):3343-3356.

162. Mishima, Y., Terui, Y., Mishima, Y., Taniyama, A., Kuniyoshi, R., Takizawa, T., Kimura, S., Ozawa, K., Hatake, K.(2008)Bsia Autophagy and autophagic cell death are next targets for elimination of the resistance to tyrosine kinase inhibitors, *Cancer Sci.*, 99(2008):2200–2208
163. Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., Klionsky, D.J. (2008). Autophagy fightsdisease through cellular self-digestion. *Nature.* 451:1069-1075.
164. Mizushima, N., Yoshimori, T. (2007). How to interpret LC3 immunoblotting, *Autophagy* 3, 542–545
165. Moscat, J., Diaz-Meco, M.T. (2009). P62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer, *Cell* 137, 1001–1004.
166. Munsie M.J., Michalska A.E., O'Brien C.M., Trounson A.O., Pera M.F., Mountford P.S. (2000). Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult Mouse somatic cell nuclei, *Curr Biol.*, 10(16):989-92.
167. Nagar, B. et al. (2002). *Cancer Res.* 62, 4236
168. Nam, S., Williams, A., Vultur A., Dasatinib (BMS-354825) inhibits Stat5 signaling associated with apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells.(2007) *Mol Cancer Ther* 6(2007):1400-1405.
169. Navarro, A., Gaya, A., Martinez, A., Urbano-Ispizua, A., Pons, A., Balagué, O., Gel, B., Abrisqueta, P., et. Al. (2007). MicroRNA expression profiling in classic Hodgkin lymphoma, *Blood Journal*, doi:10.1182/blood-2007-06-096784
170. Niemoeller, O.M., Niyazi, M., Corradini, S., Zehentmayr, F., Li, M., Lauber, K., Belka, C. (2011). MicroRNA expression profiles in human cancer cells after ionizing radiation, *Radiat Oncol*, 31;6:29
171. Nohata, N., Hanazawa, T., Kinoshita, T., Okamoto, Y., Seki, N.
172. Novina, C.D., Sharp, P.A. (2004). The RNAi revolution. *Nature*, 430, 161-4
173. Nowell, P., Hungerford, D. (1960). A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*; 132: 1497.
174. O'Hare, T., Walters, D.K., Stoffregen, E.P. et al. (2005). In vitro activity of Bcr-Abl inhibitorsAMN107 and BMS-354825 against clinically

- relevant imatinib-resistant Abl kinase domain mutants, *Cancer Res*, 65: 4500-5.
175. O'Hare, T., Walters, D.K., Stoffregen, E. P., Jia, T., Manley, P.W., Mestan, J., Cowan-Jacob, S.W., Lee, F.Y., Heinrich, M.C., Deininger, M.W.N., Druker, B.J. In vitro Activity of Bcr-Abl Inhibitors AMN107 and BMS-354825 against Clinically Relevant Imatinib-Resistant
 176. O'Hare, T., Pollock, R., Stoffregen, E.P., Keats, J.A., Abdullah, O.M., Moseson, E.M., Rivera, V.M., Tang, H., Metcalf III, C.A., Bohacek, R.S., Wang, Y., Sundaramoorthi, R., Shakespeare, W.C., Dalgarno, D., Clackson, T., Sawyer, T.K., Deininger, M.W., Druker, B.J. (2004). Inhibition of wild-type and mutant Bcr-Abl by AP23464, a potent ATP-based oncogenic protein kinase inhibitor: implications for CML, *Blood Journal*, 104: 2532-2539
 177. Odorico, J.S., Kaufman, D.S., Thomson, J.A. (2001). Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*; 19(3): 193-204. Review.
 178. O'Hare, T., Shakespeare, W.C., Zhu, X., Eide, C.A., Rivera, V.M., Wang, F., et al. (2009). AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance, *Cancer Cell*, 16(5):401–12.
 179. Ohtomo, T., Miyazawa, K., Naito, M., Moriya, S., Kuroda, M., Itoh, M., Tomoda, A., (2010). Cytoprotective effect of imatinib mesylate in non-BCR-ABL-expressing cells along with autophagosome formation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 391 (2010) 310–315
 180. Otsubo, T., Akiyama, Y., Hashimoto, Y., Shimada, S., Goto, K., et al. (2011). MicroRNA-126 Inhibits SOX2 Expression and Contributes to Gastric Carcinogenesis, *PLoS ONE*, 6(1): e16617
 181. Ou, Z., Wada, T., Gramignoli, R., Li, S., Strom, S.C., Huang, M., Xie, W.
 182. Öktem, S., Özhan, M., Özöl, D. (2001). Apoptozisin Önemi, , *ToraksDergisi*, 2(1):91-95
 183. Öztel, O.N. (2010). İnsan göbek kordon kanı ve periferik kankaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin invitro kültür ortamına adaptasyonuna etki

