

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ HÜCRE
HATTINDA FOXM1 GEN EKSPRESYON
SEVİYESİNİN BELİRLENMESİ VE FOXM1'İN
DEKSAMETAZON VE FOXM1 İNHİBİTÖRÜ
SİOMİSİN A KULLANILARAK HEDEFLENMESİ**

UZM. DR. ÖZLEM TÜFEKÇİ

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

İZMİR- 2012

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI
ANABİLİM DALI

**AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ HÜCRE
HATTINDA FOXM1 GEN EKSPRESYON
SEVİYESİNİN BELİRLENMESİ VE FOXM1'İN
DEKSAMETAZON VE FOXM1 İNHİBİTÖRÜ
SİOMİSİN A KULLANILARAK HEDEFLENMESİ**

YAN DAL UZMANLIK TEZİ

Uzm. Dr. Özlem Tüfekçi

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Gülersu İRKEN

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından
99.3456.23 sayı ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

İçindekiler.....	I-III
Tablolar Dizini.....	IV
Şekiller Dizini.....	V
Kısaltmalar.....	VI-VII
Özet.....	1-2
Summary.....	3-4
1. Giriş ve Amaç.....	5-6
2. Genel Bilgiler.....	7-29
2.1. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL).....	7-20
2.1.1. Lökogenez.....	7-8
2.1.2. T-Hücre Lenfogenez ve Lökogenez.....	8-10
2.1.3. ALL: Epidemiolojik Sınıflandırma ve Prognostik Faktörler.....	10-14
<i>Minimal rezidüel hastalık</i>	14
2.1.4. ALL: Tedavi.....	15-19
2.1.4.1. Destek Tedavisi.....	15
2.1.4.2. Çoklu Ajan Kemoterapi Protokolleri.....	15-17
<i>İndüksiyon</i>	15-16
<i>Konsolidasyon</i>	16
<i>Reindüksiyon</i>	16
<i>İdame Tedavisi</i>	16
<i>MSS profilaksisi</i>	17
2.1.4.3. Kök Hücre Transplantasyonu.....	17
2.1.4.4. Hedef Tedavi.....	17-19
2.1.4.5. Tedavi Yanıtı.....	19-20
2.2. FoxM1.....	20-29
2.2.1. FoxM1 Yapısı ve Özellikleri.....	20-23
2.2.1.1. FoxM1: Forkhead Ailesine Ait Bir Transkripsiyon Faktörü.....	20
2.2.1.2. FoxM1: Genetik Yapı, Alternatif Uçbirleştirme.....	20
2.2.1.3. FoxM1: Hücre Çoğalmasına Özgül Transkripsiyon Faktörü.....	21
2.2.1.4. FoxM1: Hücre Döngüsündeki Ekspresyonu.....	21-23
2.2.2. FoxM1 Hücresel Fonksiyonları.....	24-25
2.2.2.1. FoxM1 ve Organogenez.....	25
2.2.2.2. FoxM1 Hücre Çoğalmasını Arttırır.....	25

2.2.2.3. FoxM1: Hücre Döngüsü Kontrolü.....	25
2.2.3. FoxM1 ve Kanser.....	26-28
2.2.3.1. FoxM1: Kanser Patogenezindeki Rolü.....	26-28
<i>FoxM1'in tümör oluşumundaki rolü.....</i>	26
<i>FoxM1'in tümör yayılmasında ve saldırganlığındaki rolü.....</i>	26-27
2.2.3.2. FoxM1:Kanser Tedavisinde Yeni Bir Hedef.....	29
<i>Siomycin A: FoxM1 inhibitörü, potansiyel antikanser bir ilaç....</i>	29
3. Gereçler ve Yöntemler	30-34
3.1. Etik Kurul.....	30
3.2. Jurkat Hücreleri.....	30
3.2.1 Jurkat Hücrelerinin Pasajlanması.....	30
3.3. Deksametazon.....	30
3.4. Siomisin A.....	30
3.5. Jurkat Hücrelerinde FoxM1 Gen Ekspresyon Seviyelerinin Ters	
Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi ile Belirlenmesi.....	30-31
3.6. Jurkat Hücreleri Üzerine Deksametazonun ve Siomisin A'nın	
Hücre Çoğalmasını Engelleyici Etkilerinin Belirlenmesi.....	31
3.7. Siomisin A ve Deksametazon Uygulanan Jurkat Hücrelerinin Yaşam	
Yüzdelерinin Belirlenmesi.....	31-32
3.8. Siomisin A ve Deksametazonun Beraber Uygulandığı Jurkat Hücrelerinde	
Sinerjistik, Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi.....	32
3.8.1. Siomisin A ve Deksametazonun Kombinasyonunun	
İzobologramAnalizleri.....	32
3.8.2. Siomisin A ve Deksametazon Uygulanan Jurkat Hücrelerinde Kaspaz-3	
Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi.....	32-33
3.8.3. Siomisin A ve Deksametazon Uygulanan Jurkat Hücrelerinde	
Mitokondri Zar Potansiyelinin Belirlenmesi.....	33
3.8.4. Siomisin A ve Deksametazon Uygulanan Jurkat Hücrelerinde Apoptotik	
Hücre Ölümlerinin Aneksin V Akım Sitometre Yöntemi İle Belirlenmesi	33

3.9. Siomisin A ve Deksametazonun Beraber Uygulandığı Jurkat Hücrelerinde	
Hücre Döngüsü Analizleri.....	33-34
4. Bulgular.....	35-40
4.1. Jurkat Hücrelerinde FoxM1 Gen Ekspresyon Seviyelerinin PCR yöntemi ile	
Belirlenmesi.....	35
4.2. Siomisin A ve Deksametazon Uygulanan Jurkat Hücrelerinde FoxM1 Gen	
Ekspresyon Seviyelerinin PCR Yöntemi ile Belirlenmesi.....	35
4.3. Jurkat Hücreleri Üzerine Deksametazon ve Siomisin A'nın Hücre Çoğalmasını	
Engelleyici Etkileri.....	36
4.4. Deksametazon ve Siomisin A'nın Beraber Uygulandığı Jurkat Hücrelerinde	
Sinerjistik ve Apoptotik Etkiler.....	36-38
4.4.1. Siomisin A ve Deksametazonun Kombinasyonunun İzobologram	
Analizleri.....	36
4.4.2. Siomisin A ve Deksametazon Uygulanan Jurkat Hücrelerinde Kaspaz-3	
Enzim Aktivitesi, Mitokondri Zar Potansiyeli Bozulmaları ve Annexin V	
Apoptotik Testleri.....	37-38
4.5. Deksametazon ve Siomisin A'nın Beraber Uygulandığı Jurkat	
Hücrelerinde Hücre Döngüsü Analizleri.....	39-40
5. Tartışma.....	41-44
6. Sonuçlar.....	45
7. Kaynaklar.....	46-54
8. Ekler.....	55
8.1. Etik Kurul Kararı.....	55

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Başlık</u>	<u>Sayfa No</u>
1	T-hücre Akut Lenfoblastik Lösemi'de Tip A Genetik Mutasyonları.....	10
2	T-hücre Akut Lenfoblastik Lösemi'de Tip B Genetik Mutasyonları.....	10
3	EGIL'e Göre Akut Lenfoblastik Lösemi'nin İmmünolojik Sınıflaması.....	12
4	Çocukluk Çağı Bazı Akut Lenfoblastik Lösemi Alt Tiplerinin Özellikleri ve Klinik Seyirleri.....	13
5	Akut Lenfoblastik Lösemi'de Prognozu Etkileyen Faktörler.....	14
6	Akut Lenfoblastik Lösemi'de Yeni Geliştirilen Hedef Tedavi Ajanları....	18
7	Siomisin A ve Deksametazon ile Muamele Edilen Hücrelerin Hücre Döngüsü Analizleri.....	40

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>No</u>	<u>Başlık</u>	<u>Sayfa No</u>
1	T-hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi biyolojik özelliklerinin şematik olarak gösterilmesi.....	9
2	Akut Lenfoblastik Lösemi'de genetik anormallikler.....	12
3	Alternatif uçbirleştirme sonucu oluşan FoxM1 proteinin varyantları.....	21
4	Hücre döngüsü.....	23
5	FoxM1'in hücre döngüsüne bağımlı olarak düzenlenmesi.....	23
6	Hücre döngü ilerlemesi ve genomik stabilitenin sağlanmasında FoxM1 rolü.....	25
7	FoxM1 ve kesiştiği onkojenik yollar.....	28
8	FoxM1'in kanser oluşumu ve yayılmasındaki rolü.....	28
9	Sağlıklı hücrelerde ve Jurkat hücrelerinde gen ekspresyon profilleri.....	35
10	Siomisin A ve deksametazon uygulanan Jurkat hücrelerinin doza bağımlı olarak ekspresyon seviyeleri.....	36
11	Jurkat Hücrelerinin siomisin A ile 72 saat muamelesi sonucunda elde edilen IC50 değerleri.....	37
12	Jurkat Hücrelerinin deksametazon ile 72 saat muamelesi sonucunda elde edilen IC50 değerleri.....	37
13	Siomisin A ve deksametazonun beraber uygulanmasının Jurkat hücreleri çoğalması üzerindeki etkisi.....	38
14	İzobologram analizleri, doz-etki eğrisi.....	39
15	Siomisin A ve deksametazon ile muamele edilen hücrelerin hücre döngüsü analizleri.....	40

KISALTMALAR

ALL: Akut lenfoblastik lösemi

AML: Akut myeloid lösemi

AP-1: Aktive edici protein-1

CDK: Siklin bağımlı kinaz (*Cyclin dependent kinase*)

c-DNA: Komplementer DNA (*Complementary DNA*)

COX-2: Siklooksigenaz-2 (*Cyclooxygenase-2*)

DMSO: Dimetilsülfoksit

EGIL: Lösemilerin immunolojik karakterizasyonu-Avrupa grubu

(*European Group for the Immunologic Characterisation of Leukemias*)

EGFR: Epidermal büyüme faktörü reseptörü (*Epidermal growth factor receptor*)

ER: Östrojen reseptörü (*Estrogen receptor*)

ERK: Ekstrasellüler regüle kinaz (*Extracellular signal regulated kinase*)

FISH: Floresan in situ hibridizasyon

HIF: Hipoksi indüklenebilir faktör (*Hypoxia inducible factor*)

IC50: Hücrelerin %50'sinin öldüğü ilaç konsantrasyonu

(*The half maximal inhibitory concentration*)

MAPK: Mitojen aktive protein kinaz (*Mitogen activated protein kinase*)

MHC: Majör histokompatibilite kompleksi (*Major histocompatibility complex*)

MLL: Karışık lineage lösemi (*Mixed lineage leukemia*)

MMP: Matriks metalloproteinaz

MRD: Minimal rezidüel hastalık (*Minimal residual disease*)

MSS: Merkezi sinir sistemi

mTOR: Rapamisinin memeli protein hedefi (*Mammalian target of rapamycin*)

NF-κB: Nükleer faktör-κB

PBS: Fosfat tampon çözeltisi (*Phosphate buffered saline*)

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu (*Polymerase chain reaction*)

PI: Propidium iyodür

PI3K: Fosfatidol inositol 3-kinaz

Plk-1: Polo benzeri kinaz (*Polo like kinase*)

SHH: Sonik hedhehog (*Sonic hedhehog*)

ROS: Reaktif oksijen türleri (*Reactive oxygen speice*)

siRNA: Küçük interferan RNA (*Small interfering RNA*)

T-ALL: T hücreli akut lenfoblastik lösemi

TCR: T hücre reseptör (*T-cell receptor*)

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü (*Vascular endothelial growth factor*)

6-MP: 6-merkaptopürin

ÖZET

AKUT LENFOBlastİK LÖSEMİ HÜCRE HATTINDA FOXM1 GEN EKSPRESYON SEVİYESİNİN BELİRLENMESİ VE FOXM1'İN DEKSAMETAZON VE FOXM1 İNHİBİTÖRÜ SİOMİSİN A KULLANILARAK HEDEFLENMESİ

Giriş ve Amaç: FoxM1 hücre döngüsünün düzenlenmesinde rol alan ve hücre çoğalmasını arttıran bir transkripsiyon faktörüdür. Son yıllarda yapılan çalışmalarda akciğer kanseri, glioblastom, prostat kanseri, bazal hücre karsinomu, hepatosellüler karsinom, meme kanseri ve pankreas kanserinde FoxM1 sinyal ağının bozulduğu ve gen ekspresyonunun yüksek oranda arttığı gösterilmiştir. Bir tiazol antibiyotiği olan siomisin A, FoxM1 transkripsiyonel aktivasyonunu önleyen önemli bir inhibitördür. Deksametazon, akut lenfoblastik lösemi (ALL) tedavisinde çok önemli yere sahip ve T-hücreli ALL'de diğer steroidlere göre daha etkin olduğu bilinen bir glukokortikoiddir. Bu çalışmamızda, Jurkat hücrelerinde (T-ALL hücre hattı) FoxM1 gen ekspresyon düzeyinin belirlenmesi ve FoxM1'in siomisin A ve deksametazon kullanarak hedeflenmesi ile bu ekspresyondaki değişikliklerin ve hücre çoğalması üzerindeki etkilerin incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereçler ve Yöntem: FoxM1 geninin ekspresyon düzeyleri Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ile gösterilmiştir. Siomisin A ve deksametazon'un Jurkat hücreleri üzerindeki hücre çoğalmasını engelleyici etkileri MTT hücre çoğalma testi ile saptanmıştır. Deksametazonun, siomisin A ile kombinasyonlarının olası sinerjistik, additif, nötral veya antagonistik etkilerinin belirlenmesi amacı ile izobologram analizi yapılmıştır. Bu ajanların apoptotik etkileri ise kaspaz-3 aktivitesindeki ve mitokondri zar potansiyelindeki bozulmalar ve fosfatidilserinin hücre zarındaki lokalizasyonu ile belirlenmiştir. Bu amaçla, sırasıyla, kaspaz-3 kolorimetrik kiti, JC-1 mitokondriyal membran potansiyeli kiti ve Anneksin V-FITC apoptoz ölçüm kiti kullanılmıştır. Siomisin A ve deksametazon'un hücre döngüsü üzerindeki etkilerinin araştırılması amacıyla, siomisin A ve deksametazon ile ayrı ayrı ve kombine şekilde muamele edilen hücreler propidyum iyodür ile boyanarak akım sitometrisinde analiz edilmiştir.

Bulgular: T-ALL hücre hattında FoxM1 gen ekspresyon seviyesinin belirgin derecede artmış olduğu ve siomisin A ve deksametazon uygulanan Jurkat hücrelerinde FoxM1 gen ekspresyon seviyelerinin her bir ilacın dozuna bağımlı olarak azaldığı gösterilmiştir. Bir ve 10 µM deksametazona 72 saat boyunca maruz bırakılan Jurkat hücrelerinin çoğalması kontrol grubuna göre %8 ve %13 azalırken, aynı dozlarda deksametazonun, siomisin A ile kombine

uygulanan hücrelerin çoğalmasını %74 ve %75 oranında baskıladığı izlenmiştir. Yapılan izobologram analizinde deksametazon ve siomisin A'nın çok kuvvetli sinerji gösterdikleri ortaya koyulmuştur. Gerçekleştirilen apoptotik testler, siomisin A ve deksametazon kombinasyonunun Jurkat hücreleri üzerinde apoptotik etkisi olmadığını göstermiştir. Hücre döngüsü analizinde, siomisin A ve deksametazon kombinasyonu ile FoxM1'in belirgin baskılandığı Jurkat hücrelerinin, G1 fazında durdurulduğu ve bölünmelerinin anlamlı derecede azaldığı gösterilmiştir.

Sonuç: FoxM1 ekspresyonunun T-ALL hücre hattında belirgin olarak artmış olduğu, bir FoxM1 inhibitörü olan siomisin A'nın ve deksametazonun lösemik hücre çoğalmasını hücre döngüsünü G1 fazında baskılayarak önemli oranda azalttığı gösterilmiştir. Tüm bu bulgular, FoxM1'in T- ALL patogenezinde olası bir rolü olduğunu ve FoxM1'in T-ALL tedavisinde önemli bir hedef olabileceğini göstermektedir.

Anahtar kelimeler: FoxM1, akut lenfoblastik lösemi, siomisin A

SUMMARY

DETERMINATION OF FOXM1 GENE EXPRESSION LEVEL IN ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA CELL LINE AND TARGETING FOXM1 BY DEXAMETHASONE AND FOXM1 INHIBITOR SIOMYCIN A

Introduction-Objective: FoxM1 is a transcriptional factor that takes play in regulation of cell cycle and promotes cell proliferation. Recent studies show that the FoxM1 signaling network is frequently deregulated in human malignancies with up-regulated expression of FoxM1 in lung cancer, glioblastomas, prostate cancer, basal cell carcinomas, hepatocellular carcinoma, and primary breast cancer and pancreatic cancer. Siomycin A, a thiazol antibiotic, is known to inhibit FoxM1 transcriptional activity. Dexamethasone is a glucocorticoid that is very important in treatment of acute lymphoblastic leukemia (ALL) and is known to be more potent compared to other steroids in the treatment of T-cell ALL. In this study, we aimed to determine the gene expression levels of FoxM1 in Jurkat cells (T-ALL cell line) and to investigate the changes in gene expression levels and the effects on cellular proliferation by targeting FoxM1 with siomycin A and dexamethasone.

Materials and methods: The gene expression levels of FoxM1 were studied with reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). The antiproliferative effects of siomycin A and dexamethasone on Jurkat cells were studied with MTT cell proliferation test. The possible synergistic, additive, neutral, and antagonistic effect of combination of dexamethasone and siomycin A was determined with isobologram analysis. The apoptotic effects of these two agents were evaluated by Caspase-3 activity, disturbances in mitochondrial membrane potential and localisation of phosphatidylserine in cellular membrane. For this purpose, Caspase-3 calorimetric assay kit, JC-1 mitochondrial membrane potential assay kit, and Annexin V-FITC apoptosis detection kit were used, respectively. For cell cycle analysis, siomycin A and dexamethasone treated Jurkat cells were stained with propidium iodide and analysed in flow-cytometer.

