

PARIA NOJAVAN TALATPEH

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

İSTANBUL – 2024

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**IMATİNİB MESİLAT DİRENÇLİ K562 HÜCRE SOYU İLE DUYARLI K562
HÜCRE SOYLARINDA DNA METİLTRANSFERAZ 1 ENZİMİNİN İFADE
DÜZEYİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

PARIA NOJAVAN TALATAPEH

DANIŞMAN
Prof. Dr. VEYSEL SABRİ HANÇER

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

İSTANBUL – 2024

İSTİNYE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**IMATİNİB MESİLAT DİRENÇLİ K562 HÜCRE SOYU İLE DUYARLI K562
HÜCRE SOYLARINDA DNA METİLTRANSFERAZ 1 ENZİMİNİN İFADE
DÜZEYİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

PARIA NOJAVAN TALATAPEH

DANIŞMAN
Prof. Dr. VEYSEL SABRİ HANÇER

İSTANBUL – 2024

TEZ ONAYI

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

Anabilim Dalı Başkanı
[Unvan ve Ad/Soyadı]

Enstitü Müdürü
[Unvanı, Adı Soyadı]

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

[Unvan Ad ve Soyadı]
Danışman

[Unvan Ad ve Soyadı]
Ortak Danışman(varsa)

Okuduğumuz ve savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Jüri Üyeleri (İlk isim jüri başkanına, ikinci isim danışmana aittir)

[Jüri başkanının ünvan ad ve soyadı] [Kurum]

[Danışmanın ünvan ad ve soyadı] [Kurum]

[Jüri üyesi ünvan ad ve soyadı] [Kurum]

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum, “İMATİNİB MESİLAT DİRENÇLİ K562 HÜCRE SOYU İLE DUYARLI K562 HÜCRE SOYLARINDA DNA METİLTRANSFERAZ 1 ENZİMİNİN İFADE DÜZEYİNİN KARŞILAŞTIRILMASI” adlı çalışmanın, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Paria Nojavan Talatapeh

İTHAF

Yaşamım boyunca bana her konuda koşulsuz desteğini, güvenini, sevgisini ve yardımlarını esirgemeyen beni bu günlere sevgi ve saygı ile yetiştirerek getiren ve benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen her zaman yanımda olan aile kelimesini en iyi şekilde bana hissettirip yaşatan en değerli varlığım annem ve babama ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince bana bilgi, deneyim ve tecrübelerini aktaran, her konuda danışabileceğimi bana hissettiren, sabır ve içtenlik ile bana emek harcayan, yardımlarını benden esirgemeyen ve süreci yönetmemde çok önemli katkılar sağlayan danışman hocam Sayın; Prof.Dr. Veysel Sabri HANÇER'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen laboratuvar ve analiz sürecinin verimli geçmesini sağlayan Dr. Öğt. Üyesi Süreyya BOZKURT ve Altınbaş Üniversitesinden analiz çalışmalarımda destek olan Dr. Öğt. Üyesi Yalda HEKMATSHOAR hocama tüm samimiyetim ve içtenlikle teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamı yapmamda sağladığı proje desteği için İstinye Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Sağladığı alt yapı ve laboratuvar ekipman ve kaynaklar için İstinye Üniversitesine teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	i
ETİK BEYANI	ii
İTHAF	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ	vii
ŞEKİLLER LİSTESİ	viii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Kronik Miyeloid Lösemi ve K562 Hücre Hattı	2
2.1.1. Kronik Miyeloid Löseminin Tanımı ve Epidemiyolojisi	2
2.1.2. KML'nin Moleküler Patogenezi	4
2.1.2.1. Temel Genetik Mekanizmalar	7
2.1.2.1.1. BCR-ABL Füzyon Genlerinin Yapısı	7
2.1.2.1.2. BCR-ABL Aracılı Malign Transformasyonun Moleküler Temelleri	8
2.1.2.2. Biyolojik Mekanizmalar	10
2.1.2.2.1. K562 Hücre Hattı Oluşumu	10
2.1.2.2.2. K562 Hücre Hattı Özellikleri	12
2.1.2.2.3. K562 Hücre Hattının Kronik Miyeloid Lösemi Araştırmalarındaki Önemi	13
2.2. İmatinib Mesilat ve Direnç Mekanizmaları	15
2.2.1. İmatinib Mesilatın Keşfi ve Etki Mekanizması	16
2.2.2. İmatinib Mesilatın KML Tedavisindeki Yeri ve Önemi	18
2.2.2.1. KML'de İmatinib İle Faz 3 Çalışmaları	18
2.2.2.2. KML'de İmatinib Direnci	19
2.2.2.3. İmatinib Doz Uygulaması, Takibi Ve Yanıt Kriterleri	20

2.2.3. İmatinib Direncinin Moleküler Temelleri ve Mekanizmaları	24
2.2.4. Dirençli Hücre Hatlarında Görülen Değişiklikler ve Bunların Tedaviye Etkisi	25
2.3. DNA Metiltransferaz Enzimleri ve Epigenetik Modifikasyonlar	26
2.3.1. DNA Metilasyonunun Temel Prensipleri ve Mekanizmaları	26
2.3.2. DNMT Enzim Ailesinin Tanımlanması ve Karakterizasyonu	30
2.3.3. DNMT1 Enziminin Biyolojik İşlevleri	31
2.3.4. Normal Memeli Dokularında DNA Metilasyonu	32
2.3.5. Kanserde DNA Metilasyonu ve DNMT Enzimlerinin Düzenlenmesi	33
2.3.5.1. Hipermetilasyon	35
2.3.5.2. Kodlamayan RNA'lar	37
2.3.5.3. Hipometilasyon	38
2.3.6. Kanserde İntergenik ve İntragenik Bölgelerde DNA Metilasyonu	39
2.3.6.1. Transkribe Edilen Bölgelerde DNA Metilasyon Değişiklikleri	39
2.3.6.2. DNA Metilasyonu ve Enhancerlar	40
2.3.7. DNMT1'in İlaç Direnci ve Kansere Tedavisindeki Önemi	41
2.3.8. Epigenetik Terapiler ve DNMT1 Hedefleyen Yaklaşımlar	42
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	44
3.1. Besiyeri Değiştirme	44
3.2. Hücre Kültürü ve İmatinib Mesilat Uygulaması.....	45
3.2.1. Hücre Kültürünün Pasajlanması.....	45
3.2.2. Hücre Soylarının Stoklanması.....	45
3.2.3. Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı.....	46
3.2.4. Total Rna İzolasyonu.....	47
3.2.4.1. Adım Adım RNA İzolasyon Protokolü.....	47
3.2.5. cDNA Sentezi.....	48
3.2.6. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time PCR).....	49
3.2. DNA Metiltransferaz 1 Enziminin İfade Düzeyinin Belirlenmesi	50
4. BULGULAR.....	51
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	58
KAYNAKÇA	60
EKLER	80
EK-1: İNTİHAL RAPORU	82

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3.1: DNA eliminasyon mixi	48
Tablo 3.2: cDNA sentez reaksiyonu bileşenleri	49
Tablo 4.1: E (amplifikasyon etkinliği değeri)	51



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Normal Kan ve Lösemi Kanı	2
Şekil 2.2: Philadelphia Kromozomun Karyotipi	6
Şekil 2.3: Philadelphia Kromozomu ve BCR-ABL füzyon geni	6
Şekil 3.1: Thoma Lamı Düzeni ve Hücre Sayısı.....	46
Şekil 4.1: K562R vs K562S DNTM1	52



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

ALL	: Akut Lenfoblastik Lösemi
ark.	: Arkadaşları
ATP	: Adenozin Trifosfat
CBL	: Casitas-B-Lineage Lymphoma Protein
CRKL	: CRK-Like Protein
DD	: Dimerizasyon Bölgesi
DNA	: Deoksiriboz Nükleik Asit
DNMT1	: DNA Metiltransferaz 1
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
GIST	: Gastrointestinal Stromal Tümörler
GLUT-1	: Glikoz Taşıyıcı Protein Tip 1
GRB-2	: Growth Factor Receptor-Bound Protein 2
IRIS	: International Randomized Study of Interferon and STI571
I-FISH	: İnterfaz in Situ Hibridizasyon
KIT	: Kemik İliği Transplantasyonu
KML	: Kronik Miyeloid Lösemi
MAP	: Mitogen Aktive Protein
m-bcr	: Minor Breakpoint Cluster Region
PDGF	: Trombosit Türevli Büyüme Faktörü
pH	: Power of Hydrogen
RTQ-PCR	: Gerçek Zamanlı Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SHC	: SRChomology-Containing Protein
STAT	: Sinyal Transdüktörleri ve Aktivatörleri of Transkripsiyon
TdT	: Terminal Deoksinükleotidil Transferaz
TGF-β	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü-β
TKI	: Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin
%	: Yüzde

ÖZET

Nojavan Talatapeh, P. (2024). İMATİNİB MESİLAT DİRENÇLİ K562 HÜCRE SOYU İLE DUYARLI K562 HÜCRE SOYLARINDA DNA METİLTRANSFERAZ 1 ENZİMİNİN İFADE DÜZEYİNİN KARŞILAŞTIRILMASI. İstinye Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Çalışmamızda imatinib mesilata dirençli (K562R) ve duyarlı (K562S) K562 hücre hatlarında DNA Metiltransferaz 1(DNMT1) ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Bulguları, hassas hücre hattına kıyasla dirençli hücre hattında DNMT1 gen ifadesinde 1,3921286 katlık önemli bir artış olduğunu ortaya koymuştur. DNMT1'in bu yukarı regülasyonu, K562 hücrelerinde imatinib mesilata karşı direnç gelişiminde potansiyel bir rol oynadığını düşündürmektedir.

Çalışmamız, sonuçların doğruluğunu ve tutarlılığını sağlamak için deneylerin üç kez tekrarlanmasının önemini vurgulamıştır. Bulgularının doğrulanması, DNMT1'in imatinib direncindeki rolüne ilişkin argümanı güçlendirmekte ve potansiyel olarak yeni terapötik stratejilere yol açmaktadır.

Ayrıca, çalışmamız imatinib dirençli tümörler için bir tedavi olarak DNMT1 inhibitörlerinin araştırılmasını ve DNMT1 ile imatinib direncinde rol oynayan diğer genler arasındaki ilişkinin incelenmesini önermiştir. Araştırmamız ayrıca tedavi sonuçlarını iyileştirmek için hem dirençte rol oynayan moleküler yolları hem de DNMT1'i hedef alan kombinasyon tedavilerinin geliştirilmesini önermiştir.

Çalışmamız hücre hatlarında gerçekleştirilmiş olsa da, DNMT1'in imatinib direncindeki rolünü ve insan bağlamında terapötik bir hedef olarak potansiyelini doğrulamak için daha fazla klinik doğrulamaya ihtiyaç olduğunu vurguladık.

Bu çalışmamız, imatinib direnci bağlamında DNMT1'in önemine ışık tutmakta ve kronik miyeloid lösemi tedavisinde direnç mekanizmalarını anlamayı ve bunlarla mücadele etmeyi amaçlayan gelecekteki araştırmalar için güçlü bir kaynak sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: DNMT1, İmatinib direnci, K562 hücre hatları, İmatinib mesilat, Kronik miyeloid lösemi

ABSTRACT

Nojavan Talatapeh, P. (2024). Comparison Of The Expression Levels Of DNA Methyltransferase 1 Enzyme In Imatinib Mesylate Resistant K562 Cell Line And Sensitive K562 Cell Line. Istinye University, Institute of Health Science, Department of Medical Biology and Genetic. Masters Thesis. Istanbul.

In our study, DNA Methyltransferase 1 (DNMT1) expression levels were examined in imatinib mesylate resistant (K562R) and sensitive (K562S) K562 cell lines. Their findings revealed a significant 1.3921286-fold increase in DNMT1 gene expression in the resistant cell line compared to the sensitive cell line. This upregulation of DNMT1 suggests a potential role in the development of resistance to imatinib mesylate in K562 cells.

Our study emphasized the importance of repeating the experiments three times to ensure the accuracy and consistency of the results. Confirmation of their findings strengthens the argument for the role of DNMT1 in imatinib resistance and potentially leads to novel therapeutic strategies.

Furthermore, our study suggests investigating DNMT1 inhibitors as a treatment for imatinib-resistant tumors and examining the relationship between DNMT1 and other genes involved in imatinib resistance. Our research also suggested the development of combination therapies targeting both the molecular pathways involved in resistance and DNMT1 to improve treatment outcomes.

Although our study was performed in cell lines, we highlighted the need for further clinical validation to confirm the role of DNMT1 in imatinib resistance and its potential as a therapeutic target in the human context.

Our study sheds light on the importance of DNMT1 in the context of imatinib resistance and provides a powerful resource for future research aimed at understanding and combating resistance mechanisms in the treatment of chronic myeloid leukemia.

Keywords: DNMT1, Imatinib resistance, K562 cell lines, Imatinib mesylate, Chronic myeloid leukemia

1. GİRİŞ

Kronik Miyeloid Lösemi (KML) hematopoetik bir hastalıktır. KML tedavisi için ilk dizayn edilen ilaç olan İmatinib (IM) bir tirozin kinaz inhibitörüdür ve günümüzde de ilk tedavi seçeneği olarak kullanılmaktadır. Ancak, KML tedavisinde İmatinib'e karşı direnç gelişebilmekte ve bu da tedavinin başarısız olmasına ve hastalığın tekrar etmesine neden olmaktadır. Gelişen bu direncin çok farklı sebepleri bulunmaktadır. Epigenetik modifikasyonlar bunlardan bir tanesidir (1). DNA metilasyonu, DNA' da CpG dinükleotidlerinde sitozin bazına bir metil grup eklenmesi ile gerçekleşen bir epigenetik modifikasyondur. Bu modifikasyon metiltransferaz enzimlerince gerçekleştirilir. DNMT1 metiltransferazın kanser gelişiminde rol oynadığı ileri sürülmektedir. Bu tez çalışmasında imatinib duyarlı ve dirençli K562-Kronik myeloid lösemi hücre soyunda, DNMT1 enziminin ifade düzeyleri karşılaştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler:

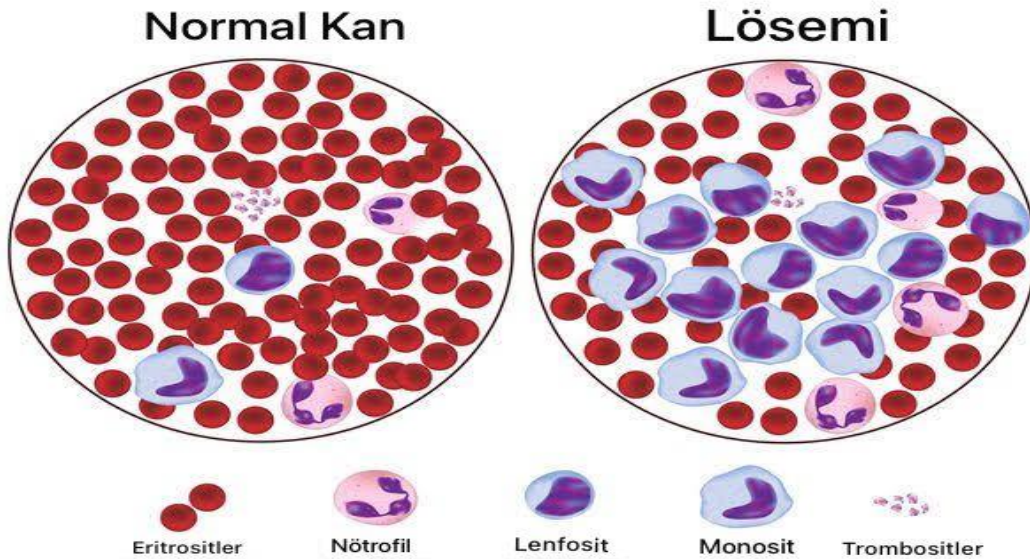
Kronik Myeloid Lösemi, Epigenetik, DNMT1

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kronik Miyeloid Lösemi ve K562 Hücre Hattı

2.1.1. Kronik Miyeloid Löseminin Tanımı ve Epidemiyolojisi

KML, karakteristik olarak (9;22) (q34;q11) dengeli resiprokal translokasyonu sonucunda ortaya çıkan ve Philedelphia (Ph) kromozomu ile ilişkilendirilen bir myeloproliferatif hastalık olarak bilinmektedir (Balk ve ark., 2021). Bu translokasyon, BCR-ABL1 onkogeninin oluşumuna yol açarak, sürekli bir kinaz aktivitesi sergileyen kimerik BCR-ABL1 proteininin kodlanmasına sebep olmaktadır (Adnan-Awad ve ark., 2021). Pluripotent hematopoetik kök hücrelerde görülen BCR-ABL1 füzyon geni, bu hücrelerin klonal olarak hızla çoğalmasını teşvik ederek KML'nin gelişimine neden olmaktadır. Normalde ABL proteininin tirozin kinaz aktivitesi sıkı bir biçimde düzenlenmekteyken, BCR dizisinin eklenmesi sonucu oluşan BCR-ABL proteini, sürekli devam eden tirozin kinaz aktivitesine yol açmaktadır (Luttman ve ark., 2021). Bu protein, çok sayıda substratın fosforillenmesini sağlayarak, hücre proliferasyonunu ve transformasyonunu teşvik ederken, büyüme faktörü bağımlı yolları baskılamakta, apoptoza direnç mekanizması geliştirmekte ve kemik iliği ile stromasındaki hücre adhezyonunu bozmaktadır (Omsland ve ark., 2020).



Şekil 2.1: Normal Kan ve Lösemi Kanı

KML'nin tedavisinde kritik bir rol oynayan Imatinib, BCR-ABL kinaz domainine doğrudan bağlanarak, BCR-ABL 'ın ATP bağlanmayan inaktif bir formda stabilizasyonunu sağlamaktadır (Lee ve ark., 2021). Bu etkileşim, tirozin otofosforilasyonunu ve bunun sonucunda meydana gelebilecek çeşitli substratların fosforilasyonunu önlemektedir. ATP bağlanma bölgesi ile rekabet ederek BCR-ABL kinaz aktivitesini inhibe etmekte ve bu süreç, BCR-ABL onkoprotein aktivitesinin bozulmasına, dolayısıyla hücre proliferasyonunun baskılanmasına ve apoptozisin indüklenmesine katkıda bulunmaktadır. Bu mekanizma, tedavinin temelini oluşturmakta ve KML hastalarının tedavi yanıtlarını belirgin bir şekilde iyileştirmektedir (Mian ve ark., 2021).

Imatinib, mikromolar konsantrasyonlarda ABL, ABL-ilişkili gen proteinleri, KIT reseptörü ve platelet-kaynaklı büyüme faktör reseptörleri gibi çeşitli proteinlerin kinaz aktivitelerini inhibe etme yeteneğine sahiptir. Bu inhibisyon, imatinibin kinaz domainlerine bağlanmasıyla gerçekleşmektedir. Ancak, direnç gelişimi, özellikle BCR-ABL kinaz domaininde meydana gelen mutasyonlarla ilişkilendirilmektedir (Liu ve ark., 2020). Bu mutasyonlar, kinaz domaininin konformasyonunda değişikliklere neden olarak, imatinibin BCR-ABL ile etkileşimini engellemekte ve böylece ilacın etkinliğini azaltmaktadır. Bu tür bir direnç mekanizması, sekonder direnç olarak adlandırılmakta ve relapsa neden olan hastalar üzerinde yapılan çalışmalarda gözlemlenmektedir. Öte yandan, bazı hastalarda ise BCR-ABL mekanizmasından bağımsız olarak birincil direnç mekanizmaları geliştiği saptanmıştır (Braun ve ark., 2020).

Birçok vakada, imatinib tedavi etkili sonuç sağlamasına rağmen, bu ilaç tüm lösemik hücreleri tam olarak yok edememekte ve bu durum, hastalığın tekrarlanmasını engellemek adına sürekli ilaç kullanımını zorunlu kılmaktadır (Braun ve ark., 2020). KML ilerlemesi ve imatinib direnci, DNA metilasyonu gibi epigenetik değişikliklerle ve antiapoptotik ile apoptotik genlerin transkripsiyonel düzenlenmesi gibi mekanizmalarla yakından ilişkilendirilmektedir. Bu bağlamda, progresyonla ilişkili genler ve oksidatif stresin rolü de büyük önem taşımaktadır (Krishnan ve ark., 2022). Ayrıca, imatinib direnci gösteren hücreler ile direnç göstermeyen hücreler arasında, hücre adezyonu, ilaç metabolizması, protein tirozin kinazlar ve fosfatazların ekspresyonu gibi çeşitli faktörlerde belirgin farklılıklar bulunmaktadır. Bu farklılıklar, imatinib dirençli ve hassas hücrelerin apoptotik yollar üzerindeki gen ekspresyonlarını etkileyerek, tedaviye olan

yanıtı modüle etmektedir (Mutlu Altundağ ve ark., 2021). Bu bulgular, imatinib ve benzeri tedavilerin etkinliğini artırmak ve direnç mekanizmalarını aşmak için yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu stratejiler, epigenetik düzenleyicilere müdahale, ilaç kombinasyonları ve hedeflenmiş moleküler tedavileri içerebilir.

Primer KML hücrelerinde gerçekleştirilen incelemelerde, normal kemik iliği hücreleri ile kıyaslandığında Bim proteininin ekspresyonunun önemli derecede düşük olduğu tespit edilmiştir. Öte yandan, Imatinib dirençli hücre hatlarında ise BCL-2 geninin ekspresyonunun artış gösterdiği belirlenmiştir. Bu bulgular, Imatinib'in apoptotik etkisini artırma potansiyeline sahip bir ajan ile kombinasyon halinde kullanılmasının daha etkili sonuçlar verebileceği düşüncesini güçlendirmektedir. Bu tür bir kombinasyon tedavisi, apoptozisi daha güçlü bir şekilde indükleyerek kanser hücrelerinin yok edilmesini amaçlamaktadır (Mojtahedi ve ark., 2021).

Imatinibin etkililiği ve direnci arasındaki moleküler mekanizmalar geniş çapta araştırılmış olmasına rağmen, bu tedavinin metabolik etkileri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. BCR-ABL pozitif hücrelerde, yüksek afiniteli GLUT-1 glukoz taşıyıcısının ekspresyonunda bir artış gözlenmekte ve bu durum hücre içi glukoz alımını artırmaktadır (Li ve ark., 2022). Yapılan son çalışmalar, glukoz-substratlı metabolik akışın kontrolünün, Imatinibin anti-proliferatif etkisinde önemli bir rol oynadığını ortaya koymaktadır (Rosa ve ark., 2019). Özellikle, Imatinibe hassas hücrelerin mitokondriyal homeostazı korurken glikolitik aktivitelerinin azaldığı gözlemlenmiştir (Zhang ve ark., 2017). Bu durum, enerji metabolizmasının, özellikle apoptozisi indüklemekte kritik bir mekanizma olduğunu ve antikanser tedavilerinde enerji metabolizmasının düzenlenmesinin potansiyel olarak önemli bir hedef olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, enerji metabolizması ve apoptotik süreçlerin daha iyi anlaşılması, kanser tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilmesine zemin hazırlayabilir.

2.1.2. KML'nin Moleküler Patogenezi

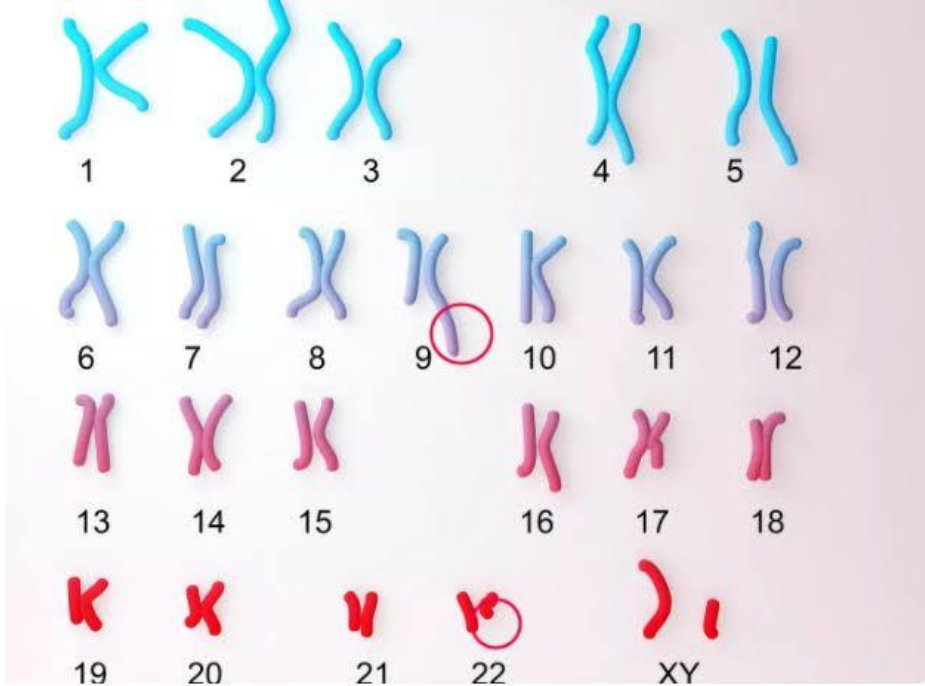
Kronik Miyeloid Lösemi (KML), BCR-ABL füzyon geninin oluşumuna yol açan, kromozom 9 ve 22 arasındaki karşılıklı translokasyondan kaynaklanan Philadelphia kromozomunun varlığı ile karakterize miyeloproliferatif bir hastalıktır (Koschmieder ve

ark., 2005; Deininger ve ark., 2005). BCR-ABL füzyon geni, miyeloid hücrelerin kontrolsüz çoğalmasını sağlayan, yapısal tirozin kinaz aktivitesine sahip kimerik bir protein kodlar (Koschmieder ve ark., 2005). Bu genetik anormallik KML patogenezinin merkezinde yer alır (Jabbour ve ark., 2008). Söz konusu translokasyonda, 22. kromozom üzerinde yer alan BCR geni ile 9. kromozom üzerinde bulunan abl geni arasında bir füzyon meydana gelmekte ve bu durum, kimerik BCR-ABL geninin kodladığı onkoprotein tarafından hastalığın patogenezinde önemli roller üstlenilmektedir. KML, başlangıç aşamasında terminal farklılaşmayı gerçekleştirebilen klonal hematopoezin anormal bir şekilde genişlemesiyle karakterize edilen bir myeloproliferatif hastalık olarak ortaya çıkmaktadır (Jabbour ve ark., 2008). Hastalık genellikle bifazik bir klinik gelişim sergileyerek, uzun yıllar sürebilen kronik bir faz ile başlar ve daha sonra ölümcül sonuçlar doğurabilen blastik faza geçiş yapmaktadır.

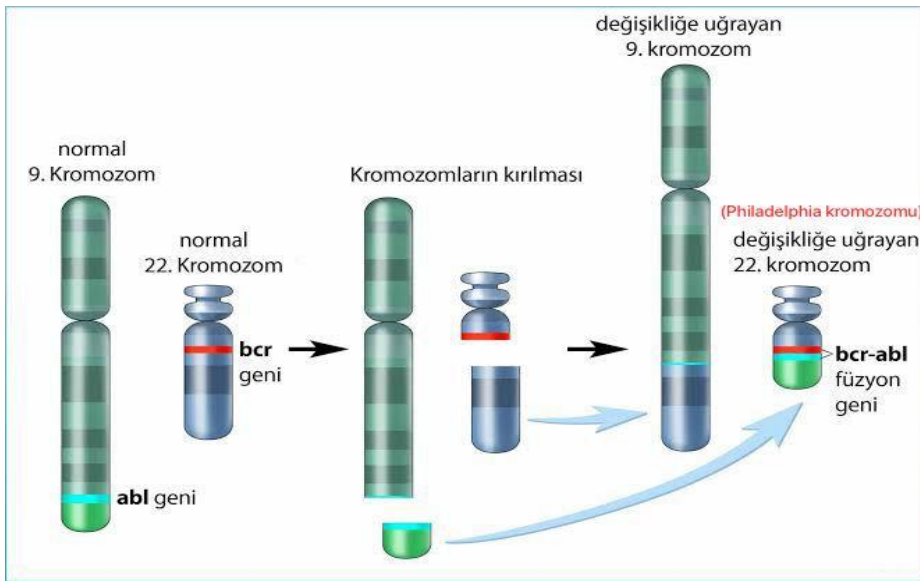
KML'nin kronik fazı, diferansiye olabilen ve normal işlevlerini yerine getirebilen artmış sayıda miyeloid hücre ile karakterize edilmekte ve hastaların %90-95'i bu fazda tanı almaktadır. Kronik fazın süresi genellikle dört ile altı yıl arasında değişkenlik gösterir. Bu süre sonrasında, hastalık akselere faz olarak da bilinen ve sonrasında blastik faza dönüşen daha agresif bir evreye geçiş yapmaktadır. Hastalığın ilerlemesi, lösemik klonun terminal diferansiyasyon yeteneğinin progresif bir şekilde kaybolmasına neden olan moleküler anomalilerin birikimi ile ilişkilendirilmektedir. Blastik kriz, kronik fazdan farklı olarak daha hızlı bir hücre çoğalması, diferansiyasyon, apoptoz ve adhezyon süreçlerinde önemli değişiklikler göstermektedir.