eden faktörlerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 162s

184. Öztürk, A., Beyan, C., Tekgündüz, E., Özkalemkaş, F., Karadoğan, İ., Dilek, İ., Tiftik, N., Kartı, S., Atamer, T., Özçelik, T., Celkan, T.T. (2010). Akut Lösemileri Ulusal Tanı ve Tedavi Rehberi, www.thd.org.tr. (son ulaşım tarihi: 13.08.2012)
185. Park, J., Kim, S., Oh, C., Yoon, S.S., Lee, D., Kim, Y. (2005). Differential tyrosine phosphorylation of leukemic cells during apoptosis as a result of treatment with imatinib mesylate, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 336 (2005) 942–951
186. Park, S.Y., Lee, J.H., Ha, M., Nam, J.W., Kim, V.N. (2009). miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 and CDC42, *Nat Struct Mol Biol.*, 16(1):23-9
187. Pekarsky, Y., Calin, G.A., Aqeilan, R., Croce, C.M. (2005). Chronic Lymphocytic Leukemia: Molecular Genetics and Animal Models, *CTMI*, (2005) 294:51–70
188. Petrocca, F., Vecchione, A., Croce, C.M. (2008). Emerging Role of miR-106b-25/miR-17-92 Clusters in the Control of Transforming Growth Factor β Signaling, *Cancer Res.*, 68(20):8191-4.
189. Petrocca, F., Visone, R., Onelli, M.R., Shah, M.H., Nicoloso, M.S., de Martino, I., Iliopoulos, D., Pillozzi, E., Liu, C.G., Negrini, M., Cavazzini, L., Volinia, S., Alder, H., Ruco, L.P., Baldassarre, G., Croce, C.M., Vecchione, A. (2008). E2F1-regulated microRNAs impair TGF β -dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer, *Cancer Cell*, 13, 272–286.
190. Placzek, M.R., Chung, I.M., Macedo, H.M., Ismail, S., Mortera Blanco, T., Lim, M., Cha, J.M., Fauzi, I., Kang, Y., Yeo, D.C., Ma, C.Y., Polak, J.M., Panoskaltsis, N., Mantalaris, A. (2009). Stem Cell Bioprocessing: Fundamentals And Principles, *Journal of the Royal Society Interface*, 32:209-32.
191. Pollari, S., Leivonen, S-K., Pera"la", M., Fey, V., Ka"ko"nen, S-M., et. al. (2012). Identification of MicroRNAs Inhibiting TGF- β -Induced IL-11 Production in Bone Metastatic Breast Cancer Cells, *PLoS ONE*, 7(5): e37361

192. Pradelli, L.A., Bénéteau, M., Ricci, J.E. (2010). Mitochondrial control of caspase dependent and -independent cell death. *Cell Mol Life Sci.* 67:1589-1597.
193. Preston, S.L., Alison, M.R., Forbes, S.J., Direkze, N.C. et al. (2003). The new stem cell biology: something for everyone. *J Clin Pathol: Mol Pathol*; 56: 86-96.
194. Qian, W., Liu, J., Jin, J., Ni, W., Xu, W. (2007). Arsenic trioxide induces not only apoptosis but also autophagic cell death in leukemia cell lines via upregulation of Beclin-1. *Leuk Res.* 31:329–339.
195. Ramkinssoon, S.H., Mainwaring, L.A., Ogasawara, Y., Keyvanfar, K., Philip, McCoy, J., Sloand, E.M., Kajigaya, S., Young, N.S. (2005). Hematopoietic-specific microRNA expression in human cells, *Leuk Res*, 30, 643-7
196. Ravandi, F., Estrov, Z. (2006). Eradication of leukemia stem cells as a new goal of therapy in leukemia, *Clin Cancer Res.*, 12:340-344.
197. Ren, R. (2005). Mechanisms Of Bcr–Abl In The Pathogenesis Of Chronic Myelogenous Leukaemia, *Nature Reviews Cancer*, 5, 172-183.
198. Rippe, V., Dittberner, L., Lorenz, V.N., Drieschner, N., Nimzyk, R., et al. (2010). The Two Stem Cell MicroRNA Gene Clusters C19MC and miR-371-3 Are Activated by Specific Chromosomal Rearrangements in a Subgroup of Thyroid Adenomas, *PLoS ONE*, 5(3): e9485
199. Rogers, I., Yamanaka, N., Bielecki, R., Wong, C.J. et al. (2007). Identification and analysis of in vitro cultured CD45-positive cells capable of multi-lineage differentiation. *Exp Cell Res.*; 313(9): 1839-52.
200. Roldo, C., Missiaglia, E., Hagan, J.P., Falconi, M., Capelli, P., Bersani, S., Calin, G.A., Volinia, S., Liu, C.G., Scarpa, A., Croce, C.M. (2006). MicroRNA Expression Abnormalities in Pancreatic Endocrine and Acinar Tumors Are Associated With Distinctive Pathologic Features and Clinical Behavior, *J Clin Oncol.*, 24(29):4677-84
201. Rossant, J. (2001). Stem cells from the mammalian blastocyst. *Stem Cells*; 19: 477-82.