Results: We found that FoxM1 gene is overexpressed in T-ALL cell line and dexamethasone and siomycin A caused a reduction in gene expression levels of FoxM1 in Jurkat cells. Eight to 13 % decrease in proliferation of Jurkat cells were observed when these cells were treated with 1 and 10 μ M doses of dexamethasone for 72 hours, respectively. On the other hand, the same doses of dexamethasone combined with siomycin A caused 74% and 75% decrease in

proliferation of Jurkat cells. Isobologram analysis revealed very strong synergy between dexamethasone and siomycin A. Apoptotic tests showed no apoptotic activity of dexamethasone and siomycin A on Jurkat cells. Cell cycle analysis showed that, reduction of FOXM1 expression by combination of dexamethasone and siomycin A in Jurkat cells inhibited cell proliferation through induction of G1 phase arrest.

Conclusion: It is demonstrated that FoxM1 gene is strongly overexpressed in T-ALL cell line and targeting FoxM1 by siomycin A and dexamethasone caused a significant decrease in T-ALL cell proliferation through induction of G1 cell cycle arrest. All these findings suggest a possible role for FoxM1 in T-ALL pathogenesis and represent FoxM1 as an attractive target for T-ALL therapy.

Key words: FoxM1, acute lymphoblastic leukemia, siomycin A

1. GİRİŞ ve AMAC

Lösemiler çocukluk çağı kanserlerinin %25-30'unu; akut lenfoblastik lösemiler (ALL) çocukluk çağı lösemilerinin %75-85'ini oluşturmaktadır (1). Lösemik lenfoblastların morfolojik, immunolojik, sitogenetik ve moleküler genetik özelliklerinin incelenmesi ile ALL'nin biyolojik çeşitliliği gösterilmiştir (2). Son yıllarda risk gruplarına göre tedavi yaklaşımlarının belirlenmesi, yeni antineoplastik ilaçların devreye girmesi ve bakım ve destek imkanlarının daha da iyileşmesiyle ALL'de 5-yıllık olaysız sağ kalım süresi %76-86 oranlarına ulaşmıştır (3-5). Tedavi başarısı yüksek olmasına karşın halen çocukluk çağı lösemilerinin önemli bir alt grubunda hastalık tekrarlamakta ya da tam remisyon sağlanamamaktadır. Belirli bazı sitogenetik anormallikler, ağır hipodiploidi varlığı ve "mixed lineage leukemia" (MLL) geni yeniden düzenlenmesi olan hastalarda remisyon indüksiyon başarısızlığı ya da hastalığın tekrarlama riskinin artmış olduğu ve olaysız sağ kalım süresinin %40'ın altına düştüğü bilinmektedir (6,7). Pediatrik ALL'lerin % 15'ini oluşturan T-hücre lösemilerinin tedavi başarısı da B-hücre lösemisine göre daha düşüktür. Yapılan çalışmalar tekrarlayan ALL'de T-hücre lösemi için genel sağ kalım oranının düşük (%15) olduğunu göstermiştir (8).

ALL'de; moleküler bozuklukları tanımlamada çok önemli gelişmeler kaydedilmiş olmasına karşın, bu değişikliklerin ne şekilde bir iş birliği ile lösemiye neden oldukları ya da ilaç direncini nasıl oluşturdıkları henüz tam olarak belirlenememiştir. Son dönemlerde lösemi patogenezi ve prognozu üzerine yapılan geniş kapsamlı genetik çalışmalar bir yandan da hedefe yönelik tedavilerin gelişmesine zemin hazırlamıştır. Hedefe yönelik tedavilerin başarılı olması durumunda antineoplastik ajanların kullanımı ve bunlarla ilişkili toksisiteler azalırken sağ kalım oranları yükselecek ve hastalığın tekrarlama riski azalacaktır (9).

"Forkhead box protein M1" (FoxM1) evrimsel olarak korunmuş ve "forkhead box" ya da "winged helix domain" olarak adlandırılan DNA-bağlayıcı bölge (*DNA-binding domain*) varlığı ile karakterize bir transkripsiyon faktörüdür (10). Son yıllarda FoxM1 üzerine yapılan çalışmalar bu transkripsiyon faktörünün tümör oluşumu ve yayılımındaki biyolojik rolünü gün geçtikçe daha çok desteklemektedir (11-13). FoxM1'in hücre çoğalmasında görev aldığı ve G₁'den S- fazına ve G₂'den mitozaya ilerlerken anahtar hücre döngü düzenleyicilerden biri olduğu ve FoxM1 ekspresyon kaybının mitotik ağırlarda bozukluklara ve hücre mitozunun gecikmesine neden olduğu tespit edilmiştir (14-22).

FoxM1'in hücre çoğalması ve apoptozu arasındaki dengenin idamesini içeren hücresel gelişim yollarında önemli roller oynadığı ve FoxM1 sinyal iletimindeki değişikliklerin karsinogenezle ilişkili olduğu bilinmektedir (13,19). Son yıllarda artan sayıda yapılan çalışmalarda akciğer kanseri, glioblastom, prostat kanseri, bazal hücre karsinomu, ve pankreas kanseri gibi bir çok solid organ kanserinde FoxM1 sinyal ağının bozulduğu ve *up-regüle* olduğu gösterilmiştir (11-13,23-25). Bütün bu sonuçlar FoxM1'in lösemi patogenezindeki yeri hakkında merak uyandırmaktadır. Literatürde lösemi patogenezindeki yeri ile ilgili bugüne kadar yapılmış sadece bir çalışma olup, bu çalışmada FoxM1'in akut miyeloid lösemi (AML) hücrelerindeki ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Bu çalışmada FoxM1 mRNA'sının AML hücrelerinde yüksek oranda eksprese edildiği ve artmış ekspresyonunun AML hücre çoğalmasını arttırdığı gösterilmiştir (26).

FoxM1'in hangi moleküler mekanizmalarla tümör oluşumuna neden olduğu tam olarak bilinmemektedir. Ancak yapılan çalışmalarda FoxM1 yolağının; bir çok onkogenik yolakla kesiştiği ve bu yollarla yer alan genlerin ekspresyon düzeylerinde değişikliklere yol açtığı gösterilmiştir (10).

Yapılan çalışmalarda tiazol grubu antibiyotiklerden siomisin A'nın FoxM1 transkripsiyonel aktivasyonunu önlediği belirlenmiştir (27,28). İnsan kanser hücrelerine siomisin A uygulanmasının FOXM1'in *down-regülasyonuna* neden olarak etkin apoptozu neden olduğu gösterilmiştir (27,28,30). Yapılan tüm bu çalışmalar, kanser patogenezinde önemli bir role sahip FoxM1'i hedef alan kimyasal bileşiklerin anti-kanser ilaç olarak kullanılabileceği fikrini akla getirmektedir.

Bu çalışmanın amacı; FoxM1'in T-hücre lösemi patogenezindeki rolünü araştırmak; T-lenfoblastik lösemi hücre kültüründe FoxM1 gen ekspresyon seviyelerini belirlemek ve siomisin A uygulanarak elde edilecek FoxM1 inaktivasyonunun çoğalma ve apoptoz üzerine etkisini incelemek; siomisin A ile ALL'de önemli tedavi ajanlarından biri olan deksametazonun beraber uygulanmasının olası sinerjistik, sitotoksik ve apoptotik etkilerini incelemek ve bu ajanların uygulandığı T-lenfoblastik lösemi hücrelerinde gen ekspresyon profilindeki değişimleri izlemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİ

2.1.1 Lökogenez

Lösemiler, hematopoetik öncül hücrelerin neoplastik değişimi sonucu ortaya çıkan klonal hastalıklardır. Bir veya daha fazla etken varlığında hematopoetik öncül hücrelerde oluşan kromozomal bozukluk ve mutasyonlar sonucunda, hücre döngüsünde yer alan birçok ileti moleküllerini kodlayan genlerdeki yapısal ve işlevsel değişiklik hematopoetik hücrenin kanserleşmesi (lösemik kök hücre) ile sonuçlanır (31,32).

ALL, B-ya da T-hücre dizisine yönelmiş tek bir hematopoetik öncül hücreden köken alan maliyn bir hastalıktır. Normal lenfosit gelişimi merkezi lenfoid organlarda gerçekleşir; bu yerler B- hücreleri için kemik iliği iken T-hücreler için timustur. Olgunlaşma sürecinde belirli hücre yüzey reseptörleri (IL-7 reseptör, NOTCH reseptörleri vb.), bir dizi gen ekspresyonu sonucunda B-hücre ya da T-hücre oluşumunu sağlayacak bir süreç başlatmak üzere tetiklenirler. Bu reseptörler öncül hücrelerin çoğalmasını ve antijen reseptör genlerin yeniden düzenlenmesini sağlar. Olgun, özgül antijen reseptörünün edinilmesi ve ekspresyonu B- ve T-hücre olgunlaşma sürecinin esas özelliğidir. Bu süreçte öncül hücrelerde gelişen bir dizi genetik anormallik sonucunda hücre olgunlaşamaz, farklılaşmada duraklama gerçekleşir, kontrol edilemez bir şekilde çoğalır ve lenfoblastik lösemi gelişir (32).

Lökogeneze neden olan değişiklikler aşağıda yazılı şekilde özetlenebilir:

1. **Kromozomal yeniden düzenlenmeler sonucu** proto-onkogenlerin *overekspresyonu* (örn. *NOTCH1*, *MYB*, *HOXA*, *TAL1* gibi T-hücre reseptör (TCR)genleri)
2. Onkogenik karakterde yeni füzyon genlerin oluşumuna yol açan **translokasyonlar** (örn. t(12,21)/*ETV6-RUNX* ve t(9,22)/*BCR-ABL1* translokasyonları)
3. Tümör supresör genlerin kaybına yol açan **genomik delesyonlar** (örn. *CDKN2A* tümör supresör gen kaybı)
4. **Gen duplikasyonları ya da amplifikasyonları** (örn. *MYB* onkogeninin duplikasyonu ya da *NUP214-ABL1* varyant füzyon geninin amplifikasyonu)
5. **Aktive edici ya da inaktive edici gen mutasyonları** (örn. *NOTCH1* aktivasyonu)
6. **Genomik imbalans** (32).

Çok basamaklı lökomogenez

Lösemi anormal öncül hücre tarafından kazanılmış çok sayıda genetik defekt sonucunda ortaya çıkar. Örneğin T-hücre ALL'de (T-ALL) *NOTCH1* mutasyonu kendini yenileme kapasitesini artırır, translokasyonla onkojen aktivasyonu çoğalmayı tetikleyip maturasyon duraklamasına neden olur ve hücre döngü kontrolünde bozukluk da anormal klonun genişlemesine neden olur (33).

Farklaşma duraklaması

B- ve T-ALL heterojen hastalıklardır. Bu heterojenite hem altta yatan genetik bozuklukların kompleks yapısı ve çeşitliliğinin bir sonucu hem de öncül hücrelerdeki farklılaşma sürecinde genetik bozuklukların olduğu farklı evrelerin yansımalarının bir sonucudur. Kemik iliği/timik öncül hücrelerin olgun T-ya da B-lenfosit haline dönüşme sürecinde hücreler farklı evrelerde belirli hücre yüzey immunglobulin ve antijenlerin ekspresyonuyla tanımlanırlar. B-öncül hücre ve T-ALL'nin farklı alt tipleri farklılaşmada duraklama olan evredeki B-ya da T-hücresinin antijenik özelliklerini taşırlar. Bu lenfoblast belirteçler risk değerlendirmesinde ve minimal rezidüel hastalık (MRD) tayininde kullanılırlar (34).

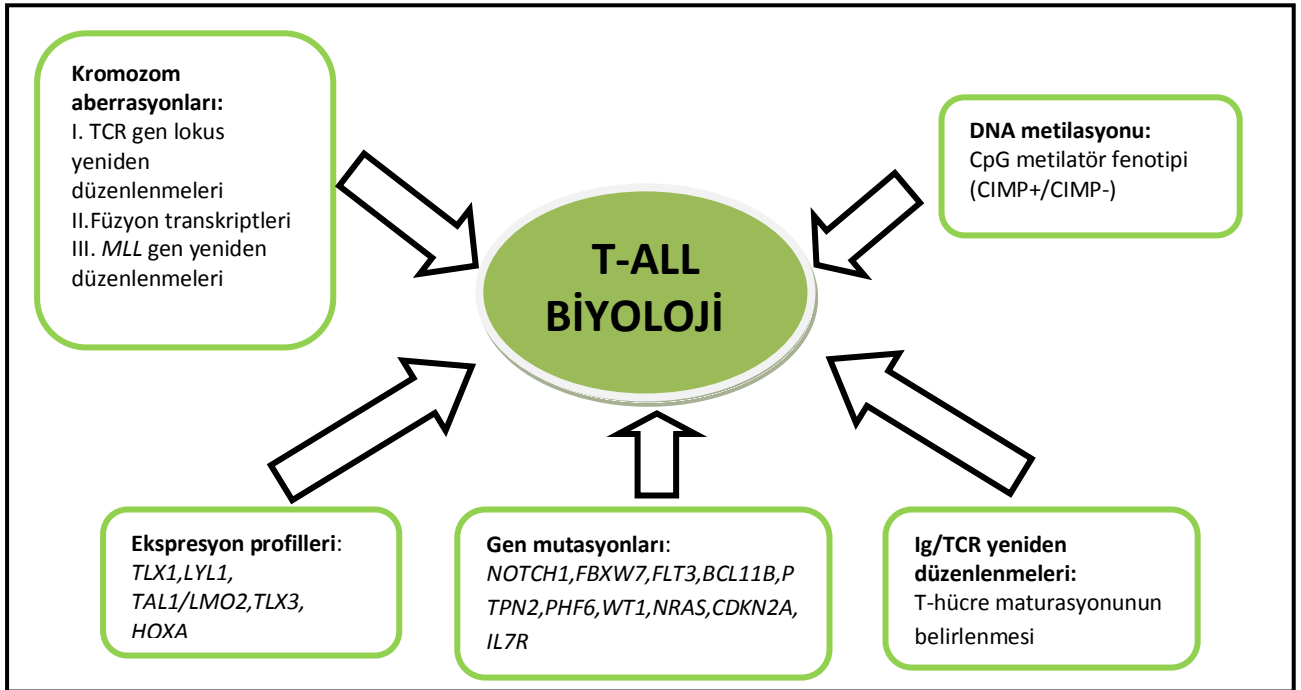
2.1.2 T-hücre Lenfogenez ve Lökomogenez

Ortak lenfoid öncül hücreler timusa ulaştıklarında, timik mikroçevreden sinyaller alırlar ve bu şekilde sadece T-hücre dizisine yönlendirilmiş olurlar. Olgun olmayan yönlendirilmiş lenfositler, bunlara timosit denmektedir, iki çok önemli basamaktan geçerler. Birinci aşamada özgün olgun TCR edinilmesinden sonra reseptörün farklı zincirlerini kodlayan genlerde yeniden düzenlenme gerçekleşir. İkinci aşama ise işlevsel reseptörleri olan ve timik epitelyal hücreler tarafından majör histokompatibilite kompleks (MHC) yoluyla sunulan belirli antijenleri taşıma kapasitesine sahip timositlerin belirlendiği seçim sürecidir. Pozitif olarak seçildikleri durumda timositler fonksiyonel TCR 'dan hücre çekirdeğine farklı sinyal proteinleri ile iletilen sinyaller aracılığı ile hücrenin yaşamını sürdürmesi için gerekli olan genlerinin transkripsiyonunu başlatırlar. Bu aktif hale gelmiş sinyal proteinler arasında LCK, ABL1 gibi tirozin kinazlar bulunur (35).

Timosit gelişimi transkripsiyon faktörleri ve E2A gibi hematopoez düzenleyicileri tarafından düzenlenir. NOTCH ailesi proteinleri, HOX proteinleri, MYB, IKAROS ise T-hücre yönlendirme, farklılaşma ve çoğalma sürecinde yer alırlar. NOTCH proteinleri ayrıca öncül hücrenin kendini yenilemesinde de önemli rol oynarlar (36).

T-ALL biyolojisi beş ana başlık altında toplanabilir (Şekil-1) (37).

- 1- Kromozomal aberasyonlar
- 2- Gen ekspresyon profilleri
- 3- Gen mutasyonları
- 4- Immunglobulin(Ig)/TCR yeniden düzenlenmeleri
- 5- DNA metilasyonu



Şekil 1: T-hücreli akut lenfoblastik lösemi biyolojik özelliklerinin şematik olarak gösterilmesi

T- ALL'ye neden olabilecek tüm bu genetik değişiklikler Tip A ve Tip B alt gruplarına ayrılırlar. Tip A mutasyonları, hastanın gen ekspresyonunu tek başına belirleyen ve spesifik moleküler-sitogenetik T-ALL alt tiplerini oluşturan mutasyonlardır. Tip B mutasyonları ise, hemen hemen tüm T-ALL alt tiplerinde bulunan T-hücre patogenezi sırasında tip A mutasyonları ile sinerji gösteren mutasyonlardır (Tablo-1,2)(38).