KML blastik fazında, morfolojik olarak akut lösemilerde tipik olan blast hücrelere benzer biçimde artmış blast hücre sayıları gözlemlenmektedir. Dünya genelinde kabul görmüş klinik kriterlere göre, blastik fazın tanımlanması kemik iliği veya periferik kanda %30 veya daha fazla blast hücre bulunması ya da ekstramedüller blast hücre hastalığının varlığı ile yapılmaktadır. Blastik faz, genellikle miyeloid veya lenfoid olmak üzere iki ana tip altında incelenir, ancak bazı durumlarda bifenotipik veya karışık lenfoblastik-miyeloblastik fazlar da görülebilmektedir (Kantarjian ve ark., 2024). Miyeloid blastik kriz, vakaların yaklaşık %60-80'inde ortaya çıkmakta olup, bu durumda myeloblastlar myeloperoksidaz boyası ile boyanır ve CD13, CD33, CD117 gibi miyeloid belirteçler taşır, bu özellikleriyle akut miyeloid lösemiye taklit etmektedir (Paulose ve Fathima, 2023). Öte yandan, lenfoid blast hücreleri Terminal deoksiniükleotidil transferaz (TdT)

enzimi içermekte ve bu enzim, çok az diferansiye olmuş normal ve T-hücre ile B-hücre orijinli malign hücrelerde bulunur. Lenfoblastlar genellikle B-hücre orijinlidir ve hastaların küçük bir yüzdesinde T-hücreli blastik kriz gözlemlenmektedir (Çobankent ve ark., 2023). Ayrıca, megakaryoblastik ve eritroblastik transformasyonlar ile bazofili ve yüksek kan histamin seviyeleri gibi özellikler taşıyan blastik fazlar da rapor edilmiştir.



Şekil 2.2: Philadelphia Kromozomun Karyotipi



Şekil 2.3: Philadelphia Kromozomu ve BCR-ABL füzyon geni

2.1.2.1. Temel Genetik Mekanizmalar

2.1.2.1.1. BCR-ABL Füzyon Genlerinin Yapısı

BCR-ABL füzyon genleri, ABL geni üzerinde meydana gelen kırılmaların lokalizasyonuna göre farklılık göstermektedir. ABL geni üzerindeki kırılma bölgeleri, genin 5' segmentinin herhangi bir noktasında meydana gelebilmekte olup, bu kırılmalar çoğunlukla ilk alternatif ekzon olan 1b'den aşağı yönde veya ikinci alternatif ekzon olan 1a'dan yukarı yönde yer almaktadır (Liu ve ark., 2023). Bu kırılmaların yerleşim yerleri, BCR-ABL füzyon genlerinin yapısal çeşitliliğini belirleyen temel faktörlerden biri olup, füzyon genleri hem ekzon 1b hem de ekzon 1a'yı içerebilecek şekilde veya bu ekzonları dışlayarak farklı ekzon kombinasyonlarına sahip olabilecek şekilde oluşturulabilmektedir. Bu yapısal çeşitlilik, BCR-ABL mRNA'sının da çeşitlenmesine yol açmakta; örneğin, ekzon 1'den yoksun olan mRNA türleri, ABL'nin ekzon 2a'sı ile doğrudan birleşen BCR ekzonlarından oluşmaktadır (Haleem ve ark., 2023).

Öte yandan, BCR genindeki kırılma noktaları genellikle üç tanımlanmış bölgede yer almaktadır. Kronik miyeloid lösemi (KML) hastalarının çoğunda BCR geninin kırılma noktası, "major breakpoint cluster region" olarak adlandırılan ve 5.8 kb büyüklüğünde bir bölge içinde lokalize olmaktadır. Bu bölge, e12 ile e16 (eski isimleriyle ekzon b1 ile b5) arasında beş ekzondan oluşur ve çoğu kırılma noktası, ekzon 13 ile ekzon 14 arasında gerçekleşmektedir (Iezza ve ark., 2023). Bu genetik olay, BCR ekzonlarının ABL'nin ekzon 2a'sı ile birleşmesine ve sonuç olarak hibrid transkriptler e13a2 (b2a2) veya e14a2 (b3a2) birleşkelerinden oluşmasına neden olmaktadır. Bu mRNA molekülleri, 210 kDa ağırlığında bir füzyon proteini olan p210BCR-ABL'yi kodlayan 8.5 kb'lik bir sekans içerir. Bu sekanslar ve oluşturdukları protein yapıları, KML'nin klasik konfigürasyonunda sıklıkla gözlemlenmektedir (Arsalan ve ark., 2023).

Hibrid protein, BCR'nin amino terminalinden başlayarak dimerizasyon bölgesi (DD), SH2 bağlanma bölgesi, Rho GTP-GDP exchange faktör (rho-GEF) domainleri gibi çeşitli fonksiyonel parçaları içermekte, ABL'nin karboksi terminalinden ise Src-homolog bölgeleri SH3, SH2, SH1 ve DNA ile aktin bağlanma bölgeleri gibi kritik yapısal öğeleri barındırmaktadır. BCR'deki tirozin 177 ve ABL'deki tirozin 412 pozisyonları, adaptör proteinlerin bağlanması ve BCR-ABL otofosforilasyonu gibi süreçlerde merkezi roller oynamaktadır (Arsalan ve ark., 2023). Bu genetik ve moleküler özellikler, BCR-ABL

füzyon geninin ve proteininin fonksiyonel çeşitliliğini ve patolojik etkilerini önemli ölçüde belirlemektedir.

KML hücrelerinde sıklıkla b2a2 veya b3a2 transkriptleri gözlemlenirken, vakaların yaklaşık yüzde beşinde alternatif birleşmeler nedeniyle farklı füzyon proteinleri oluşmaktadır. B2a2 ve b3a2 transkriptleri taşıyan hastalarda klinik özellikler, tedaviye yanıtlar ve prognozlar genellikle büyük ölçüde benzerlik göstermektedir (Laabidi ve ark., 2023). Bununla birlikte, b3a2 transkripti taşıyan hastalar daha yüksek trombosit sayılarına sahip oldukları gözlemlenmektedir. Philadelphia kromozomu (Ph) pozitif Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL) vakalarında, yetişkinlerin yüzde 50'sinde ve çocukların yüzde 80'inde, ayrıca nadiren KML vakalarında, 22. kromozomun minor breakpoint cluster region (m-bcr) olarak adlandırılan ve m-bcr'nin 5' ucunda bulunan bölgede kırılma meydana gelmektedir (Arsalan ve ark., 2023).

Ek olarak, e1 ve e2 ekzonları ABL genindeki ekzonlarla birleştiğinde, 190 kDa'lık p190BCR-ABL füzyon proteini oluşmaktadır. Bu durum, BCR genindeki kırılma noktalarının çeşitliliği ve sonuçta ortaya çıkan füzyon proteinlerinin fonksiyonel özelliklerindeki farklılıklar açısından önem taşımaktadır. BCR genindeki üçüncü bir kırılma noktası ise m-bcr bölgesinin 3' ucunda, e19 ve e20 ekzonları arasında yer almakta ve bu bölge μ -bcr olarak adlandırılmaktadır. e19a2 birleşmesi sonucu oluşan transkriptin translasyonu ile 230 kDa'lık p230BCR-ABL füzyon proteini ortaya çıkmaktadır (Li ve ark., 2024). Bu farklı füzyon proteinleri, hastalığın klinik seyri üzerinde belirleyici olabilmekte ve tedavi stratejilerinin kişiselleştirilmesinde kritik rol oynamaktadır.

KML'de p190BCR-ABL proteininin ifadesi genellikle monositoz ve displastik değişikliklerle ilişkilendirilirken, p230BCR-ABL protein ifadesi kronik nötrofilik lösemi varyantı ve belirgin trombositoz ile ilişkili olabilmektedir. Bu protein yapıları ve onların biyolojik sonuçları, hastalığın patogenezinin daha iyi anlaşılmasına ve hastalığın farklı alt tiplerinin ayırt edilmesine yardımcı olmaktadır, böylece daha hedeflenmiş ve etkili terapötik yaklaşımların geliştirilmesine olanak sağlamaktadır (Pardanani ve ark., 2009).

2.1.2.1.2. BCR-ABL Aracılı Malign Transformasyonun Moleküler Temelleri

p210BCR-ABL onkoproteininin lökomojenik etkilerinin altında yatan temel mekanizma, ABL proteininin normalde regüle edilen tirozin kinaz aktivitesinin, BCR sekanslarının yapısal olarak entegrasyonu sonucu kontrolsüz bir şekilde aktive olmasıdır.

Bu onkoprotein, ABL komponentinde bulunan SH1 parçası tarafından taşınan tirozin kinaz enzimatik aktivitesine sahiptir ve bu özellik, onkojenik transformasyon süreci için kritik önem taşımaktadır (Cilloni ve Saglio, 2012). Fizyolojik koşullar altında, ABL tirozin kinaz aktivitesi sıkı bir şekilde düzenlenmektedir. Ancak, normal ABL proteinine BCR dizisi eklendiğinde, bu tirozin kinaz aktivitesi kontrol edilemez hale gelmekte ve p210BCR-ABL'nin lökomojenik potansiyeli açığa çıkmaktadır (Zhang ve ark., 2020).

BCR-ABL füzyon proteininde, ABL'nin cap bölgesinin eksikliği ve BCR'nin ilk ekzonunda bulunan dimerizasyon bölümü, ABL SH1 bölümünün aktivasyonunu tetiklemektedir. Bu durum, BCR onkoproteinlerinin dimerizasyonu sonucu iki BCR-ABL molekülünün kinaz aktivasyon bölümünde bulunan tirozinlere fosfat gruplarının eklenmesi ile sonuçlanmaktadır (Braun ve ark., 2020). Bu dimerizasyon, p210BCR-ABL'nin kinaz aktivitesini daha da artırarak, hücre içi sinyal yolağını etkinleştirir ve sonuç olarak hücre büyümesi ve bölünmesinde kontrolsüz artışa yol açmaktadır. Bu aktivasyon aşaması, normal ABL enziminin çeşitli efektör proteinler ile etkileşime girerek daha geniş bir moleküler etki ağı oluşturduğu süreçlerle devam etmektedir (Gómez ve ark., 2022). Bu moleküler mekanizmaların detaylı anlaşılması, KML'nin patogenezi açıklamada ve hastalığa yönelik daha etkili terapötik müdahalelerin geliştirilmesinde büyük önem taşımaktadır (Gregor ve ark., 2022).

BCR-ABL füzyon proteini, hücre içerisinde çok sayıda efektör protein yoluyla geniş bir etkileşim ağına yol açmakta ve bu etkileşimler, gen transkripsiyonunun aktivasyonu veya supresyonu, apoptotik yanıtların düzenlenmesi, mitokondrial işlevler, hücre iskeletinin organizasyonu ve belirli inhibitör proteinlerin degradasyonu gibi süreçleri içermektedir (El-Tanani ve ark., 2024). Bu etkileşimler sonucunda onkojenik sinyaller üretilir ve hücrelerin malign transformasyonu teşvik edilir. Anahtar rol oynayan sinyal yolları arasında RAS, Mitogen Aktive Protein (MAP) kinazlar, Sinyal Transdüktörleri ve Aktivatörleri of Transkripsiyon (STAT), Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) ve MYC bulunmaktadır (Almatroodi ve ark., 2023).

BCR-ABL proteini, çoğunlukla tirozinin fosforilasyonu aracılığı ile bu yolları aktive eder ve bu süreç, growth factor receptor-bound protein 2 (GRB-2), DOK, CRK, CRK-like protein (CRKL), SRChomology-containing protein (SHC) ve casitas-B-lineage lymphoma protein (CBL) gibi adaptör proteinlerin bağlanmasını gerektirmektedir (Letsoalo ve ark., 2024). Bu proteinler, sinyal yollarını daha da tetikleyerek, malign

transformasyonun ilerlemesine katkı sağlar (Roskoski, 2022). Sonuç olarak, BCR-ABL'nin hücreler üzerindeki etkisi, kontrolsüz hücre çoğalması, lösemik hücrelerin ekstrasellüler matriks ve kemik iliği stromasına yapışıklığında artış ve mutajenik uyarılara karşı apoptotik yanıtlarda azalma şeklinde özetlenebilir. Bu süreçler, BCR-ABL'nin malign etkilerinin temel mekanizmaları olarak kabul edilmekte ve KML'nin patogenezi üzerinde belirleyici roller oynamaktadır (Letsoalo ve ark., 2024).

2.1.2.2. Biyolojik Mekanizmalar

2.1.2.2.1. K562 Hücre Hattı Oluşumu

K562 hücre hattının oluşumu, hematolojik kanser araştırmalarında önemli bir konu olup, özellikle KML modellerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu hücre hattı ilk olarak 1970 yılında Lozzio ve Lozzio tarafından izole edilmiştir ve insan miyeloid hücrelerinin eritroid dönüşüm yeteneğini göstermesi nedeniyle hematolojik araştırmalar için ideal bir model olarak kabul edilmektedir (Lozzio ve Lozzio, 1975). K562 hücreleri, Philadelphia kromozomu pozitif (Ph+) ve bu özellikleriyle KML 'nin blast krizi aşamasını temsil etmektedirler (Okabe ve ark., 2020). Bu hücre hattı, benzersiz özellikleri nedeniyle sadece kanser araştırmaları için değil, aynı zamanda birçok farmakolojik ve genetik çalışma için de vazgeçilmez olmuştur.

K562 hücreleri miyeloid kökenden gelmekte ve diferansiye olmamış durumları ile karakterize edilmektedir; standart hücre kültürü koşulları altında sürekli çoğalma kapasitesini korumaktadırlar. Bu hücrelerin ölümsüzleşmesi, 9 ve 22 No.lu kromozomlar arasında karşılıklı bir translokasyon sonucu ortaya çıkan özgül bir kromozomal anormallik olan Philadelphia kromozomunun varlığı ile kolaylaştırılmaktadır (Antonenko ve ark., 2020). Bu translokasyon, sürekli aktif bir tirozin kinazı kodlayan BCR-ABL füzyon genini oluşturur ve bu gen, hücrelerin habis büyümesini teşvik ederek çeşitli sinyal iletim yollarını aktive etmektedir (Deininger, Goldman ve Melo, 2000).

K562 hücre hattının incelenmesi, lösemide düzensizleşen hücresel süreçler ve sinyal yolları hakkında önemli bilgiler sağlamıştır. Araştırmacılar, bu hücre hattını kullanarak çeşitli kimyasal maddelerin hücre diferansiyasyonu, apoptoz ve hücre döngüsü üzerindeki etkilerini incelemişlerdir (Ahagh ve ark., 2021). Ayrıca, K562 hücreleri, BCR-ABL füzyon proteinini hedef alan ve KML'nin hedefli tedavisinde devrim niteliğinde bir adım olan tirozin kinaz inhibitörleri, örneğin imatinibin etkinliğini araştırmak için geniş

çapta kullanılmıştır (Druker ve ark., 2001). K562 hücre hattının bir diğer önemli yönü, hücresel diferansiyasyonu incelemedeki rolüdür. Belirli deneysel koşullar altında, bu hücreler eritroid, megakaryositik veya monositik hücrelere diferansiye edilebilir, hematopoez ve miyeloid hücre işlevini incelemek için çok yönlü bir model sağlar (Mishra ve ark., 2023). Bu özellik, hücre diferansiyasyonunu etkileyen yolların anlaşılmasının kritik olduğu rejeneratif tıp ve gen terapisi alanında özellikle değerlidir.

Ayrıca, K562 hücrelerinde fetal hemoglobin ifadesi, araştırmaların odak noktası olmuştur ve orak hücre hastalığı ve beta-talasemi gibi hastalıkların tedavisinde potansiyel bir terapötik strateji sunmaktadır. Araştırmacılar, bu genetik bozuklukların klinik şiddetini hafifletmek amacıyla fetal hemoglobin üretimini teşvik edebilecek çeşitli farmakolojik ajanları incelemiştir (Mishra ve ark., 2023). K562 hücrelerinin bağışıklık sistemi bileşenleri ile etkileşimi de önemli bir araştırma alanı olmuştur. Yapılan çalışmalar, K562 hücrelerinin doğal katil (NK) hücreler tarafından aracılı sitotoksositeye duyarlı olduğunu göstermiş ve NK hücre aktivasyon mekanizmalarını ve hedeflerinin tanımlanmasını incelemeye yararlı bir araç olarak olduğunu göstermiştir (Robertson ve Ritz, 1990). K562 hücrelerinin manipülasyonu, ABCB1 gibi spesifik taşıyıcıları aşırı eksprese eden K562-Dox gibi hücre hatlarının geliştirilmesine yol açmıştır (Eadie ve ark., 2018). Ayrıca, ilaç direnci mekanizmalarını araştırmak için K562/TPA ve K562/ADM gibi dirençli alt hatlar oluşturulmuştur (Takeda ve ark., 1994; Camarasa ve ark., 2004). Kronik miyeloid lösemide ilaç direncini incelemek için K562-MP5 ve K562/DAC gibi modeller oluşturulmuştur (Wen ve ark., 2019).

Çalışmalar, K562 hücrelerinde ilaç direncinin üstesinden gelmek için, hücre büyümesini inhibe etmek ve ilaca dirençli K562 hücrelerinde apoptozu indüklemek için likopen ve GMZ-1 gibi bileşiklerin kullanımı da dahil olmak üzere stratejileri araştırmıştır (Ghorbanihaghjo ve Faezizadeh, 2014; Cao ve ark., 2017). K562/R ve K562/DNR gibi dirençli hücre hatlarının geliştirilmesi, çoklu ilaç direnci mekanizmalarının ve potansiyel tedavi seçeneklerinin incelenmesini kolaylaştırmıştır (Nambu ve ark., 2009; Man ve ark., 2014). K562 hücrelerinde çoklu ilaç direncini tersine çevirme çabaları, Apollon ve MDR1 gibi spesifik genlerin hedeflenmesini içermektedir (Chen ve ark., 2017).

Ayrıca K562 hücreleri, akut miyeloid lösemi tedavisinde umut vaat eden SPHINX tabanlı kombinasyon tedavisi gibi yeni tedavi stratejilerinin keşfedilmesinde etkili

olmuştur (Wodi ve ark., 2023). Nanopartiküller, K562 de dahil olmak üzere lösemi hücrelerinde antisens oligonükleotidlerin iletimini artırmak için de kullanılmış ve bu hücre hattının ilaç dağıtım araştırmalarındaki çok yönlülüğünü göstermiştir (Wang ve ark., 2010).

2.1.2.2.2. K562 Hücre Hattı Özellikleri

K562 hücre hattı, kronik miyeloid lösemi (KML) araştırmalarında temel bir model olarak kullanılan Philadelphia (Ph) kromozomu pozitif hücre hattıdır. İlk kez Dr. Carmen ve Dr. Bismarck Lozzio tarafından, terminal blast kriz hastalığı olan 53 yaşındaki bir kadının plevral efüzyonundan türetilmiştir. Bu hücre hattı, 3,5 yıl boyunca sürekli olarak çoğalma kapasitesini göstermiş ve Ph kromozomu pozitifliğini korumuştur (Lozzio ve Lozzio, 1975). K562 hücreleri, çeşitli deneysel tasarımlarda kullanılarak büyük bir değere sahiptir ve kanser biyolojisi araştırmalarında geniş bir yelpazede kullanılmaktadır.

Philadelphia kromozomu, kromozom 9'daki ABL1 geni ve kromozom 22'deki BCR geni arasındaki karşılıklı bir translokasyon sonucunda oluşur ve BCR-ABL1 füzyon onkogenini üretir (Rowley, 1973). BCR-ABL1 tirozin kinazının, KML gelişimini ve ilerlemesini teşvik ettiği bilinmektedir ve bu bilginin ışığında, imatinib-mesilat gibi tirozin kinaz inhibitörlerinin geliştirilmesi, onkolojide devrim yaratmıştır (Druker ve ark., 2001). Bununla birlikte, hastaların yaklaşık üçte biri, tedaviye başlangıçta zayıf yanıt verir veya ilk yanıtın ardından nüks eder, bu da tedavi direncinin önemli bir klinik zorluk olduğunu göstermektedir (Shah ve ark., 2004).

K562 hücre hattının özelliklerinden biri, bu hücrelerin sürekli bir proliferasyon kapasitesine sahip olmalarıdır. Bu hücreler, kültür koşullarında sınırsız bir şekilde bölünebilirler ve bu özellikleri sayesinde araştırmacılar tarafından çeşitli biyokimyasal ve genetik analizler için tercih edilmektedirler. Bununla birlikte, K562 hücreleri, immünohistokimyasal ve sitogenetik analizler için de uygun bir model sunmaktadır. Özellikle, bu hücre hattı, Philadelphia kromozomuna sahip olmaları nedeniyle BCR-ABL füzyon genine sahiptir ve bu da onları KML'nin moleküler mekanizmalarının araştırılması için ideal kılmaktadır (Sampaio ve ark., 2021).

K562 hücre hattının bir diğer önemli özelliği, bu hücrelerin eritroid farklılaşma gösterebilmeleridir. Eritropoietin ve diğer kimyasal uyarıcılarla muamele edildiğinde, K562 hücreleri hemoglobin üretmeye başlar ve eritroid hücrelere farklılaşır. Bu özellik,

hemoglobinopatiler ve diğer eritroid bozuklukların araştırılmasında önemli bir model sunmaktadır (Zuccato ve ark., 2021). Ayrıca, K562 hücreleri, ilaç direnci mekanizmalarının incelenmesinde de kullanılır. Örneğin, imatinib mesilat gibi tirozin kinaz inhibitörlerine karşı duyarlılık ve direnç geliştirme süreçleri bu hücre hattı kullanılarak incelenebilir (Deininger ve ark., 2005).

K562 hücre hattı, aynı zamanda epigenetik düzenlemelerin araştırılmasında da önemli bir rol oynar. Bu hücreler üzerinde yapılan çalışmalar, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarının gen ekspresyonunu nasıl etkilediğini anlamamıza yardımcı olmuştur. Özellikle, DNA metiltransferaz 1 (DNMT1) enziminin ifade düzeyleri ve aktivitesi, K562 hücrelerinde detaylı bir şekilde incelenmiştir. DNMT1, DNA metilasyonunu sürdüren ana enzim olarak bilinmekte ve genellikle gen susturulması ile ilişkili olmaktadır (Goll ve Bestor, 2005). K562 hücre hattında DNMT1'in rolü ve ekspresyon düzeyleri üzerine yapılan çalışmalar, epigenetik düzenlemelerin lösemi patogeneziindeki önemini vurgulamaktadır (Wu ve ark., 2021).

2.1.2.2.3. K562 Hücre Hattının Kronik Miyeloid Lösemi Araştırmalarındaki Önemi

KML, hematopoietik kök hücrelerde meydana gelen genetik bir anomali sonucunda oluşan bir kan kanseridir ve klinik olarak üç aşamada seyretmektedir. Bunlar kronik faz, akselere faz ve blast kriz fazıdır. Bu hastalığın anlaşılmasında ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde çeşitli hücre hatları kullanılmaktadır. Bunların arasında K562 hücre hattı, özel bir yere sahiptir. K562 hücre hattı, 1970'lerde Philadelphia kromozomu (t(9;22) (q34;q11)) taşıyan bir KML hastasından izole edilmiştir ve araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Lozzio ve Lozzio, 1975).

K562 hücre hattının KML araştırmalarındaki önemi, bu hücrelerin BCR-ABL füzyon onkogenini ifade etmesinden kaynaklanmaktadır. BCR-ABL füzyon geni, KML'nin patogeneziinde kritik bir rol oynamakta ve bu genin sürekli aktif olan tirozin kinaz aktivitesi, hücresel proliferasyonu ve apoptoz direncini artırmaktadır. Bu nedenle, K562 hücreleri, BCR-ABL'nin biyolojik etkilerini incelemek ve bu onkogene karşı etkili terapötik ajanlar geliştirmek için ideal bir model sistemidir (Al-Rawashde ve ark., 2021).

Bu hücre hattı üzerinde yapılan çalışmalar, KML tedavisinde devrim niteliğinde olan tirozin kinaz inhibitörlerinin (TKI'lar) geliştirilmesine yol açmıştır. Imatinib mesylate (Gleevec), BCR-ABL tirozin kinazını spesifik olarak inhibe eden ilk TKI'dır ve

KML tedavisinde önemli bir başarı elde etmiştir. Imatinib'in etkileri, K562 hücre hattı kullanılarak kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve bu ilacın hücre proliferasyonunu durdurduğu ve apoptozu indüklediği gösterilmiştir (Carofiglio ve ark., 2020).

Bununla birlikte, K562 hücre hattı sadece BCR-ABL füzyon onkogeninin biyolojik etkilerini incelemekle sınırlı kalmaz. Ayrıca, bu hücre hattı, ilaç direncinin mekanizmalarını ve alternatif tedavi stratejilerini araştırmak için de kullanılır. Örneğin, K562 hücrelerinde gelişen imatinib direnci, mutasyonlar, BCR-ABL gen ekspresyonunun artması veya alternatif sinyal yollarının aktivasyonu gibi çeşitli mekanizmalarla açıklanmıştır (Gorre ve ark., 2001). Bu bulgular, KML tedavisinde ikinci nesil ve üçüncü nesil TKI'ların geliştirilmesine yol açmıştır. K562 hücre hattı ayrıca, KML patogenezinde rol oynayan diğer genlerin ve proteinlerin fonksiyonel analizleri için de kullanılmıştır. Örneğin, MYC onkogeninin K562 hücrelerinde aşırı ekspresyonu, hücre proliferasyonunu ve tümörjenik potansiyeli artırdığı gösterilmiştir (Fathi ve ark., 2019).

Literatürdeki çalışmalar K562 hücrelerinin tirozin kinaz inhibitörleri, otofaji indükleyicileri ve apoptoz indükleyici ajanlar gibi farklı tedavilere yanıt verdiğini göstermiştir (Bellodi ve ark., 2009; Jia ve ark., 2009; Hromadnikova ve Sedláčková, 2008). KML'nin ek genetik anormalliklerle karakterize kronik fazdan blast krizine geçişi K562 hücreleri kullanılarak araştırılmıştır (Calabretta ve Perrotti, 2004). Araştırmacılar, ilaç direnci mekanizmalarını anlamak ve potansiyel terapötik ajanları belirlemek için çeşitli bileşiklerin K562 hücreleri üzerindeki etkilerini araştırmışlardır (Zhong ve ark., 2020; Lasa-Saracibar ve ark., 2013; Wang ve ark., 2023). Ayrıca, K562 hücreleri, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerden salgılanan sitokinlerin hücre çoğalması ve apoptoz üzerindeki etkisini incelemek için kullanılmıştır (Fathi ve ark., 2019).

Bununla birlikte, K562 hücreleri lösemi hücrelerinde eritroid farklılaşması, gen ekspresyon profilleri ve epigenetik modifikasyonların incelenmesinde çok önemli olmuştur (Mchaourab ve ark., 2018; Qiao ve ark., 2022). Bu hücre hattı, yeni bileşiklerin sitotoksitesini değerlendirmek ve gen susturmanın ilaç direnci ve apoptoz üzerindeki etkisini araştırmak için kullanılmıştır (Nabioğlu ve ark., 2022). Ayrıca, curcumin ve quercetin gibi farklı tedavi kombinasyonlarının apoptozu indüklemesindeki ve sinyal iletim yollarını etkilemedeki etkinliğini değerlendirmek için K562 hücreleri kullanılmıştır (Martínez-Castillo ve ark., 2018; Altundağ ve ark., 2018).

2.2. İmatinib Mesilat ve Direnç Mekanizmaları

Imatinib, 2-fenilaminoprimidin yapısına sahip bir bileşik olarak, Brian Ducker ile Basel'deki Novartis Farma da görev yapan araştırmacılar tarafından klinik kullanım amacı ile geliştirilmiş. Bu bileşik, özellikle kronik miyeloid lösemi (KML) tedavisinde devrim yaratmıştır çünkü BCR-ABL hibrid proteinini hedef alarak tasarlanmış ilk oral tirozin kinaz inhibitörüdür. Imatinib'in geliştirilme süreci, ABL protein kinazının ATP bağlanma bölgesinin detaylı yapısının analiz edilmesiyle mümkün olmuştur (Nimmanapalli ve Bhalla, 2002). Böylece, “imatinib mesilat, BCR-ABL'nin tüm ATP bağlanma cebini kaplamak yerine, proteinin inaktif formuna bağlanarak bu formun stabilizasyonunu sağlamakta ve aktif formdan inaktif forma geçişi engelleyerek otofosforilasyonu ve sonrasında gelen aktivasyon ile sinyal transdüksiyon süreçlerini inhibe etmektedir” (Tauchi ve Ohyashiki, 2004).

Imatinib, yalnızca BCR-ABL kompleksini hedef almakla kalmayıp, ABL proteininin yanı sıra ABL ile ilişkili diğer gen ürünlerini, C-kit reseptörünü, trombosit kaynaklı PDGFR Alfa ve PDGFR Beta ile koloni stimüle edici faktör 1 reseptöründe inhibe ederek geniş bir etki spektrumu sunmaktadır. Bu geniş inhibisyon kapasitesi, imatinib'i önceki standart tedavilere göre daha avantajlı kılmakta ve yüksek süreli cevap oranları ile iyi tolere edilebilirlik profili sayesinde KML tedavisinde yeni bir standart olarak kabul edilmesini sağlamıştır (Bhavani ve Reddy, 2023). Özellikle, imatinib'in BCR-ABL'yi etkin bir şekilde inhibe etmesi, KML'nin patogenezi için kritik olan başlangıç olaylarını başarıyla engellemekte ve bu durum, kronik miyeloid lösemi tedavisinde yeni bir dönemin başlamasına ön ayak olmaktadır. Bu nedenle, imatinib, bu alanda öncü bir molekül olarak geniş çapta kabul görmekte ve kronik miyeloid lösemi tedavisinde devrim yaratan bir tedavi olarak değerlendirilmektedir (Pardanani ve Tefferi, 2004).