202. Rubinsztein, D.C., Gestwicki, J.E., Murphy, L.O., Klionsky, D.J. (2007). Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov.* 6:304-312.
203. Sauerzweig, S., Munsch, T., Lessmann, V., Reymann, K.G. ve Braun, H. (2009) A Population Of Serum Deprivation-induced Bone Marrow Stem Cells (SD-BMKH) Expresses Marker Typical For Embryonic And Neural Stem Cells, *Experimental Cell Research*, 1:50-66.
204. Saunders, M. A., Liang, H. and Li, W. (2007). Human polymorphism at microRNAs and microRNAs target sites, *PNAS*, 104, 3300-3305 p.
205. Savage, D.G. and Antman, K.H. (2002). Imatinib mesylate--a new oral targeted therapy, *N Engl J Med*, 346(9): p. 683-93.
206. Sawyers, C.L. (1999). Chronic myeloid leukemia, *N Eng J Med*, 340:1330-1340
207. Schindler, T. et al. (2000). *Science* 289, 1938
208. Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*; 103: 211–25.
209. Schrauder, M.G., Strick, R., Schulz-Wendtland, R., Strissel, P.L., Kahmann, L., et al. (2012). Circulating Micro-RNAs as Potential Blood-Based Markers for Early Stage Breast Cancer Detection, *PLoS ONE*, 7(1): e29770
210. Secco, M., Zucconi, E., Vieira, N.M., Fogaça, L.L., Cerqueira, A., Carvalho, M.D., Jazedje, T., Okamoto, O.K., Muotri, A.R., Zatz, M. (2008). Multipotent stem cells from umbilical cord: cord is richer than blood, *Stem Cells.*,
211. Sevignani, C., Calin, G.A., Siracusa, L.D. and Croce, C.M. (2006). Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression, *Mammalian Genome*, 17, 189-202 p.
212. Shah, M.Y., Pan, X., Fix, L.N., Farwell, M.A., Zhang, B. (2011). 5-Fluorouracil drug alters the microRNA expression profiles in MCF-7 breast cancer cells, *J Cell Physiol*, 186:68-78
213. Shah, N. (2005, 11-13 November). Not Abl mutations are 'equal', Third ESH International Conference on Chronic Myeloid Leukemia in the 21st Century, 2005, Genova, Italy.