Tablo 1: T- hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi'de Tip A Genetik Mutasyonları

	Yeniden düzenlenme	Gen(ler)	T-hücre duraklaması
TAL/LMO alt grubu	t(1;14)(p32;q11)/t(1;7)(p32;q34) 1p32 delesyonu t(7;9)(q34;q32) t(11;14)(p15;q11)/t(7;11)(q34;p15) t(11;14)(p13;q11)/t(7;11)(q34;p13) 11p13 delesyonları	<i>TAL1</i> <i>STIL/TAL1</i> <i>TAL2</i> <i>LMO1</i> <i>LMO2</i> <i>LMO2</i>	Pre- $\alpha\beta$ /TCR- $\alpha\beta$ Pre- $\alpha\beta$ /TCR- $\alpha\beta$ Bilinmiyor Bilinmiyor Immatür /pre- $\alpha\beta$ /TCR- $\alpha\beta$ Immatür /pre- $\alpha\beta$ /TCR- $\alpha\beta$
TLX1 alt grubu	t(10;14)(q24;q11)/t(7;10)(q34;q24)	<i>TLX1/HOX11</i>	Immatür /pre- $\alpha\beta$
TLX3 alt grubu	t(5;14)(q35;q32)	<i>TLX3/HOX11L2</i>	Immatür /pre- $\alpha\beta/\delta$
HOXA alt grubu	inv(7)(p15;q34)/t(7;7)(p15;q34) t(10;11)(p13;q14) t(11;19)(q23;p13) 9q34 delesyonları	<i>HOXA@</i> <i>PICALM-MLLT10</i> <i>MLL-MLLT1</i> <i>SET-NUP214</i>	TCR- $\alpha\beta$ veya TCR- δ Immatür/ δ Immatür/ δ Immatür/ δ
MYB alt grubu	t(6;7)(q22;q34)	<i>MYB</i>	Bilinmiyor
Bilinmeyen	t(7;19)(q34;p13) t(14;21)(q11.2;q22)	<i>LYL1</i> <i>OLIG2</i>	Bilinmiyor Bilinmiyor

Tablo 2: T- hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi'de Tip B Genetik Mutasyonları

	Yeniden düzenlenme	Gen(ler)	Fonksiyon
Hücre döngü defektleri	9p21 delesyonları/hipermetilasyon t(7;12)(q34;p13)/t(12;14)(p13;q11)	<i>CDKN2A/2B</i> <i>CCND2</i>	Hücre döngüsünde inhibitör Hücre döngüsünde aktivatör
NOTCH aktivasyonu	t(7;9)(q34;q34) Mutasyonlar Mutasyonlar	<i>NOTCH1</i> <i>NOTCH1</i> <i>FBXW7</i>	Kendini yenileme, farklılaşma T-hücre commitment Proteazomal yıkım
Pre(TCR) sinyal ileti yolağı	t(1;7)(p34;q34) Mutasyonlar 17q11.2 delesyonu 10q23.31 delesyonu Mutasyonlar	<i>LCK</i> <i>RAS</i> <i>NF1</i> <i>PTEN</i> <i>PTEN</i>	Sinyal iletimi Sinyal iletimi RAS inhibitörü Sinyal iletimi Sinyal iletimi
Deregülasyon T-hücre farklılaşması Diğer tirozin kinazların aktivasyonu	Duplikasyon Epizomal 9q34 amplifikasyonu t(9;14)(q34;q32) t(9;12)(q34;p13) t(9;22)(q34;q11) t(9;12)(p24;p13) Mutasyonlar	<i>MYB</i> <i>NUP214-</i> <i>ABL1</i> <i>EML1-ABL1</i> <i>ETV6-ABL1</i> <i>BCR-ABL1</i> <i>ETV6-JAK2</i> <i>FLT3</i>	Transkripsiyon faktörü Transkripsiyon faktörü Transkripsiyon faktörü Transkripsiyon faktörü Transkripsiyon faktörü Tirozin kinaz reseptör sinyali

2.1.3 ALL:Epidemiyoloji, Sınıflandırma ve Prognostik Faktörler

Lösemi çocukluk çağında en sık görülen kanser tipi olup bu dönemdeki kanserlerin %25-35'ini oluşturur (1). Ülkemiz çocukluk çağı kanser kayıtlarında lösemi sıklığı %31,3 olarak

bildirilmektedir (39). ALL ise tüm çocukluk çağı lösemilerinin %75-85'ini oluşturmaktadır (1).

Lösemik lenfoblastların morfolojik, immunolojik, sitogenetik ve moleküler genetik özelliklerinin incelenmesi ile ALL'nin biyolojik çeşitliliği gösterilmiştir (2). Hücre morfolojisi ve sitokimyanın tek tanı yöntemi olduğu 70'li yıllardan günümüze gelişen tanısal yöntemlerle immünofenotip tayini, klasik sitogenetik, floresans in situ hibridizasyon (FISH) ve moleküler genetik tetkikler rutin incelemeler arasına girmiştir (40). Lenfoblastların bu yöntemlerle saptanan özelliklerine göre farklı davranış ve klinik seyir gösteren ALL tipleri tanımlanmış ve buna göre risk grupları ve tedavi seçenekleri belirlenmiştir.

Avrupa'lı araştırmacıların yayınladığı EGIL (European Group for the Immunologic Characterisation of Leukemias) kriterlerine göre ALL'nin immünolojik sınıflaması Tablo-3'de gösterilmiştir (41). Buna göre akut lenfoblastik lösemilerin %80-85'ini B-hücreli ALL oluştururken %15-20'sini T-hücreli ALL oluşturur (35).

Standart genetik analizler ALL'li olguların %75'den fazlasında primer genetik anormallikleri saptarlar ancak genetik değişikliklerin tümünü belirleyemezler. Yüksek rezolüsyonlu genom analizleri, DNA kopya sayısı değişiklikleri, heterozigosite kaybı, epigenetik değişiklikler ve tüm genom dizilimi yöntemlerinin gelişmesi ile bir çok genetik anormallik saptanabilmektedir. Günümüzde ALL'li çoğu hastada bulundurduğu spesifik genetik anormalliğe göre sınıflandırma yapılabilir (Şekil 2) (3). Bu çalışmalar genetik değişikliklerin karmaşık etkileşimlerinin lökomogenez ve tedavi yanıtındaki yerini belirlemede yardımcı olmuştur (3).

Primer somatik genetik anormalliklerin lökomogenezde ve ALL prognozunda ve tedavisinde kritik prognostik ve terapötik rolleri vardır (Tablo-4) (3).

ALL'de lenfoblastlarda tanımlanan bazı özelliklerin yanı sıra tanı yaşı, lökosit sayısı ve tedaviye yanıt gibi faktörlerin de prognoz üzerinde çok önemli etkileri olduğu bilinmektedir. Bu faktörler uygulanan tedavi protokolüne göre değişebilmekle birlikte, hiçbir koşulda değerini kaybetmemektedirler (3,42-45).

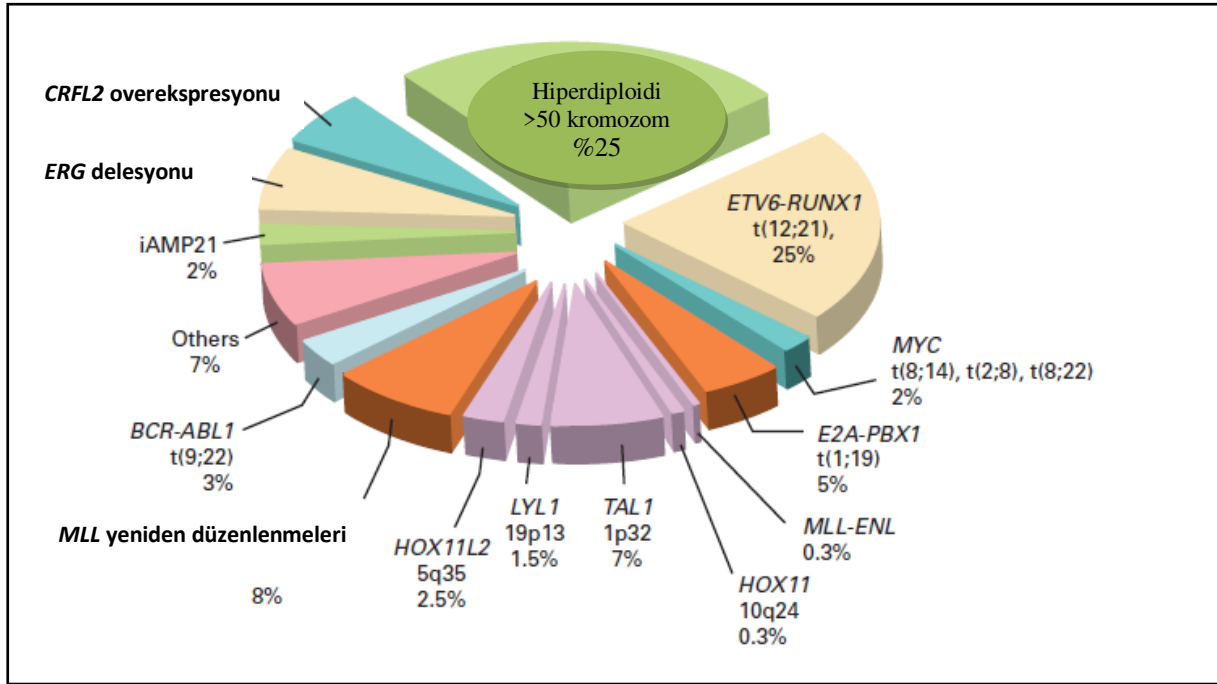
Tablo 3: EGIL'e Göre Akut Lenfoblastik Lösemi'nin İmmünolojik Sınıflaması

1- B hücreli ALL* (CD19+ ve/veya CD79a+ ve/veya CD22+)		
Pro-B-ALL (B-I)		Başka bir B dizisine ait farklılaşma antijeni yok
Common ALL (B-II)		CD10+
Pre-B-ALL (B-III)		Sitoplazmik IgM+
Matür B-ALL (B-IV)		Sitoplazmik veya yüzey κ veya λ pozitif
2- T hücreli ALL** (sitoplazmik/yüzey CD3+)		
Pro-T-ALL (T-I)		CD7+
Pre-T-ALL (T-II)		CD2+ ve/veya CD5+ ve/veya CD8 pozitif
Kortikal T-ALL (T-III)		CD1a+
Matür T-ALL (T-IV)		Yüzey CD3+, CD1a-
α/β + T-ALL (Grup a)		Anti-TCR α/β +
γ/δ + T-ALL (Grup b)		Anti-TCR γ/δ +
3- Miyeloid antijen + ALL (BAL† kriterlerine uymayan olgular)		

* :Üç belirteçten en az 2'si +. Çoğu olgu TdT+ ve B-IV hariç HLA-DR+

** :Çoğu olgu TdT+, HLA-DR-, CD34- olmakla birlikte bu belirteçler tanı veya sınıflama için kullanılamaz

† :Bifenotipik akut lösemi



Şekil 2: Çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemide genetik anormallikler

Tablo 4: Çocukluk Çağı Bazı Akut Lenfoblastik Lösemi Alt Tiplerinin Özellikleri ve Klinik Seyirleri

Alt tip	Sıklık (%)	Klinik seyir	Tahmini 5 yıllık genel sağkalım (%)
B-hücre prekürsör			
Hiperdiploidi >50	20-30	Antimetabolit bazlı tedavi ile mükemmel prognoz	85-95
t(12;21)(p13;q22) <i>ETV6-RUNX</i>	15-25	CD13 ve CD33 miyeloid antijen ekspresyonu Yoğun asparajinaz tedavisi ile mükemmel prognoz	80-95
Trisomi 4 ve 10	20-25	Antimetabolit tedavi ile mükemmel prognoz	85-90
t(1;19)(q23;p13) <i>TCF3-PBX1</i>	2-6	Siyah ırkta artmış insidans, yüksek doz metotreksat tedavisi ile mükemmel prognoz, bazı çalışmalarda artmış MSS relaps riski	80-85
Kromozom 21'in intrakromozomal amplifikasyonu	2-3	Büyük çocuklarda ve adolesanlarda daha sık, kötü prognoz; yoğun indüksiyon ve erken re-intensifikasyondan fayda görürler	30-40
t(4;11)(q21;q23) <i>MLL-AF4</i>	1-2	Kötü prognoz, infant döneminde özellikle <6 ay sık, FLT-3 overekspresyonu	30-40
t(9;22)(q34;q11.2) <i>BCR-ABL1</i>	2-4	İmatinib ve yoğun tedavi erken tedavi yanıtını iyileştirmiştir	80-90 (3yılıda)
t(8;14)(q23;q32.3)	2	Yüksek doz metotreksat, sitarabin ve iklofosfamid içeren kısa dönem yoğun tedavi ile iyi prognoz	75-85
Hipodiploidi <44	1-2	Kötü prognoz	35-40
<i>CRFL2</i> overekspresyonu	6-7	Kötü prognoz, Down Sendromlu hastalarda sık	?
T-hücre			
<i>TAL/LMO</i> yeniden düzenlenmesi	15-30	Genellikle iyi prognoz, histon deasetilaz inhibitörlerine potansiyel yanıt	?
<i>HOX11</i> yeniden düzenlenmesi	7-8	İyi prognoz	?
<i>HOX11L2(TLX3)</i> yeniden düzenlenmesi	20-24	Bazı çalışmalarda kötü prognoz	?
<i>HOXA</i> yeniden düzenlenmesi	4-5	Kötü prognoz, histon H3K79 metiltransferaz inhibitörüne potansiyel yanıt	?
<i>NUP214-ABL1</i>	6	Tirozin kinaz inhibitörüne duyarlı	~50
<i>MLL-ENL</i>	2-3	İyi prognoz	80-90
Erken T-hücre prekürsör	12	Kötü prognoz, myeloid ya da kök hücre ekspresyonu	30-35
Kooperasyon mutasyonları			
B-hücre prekürsör			
<i>IKZF1</i> delesyon/mutasyon	15-30	Kötü prognoz, asparajinaz ve daunorubisine dirençli	50-55
<i>JAK</i> mutasyonları	2-5?	Yüksek risk hastalarda daha sık, Down Sendromlu hastaların %20'sinde <i>JAK2</i> mutasyonu, <i>JAK2</i> inhibitörlere potansiyel yanıt	~60
T-hücre			
<i>NOTCH/FBXW7</i> mutasyonları	50	İyi prognoz, <i>NOTCH</i> inhibitörlere potansiyel yanıt	90
<i>PTEN-P13K-AKT</i> yolağı	~50	Kötü prognoz?	?
<i>CDKN2A/2B</i> delesyonları	~70	DNA metiltransferaz inhibitörlere potansiyel yanıt	?

ALL'de lenfoblastlarda tanımlanan bazı özelliklerin yanı sıra tanı yaşı, lökosit sayısı ve tedaviye yanıt gibi faktörlerin de prognoz üzerinde çok önemli etkileri olduğu bilinmektedir. Bu faktörler uygulanan tedavi protokolüne göre değişebilmekle birlikte, hiçbir koşulda değerini kaybetmemektedirler (3,42-45).

Minimal rezidüel hastalık

Moleküler genetik tetkiklerin ilerlemesiyle minimal rezidüel hastalık (MRD) tayini yaygın olarak kullanılmaya başlanmış ve tedaviye yanıt daha güvenilir bir şekilde değerlendirilmeye başlanmıştır. ALL'li hastaların risk grubunu belirlemede kullanılan tanı ve erken tedavi dönemindeki tüm parametrelerin bir sınırı vardır. Kemik iliğinde MRD ölçümü blast hücrelerinin morfolojik incelenmesinden çok daha özgün ve duyarlı bir yöntemdir. MRD ölçümü için çoklu akım sitometresi ile lösemik hücre belirleyici immünfenotip aranır veya polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile klonal antijen-reseptör geni yeniden düzenlemelerinin analizi yapılır (46). İndüksiyon tedavisi sonunda çekirdekli kemik iliği hücrelerinin %0.01'inden azında lösemik tutulum saptanmasıyla tanımlanan immunolojik veya moleküler remisyon görülen hastalarda relaps riski bu durumda olmayanlardan çok daha azdır. Remisyon indüksiyonu tedavisin sonunda morfolojik remisyonda olup da MRD düzeyi %1 veya daha fazla olan hastaların relaps riski ise çok yüksektir (47,48). ALL'de genel olarak kabul görmüş prognostik faktörler Tablo-5 de gösterilmiştir. (Tablo-5) (42-46).

Tablo 5: Akut Lenfoblastik Lösemi'de Prognozu Etkileyen Faktörler

Faktör	İyi	Orta	Kötü
Tanı yaşı	1-9 yaş	≥ 10 yaş	<1 ve MLL+
Beyaz küre sayısı	< 50.000/μL	≥ 50.000/μL	
Genotip	-Hiperdiploidi (>50 kromozom) ya da DNA indeksi >1.16 -t(12;21)/ETV6/CBFA2füzyonu -Trisomi 4,10,17 varlığı	-Diploidi - t(1;19)/TCF3-PBX1	-Hipodiploidi (<45 kromozom) -t(9;22)/BCR-ABL1 füzyonu -t(4;11)/MLL-AF4 füzyonu
İmmünfenotip	Prekürsor B hücre	T-hücre	
MSS* lösemisi	CNS1**	CNS2** Travmatik ve blast +	CNS3**
8. günde periferik kanda blast sayısı	<1000/μL		>1000/μL
İndüksiyon tedavisine yanıtızlık	Hayır		Evet
MRD† varlığı	<%0.01	%0.01-%0.99	>%1

*:MSS: Merkezi sinir sistemi **:CNS1:MSS'de blast yok CNS2: MSS'de <5/ μL blast CNS3: MSS'de ≥5/μL blast

†: Minimal rezidüel hastalık

2.1.4 ALL: Tedavi

2.1.4.1 Destek Tedavisi

Destek tedavisi; enfeksiyonlara karşı profilaksi ve tedavi, febril nötropeni tedavisi, hematolojik replasman, tümör lizis sendromu tedavisi, dissemine intravasküler koagülopati tedavisi, bulantı, kusma, ağrı semptomlarının giderilmesi, hasta ve ailesine psikososyal destek sağlanması, gerektiğinde total parenteral nutrisyon, tedavilerin yan etkilerinin engellenmesi ya da azaltılmasını kapsar (49).

2.1.4.2 Çoklu Ajan Kemoterapi Protokolleri

Bugün dünyanın pek çok ülkesinde ALL'li çocukların tedavisi için iki büyük çalışma grubunun tedavi protokolleri veya bu protokoller temel oluşturacak şekilde o ülkenin koşulları gözönüne alınarak hazırlanan benzerleri kullanılır. Bu iki büyük çalışma grubundan birisi Avrupa'da, Berlin, Frankfurt ve Münster şehirlerindeki merkezlerin birlikte başlattıkları ve bugün bir çok ülkenin katıldığı Alman "BFM Çalışma Grubu" diğeri de Kuzey Amerika kıtasındaki hemen hemen tüm merkezlerin katıldığı "Children's Oncology Group" (COG) dur.