Imatinib, BCR-ABL aracılı sinyal iletim yollarının inhibisyonu yoluyla, kronik miyeloid lösemi (KML) tedavisinde önemli bir rol oynamaktadır. Bu ilaç, BCR-ABL proteininin aktivitesini baskılayarak, sinyal iletimini engeller ve sonuç olarak, hem hücre çoğalmasının inhibisyonunu hem de apoptozun induklenmesini sağlamaktadır. Bu iki mekanizma, imatinibin antineoplastik etkilerinin temelini oluşturur ve bu özellikleri sayesinde, özellikle “KML'nin kronik fazın da çoğu hastalada tam sitogenetik remisyon görülmektedir. Bununla birlikte, hastalığın ileri fazlarında imatinibe verilen cevap

genellikle daha kısa sürelidir ve hastalar zamanla ilaca karşı direnç geliştirebilmektedir” (Tauchi ve Ohyashiki, 2004).

İmatinibe karşı geliştirilen direnç, iki ana grup altında incelenmektedir. Bunlar “BCR-ABL'ye bağlı direnç mekanizmaları ve BCR-ABL'ye bağlı olmayan direnç mekanizmalarıdır” (Hoemberger ve ark., 2020). BCR-ABL'ye bağlı direnç mekanizması arasında, BCR-ABL proteininin dublikasyonu ile mutasyonları yer almaktadır. Öte yandan, BCR-ABL'ye bağlı olmayan direnç mekanizmaları daha çeşitlidir ve bu mekanizmalar arasında ilacın hücre dışına atılması, hücre içine alımındaki aksaklıklar, ilacın hücre içindeki diğer proteinlere bağlanması, ilacın yeterli konsantrasyona ulaşamaması, alternatif sinyal iletim yollarının aktivasyonu ve çeşitli epigenetik değişiklikler sayılabilir (Fathi ve ark., 2019). Bu direnç mekanizmaları, imatinib tedavisinin etkinliğini azaltan faktörler olarak önem taşır ve bu nedenle, KML tedavisinde daha ileri stratejilerin geliştirilmesi için kritik öneme sahiptir. Bu bilgiler ışığında, yeni tedavi yaklaşımlarının, hem BCR-ABL'ye bağlı hem de bağlı olmayan direnç mekanizmalarını hedef alacak şekilde tasarlanması gerekmektedir (Hoemberger ve ark., 2020).

2.2.1. İmatinib Mesilatın Keşfi ve Etki Mekanizması

İmatinibin keşfi, hedefe yönelik tedavi konseptinin öncüsü olarak kabul edilmekte olup, hastalıkların moleküler temellerine yönelik terapötik yaklaşımların geliştirilmesine büyük katkı sağlamıştır. İmatinib, KML hastalarının yaşam süresini önemli ölçüde uzatmış ve yaşam kalitelerini artırmıştır. İmatinib mesilatın keşfi, 1990'lı yılların başında başlamış ve 2001 yılında FDA onayı ile sonuçlanmıştır. İmatinibin geliştirilmesi, BCR-ABL füzyon geninin keşfi ile doğrudan ilişkilidir. Bu füzyon geni, KML'nin patogenezinde kritik bir rol oynamakta ve sürekli aktif olan bir tirozin kinaz enzimi üretmektedir (Druker ve ark., 1996). Bu keşif, tirozin kinaz inhibitörlerinin (TKI'lar) geliştirilmesi için bir başlangıç noktası olmuştur. İmatinib, bu enzimi spesifik olarak inhibe ederek, kanser hücrelerinin çoğalmasını durdurmakta ve apoptoza yol açmaktadır (Bewry ve ark., 2008; Parmar ve ark., 2005).

İmatinibin etki mekanizması, BCR-ABL tirozin kinaz aktivitesinin inhibisyonu üzerine kuruludur. Bu inhibitör, ATP'nin bağlanma bölgesine bağlanarak, enzimin aktif

formuna geçişini engeller. Bu süreç, hücre içi sinyal iletim yollarını kesintiye uğratarak, hücre proliferasyonunu durdurur ve apoptozu indükler (Druker ve ark., 2001). İmatinibin bu mekanizması, sadece KML değil, aynı zamanda gastrointestinal stromal tümörler (GIST) gibi diğer kanser türlerinde de etkilidir (Blay ve ark., 2007).

İmatinibin klinik başarıları, KML tedavisinde bir dönüm noktası olmuştur. İlk klinik çalışmalarda, imatinibin KML hastalarında yüksek oranda hematolojik ve sitogenetik yanıtlar sağladığı gösterilmiştir (O'Brien ve ark., 2003). Bu yanıtlar, hastaların yaşam süresini uzatmış ve hastalığın ilerlemesini önemli ölçüde yavaşlatmıştır. Ayrıca, imatinibin yan etkileri, diğer kemoterapötik ajanlara kıyasla oldukça hafif ve yönetilebilir düzeydedir.

İmatinib mesilatın etki mekanizması, dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β) ve trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF) yolaklarının seçici inhibisyonunu içermektedir (Distler ve ark., 2007). Bu ikili inhibisyon, antiproliferatif etkilerine ve çeşitli koşullarda fibrozis gelişimini önleme yeteneğine katkıda bulunmaktadır (Vuorinen ve ark., 2007). İmatinib mesilatın ayrıca KML hücrelerinde intrinsik yolak aracılığıyla apoptozu indüklediği, arsenik trioksit ile kombinasyonunun ise intrinsik, ekstrasik ve endoplazmik retikulum stresi aracılı yolaklar aracılığıyla hücre ölümünü daha da artırabildiği gösterilmiştir (Du ve ark., 2006). Ayrıca, imatinib mesilatın Bcr-Abl-pozitif KML ve c-Kit veya PDGFRa-pozitif gastrointestinal stromal tümörler gibi protein tirozin kinazların yapısal olarak aktive olduğu malignitelerde terapötik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (McDowell ve ark., 2006). İlacın etkinliği, tedavi sonrası gastrointestinal stromal tümörlerin stromasında SCGF α 'yı bloke etme kabiliyetiyle ilişkilendirilmiş ve tümör mikroçevresi üzerindeki etkisi vurgulanmıştır (Riva ve ark., 2011). Bununla birlikte, imatinib mesilatın polisitemi vera hastalarında otonom eritropoezi inhibe ettiği bulunmuştur ve bu da hematopoetik hücre farklılaşması üzerindeki daha geniş etkilerini göstermektedir (Oehler ve ark., 2003).

Literatürde, imatinibin geliştirilmesi ve klinik uygulamaları üzerine çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Örneğin, imatinibin KML'nin yanı sıra, PDGFRA ve KIT mutasyonları taşıyan GIST'ler üzerindeki etkisi de kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Bu çalışmalar, imatinibin geniş spektrumlu bir TKI olduğunu ve çeşitli kanser türlerinde etkili olabileceğini göstermiştir (Heinrich ve ark., 2003).

İmatinibin keşfi, moleküler hedeflere yönelik tedavilerin geliştirilmesi açısından bir paradigma değişikliğine işaret etmektedir. Bu ilaç, kanser tedavisinde kişiselleştirilmiş tıbbın önemini vurgulamış ve hastalığın moleküler mekanizmalarının anlaşılmasının tedavi stratejileri üzerinde doğrudan bir etkisi olabileceğini göstermiştir. İmatinibin başarısı, diğer TKI'ların ve hedefe yönelik tedavi ajanlarının geliştirilmesine ilham kaynağı olmuştur (Goldman ve Melo, 2008).

2.2.2. İmatinib Mesilatın KML Tedavisindeki Yeri ve Önemi

2.2.2.1. KML'de İmatinib İle Faz 3 Çalışmaları

İmatinib'in etkinliğini ve güvenilirliğini ortaya koyan faz 3 çalışmalar, KML hastalarının tedavi sürecini önemli ölçüde değiştirmiştir. Örneğin, International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS) çalışması, bu ilacın hastalığın ilerlemesini durdurma ve sağ kalım oranlarını iyileştirme kapasitesini kanıtlamıştır (O'Brien ve ark., 2003). IRIS çalışması, kronik faz KML hastalarında İmatinib ile tedavi edilen grup ile daha geleneksel tedavi yöntemleri uygulanan grup arasında karşılaştırma yapmıştır. Çalışmanın sonuçları, İmatinib grubundaki hastaların, hastalıksız sağ kalım ve genel sağ kalım oranlarının geleneksel tedavi grubuna göre anlamlı olarak daha iyi olduğunu göstermiştir.

İmatinib, özellikle kronik faz KML için birinci sınıf tedavi olarak kabul edilmektedir. Ancak, bazı hastalarda zamanla ilaca direnç gelişebilir. Bu direnç, genellikle BCR-ABL1 kinaz domeninde mutasyonların oluşmasıyla ilişkilendirilir (Gorre ve ark., 2001). Bu tür durumlar, daha sonraki çalışmalarda yeni nesil tirozin kinaz inhibitörlerinin geliştirilmesine öncülük etmiştir. Ayrıca, faz 3 çalışmalar, İmatinib'in yan etkilerini de detaylı bir şekilde incelenmesini sağlamıştır. En yaygın yan etkiler arasında bulantı, kas krampları ve ödem bulunmaktadır. Ancak, bu yan etkiler genellikle yönetilebilir ve ilacın kesilmesini gerektirmemektedir (Deininger ve ark., 2005).

İmatinib mesilat ile tedavi edilen KML hastalarında hematopatolojik ve sitogenetik bulguları rapor etmiş, sürekli tam hematolojik yanıtlar göstermiş ancak tedavi sırasında morfolojik ve sitogenetik değişikliklerin daha iyi anlaşılması gerektiğini vurgulamıştır (Brazier ve ark., 2002). Ayrıca, yeni tanı konmuş Philadelphia kromozomu pozitif kronik faz KML'de yüksek doz imatinib mesilat tedavisinin etkinliğini araştırılmış

ve ilacın bu ortamdaki etkinliği vurgulanmıştır (Kantarjian ve ark., 2004). Kantarjian ve ark., (2007) ve Nagai ve ark., (2010) tarafından yapılan ve sırasıyla imatinib mesilat başarısızlığı sonrası Philadelphia kromozomu pozitif KML hastalarının sonuçlarına ve Japonya'daki prospektif bir çalışmanın sonuçlarına odaklanan çalışmalar, farklı klinik senaryolarda imatinib yönetimi ve yanıtına ışık tutmaktadır (Kantarjian ve ark., 2007; Nagai ve ark., 2010).

2.2.2.2. KML'de İmatinib Direnci

Kronik miyeloid lösemi (KML) tedavisinde imatinib, bir tirozin kinaz inhibitörü olarak önemli bir rol oynamasına rağmen, zamanla gelişen direnç mekanizmaları bu tedavinin etkinliğini sınırlamaktadır. İmatinib direnci, çeşitli biyolojik mekanizmalarla ilişkilendirilmektedir. Bu mekanizmalardan biri, ABL kinaz domenindeki mutasyonlar olup, bu mutasyonlar ilacın hedef aldığı bölgeye bağlanmasını engelleyerek direnç oluşumuna yol açar (Liu ve ark., 2021). Ayrıca, P-glikoprotein düzeylerinin yükselmesi ve oksidatif fosforilasyonun bozulması gibi faktörler de imatinibin etkisini azaltabilir (Cai ve ark., 2022).

KML hücrelerinde P-glikoprotein ařırđ ifadesi, edinilmiş direnç gelişimini tetikleyebilir ve bu proteinin düzenlenmesi direnci aşma yollarından biri olarak görülmektedir (Peng ve ark., 2012). Aynı zamanda, KML için karakteristik olan lösemik kök hücreler, doğal olarak imatinibe dirençlidir ve tedavi, bu direnci daha da artırabilir (Redner, 2010). Bu bulgular, direnç mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasını ve bu dirençlere karşı stratejiler geliştirilmesini zorunlu kılmaktadır.

Araştırmalar, imatinib direncini aşmak için çeşitli stratejileri incelemektedir. Örneğin, SOS1 proteinini hedef almak, BCR-ABL'den bağımsız olarak, SLC22A4 alım taşıyıcısı aracılığıyla imatinib direncini aşma yöntemi olarak önerilmiştir (Liu ve ark., 2021). Otofajinin inhibisyonu, KML hücrelerinin imatinibe olan duyarlılığını artırarak, otofajinin ilaç direncindeki rolünü vurgulamıştır (Huang ve ark., 2022). Ayrıca, PI3K/AKT sinyal yolunu ve Twist1'i hedef almak, KML'de imatinib direnciyle mücadele stratejisi olarak önerilmiştir (Yuan ve ark., 2020).

İmatinib direnciyle mücadelede kullanılan diğer yaklaşımlar arasında, özellikle deferasiroks gibi spesifik inhibitörlerin kullanımı yer alır. Bu madde, bir demir şelatörü

olarak imatinible sinerjik bir şekilde KML hücre proliferasyonunu inhibe edebilir (Kim ve ark., 2016). Ayrıca, ribonükleotit redüktaz düzenleyici alt birim M2'nin düşürülmesi, KML'nin imatinib bazlı terapiye olan duyarlılığını artırabilir (Liu ve ark., 2019). Bununla birlikte, miR-202'nin aşırı ifadesi, Hexokinase 2'yi hedef alarak imatinibe dirençli KML hücrelerini yeniden duyarlı hale getirebilir (Deng ve ark., 2018).

2.2.2.3. İmatinib Doz Uygulaması, Takibi Ve Yanıt Kriterleri

Kronik fazda bulunan ve tirozin kinaz inhibitörlerine daha önce maruz kalmamış hastalarda ilk tercih edilen tedavi, günde 400 mg imatinib mesilat olarak uygulanmaktadır. Daha yüksek dozların denendiği durumlar olmakla birlikte, bu dozların sonuçlarının daha iyi olduğuna dair kesin bir kanıt bulunmamaktadır. Yapılan araştırmalar, imatinibin etkinliğinin günde en az 300 mg alınmasıyla elde edilen sonuçlar temelinde değerlendirildiğini göstermektedir; bu dozajda tedavi gören hastaların hastalık hücreleri içindeki tirozin kinaz inhibitörüne duyarlılık oranı %98 olarak saptanmıştır (IJerman ve ark., 2020). Bildirilen yan etkiler genellikle hafif ya da orta derecede şiddette olup, genellikle 1 veya 2. derece olarak değerlendirilmektedir. Ancak, doz artışı ile birlikte yan etkilerin görülme sıklığında da bir artış gözlemlenmiştir ve 600 ila 1000 mg/gün dozlarında tedavi gören hastalarında %25' inde derece 3 ile derece 4 myelosupresyon meydana gelmiştir. “Myelosupresyon genellikle doz sınırlayıcı bir faktör olmamakta; doz azaltıldığında veya tedaviye kısa bir süre ara verildiğinde bu yan etkiler genellikle ortadan kalkmaktadır” (Clarke ve ark., 2021).

İmatinibe tolerans gösteremeyen veya direnç geliştiren hastalarda, tedavinin nilotinib (NI) veya dasatinib (DA) ile değiştirilmesi tavsiye edilmektedir. Nilotinib için önerilen doz, günde iki kez 400 mg iken, dasatinib için önerilen doz günde bir kez 100 mg olarak uygulanmaktadır. Nilotinib ve dasatinib arasında tercih yapılırken, BCR-ABL kinaz domeninde mevcut olan mutasyonların varlığı ve bu mutasyonların nilotinib ve dasatinibe karşı gösterdiği in vitro duyarlılık, beklenen yan etkiler ve hastanın genel klinik durumu ile komorbiditeleri önemli faktörler arasında yer almaktadır. "İmatinibden suboptimal yanıt alan hastalarda ise en az üç seçenek bulunmaktadır: mevcut dozda tedaviye devam etmek, tedaviyi nilotinib veya dasatinibe çevirmek veya alternatif hematopoetik hücre nakli yapmak. Hangi seçeneğin daha üstün olduğuna dair kesin bir kanıt bulunmamaktadır (Cheng ve ark., 2023).

Imatinib, kronik miyeloid lösemi (KML) tedavisinde standart ilk basamak tedavi olarak kullanılmaktadır. Bu tedaviye verilen yanıtın takibi, hastalığın yönetiminde kritik bir öneme sahiptir ve çeşitli testler ile değerlendirme kriterleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Yanıt değerlendirmesi sürecinde, hastaların tam kan sayımları incelenerek hematolojik yanıt tespit edilmekte; kemik iliği biyopsileri aracılığıyla yapılan metafaz analizleri ile sitogenetik yanıt belirlenmekte; ayrıca BCR-ABL transkript düzeylerinin kantitatif analizi ile moleküler yanıt değerlendirilmektedir. Bu değerlendirmeler, gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RTQ-PCR) teknolojisi kullanılarak yürütülmektedir ve bu yöntem, tedavi sürecinin etkinliğini belirlemede ve hasta takibinde standart bir araç olarak kabul edilmektedir (Santoleri ve ark., 2021). Bu detaylı ve çok yönlü değerlendirme süreci, tedaviye yanıtın zamanında ve doğru bir şekilde izlenmesini sağlamakta ve tedavi stratejilerinin hastaya özel olarak optimize edilmesine olanak tanımaktadır.

Hematolojik yanıtın değerlendirilmesi için tam kan sayımı, tam hematolojik yanıt elde edilene kadar iki haftada bir yapılır; bu yanıt elde edildikten sonra ise en az üç ayda bir kontrol edilir (Han, 2023). Sitogenetik değerlendirme, kemik iliği metafazlarının kromozom şeritleme yöntemi ile yapılır ve her 3-6 ayda bir tam sitogenetik yanıt sağlanana dek sürdürülür, daha sonra yılda bir kez yapılır. İnterfaz in situ hibridizasyon (I-FISH) tekniği ise, periferik kandan ve kemik iliğinden yapılan değerlendirmelerde, özellikle sitogenetik yanıtların saptanmasında kromozom şeritleme yöntemine alternatif olarak kullanılabilir. Ancak, kemik iliği metafazlarının değerlendirilmesi sırasında kromozom şeritleme yöntemi, Philadelphia kromozomu pozitif (Ph(+)) hücrelerin yanı sıra, Philadelphia kromozomu negatif (Ph(-)) hücrelerdeki klonal kromozomal anomalilerin saptanması açısından da önem taşımaktadır (Cheng ve ark., 2023).

Moleküler yanıtın takibi, RTQ-PCR ile yapılır ve major moleküler yanıt elde edilene kadar her üç ayda bir, daha sonra her altı ayda bir gerçekleştirilir. Ayrıca, suboptimal yanıt alınan veya yanıtsız hastalarda, bir tirozin kinaz inhibitöründen diğerine geçmeden önce mutasyonal analiz için denatüre eden yüksek performans likid kromatografi (D-HPLC) yöntemi her zaman uygulanmalıdır. Bu sayede, tedaviye yanıtın optimize edilmesi ve direnç mekanizmalarının anlaşılması sağlanmaktadır. Bu kapsamlı izleme ve değerlendirme süreci, kronik miyeloid lösemi hastalarının tedavi süreçlerinin etkin bir şekilde yönetilmesine olanak tanımaktadır (Han, 2023).

İmatinibe verilen optimal yanıt, belirli zaman dilimlerinde elde edilen spesifik sonuçlar ile tanımlanmaktadır. İlk olarak, tedaviye başlandıktan üçüncü ayda tam hematolojik yanıt ve en az minör sitogenetik yanıtın ($Ph+ < \%65$) elde edilmesi gerekmektedir. Altıncı ayda, hastaların en az kısmi sitogenetik yanıt göstermesi beklenir ($Ph+ < \%35$). Tedavinin on ikinci ayında tam sitogenetik yanıtın sağlanması hedeflenirken, on sekizinci ayda major moleküler yanıt ($BCR-ABL: ABL \leq \%0,1$) elde edilmesi gerekmektedir (Han, 2023).

Tedaviye yanıtsızlık durumu ise, üçüncü ayda inkomplet hematolojik yanıtın olması, altıncı ayda herhangi bir sitogenetik yanıtın gözlenmemesi ($Ph+ > \%95$), on ikinci ayda parsiyel sitogenetik yanıttan daha düşük bir yanıtın alınması ($Ph+ > \%35$) ve on sekizinci ayda tam sitogenetik yanıttan daha az bir yanıtın elde edilmesi durumlarında tanımlanmaktadır. Ayrıca, tam hematolojik ve sitogenetik yanıtların kaybedilmesi de tedaviye yanıtsızlık olarak değerlendirilmektedir. Bu tanımlanan kriterlere uymayan durumlar ise suboptimal yanıt olarak değerlendirilmektedir (Hinterlang ve ark., 2022).

Optimal yanıt elde edilen hastalar için, tedavi sürecinin imatinib ile sürdürülmesi tavsiye edilmektedir. Bunun yanı sıra, klinik duruma bağlı olarak, ikinci kuşak tirozin kinaz inhibitörlerine geçiş yapılabilir. Diğer yandan, tedaviye yanıt göstermeyen hastalarda ise, tercih edilen tedavi stratejisi olarak allojenik kök hücre nakli önerilmekte ve bu yaklaşım, genel tedavi protokollerinde önemli bir alternatif olarak kabul edilmektedir. Suboptimal yanıt alınan hastalarda ise, mevcut dozda devam edilen imatinib tedavisinin dozu artırılarak sürdürülebilir. Ancak, bu hastalar arasında bazıları ikinci kuşak tirozin kinaz inhibitörlerine geçiş için uygun adaylar olabilir (Han, 2023).

Kronik fazdaki hastaların büyük bir çoğunluğu, ilk basamak tedavi olarak imatinib kullanıldığında, %95 oranında tam hematolojik yanıt elde etmekte, %70-80 oranında tam sitogenetik yanıt göstermekte ve %50-60 oranında ise majör moleküler yanıt kazanmaktadır. Uzun dönem izlemede ise, hastaların ortalama toplam sağ kalım süresi yedi yıl içinde %85'e ulaşmakta, progresyonsuz sağ kalım oranı, yani akselere veya blastik faza ilerlemeksizin sağ kalım, %90'ın üzerinde gerçekleşmekte ve olaysız sağ kalım oranı ise %60-70 aralığında bulunmaktadır (Han, 2023).

Kronik miyeloid lösemi (KML) tedavisinde ilerleme ve tüm olayların oranı zamanla azalmakta olup, dört yıl sonunda bu oranlar %0-2 aralığına düşmektedir. Araştırmalar, üçüncü ayda tam hematolojik yanıt alınamamasının, hastalar için sonraki

dönemlerde kötü sonuçlara yol açabileceğini göstermektedir. Aynı zamanda, tam sitogenetik yanıtın elde edilmesi, hastalığın ilerleyişindeki en iyi gösterge olarak kabul edilmekte ve erken dönemde elde edilen yanıtların, daha iyi sonuçları beraberinde getirdiği belirtilmektedir. Ancak, geç dönemde yanıt alınması durumunda bile, bazı hastaların mükemmel bir prognoza sahip olabileceği göz ardı edilmemelidir (Hinterlang ve ark., 2022).

Literatürde, özellikle tedavinin 12. ve 18. aylarında elde edilen sonuçların hastalığın gidişatı açısından kritik olduğu vurgulanmaktadır. Bu dönemlerde sağlanan moleküler ve sitogenetik yanıtların, hastalığın ilerleyişini belirlemede ve tedavi stratejilerini yönlendirmede büyük bir öneme sahip olduğu kabul edilmektedir. Üçüncü ve altıncı aylarda elde edilen sitogenetik yanıtlar ise, hastalığın erken evresindeki seyrini anlamak açısından temel teşkil etmektedir. Moleküler yanıtın prognostik değeri genel olarak kabul görmekle birlikte, bu yanıtların zamanlaması ve derecesi üzerine yürütülen tartışmalar devam etmektedir. Örneğin, IRIS çalışmasının erken analizlerinde, tedavinin 12. ayında elde edilen major moleküler yanıtların daha iyi progresyonsuz sağ kalım ile ilişkili olduğu belirlenmişken, beşinci yıl yapılan analizler bu sonucun öneminin sınırda olduğunu ortaya koymuştur. Buna karşılık, aynı çalışmanın sonraki analizleri, 18. ayda elde edilen major moleküler yanıtların altı yıllık progresyonsuz sağ kalım ile güçlü bir korelasyon içinde olduğunu göstermiş, bu durumun 12. ayda elde edilen yanıtlar için geçerli olmadığını vurgulamıştır (Nekooresh ve ark., 2020).

BCR-ABL transkript düzeyindeki artışlar her zaman dikkate alınmalı ve kontrol altında tutulmalıdır, ancak moleküler yanıt kaybının prognostik değeri üzerindeki tartışmalar devam etmektedir. BCR-ABL kinaz domaininde nokta mutasyonların saptanması, özellikle imatinibe dirençli mutasyonlar söz konusu olduğunda, tedavi değişikliği için mutlak bir endikasyon teşkil etmektedir. Tanı anında veya tedavi sürecinde Ph(+) hücrelerde gelişen klonal kromozomal anormallikler, hastalığın seyri ve tedaviye yanıt konusunda önemli uyarıcı faktörler olarak değerlendirilmektedir. Tanı sırasında yapılan sitogenetik yanıt değerlendirmeleri, Sokal veya Hasford skorları kullanılarak progresyonsuz sağ kalım, olaysız sağ kalım ve ortalama sağ kalım relatif riskleri hesaplanarak hastalığın prognostik değerlendirilmesine katkıda bulunur. Bu geniş kapsamlı değerlendirmeler, KML tedavisinde bireyselleştirilmiş tedavi stratejilerinin

geliştirilmesine olanak tanımakta ve hastaların yaşam kalitesinin artırılmasına yardımcı olmaktadır (Sánchez ve ark., 2022).

2.2.3. İmatinib Direncinin Moleküler Temelleri ve Mekanizmaları

İmatinib, zamanla, çeşitli moleküler mekanizmalar aracılığıyla imatinibe direnç geliştirebilmektedir. Direnç mekanizmalarının anlaşılması, bu ilacın etkinliğini artırmak ve dirençle mücadele etmek için kritik öneme sahiptir. İmatinib direncinin temelinde yatan mekanizmalar, genetik mutasyonlar, ilaç taşınım süreçlerindeki değişiklikler, alternatif sinyal yollarının aktivasyonu ve epigenetik modifikasyonlar olarak sıralanabilir (Weicai ve ark., 2017).

Birincil direnç mekanizmalarından biri, KIT veya PDGFRA gibi anahtar genlerde ikincil mutasyonların kazanılmasıdır. Bu mutasyonlar, hücrelerin imatinibe karşı duyarsız hale gelmesine neden olmaktadır (Antonescu ve ark., 2005; Wang ve ark., 2009). Ayrıca, imatinibin hücre içine ve dışına aktif taşınımı gibi ilaç taşınım süreçlerindeki değişiklikler de dirence katkıda bulunabilmektedir (Thomas ve ark., 2004). KML'de BCR-ABL inhibitör direncine karışan alternatif sinyal yollarının, örneğin MET/ERK ve MET/JNK yollarının aktivasyonu da direnç mekanizmaları arasında yer almaktadır (Tsubaki, 2018; Yuan ve ark., 2020).

İlaç taşıyıcılarının aşırı ifadesi, hedef genlerin genomik amplifikasyonu ve BCR-ABL transkriptlerinin anormal ifadesi gibi diğer direnç mekanizmaları da bildirilmiştir (Burger ve ark., 2004; Radujkovic ve ark., 2005; Peng ve ark., 2012). Abl kinaz domeninde mutasyonlar, mikroRNA'ların düzensizliği ve dirence yol açan sinyal yollarını aktive eden Twist1 gibi belirli proteinlerin yükseltilmesi de direnç faktörleri arasındadır (Cai ve ark., 2022; Gao ve ark., 2014; Yuan ve ark., 2020). Ayrıca, histon deasetilazların yükseltilmesi sonucu oluşan anormal protein asetilasyonu gibi epigenetik değişiklikler de imatinib direncine katkıda bulunabilmektedir (Lee ve ark., 2007).

Otofajiyile ilişkili proteinlerin, özellikle GCA'nın, imatinib direncini düzenlemedeki rolüne dair yapılan çalışmalar, otofajinin aktivasyonu ve direnç mekanizmaları arasında potansiyel bir bağlantı olduğunu öne sürmektedir (Han ve ark., 2019). Ayrıca, BCR-ABL'ın ubiquitinasyonu ve belirli enzimlerin inhibisyonu, KML hücrelerinde kinaz sinyallemesini bloke ederek ve apoptozu teşvik ederek gösterilmiştir.

İmatinibin anti-proliferatif aktivitesini etkileyen ABCB1 polimorfizmleri gibi genetik polimorfizmlerin ilaç aktivitesi üzerindeki etkisi, ilaç yanıtındaki genetik değişkenliğin rolünü vurgulamaktadır (Dessilly ve ark., 2016).