214. Shah, N.P., Tran, C., Lee, F.Y., Chen, P., Norris, D., Sawyers, C.L. (2004). Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor, *Science*, 305:399-401.
215. Shanthly, N., Aruva, M.R., Zhang, K., Mathew B., Thakur, M.L., (2006). Stem cells: a regenerative pharmaceutical, *Q J Nucl Med Mol Imaging*., 50(3):205-16.
216. Shintani, T., Klionsky, D.J. (2004). Autophagy in health and disease: a doubleedgedsword. *Science*. 306:990-995.
217. Shivdasani, R.A., Orkin S.H.(1996). The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood*; 87(10): 4025-39.
218. Shoji, T., li, M., Mifune, Y., Matsumoto, T., Kawamoto, A., Kwon, S.M., Kuroda, T., Kuroda, R., Kurosaka, M., Asahara T. (2010). Local transplantation of human multipotent adiposederivedstem cells accelerates fracture healing via enhanced osteogenesis and angiogenesis, *Lab Invest*., 90(4):637-49.
219. Si, M.L., Zhu, S., Wu, H., Lu, Z., Wu, F., Mo, Y.Y. (2007). miR-21-mediated tumor growth, *Oncogene*, 26(19):2799-2803.
220. Siminovitch, L., McCulloch, E.A., Till, J.E. (1963). The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Physiol*; 62: 327-36.
221. Smith, K.M., Yacobi, R., Van Etten, R.A. (2003). Autoinhibition of Bcr-Abl through its SH3 domain. *Mol Cell*; 12: 27–37.
222. Son, J.W., Kim, Y.J., Cho, H.M., Lee, S.Y., Jang, J.S., Choi, J.E., Lee, J.U., et. al. (2009). MicroRNA Expression Profiles in Korean Non-Small Cell Lung Cancer, *Tuberculosis and Respiratory Diseases*, Vol. 67. No. 5
223. Song, G., Ouyang, G., Bao, S. (2005). The activation of Akt/PKB signalingpathway and cell survival. *J Cell Mol Med*. 9:59–71.
224. Soysal, T., Ar, M.C., Öngören, Ş., Ferhanoğlu, B., Aydın, Y., Eşkazan, E., ., Ülkü, B., Başlar, Z., Çetin, G. (2008). Kronik Lenfositik Lösemi, *Hematoloji Ders Kitabı, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları*, 157-171
225. Srivastava D., Ivey K.N. (2006). Potential of stem-cell-based therapies for heart disease, *Nature*, 441:1097–9.

226. Steffen, B., Müller-Tidow, C., Schwable, J. et al. (2005). The molecular pathogenesis of acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol*; 56: 195-221.
227. Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M., Samali, A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* 7:880-885.
228. Szilvassy, S., Hoffman, R. (1995). Enriched hematopoietic stem cells; basic biology and clinical utility. *Biol Blood Marrow Transplant*; 1: 3-17.
229. Talpaz, M., Kantarjian, H.M., McCredie, K.B. (1987). Clinical investigation of human α -interferon in chronic myelogenous leukemia, *Blood*, 69:1280-8
230. Talpaz, M., Shah, N.P., Kantarjian, H. et al. (2006). Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias, *N Engl J Med*, 354: 2531 – 2541.
231. Thomas, E.D., Blume, K.G., Forman, S.J. (1999). Preface to the first edition in: Hematopoietic cell transplantation. Second edition. Blackwell Science Publication, Massachusetts, USA.
232. Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A. et al. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*; 282: 1145-47.
233. Tie, J., Pan, Y., Zhao, L., Wu, K., Liu, J., et al. (2010). MiR-218 Inhibits Invasion and Metastasis of Gastric Cancer by Targeting the Robo1 Receptor, *PLoS Genet*, 6(3): e1000879
234. Toffanin, S., Hoshid, Y., Lachenmayer, A., Villanueva, A., Cabellos, L., Minguez, B., Savic, R., Ward, SC, Thung, S., Chiang, DY., Alsinet, C., Tovar, V., Roayaie, S., Schwartz, M., Bruix, J., Waxman, S., Friedman, SL., Golub, T., Mazzaferro, V., Llovet, JM. (2011). MicroRNA-based classification of hepatocellular carcinoma and oncogenic role of miR-517a, *Gastroenterology*, 140(5):1618-28.e16
235. Togalingam, G., Pinedergast, M. (2008). Abl kinases regulates autophagy by promoting the trafficking and function of lysosomal components, *J. Biol. Chem.* 283, 35941–35953.
236. Topçuoğlu, P. (2007). Kronik myeloid lösemide imatinib direnci ve tedavi seçenekleri, *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci.*, 2(3):62-73.