Günümüzde ALL'de uygulanan çoklu ajan kemoterapi protokolleri dört ana öğeden oluşur: İndüksiyon, merkezi sinir sistemine (MSS) yönelik tedavi ve konsolidasyon, reindüksiyon ve idame. MSS profilaksisi ise hemen tedaviyle birlikte başlayarak MSS tutulumu, lösemi tipi ve risk grubuna göre değişen süre ve yoğunlukta uygulanır (46).

İndüksiyon

İndüksiyon tedavisinin amacı 4-6 haftanın sonunda morfolojik remisyonu ve normal hematopoezin tekrar başlamasını sağlamaktır. Bu tedavi döneminde hastaya, hemen her zaman, bir glukokortikoid (prednizon, prednizolon veya deksametazon), vinkristin ile asparaginaz, intratekal tedavi ve/veya bir antrasiklin birlikte uygulanır. Glukokortikoidler ALL tedavisinin vazgeçilmez elemanları olduğu ve steroide erken yanıtın ALL tedavisinde çok önemli bir prognostik faktör olduğu bilinmektedir. Bazı protokollerde antrasiklin tüm hastalara verilirken bazı protokollerde sadece yüksek-risk hastalarına verilir (42-46). Glukokortikoidler sitotoksik etkilerini blastlar üzerindeki glukokortikoid reseptörlere bağlanarak gösterirler. Glukokortikoidler reseptörlere bağlandıktan sonra, reseptörler homodimerize olup hücre çekirdeğine geçer ve orada glukokortikoid yanıt elemanları ile etkileşime girip gen ekspresyonunu aktif hale getirirler. Ya da reseptörlerle etkileşimden sonra monomerik olarak kalıp aktive edici protein-1 (AP-1), nükleer faktör κB (NF-κB) gibi transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini baskırlar. Her iki süreçte de sitokin salınımı engellenir, bir çok onkogenin ekspresyonu değişir, hücre döngüsünde duraklama ve apoptoz

gerçekleşir (50). Bir çok tedavi protokolünde glukokortikoid olarak remisyon indüksiyonunda prednizon veya prednizolon, postremisyon tedavisinde de deksametazon yer almasına rağmen bazı protokoller indüksiyon tedavisinde de MSS'e geçişi, yarılanma ömrü ve sitotoksik etkisi daha fazla olan ve T-hücre lösemilerinde daha etkin olduğu bilinen deksametazon kullanımını önermektedir (46,51,52). Öte yandan deksametazonun erken ve geç yan etkilerinin daha fazla olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (53). Kemoterapi ve destek bakımındaki gelişmeler sonucunda bugün, ALL'li çocukların %95-98'inde, indüksiyon döneminin sonunda tam remisyon sağlanabilmektedir. Hastaların indüksiyon tedavisine verdikleri erken cevabın prognoz açısından önemi büyüktür, 14. günlerde değerlendirilen erken cevabı yavaş olanlarda relaps riski, hızlı olanlardan çok daha fazladır (42,54).

Konsolidasyon

İndüksiyon tedavisi sonunda ve normal hematopoez bulguları saptanınca konsolidasyon tedavisine başlanır. Tedavinin bu fazında uygulanan kemoterapötikler hastanın risk grubu ve tedavi protokolüne göre değişir. Haftalık ya da iki haftada bir inratekal tedavi ve yüksek doz metotreksat ve 6-merkaptopürinden (6-MP) oluşur. MSS'ye yönelik tedavi, MSS relapslarını önlemeyi ve sistemik minimal rezidüel lösemi yükünü azaltmayı hedefler. Yüksek riskli hastaların tedavisine sistemik tümör yükünü daha da azaltmak için siklofosfamid, sitarabin ve/veya yoğunlaştırılmış asparaginaz ve vinkristin eklenir (42-46).

Reindüksiyon (Geç intensifikasyon)

Genellikle tedavinin başlangıcından birkaç ay sonra uygulanır. Bu tedavi esas olarak önceki tedavi aşamalarının kısaltılarak tekrarı şeklindedir ve relaps riskini azaltmasıyla ALL tedavisinin en önemli komponentlerinden birini oluşturur (42-46).

İdame tedavisi

Olgun B-hücreli lösemi hariç ALL'de tedavi süresinin uzun olması gerekmektedir. Düşük yoğunluktaki idame kemoterapisi ile tedavi toplam 2-2,5 yıl kadar sürer. İdame tedavisini kısaltma çabaları olumlu sonuç vermemiştir. Her gün oral 6-MP ve haftada bir gün oral metotreksat idamede en çok kullanılan ilaç kombinasyonudur (42-46,54).

MSS profilaksisi

MSS lösemisine yönelik profilaksi yapılmayan hastaların %60'ında tedavinin herhangi bir yerinde MSS lösemisi ile karşılaşılır. MSS lösemisini arttıran risk faktörleri; lösemik hücre yükünün fazla oluşu, yüksek risk özellikleri, T-hücre immünofenotipi, infant lösemisi ve serebrospinal sıvıda lösemik hücre bulunmasıdır (55). MSS profilaksisi için uzun yıllar kraniyal ışınlama uygulanmış ancak radyoterapiye bağlı önemli geç yan etkilerin (ikincil kanserler, nörobilişsel bozukluklar ve endokrinopati) ortaya çıkmasıyla hem kraniyal ışınlama dozu azaltılmış hem de uygulanan hasta grubu daha da küçülmüştür. Bugün pek çok çalışma grubu radyasyonu yalnızca çok yüksek riskli veya ilk gelişte lökosit sayısı çok yüksek T-hücreli ya da MSS tutulumu olan hastalarda kullanmakta, diğer bütün hastalara tek ilaçlı ya da üçlü (metotreksat, sitarabin, hidrokortizon) intratekal profilaksi yapılmakta ve risk grubuna göre kan-beyin bariyerini aşabilen yüksek doz sistemik kemoterapi uygulanmaktadır (42-46,55,56).

2.1.4.3 Kök Hücre Transplantasyonu

Modern kemoterapi protokolleri ile çocukluk çağı ALL'li hastaların tedavi başarısı belirgin olarak yükselmiş olduğundan birinci tam remisyonda hematopoietik kök hücre transplantasyonu sadece çok yüksek risk kriterlerini taşıyorsa önerilmektedir. Öte yandan erken kemik iliği relapsı, erken izole MSS relapsı olanlarda allojeneik kök hücre nakli standart bir tedavi yaklaşımı olarak önerilir (57,58).

2.1.4.4 Hedefe Yönelik Tedavi

ALL'de moleküler bozuklukları tanımlamada çok önemli gelişmeler kaydedilmiş olmasına karşın, bu değişikliklerin ne şekilde bir iş birliği ile lösemiye neden oldukları ya da ilaç direncini nasıl oluşturdukları henüz tam olarak belirlenememiştir. Son dönemlerde lösemi patogenezi ve prognozu üzerine yapılan geniş kapsamlı genetik çalışmalar bir yandan da hedefe yönelik tedavilerin gelişmesine zemin hazırlamıştır. Modern lösemi tedavisinde en önemli amaç sağ kalım oranlarını arttırarak tedaviye bağlı yan etkileri en aza indirmektedir. Yeni tedavi yaklaşımları maliyn hücreleri seçici olarak öldürürken maliyn olmayan hücrelere en az hasarı vermek üzerine odaklanmıştır. Hedefe yönelik tedavilerin başarılı olması durumunda konvensiyonel, pan-sitotoksik antineoplastik ajanların kullanımı ve bunlarla ilişkili toksisiteler azalırken sağ kalım oranları yükselecek ve hastalığın tekrarlama riski azalacaktır (59).

Normal lenfosit büyümesi ve çoğalmasında bir çok biyokimyasal süreç yer almaktadır. Bu karmaşık süreçlerin düzenlenmesindeki herhangi bir bozukluk maliyn hücre çoğalmasına zemin hazırlar. Lenfoid lösemilerde maliyn hücre patolojik olarak değişmiş sinyal yolları sayesinde süresiz yaşama ve çoğalma avantajına sahiptir. ALL'de patolojik olarak *up-regüle* olan hücre içi yollar fosfatidol inositol 3-kinaz (PI3K)/Akt; “mitogen-activated protein kinase” (MAPK); “extracellular signal regulated kinase” (ERK) ve “mammalian target of rapamycin” (mTOR) gibi hücrenin yaşamını sürdürmesi ve çoğalmasını sağlayan ve apoptozu engelleyen yollardır. Bu yollar maliyn olmayan hücreler tarafından da kullanılmasına rağmen onları kanser tedavisi için mükemmel hedef haline getiren şey, maliyn hücrelerin yaşamlarını sürdürmelerinin sadece bu yollara bağlı olmasıdır. Bu yollar hedef alınarak bir çok antilösemik ajan geliştirilmiş ve halen geliştirilmektedir. (Tablo 6) (42,43,59).

Tablo 6: Akut Lenfoblastik Lösemi'de Geliştirilen Hedefe Yönelik Tedavi Ajanları

Sınıf	İsim	Hedef	ALL tipi
<i>ABL1 inhibitörler</i>	İmatinib	ABL1,cKIT	Ph+ALL
	Dasatinib	ABL1, SRC, cKIT	Ph+ALL
		EPHA, PDGFR	Ph+ALL
	Nilotinib	ABL1, cKIT	Ph+ALL
<i>FLT3 inhibitörleri</i>	Lestaurtanib	FLT-3	MLL-R + ALL
	Midostaurin	FLT-3	MLL-R + ALL
<i>mTOR inhibitörleri</i>	Rapamisin(silrolimus)	mTOR	Relaps/refrakter ALL
	Temsirolimus	mTOR	Relaps/refrakter ALL
<i>JAK2 inhibitörleri</i>	Lestaurtanib	JAK2	JAK mutasyon (+) ALL
<i>Aurora inhibitörleri</i>	MLN8237	Aurora A, ABL1	Relaps/refrakter ALL
<i>Multikinaz inhibitörler</i>	Sorafenib	RAF, FLT-3, VEGFR, PDGFR, cKIT, p38α	Relaps/refrakter ALL
<i>Proteazom inhibitörler</i>	Bortezomib	26S proteazom	Relaps/refrakter ALL
<i>BCL2antagonisti</i>	Obatoclaks	Pan-Anti-Apoptotik BCL2	Relaps/refrakter ALL
<i>Histon deasetilaz inhibitörleri</i>	Vorinostat	HDAC	Relaps/refrakter ALL
<i>DNA metiltransferaz inhibitörleri</i>	Desitabin	DNA metiltransferaz	Relaps/refrakter ALL
<i>CD antijen antikorları</i>	Rituksimab	CD20	CD20+ALL
	Epratuzimab	CD22	CD22+ ALL
	Alemtuzumab	CD52	CD52+ALL
	Bilinatamumab	CD19+ALL	CD3+T hücre kullanılarak
	(Bispesifik antikor)		CD19+ALL hedeflenir
<i>Diğer</i>	Demetileedici ajanlar	Hipermetilasyon	MLL-R+ALL
	Forodesin	Fosforilaz inhibitör	ALL
	Nelarabin	Hücre içi sitarabine çevrilir	T hücre ALL

Ph+ALL:Philadelphia kromozomu pozitif ALL **MLL-R + ALL:** MLL-yeniden düzenlemesi pozitif ALL

Hedef tedaviye en iyi örnek; anormal aktiviteye sahip *BCR-ABL* füzyon ürünü olan ve ABL1 tirozin kinazı inhibe eden imatinibdir. *BCR-ABL* pozitif pediatrik ALL'de sadece kemoterapi

ile %35 olan 3-yıllık olaysız sağ kalım süresi, imatinib kullanımı ile birlikte çok anlamlı bir iyileşme göstermiş ve %80'e kadar yükselmiştir (6). Ancak tek başına kullanıldığında imatinibe direnç gelişimi söz konusudur bu yüzden de ALL'de standart kemoterapi tedavisi ile birlikte kullanılması gerekmektedir, direnç gelişimi durumunda imatinibden çok daha etkin olan dasatinib ya da nilotinib kullanılabilir (60,61). Çok nadir olarak görülen *NUP214-ABL1* füzyonu olan T-hücre ALL'de de bu ürünlerin kullanılabileceği öne sürülmektedir (43).

T-hücre lösemilerin yarısında aktive edici *NOTCH1* gen reseptörlerinin bulunması da NOTCH yolağını hedef haline getirmiştir (62). Refrakter T-hücre ALL'de bu amaçla gamma sekretaz inhibitörleri kullanılmış ancak çalışmalar gastrointestinal yan etkileri nedeni ile durdurulmuştur (63). T-hücre ALL'de pürin nükleosid fosforilaz enzimini hedef alan forodesin ile ilgili çocukluk çağı ALL'de yürütülen çalışmalar vardır (64). Nelarabin ise intrasellüler olarak sitarabine çevrilebilen ve T-hücre ALL'de etkin olduğu bilinen bir başka ajandır (65).

Vahşi tip *FLT-3* tirozin kinaz overekspresyonu da özellikle *MLL*- yeniden düzenlenmesi olan ve hiperdiploidi olan ALL'de FLT-3 inhibitörlerle hedef tedavi için önemli fırsatlar sunmaktadır (66). Diğer bir tedavi şekli de *MLL*-yeniden düzenlenmesi olan ALL'deki hipermetilasyona yöneliktir. Demetile edici ajanlar *MLL*-yeniden düzenlenmesi pozitif olan infant lösemi hücrelerinin ölümüne yol açarlar (67).

Son olarak çocukluk çağı ALL'de farklı antijenlere yönelik monoklonal antikorlar (antiCD20, antiCD22 ve antiCD52) ile ilgili çalışmalar halen devam etmektedir (68-70).

2.1.5 Tedavi Yanıtı

Çocukluk çağı lösemi tedavisi kanser tarihinde önemli bir başarı öyküsüdür. ALL'de 5 yıllık yaşam süresi 1960'lı yıllarda %10'un altında iken bu oran 2000'li yıllarda %80'lerin üzerine çıkmıştır. Multimodal tedavi protokolleri ve son yıllarda risk gruplarına göre tedavi yaklaşımlarının belirlenmesi, yeni antineoplastik ilaçların devreye girmesi ve bakım ve destek imkanlarının daha da iyileşmesiyle ALL'de 5-yıllık olaysız sağkalım süresi gelişmiş ülkelerde %76-86 oranlarına ulaşmıştır (3-5,71).

Tedavi başarısı yüksek olmasına karşın halen çocukluk çağı lösemilerinin önemli bir alt grubunda hastalık tekrarlamakta ya da tam remisyon sağlanamamaktadır. Belirli bazı sitogenetik anormallikler, ağır hipodiploidi varlığı ve *MLL*-yeniden düzenlenmesi olan hastalarda remisyon indüksiyon başarısızlığı ya da hastalığın tekrarlama riskinin artmış olduğu ve olaysız sağ kalım süresinin %40'ın altına düştüğü bilinmektedir (6,7). Bunun

yanında standart risk grubu özelliklerinin tamamını taşıdığı halde mevcut tedavilere yanıt vermeyen ya da lösemisi tekrarlayan bir hasta grubu da mevcuttur. Pediatrik ALL'lerin % 15'ini oluşturan T-hücre lösemilerinin tedavi başarısı da B-hücre lösemisine göre daha düşüktür. Yapılan çalışmalar tekrarlayan ALL'de tüm hücre tipleri için genel sağ kalımı %30 oranında saptamışken; T hücre lösemi için bu oranın çok daha düşük (%15) olduğunu göstermiştir (8).

2.2 FOXM1

2.2.1 FoxM1 Yapısı ve Özellikleri

2.2.1.1 FoxM1: Forkhead Ailesine Ait Bir Transkripsiyon Faktörü

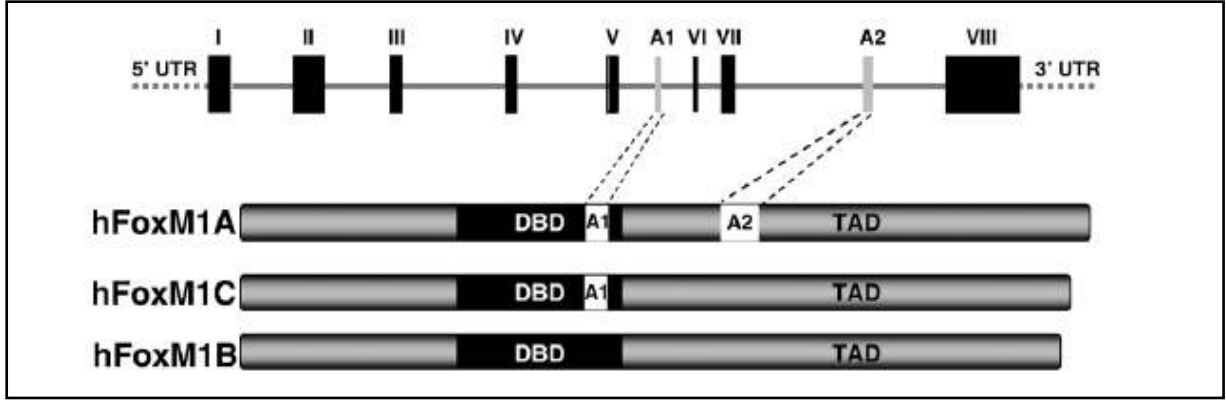
Hücre döngüsü çeşitli transkripsiyonel programlar tarafından kontrol edilir. "Forkhead box protein M1"(FoxM1), "Forkhead" ailesine ait bir transkripsiyon faktörüdür (19). Literatürde Trident (fare), HFH-11 (insanda), WIN ya da INS-1(rat), MPP-2 (insan) olarak farklı isimlerle de adlandırılan bu transkripsiyon faktörü olası karışıklıkları önlemek amacı ile 1998'de getirilen bir öneriden sonra standart olarak FoxM1 (Forkhead BoxM1) olarak adlandırılmaya başlanmıştır (72).