2.2.4. Dirençli Hücre Hatlarında Görülen Değişiklikler ve Bunların Tedaviye Etkisi

Dirençli hücre hatlarında görülen değişiklikler, kanser tedavilerinde karşılaşılan en büyük zorluklardan biridir. Bu direnç mekanizmaları, ilaç tedavisinin etkinliğini azaltarak hastalığın kontrol altına alınmasını zorlaştırmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, direnç mekanizmalarını daha iyi anlamamıza yardımcı olmuş ve bu bilgiler, daha etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesinde kritik rol oynamaktadır. Dirençli hücre hatlarında genetik ve epigenetik değişiklikler, ilaç taşıyıcı proteinlerin düzenlenmesi, sinyal iletim yollarında değişiklikler ve mikroçevresel faktörlerin etkisi gibi bir dizi değişiklik gözlemlenmektedir (Sun ve ark., 2011).

Genetik değişiklikler, dirençli hücre hatlarının en belirgin özelliklerindendir. Özellikle, spesifik gen mutasyonları, gen amplifikasyonları ve kromozomal değişiklikler, ilaçlara karşı direncin temelini oluşturur. Örneğin, EGFR genindeki mutasyonlar, akciğer kanseri tedavisinde kullanılan tirozin kinaz inhibitörlerine direnç gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır (Sequist ve ark., 2011). Ayrıca, p-glikoprotein gibi ilaç taşıyıcı proteinlerin aşırı ifadesi, çeşitli kanser türlerinde direnç mekanizmalarında sıkça rastlanan bir diğer faktördür. Bu proteinler, ilaçların hücre içine alınmasını engelleyerek veya hücre dışına atarak ilaçların etkinliğini azaltmaktadır (Gottesman ve ark., 2002).

Sinyal iletim yollarında meydana gelen değişiklikler de direnç gelişiminde kritik öneme sahiptir. Örneğin, PI3K/Akt/mTOR sinyal yolu, birçok kanser türünde üzeraktivite gösterir ve bu durum, hücrelerin ilaçlara karşı direnç kazanmasına yol açar (Edlind ve ark., 2014). Bu sinyal yolunun inhibitörleri, bu direnci aşmak için geliştirilmiş olup, klinik çalışmalarda umut verici sonuçlar elde edilmiştir. Mikroçevresel faktörler, özellikle tümör mikroçevresinin asidik doğası ve hipoksik koşulları, hücrelerin ilaçlara dirençli hale gelmesinde etkilidir. Asidik mikroçevre, ilaçların hücre içine alımını azaltabilir ve hücrelerin ilaçlara olan duyarlılığını değiştirebilir. Hipoksi, hücrelerin ilaç metabolizmasını etkileyerek, tedaviye yanıtı azaltabilmektedir (Edlind ve ark., 2014).

2.3. DNA Metiltransferaz Enzimleri ve Epigenetik Modifikasyonlar

2.3.1. DNA Metilasyonunun Temel Prensipleri ve Mekanizmaları

DNA metilasyonu, insan genomunun işlevsel organizasyonunda temel bir mekanizma olarak bilinmektedir. DNA metilasyonunun incelenmesi, kanserojenesis, farklı virüslerin konakçı enfeksiyonu, hücre farklılaşması, otoimmün hastalıklar, çeşitli akıl hastalıkları ve nörolojik bozukluklar ile çevresel toksikoloji gibi biyomedikal bilimlerdeki bazı temel sorulara çözüm bulmamıza yardımcı olabilmektedir. Ne yazık ki, DNA metilasyonunu hedefleyen etkili tedavi ve önleyici yöntemler hala yeterince geliştirilmiş değildir. Bu durum büyük ölçüde, insan hücrelerindeki temel DNA metiltransferaz olan DNMT1'in moleküler mekanizması hakkında bilgi eksikliğinden kaynaklanmaktadır (Song ve ark., 2011).

DNA metilasyonu ile ilgili ilk kanıt, 1948 yılında rapor edilmiştir ve 27 yıl sonra, memeli DNA metiltransferazlarının saflaştırılmasına yönelik ilk girişimler tanımlanmıştır. Sonraki 15 yıl içinde, DNMT1'in çok büyük ve karmaşık bir enzim olduğu bulunmuştur. DNMT1, hemimetillenmiş bölgelere karşı katalitik bir tercihe sahiptir ve aktivitesi belirli DNA ve RNA molekülleri grubu tarafından düzenlenebilmektedir. DNMT1'in, poly(dI-dC) substratına karşı yüksek kinetik tercihi ve belirgin bir allosterik bölgesi bulunmaktadır. DNMT1'in moleküler biyoloji çağı, 1992 yılında cDNA'sının ve tam uzunluktaki geninin klonlanması ile başlamıştır. Memeli hücrelerinden tam olarak saflaştırılması, onlarca mekanistik çalışmanın temelini atmıştır (Goyal ve ark., 2006).

DNMT1'in mekanistik çalışmaları, bakteriyel enzim M.HhaI tarafından hedef bazın ilk kristal yapısının belirlenmesiyle büyük ölçüde kolaylaştırılmış ve bu önemli başarıdan ilham alan sayısız mekanistik çalışma yapılmıştır. DNMT1'in, DNA metilasyonu sürecinde hemimetillenmiş DNA bölgelerini tanıma ve metilasyon desenlerini koruma yeteneği, gen ifadesinin düzenlenmesi ve genomik stabilitenin sürdürülmesi açısından kritik öneme sahiptir (Youngblood ve ark., 2006).

DNMT1 ifadesinin bir bakulovirüs vektörü kullanılarak gerçekleştirilmesi, DNMT1'in farklı parçalarının hazırlanmasını ve karakterizasyonunu mümkün kılmış ve DNMT1'in saflaştırılmasını birçok araştırma grubu için rutin hale getirmiştir (bugün, saflaştırılmış DNMT1 çeşitli ticari kaynaklardan da temin edilebilmektedir). DNMT1 üzerine yapılan çalışmaların çoğu, allosterik bölgesinin fonksiyonuna, de novo ve koruma

metilasyonu arasındaki seçiciliğe ve DNMT1'in farklı parçalarının karakterizasyonuna odaklanmıştır (Hsieh, 2005). Buna karşın, aktif bölgedeki katalitik mekanizmanın karakterizasyonu, önerilen DNMT1 inhibitörlerinin etki mekanizmaları ve DNMT1'in çoklu fosforilasyonları üzerinde nispeten az çalışma yapılmıştır. DNMT1 ile hücrelerde etkileşime giren molekülleri aramak için büyük bir araştırma çabası harcanmıştır.

2010 yılı itibarıyla, DNMT ile etkileşime giren 31 farklı molekül bulunmuş olup, bu etkileşimlerin birçoğu DNMT1 dizisinin farklı bölümlerine haritalanmış, ancak bu etkileşimlerin yalnızca küçük bir kısmı işlevsel olarak karakterize edilmiştir. DNMT1 çalışmaları genellikle insan ve fare enzimlerini kullanmış olup, iki enzim %78 oranında dizi benzerliği ve katalitik mekanizmada birçok ince detay paylaşmaktadır (Youngblood ve ark., 2006).

DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları, epigenetik düzenlemenin iki önemli unsuru olarak bilinmektedir. Memelilerde DNA metilasyonu, CG dinükleotidlerinde bulunan sitozin bazlarının 5. pozisyonuna metil grubunun enzimatik olarak eklenmesi sürecidir. Bu metilasyon reaksiyonu, DNA metil transferaz (DNMT) enzimleri tarafından S-adenozil metionin (SAM)'den alınan bir metil grubu kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Smith ve ark., 2007; Fandy ve ark., 2007).

DNA metilasyonunu gerçekleştiren DNMT enzimleri, genomik düzenleme süreçlerinde çeşitli ve kritik işlevlere sahiptir. DNMT3a ve DNMT3b enzimleri, 'de novo metiltransferazlar' olarak adlandırılarak, özellikle erken embriyonik gelişim sırasında DNA metilasyon modellerinin ilk kez oluşturulmasından sorumludur. Bu enzimler, genomik metilasyonun temelini oluşturmakta ve epigenetik programlamada önemli bir rol oynamaktadır. Diğer taraftan, DNMT1 ve DNMT2, DNA replikasyonu esnasında var olan metilasyon desenlerinin ebeveyn DNA zincirinden yeni sentezlenen zincire doğru ve hatasız bir şekilde kopyalanmasını sağlamaktadır. Bu süreç, hücresel hafızanın korunmasında ve gen ifadesinin düzenlenmesinde merkezi bir öneme sahiptir (Szyf, 2003; Lafon-Hugues ve ark., 2008).

İnsan genomunda, DNA metilasyonunun yoğun olarak gerçekleştiği bölgeler, G+C içeriği %50'den fazla olan ve en az 200 baz çifti uzunluğundaki 'CpG adaları' olarak bilinir. Bu bölgeler, insan genlerinin yaklaşık yarısının promotor alanlarında bulunmakta ve genellikle metillenmemiş durumdadır, bu sayede aktif gen ifadesinin sürdürülmesine imkân tanımaktadır. Buna karşın, genomun tekrar eden diğer alanlarında yer alan CG

dinükleotidleri, gen ifadesinin bastırılması ve genomik stabilite sağlanması açısından yoğun bir şekilde metillenmektedir (Costello ve Plass, 2001; Frühwald ve Witt, 2008).

Promotor bölgelerinde meydana gelen metilasyon, ilgili genin susturulmasıyla doğrudan ilişkilendirilmekte ve bu durum, transkripsiyonun baskılanmasını sağlayan çeşitli mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşmektedir. İlk mekanizma, DNA metilasyonunun, transkripsiyon faktörlerinin promotor bölgesine bağlanmasını engelleyerek, genin ifade edilmesini önlemesi şeklinde işlemektedir. İkinci mekanizma ise, metillenmiş bölgeleri tanıyabilen ve bu bölgelere özgül olarak bağlanan 'metillenmiş-CpG bağlayıcı domain proteinleri' (MBD'ler) tarafından hayata geçirilmektedir. MBD proteinleri (örneğin MBD1, MBD2, MBD3, MBD4, MeCP2) ve onlarla birlikte işlev gören histon modifiye edici enzimler (örneğin, histon deasetilazlar) ve histon metiltransferazlar gibi ko-represör kompleksleri, metillenmiş bölgelerde inaktif kromatin yapısının oluşmasını sağlayarak genin transkripsiyonunu etkin bir şekilde baskılamaktadır. Bu süreçler, gen ifadesinin kontrolü ve epigenetik düzenlemelerde merkezi bir role sahiptir (Patra ve Szyf, 2008).

Gelişim süreci sırasında oluşturulan DNA metilasyon desenleri, erişkin yaşam boyunca somatik hücrelerde stabil bir biçimde korunmakta ve her hücre bölünmesinde, özgün metilasyon bilgilerinin yeni hücrelere doğru ve hatasız olarak aktarılması ile bu stabilite sağlanmaktadır. Bu sürekli aktarım, hücrelerin genetik bilgiyi korumasına ve fonksiyonel özelliklerini sürdürmesine olanak tanımaktadır (Reik, 2007; Spivakov ve Fisher, 2007).

DNA metilasyonu, gen ifadesini DNA dizilimini değiştirmeden düzenleyen hayati bir epigenetik mekanizmadır. Bu süreç, özellikle CpG dinükleotidlerinde bulunan sitozin kalıntılarına bir metil grubu eklenmesini içerir ve transkripsiyon kontrolü, hücre diferansiyasyonu ve genom stabilitesi gibi çeşitli biyolojik süreçler için esastır (Vanyushin, 2005; Severin ve ark., 2011; Rehman ve ark., 2022). Araştırmalar, DNA metilasyonunun genetik ve çevresel faktörlerden, örneğin diyet, mikroRNA'lar ve histon modifikasyonlarından etkilendiğini göstermiştir (He ve ark., 2018; Kadayıfci ve ark., 2018; Wang ve ark., 2017). Örneğin, mikroRNA'lar, DNA metiltransferazları veya metilasyonla ilişkili proteinleri hedef alarak DNA metilasyonunu düzenleyebilir ve böylece gen ifadesi desenlerini modüle edebilir (Wang ve ark., 2017). Ayrıca, H3K9 ve H3K27 metilasyonları gibi histon modifikasyonları, DNA metilasyonunun geri

kazanımına katkıda bulunarak, farklı epigenetik mekanizmalar arasındaki karmaşık etkileşimi vurgulamaktadır (Wong ve ark., 2011).

DNA metilasyonu, sadece gen ifadesini düzenlemekle kalmaz, aynı zamanda bitkilerde RNA yönlendirmeli DNA metilasyonu (RdDM) ve aktif DNA demetilasyonu gibi süreçler aracılığıyla genom genelinde DNA metilasyon desenlerini de etkilemektedir (Lei ve ark., 2015). Bununla birlikte, DNA metilasyon değişiklikleri, hafıza oluşumu, meyvelerde olgunlaşma ve postoperatif bilişsel işlev bozukluğu gibi çeşitli biyolojik olaylarla ilişkilendirilmiştir (Oliveira, 2016; Lang ve ark., 2017; Gao ve ark., 2021).

Ayrıca, DNA metilasyonunun hastalık durumlarında, özellikle kanserde önemli etkileri vardır. Yapılan çalışmalar, DNA metilasyon desenlerindeki sapmaların, genetik mutasyonlar gibi kanserin ilerlemesi ve metastazında rol oynadığını ve kanser tedavisinde potansiyel hedefler olarak hizmet edebileceğini göstermiştir (Szyf, 2008). DNA metilasyonunun gen ifadesi ve genom stabilitesi üzerindeki düzenleyici rolü, hem normal fizyolojik süreçlerde hem de patolojik durumlarda önemini vurgulamaktadır.

DNA metilasyonu, sitozin rezidülerine bir metil grubunun eklenmesini içeren temel bir epigenetik mekanizmadır ve bu süreç, özellikle CpG dinükleotidlerinde yoğunlaşmıştır. DNA metilasyonu, genom düzenlenmesi, gelişim ve hastalıklar gibi çeşitli hücrel süreçlerde kritik bir rol oynamaktadır (Lister ve ark., 2009). DNA metilasyon süreci, de novo DNA metilasyonu, metilasyonun korunumu ve DNA demetilasyonu olmak üzere üç ana mekanizma tarafından sıkı bir şekilde düzenlenmektedir (Elhamamsy, 2016). Bu süreçler, hücre büyümesi ve gelişimi sırasında gen ifadesinin dinamik düzenlenmesini ve genom stabilitesini sağlamaktadır (Zhu ve ark., 2020).

Araştırmalar, DNA metilasyonunun kanser, ateroskleroz, sinir bozuklukları ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli hastalıklara yol açabilecek kalıtsal bir değişiklik olduğunu göstermiştir (Kandi ve Vadakedath, 2015). Anormal DNA metilasyon desenleri, kanser gelişimi ve ilerlemesi ile ilişkilendirilmiş olup, DNA metilasyonunun düzenleyici mekanizmalarını anlamının önemi vurgulanmaktadır (Lian ve ark., 2012). Kanserde, genom genelinde ve gen spesifik DNA metilasyon değişiklikleri, hastalığın başlatılması ve ilerlemesine katkıda bulunan mutasyona uğramış veya düzenlenmiş kromatin düzenleyiciler nedeniyle ortaya çıkmaktadır (Kim ve Costello, 2017).

Bununla birlikte, DNA metilasyonu, kromatin yapısını değiştirerek genlerin ve tekrarlayan elementlerin susturulmasında rol almakta ve bu da transkripsiyonel baskılanmaya yol açmaktadır (Miranda ve Jones, 2007). DNA metilasyon süreci, genomik izlenim, X-kromozomu inaktivasyonu ve hücrel diferansiyasyon için hayati öneme sahiptir (Riso ve ark., 2022). Ayrıca, DNA metilasyon dinamikleri, genetik varyantları ve çevresel ipuçlarını fenotipik özelliklere çeviren genetik ve çevresel faktörlerden etkilenmektedir (He ve ark., 2018).

2.3.2. DNMT Enzim Ailesinin Tanımlanması ve Karakterizasyonu

DNA metil transferaz (DNMT) enzim ailesi, epigenetik düzenlemenin temel unsurlarından biri olan DNA metilasyon süreçlerinde kritik roller oynamaktadır. Bu aile, özellikle DNMT1, DNMT3A ve DNMT3B olmak üzere, sitozin rezidülerine metil gruplarının transferinden sorumludur ve bu süreç gen ifadesi ile genomik stabilite üzerinde önemli etkiler oluşturmaktadır (Levenson ve ark., 2006). DNMT1, var olan metilasyon desenlerinin korunmasında görev alırken, DNMT3A ve DNMT3B, yeni metilasyonların oluşturulmasında etkilidir (Sarabi ve Naghibalhossaini, 2015).

Bu enzimler, gametogenez, embriyo gelişimi ve hücre farklılaşması gibi çeşitli biyolojik süreçler için zorunlu olan DNA metilasyon desenlerinin kurulmasında ve sürdürülmesinde esastır (Myant ve Stancheva, 2008). Özellikle, DNMT1'in metilasyon desenlerinin devamlılığını sağlama görevi, hücrelerin nesilden nesile genetik bilgilerini doğru bir şekilde aktarabilmesi için önemlidir. Diğer yandan, DNMT3A ve DNMT3B, hücrelerin gelişim sürecinde veya yeni çevresel koşullara uyum sağlama sırasında ihtiyaç duyulan yeni metilasyon desenlerinin oluşturulmasında aktif roller üstlenmektedir.

DNMT'lerin hastalıklar, özellikle kanser gibi çeşitli patolojilerdeki rolleri de yoğun bir şekilde araştırılmıştır. Bu enzimler, gen ifadesinin epigenetik olarak susturulmasında yer aldıkları için, özellikle kanser gelişiminde ve ilerlemesinde önemli faktörlerdir (Agarwal ve ark., 2013). Ayrıca, DNMT3A'nın öğrenme ve hafıza süreçleriyle özgül olarak ilişkilendirilmesi, bu enzimlerin nöronal işlev ve plastisite üzerindeki etkilerini de göstermektedir (Antúnez ve ark., 2014).

Karaciğer karsinogenez modellerinde DNMT3A ve DNMT3B'nin kanser gelişiminin erken evrelerinde farklı ifade desenleri gösterdiği gözlemlenmiştir, bu da

DNMT'lerin kanser biyolojisindeki rolünün daha iyi anlaşılmasına katkı sağlamaktadır (Yoo ve Medina-Franco, 2012). Ayrıca, kanser ve diğer hastalıklar için potansiyel bir tedavi stratejisi olarak DNMT'lerin inhibisyonu hedeflenmektedir.

2.3.3. DNMT1 Enziminin Biyolojik İşlevleri

DNMT1 enzimi, hücre bölünmesi sırasında genomik DNA metilasyon desenlerinin korunmasında hayati bir role sahiptir. Bu enzim, DNA metilasyonunun devamlılığını sağlamakla sorumlu olup, hücre nesilleri boyunca epigenetik işaretlerin sadakatini korumasını garanti etmektedir (Wu ve ark., 2014). Yapılan araştırmalar, DNMT1'in MYC indüklenmiş T-hücre lenfomalarının önlenmesi ve sürdürülmesinde önemli bir rol oynadığını göstermekte, bu da onun epigenomik stabilite üzerindeki etkisini vurgulamaktadır (Peters ve ark., 2013). Ayrıca, DNMT1, histon modifiye edici enzimlerle etkileşimler yoluyla gen ifadesinin düzenlenmesinde rol aldığı ve metiltransferaz fonksiyonundan bağımsız olarak bir transkripsiyon baskılayıcı olarak işlev görebildiği bilinmektedir (Clements ve ark., 2012).

DNMT1'in DNA metilasyon desenlerinin düzenlenmesinde çeşitli biyolojik bağlamlarda etkili olduğu gösterilmiştir. Örneğin, postnatal hayvanlarda DNA hipometilasyonu, merkezi sinir sistemi nöronlarının işlevini ve hayatta kalmasını bozabilir (Fan ve ark., 2001). Ayrıca, DNMT1'in mitokondriyal genom metilasyonunu modüle ettiği ve mitokondriyal biyolojiyi düzenlediği de tespit edilmiştir (Saini ve ark., 2017). Bunun yanı sıra, DNMT1'in HP1 ile etkileşime girdiği ve DNA ile kromatin şablonlarında DNA metilasyonunu artırdığı belirlenmiştir (Smallwood ve ark., 2007).

DNMT1'in işlevleri, sadece DNA metilasyonunun korunmasını sağlamakla sınırlı değildir; ayrıca katalitik aktivitesi olmaksızın gen ifadesini düzenlediği, kısmen histon modifiye edici enzimlerle olan etkileşimleri aracılığıyla bu işlevi yerine getirdiği bulunmuştur (Clements ve ark., 2012). Ayrıca, DNMT1'in mikroRNA ifadesinin düzenlenmesinde rol aldığı ve bu durumun kolorektal kanser hücrelerinin biyolojik özelliklerini etkilediği gözlemlenmiştir (Wang ve ark., 2020). Enzimin aktivitesi, SIRT1 tarafından deasetilasyon yoluyla modüle edilmekte, bu da metilasyon desenlerinin korunması ve tümör baskılayıcı genlerin susturulması işlevlerinde değişikliklere yol açmaktadır (Peng ve ark., 2011).

Sonuç olarak, DNMT1 enzimi, DNA metilasyon süreçlerinin ötesinde gen ifadesinin ve epigenetik düzenlemenin önemli bir düzenleyicisidir. Bu enzimin işlevleri ve düzenlenmesi, biyolojik süreçler ve hastalıklar üzerindeki etkileri açısından daha detaylı anlaşıldığında, epigenetik terapilerin geliştirilmesinde kritik bilgiler sunabilir. Bu bilgiler, özellikle kanser gibi karmaşık hastalıkların tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilmesine olanak tanıyabilir.

2.3.4. Normal Memeli Dokularında DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu, normal fizyolojik koşullar altında genom bütünlüğünün korunması için hayati öneme sahiptir. Tekrarlayan bölgelerin metilasyonu, retrotranspozon aktivitesini önleyerek genom stabilitesini sağlamaktadır. Ayrıca, dokuya özgü genlerin baskılanmasında ve allelik ekspresyonun genomik baskılama yoluyla düzenlenmesinde de önemli bir rol oynamaktadır. Kadınlarda fazladan X kromozomunun inaktivasyonu için de gereklidir (Smith ve Meissner, 2013).

Evrimsel süreç boyunca, memeli genomu birçok parazitik transpoze, retroviral ve tekrarlayan eleman biriktirmiştir. Bu elemanlar, insan genomunun üçte birinden fazlasını oluşturmaktadır (Cordaux ve Batzer, 2009). Transpoze elemanların CpG metilasyonu, bu elemanların sessizleştirilmesini ve transkripsiyonlarının engellenmesini sağlamaktadır. Tekrarlayan bu elemanların DNA metilasyonu, genom bütünlüğünün korunması açısından merkezî bir rol oynamaktadır (Smith ve Meissner, 2013).

Genomik baskılama olarak bilinen epigenetik fenomen, her bir ebeveynden miras alınan kromozomların embriyonik gelişime eşit katkı yapmamasıyla sonuçlanmaktadır. Baskılanmış genler, her iki kromozomdan ziyade ebeveyne özgü bir şekilde ifade edilmektedir. DNA metilasyonu, allel-spesifik ifadenin kurulması ve sürdürülmesi için kilit mekanizmadır. Örneğin, maternal allel DNA metilasyonu ile baskılandığında, bu allel sessizleşir ve sadece babadan miras alınan gen ifade edilmektedir (Bertozzi, 2021).

X kromozomu inaktivasyonu, gelişimsel olarak gerekli bir süreç olup, kadınlarda X-bağılantılı genlerin dozajının erkeklerdeki gen dozajıyla eşitlenmesini sağlar (Weisenberger ve ark., 2022). Memelilerde, inaktive edilecek X kromozomunun seçimi rastgeledir. Bu süreç, inaktive edilecek X kromozomunda kodlamayan RNA XIST'in artan ekspresyonu ile başlatılır. Bu durum, sonunda RNA polimerazın dışlanmasına ve

baskılayıcı histon işaretlerinin Xi'ye (inaktive X) toplanmasına yol açan bir olaylar dizisini tetiklemektedir (Pontier ve Gribnau, 2011). İnaktive X bir kez oluşturulduktan sonra, CpG adalarının DNA metilasyonu, sessiz durumun sürdürülmesi için gereklidir (Bestor ve ark., 2015).

2.3.5. Kanserde DNA Metilasyonu ve DNMT Enzimlerinin Düzenlenmesi

Kanserin başlatılması ve ilerlemesi geniş çaplı epigenom değişiklikleri ile birlikte gerçekleşmektedir. On yıllardır bilinen bir gerçek olarak, kanser hücreleri, düşük yoğunluklu CpG bölgeleri, tekrarlayan elemanlar, retrotranspozonlar ve laminin ile ilişkili bölgeler (LAD'ler) dâhil olmak üzere, genel bir CpG metilasyonu kaybı sergilemektedir. Bu olgu, CpG adalarında ve CpG ada kıyılarında eş zamanlı olarak meydana gelen bölgeye özgü hipermetilasyon ile yan yana gerçekleşmektedir (Weisenberger ve Liang, 2015).

DNA metilasyonu, kanser gelişimi ve ilerlemesinde kritik bir faktör olup, gen ifadesi desenlerini ve genomik stabiliteyi etkiler. Tümör baskılayıcı genlerin hipermetilasyonu ve onkogenlerin hipometilasyonu gibi anormal DNA metilasyonu, çeşitli kanserlerde yaygın olarak gözlemlenen bir epigenetik değişikliktir (Jones ve Baylin, 2007). Bu DNA metilasyonundaki düzensizlik, hücre döngüsü düzenlemesi, apoptoz ve DNA tamiri gibi kritik genlerin susturulması ile ilişkilidir (Esteller, 2011).

Kanser hücrelerinde, DNA metilasyonu histon modifikasyonları ve kromatin yapısı değişiklikleri ile karmaşık bir epigenetik ağ oluşturarak tümör oluşumuna katkıda bulunmaktadır (Aydin ve Kalkan, 2020). DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları arasındaki etkileşim, tümör baskılayıcı genlerin susturulmasına ve onkogenlerin aktivasyonuna yol açarak kanser ilerlemesini teşvik etmektedir (Li ve ark., 2016). Ayrıca, kronik inflamasyonun, anormal DNA metilasyon desenleri aracılığıyla tümör gelişimini teşvik ettiği gösterilmiştir (Wang v e ark., 2017).

DNA metiltransferaz 1 (DNMT1), genom genelinde DNA metilasyon desenlerinin korunmasından sorumlu anahtar bir enzim olup, kanserde sıkça düzensizleşmiştir (Liang ve ark., 2019). DNMT1, çeşitli kanser türlerinde karsinogenezi teşvik etmekle ilişkilendirilmiş olup, tümör başlatılması ve ilerlemesindeki rolü vurgulanmaktadır (Sharma ve ark., 2009). Ayrıca, DNMT1'in, Wnt sinyalleşmesini ve

DNA metilasyonunu etkileyerek kolorektal kanser hücrelerinde β -katenin gibi diğer proteinlerle etkileşime girdiği bulunmuştur (Subramaniam ve ark., 2014).

MikroRNA'lar, DNMT1 ifadesinin düzenleyicileri olarak tanımlanmış olup, kanser hücrelerinde DNA metilasyon desenlerini ve gen ifadesini etkilemektedir (Shen ve Laird, 2013). DNMT1/miR-34a aksının düzensizliği, kanser hücrelerinin kökenselliği ile ilişkilendirilmiş olup, epigenetik düzenlemenin kanser ilerlemesindeki önemini vurgulanmaktadır (Bowler ve ark., 2019). Ayrıca, MEK/ERK yolunun, kanser hücrelerinde DNMT1'in aşırı ifadesi ile bağlantılı olduğu ve bu yolun kanser tedavisinde potansiyel bir hedef olabileceği önerilmektedir (Jialun ve ark., 2019).

DNA metilasyonunun kanser üzerindeki etkileri, hem gen susturulmasında hem de genom stabilitesinin bozulmasında kendini göstermektedir. Genom genelinde metilasyon kaybı, genellikle gen ifadesinin düzensizleşmesine ve potansiyel onkogenlerin aktivasyonuna yol açmaktadır. Bu durum, hücre proliferasyonunu kontrolsüz bir şekilde artırarak tümör oluşumunu tetiklemektedir. Diğer yandan, CpG adalarının hipermetilasyonu, tümör baskılayıcı genlerin sessizleştirilmesine yol açar, bu da hücre döngüsü kontrolü ve apoptoz gibi temel hücresel süreçlerin bozulmasına neden olmaktadır.

Özellikle bazı kanser türlerinde, belirli gen bölgelerinin hipermetile edilmesi yaygındır. Örneğin, MLH1 gibi DNA tamir genlerinin promotor bölgelerindeki hipermetilasyon, kolorektal kanserde yaygın olarak gözlemlenen bir durumdur (Herman ve ark., 1998). Bu tür epigenetik değişiklikler, genetik mutasyonlar kadar önemli olup kanser biyolojisinde kritik bir rol oynamaktadır. Kanser hücrelerinde gözlemlenen bu epigenetik değişiklikler, sadece gen ifadesini değil, aynı zamanda hücre mikroçevresini de etkiler. Metilasyon desenlerindeki değişiklikler, hücre-hücre etkileşimlerini ve hücre dışı matris bileşenlerinin düzenlenmesini değiştirebilir. Bu durum, tümör mikroçevresinin oluşumuna katkıda bulunarak metastaz yeteneğini artırabilmektedir (Timp ve Feinberg, 2013).