237. Uhl, E., Krimer, P., Schliekelman, P., Tompkins, S.M., Suter, S. (2011). Identification of Altered MicroRNA Expression in Canine Lymphoid Cell Lines and Cases of B- and T-Cell Lymphomas, *Genes, Chromosomes & Cancer*, 50:950–967
238. Van Cruchten, S., Van Den Broeck, W. (2002). Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol*. 31:214-223.
239. Van Etten, R.A. (2003). c-Abl regulation: a tail of two lipids. *Curr Biol*; 13: 608–10.
240. Ventura, A., Young, A.G., Winslow, M.M., Lintault, L., Meissner, A., Erkeland, S.J., Newman J., Bronson R.T., Crowley D., Stone J.R., Jaenisch R., Sharp, P.A., Jacks T. (2008). Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters, *Cell*, 132, 875–886
241. Veronese, A., Lupini, L., Consiglio, J., Visone, R., Ferracin, M., Fornari, F., Zanesi, N., Alder, H., D'Elia, G., Gramantier, i L., Bolondi, L., Lanza, G., Querzoli, P., Angioni, A., Croce, C.M., Negrini, M. (2010). Oncogenic role of miR-483-3p at the IGF2/483 locus, *Cancer Res.*, 70(8):3140-9
242. Virchow, R. (1855). Editorial. *Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.*; 3, 23.
243. Vogelstein, B., Bloom, B.R., Goodman, C.S., King, P.A., McKhann, G.M., Weisfeldt, M.L. (2002). *Stem Cells and the Future of Regenerative Medicine*, National Academy Press, USA Watt F.M. ve Driskell R.R., (2010), The therapeutic potential of stem cells, *Philos Trans RSoc Lond B Biol Sci.*, 365(1537):155-63.
244. Walz, C., Sattler, M. (2006). Novel targeted therapies to overcome imatinib mesylate resistance in chronic myeloid leukemia (CML), *Clinical Rev. Onc/Hemat*, 57:145–164.
245. Wang, J.C.Y., Dick, J.E. (2005). Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends in Cell Biology*; 15: 494-501.
246. Wang, Y., Rathinam, R., Walch, A., Alahari, S.K. (2009). ST14 (Suppression of Tumorigenicity 14) Gene Is a Target for miR-27b, and

- the Inhibitory Effect of ST14 on Cell Growth Is Independent of miR-27b Regulation, JBC Papers in Press, DOI 10.1074/jbc.M109.012617
247. Warner, J.K., Wang, J.C., Hope, K.J., Jin, L., Dick, J.E. (2004). Concepts of human leukemic development. *Oncogene*; 23: 7164-77.
 248. Watahiki, A., Wang, Y., Morris, J., Dennis, K., O'Dwyer, H.M., Gleave, M., Gout, P.W., Wang, Y. (2011). MicroRNAs associated with metastatic prostate cancer, *PLoS One.*, 6(9):e24950
 249. Wei, Y., Hardling, M., Olsson, B., Hezaveh, R., Ricksten, A., Stockelberg, D.Y. et al. (2006). Not all imatinib resistance in CML are BCR-ABL kinase domain mutations, *Ann Hematol*, 85(12):841-847.
 250. Weisberg, E., Manley, P., Breitenstein, W. ve diğeri. (2005). Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl, *Cancer Cell*, 7, 129–141.
 251. Wiemer, E.A. (2007). The role of microRNAs in cancer: no small matter, *Eur J Cancer*, 43(10):1529-1544.
 252. Woods, K., Thomson, J.M., Hammond, S.M. (2007). Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors, *J Biol Chem*, 282, 2130–4
 253. Wu, X., Somlo, G., Yu, Y., Palomares, M.R., Li, A.X., Zhou, W., Chow, A., Yen, Y., Rossi, J.J., Gao, H., Wang, J., Yuan, Y.C., Frankel, P., Li, S., Ashing-Giwa, K.T., Sun, G., Wang, Y., Smith, R., Robinson, K., Ren, X., Wang, S.E. (2012). De novo sequencing of circulating miRNAs identifies novel markers predicting clinical outcome of locally advanced breast cancer, *J Transl Med.*, 8;10:42.
 254. Wu, Z-s., Wu, Q., Wang, C-q., Wang, X-n., Huang, J., Zhao, J-j., Mao, S-s., Zhang, g-h., Xu, X-c., Zhang, N. (2011). miR-340 Inhibition of Breast Cancer Cell Migration and Invasion Through Targeting of Oncoprotein c-Met, *Cancer*, 117:2842–52.
 255. Xia, H., Ng, S.S., Jiang, S., Cheung, W.K., Sze, J., Bian, X.W., Kung, H.F., Lin, M.C. (2010). miR-200a-mediated down regulation of ZEB2 and CTNNB1 differentially inhibits nasopharyngeal carcinoma cell growth, migration and invasion, *BiochemBiophysRes Commun*, 391(1):535-41
 256. Xie, Z., Klionsky, D.J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptation. *Nat Cell Biol.* 9:1102-1109.