Forkhead ailesi evrimsel olarak korunmuş "fork head box" ya da "winged helix domain" olarak adlandırılan DNA-bağlayıcı bölge (100 aminoasit) varlığı ile karakterize 50'den fazla transkripsiyon faktörünü içeren geniş bir ailedir (73). *FoxM1* geni FoxM1 adlı transkripsiyon faktörünü kodlar ve DNA-bağlayıcı bölgesi aynı aileye ait *FoxA3*, *FoxC1*, *FoxF2*, *FoxK1* ve *FoxN2* adlı üyelerle %45 benzerlik gösterir (74).

2.2.1.2 FoxM1: Genetik Yapı, Alternatif Uçbirleştirme

İnsan *FoxM1* geni, 12. kromozomun p13-3 bölgesinde lokalize olup, 10 ekzonluk yapıda 25 ve kb ağırlığındadır (74). Ekzon A1 ve ekzon A2'nin alternatif olarak uçbirleştirilmesi (*splicing*) sonucunda *FoxM1* geninden 3 farklı sınıf transkript oluşur; FoxM1A, FoxM1B ve FoxM1C (Şekil 3) (19,75,76).

FoxM1A her iki ekzonu içerirken, FoxM1B iki ekzonu da içermez, FoxM1C ise sadece ekzon A1'i içerir. FoxM1A ve FoxM1B transkripsiyonel olarak aktiftir ancak FoxM1A transkripsiyonel olarak inaktiftir (76).



Şekil 3: Alternatif uçbirleştirme sonucu oluşan FoxM1 proteinin varyantları

2.2.1.3 FoxM1: Hücre Çoğalmasına Özgül Transkripsiyon Faktörü

FoxM1 tüm embriyonik dokularda ve özellikle epitelyum ve mezanşimal orijinli çoğalan hücrelerde eksprese edilir (74,76). Erişkin dokularda FoxM1 timus ve testiste yüksek oranda görülürken akciğer ve barsakta orta seviyede görülür ki bu dokular yüksek çoğalma özelliğine sahip dokulardır (74).

Ek olarak, FoxM1'in çok sayıda hücre türünde ve kanserli hücrelerde eksprese edildiği bilinmektedir (11-13,15,17,74-76). T-hücre gelişimi esnasında FoxM1 timusta immatür tekli pozitif ve çift pozitif T-hücre gibi aktif olarak çoğalan hücrelerde eksprese edilir. Buna karşın FoxM1 ekspresyonu dinlenmekte olan periferik T-hücre popülasyonunun çoğunu oluşturan tekli pozitif lenfositlerde gözükmez (15). FoxM1'in ayrıca nöral kök hücre germinal merkezinde eksprese edildiği ve hücreler farklılaştıkça *down-regüle* olduğu da gösterilmiştir (77,78). Tüm bu gözlemler FoxM1 ekspresyon derecesinin hücrenin çoğalma süreciyle eşgüdümlü olduğunu göstermektedir (19).

Sonuç olarak FoxM1, hücre çoğalmasına özgül bir protein olup FoxM1 ekspresyonu çoğalan hücrelerle sınırlıdır. Ekspresyonu tam olarak farklılaşmış ya da sessiz olan hücrelerde negatif olarak düzenlenirken hücre döngüsüne giren hücrelerde ise ekspresyonu tetiklenir (74).

2.2.1.4 FoxM1: Hücre Döngüsündeki Ekspresyonu

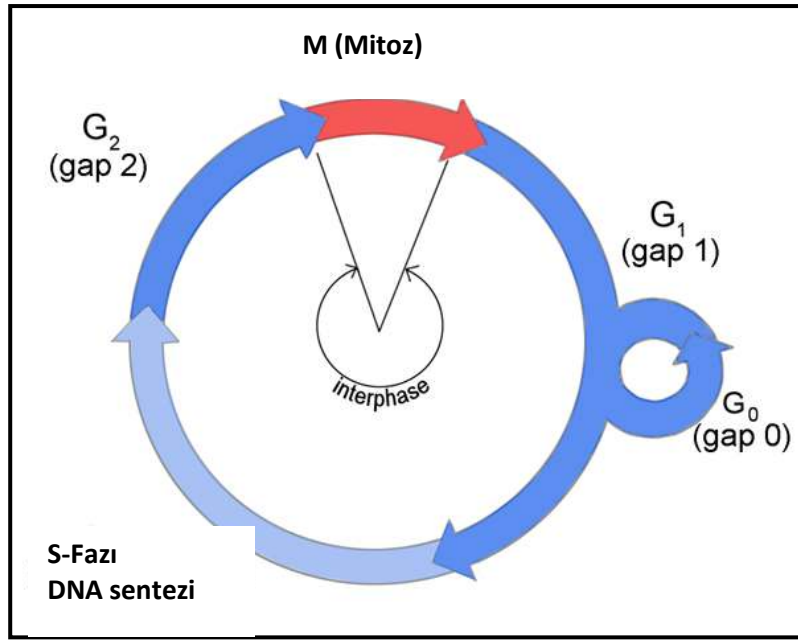
Hücre döngüsü belirli fazlardan oluşur (Şekil 4). *FoxM1* geni hücre döngüsü sırasında özel bir ekspresyon şekli gösterir. FoxM1 mRNA ve protein seviyeleri dinlenme hücrelerinde nadiren saptanabilirler, ancak hücre döngüsüne girildiğinde seviyelerinde artış görülür (74). FoxM1 ekspresyonundaki bu artış, S-fazın başlangıcında artar ve G₂-faz ve mitoz boyunca devam

eder. Çalışmalar, FoxM1 transkripsiyonel aktivitesinin hücre döngüsüne sınırlı olduğunu, protein fosforilasyonu ile eşgüdümlü olduğunu ve G₂-fazı sırasında maksimum seviyeye ulaştıklarını göstermektedir (Şekil 5) (19,74). Daha önce yapılan çalışmalarda FoxM1 fosforilasyonunun çoğunlukla mitozda gerçekleştiği bildirilmiş olmasına rağmen, son çalışmalarda FoxM1 fosforilasyonunun siklin (*cyclin*)-siklin bağımlı kinaz (CDK) kompleksleri ile erken G₁'de başladığı ve hücre döngüsündeki G₂ ve M-fazları boyunca devam ettiğini gösterilmiştir (79,80).

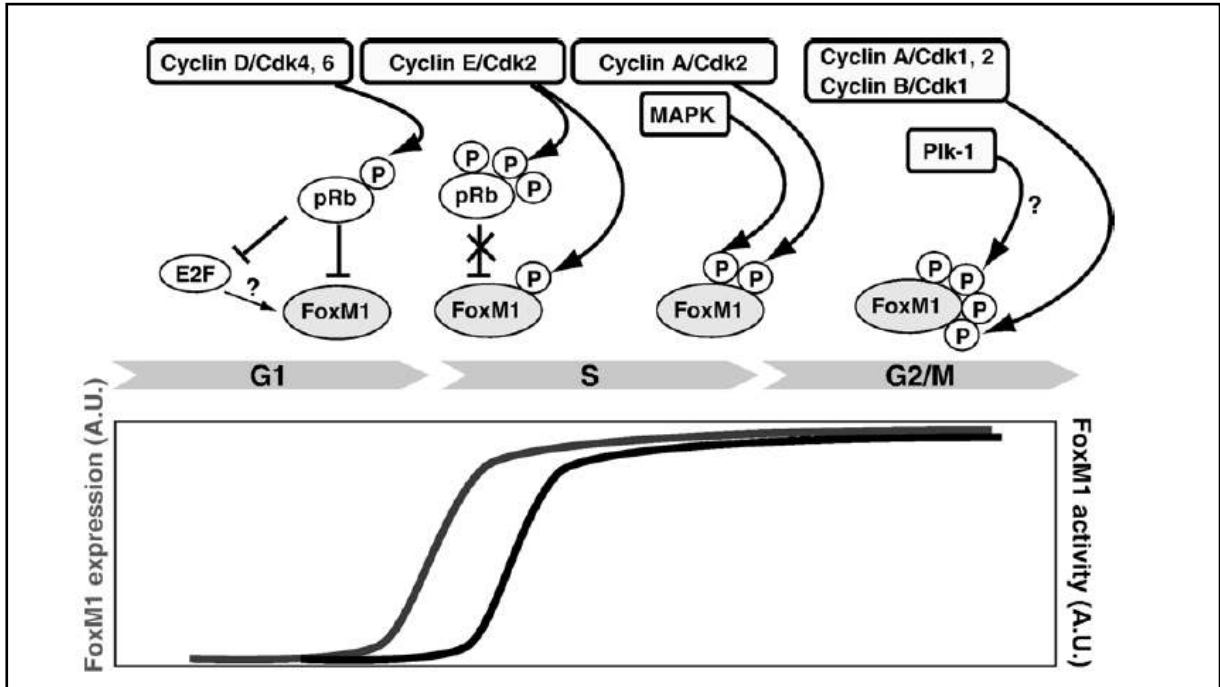
FoxM1 aktivasyonu için FoxM1 proteininin C-terminal bölgesine siklinlerin bağlanması gerekmektedir. Böylelikle FoxM1'in CDK'lar tarafından etkin bir şekilde fosforilasyonu gerçekleşir. FoxM1, G₁- ve S-fazlarında Siklin E-CDK1 kompleksine bağlanırken G₂-fazında seçici olarak siklin B-CDK1 kompleksine bağlanır. FoxM1'in siklin-CDK kompleksi içindeki CDK inhibitörü olan p27^{Kip1} ile de etkileşim içerisinde olduğu bilinmektedir (80). p27^{Kip1} siklin-CDK aktivitesini engellediği için bu şekilde bir etkileşimin varlığı FoxM1'in C-terminalinin fosforilasyonunu engelleyerek hücre döngüsündeki G₁ fazında FoxM1 aktivitesinin baskılanmasına neden olur (19). FoxM1 aktivasyonu için ayrıca uygun mitojenik sinyallerin olması gerekmektedir. Bu bağlamda Ras-MAPK yolağı önemli bir rol oynamaktadır (81). MAPK aracılıklı FoxM1 fosforilasyonun subsellüler lokalizasyonu ve transkripsiyonel aktivasyonu düzenlediği gösterilmiştir. Ras-MAPK sinyal ileti yolağının engellenmesi FoxM1-bağımlı transkripsiyonda belirgin derecede azalmaya neden olmaktadır (81).

FoxM1'in siklin-CDK kompleksleri ile etkileşiminin yanı sıra hücre döngüsünün belirli evrelerinde diğer hücre döngü proteinlerine bağlandığı da bilinmektedir. FoxM1'in hücre döngü-inhibitör proteinlerinden pRb'ye G₁-fazında, CDK aktive edici fosfotazlardan Cdc25B'ye ise G₁/S-fazında bağlandığı bilinmektedir (80). Son olarak da, bir tümör supresörü olan p19^{Arf}, FoxM1'e bağlanarak transkripsiyonel aktivitesini engeller (82).

Sonuç olarak FoxM1 transkripsiyon faktörünün ekspresyon ve transkripsiyonel aktivitesi hücre döngüsünün ilerlemesine bağlıdır. FoxM1 transkripsiyonel aktivitesini başlatmak ve sürdürmek kesin olarak siklin-CDK komplekslerinin bağlanmasını ve ardından da fosforilasyonunu gerektir (Şekil 5) (19).



Şekil 4: Hücre döngüsü. Hücre döngüsü G₁, S, G₂ ve mitoz fazlarından oluşur. G₀'da dinlenme safhasında olan, bölünmeyen hücreler bulunur. G₁-fazı büyüme ve DNA sentezine hazırlık, S-fazı DNA sentezi, G₂-fazı büyüme ve mitoz hazırlık fazıdır. Mitozda ise (profaz, metafaz, telofaz, anafaz) bölünme gerçekleşir.



Şekil 5: FoxM1'in hücre döngüsüne bağımlı olarak düzenlenmesi

FoXM1 RNA ve protein ekspresyon seviyeleri olası c-myc ve/veya E2F'e bağılı olarak geç-G₁ fazında artar. Mitojenik uyarı ile, Siklin D/CDK 4,6 ve Siklin E/CDK 2 pRb'yi inaktive eder, hücrelerin S-fazına ilerlemesini sağlar. FoxM1 aktivitesi G₂/M fazında fosforilasyonla daha da artar. S-fazında başlayan fosforilasyon G₂/M fazındaki kritik öneme sahip fosforilasyonlar için gereklidir. Bu şekilde FoxM1'in, Siklin A/CDK 2 ya da CDK 1, Plk-1(*polo like kinase*) ve MAPK yolları aracılığı ile tamamen aktivasyonu gerçekleşir

2.2.2 FoxM1 Hücresel Fonksiyonları

2.2.2.1 FoxM1 ve Organogenez

FoxM1 embriyogenezin erken evrelerinde yer almaz, ancak daha sonra gerçekleşen organogenez için vazgeçilmezdir (19). FoxM1 *knock-out* farelerde yapılan deneylerde hepatoblast çoğalmasının ve karaciğer perfüzyonunun belirgin olarak azaldığı ve intrahepatik safra kanallarının yokluğu dikkati çekmiş ve böylelikle FOXM1'in hepatoblastların çoğalmasında ve safra epitel hücre dizilerine farklılaşmasında kritik öneme sahip olduğunu göstermiştir (23,83). Bununla beraber organogenez esnasında FoxM1 ekspresyon şeklinin diğer dokulardaki (akciğer, pankreas) öncül hücrelerin çoğalmasında ve farklılaşmasında önemli olduğu da gösterilmiştir. Tüm bu bilgiler FoxM1'in çok sayıda doku ve hücre tiplerinin çoğalmasında genel bir rolü olduğunu işaret etmektedir (84,85).

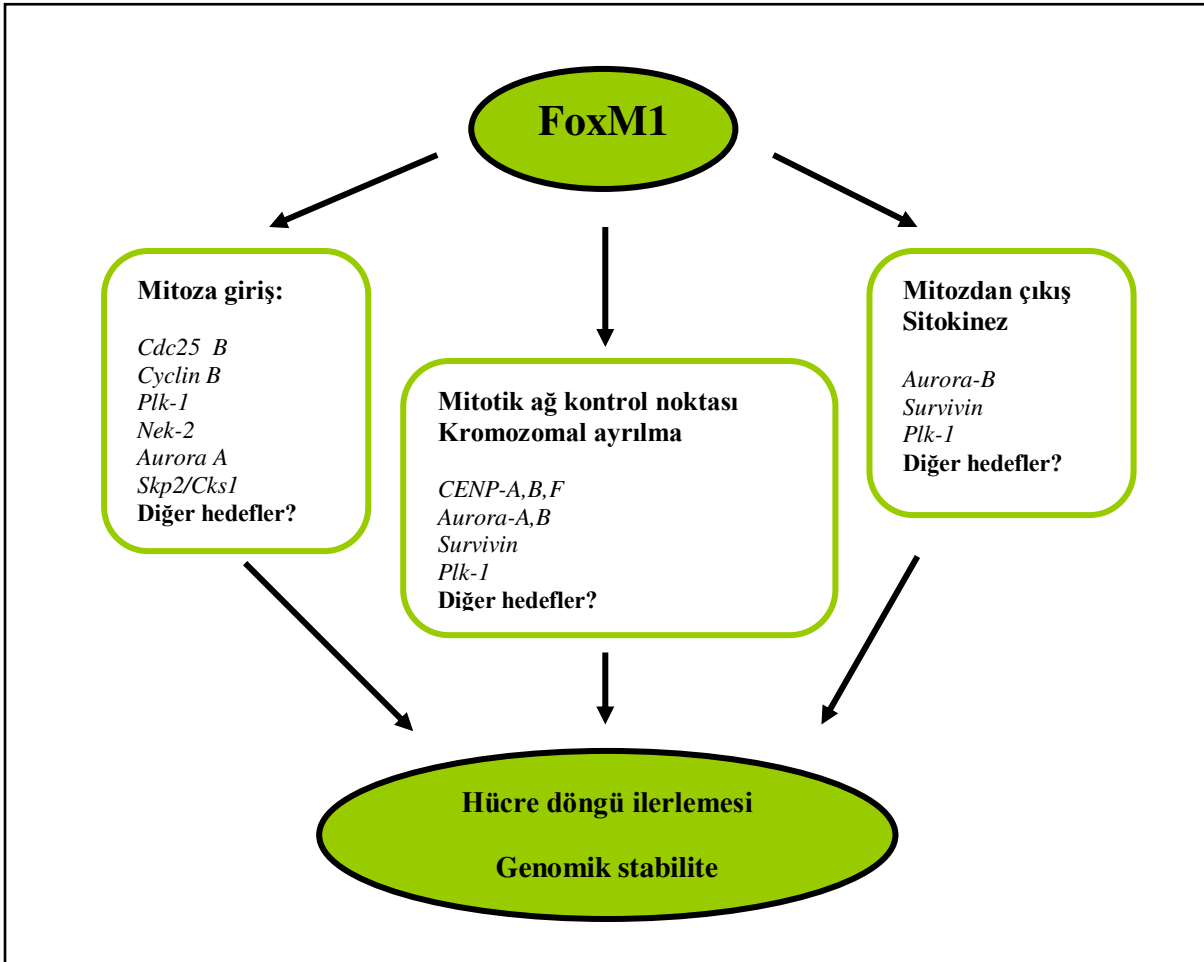
2.2.2.2.FoxM1 Hücre Çoğalmasını Arttırır

FoxM1 *knock-out* farelerde öncül hücre çoğalamamasına bağlı olarak çeşitli organlarda bozuklukların saptanması, FoxM1'in çoğalan hücrelerde eksprese edilebilmesinin yanı sıra normal olarak çoğalan hücrelerde de gerekli olabileceğini göstermektedir. Hücre çoğalmasının azalması ile uyumlu olarak; FoxM1 eksikliğin hücre döngüsünde S-, G₂- ve M-fazlarındaki bir çok düzenleyici genin azalmış ekspresyonuna neden olduğu saptanmıştır (23,82-84). FoxM1'in hücre çoğalmasını arttırdığı ancak bunun için düzenli olarak mitojen faktörler tarafından uyarılması gerektiği yapılan diğer çalışmalarda kanıtlanmıştır (21,86). Sonuçta FoxM1 spesifik olarak çoğalan hücrelerde eksprese olur ancak, aynı zamanda hücre döngüsündeki anahtar yapıları doğrudan transkripsiyonel düzenlemesiyle de hücre çoğalmasını arttırır (19).