Epigenetik terapiler, kanser tedavisinde umut verici bir yaklaşım olarak ortaya çıkmaktadır. DNA metilasyonunu hedef alan demetilasyon ajanları ve histon deasetilaz inhibitörleri gibi epigenetik ilaçlar, tümör hücrelerinin yeniden programlanmasına ve apoptoza yönlendirilmesine yardımcı olabilir. Ancak, bu tür tedavilerin etkinliği,

hedeflenen epigenetik değişikliklerin hassas bir şekilde tanımlanmasına ve kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesine bağlıdır (Jones ve Baylin, 2007).

2.3.5.1. Hipermetilasyon

DNA metilasyonu gibi epigenetik süreçler, tümör baskılayıcı genlerin (TSG'ler) inaktivasyonunda genetik değişikliklere ek olarak ikincil bir mekanizma olarak hizmet etmektedir (Jones ve Laird, 1999; You ve Jones, 2012). Kanser hücrelerinde CGI promotorlarının hipermetilasyonu, gen ifadesi ile ters orantılı olup, birçok bilinen tümör baskılayıcı genin sessizleştirilmesiyle sonuçlanmaktadır (Jones ve Baylin, 2007; Irizarry ve ark., 2009; Ehrlich ve Lacey, 2013; Shen ve Laird, 2013). Hücre döngüsü düzenleyicileri ve DNA tamir genlerinin DNA metilasyonu yoluyla sessizleştirilmesi, birçok farklı kanser türünde rapor edilmiştir ve genellikle genetik inaktivasyonla karşılıklı dışlayıcı bir şekilde gerçekleşmektedir (Sakai ve ark., 1991; Costello ve ark., 1996; Alvarez-Nuñez ve ark., 2006; Chiang ve ark., 2006).

Sporadik meme ve yumurtalık kanserlerinde BRCA1 ifadesinin kaybı, promotor hipermetilasyonu nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Benzer şekilde, promotor metilasyonu yoluyla tümör baskılayıcı VHL'nin epigenetik sessizleştirilmesi, bireyleri berrak hücreli renal hücre karsinoması da dahil olmak üzere çeşitli malignitelere yatkın hale getirmektedir (Herman ve ark., 1994). DNA tamir genlerinin sessizleştirilmesi, genomik istikrarsızlık ve genetik mutasyon yükünün artmasına katkıda bulunmaktadır. O6-Metilguanin-DNA metiltransferaz (MGMT), DNA üzerindeki alkilasyon aduklarını temizlemekten sorumlu bir DNA tamir enzimi olup birçok kanser türünde, özellikle gliomlar ve kolorektal kanserde sıkça hipermetile edilmektedir.

Sonuç olarak, MGMT, keşfedilen ilk kanser DNA metilasyon biyomarkörlerinden biri olmuştur. Promotor hipermetilasyonu nedeniyle MGMT baskılanması, p53 ve KRAS gibi önemli genlerde artan genetik mutasyon eğilimine yol açmaktadır. İlginç bir şekilde, MGMT kaybı, hücreyi kemoterapötik ajan temozolomide (TMZ) karşı daha hassas hale getirmektedir. Glioblastoma multiforme (GBM) klinik çalışmalarında, TMZ tedavisinin, tümörün MGMT promotor hipermetilasyonu sergilediğı vakalarda en faydalı olduğı gözlemlenmiştir (Zarnett ve ark., 2015).

Benzer şekilde, uyumsuzluk tamir geni MLH1'in promotor hipermetilasyonu, kanserlerde sıkça görülmektedir. Çalışmalar, hipermetilasyonun artan promotor nükleozom doluluğuna ve MLH1 ifadesinin azalmasına yol açtığını doğrulamıştır (Lin ve ark., 2007). Promotor metilasyonu nedeniyle MLH1 inaktivasyonu, belirli bir CpG adası alt kümesinin hipermetilasyonu ile güçlü bir şekilde ilişkilidir ve bu, mikrosatellit instabilitesinin birincil mekanizmasıdır. Bu durum, kolorektal ve endometrial kansinomlar da dahil olmak üzere birçok kanserin patogeneze katkıda bulunmaktadır (Hinoue ve ark., 2012).

CpG adalarının hipermetilasyonu aynı zamanda izlenim kaybına da katkıda bulunabilir. İmprintlenmiş lokus IGF2/H19 anormal şekilde metillendiğinde, büyüme faktörü IGF2'nin ifadesi artar (Kaneda ve Feinberg, 2005). IGF2'nin sürekli aşırı ifadesinin, kolorektal ve mide kanserleri gibi kanserlerin gelişimi ve ilerlemesine katkıda bulunduğu gözlemlenmiştir. Bu lokusta izlenim kaybı, Wilms tümöründe en yaygın değişiklik olarak kabul edilmektedir (Bjornsson ve ark., 2007).

Anormal DNA metilasyonu, kanserde yaygın bir fenotip olup tümör fenotipini yönlendiren spesifik değişikliklerin belirlenmesi, terapötik stratejilere rehberlik edebilir. Son bir çalışmada, araştırma grubumuz tümörijenesisin epigenetik sürücülerini belirlemek için DNA metilasyonu bağımlılığı kavramını uygulamıştır. Hipotezimiz, kanser hücrelerinin hayatta kalmak için birkaç hayati bölgenin metilasyonuna bağımlı olduğu ve bu bölgelerin, metilasyon seviyeleri yapay olarak azaltıldığında DNA metilasyonunu koruma olasılığının daha yüksek olduğu yönündedir. Bu bölgeler, kanser hücresinin fitnessine katkıda bulunduğundan, tümör durumunu yönlendiren bölgeler olarak öne çıkmaktadır. Bu hipotezi test etmek için, kolorektal hücre hattı HCT116'nın global DNA metilasyonu, DNMT'lerden bir veya daha fazlası eksik olan düşük metillenmiş türevi hat ile karşılaştırılmıştır (Rhee ve ark., 2000, 2002). Epigenetik sürücüler, HCT116 türev hattında tercihli olarak ve kanser spesifik bir şekilde metilasyonu sürdüren genomik bölgeler tanımlanarak belirlenmiştir.

Bu yaklaşımla tanımlanan aday epigenetik sürücülerden biri, interlökin-1 reseptörle ilişkili kinaz 3 (IRAK3) olmuştur. IRAK3 promotörü, kanserlerde spesifik olarak hipermetilasyona uğramış olup, bu durum, kolon adenokarsinom gibi birçok kanserde genin ifadesinin azalmasıyla ilişkilidir. Önemli olarak, IRAK3, STAT3, NF-κB ve MAPK yolları dâhil olmak üzere kanser hayatta kalması için önemli olan birçok yolu

dolaylı olarak inhibe eder. Bu nedenle, IRAK3'ün aşağı regülasyonu kanser ilerlemesi için büyük ölçüde faydalıdır. Tümörjenik olmayan bir hücre hattında IRAK3'ün azaltılması, in vitro olarak koloni oluşumunu artırmak için yeterli olmuştur. HCT116'da IRAK3, DNA metilasyonu ile susturulmuş olup bu hattan IRAK3'ün aşırı ifadesi hücre canlılığında azalmaya yol açmıştır (De Carvalho ve ark., 2012).

2.3.5.2. Kodlamayan RNA'lar

Kodlamayan RNA'lar (ncRNA'lar), klasik gen promotörlerinin ötesinde, metilasyonun önemli bir düzenleyici rol oynadığı elemanlardır. Bu elemanlar arasında mikroRNA (miRNA), küçük nükleolar RNA (snoRNA), vault RNA (vtRNA) ve uzun kodlamayan RNA (lncRNA) gibi çeşitli ncRNA türleri bulunmaktadır. Bu elemanlar, hücresel süreçlerin, özellikle proliferasyon, farklılaşma ve gelişim gibi kritik işlevlerin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Esteller, 2011). Anormal hipermetilasyon, mikroRNA'ların düzensizleşmesine yol açarak kanser gelişimine katkıda bulunabilmektedir. Mesane kanseri hücrelerinde, DNMT inhibitörü 5-Aza-2'-deoksisitidin (5-Aza-CdR) tedavisi, miR-127'nin yukarı regülasyonuna ve proto-onkogen BCL-6'nın ardından aşağı regülasyonuna yol açmaktadır (Kulis ve ark., 2012).

Benzer şekilde, akut lenfoid lösemi (ALL) durumunda miR-124a'nın hipermetilasyon nedeniyle sessizleşmesi, CDK6-RB1 onkogen yolunu aktive ederek hasta sağkalımını olumsuz etkilemektedir. Ayrıca, ALL'de snoRNA'lar SNORD123, U70C ve ACA59B'nin yukarıdaki CpG adalarının kanser spesifik hipermetilasyonu sonucunda bu snoRNA'ların transkripsiyonel sessizleşmesi gözlemlenmiştir (Ferreira ve ark., 2012). Mide kanseri ve akut miyeloid lösemi (AML) hastalarında, ncRNA nc866'nın, diğer adıyla vtRNA2-1, CpG hipermetilasyonuna uğraması, kötü sağkalım ile ilişkilendirilmiştir (Treppendahl ve ark., 2012; Lee ve ark., 2014). Mide hücre hatlarında nc866'nın in vitro knockdown'u, bilinen onkogenlerin indüksiyonuna yol açarken, ncRNA'nın aşırı ifadesi hücresel proliferasyonu azaltmaktadır. Myelodisplastik sendromda (MDS), vtRNA1-2 ve vtRNA1-3 promotör metilasyonu ile sessizleştirilebilir ve vtRNA1-3 promotörünün hipermetilasyonu, düşük riskli MDS hastalarında azalmış sağkalım ile ilişkilidir (Helbo ve ark., 2015).

Son olarak, yakın tarihli bir çalışma, kısmen anotlanmış lncRNA MORT'un DNA hipermetilasyonu yoluyla epigenetik olarak sessizleştirilmesinin, insan memesi epitel hücrelerinin ölümsüzleştirilmesi için oldukça önemli olduğunu tespit etmiştir. MORT ifadesinin eksikliği, birçok kanser türünde yaygındır ve 5-Aza-CdR tedavisi ile yeniden aktif hale getirilebilmektedir. Bu durum, bu lncRNA'nın onkogenez sırasında ölümsüzleşme üzerindeki rolünü önermektedir (Vrba ve ark., 2015). Bu bulgular ve diğer birçok çalışma, tümör baskılayıcı etkileri olan ncRNA'ların anormal metilasyonunun, kanserin temel bir özelliği olduğunu ve hastalık ilerlemesinde hayati bir rol oynadığını açıkça ortaya koymaktadır.

2.3.5.3. Hipometilasyon

CpG hipometilasyonu, kanserlerde keşfedilen ilk metilasyon değişikliği olmasına rağmen, bu düzensizliğin tümoriyenizdeki rolü sıklıkla göz ardı edilmiştir. Feinberg ve Vogelstein ile Gama-sosa ve arkadaşları, birçok kanser türünde 5mC içeriğinde genel bir azalma tespit etmişlerdir. Hipometilasyon, tümoriyenizde erken bir olay olabilir ve sıklıkla benign hiperplazide tespit edilmektedir. Metilasyon kaybı, tümör ilerledikçe daha belirgin hale gelmekte olup, metastatik lezyonlar primer tümörlerden daha fazla demetilasyon göstermektedir (Li ve ark., 2014).

CpG metilasyonundaki azalmanın çoğunluğu, intergenik ve intragenik bölgelerde gerçekleşmektedir. Bu genomik alanlar, tekrarlayan ve transpoze edilebilen elemanlarla doludur. DNA metilasyonu, bu elemanları baskılamakta olup hipometilasyonları ektopik gen ifadesine katkıda bulunabilir. Uzun aralıklı nükleer eleman 1 (LINE1) retrotranspozonları, insanlarda endojen mutagenezden büyük ölçüde sorumlu olan hareketli genetik elemanlardır. LINE1 insertleri, gen ifadesini büyük ölçüde etkileyebilir ve DNA metilasyonu, LINE1'in sessizleştirilmesinde anahtar bir rol oynamaktadır. LINE1'in promotöründeki CpG adasının hipometilasyonu, alternatif MET promotöründe izin verici bir kromatin yapısının benimsenmesini teşvik ederek onkogenin aktivasyonunu sağlar. LINE1 hipometilasyonu, prostat, melanom, mesane ve böbrek kanseri de dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinde tümör ilerlemesi ve prognoz göstergesi olarak tanınmıştır (Karami ve ark., 2015). Kısa aralıklı nükleer elemanlar (SINE'ler) olarak bilinen bir diğer tekrarlayan eleman sınıfı da benzer şekilde

metilasyonla düzenlenmektedir ve çalışmalar, akut miyeloid lösemide (AML) bu tekrarların metilasyon kaybını gözlemlemiştir (Saied ve ark., 2012).

Non-CGI promotörlerinin hipometilasyonu, promotör CGI'ların hipermetilasyonuna göre çok daha az yaygın olmasına rağmen, onkogenlerin ve proto-onkogenlerin yukarı regülasyonuna yol açabilir. Örneğin, metastatik küçük hücreli dışı akciğer kanseri tümörlerinde, varsayılan onkogen engulfment and cell motility 3 (ELMO3) geni, promotör hipometilasyonu sonucunda önemli ölçüde aşırı ifade edilmektedir. Osteosarkomda, Iroquois homeobox 1 (IRX1) yukarı regüle edilmiştir ve pro-metastatik bir rol oynamaktadır. IRX1 gen ifadesindeki artış, hem metastatik osteosarkom hücre hatlarında hem de primer hasta örneklerinde bulunmuştur (Lu ve ark., 2015). Her iki durumda da, gen ifadesindeki artış, gen promotörünün hipometilasyonu ile ilişkilidir.

2.3.6. Kanserde İntergenik ve İntragenik Bölgelerde DNA Metilasyonu

Yıllarca, kanser epigenetiğindeki araştırma çabaları büyük ölçüde gen promotörlerindeki DNA metilasyonunun düzenlenmesine odaklanmıştır. Yeni nesil ve yüksek yoğunluklu dizi analiz teknolojilerindeki ilerlemeler, araştırmacıların DNA metilasyonunu genom çapında incelemelerini mümkün kılmıştır. Bu sayede, non-promotör intragenik ve intergenik bölgelerin de dinamik olarak düzenlendiği ve hem fizyolojik değişimlere hem de hastalık durumlarının gelişimine katkıda bulunduğu giderek daha belirgin hale gelmiştir.

2.3.6.1. Transkribe Edilen Bölgelerde DNA Metilasyon Değişiklikleri

Promotörlerin aksine, metilasyonun gen baskılanmasına neden olduğu "kapalı" bir kromatin yapısı oluşturduğu yerlerde, genlerin transkribe edilen bölgelerindeki (gövde) metilasyon seviyesi genellikle gen ifadesi ile pozitif ilişkilidir. Glioblastoma örneklerinin yakın tarihli bir incelemesi, gen gövdesi metilasyonunun MGMT ifadesini etkileyen işlevsel rollerini ortaya koymuştur (Moen ve ark., 2014). Çalışma, metillenmemiş MGMT promotörü ve yüksek gen gövdesi metilasyonu olan tümörlerin yüksek MGMT ifadesini koruduğunu bulmuştur. Daha önce belirtildiği gibi, MGMT

ifadesi, TMZ tedavisine direnç kazandırmaktadır. Sonuç olarak, glioblastoma hücre hatlarının DNMT inhibitörü decitabine ile ön tedavi edilmesi, MGMT gövde metilasyonunu azaltarak temozolomide tedavisine karşı duyarlılıklarını önemli ölçüde artırmıştır (Moen ve ark., 2014).

Gen gövdeleri çoğunlukla CpG açısından fakirdir, çok sayıda tekrarlayan ve transpoze edilebilen eleman içerir ve geniş ölçüde metillenmiştir. DNA metilasyonu, transkripsiyonun başlatılmasını engellerken, transkripsiyonun uzamasına olanak tanır (Kulis ve ark., 2013). Ayrıca, gen gövdesindeki metilasyon, alternatif başlama noktalarının kullanımını düzenleyerek transkripsiyon verimliliğine de katkıda bulunabilir. GBM'lerin küresel metilom analizi, gen gövdesi hipometilasyonunun alternatif promotörlerden transkripsiyonu teşvik ederek alternatif transkriptlerin ve onkojenik protein izoformlarının artan ifadesine yol açtığını ileri sürmektedir (Nagarajan ve ark., 2014). Son olarak, gen gövdelerindeki metilasyon kaybı, dokuya özgü olarak susturulmuş distal düzenleyici elemanları (enhancerlar) açığa çıkarabilir. Normal B hücreleri ve kronik miyeloid lösemi DNA metilasyon profillerinin büyük ölçekli bir analizi, özellikle enhancer bölgeleri hedef alan yaygın gen gövdesi hipometilasyonunu ortaya koymuştur (Kulis ve ark., 2012).

2.3.6.2. DNA Metilasyonu ve Enhancerlar

Promotörlerle birlikte, enhancerlar hedef genlerin ifadesini ve aktivitesini düzenlemede önemli bir rol oynamaktadır. Enhancerlar, DNA'ya dizilim tanıma yoluyla bağlanan transkripsiyon faktörleri (TF'ler) için bir platform görevi görür. Enhancer aktivasyonu genellikle birden fazla TF'nin varlığını gerektirir. Ayrıca, işlevsel enhancerlar, H3K4me1 ve H3K27ac gibi aktif histon işaretleri ile süslenmiştir. "Looping" gibi uzun menzilli etkileşimler aracılığıyla, bu distal elemanlar bağlı aksesuar proteinleri promotörlere ulaştırarak güçlü bir transkripsiyonu teşvik eder. Her enhancer, birden fazla promotörün aktivitesini düzenleyebilir (Bulger ve Groudine, 2011).

DNA'nın metilasyonunun, aktif histon işaretlerinin varlığıyla ters orantılı olduğu not edilmiş olsa da, aktif enhancerları belirleyen işaretler gibi, enhancerlarla eşleşen ifade ile ilişkili metilasyon siteleri de gözlemlenmiştir. Bu sitelerdeki metilasyon, promotörlere benzer şekilde gen ifadesi ile ters orantılıdır ve sıklıkla ifade seviyelerinin daha iyi bir

öngörücüsüdür. Ayrıca, enhancerlar, promotör sürekli olarak metillenmemiş olsa bile, gen ifadesini hücre tipine özgü bir şekilde düzenleyebilir (Aran ve Hellman, 2013).

TF tanıma dizileri ve diğer DNA bağlanma elemanları genellikle metillenmemiş DNA'da yer alır. DNA metilasyonu, TF'nin DNA'ya bağlanmasını engelleyebilir ve tersine, TF'lerin varlığı, DNMT'lerin DNA'ya erişimini engelleyerek DNA hipometilasyonunu teşvik edebilir (Calo ve Wysocka, 2013). Bu nedenle, enhancerlarda DNA metilasyonunun ince ayarlı modülasyonu, birçok hedef genin ifadesini büyük ölçüde etkileyebilir. Kanserde, intergenik ve intragenik enhancerların hipometilasyonu, TF'ler için bağlanma motiflerini açığa çıkarabilir ve aşağı akıştaki ifade değişikliklerini tetikleyebilir. Öte yandan, enhancerlardaki DNA hipermetilasyonu, bunları devre dışı bırakarak aktif histon işaretlerinin ve transkripsiyon faktörü bağlanmasının kaybına yol açabilir. Bu tür değişiklikler, promotör metilasyon dalgalanmalarından bağımsız olarak gen transkripsiyonunu modüle edebilir (Kulis ve ark., 2013).

2.3.7. DNMT1'in İlaç Direnci ve Kanser Tedavisindeki Önemi

DNA metiltransferaz 1 (DNMT1), DNA metilasyonunu teşvik etmede kritik bir rol oynamakta olup, bu durumun kanser ilaç direncinin sürdürülmesi ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Yapılan araştırmalar, DNMT1'in tükenmesinin kanser hücrelerinde ilaç direncinin üstesinden gelmeye yardımcı olabileceğini göstermiştir. Ayrıca, çalışmalar, DNMT1 ve DNMT3B eksikliği olan kanser hücrelerinde ilaç kaynaklı demetilasyonun belirli DNA metilasyon desenleri ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. DNMT1 ile ilaç direnci arasındaki ilişki, hepatoselüler karsinom ve küçük hücreli akciğer kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde araştırılmıştır (Yan ve ark., 2016).

PD-L1/DNMT1 eksenine yönelik araştırmalar, belirli kanser tedavilerine karşı kazanılmış direncin anlaşılmasında önemli bir rol oynamakta olup, ilaç direncinin altında yatan moleküler mekanizmaların anlaşılmasının önemini vurgulamaktadır. Ayrıca, miRNA'ların DNMT1 ifadesini düzenleyerek kanser hücrelerinde ilaç direncini etkileyebileceği gösterilmiştir. Bununla birlikte, DNMT1'in histon deasetilaz inhibitörlerine karşı dirençte rol oynadığı, epigenetik düzenlemenin ilaç direncindeki rolünü vurgulamaktadır (Min ve ark., 2017).

DNMT1, kanser tedavisinde potansiyel bir terapötik hedef olarak tanımlanmış olup, DNMT1 ifadesinin inhibe edilmesine odaklanan araştırmalar, tedavi sonuçlarını iyileştirme amacı taşımaktadır. DNMT1'in kanser tedavisindeki önemi, ilaç direnci ile olan ilişkisi ve kanser hücrelerinde DNMT1 aktivitesini tespit etmek için hassas analizlerin gerekliliği ile daha da vurgulanmaktadır (Zhao ve ark., 2017).

2.3.8. Epigenetik Terapiler ve DNMT1 Hedefleyen Yaklaşımlar

Epigenetik terapiler, kanser gelişimine ve ilaç direncine katkıda bulunan epigenetik sapmaları tersine çevirme amacı güden umut vadeden bir yaklaşım olarak ortaya çıkmıştır. Sharma ve arkadaşları (2009) tarafından belirtildiği üzere, bu terapiler kanser epigenomunun yeniden programlanmasını hedeflemekte olup hem tedavi hem de ilaç direncinin üstesinden gelme potansiyeli sunmaktadır. Furtado ve arkadaşları (2019) ise, epigenetik terapinin, ilaca dirençli kanser hücrelerini diğer tedavilere duyarlı hale getirme yeteneğine sahip olduğunu ve böylece genel tedavi etkinliğini potansiyel olarak artırabileceğini öne sürmektedir.

Özellikle, DNA metiltransferaz olan DNMT1, kanser için epigenetik terapide önemli bir hedef olarak belirlenmiştir. DNMT1, bölünen hücrelerde bol miktarda bulunur ve kanser hücrelerinde metilasyon inhibisyonu için önemli bir terapötik hedef haline gelmiştir (Zhu ve ark., 2020). DNMT1 ifadesinin inhibisyonu, özellikle meme kanserinde kanser terapisinin etkinliğini artırma stratejisi olarak araştırılmaktadır. Ayrıca, DNMT1'i hedef alan yaklaşımlar, ilaç direncini tersine çevirme ve kanser hücrelerini tedaviye duyarlı hale getirme ile ilişkilendirilmiştir (Juergens ve ark., 2011).

Refakter ileri evre küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarında DNMT inhibitörleri ve histon deasetilaz inhibitörlerini içeren kombine epigenetik terapi, tedavi direncini aşmada etkili olduğunu göstermiştir. Ek olarak, epigenetik düzenleyicilerin, örneğin DNMT1'in, kanser kimyoprevansiyonu stratejisi olarak diyet fitokimyasalları tarafından modüle edilmesi araştırılmıştır. Tümörögenizde epigenetik modifikasyonların geri dönüşümlü doğası, onları kanser terapisi için umut vadeden hedefler yapmaktadır. Epigenetik düzenlemeyi hedefleyen NRF2/KEAP1 sinyalleme gibi yaklaşımlar, kanser tedavisi için potansiyel bir strateji olarak önerilmektedir (Zhang ve ark., 2022). DNA metiltransferaz inhibitörleri kullanımını içeren epigenetik terapiler, çeşitli kanser

tiplerini, özellikle üçlü negatif meme kanserini tedavi etme konusunda umut vaat etmektedir (Yu ve ark., 2019).



3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

K562S (Imatinib'e duyarlı) ve K562R (Imatinib'e dirençli) süspansiyon hücre hatları deneysel amaçlar için kültürlenmiş ve pasajlanmıştır. Daha sonra, canlı olmayan hücreler Trypan mavisi boyası ile boyanarak mavi-mor boyama yoluyla tanımlanmaları sağlanmış ve Thoma odası kullanılarak canlı hücre sayımı kolaylaştırılmıştır. Bunu takiben, hem Imatinib'e duyarlı K562S hem de dirençli K562R hücrelerinde DNMT1 geninin ekspresyonunu değerlendirmek için örneklerden RNA izolasyonu yapılmıştır. DNMT1 gen ifadesinin müteakip kantitatif analizi qRT-PCR tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İstatistiksel analizler SPSS 11.5 yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Hücre kültürü bakımı için %10 fetal sığır serumu (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin ile desteklenmiş RPMI-1640 ortamı kullanılmıştır. Hücre kültürlerinin -80°C'de saklanan kriyoviyallerden alınması, hücre çoğalmasını teşvik etmek için bir su banyosunda hızlı çözülme içeriyordu. Çözdürülen hücrelerden elde edilen hücre süspansiyonu, %5 CO₂ ortamında 37°C'de inkübasyon için uygun kültür kaplarına ekilmiştir.

Flask içindeki besiyerini aspirasyon yoluyla boşaltmak için 25 cm²'lik şişe için 2 ml ve 75 cm²'lik şişe için 4 ml miktarlarında 1X PBS kullanılmış ve ardından hücre yüzeyleri hassas bir şekilde yıkanmıştır. Ortamdan PBS çıkarıldıktan sonra 25 cm²'lik şişeye 5 ml yeni ortam eklenmiştir. Buna karşılık, 75 cm²'lik şişeye 10 ml taze besiyeri eklenerek pasajlama işlemi başlatıldı.

3.1. Besiyeri Değiştirme

Flask içindeki besiyerini aspirasyon yoluyla boşaltmak için 25 cm²'lik şişe için 2 ml ve 75 cm²'lik şişe için 4 ml miktarlarında 1X PBS kullanılmış ve ardından hücre yüzeyleri hassas bir şekilde yıkanmıştır. Ortamdan PBS çıkarıldıktan sonra 25 cm²'lik şişeye 5 ml yeni ortam eklenmiştir. Buna karşılık, 75 cm²'lik şişeye 10 ml taze besiyeri eklenerek pasajlama işlemi başlatıldı.

3.2. Hücre Kültürü ve İmatinib Mesilat Uygulaması

3.2.1. Hücre Kültürünün Pasajlanması

Deneyisel kullanım için tasarlanan K562S (Imatinib-duyarlı) ve K562R (Imatinib-dirençli) süspansiyon hücre hatlarının pasajlanması aşağıda ayrıntılı olarak açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

Süspansiyon durumlarıyla karakterize edilen K562S hücreleri ilk olarak bir T-25 şişesinden 10 ml RPMI 1640/Lonza ortamıyla birlikte 15 ml'lik bir şişeye aktarılmıştır. Ardından, hücre süspansiyonu 1000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilmiş ve ardından süpernatant uzaklaştırılmıştır. Bunu takiben, hücre peletine yaklaşık 10 ml taze besiyeri eklenmiş ve hücreler %5 CO₂ ile zenginleştirilmiş bir ortamda 37°C'de kültüre edilmiştir.

Buna karşılık, 5 µM Imatinib'e karşı dirençleriyle bilinen K562R süspansiyon hücrelerine benzer bir pasajlama prosedürü uygulanmıştır. Bu hücreler bir T-25 şişesinden 10 ml ortamla birlikte 15 ml'lik bir şişeye aktarılmış ve ardından 1000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant atılmış ve hücre peletine 10 ml besiyeri eklenmiştir. K562R hücreleri bir T-25 şişesine yeniden ekilmiş ve kültürlemeye devam etmek için 5 µM Imatinib ile desteklenmiş bir ortamda muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Hücre Soylarının Stoklanması

Hücreler konfluense ulaştığında, şişedeki büyüme ortamı aspirasyon yoluyla uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, hücreler 1X PBS ile hassas bir şekilde durulanmış ve ardından PBS aspire edilmiştir. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması, serbest bırakılmalarını sağlamak için kolaylaştırılmıştır. 0,05'lik bir Trypsin-EDTA çözeltisi eklenmiş ve hücreler daha sonra 5 dakika boyunca %5 CO₂ ortamında 37°C'de kültürlenmiştir. Trypsin aktivitesini durdurmak için hücreler on kat fazla tripsin inhibitörü ile muamele edilmiştir. Bundan sonra taze ortam takviyesi yapılmıştır. Bu ortam daha sonra şişe içindeki hücre süspansiyonuna eklenmiştir. Hücre süspansiyonu 15 ml'lik bir Falcon tüpüne aktarıldı ve 21°C'de 5 dakika boyunca 800 rpm'de santrifüj edildi. Ardından süpernatant aspire edilmiş ve loş ışıklı bir ortamda pelet üzerindeki her bir kriyoviyale 1,5 ml dondurma ortamı (5 ml DMSO, 5 ml FBS ve 40 ml DMEM'den oluşan) eklenmiştir. Son olarak, hücre süspansiyonu kriyoviyallere dağıtılmış ve hücrelerin uzun

sürelili saklanması ve canlılığını sağlamak üzere kriyoprezervasyon için derhal -80°C'ye aktarılmıştır.