257. Xu, G., Wu, J., Zhou, L., Chen, B., Sun, Z., et al. (2010). Characterization of the Small RNA Transcriptomes of Androgen Dependent and Independent Prostate Cancer Cell Line by Deep Sequencing, PLoS ONE, 5(11): e15519
258. Xue, L., Fletcher, G.C., Tolkovsky, A.M. (1999). Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution. Mol Cell Neurosci. 14:180-198.
259. Yan, B., Zhao, J.L. (2012). miR-1228 prevents cellular apoptosis through targeting of MOAP1 protein, Apoptosis, 17(7):717-24
260. Yi, C., Wang, Q., Wang, L., Huang, Y., Li, L., Liu, L., Zhou, X., Xie, G., Kang, T., Wang, H., Zeng, M., Ma, J., Zeng, Y., Yun, J.P. (2012). MiR-663, a microRNA targeting p21WAF1/CIP1, promotes the proliferation and tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma, Oncogene, doi: 10.1038/onc.2011.629
261. Yorimitsu, T., Klionsky, D.J. (2005). Autophagy: molecular machinery for self-eating. Cell Death Differ. 12:1542–1552.
262. Young, H.E., Black, A.C. (2004). Adult stem cells, Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 276(1):75-102.
263. Young, M.A., Shah, N.P., Chao, L.H. et al. (2006). Structure of the kinase domain of an imatinib-resistant Abl mutant in complex with the Aurora kinase inhibitor VX-680, Cancer Res, 66: 1007 – 1014.
264. Zeng, Y., Qu, X., Li, H., Huang, S., Wang, S., Xu, Q., Li, n.R, Han, Q., Li..J, Zhao, RC, . (2012). MicroRNA-100 regulates osteogenic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells by targeting BMP2, FEBS, Letters 586: 2375–2381
265. Zhai, Q., Zhou, L., Zhao, C., Wan, J., Yu, Z., Guo, X., Qin, J., Chen, J., Lu, R. (2012). Identification of miR-508-3p and miR-509-3p that are associated with cell invasion and migration and involved in the apoptosis of renal cell carcinoma, Biochem Biophys Res Commun, 419(4):621-6
266. Zhang, B., Pan, X., Cobb, G.P. and Anderson, T.A. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. Developmental Biology, 302, 1 - 12 p.

267. Zhang, J., Yang, P.L., Gray, N.S. (2009). Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer*; 9: 28–39.
268. Zhang, L., Huang, J., Yang, N. et al. (2006). microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 103: 9136–41.
269. Zhang, S., Shan, C., Kong, G., Du, Y., Ye, L., Zhang, X. (2012). MicroRNA-520e suppresses growth of hepatoma cells by targeting the NF- κ B-inducing kinase (NIK), *Oncogene*, 31(31):3607–20
270. Zhao, H., Shen, J., Medico, L., Wang, D., Ambrosone, C.B., et al. (2010). A Pilot Study of Circulating miRNAs as Potential Biomarkers of Early Stage Breast Cancer, *PLoS ONE*, 5(10): e13735
271. Zhou, T., Commodore, L., Huang, W.S., Wang, Y., Thomas, M., Keats, J., Xu, Q., Rivera, V.M., Shakespeare, W.C., Clackson, T., Dalgarno D. C., Zhu X., Structural Mechanism of the Pan-BCR-ABL Inhibitor Ponatinib (AP24534): Lessons for Overcoming Kinase Inhibitor Resistance. *Chem Biol Drug Des* 77(2011): 1–11
272. Zhu, S., Wu, H., Wu, F., Nie, D., Sheng, S., Mo, Y.Y.(2008).MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis, *Cell Res*, 18, 350–359

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında İzmir’ de doğdum. İlköğrenimime İzmir Özel Türk Koleji’ nde başladım, Özel İzmir İlköğretim Okulu’ nda tamamladım. Orta öğrenimimi ise İzmir Atatürk Lisesi’ nde tamamladım. 2006 yılında Ege Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’ nde yükseköğrenimime başladım ve 2010 yılında mezun oldum. 2010 yılında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans öğrenimime başladım. Yabancı dilim İngilizce ve orta düzeyde Fransızca ve İspanyolca’ dır.