2.2.2.3 FoxM1: Hücre Döngüsü Kontrolü

Son zamanlarda gen ekspresyon çalışmaları FoxM1 tarafından düzenlenen ve G₂/M fazlarına spesifik olan bir çok genin (*Siklin B*, *Nek-2*, *CENP-F*, vb.) tanımlanmasına olanak sağlamıştır (87). Çalışmalar FoxM1 tarafından kontrol edilen yeni bir grup geni de ortaya çıkarmıştır. Bu genler hücresel metabolizmada, hücre sinyal ileti yollarında ve ekstrasellüler matriks yeniden şekillendirmesinde yer alan genleri ve ayrıca doğrudan transkripsiyonel düzenlemede yer alan genleri içerir (Şekil 6) (16,17,19,20,87). FoxM1 yoksun olan hücrelerde G₂'den

mitoz fazına ilerlenmesinde rol alan ve mitozun ilerlemesinde önemli olan *Siklin B*, "*polo-like kinaz 1*" (*Plk-1*), *Cdc25B* fosfotaz, *Aurora kinaz*, *Cdc25B* ve *Siklin D1*, gibi hücre döngü genlerinin ekspresyon seviyeleri azalır (20,22,23,82-84,87). Bunun yanında, yine FoxM1 yoksun olan hücrelerde p21^{Cip1} ve p27^{Kip1} gibi CDK inhibitörlerinin seviyelerinin ise arttığı gösterilmiştir (88). Bu durumun FoxM1 yoksun olan hücrelerde p21^{Cip1} ve p27^{Kip1} proteinlerinin proteazomal yıkımı için gerekli olan *Skp2* ve *Cks1* genlerinin *down-regüle* edilmesinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir. (89). Sonuç olarak FoxM1, hücre döngü ilerlemesinin yönetilmesinde ve genomik bütünlüğün sağlanmasında çok önemli bir rol oynar. Bu durum memeli G₂-M spesifik gen kümesinin transkripsiyonel düzenleyicisi olması ile ilişkilidir (19).



Şekil 6: Hücre döngü ilerlemesi ve genomik stabilitenin sağlanmasında FoxM1'in rolü.

2.2.3 FoxM1 ve Kanser

2.2.3.1 FoxM1: Kanser Patogenezindeki Rolü

FoxM1 çoğalan hücrelerde aktif olan bir gendir ve dolayısıyla ekspresyonu hızlı çoğalma özelliğine sahip tümör hücrelerinde artmıştır (19).

Geniş kapsamlı gen ekspresyon analizleri bir çok solid tümörde FoxM1'in yüksek oranda eksprese edildiğini ortaya çıkarmıştır. Son yıllarda artan sayıda yapılan çalışmalarda akciğer kanseri, glioblastom, prostat kanseri, bazal hücre karsinomu, hepatosellüler karsinom, meme kanseri ve pankreas kanserinde FoxM1 sinyal ağının bozulduğu ve *up-regüle* olduğu gösterilmiştir (11-13,24,25,90). Diğer bir yandan FoxM1 ekspresyonunun baskılanmasının insan kanser hücrelerindeki *in vitro* metastatik potansiyeli engellediği gösterilmiştir (25,82,91). Bunun yanında FoxM1'in ekspresyonunun artışının meme kanserinde kötü prognozla ilişkili olduğu ve mide kanserinde yaşam süresini olumsuz yönde etkileyen bağımsız bir belirteç olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (91,92). Son yıllarda FoxM1 üzerine yapılan çalışmalar bu transkripsiyon faktörünün tümör saldırganlığındaki biyolojik rolünü gün geçtikçe daha çok desteklemektedir. Bütün bu sonuçlar FoxM1'in lösemi patogenezindeki yeri hakkında merak uyandırmaktadır. Literatürde lösemi patogenezindeki yeri ile ilgili bugüne kadar yapılmış sadece bir çalışma olup, bu çalışmada FoxM1'in AML hücrelerindeki ekspresyon düzeyleri belirlenmiştir. Bu çalışmada FoxM1 mRNA'sının AML hücrelerinde yüksek oranda eksprese edildiği ve artmış ekspresyonunun AML hücre çoğalmasını arttırdığı gösterilmiştir (26).

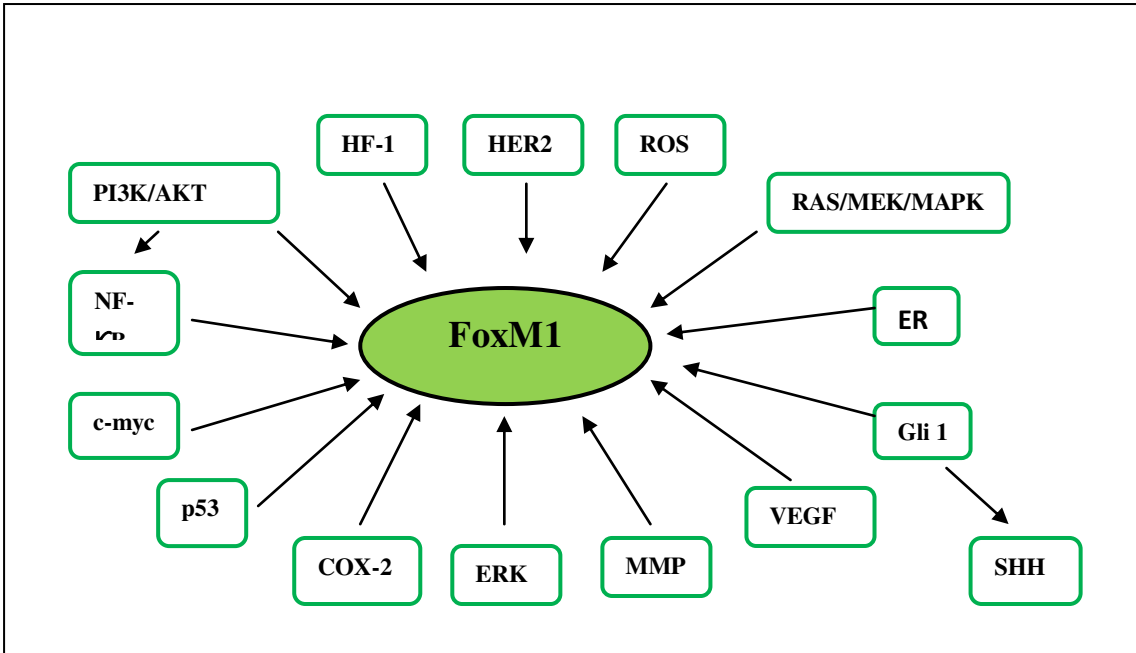
FoxM1'in tümör oluşumundaki rolü

Hücre döngüsünün ilerlemesi, hücre çoğalması ve hücre yaşlanmasının önlenmesinde kritik öneme sahip olduğu anlaşılmış olan FoxM1'in bu süreçte rol alan *Cdc25B*, *Siklin B*, *Plk-1*, *Nek-2*, *Aurora A*, *Aurora B*, *Skp2/Cks1*, *survivin* gibi genlerin ekspresyon seviyelerini arttırarak ve *p53*, *p21^{Cip1}*, *p27^{Kip1}* ve *p19^{Arf}* gibi hücre yaşlanmada önemli genlerin ekspresyon seviyelerini azaltarak tümör oluşumuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir (10,19).

FoxM1'in tümör yayılmasında ve saldırganlığındaki rolü

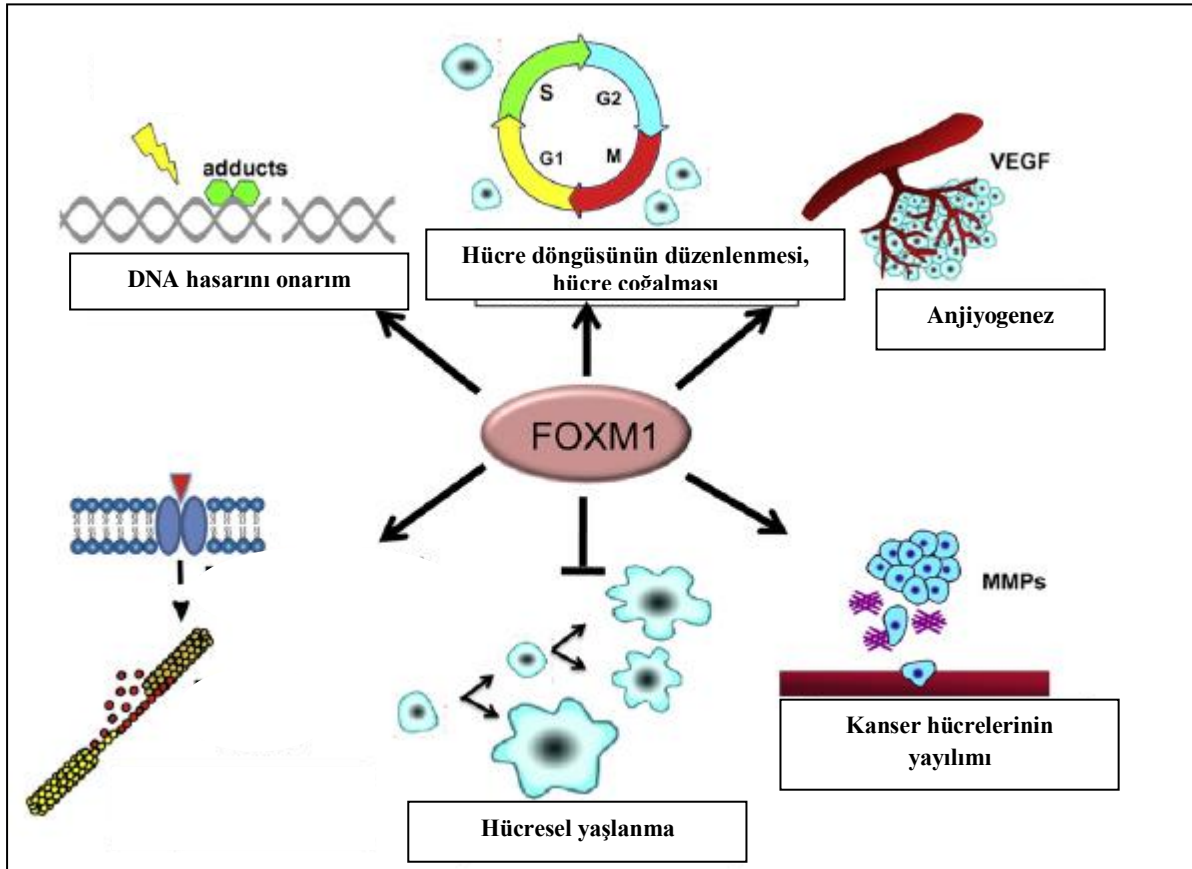
Yapılan çalışmalarda FoxM1'in bir çok onkojenik yolakla kesiştiği ve bu yolaklarla ve diğer sinyal ileti yolaklarıyla yaptığı *cross-talk* sayesinde tümör saldırganlığına önemli katkıda

bulunduğu gösterilmiştir. FoxM1; CDK, PI3K/Akt, MAPK/ERK, NF-κB, siklooksigenaz-2 (COX-2), epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR), östrojen reseptörü (ER), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), matriks metalloproteinaz (MMP), c-myc, p53, reaktif oksijen türleri (ROS), “sonic hedgehog” (SHH), “hypoxia inducible factor 1” (HIF-1) yolaklarıyla kesişir ve bu yolaklardaki genlerin ekspresyon düzeylerinde önemli değişikliklere yol açar (Şekil 7) (10). Karsinogenezde önemli olan CDK, PI3K/Akt, MAPK/ERK, NF-κB, SHH gibi faktörlerin ve yolakların aktivasyonuna neden olurken; *p16*, *pRb*, *p53* ve *p19^{Arf}* gibi tümör supresor genlerinin ekspresyon seviyelerinde azalmaya neden olur (19). Karsinogenezde rol alan bu önemli yolaklardan; özellikle PI3K/Akt'nin ve CDK'ların T-hücre lösemi patogeneğinde önemli rol oynadıkları bilinmektedir (37). FoxM1'in VEGF ekspresyonunu arttırarak tümör anjiyogenezinde önemli rol aldığı ve dolayısı ile tümör büyümesine katkıda bulunduğu; tümör saldırganlığında kritik öneme sahip matriks metalloproteinazları aktive etmesiyle de tümörün yayılımına katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Bütün bunların yanında FoxM1'in hücrenin kendini yenilemesi, çoğalması, organogenezdeki rolleri ve DNA hasarını onarma özellikleri ile kanser ilaçlarının direnç kazanmasında rol oynadığı öne sürölmektedir (Şekil 8) (93).



Şekil 7: FoxM1 ve kesiştiği onkojenik yollar

PI3K: Fosfatidol inositol-3-kinaz, ROS: Reaktif oksijen ürünleri, ER: östrojen reseptörü VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü MMP: Matriks metalloproteinaz COX: Siklooksijenaz NF-κB: Nükleer faktör KB ERK: "Extracellular signal regulated kinase" SHH: "Sonic hedgehog" MAPK: "Mitogen activated protein kinase"



Şekil 8: FoxM1'in kanser oluşumu ve yayılmasındaki rolü

VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü MMP: Matriks metalloproteinaz

2.2.3.2 FoxM1: Kanserde Tedavisinde Yeni Bir Hedef

FoxM1 transkripsiyon faktörünün bir çok kanser türünde ekspresyonunun artmış bulunması ve yapılan çalışmalarla kanser patogenezindeki öneminin gün geçtikçe daha da desteklenmesi FoxM1'i hedef alan kimyasal bileşiklerin anti-kanser ilaç olarak kullanılabileceği fikrini akla getirmektedir (94-96). Tiazol grubu antibiyotiklerden siomisin A ve thiostrepton'un FoxM1 transkripsiyonel aktivasyonunu önlediği bilinmektedir (27,28,30). Ayrıca MG115, MG132 ve bortezomib gibi proteozam inhibitörlerinin de FoxM1 transkripsiyon aktivitesini ve protein ekspresyonunu engelleyebileceği gösterilmiştir (97).

Siomisin A: FoxM1 inhibitörü, potansiyel antikanser bir ilaç

Siomisin A, tiazol grubu bir antibiyotik olup, 50S ribozomal alt birimde 23S rRNA'ya bağlanarak translasyonun translokasyon basamağını engeller; ancak ökaryot protein sentez üzerine etkisi yoktur (29). Siomisin A'nın antitümör etkinliği ve epitel hücrelerinde güçlü proapoptotik özellik gösterdiği, potansiyel bir antikanser ilaç olarak p53- bağımsız apoptoza neden olduğu ve lizozomal zar geçirgenliğini arttırdığı gösterilmiştir (98,99). FoxM1 kendi transkripsiyonunu aktive eden bir transkripsiyon faktörü olduğundan siomisin A FoxM1'i *down-regüle* etmekle kalmaz aynı zamanda FoxM1 mRNA ve protein seviyelerini de azaltır (29). İnsan kanser hücrelerine siomisin A uygulanmasının FOXM1'in *down regülasyonuna* neden olarak etkin apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (27,28,30). Ayrıca, tiazol antibiyotiklerinin bu kanser hücrelerindeki p21 ve p53 gibi bazı hücrel proteinleri stabilize ettiği de gösterilmiştir. Bu hücrel proteinlerin proteozom inhibitörleri tarafından *up-regüle* edildiği bilindiği için thiazole antibiyotiklerinin proteazomal inhibitörleri olarak etki göstereceği düşünülmüş ve Bhat ve arkadaşları (97) yaptıkları çalışmada bu antibiyotiklerin *in vitro* ortamda proteazom inhibitörleri gibi görev yaptığını ortaya çıkarmıştır. Aynı çalışmada iyi bilinen proteazomal inhibitörlerinden MG115, MG132 ve bortezomibin FoxM1 üzerine etkisi araştırılmış ve bu bileşiklerin FoxM1 transkripsiyonel aktivasyonunu ve protein ekspresyonunu thiazole antibiyotiklere benzer olarak güçlü bir şekilde inhibe ettiği bulunmuştur (97).

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

Çalışma İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.1 Etik Kurul

Çalışma için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 24.11.2011 tarih ve 2011/37-06 sayılı etik kurul onayı alındı.

3.2 Jurkat Hücreleri

Çalışmada Jurkat T-hücreli ALL hücre hattı kullanılmıştır. Jurkat hücreleri %10 fetal dana serumu ve %1 penisilin-streptomisin içeren RPMI 1640 besiyerinde üretilmiştir. Hücreler 37°C sıcaklık ve %5 CO₂ ortamında karbondioksit inkübatöründe üretilmişlerdir.

3.2.1 Jurkat Hücrelerinin Pasajlanması

Jurkat hücreleri 5 günde bir pasajlanmıştır. Hücre kültür flaskından 0,5 mL hücre solüsyonu steril falkon tüpe alınmış ve üzerine 2,5 mL fosfat tampon solüsyonu (PBS) ilave edilmiştir. 800 rpm de 5 dakika santrifüj edildikten sonra supernatan atılmış ve alttaki hücre pelleti 5 mL besiyeri solüsyonunda çözülerek hücre kültür flaskına aktarılmıştır

3.3 Deksmetazon

Deksmetazon ALL tedavisinde kullanılan etkili bir ilaçtır. Bu çalışmada deksametazon 0,5 mg'lık tabletler kullanılmıştır. Tabletler distile su ile sulandırılmışlardır.