3.2.3. Hemositometre ile Hücrelerin Sayımı

Hücre sayımı amacıyla, tripsinizasyonu takiben elde edilen 10 µl hücre örneği eşit hacimde %0,5 tripan mavisi solüsyonu ile birleştirilmiştir. Elde edilen karışım, bu kombinasyonun 10 µl'si bir thoma lamına aktarılmadan önce iyice karıştırılmıştır. Ardından, mikroskop kullanılarak lam üzerindeki beş alanda hücreler sayılmıştır. Belirlenen hücre sayısı daha sonra işlemde uygulanan seyreltme faktörü dikkate alınarak 1 ml besiyerindeki toplam hücre sayısını hesaplamak için kullanılmıştır.

1 büyük karenin hacmi;

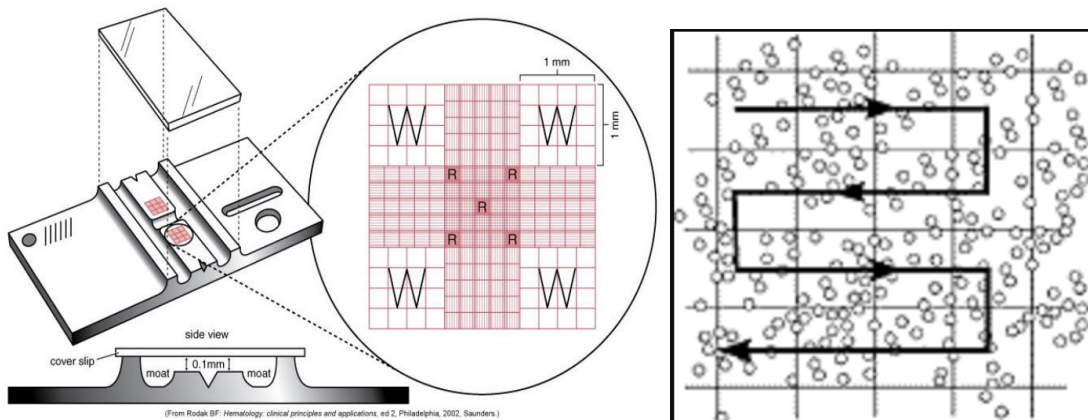
$$0,1 \text{ cm} \times 0,1 \text{ cm} = 0,01 \text{ cm}^2$$

Bölmenin derinliği; 0,1mm= 0,01 cm

$$0,01 \text{ cm}^2 \times 0,01 \text{ cm} = 0,0001 \text{ cm}^3 = 0,0001 \text{ ml} = 0,1 \text{ µl}$$

$$\text{Konsantrasyon (hücre/ml)} = \frac{\text{Hücre Sayısı} \times 10.000}{\text{Sayılan Alan} \times \text{Dilüsyon}}$$

Sulandırma katsayısı (dilüsyon); 1:10 dilüsyon için; 0,1



Şekil 3.1: Thoma Lamı Düzeni ve Hücre Sayısı

3.2.4. Total Rna İzolasyonu

3.2.4.1. Adım Adım RNA İzolasyon Protokolü

1. 1 mL Tampon RLT'ye 10 µL β-Merkaptoetanol eklenmiş, ardından pipetleme yoluyla iyice karıştırılmış ve homojenizasyon sağlanmıştır.
2. 500 mL Tampon RLT, dirençli ve hassas hücrelerin hücre peletlerine ayrı ayrı eklenmiş, ardından 10 saniye boyunca pipetlenmiş ve SciLogex cihazı kullanılarak yaklaşık 30 saniye boyunca vortekslenmiştir.
3. Hazırlanan karışımlar daha sonra 2 mL Eppendorf tüplerine yerleştirilen GDNA eliminatör kolonlarından geçirilerek RNA izolasyonlarındaki en büyük endişe olan genomik DNA varlığı giderilmiş ve kolon içinde tutulması sağlanmıştır.
4. Falcon'lardaki K-562S ve K-562R hücre süspansiyonları yaklaşık 500-600 mL'ye tamamlanmış ve spin kolonlara aktarılmıştır.
5. Bir Hitachi cihazında 10.000 rpm'de 30 saniye santrifüj işlemini takiben, elde edilen tüplerin alt kolonlarının çıkarılmasına izin verilmiş ve bunlar daha sonra 1,5 mL Eppendorf tüplerine aktarılmıştır. Ardından %70 etanol eklenmiş ve yaklaşık 10 kez pipetlenerek nazikçe karıştırılmıştır.
6. Pembe kolonlar (RNeasy spin kolonları) açılmış ve her birine bir önceki numuneden yaklaşık 700 µL aktarılmıştır. Bu kolonlar, sonraki adımlarda kirleticileri yıkarken ilgilenilen RNA'yı özel olarak tutmak için tasarlanmıştır.
7. 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edildikten sonra alt tüpler atılmış ve kolonlar yeni 2 mL Eppendorf tüplerine yerleştirilmiştir.
8. Proteinleri ve tuzları yıkamak için tüplere 700 µL RW1 eklenmiş ve ardından 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir.
9. Santrifüj edilen kolonlar daha sonra 2 mL Eppendorf tüplerine aktarılmıştır.
10. İkinci yıkama solüsyonu olarak RPE kullanılmış, her tüpe 500 µL eklenmiş ve ardından ilk yıkama için 10.000 rpm'de 15 saniye santrifüj edilmiştir.
11. Sonraki yıkamada, aynı şekilde 500 µL RPE eklenmiş ve ardından 10.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilmiştir.
12. Kolonlar tekrar 1,5 mL Eppendorf tüplerine yerleştirilerek 30 µL RNaz içermeyen su filtreye temas ettirilmeden dikkatlice uygulandı. Örnekler 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmeden önce 5 dakika dinlendirilmiştir.

13. RNA izolasyon işlemini tamamlamak için örneklerden 1,5 µL alınıp Nanodrop ölçümleri için Thermo Scientific Nanodrop One kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2.5. cDNA Sentezi

K-562R ve K-562S hücrelerinde cDNA sentezi için, titiz bir deneysel prosedürün ardından Qiagen QuantiTect Ters Transkripsiyon Kiti kullanılmıştır. Başlangıçta, her hücre tipi için gerekli RNA hacmi belirlenmiş ve soğutulmuş koşullar altında işlenmiştir. Daha sonra, 8 µl K-562R RNA etiketli tüplere bölünürken, 4,9 µl K-562S RNA belirlenmiş başka bir tüpe dağıtıldı. Tampon GE (2 µl) daha sonra her bir RNA örneğine eklenmiş ve ardından nazikçe pipetlenmiştir. Örnekler daha sonra bir PCR makinesinde (Biorad) 42°C'de 5 dakikalık bir inkübasyona tabi tutulmuştur. Inkübasyon sonrasında tüplere 4 µl 5x Tampon BC3 eklenmiştir. Toplam 10 µl hacim elde etmek için K-562S örneğine 3 µl RNeas içermeyen su eklenmiştir. Buna karşılık, K-562R'nin başlangıç hacmi zaten 10 µl olduğundan, ilave su eklenmedi. Ardından, her iki tüpe de 2 µl RE Reverse Transkriptaz karışım enzimi eklenmiştir. Bunu takiben, her tüpe 1 µl Kontrol P2 eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Tüpler daha sonra 42°C'de 15 dakikalık bir inkübasyona tabi tutulmuş, ardından 20 µl'lik bir nihai hacim elde etmek için PCR düzeneği içinde 95°C'de 5 dakikalık bir inkübasyon gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.1: DNA eliminasyon mixi

İçerik	K-562R Miktar	K-562S İçin Miktar
RNA Örnekleri	8 µl	4.9 µl
Buffer GE	2 µl	2 µl
RNA Free Water	-	3 µl
Total Hacim	10 µl	10 µl

Tablo 3.2. cDNA sentez reaksiyonu bileşenleri

İçerik	Miktar
RNA Free Water	3 µl
5x Buffer BC3	4 µl
RE Reverse Transkriptaz	2 µl
Control P2	1 µl
Total Hacim	10 µl

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

Araştırma çalışmamızda, gen ifadesi kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) tekniği ile titizlikle değerlendirilecektir. Başlangıçta, hücresel kaynaklardan çıkarılan 1000 nanogram RNA örneği ile bir cDNA sentez kiti kullanılarak tamamlayıcı DNA (cDNA) sentezlenecektir. Ardından, K562R ve K562S genleri için uyarlanmış primerlerin formüle edilmesini takiben Gerçek Zamanlı PCR yoluyla gen ekspresyon profili çıkarılacaktır. Ek olarak, B-aktin geni, farklı dokular arasında tutarlılığı sağlamak ve hücresel canlılığı desteklemek için temizlik/referans geni olarak işlev görecektir.

qRT-PCR analizi sırasında gen ekspresyon seviyelerini tespit etmek için primerler akıllıca hazırlanmıştır. Kullanılan spesifik primer dizileri aşağıda verilen tabloda özetlenmiştir.

Primer Dizilimleri

B Aktin Forward	TGTTTGAGACCTTCAACACCC	529bp
B Aktin Reverse	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	
DNMT1 Forward	CCATCAGGCATTCTACCA	132bp
DNMT1 Reverse	CGTTCTCCTTGTCTTCTCT	

qRT-PCR Programı:

Preinkübasyon	95°C 600 sn
Amplifikasyon	95°C 30 sn
	60°C 30 sn
	72°C 30 sn
Melting	95°C 10 sn
	65°C 60sn
	97°C continuous

3.2. DNA Metiltransferaz 1 Enziminin İfade Düzeyinin Belirlenmesi

4. BULGULAR

Çalışmamızda, DNA Metiltransferaz 1 enziminin ekspresyon seviyeleri imatinib mesilata dirençli K562 hücre hatları ile duyarlı K562 hücre hatları arasında karşılaştırılmıştır. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) analizi her örnek için en az üç Cp değeri üretmiş ve analiz için bu değerlerin ortalaması kullanılmıştır.

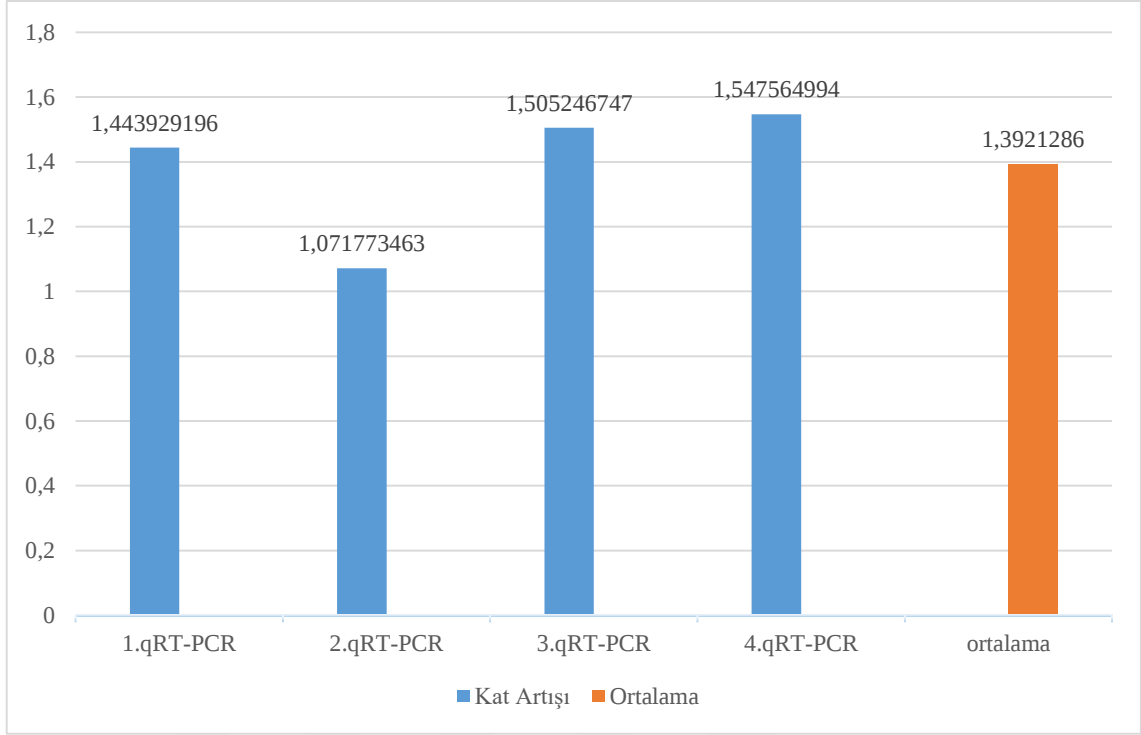
Gen ifade oranlarının hesaplanmasında;

$$R = \frac{(E_{Hedef})^{\Delta CP_{Hedef} (Kontrol- Örnek)}}{(E_{Ref})^{\Delta CP_{Ref} (Kontrol- Örnek)}}$$

formülü kullanılmıştır. Bu formül ile hesaplanan gen ifadesi oranları, log2 tabanına çevrilmiştir.

Tablo 4.1: E (amplifikasyon etkinliği değeri)

K562R vs K562S DNTM1	Kat Artışı
1.qRT-PCR	1,443929196
2.qRT-PCR	1,071773463
3.qRT-PCR	1,505246747
4.qRT-PCR	1,547564994



Şekil 4.1: K562R vs K562S DNTM1

Çalışmamız kapsamında gerçekleştirilen kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) analizleri üç kez tekrarlanmıştır. Ortalama 1,3921286 kat değişikliği, imatinib mesilata dirençli K562R hücre hattında, imatinib mesilata duyarlı K562S hücre hattına kıyasla DNMT1 geninin ifade düzeyinde önemli bir artış olduğunu göstermektedir.

5. TARTIŞMA

DNA metiltransferazların (DNMT'ler) etkisiyle DNA metilasyonu, çeşitli hücrel süreçlerde yer alan önemli bir düzenleyici mekanizmadır. Özellikle DNMT1, hücre bölünmesi sırasında DNA metilasyon modellerinin korunmasından sorumludur ve gen ifadesinin düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynadığı bulunmuştur. Son yıllarda, DNMT1 ifadesinin önemi giderek artan bir ilgi konusu olmuş ve çeşitli araştırma alanlarında kapsamlı bir şekilde incelenmiştir.

Çalışmamızın temel amacı, imatinib mesilata dirençli K562 hücre hattı ile duyarlı K562 hücre hattında DNA Metiltransferaz 1 enziminin ekspresyon düzeyini karşılaştırmaktır. Sonuçlarımız, imatinib mesilata dirençli K562 hücre hattında DNMT1 geninin ekspresyonunun duyarlı hücre hattına kıyasla önemli ölçüde arttığını göstermiştir.

Bu çalışma sırasında, sonuçların doğruluğunu ve kesinliğini sağlamak için qRT-PCR analizi üç kopya halinde gerçekleştirilmiştir. Her numune için en az üç Cp değerinin ortalaması gen ifadesindeki kat değişikliğini hesaplamak için kullanılmıştır. Bu yaklaşım, deneysel hataları en aza indirmek ve güvenilir sonuçlar elde etmek için gen ekspresyonu çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Gen ifadesinde elde edilen kat değişikliğı olup, imatinib mesilata dirençli K562 hücre hattında DNMT1 geninin ifadesinde 1,4 kat artış olduğunu göstermektedir. Bu bulgu, K562 hücre hattında imatinib mesilata karşı direnç gelişiminde DNMT1 enziminin olası bir rolüne işaret etmektedir.

DNMT1 gen ifadesinde gözlenen artış çeşitli faktörlere bağlanabilir. DNA metilasyonunun gen ifadesinin düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynadığı iyi bilinmektedir. DNA metilasyon modellerindeki değişiklikler kanser hücrelerinde ilaç direnci gelişimi ile ilişkilendirilmiştir. Dirençli K562 hücre hattında DNMT1 gen ifadesinin yukarı regülasyonunun imatinib mesilata karşı direnç gelişimine katkıda bulunması mümkündür.

Shin ve arkadaşları (2016) tarafından yakın zamanda yapılan bir çalışmada, epigenetik metilasyonla ilişkili bir protein olan DNMT1'in ekspresyonu çeşitli meme kanseri alt tiplerinde ve stromal tiplerde araştırılmıştır. Bulguları, bazal benzeri tümörlere kıyasla luminal tip meme kanseri tümörlerinde DNMT1 ekspresyonunda önemli bir artış olduğunu ortaya koymuştur. Ayrıca, fibroblast bakımından zengin stromaya sahip tümörlerde, adiposit bakımından zengin stromaya sahip olanlara kıyasla daha yüksek

DNMT1 ekspresyonu gözlemlemişlerdir. Bu çalışma DNMT1 ekspresyonu, meme kanseri alt tipleri ve stromal histoloji arasındaki potansiyel etkileşime ışık tutmaktadır.

Buna paralel olarak, imatinib mesilata dirençli K562 hücre hatlarına odaklanan çalışmamız da DNMT1 ekspresyonuna ilişkin ilgi çekici sonuçlar ortaya koymuştur. Araştırmamız, duyarlı K562S hücre hattına kıyasla imatinib mesilata dirençli K562R hücre hattında DNMT1 ekspresyon seviyelerinde kayda değer bir artış olduğunu göstermiştir. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) analizi, dirençli hücre hattında DNMT1'in net bir şekilde yukarı regülasyonuna işaret eden önemli bir kat değişikliğinin altını çizmiştir.

Bu iki çalışma arasında bir tartışma yapıldığında, DNMT1 ifadesinin farklı bağlamlarda değişkenlik gösterdiği ortaya çıkmaktadır. DNMT1 ekspresyonunun meme kanseri alt tipleri ve tedavi direncindeki etkileri, farklı biyolojik ortamlardaki çeşitli rollerine işaret etmektedir. İmatinib mesilat dirençli hücrelerdeki yüksek DNMT1 seviyeleri potansiyel olarak ilaç direncinin altında yatan bir mekanizmaya işaret etmekte ve epigenetik faktörler ile tedavi sonuçları arasındaki karmaşık etkileşimi göstermektedir.

DNMT1'in diferansiyel ekspresyonunun anlaşılması, sadece belirli kanser alt tiplerine göre uyarlanmış bireyselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının önemini vurgulamakla kalmamakta, aynı zamanda tedavi direnciyle mücadelede DNMT1'in potansiyel terapötik hedeflemesi hakkında soruları da gündeme getirmektedir. Bu bulgular toplu olarak, DNMT1'in kanser ilerlemesini ve ilaç yanıtını etkilediği kesin mekanizmaları aydınlatmak için daha fazla araştırma yapılması gerektiğini vurgulamakta ve hasta sonuçlarını iyileştirmeyi amaçlayan hedefe yönelik tedavileri keşfetmek için yeni yollar sunmaktadır.

Moleküler biyoloji ve tıbbi araştırmalar alanında, DNA Metiltransferaz 1'in (DNMT1) rolü çeşitli bağlamlarda giderek daha fazla incelenmekte ve farklı biyolojik süreçler ve hastalıklardaki önemine ışık tutmaktadır.

Noguchi ve arkadaşları (2015), yetişkin hipokampusündeki nöral kök/öncü hücrelerde (NPC'ler) DNMT1 ifadesine odaklanarak nörojenezi araştırmıştır. Çalışma, DNMT1'in yeni doğan nöronların hayatta kalması ve farklılaşmasındaki önemini altını çizerek, sinir sistemi bütünlüğünün ve işlevinin korunmasındaki kritik rolünü vurgulamıştır.

Zhang ve arkadaşları (2016), DNMT1 ekspresyonunu meme kanseri ile ilişkili olarak araştırmış, özellikle meme kanseri hastalarında östrojen reseptörü alfa (ER α)

ekspresyonu ve metilasyon durumu ile korelasyonunu incelemiştir. Bulguları, yüksek DNMT1 seviyelerinin ER α geninin artan metilasyonu ile bağlantılı olduğunu, bunun da ER α ekspresyonunun azalmasına yol açarak meme kanseri gelişimi ve ilerlemesine potansiyel olarak katkıda bulunduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda, imatinib mesilata dirençli (K562R) ve duyarlı (K562S) hücre hatlarında DNMT1'in ekspresyon seviyelerine odaklanılmıştır. Araştırma, qRT-PCR analizi kullanarak bu iki hücre hattındaki DNMT1 ekspresyonunu karşılaştırmıştır. Sonuçlar, hassas hücre hattına kıyasla imatinib mesilat dirençli hücre hattında DNMT1 gen ifadesinde 1,3921286 kat artış olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmalar toplu olarak değerlendirildiğinde, DNMT1'in farklı biyolojik bağlamlardaki rolüne ilişkin bir model ortaya çıkmaktadır. Noguchi ve arkadaşları ve X (2024) tarafından elde edilen bulguların her ikisi de DNMT1'in yukarı regülasyonunun spesifik hücresel koşullarla (sırasıyla nörogenez ve ilaç direnci) ilişkili olduğunu vurgulamaktadır. Öte yandan, Zhang ve arkadaşlarının çalışması, DNMT1 upregülasyonunun meme kanseri bağlamında gen metilasyon modellerini nasıl etkileyebileceğini ve hastalığın ilerlemesi için çok önemli olan gen ekspresyon seviyelerini nasıl etkileyebileceğini göstermektedir. Bu karşılaştırmalı analiz, DNMT1'in çeşitli hücresel süreçler ve patolojik koşullardaki çok yönlü rolünün altını çizmektedir.

Bir tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib, BCR-ABL füzyon proteinini hedef alarak Kronik Miyeloid Lösemi (KML) tedavisinde devrim yaratmıştır. Etkinliğine rağmen, imatinibe karşı direnç gelişimi önemli bir klinik zorluk teşkil etmektedir. Hem genetik hem de genetik olmayan çeşitli mekanizmalar bu dirence katkıda bulunmakta ve bu sorunun üstesinden gelmenin karmaşıklığını vurgulamaktadır.

Yaghmaie ve Yeung (2019), BCR-ABL mutasyonlarının imatinibin bağlanmasını nasıl engellediğini ve ilacı etkisiz hale getirdiğini vurgulamıştır. 100'den fazla mutasyonun ortaya çıkması, kanser hücrelerinin uyarlanabilirliğinin altını çizmektedir. Yeni TKI'ler belirli mutasyonları ele alırken, yeni mutasyonlar yoluyla direncin sürekli evrimi bir endişe kaynağı olmaya devam etmektedir.

Yaghmaie ve Yeung (2019) tarafından tartışıldığı gibi genetik olmayan faktörler, imatinib direncinde önemli bir rol oynamaktadır. Kinom adaptasyonu ve telafi edici yollar, kanser hücrelerinin BCR-ABL inhibisyonunu atlatma yeteneğini göstermektedir. BCR-ABL'deki aşırı ekspresyon gibi değişiklikler dirence daha fazla katkıda bulunur.

Lovera ve arkadaşları (2015) imatinib direncini anlamak için yeni bir yol olarak kinaz konformasyonel dinamiklerine ışık tutmuştur. BCR-ABL'nin yapısal durumlarındaki değişiklikler ilacın bağlanmasını ve etkinliğini etkilemektedir. Bu dinamik konformasyonların hedeflenmesi, imatinib direnciyle mücadelede umut vaat edebilir.

İmatinibe dirençli ve duyarlı K562 hücre hatlarında DNMT1 gen ifadesini karşılaştıran çalışmamız, direnç mekanizmalarına yeni bir bakış açısı getirmektedir. Dirençli hücrelerde DNMT1'in yukarı regülasyonu, imatinib direncine potansiyel bir epigenetik bileşen önermekte ve önceki çalışmalarla açıklanan mevcut genetik ve genetik olmayan mekanizmalara bir karmaşıklık katmanı eklemektedir.

Kronik miyeloid lösemide (KML) ABL kinaz inhibisyonuna direnç konusu, hastalar için etkili sonuçlar sağlamak için sürekli dikkat gerektiren lösemi tedavisinin kritik bir yönüdür. Patel ve arkadaşları (2017), ABL kinaz inhibitörlerine direncin altında yatan mekanizmaları araştırarak, ilgili karmaşık yollara ışık tutmuş ve bu zorluğun üstesinden gelmek için yeni nesil inhibitörlerin geliştirilmesini tartışmıştır. Çalışmamız, KML'de ilaç direncine katkıda bulunan faktörleri incelemekte ve özellikle imatinib mesilat dirençli K562 hücre hattında DNA Metiltransferaz 1'in (DNMT1) rolüne odaklanmaktadır. İki çalışma arasındaki bu karşılaştırma, ABL kinaz inhibitörü direncine ilişkin araştırmaların mevcut durumu ve KML tedavisindeki bu zorluğu yönetmek için gelecekteki potansiyel yönler hakkında değerli bilgiler sunmaktadır.

Patel ve arkadaşları (2017), KML'de ABL kinaz inhibisyonuna dirence katkıda bulunan çeşitli mekanizmaların kapsamlı bir incelemesini sunmaktadır. BCR-ABL1 kinaz alanındaki mutasyonların ve SRC ve PI3K/AKT/mTOR yolları gibi alternatif sinyal yollarının aktivasyonunun direnci artırmadaki rolünü tartışmaktadırlar. Çalışmamız ayrıca, KML hastalarında direncin üstesinden gelmede umut verici sonuçlar gösteren dasatinib ve ponatinib gibi yeni nesil ABL kinaz inhibitörlerinin gelişimini de vurgulamaktadır.

Çalışmamızda özellikle DNMT1'in ABL kinaz inhibitör direncindeki rolüne odaklanılmıştır. DNMT1, kanser ilerlemesi ve ilaç direnci ile bağlantılı olan DNA metilasyonunda yer alan bir enzimdir. Çalışma, imatinib mesilat dirençli K562 hücre hattı ile hassas K562 hücre hattındaki DNMT1 ekspresyon seviyelerini karşılaştırmaktadır. Sonuçlar, dirençli hücre hattında DNMT1 ekspresyonunda bir artış olduğunu göstermekte

ve KML'de ABL kinaz inhibitörü direncinde DNA metilasyonunun potansiyel bir rolü olduğunu düşündürmektedir.

İki çalışma arasındaki dikkate değer bir benzerlik, daha etkili tedavi stratejileri geliştirmek için direncin altında yatan mekanizmaları belirlemeye odaklanılmasıdır. Patel ve arkadaşları (2017) çeşitli mekanizmalara daha geniş bir genel bakış sağlarken, bizim çalışmamız dirençte DNA metilasyonunun spesifik rolüne odaklanmaktadır. Bir diğer benzerlik ise gen ifade düzeylerini analiz etmek ve nicel veriler sağlamak için qRT-PCR gibi gelişmiş tekniklerin kullanılmasıdır.

Bununla birlikte, iki çalışma arasındaki önemli bir fark, farklı direnç mekanizmalarına odaklanmasıdır. Patel ve arkadaşları (2017) mutasyonlar ve alternatif sinyal yolları dahil olmak üzere bir dizi faktörü tartışırken, bizim çalışmamız DNA metilasyonunun rolünü örneklemektedir. Bu durum, KML'deki direncin karmaşıklığını ve ilgili çeşitli mekanizmaları tam olarak anlamak için daha fazla araştırma yapılması gerektiğini vurgulamaktadır.

Bu çalışmaların bulguları, KML hastalarında ABL kinaz inhibitörü direncinin yönetimi için önemli çıkarımlara sahiptir. Patel ve arkadaşları (2017) dirençli mutasyonları ve alternatif yolları hedeflemek için yeni nesil ABL kinaz inhibitörlerinin geliştirilmesine devam edilmesini önerirken, bizim çalışmamız direncin üstesinden gelmede DNMT1 inhibitörleri gibi epigenetik tedavilerin potansiyel kullanımını vurgulamaktadır. Ayrıca, her iki çalışma da bireysel hasta direnç mekanizmalarına dayalı kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarının önemini vurgulamaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, imatinib mesilata dirençli (K562R) ve duyarlı (K562S) K562 hücre hatlarında DNA Metiltransferaz 1 (DNMT1) enziminin ekspresyon düzeyini araştırdık. qRT-PCR analizimiz, DNMT1 gen ifadesinin dirençli hücre hattında hassas hücre hattına kıyasla 1.3921286 kat arttığını ortaya koymuştur. Bu, DNMT1'in K562 hücrelerinde imatinib mesilata karşı direnç gelişimine katkıda bulunmada potansiyel bir rolü olduğunu göstermektedir.

DNMT1'in gen ifadesi ve genom stabilitesinin korunması dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlerde önemli bir rol oynayan hücresel DNA metilasyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı daha önce bildirilmiştir. Sonuçlarımız, DNMT1'in artan ekspresyonunun dirençli K562 hücrelerinde değişmiş DNA metilasyon modellerine yol açabileceğini ve potansiyel olarak imatinib direncinin gelişimini etkileyebileceğini düşündürmektedir.

Ayrıca, deneylerin üç kopya halinde gerçekleştirilmesinin de gösterdiği gibi bulgularımızın tutarlılığı, sonuçlarımızın geçerliliğini güçlendirmektedir. Bununla birlikte, K562 hücrelerinde imatinib direncinde DNMT1'in rolünün altında yatan mekanizmaların tam olarak aydınlatılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, çalışmamız K562 hücrelerinde imatinib direncinin gelişiminde DNMT1'in potansiyel rolüne dair kanıtlar sunmaktadır. Bu bulgu, imatinib direncinin üstesinden gelmek ve bu ilacın kronik miyeloid lösemi tedavisindeki etkinliğini artırmak için yeni stratejilerin geliştirilmesinde etkili olabilir. Bu alanda yapılacak daha ileri araştırmalar, imatinibe dirençli tümörlerin tedavisi için yeni terapötik hedeflerin ve yaklaşımların belirlenmesine yol açabilir.