3.4 Siomisin A

Siomisin A spesifik bir FoxM1 transkripsiyon faktörü inhibitörüdür. Siomisin A (NCI) DMSO (dimetilsülfoksit) içinde çözülmüştür.

3.5 Jurkat Hücrelerinde FoxM1 Gen Ekspresyon Seviyelerinin Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Yöntemi ile Belirlenmesi

Total RNA Jurkat hücrelerinden NucleoSpin® (Macherey-Nagel, Almanya) RNA izolasyon kiti kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda izole edilmiş ve elde edilen RNA'lar ters transkriptaz enzim kiti Fermentas® (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak komplementer DNAYA (cDNA) çevrilmiştir. Daha sonra ise elde edilen cDNA'lar ile FoxM1 ve β -aktin genlerinin PCR yöntemi ile mRNA seviyeleri ölçülmüş ve gen ekspresyon

seviyeleri belirlenmiştir. β -aktin geninin ekspresyon seviyesi pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. Aynı işlem Jurkat hücrelerine Siomisin A ve deksametazon artan konsantrasyonlarda uygulandıktan sonra da gerçekleştirilmiş ve uygulanan bu ajanların değişik konsantrasyonlarında Jurkat hücrelerindeki FoxM1 gen ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir.

3.6 Jurkat Hücreleri Üzerine Deksametazonun ve Siomisin A'nın Hücre Çoğalmasını Engelleyici Etkilerinin Belirlenmesi

Siomisin A ve deksametazonun IC₅₀ (hücrelerin %50'sinin öldüğü ilaç konsantrasyonu) değerleri MTT yöntemi ile belirlenmiştir. Tetrazolium tuzlarının hücre çoğalması, hücrenin canlılığı ve/veya sitotoksosite analizleri için yaygın bir şekilde kullanıldığı bilinmektedir. MTT sitotoksosite testi canlı hücrelerin mitokondrileri tarafından tetrazoliumun formazana çevrilmesi temeli üzerine kurulmuştur. Reaksiyon aktif mitokondrileri gerektirmekte, ölü hücreler bu işlemi gerçekleştirememektedir.

MTT uygulaması gerçekleştirildikten sonra örnekler ELISA okuyucu tarafından analiz edilerek meydana gelen renk değişimine göre çoğalan hücre oranları belirlenmektedir. MTT analizi sayesinde hücre hatlarına ilk etapta uygulanacak ilaç konsantrasyonları da belirlenebilmektedir. Çünkü MTT analizi hücrelerin %50'sinin öldüğü ilaç dozunun belirlenmesini sağlayacaktır.

Bu amaçla hücreler 96 kuyucuklu kültür kaplarına (20.000 hücre/kuyucuk) ekilmiş ve antikanser ajanlar artan dozlara 72 saat boyunca maruz bırakılmışlardır. Her göze aktifleştirilmiş MTT solüsyonundan 20 μ L eklenmiş ve karbondioksit inkübatöründe 37°C'de 3 saat bekletilmişlerdir. Bu inkübasyon süresinden sonra hücreler 1800 rpm de 10 dk süre ile santrifüj edilmiş, supernatantlar uzaklaştırılmış ve MTT kristalleri her bir kuyucuğa 100 μ L DMSO eklenerek çözülmüştür. Hücrelerin çoğalma değerleri 490 nm dalga boyunda ELISA okuyucu ile optik yoğunluğun belirlenmesi ile elde edilen değerlerle hesaplanmıştır (100,101).

3.7 Siomisin A ve Deksametazon Uygulanan Jurkat Hücrelerinin Yaşam Yüzdelerinin Belirlenmesi

Jurkat hücreleri siomisin A ve deksametazona maruz bırakılmış ve hücrelerin yaşam yüzdeleri tripan mavisi yöntemi ile belirlenmiştir. Bu amaçla 1×10^6 hücre, 6 kuyucuklu kültür kabının her bir kuyusunda 2 mL besiyerine ekilmiş ve 72 saat boyunca farklı dozlarda ilaca maruz

birakılmışlardır. Hücre süspansiyonundan 500 µL alınıp 1,600 rpm de 3 dakika santrifüj edilmiş ve 100 µL 1X PBS içerisinde çözöldükten sonra 100 µL tripan mavisi solusyonu ile oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmiştir. Hematositometreye alınan canlı ve ölü hücreler ışık mikroskopu altında sayılmıştır. Elde edilen canlı ve ölü hücre oranı, hücrelerin yaşam yüzdesini vermektedir.

3.8 Siomisin A ve Deksametazonun Beraber Uygulandığı Jurkat Hücrelerinde Sinerjistik, Sitotoksik Etkilerinin Belirlenmesi

Hücrelerde FoxM1 transkripsiyon faktörünü inhibe eden siomisin A'nın deksametazonun sitotoksik etkisini nasıl etkilediği araştırılmıştır. Bu amaçla hücelere IC50 dozunda FoxM1 inhibitörü ve artan dozlarda deksametazon birlikte uygulanmış ve olası sinerjistik sitotoksik analizler MTT yöntemi ile belirlenmiştir.

3.8.1 Siomisin A ve Deksametazonun Kombinasyonunun İzobologram Analizleri

Deksametazonun, siomisin A ile kombinasyonlarının olası sinerjistik, additif, nötral veya antagonistik etkilerinin belirlenmesi amacı ile CalcuSyn Windows bilgisayar programı (CalcuSyn software, Biosoft, İngiltere) kullanılmıştır. Programa dataların girilmesinden sonra software tarafından bulunan CI değeri iki ajanın etkisinin nasıl olduğunun belirtilmesi için kullanılan bir terimdir. $CI < 1$ sinerji olduğunu, $CI = 0.1-0.5$ güçlü sinerji olduğunu, $CI < 0.1$ çok güçlü sinerjiyi, $CI = 1$ additif etkiyi, $CI > 1$ antagonist etkiyi, $CI = 3.3-10$ güçlü antagonist etkiyi ve $CI > 10$ çok güçlü antagonist etkiyi göstermektedir (102).

3.8.2 Siomisin A ve Deksametazon Uygulanan Jurkat Hücrelerinde Kaspaz-3 Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

Kaspaz-3 enzim aktivitesinin belirlenmesi amacı ile Kaspaz-3 Kolorimetrik Assay Kiti kullanılmıştır. Bu amaçla, 1×10^6 hücre 6 kuyucuklu kültür kabının her bir kuyusunda 2 mL besiyerine ekilmiş ve 72 saat boyunca farklı dozlarda siomisin A ve Deksametazon yalnız veya ikisinin farklı dozlardaki kombinasyonuna maruz bırakılmışlardır. Bu inkübasyon süresinden sonra, hücreler 800 rpm de 5 dk santrifüj edilerek toplanmış ve supernatantlar uzaklaştırılmıştır. Daha sonra, hücrelerin üzerine 100 µL soğutulmuş lysis buffer ilave edilip karıştırılmış ve buzun üzerinde 10 dk bekletilmiştir. Örnekler ependorf tüpe alınmış ve 15.000 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir. Supernatan steril yeni bir ependorf tüpe alınıp ayrı ayrı kuyucuklara 50 µL supernatanlardan ve 50 µL 2X reaksiyon bufferı 96 kuyucuklu flat bottom mikrolatelere ekim yapılmıştır. Daha sonra her kuyucuğa 5 µL kaspase-3 kolorimetrik

substrat (DEVD-pNA) ilave edilip 37°C derecede 2 saat bekletilmiştir. Sonuçlar 405 nm dalga boyunda okunmuştur. Elde edilen sonuçlar Bradford Analizi ile gerçekleştirilmiş olan protein düzeylerine normalize edilmiştir. Bu yöntemle hücrelerde durağan ve ilaç uygulamaları sonrasında kaspaz-3 enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler belirlenmiştir.

3.8.3 Siomisin A ve Deksametazon Uygulanan Jurkat Hücrelerinde Mitokondri Zar Potansiyelinin Belirlenmesi

Hücrelerde mitokondri zar potansiyelinin belirlenmesi amacı ile JC-1 mitokondri zar potansiyeli belirleme kiti kullanılmıştır. Bu amaçla 1×10^6 hücre 6 kuyucuklu kültür kabının her bir kuyusunda 2 mL besiyerine ekilmiş ve 72 saat boyunca farklı dozlarda siomisin A ve deksametazon yalnız veya ikisinin farklı dozlardaki kombinasyonuna maruz bırakılmışlardır. Hücre süspansiyonu 800 rpm de 5 dk sentrifüj edilerek hücreler toplanmıştır.

Hücreler 0,5 mL 1X JC-1 kimyasalı ile sulandırılmış ve hücre süspansiyonu 37 °C de %5 CO₂ inkübatöründe 15 dakika inkübe edildikten sonra 800 rpm de 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücreler 2 mL besiyerine ekilmiş ve tekrar santrifüj edilmiş ve hücre peleti 0,5 mL taze besiyerinde sulandırıldıktan sonra akım sitometride analiz edilmiştir. Bu yöntemle hücrelerde durağan ve ajan uygulamaları sonrasında mitokondri zar potansiyelinde meydana gelen değişimler belirlenmiştir.

3.8.4 Siomisin A ve Deksametazon Uygulanan Jurkat Hücrelerinde Apoptotik Hücre Ölümünün Aneksin V Akım Sitometre Yöntemi İle Belirlenmesi

Bu amaçla 1×10^6 hücre 6 kuyucuklu kültür kabının her bir kuyusunda 2 mL besiyerine ekilmiş ve 72 saat boyunca farklı dozlarda siomisin A ve deksametazon yalnız veya ikisinin farklı dozlardaki kombinasyonuna maruz bırakılmışlardır. Hücre süspansiyonu 800 rpm de 5 dk sentrifüj edilerek hücreler toplanmıştır. Hücreler soğuk PBS içerisinde çözüldükten sonra tekrar santrifüj edilerek çöktürülmüş ve 1X binding buffer ile çözülmüştür. Örneklerden 100µL alınarak üzerine 5µL Aneksin V-FITC ve 5µL PI ilave edilerek karanlıkta ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir. Her tüpe 400 µL binding buffer ilave edilerek akım sitometride analiz edilmiştir.

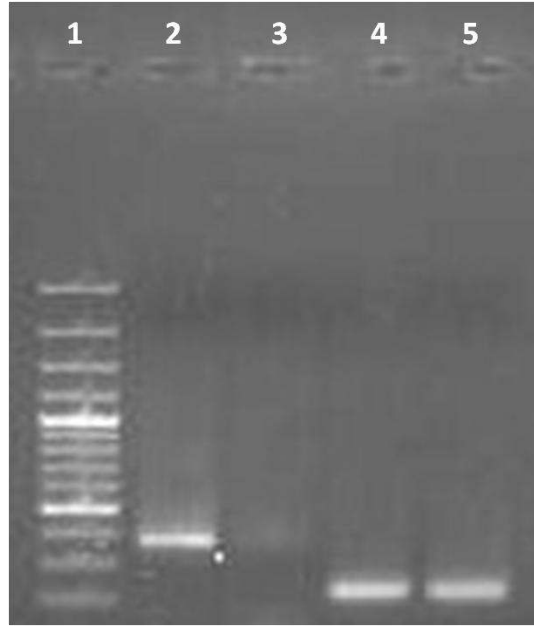
3.9 Siomisin A ve Deksametazonun Beraber Uygulandığı Jurkat Hücrelerinde Hücre Döngüsü Analizleri

Bu amaçla 1×10^6 hücre 6 kuyucuklu kültür kabının her bir kuyusunda 2 mL besiyerine ekilmiş ve 72 saat boyunca farklı dozlarda siomisin A ve deksametazon yalnız veya ikisinin farklı dozlardaki kombinasyonuna maruz bırakılmışlardır. Bu inkübasyon süresinden sonra, hücreler 1200 rpm de 5 dk santrifüj edilerek toplanmış ve süpernatantlar uzaklaştırılmıştır. Pelletin üzerine 1 mL soğuk PBS eklenmiş ve buz üzerinde tutulmuştur. -20 °C 'de saf etanolden 4 mL eklenerek buz üzerinde tutulmaya devam edilmiştir. Hücreler boyanma gününe kadar -20 °C 'de bekletilmişlerdir. Boyama için hücreler dondurucudan çıkartıldıktan sonra +4 °C'de 1200 rpm de 10 dk süre ile santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücelere 5 mL soğuk PBS eklenmiş ve örnekler 1200 rpm de 10 dk süre ile santrifüj edilmiştir. Daha sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve pellete 1 mL PBS ve ardından 100 µL RNase-A eklenerek, hücreler 39 °C 'de 30 dk bekletilmiştir. Ardından 100 µL (1 mg/mL) propidium iyodür (PI) boyası eklenerek hücreler oda sıcaklığında 10 dk bekletilmiş ve akım sitometride analiz edilmiştir. G₁,S ve G₂/M fazlarındaki hücre yüzdeleri Modfit® programı kullanılarak hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Jurkat Hücrelerinde FoxM1 Gen Ekspresyon Seviyelerinin PCR yöntemi ile Belirlenmesi

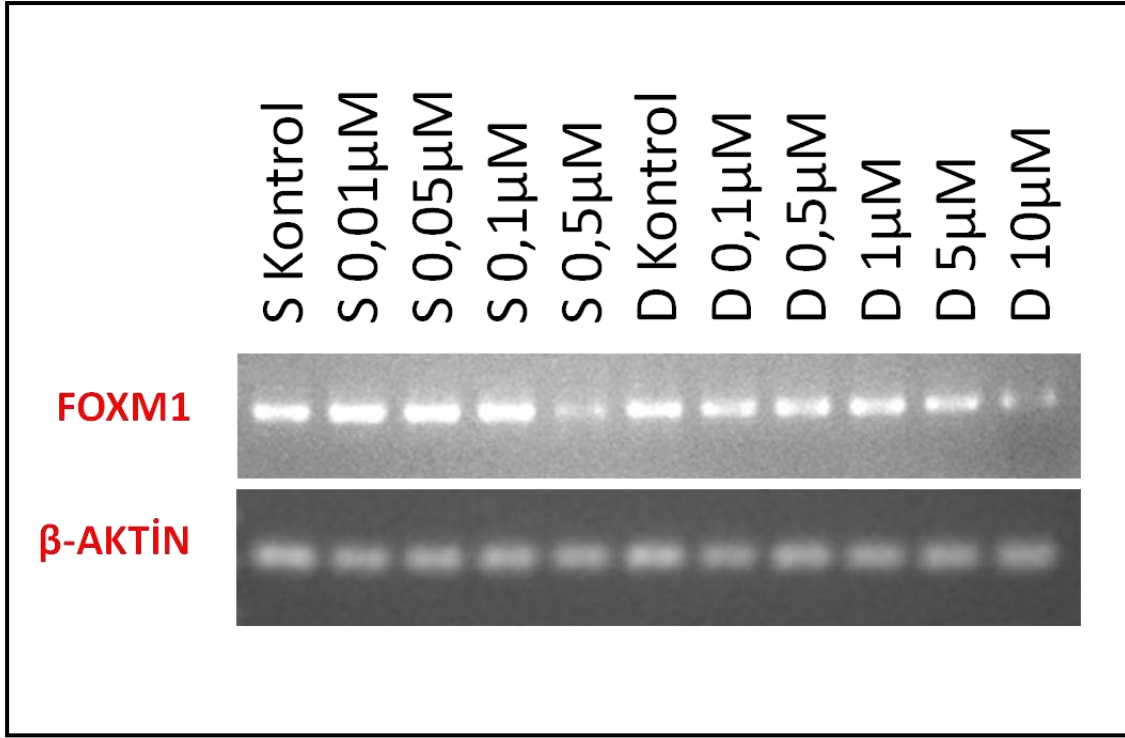
Jurkat hücrelerinde FoxM1 gen ekspresyonu düzeyine bakılmış ve FoxM1 gen ekspresyonunun normal sağlıklı hücelere göre belirgin derecede artmış olduğu saptanmıştır (Şekil 9).



Şekil 9: Sağlıklı hücrelerde ve Jurkat hücrelerinde gen ekspresyon profilleri **1:** DNA belirteci **2:** Jurkat hücrelerindeki FoxM1 ekspresyonu **3:** Sağlıklı kan hücrelerindeki FoxM1 ekspresyonu **4:** Jurkat hücrelerindeki β -Aktin ekspresyonu **5:** Sağlıklı kan hücrelerindeki β -Aktin ekspresyonu

4.2 Siomisin A ve Deksametazon Uygulanan Jurkat Hücrelerinde FoxM1 Gen Ekspresyon Seviyelerinin PCR Yöntemi ile Belirlenmesi

Siomisin A ve deksametazon uygulanan Jurkat hücrelerinde FoxM1 gen ekspresyon seviyelerinin her bir ilacın dozuna bağımlı olarak azaldığı gösterilmiştir. İlaç dozlarının kademeli olarak arttırılması sonucu 0,5 μ M siomisin A ve 10 μ M deksametazon dozlarında FoxM1 gen ekspresyon seviyelerinin belirgin olarak azaldığı saptanmıştır (Şekil 10).



Şekil 10: Siomisin A ve deksametazon uygulanan Jurkat Hücrelerinin doza bağımlı olarak ekspresyon seviyeleri. S: Siomisin A D: Deksametazon

4.3 Jurkat Hücreleri Üzerine Deksametazon ve Siomisin A'nin Hücre Çoğalmasını Engelleyici Etkileri

Jurkat hücrelerinin siomisin A ve deksametazon ile 72 saat boyunca muamelesi sonucunda IC50 değerleri, sırasıyla, 0,46 ve 19 μM olarak hesaplandı (Şekil 11, Şekil 12). Bir ve 10 μM deksametazona 72 saat boyunca maruz bırakılan Jurkat hücrelerin çoğalması kontrol grubuna göre %8 ve %13 azalırken, aynı dozlarda deksametazonun, siomisin A ile beraber uygulanması durumunda hücrelerin çoğalmasını %74 ve %75 oranında baskıladığı izlenmiştir (Şekil 12, Şekil 13).