İmatinib direncinde DNMT1'in etki mekanizmasını araştırın: DNMT1'in K562 hücrelerinde imatinib direncinin gelişimine nasıl katkıda bulunduğunu tam olarak anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bu, DNA metilasyon modellerini değiştirmedeki rolünün ve diğer hücresel süreçler üzerindeki etkisinin araştırılmasını içerebilir.

İmatinibe dirençli tümörler için potansiyel bir tedavi olarak DNMT1 inhibitörlerinin test edilmesi: Çalışmamızın sonuçlarına göre, DNMT1'in spesifik inhibitörlerle hedeflenmesi, K562 hücrelerinde imatinib direncini potansiyel olarak

tersine çevirebilir. Bu alanda yapılacak daha fazla araştırma, imatinibe dirençli tümörlerin tedavisi için yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesine yol açabilir.

DNMT1 ile imatinib direncine dahil olan diğer genler arasındaki ilişkiyi araştırın: Çalışmamız DNMT1'in rolüne odaklanmıştır, ancak diğer genler de imatinib direncinde rol oynayabilir. Gelecekteki çalışmalar DNMT1 ile bilinen diğer direnç genleri arasındaki ilişkiyi araştırabilir ve potansiyel olarak tedavi için yeni hedefler belirleyebilir.

İmatinib direncini hedefleyen kombinasyon tedavilerini keşfedin: Hem imatinib direncine dahil olan moleküler yolları hem de DNMT1'i hedef alan kombinasyon tedavilerinin geliştirilmesi, direncin üstesinden gelmek ve tedavi sonuçlarını iyileştirmek için umut verici bir yaklaşım olabilir.

İmatinib direncinde DNMT1'in rolünü doğrulamak için klinik çalışmalar yürütmek: Çalışmamız hücre hatları üzerinde yürütülmüştür ve insanlarda imatinib direncinde DNMT1'in potansiyel rolünü doğrulamak için klinik çalışmalarda daha fazla doğrulama yapılması gerekecektir. Bu, imatinib dirençli tümörlerin tedavisi için DNMT1'in hedeflenmesinin klinik etkilerinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

KAYNAKÇA

Adnan-Awad, S., Kankainen, M. ve Mustjoki, S. (2021). Mutational landscape of chronic myeloid leukemia: more than a single oncogene leukemia. *Leukemia & lymphoma*, 62(9), 2064-2078. doi: 10.1080/10428194.2021.1894652

Ahagh, M. H., Dehghan, G., Mahdavi, M., Feizi, M. A. H., Teimuri-Mofrad, R., Payami, E., ... ve Rashtbari, S. (2021). DNA binding ability and cytotoxicity, cell cycle arrest and apoptosis-inducing properties of a benzochromene derivative against K562 human leukemia cells, against K562 human leukemia cells. *Nucleos. Nucleot. Nucl*, 40, 732-753. doi: 10.1080/15257770.2021.1937644

Agarwal, S., Amin, K., Jagadeesh, S., Baishay, G., Rao, P., Barua, N., ... ve Banerjee, P. (2013). Mahanine restores rassfla expression by down-regulating dnmt1 and dnmt3b in prostate cancer cells. *Molecular Cancer*, 12(1). doi: 10.1186/1476-4598-12-99.

Altundağ, E. M., Yılmaz, A. M., Sert, B., Erkmen, T., Koçtürk, S., ve Yalçın, A. S. (2018). Effects of quercetin and curcumin combination on signal transduction pathways in chronic myeloid leukemia cells. *The 2nd International Cell Death Research Congress*. doi: 10.3390/proceedings2251524

Al-Rawashde, F. A., Taib, W. R. W., Ismail, I., Johan, M. F., Al-Wajeih, A. S., ve Al-Jamal, H. A. N. (2021). Thymoquinone induces downregulation of BCR-ABL/JAK/STAT pathway and apoptosis in K562 leukemia cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 22(12), 3959. doi: 10.31557%2FAPJCP.2021.22.12.3959

Almatroodi, S. A., Almatroudi, A., Khan, A. A., ve Rahmani, A. H. (2023). Potential therapeutic targets of formononetin, a type of methoxylated isoflavone, and its role in cancer therapy through the modulation of signal transduction pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(11), 9719. doi: 10.3390%2Fijms24119719

Alvarez-Nuñez, F., Bussaglia, E., Mauricio, D., Ybarra, J., Vilar, M., Lerma, E., ... ve Matias-Guiu, X. (2006). PTEN promoter methylation in sporadic thyroid carcinomas. *Thyroid*, 16(1), 17-23. doi: 10.1089/thy.2006.16.17

Antonescu, C., Besmer, P., Guo, T., Arkun, K., Hom, G., Koryotowski, B., ... ve DeMatteo, R. (2005). Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation. *Clinical Cancer Research*, 11(11), 4182-4190. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-04-2245.

Antonenko, S. V., Kravchuk, I. V., ve Telegeev, G. D. (2020). Interaction of Bcl-Abl oncoprotein with the Glg1 protein in K562 cells: its role in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia. *Cytology and Genetics*, 54(1), 48-54. doi: 10.3103/S0095452720010028

Aran, D., ve Hellman, A. (2013). DNA methylation of transcriptional enhancers and cancer predisposition. *Cell*, 154(1), 11-13. doi: 10.1016/j.cell.2013.06.018

Arsalan, H. M., Arif, A., Khan, M. K. A., Muccee, F., Toktobolotov, U. E., Wajid, U., ... ve Arshad, S. (2023). Tracking Molecular Response Of Tyrosine Kinase Inhibitors Therapy In Chronic Myeloid Leukemia Patients Using Rt-Pcr Profiling Of Bcr-Abl Transcripts. *Chelonian Research Foundation*, 18(2), 1174-1186. doi: 10.18011/2023.11(2).1174.1186

Aydin, C. ve Kalkan, R. (2020). Cancer treatment: an epigenetic view. *Global Medical Genetics*, 07(01), 003-007. doi: 10.1055/s-0040-1713610

Balk, B., Fabarius, A., ve Haferlach, C. (2021). Cytogenetics of chronic myeloid leukemia (KML). In *Chronic Myeloid Leukemia* (pp. 1-16). Cham: Springer International Publishing.

Bellodi, C., Lidonnici, M., Hamilton, A., Helgason, G., Soliera, A., Ronchetti, M., ... ve Calabretta, B. (2009). Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in philadelphia chromosome-positive cells, including primary cml stem cells. *Journal of Clinical Investigation*, 119(5), 1109-1123. doi: 10.1172/jci35660.

Bertozzi, T. M., Becker, J. L., Blake, G. E., Bansal, A., Nguyen, D. K., Fernandez-Twinn, D. S., ... ve Ferguson-Smith, A. C. (2021). Variably methylated retrotransposons are refractory to a range of environmental perturbations. *Nature Genetics*, 53(8), 1233-1242. doi: 10.1038/s41588-021-00898-9

Bestor, T.H., Edwards, J.R., ve Boulard, M. (2015). Notes on the role of dynamic DNA methylation in mammalian development. *Proc Natl Acad Sci*. 112, 6796–9. doi: 10.1073/pnas.141530111.

Bewry, N. N., Nair, R., Emmons, M. F., Boulware, D., Pinilla-Ibarz, J., ve Hazlehurst, L. A. (2008). Stat3 contributes to resistance toward bcr-abl inhibitors in a bone marrow microenvironment model of drug resistance. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(10), 3169-3175. doi: 10.1158/1535-7163.mct-08-0314

Bhavani, N., ve Reddy, M. S. (2023). Imatinib mesylate: Recent drug used in oncology. *GSC Biological and Pharmaceutical Sciences*, 22(2), 173-186. doi: 10.1007/978-3-319-91439-8_1

Bjornsson, H. T., Brown, L. J., Fallin, M. D., Rongione, M. A., Bibikova, M., Wickham, E., ... ve Feinberg, A. P. (2007). Epigenetic specificity of loss of imprinting of the IGF2 gene in Wilms tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(16), 1270-1273. doi: 10.1093/jnci/djm069

Blay, J. Y., Le Cesne, A., Ray-Coquard, I., Bui, B., Duffaud, F., Delbaldo, C., ... ve Perol, D. (2007). Prospective multicentric randomized phase III study of imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors comparing interruption versus continuation of treatment beyond 1 year: the French Sarcoma Group. *Journal of clinical oncology*, 25(9), 1107-1113. doi: 10.1200/jco.2006.09.0183

Bowler, E., Smith-Vidal, A., Lester, A., Bell, J., Wang, Z., Bell, C., ... ve Ewing, R. (2019). Deep proteomic analysis of dnmt1 mutant/hypomorphic colorectal cancer cells reveals dysregulation of epithelial–mesenchymal transition and subcellular re-localization of beta-catenin. *Epigenetics*, 15(1-2), 107-121. doi: 10.1080/15592294.2019.1656154.

Brazier, R., Launder, T., Druker, B., Olson, S., Magenis, R., Mauro, M., ... ve O'Dwyer, M. (2002). Hematopathologic and cytogenetic findings in imatinib mesylate–treated chronic myelogenous leukemia patients: 14 months' experience. *Blood*, 100(2), 435-441. doi: 10.1182/blood.v100.2.435.

Braun, T. P., Eide, C. A. ve Druker, B. J. (2020). Response and resistance to BCR-ABL1-targeted therapies. *Cancer cell*, 37(4), 530-542. doi: 10.1016/j.ccell.2020.03.006

Burger, H., Tol, H., Boersma, A., Brok, M., Wiemer, E., Stoter, G., ... ve Nooter, K. (2004). Imatinib mesylate (sti571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (bcrp)/abcg2 drug pump. *Blood*, 104(9), 2940-2942. doi: 10.1182/blood-2004-04-1398.

Bulger, M., ve Groudine, M. (2011). Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. *Cell*. 144, 327–39. doi: 10.1016/j.cell.2011.01.024.

Cai, F., Li, B., Li, J., Ding, Y., Xu, D., ve Huang, F. (2022). Myricetin is effective and selective in inhibiting imatinib-resistant chronic myeloid leukemia stem and differentiated cells through targeting eif4e. *Anti-Cancer Drugs*, 34(5), 620-626. doi: 10.1097/cad.0000000000001421.

Calabretta, B. ve Perrotti, D. (2004). The biology of cml blast crisis. *Blood*, 103(11), 4010-4022. doi: 10.1182/blood-2003-12-4111.

Calo, E., ve Wysocka, J. (2013). Modification of enhancer chromatin: what, how, and why?. *Molecular cell*, 49(5), 825-837. doi: 10.1016/j.molcel.2013.01.038

Cao, B., Yang, S., Li, W., Chen, H., Chen, Y., Liu, Y., ... ve Liu, B. (2017). Gmz-1 is a podophyllotoxin derivative that suppresses growth and induces apoptosis in adriamycin-resistant k562/a02 cells through modulation of *mdr1* expression. *Molecular Medicine Reports*. doi: 10.3892/mmr.2017.7862.

Carofiglio, F., Lopalco, A., Lopedota, A., Cutrignelli, A., Nicolotti, O., Denora, N., ... ve Leonetti, F. (2020). Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitors in the treatment of pediatric CML. *International journal of molecular sciences*, 21(12), 4469. doi: 10.3390/ijms21124469

Chiang, J. W., Karlan, B. Y., ve Baldwin, R. L. (2006). BRCA1 promoter methylation predicts adverse ovarian cancer prognosis. *Gynecologic oncology*, 101(3), 403-410. doi: 10.1016/j.ygyno.2005.10.034

Cheng, F., Li, Q., Cui, Z., Hong, M., Li, W., ve Zhang, Y. (2023). Dose optimization strategy of the tyrosine kinase inhibitors imatinib, dasatinib, and nilotinib for chronic myeloid leukemia: From clinical trials to real-life settings. *Frontiers in Oncology*, 13, 1146108. doi: 10.3389/fonc.2023.1146108

Cilloni, D., ve Saglio, G. (2012). Molecular pathways: Bcr-abl. *Clinical Cancer Research*, 18(4), 930-937. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-10-1613

Clarke, W. A., Chatelut, E., Fotoohi, A. K., Larson, R. A., Martin, J. H., Mathijssen, R. H., ve Salamone, S. J. (2021). Therapeutic drug monitoring in oncology: International Association of Therapeutic Drug Monitoring and Clinical Toxicology consensus guidelines for imatinib therapy. *European Journal of Cancer*, 157, 428-440. doi: 10.1016/j.ejca.2021.08.033

Cordaux, R., ve Batzer, M.A. (2009). The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat Rev Genet* 10(10), 691–703. doi: 10.1038/nrg2640

Clements, E., Mohammad, H., Leadem, B., Easwaran, H., Cai, Y., Neste, L., ... ve Baylin, S. (2012). Dnmt1 modulates gene expression without its catalytic activity partially through its interactions with histone-modifying enzymes. *Nucleic Acids Research*, 40(10), 4334-4346. doi: 10.1093/nar/gks031.

Costello, J.F., Plass, C. (2001). Methylation Matter. 38: 285-303. doi: 10.1136/jmg.38.5.285

Costello, J. F., Berger, M. S., Huang, H. S., ve Cavenee, W. K. (1996). Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation. *Cancer research*, 56(10), 2405-2410.

Çobankent Aytekin, E., Moharer, M. P. S., Boduroglu, A., Sanhal, C., ve Toru, H. S. (2023). Chronic myeloid leukemia during pregnancy with placental involvement: case report and literature review. *Fetal and Pediatric Pathology*, 42(5), 808-814. doi: 10.1080/15513815.2023.2218929

De Carvalho, D.D., Sharnra, S., You, J.S., (2012). DNA nrerhylation screening identifies driver epigenetic events of cancer cell survival. *Cancer Cell*. 21, 655–67. doi: 10.1016/j.ccr.2012.03.045.

Deininger, M. W., Buchdunger, E. ve Druker, B. J. (2005). The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood*, 105(7), 2640-2653. doi: 10.1182/blood-2004-08-3097.

Distler, J. H. W., Jüngel, A., Huber, L. C., Schulze-Horsel, U., Zwerina, J., Gay, R. E., ... ve Distler, O. (2007). Imatinib mesylate reduces production of extracellular matrix and prevents development of experimental dermal fibrosis. *Arthritis & Rheumatism*, 56(1), 311-322. doi: 10.1002/art.22314.

Deng, Y., Li, X., Jiao, F., ve Zhang, X. (2018). Overexpression of mir-202 resensitizes imatinib resistant chronic myeloid leukemia cells through targetting hexokinase 2. *Bioscience Reports*, 38(3). doi: 10.1042/bsr20171383.

Dessilly, G., Panin, N., Elens, L., Haufried, V., ve Demoulin, J. (2016). Impact of abcb1 1236c > t-2677g > t-3435c > t polymorphisms on the anti-proliferative activity of imatinib, nilotinib, dasatinib and ponatinib. *Scientific Reports*, 6(1). doi: 10.1038/srep29559.

Druker, B., Talpaz, M., Resta, D., Peng, B., Buchdunger, E., Ford, J., ... ve Sawyers, C. (2001). Efficacy and safety of a specific inhibitor of the bcr-abl tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, 344(14), 1031-1037. doi: 10.1056/nejm200104053441401.

Du, Y., Wang, K., Fang, H., Li, J., Xiao, D., Zheng, P., ... ve Zhang, J. (2006). Coordination of intrinsic, extrinsic, and endoplasmic reticulum-mediated apoptosis by

imatinib mesylate combined with arsenic trioxide in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 107(4), 1582-1590. doi: 10.1182/blood-2005-06-2318

Eadie, L., Saunders, V., Branford, S., White, D., ve Hughes, T. (2018). The new allosteric inhibitor asciminib is susceptible to resistance mediated by *abcb1* and *abcg2* overexpression in vitro. *Oncotarget*, 9(17), 13423-13437. doi: 10.18632/oncotarget.24393.

El-Tanani, M., Nsairat, H., Matalka, I. I., Lee, Y. F., Rizzo, M., Aljabali, A. A., ... ve Tambuwala, M. M. (2024). The impact of the BCR-ABL oncogene in the pathology and treatment of chronic myeloid leukemia. *Pathology-Research and Practice*, 155161. doi: 10.1016/j.prp.2024.155161

Esteller, M. (2011). Non-coding RNAs in human disease. *Nature reviews genetics*, 12(12), 861-874. doi: 10.1038/nrg3074

Fan, G., Beard, C., Chen, R., Csankovszki, G., Sun, Y., Siniaia, M., ... ve Jaenisch, R. (2001). Dna hypomethylation perturbs the function and survival of cns neurons in postnatal animals. *Journal of Neuroscience*, 21(3), 788-797. doi: 10.1523/jneurosci.21-03-00788.2001.

Fandy, T.E., Carraway, H.,ve Gore, S.D. (2007). DNADemethylating Agents and Histone Deacetylase Inhibitors in Hematologic malignancies. *Rhe Cancer Journal*. 13: 40-44. doi: 10.1097/ppo.0b013e31803c7359

Fathi, E., Farahzadi, R., Valipour, B., ve Sanaat, Z. (2019). Cytokines secreted from bone marrow derived mesenchymal stem cells promote apoptosis and change cell cycle distribution of k562 cell line as clinical agent in cell transplantation. *Plos One*, 14(4), e0215678. doi: 10.1371/journal.pone.0215678.

Ferreira, H. J., Heyn, H., Moutinho, C., ve Esteller, M. (2012). CpG island hypermethylation-associated silencing of small nucleolar RNAs in human cancer. *RNA biology*, 9(6), 881-890. doi: 10.4161%2Frna.19353

Frühwald, M.C., ve Witt, O. (2008). The Epigenetic of Cancer in Chidren. *Klin Padiatr*. 220(6), 333-341. doi: 10.1055/s-0028-1086026

Furtado, C., Luciano, M., Santos, R., Furtado, G., Moraes, M., ve Pessoa, C. (2019). Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment. *Epigenetics*, 14(12), 1164-1176. doi: 10.1080/15592294.2019.1640546.

Gao, X., Shen, K., Wang, C., Ling, J., Wang, H., Fang, Y., ... ve Qin, X. (2014). *mir-320a* downregulation is associated

with imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 46(1), 72-75. doi: 10.1093/abbs/gmt118.

Gao, Y., Yang, L., Yang, X., Hao, J., Shen, X., Wang, H., ... ve Gao, C. (2021). The expression of interleukin-1 β is regulated by dna methylation in microglia to mediate postoperative cognitive dysfunction in aged mice.. doi:10.21203/rs.3.rs-973050/v1.

Ghorbanihaghjo, A. ve Faezizadeh, Z. (2014). In vitro anti-telomerase activity of novel lycopene-loaded nanospheres in the human leukemia cell line k562. *Pharmacognosy Magazine*, 10(37), 157. doi: 10.4103/0973-1296.127368

Goldman, J. M., ve Melo, J. V. (2008). BCR-ABL in chronic myelogenous leukemia–how does it work?. *Acta haematologica*, 119(4), 212-217. doi: 10.1159/000140633

Goll, M. G., ve Bestor, T. H. (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.*, 74, 481-514. doi: 10.1146/annurev.biochem.74.010904.153721

Gómez, C., Garcia-Navas, R., Baltanás, F. C., Fuentes-Mateos, R., Fernández-Medarde, A., Calzada, N., ve Santos, E. (2022). Critical requirement of SOS1 for development of BCR/ABL-driven chronic myelogenous leukemia. *Cancers*, 14(16), 3893. doi: 10.3390/cancers14163893

Gorre, M. E., Mohammed, M., Ellwood, K., Hsu, N., Paquette, R., Rao, P. N., ve Sawyers, C. L. (2001). Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*, 293(5531), 876-880. doi: 10.1126/science.1062538

Gottesman, M. M. (2002). Mechanisms of cancer drug resistance. *Annual review of medicine*, 53(1), 615-627. doi: 10.1146/annurev.med.53.082901.103929

Goyal, R., Reinhardt, R., ve Jeltsch, A. (2006). Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase. *Nucleic acids research*, 34(4), 1182-1188. doi: 10.1093/nar/gkl002

Haleem, A., Al-Ani, R., ve Burhan, G. (2023). The Comparative Study of Quantitative Real-Time Monitoring QRT-PCR for BCR-ABL Gene in Chronic Myelogenous Leukemia (CML) Between Blood and Bone Marrow Samples: Quantitative Real-Time Monitoring QRT-PCR for BCR-ABL Gene in CML. *Iraq Medical Journal*, 7(2), 32-36.

Han, J. J. (2023). Treatment-free remission after discontinuation of imatinib, dasatinib, and nilotinib in patients with chronic myeloid leukemia. *Blood research*, 58(Suppl 1), S58. doi: 10.5045%2Fbr.2023.2023035

He, Z., Zhang, R., Jiang, F., Hou, W., ve Hu, C. (2018). Role of genetic and environmental factors in dna methylation of lipid metabolism. *Genes & Diseases*, 5(1), 9-15. doi: 10.1016/j.gendis.2017.11.005.

Helbo, A., Treppendahl, M., Aslan, D., ... (2015). Hypermethylation of the VTRNA1-3 promoter is associated with poor outcome in lower risk myelodysplastic syndrome patients. *Genes (Basel)*. 6, 977–90. doi: 10.3390/genes6040977.

Heinrich, M. C., Corless, C. L., Duensing, A., McGreevey, L., Chen, C. J., Joseph, N., ... ve Fletcher, J. A. (2003). PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science*, 299(5607), 708-710. doi: 10.1126/science.1079666

Herman, J. G., Latif, F., Weng, Y., Lerman, M. I., Zbar, B., Liu, S., ... ve Linehan, W. M. (1994). Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(21), 9700-9704. doi: 10.1073%2Fpnas.91.21.9700

Hinoue, T., Weisenberger, D.J., Lange, C.P.E., (2012). Genome-scale analysis of aberrant DNA methylation in colorectal cancer. *Genome Res.* 22, 271–82. doi: 10.1101/gr.117523.110.

Hinterlang, M., Gendron, A., Fleury, T., Rieutord, A., Vrana, A., Schlatter, J., ve Annereau, M. (2022). Design and stability of pediatric oral formulation of imatinib. *Journal of Oncology Pharmacy Practice*, 28(2), 337-342. doi: 10.1177/1078155221991200

Hsieh, C. L. (2005). The de novo methylation activity of Dnmt3a is distinctly different than that of Dnmt1. *BMC biochemistry*, 6, 1-12. doi: 10.1186%2F1471-2091-6-6

Hoemberger, M., Pitsawong, W., ve Kern, D. (2020). Cumulative mechanism of several major imatinib-resistant mutations in Abl kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(32), 19221-19227. doi: 10.1073/pnas.1919221117

Iezza, M., Cortesi, S., Ottaviani, E., Mancini, M., Venturi, C., Monaldi, C., ... ve Castagnetti, F. (2023). Prognosis in chronic myeloid leukemia: baseline factors, dynamic risk assessment and novel insights. *Cells*, 12(13), 1703. doi: 10.3390/cells12131703

IJzerman, N. S., Groenland, S. L., Koenen, A. M., Kerst, M., van der Graaf, W. T., Rosing, H., ... ve Steeghs, N. (2020). Therapeutic drug monitoring of imatinib in patients with gastrointestinal stromal tumours—results from daily clinical practice. *European Journal of Cancer*, 136, 140-148. doi: 10.1016/j.ejca.2020.05.025

Irizarry, R. A., Ladd-Acosta, C., Wen, B., Wu, Z., Montano, C., Onyango, P., ... ve Feinberg, A. P. (2009). Genome-wide methylation analysis of human colon cancer reveals similar hypo-and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nature genetics*, 41(2), 178. doi: 10.1038/nrg.298

Jabbour, E., Cortés, J. E., ve Kantarjian, H. M. (2008). Molecular monitoring in chronic myeloid leukemia. *Cancer*, 112(10), 2112-2118. doi: 10.1002/cncr.23427.

Jia, Y., Li, J., Qin, Z., ve Liang, Z. (2009). Autophagic and apoptotic mechanisms of curcumin-induced death in k562 cells. *Journal of Asian Natural Products Research*, 11(11), 918-928. doi: 10.1080/10286020903264077.

Jialun, L., Wang, R., Hu, X., Gao, Y., Wang, Z., Li, J., ... ve Wong, J. (2019). Activated mek/erk pathway drives widespread and coordinated overexpression of uhrf1 and dnmt1 in cancer cells. *Scientific Reports*, 9(1). doi: 10.1038/s41598-018-37258-3.

Jones, P. A., ve Laird, P. W. (1999). Cancer-epigenetics comes of age. *Nature genetics*, 21(2), 163-167. doi: 10.1038/5947

Juergens, R., Wrangle, J., Vendetti, F., Murphy, S., Zhao, M., Coleman, B., ... ve Rudin, C. (2011). Combination epigenetic therapy has efficacy in patients with refractory advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Discovery*, 1(7), 598-607. doi: 10.1158/2159-8290.cd-11-0214.

Kadayifci, F., Zheng, S., ve Pan, Y. (2018). Molecular mechanisms underlying the link between diet and dna methylation. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12), 4055. doi: 10.3390/ijms19124055.

Kandi, V. ve Vadakedath, S. (2015). Effect of dna methylation in various diseases and the probable protective role of nutrition: a mini-review. *Cureus*. 41(2), 178-186. doi: 10.7759/cureus.309.

Kaneda, A., ve Feinberg, A. P. (2005). Loss of imprinting of IGF2: a common epigenetic modifier of intestinal tumor risk. *Cancer research*, 65(24), 11236-11240.

Kantarjian, H., Jabbour, E., ve O'Brien, S. (2024). Chronic myelogenous leukemia. *Molecular Hematology*, 83-97. doi: 10.1002/9781394180486.ch6

Kantarjian, H., O'Brien, S., Talpaz, M., Borthakur, G., Ravandi, F., Faderl, S., ... & Cortes, J. (2007). Outcome of patients with philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia post-imatinib mesylate failure. *Cancer*, 109(8), 1556-1560. <https://doi.org/10.1002/cncr.22569>.

Kantarjian, H., Talpaz, M., O'Brien, S., Garcia-Manero, G., Verstovšek, S., Giles, F., ... ve Cortes, J. (2004). High-dose imatinib mesylate therapy in newly diagnosed philadelphia chromosome-positive chronic phase chronic myeloid leukemia. *Blood*, 103(8), 2873-2878. doi: 10.1182/blood-2003-11-3800.

Karami, S., Andreotti, G., Liao, L. M., Pfeiffer, R. M., Weinstein, S. J., Purdue, M. P., ... & Moore, L. E. (2015). LINE1 methylation levels in pre-diagnostic leukocyte DNA and future renal cell carcinoma risk. *Epigenetics*, 10(4), 282-292.

Kim, D., Na, Y., Kang, M., Yoon, S., ve Choi, C. (2016). Use of deferasirox, an iron chelator, to overcome imatinib resistance of chronic myeloid leukemia cells. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 31(2), 357-366. doi: 10.3904/kjim.2015.024.

Koschmieder, S., Göttgens, B., Zhang, P., Iwasaki-Arai, J., Akashi, K., Kutok, J. L., ... ve Huettner, C. S. (2005). Inducible chronic phase of myeloid leukemia with expansion of hematopoietic stem cells in a transgenic model of bcr-abl leukemogenesis. *Blood*, 105(1), 324-334. doi: 10.1182/blood-2003-12-4369.

Krishnan, V., Kim, D. D. H., Hughes, T. P., Branford, S. ve Ong, S. T. (2022). Integrating genetic and epigenetic factors in chronic myeloid leukemia risk assessment: toward gene expression-based biomarkers. *haematologica*, 107(2), 358. doi: 10.3324/haematol.2021.279317

Kulis, M., Heath, S., Bibikova, M., Queirós, A. C., Navarro, A., Clot, G., ... ve Martín-Subero, J. I. (2012). Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nature genetics*, 44(11), 1236-1242. doi: 10.1038/ng.2443

Laabidi, B., Slama, N., Ouahchi, I., Boufrikha, W., ve Laatiri, M. A. (2023). Chronic-phase chronic myeloid leukemia: Incidence of BCR/ABL transcript and its correlation with presenting features, response to treatment, and survival. *Leukemia Research Reports*, 20, 100373. doi: 10.1016/j.lrr.2023.100373

Lasa-Saracíbar, B., Mendoza, A., Mollinedo, F., Otero, M., ve Blanco-Prieto, M. (2013). Edelfosine lipid nanosystems overcome drug resistance in leukemic cell lines. *Cancer Letters*, 334(2), 302-310. doi: 10.1016/j.canlet.2013.01.018.

Lee, S., Bae, J., Kim, M., Lee, H., Lee, M., Chung, B., ... ve Kim, S. (2007). Bcr-abl-independent imatinib-resistant k562 cells show aberrant protein acetylation and increased sensitivity to histone deacetylase inhibitors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 322(3), 1084-1092. doi:10.1124/jpet.107.124461.

Lee, H., Basso, I. N. ve Kim, D. D. H. (2021). Target spectrum of the BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. *International journal of hematology*, 113(5), 632-641. doi: 10.1007/s12185-021-03126-6

Letsoalo, K., Nortje, E., Patrick, S., Nyakudya, T., ve Hlophe, Y. (2024). Decoding the synergistic potential of MAZ-51 and zingerone as therapy for melanoma treatment in alignment with sustainable development goals. *Cell Biochemistry and Function*, 42(2), e3950. doi: 10.1002/cbf.3950

Li, C., Wen, L., Dong, J., Li, L., Huang, J., Yang, J., ... ve Chen, C. (2022). Alterations in cellular metabolisms after TKI therapy for Philadelphia chromosome-positive leukemia in children: A review. *Frontiers in Oncology*, 12, 1072806. doi: 10.3389/fonc.2022.1072806

Li, H., Chiappinelli, K. B., Guzzetta, A. A., Easwaran, H., Yen, R. W. C., Vatapalli, R., ... ve Ahuja, N. (2014). Immune regulation by low doses of the DNA methyltransferase inhibitor 5-azacitidine in common human epithelial cancers. *Oncotarget*, 5(3), 587. doi: 10.18632/oncotarget.1782

Li, H., Duymich, C. E., Weisenberger, D. J., ve Liang, G. (2016). Genetic and epigenetic alterations in bladder cancer. *International Neurourology Journal*, 20(Suppl 2), S84-94. doi: 10.5213/inj.1632752.376.

Li, Y., Deng, K., Kaner, J., Geyer, J. T., Ouseph, M., Fang, F., ... ve Kluk, M. J. (2024). Detection of Hybrid Fusion Transcripts, Aberrant Transcript Expression, and Specific Single Nucleotide Variants in Acute Leukemia and Myeloid Disorders with Recurrent Gene Rearrangements. *Pathobiology*, 91(1), 76-88. doi: 10.1159/000532085

Lian, L., Choi, J., Lee, K., Sung, H., Park, S., Oze, I., ... ve Kang, D. (2012). Dna methylation in peripheral blood: a potential biomarker for cancer molecular epidemiology. *Journal of Epidemiology*, 22(5), 384-394. doi: 10.2188/jea.je20120003.

Liang, X., Xu, C., Wang, W., ve Li, X. (2019). The dnmt1/mir-34a axis is involved in the stemness of human osteosarcoma cells and derived stem-like cells. *Stem Cells International*, 1-20. doi: 10.1155/2019/7028901.

Lister, R., Pelizzola, M., Downen, R. H., Hawkins, R. D., Hon, G. C., Tonti-Filippini, J., ... ve Ecker, J. R. (2009). Human dna methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 462(7271), 315-322. doi: 10.1038/nature08514.

Liu, C., Li, Y., Hu, R., Han, W., ve Gao, S. (2019). Knockdown of ribonucleotide reductase regulatory subunit m2 increases the drug sensitivity of chronic myeloid leukemia to imatinib-based therapy. *Oncology Reports*. doi: 10.3892/or.2019.7194.

Liu, Y., Li, C., Su, R., Yin, Z., Huang, G., Yang, J., ... ve Fei, J. (2021). Targeting sos1 overcomes imatinib resistance with bcr-abl independence through uptake transporter slc22a4 in cml. *Molecular Therapy — Oncolytics*, 23, 560-570. doi: 10.1016/j.omto.2021.11.010.

Liu, J., Yang, H., Xu, X., Yi, S. ve Meng, L. (2020). Mutations in the BCR-ABL1 kinase domain in patients with chronic myeloid leukaemia treated with TKIs or at diagnosis. *Oncology letters*, 20(2), 1071-1076. doi: 10.3892%2Fol.2020.11650

Liu, Y., Zhang, M., Jang, H., ve Nussinov, R. (2023). Higher-order interactions of Bcr-Abl can broaden chronic myeloid leukemia (CML) drug repertoire. *Protein Science*, 32(1), e4504. doi: 10.1002%2Fpro.4504

Lovera, S., Morando, M., Pucheta-Martinez, E., Martinez-Torrecedrada, J. L., Saladino, G., ve Gervasio, F. L. (2015). Towards a molecular understanding of the link between imatinib resistance and kinase conformational dynamics. *PLoS computational biology*, 11(11), e1004578. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004578

Lozzio, C. B., ve Lozzio, B. B. (1975). Human chronic myelogenous leukemia loidcell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*. 45(3) 321-334.

Lu, J., Song, G., Tang, Q., Zou, C., Han, F., Zhao, Z., ... ve Wang, J. (2015). IRX1 hypomethylation promotes osteosarcoma metastasis via induction of CXCL14/NF- κ B signaling. *The Journal of clinical investigation*, 125(5), 1839-1856. doi: 10.1172/JCI78437

Luttman, J. H., Colemon, A., Mayro, B. ve Pendergast, A. M. (2021). Role of the ABL tyrosine kinases in the epithelial–mesenchymal transition and the metastatic cascade. *Cell Communication and Signaling*, 19(1), 59. doi: 10.1186/s12964-021-00739-6

Martínez-Castillo, M., Villegas-Sepúlveda, N., Meraz-Ríos, M. A., Hernández-Zavala, A., Berúmen, J., Coleman, M. A., ... ve Córdova, E. J. (2018). Curcumin

differentially affects cell cycle and cell death in acute and chronic myeloid leukemia cells. *Oncology Letters*. doi: 10.3892/ol.2018.8112.

McDowell, H. P., Meco, D., Riccardi, A., Tanno, B., Berardi, A. C., Raschella, G., ... ve Dominici, C. (2006). Imatinib mesylate potentiates topotecan antitumor activity in rhabdomyosarcoma preclinical models. *International Journal of Cancer*, 120(5), 1141-1149. doi: 10.1002/ijc.22391

Mchaourab, Z. F., Perreault, A. A., ve Venters, B. J. (2018). Chip-seq and chip-exo profiling of pol ii, h2a.z, and h3k4me3 in human k562 cells. *Scientific Data*, 5(1). doi: 10.1038/sdata.2018.30.

Mian, A. A., Haberbosch, I., Khamaisie, H., Agbarya, A., Pietsch, L., Eshel, E., ... ve Mahajna, J. (2021). Crizotinib acts as ABL1 inhibitor combining ATP-binding with allosteric inhibition and is active against native BCR-ABL1 and its resistance and compound mutants BCR-ABL1T315I and BCR-ABL1T315I-E255K. *Annals of hematology*, 100(8), 2023-2029. doi: 10.1007/s00277-020-04357-z

Min, H., Lee, S., Woo, J., Jung, H., Park, K., Jeong, H., ... ve Lee, H. (2017). Essential role of dna methyltransferase 1-mediated transcription of insulin-like growth factor 2 in resistance to histone deacetylase inhibitors. *Clinical Cancer Research*, 23(5), 1299-1311. doi: 10.1158/1078-0432.ccr-16-0534.

Miranda, T. ve Jones, P. (2007). Dna methylation: the nuts and bolts of repression. *Journal of Cellular Physiology*, 213(2), 384-390. doi: 10.1002/jcp.21224.

Mishra, M., Singh, A. K., Thacker, G., Upadhyay, V., Sanyal, S., ve Trivedi, A. K. (2023). Ormeloxifene, a nonsteroidal antifertility drug promotes megakaryocyte differentiation in leukemia cell line K562. *Cell Biology International*, 47(7), 1247-1258. doi: 10.1002/cbin.12017

Moen, E.L., Stark, A.L., Zhang, W., (2014). The role of gene body cytosine modifications in MGMT expression and sensitivity to temozolomide. *Mol Cancer Ther.* 13, 1334–44. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0924.

Mojtahedi, H., Yazdanpanah, N. ve Rezaei, N. (2021). Chronic myeloid leukemia stem cells: targeting therapeutic implications. *Stem cell research & therapy*, 12(1), 603. doi: 10.1186/s13287-021-02659-1

Mutlu Altundağ, E., Yılmaz, A. M., Serdar, B. S., Jannuzzi, A. T., Koçtürk, S. ve Yalçın, A. S. (2021). Synergistic induction of apoptosis by quercetin and curcumin in

chronic myeloid leukemia (K562) cells: II. signal transduction pathways involved. *Nutrition and Cancer*, 73(4), 703-712. doi: 10.1080/01635581.2020.1767167

Myant, K. ve Stancheva, I. (2008). Lsh cooperates with dna methyltransferases to repress transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 28(1), 215-226. doi: 10.1128/mcb.01073-07.

Nabioğlu, A., Mutlu, P., Yalçın, S., ve Gündüz, U. (2022). Nek6 gene silencing using sirna for overcome multidrug resistance in chronic myeloid leukemia cells. *Bulletin of Biotechnology*, 3(1), 1-6. doi: 10.51539/biotech.996367.

Nagai, T., Jin, T., Dobashi, N., Kanakura, Y., Taniguchi, S., K, E., ... ve Usui, N. (2010). Imatinib for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: results of a prospective study in japan. *International Journal of Hematology*, 92(1), 111-117. doi: 10.1007/s12185-010-0621-x.

Nagarajan, R. P., Zhang, B., Bell, R. J., Johnson, B. E., Olshen, A. B., Sundaram, V., ... ve Costello, J. F. (2014). Recurrent epimutations activate gene body promoters in primary glioblastoma. *Genome research*, 24(5), 761-774. doi: 10.1101/016470.113

Nekooesh, L., Rostami, S., Nikbakht, M., Mohammadi, S., Babakhani, D., Alimoghaddam, K., ... ve Chahardouli, B. (2020). Evaluation of molecular response to imatinib mesylate treatment in Iranian patients with chronic myeloid leukemia. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 20(1), e1-e10. doi: 10.1016/j.clml.2019.09.605

Nimmanapalli, R., ve Bhalla, K. (2002). Mechanisms of resistance to imatinib mesylate in Bcr-Abl-positive leukemias. *Current opinion in oncology*, 14(6), 616-620. doi: 10.1097/00001622-200211000-00005

Oehler, L., Jaeger, E., Eser, A., Sillaber, C., Gisslinger, H., ve Geißler, K. (2003). Imatinib mesylate inhibits autonomous erythropoiesis in patients with polycythemia vera in vitro. *Blood*, 102(6), 2240-2242. doi: 10.1182/blood-2003-03-0676.

Okabe, S., Tanaka, Y., Moriyama, M., ve Gotoh, A. (2020). Effect of dual inhibition of histone deacetylase and phosphatidylinositol-3 kinase in Philadelphia chromosome-positive leukemia cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 85, 401-412. doi: 10.1007/s00280-019-04022-x

Oliveira, A. (2016). Dna methylation: a permissive mark in memory formation and maintenance. *Learning & Memory*, 23(10), 587-593. doi: 10.1101/lm.042739.116.

Omsland, M., Andresen, V., Gullaksen, S. E., Ayuda-Durán, P., Popa, M., Hovland, R., ... ve Gjertsen, B. T. (2020). Interferon alpha and tyrosine kinase inhibitors increase

tunneling nanotubes (tnt) formation and cell adhesion in chronic myeloid leukemia (cml) cell lines. *Faseb journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 34(3), 3773. doi: 10.1038/s41598-018-29391-w

Pardanani, A., Tefferi, A., Litzow, M. R., Zent, C., Hogan, W. J., McClure, R. F., ve Viswanatha, D. (2009). Chronic myeloid leukemia with p190BCR-ABL: prevalence, morphology, tyrosine kinase inhibitor response, and kinase domain mutation analysis. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 114(16), 3502-3503. doi: 10.1182/blood-2009-07-234666

Pardanani, A., ve Tefferi, A. (2004). Imatinib targets other than bcr/abl and their clinical relevance in myeloid disorders. *Blood*, 104(7), 1931-1939. doi: 10.1182/blood-2004-01-0246

Parmar, S., Smith, J., Sassano, A., Uddin, S., Katsoulidis, E., Majchrzak, B., ... ve Plataniias, L. C. (2005). Differential regulation of the p70 s6 kinase pathway by interferon α (ifn α) and imatinib mesylate (sti571) in chronic myelogenous leukemia cells. *Blood*, 106(7), 2436-2443. doi: 10.1182/blood-2004-10-4003.

Patel, A. B., O'Hare, T., ve Deininger, M. W. (2017). Mechanisms of resistance to ABL kinase inhibition in chronic myeloid leukemia and the development of next generation ABL kinase inhibitors. *Hematology/Oncology Clinics*, 31(4), 589-612. doi: 10.1016/j.hoc.2017.04.007

Patra, S.K., ve Szyf, M. (2008). DNA methylation-mediated nucleosome Dynamics and oncogenic Ras signalling insights from FAS, FAS ligand and RASSF1A . *FEBS Journal*. 275: 5217-5235. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06658.x

Paulose, P. J., ve Fathima, J. L. (2023). Classification of Acute Leukaemia based on Blast Morphology, Cytochemistry and Flow Cytometry. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 17(2), EC01-EC05. doi: 10.7860/JCDR/2023/59906.17470

Peng, X., Tiwari, A., Wu, H., ve Chen, Z. (2012). Overexpression of p-glycoprotein induces acquired resistance to imatinib in chronic myelogenous leukemia cells. *Chinese Journal of Cancer*, 31(2), 110-118. doi: 10.5732/cjc.011.10327.

Peters, S., Hlady, R., Opavska, J., Klinkebiel, D., Nováková, S., Smith, L., ... ve Opavský, R. (2013). Essential role for dnmt1 in the prevention and maintenance of myc-induced t-cell lymphomas. *Molecular and Cellular Biology*, 33(21), 4321-4333. doi: 10.1128/mcb.00776-13.

Pontier, D. B., ve Gribnau, J. (2011). Xist regulation and function explored. *Human genetics*, 130, 223-236. doi: 10.1007/s00439-011-1008-7

Radujkovic, A., Schad, M., Topaly, J., Veldwijk, M., Laufs, S., Schultheis, B., ... ve Zeller, W. (2005). Synergistic activity of imatinib and 17-aag in imatinib-resistant cml cells overexpressing bcr-abl – inhibition of p-glycoprotein function by 17-aag. *Leukemia*, 19(7), 1198-1206. doi: 10.1038/sj.leu.2403764.

Redner, R. (2010). Why doesn't imatinib cure chronic myeloid leukemia?. *The Oncologist*, 15(2), 182-186. doi: 10.1634/theoncologist.2009-0297.

Reik, W. (2007). Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*. 447, 425-432. doi: 10.1038/nature05918

Rhee, I., Bachman, K. E., Park, B. H., Jair, K. W., Yen, R. W. C., Schuebel, K. E., ... ve Vogelstein, B. (2002). DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature*, 416(6880), 552-556. doi: 10.1038/416552a

Riso, G., Sarnataro, A., Scala, G., Cuomo, M., Monica, R., Amente, S., ... ve Coccozza, S. (2022). Mc profiling: a novel approach to analyze dna methylation heterogeneity in genome-wide bisulfite sequencing data. *Nar Genomics and Bioinformatics*, 4(4). doi: 10.1093/nargab/lqac096.

Riva, L., Bozzi, F., Mondellini, P., Miccichè, F., Fumagalli, E., Vaghi, E., ... ve Bongarzone, I. (2011). Proteomic detection of a large amount of scgfa in the stroma of gists after imatinib therapy. *Journal of Translational Medicine*, 9(1). doi: 10.1186/1479-5876-9-158.

Rosa, V., Monti, M., Terlizzi, C., Fonti, R., Vecchio, S., ve Iommelli, F. (2019). Coordinate modulation of glycolytic enzymes and oxphos by imatinib in bcr-abl driven chronic myelogenous leukemia cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 3134. doi: 10.3390/ijms20133134.

Roskoski Jr, R. (2022). Targeting BCR-Abl in the treatment of Philadelphia-chromosome positive chronic myelogenous leukemia. *Pharmacological Research*, 178, 106156. doi: 10.1016/j.phrs.2022.106156

Saied, M. H., Marzec, J., Khalid, S., Smith, P., Down, T. A., Rakyan, V. K., ... & Young, B. D. (2012). Genome wide analysis of acute myeloid leukemia reveal leukemia specific methylome and subtype specific hypomethylation of repeats. *PloS one*, 7(3), e33213. doi: 10.1371/journal.pone.0033213

Sakai, T., Toguchida, J., Ohtani, N., Yandell, D. W., Rapaport, J. M., ve Dryja, T. P. (1991). Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *American journal of human genetics*, 48(5), 880.

Sharma, S., Kelly, T., ve Jones, P. (2009). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1), 27-36. doi: 10.1093/carcin/bgp220.

Saini, S., Mangalhara, K., Prakasam, G., ve Bamezai, R. (2017). Dna methyltransferase1 (dnmt1) isoform3 methylates mitochondrial genome and modulates its biology. *Scientific Reports*, 7(1). doi: 10.1038/s41598-017-01743-y.

Smallwood, A., Estève, P., Pradhan, S., ve Carey, M. (2007). Functional cooperation between hp1 and dnmt1 mediates gene silencing. *Genes & Development*, 21(10), 1169-1178. doi: 10.1101/gad.1536807.

Sampaio, M. M., Santos, M. L. C., Marques, H. S., de Souza Gonçalves, V. L., Araújo, G. R. L., Lopes, L. W., ... ve de Melo, F. F. (2021). Chronic myeloid leukemia- from the Philadelphia chromosome to specific target drugs: A literature review. *World journal of clinical oncology*, 12(2), 69. doi: 10.5306/wjco.v12.i2.69

Sánchez, R., Dorado, S., Ruíz-Heredia, Y., Martín-Muñoz, A., Rosa-Rosa, J. M., Ribera, J., ... ve Martínez-López, J. (2022). Detection of kinase domain mutations in BCR:: ABL1 leukemia by ultra-deep sequencing of genomic DNA. *Scientific reports*, 12(1), 13057. doi: 10.1038/s41598-022-17271-3

Santoleri, F., Ranucci, E., La Barba, G., Colasanto, I., Scaldaferri, M., Cattel, F., ... ve Costantini, A. (2021). Adherence, persistence and efficacy of dasatinib and nilotinib in the treatment of patients resistant or intolerant to imatinib with chronic myeloid leukemia in chronic phase: an Italian multicenter study over two years in real life. *Current Medical Research and Opinion*, 37(3), 477-481. doi: 10.1080/03007995.2021.1876006

Sarabi, M. ve Naghibalhossaini, F. (2015). Association of dna methyltransferases expression with global and gene-specific dna methylation in colorectal cancer cells. *Cell Biochemistry and Function*, 33(7), 427-433. doi: 10.1002/cbf.3126.

Sequist, L. V., ve Lynch, T. J. (2011). EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung cancer: an evolving story. *Annu. Rev. Med.*, 59, 429-442. doi: 10.1146/annurev.med.59.090506.202405

Severin, P., Zou, X., Gaub, H., ve Schulten, K. (2011). Cytosine methylation alters dna mechanical properties. *Nucleic Acids Research*, 39(20), 8740-8751. doi: 10.1093/nar/gkr578.

- Shah, N. P., Tran, C., Lee, F. Y., Chen, P., Norris, D., ve Sawyers, C. L. (2004). Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science*, 305(5682), 399-401. doi: 10.1126/science.1099480
- Shin, E., Lee, Y., ve Koo, J. S. (2016). Differential expression of the epigenetic methylation-related protein DNMT1 by breast cancer molecular subtype and stromal histology. *Journal of translational medicine*, 14, 1-11. doi: 10.1186/s12967-016-0840-x
- Smith, L.T., Otterson, G.A., ve Plass, C. (2007). Unraveling the epigenetic code of cancer for therapy. *Trends in Genetics*. 23: 449-456. doi: 10.1016/j.tig.2007.07.005
- Song, J., Rechkoblit, O., Bestor, T. H., ve Patel, D. J. (2011). Structure of DNMT1-DNA complex reveals a role for autoinhibition in maintenance DNA methylation. *science*, 331(6020), 1036-1040. doi: 10.1126/science.1195380
- Spivakov, M., ve Fisher, A.G. (2007). Epigenetic signatures of stem-cell identity. *Nature Reviews*. 8(4), 263-267. doi: 10.1038/nrg2046
- Subramaniam, D., Thombre, R., Dhar, A., ve Anant, S. (2014). Dna methyltransferases: a novel target for prevention and therapy. *Frontiers in Oncology*, 4. doi: 10.3389/fonc.2014.00080.
- Sun, H., Kapuria, V., Peterson, L., Fang, D., Bornmann, W., Bartholomeusz, G., ... ve Donato, N. (2011). Bcr-abl ubiquitination and usp9x inhibition block kinase signaling and promote cml cell apoptosis. *Blood*, 117(11), 3151-3162. doi: /10.1182/blood-2010-03-276477.
- Szyf, M. (2003). Targeting DNA methylation in cancer. *Ageing Research Reviews*. 2: 299-328. doi: 10.1016/s1568-1637(03)00012-6
- Tauchi, T., ve Ohyashiki, K. (2004). Molecular mechanisms of resistance of leukemia to imatinib mesylate. *Leukemia Research*, 28, 39-45. doi: 10.1016/j.leukres.2003.10.007
- Thomas, J., Wang, L., Clark, R., ve Pirmohamed, M. (2004). Active transport of imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood*, 104(12), 3739-3745. doi: 10.1182/blood-2003-12-4276.
- Tsubaki, M. (2018). Met/erk and met/jnk pathway activation is involved in bcr-abl inhibitor-resistance in chronic myeloid leukemia. *Yakugaku Zasshi*, 138(12), 1461-1466. doi: 10.1248/yakushi.18-00142.

Qiao, Q., Zhou, Y., Hong-yuan, Y., He, Z. X., ve Fan, A. (2022). Tet2-mediated dna demethylation regulates the proliferation and apoptosis of human leukemia k562 cells.. doi: 10.21203/rs.3.rs-1668398/v1.

Vanyushin, B. F. (2005). Enzymatic dna methylation is an epigenetic control for genetic functions of the cell. *Biochemistry (Moscow)*, 70(5), 488-499. doi: 10.1007/s10541-005-0143-y.

Vuorinen, K., Gao, F., Oury, T. D., Kinnula, V. L., ve Myllärniemi, M. (2007). Imatinib mesylate inhibits fibrogenesis in asbestos-induced interstitial pneumonia. *Experimental Lung Research*, 33(7), 357-373. doi: 10.1080/01902140701634827.

Vrba, L., Garbe, J. C., Stampfer, M. R., ve Futscher, B. W. (2015). A lincRNA connected to cell mortality and epigenetically-silenced in most common human cancers. *Epigenetics*, 10(11), 1074-1083. doi: 10.1080/15592294.2015.1106673

Wang, P., Zhang, Z., Cao, W., ve Zhang, X. (2023). Development and evaluation of novel artemisinin-isatin hybrids with potential anti-leukemic cytotoxicity. *Frontiers in Oncology*, 13. doi: 10.3389/fonc.2023.1112369.

Wang, S., Wu, W., ve Claret, F. (2017). Mutual regulation of micrnas and dna methylation in human cancers. *Epigenetics*, 12(3), 187-197. doi: 10.1080/15592294.2016.1273308.

Wang, H., Chen, C., Yang, C., Tsai, I., Hou, Y., Chen, C., ... ve Shan, Y. (2017). Tumor-associated macrophages promote epigenetic silencing of gelsolin through dna methyltransferase 1 in gastric cancer cells. *Cancer Immunology Research*, 5(10), 885-897. doi: 10.1158/2326-6066.cir-16-0295.

Weisenberger, D. J., Lakshminarasimhan, R., ve Liang, G. (2022). The role of DNA methylation and DNA methyltransferases in cancer. In *DNA Methyltransferases-Role and Function* (pp. 317-348). Cham: Springer International Publishing.

Weicai, C., Kuang, Y., Qiu, H., Cao, Z., Tu, Y., Sheng, Q., ... ve Ou, W. (2017). Dual targeting of insulin receptor and kit in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Research*, 77(18), 5107-5117. doi: 10.1158/0008-5472.can-17-0917.

Wen, X., Zhang, T., Ma, J., Zhou, J., Xu, Z., Zhu, X., ... ve Qian, J. (2019). Establishment and molecular characterization of decitabine-resistant k562 cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(5), 3317-3324. doi: 10.1111/jcmm.14221

Weisenberger, D. J., ve Liang, G. (2015). Contributions of DNA methylation aberrancies in shaping the cancer epigenome. *Translational Cancer Research*, 4(3).

Wodi, C., Belali, T., Morse, R., Porazinski, S., ve Lodomery, M. (2023). Sphinx-based combination therapy as a potential novel treatment strategy for acute myeloid leukaemia. *British Journal of Biomedical Science*, 80. doi: 10.3389/bjbs.2023.11041.

Wong, C., Wong, C., Ng, Y., Au, S., Ko, F., ve Ng, I. (2011). Transcriptional repressive h3k9 and h3k27 methylations contribute to dnmt1-mediated dna methylation recovery. *Plos One*, 6(2), e16702. doi: 10.1371/journal.pone.0016702.

Wu, K., Jin, Z., Li, Y. X., Li, X., Cheng, S. J., Li, Y. H., ve Guo, C. (2021). Silencing DNMT1 attenuates the effect of WIF-1 gene promoter methylation on the biological behavior of chronic myeloid leukemia K562 cells. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi*, 29(6), 1768-1774. doi: 10.19746/j.cnki.issn.1009-2137.2021.06.013

Yaghmaie, M., ve Yeung, C. C. (2019). Molecular mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 14, 395-404. doi: 10.1007/s11899-019-00543-7

Youngblood, B., Buller, F., ve Reich, N. O. (2006). Determinants of sequence-specific DNA methylation: target recognition and catalysis are coupled in M. HhaI. *Biochemistry*, 45(51), 15563-15572.

Yoo, J. ve Medina-Franco, J. (2012). Inhibitors of dna methyltransferases: insights from computational studies. *Current Medicinal Chemistry*, 19(21), 3475-3487. doi: 10.2174/092986712801323289.

Yuan, R., Chang, J., ve He, J. (2020). Effects of twist1 on drug resistance of chronic myeloid leukemia cells through the pi3k/akt signaling pathway. *Cellular and Molecular Biology*, 66(6), 81-85. doi: 10.14715/cmb/2020.66.6.15.

Zarnett, O.J., Sahgal, A., Gosio, J., (2015). Treatment of elderly patients with glioblastoma: a systematic evidence-based analysis. *JAMA Neurol.* 72, 589–96. doi: 10.1001/jamaneurol.2014.3739.

Zhang, P., Wang, Y., Qin, M., Li, D., Odhiambo, W., Yuan, M., ... ve Ji, Y. (2020). Involvement of blnk and foxo1 in tumor suppression in bcr-abl1-transformed pro-b cells. *Oncology Reports*, 45(2), 693-705. doi: 10.3892/or.2020.7888.

Zhao, H., Wang, L., Li, W., Zhai, S., ve Jiang, W. (2017). Ultrasensitive and accurate assay of human methyltransferase activity at the single-cell level based on a single integrated magnetic microprobe. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 9(35), 29554-29561. doi: 10.1021/acsami.7b09631.

Zhong, J., Zhang, J., Yu, X., Zhang, X., ve Dian, L. (2020). Olmutinib reverses doxorubicin resistance in ets1-overexpressing leukemia cells. Medical Science Monitor, 26. doi: 10.12659/msm.924922.

Zhu, T., Li, L., Feng, L., Mo, H., ve Ren, M. (2020). Target of rapamycin regulates genome methylation reprogramming to control plant growth in arabidopsis. Frontiers in Genetics, 11. doi: 10.3389/fgene.2020.00186.

Zuccato, C., Cosenza, L. C., Zurlo, M., Lampronti, I., Borgatti, M., Scapoli, C., ... ve Finotti, A. (2021). Treatment of erythroid precursor cells from β -thalassemia patients with cinchona alkaloids: induction of fetal hemoglobin production. International Journal of Molecular Sciences, 22(24), 13433. doi: 10.3390%2Fijms222413433

<https://www.drozdogan.com/webp-images/Philadelphia-kromozomu-KML-kronik-miyeloid-losemi-brc-abl-fuzyon-geni-938712.webp>

<https://www.vejthani.com/wp-content/uploads/2022/08/Leukemia.jpg>

<https://soroushlab.com/wp-content/uploads/2021/07/soroushlab3.jpg.png>

<https://medicoinfo.org/wp-content/uploads/2019/08/MedicoInfo.jpg>

https://blogger.googleusercontent.com/img/b/R29vZ2xl/AVvXsEheO2B8YUpKpe0uzwjr83_Vn3vP8tUTIrbl7sfyh8ovpWy5wRiGgxeOC0xLOZW4BWGmwTbb88qCj9HBqIapK06wyr4QTYF38eJdLiGxPOnQ7ZJkMzAy4xYqHswrhLOVwGPvcF69XNtJDo4/s1600/WH02.jpg

EKLER

EK - 1 : İntihal Raporu



EK-1: İNTİHAL RAPORU

Paria Nojavan Talatapeh İMATİNİB MESİLAT DİRENÇLİ K562
HÜCRE SOYU İLE DUYARLI K562 HÜCRE SOYLARINDA DNA
METİLTRANSFERAZ 1 ENZİMİNİN İFADE DÜZEYİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI TEZ.docx

ORJİNALLİK RAPORU

%**10**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**8**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**6**

YAYINLAR

%**2**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikerisim.deu.edu.tr
İnternet Kaynağı

%**2**

2

acikbilim.yok.gov.tr
İnternet Kaynağı

%**2**

3

docplayer.biz.tr
İnternet Kaynağı

%**1**

4

Submitted to The Scientific & Technological
Research Council of Turkey (TUBITAK)
Öğrenci Ödevi

%**1**

5

Mercan, Emine. "Km'l'li Hastalarda İMatinib
Mesilat Tedavisinin Sonuçları ve İzlemlerinin
Değerlendirilmesi", Dokuz Eylul Üniversitesi
(Turkey), 2024
Yayın

%**1**

6

saglikbilimleri.istinye.edu.tr
İnternet Kaynağı

<%**1**