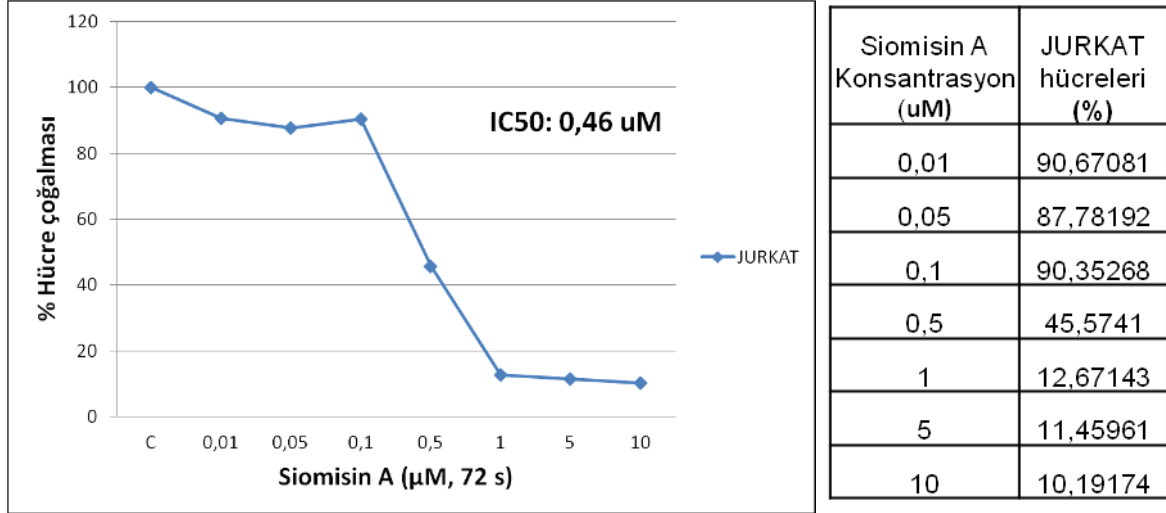
4.4 Deksametazon ve Siomisin A'nın Beraber Uygulandığı Jurkat Hücrelerinde Sinerjistik ve Apoptotik Etkiler

4.4.1 Siomisin A ve Deksametazonun Kombinasyonunun İzobologram Analizleri

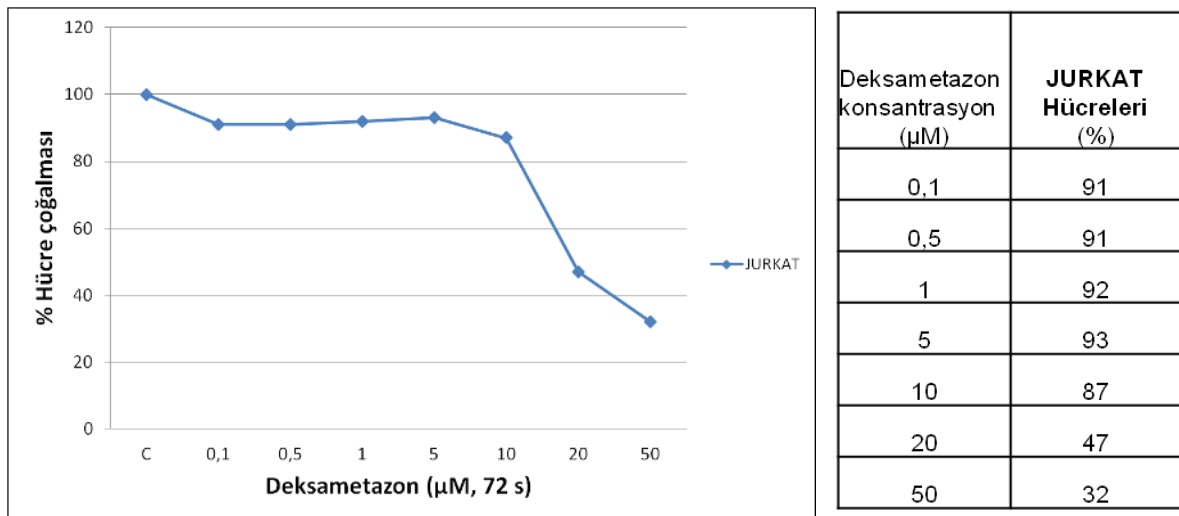
Deksametazonun, siomisin A ile olası sinerjistik, additif nötral veya antagonistik etkilerini araştırmak amacı ile izobologram analizi yapıldı. Programa dataların girilmesinden sonra elde edilen CI değeri < 0.1 olarak saptanmış olup çok kuvvetli sinerjizm olarak değerlendirildi (Şekil 14).

4.4.2 Siomisin A ve Deksametazon Uygulanan Jurkat Hücrelerinde Kaspaz-3 Enzim Aktivitesi, Mitokondri Zar Potansiyeli Bozulmaları ve Annexin V Apoptotik Testleri

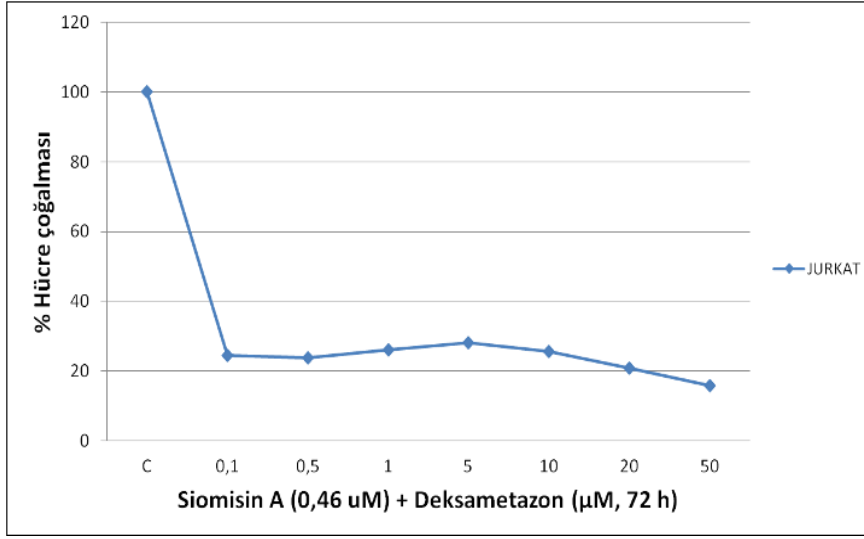
Jurkat hücreleri üzerinde gerçekleştirilen kaspaz-3 enzim aktivitesi, mitokondri zar potansiyeli bozulmaları ve Annexin V apoptotik testleri, siomisin A ve deksametazon beraber uygulanmasının Jurkat hücreleri üzerinde apoptotik etkisi olmadığını göstermiştir.



Şekil 11 : Jurkat hücrelerinin siomisin A ile 72 saat muamelesi sonucunda ele edilen IC50 değeri. IC50: 0,46 µM

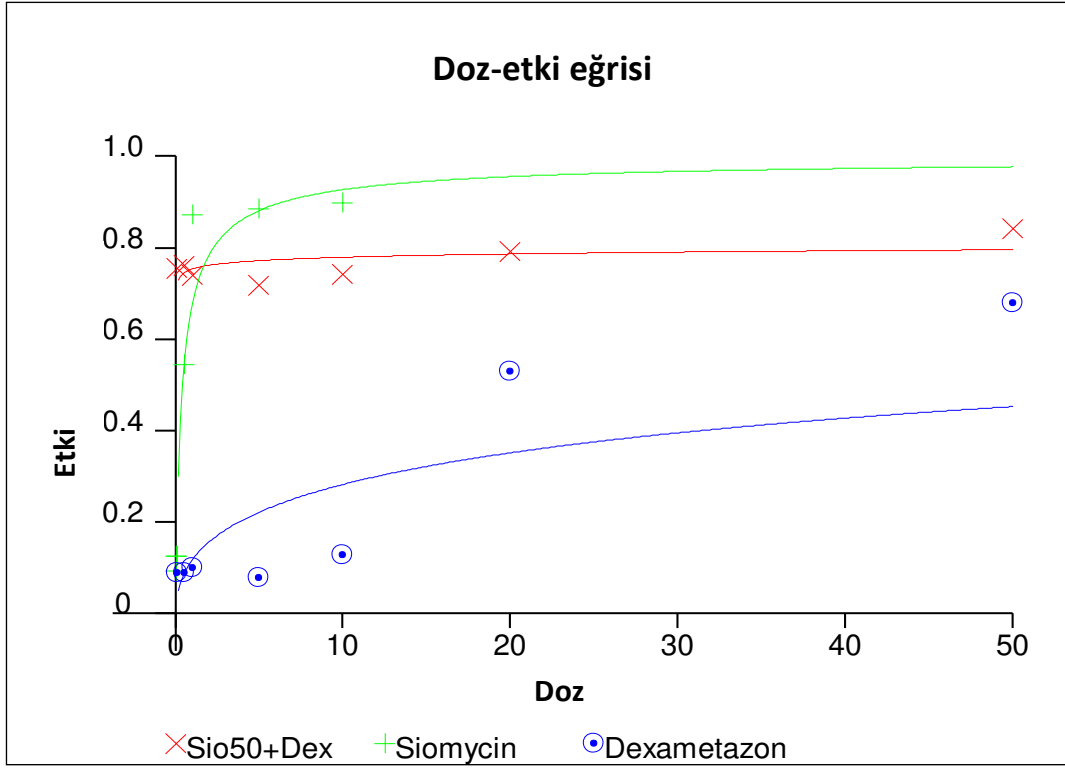


Şekil 12: Jurkat Hücrelerinin deksametazon ile 72 saat muamelesi sonucunda elde edilen IC50 değeri IC50: 19 µM



Deksametazon konsantrasyon (μM)	JURKAT Hücreleri (%)
0,1	24,45323
0,5	23,81213
1	26,04671
5	28,03866
10	25,61218
20	20,76333
50	15,84435

Şekil 13: Siomisin A ve deksametazonun beraber uygulanmasının Jurkat hücreleri çoğalması üzerindeki etkisi

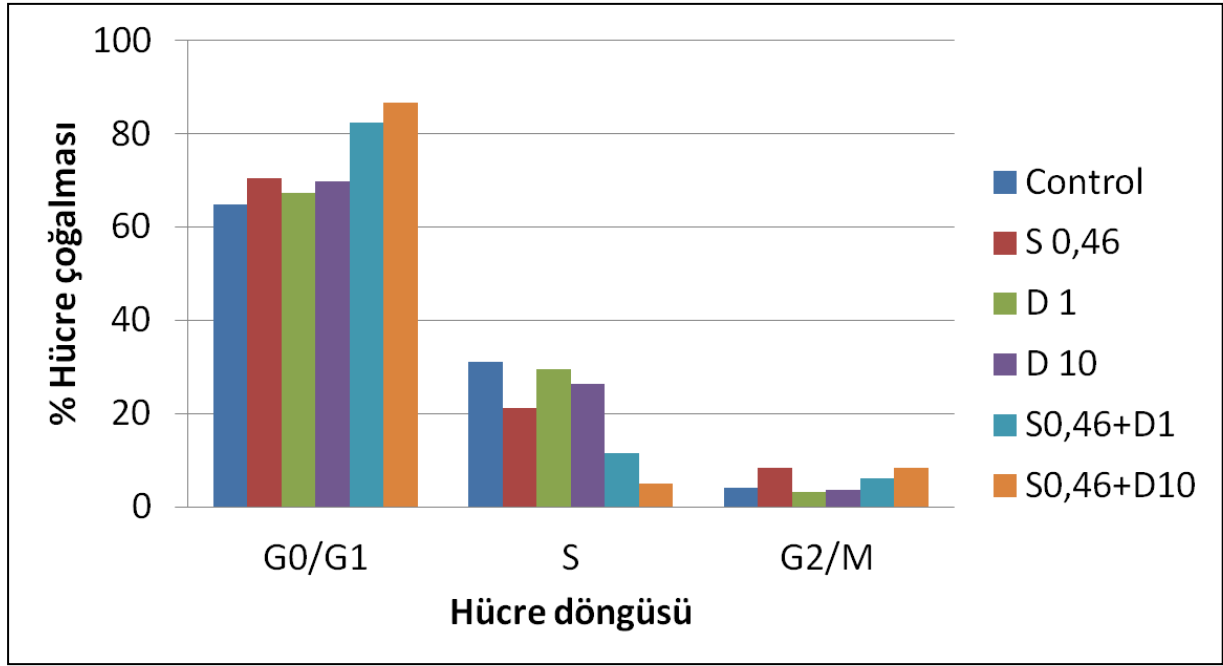


Şekil 14: İzobologram analizleri, doz-etki eğrisi

4.5 Deksmetazon ve Siomisin A'nın Beraber Uygulandığı Jurkat Hücrelerinde Hücre

Döngüsü Analizleri

Siomisin A ve deksametazon ile muamele edilen Jurkat hücrelerinin hücre döngüsü analizleri, bu iki ajanın kombinasyonunun Jurkat hücrelerini G₁ fazında durdurduğu ve hücrelerin bölünmesini anlamlı derecede engellediğini göstermiştir (Şekil 15, Tablo 7).



Şekil 15: Siomisin A ve deksametazon ile muamele edilen hücrelerin hücre döngüsü analizleri. İlaç dozları μM olarak hesaplanmıştır. **S:** Siomisin A **D:** Deksametazon

Tablo 7: Siomisin A ve Deksametazon İle Muamele Edilen Hücrelerin Hücre Döngüsü Analizleri

	Kontrol	S 0,46 μM	D 1 μM	D 10 μM	S0,46 μM +D1 μM	S0,46 μM +D10 μM
G0/G1	64,74	70,48	67,32	69,78	82,3	86,54
S	31,14	21,2	29,44	26,47	11,65	5
G2/M	4,11	8,32	3,24	3,74	6,05	8,45

S: Siomisin A **D:** Deksametazon

5. TARTIŞMA

Çocukluk çağının en sık görülen kanser tipi olan ALL, kendi içinde çok farklı biyolojik çeşitlilik gösteren bir kanser türüdür. Lenfoblastların taşıdığı belirli bazı immunolojik, sitogenetik ve moleküler genetik özelliklere göre hastalık seyri önemli olarak etkilenmektedir (1,2). Son yıllarda lösemi patogenezi üzerinde yapılan çalışmalar kromozomal aberrasyonlar, gen ekspresyon profillerinde değişiklikler ve genetik mutasyonların ALL patogenezinde ve prognozunda önemli yere sahip olduğunu göstermiştir (32). Lösemi genetiğinde saptanan bu değişiklikler bir yandan da hedefe yönelik tedavilerin gelişmesine zemin hazırlamaktadır.

FoxM1 hücre çoğalmasında, farklılaşmasında, hücre döngüsünün ilerlemesinde ve hücrel gelişim yollarında önemli roller oynayan bir transkripsiyon faktörüdür (10). Son yıllarda yapılan geniş kapsamlı gen ekspresyon analizleri akciğer kanseri, glioblastom, prostat kanseri, bazal hücre karsinomu, hepatosellüler karsinom, meme kanseri ve pankreas kanseri gibi bir çok kanser türünde FoxM1 sinyal ağının bozulduğunu ve bu transkripsiyon faktörünün yüksek oranda eksprese edildiğini göstermiştir (11-13,24,25,82,90). Biz de yaptığımız çalışmada FoxM1 gen ekspresyon seviyesinin T- ALL hücre hattında artmış olduğunu ve FoxM1 inhibisyonunun lösemik hücre çoğalmasını önemli oranda azalttığını gösterdik. FoxM1 çoğalan hücrelerde aktif olan bir gendir ve dolayısıyla ekspresyonu hızlı çoğalma özelliğine sahip tümör hücrelerinde artmıştır (19). Bu özellikleri göz önüne alındığında FoxM1 seviyelerinin tümör hücrelerinde artmış olarak bulunması ilk olarak bu hücrelerdeki yüksek çoğalma hızının bir sonucu olduğu düşüncesini akla getirmektedir ancak bu transkripsiyon faktörünün hücre çoğalmasını uyararak tümör oluşumunda ve tümörün ilerlemesi ve yayılmasında aktif olarak rol aldığı ve bu genin inhibisyonu ile kanserli hücre çoğalmasının önemli oranda azaldığı yapılan bir çok çalışma ile desteklenmiştir. FoxM1'in metastatik prostat kanserinde sürekli olarak *up-regüle* edildiği ve FoxM1'in *small interfering* RNA (siRNA) ile engellendiğinde prostatik kanser hücre kültüründe hücre çoğalmasını azalttığı gösterilmiştir (13). Benzer şekilde pankreas ve meme kanser hücrelerinde FoxM1'in RNA inhibisyonu ile *down-regüle* edilmesi sonucunda bu kanser hücrelerinin çoğalmasının ve yayılmasının önemli oranda azaldığı gösterilmiştir (25,90). Literatürde FoxM1'in lösemi patogenezindeki yeri ile ilgili sadece bir çalışma mevcuttur (26). Nakamura ve arkadaşlarının (26) yaptıkları bu çalışmada FoxM1'in AML hücrelerindeki ekspresyon düzeyleri belirlenmiş ve FoxM1b mRNA'nın insan AML hücre hattında ve hastalardan alınmış AML hücrelerinde ağırlıklı olarak eksprese edildiği ve FoxM1 geninin siRNA ile inhibisyonu sonucu AML hücre çoğalmasını engellediği gösterilmiştir. Biz de çalışmamızda FoxM1 mRNA

seviyelerinin T- ALL hücre hattında sağlıklı hücrelere göre belirgin olarak artmış olduğunu gösterdikten sonra bir FoxM1 inhibitörü olan siomisin A kullanarak T-ALL hücreleri üzerindeki etkisini inceledik. Siomisin A ve T-ALL tedavisinde kullanılan önemli ajanlardan biri olan deksametazonun ayrı ayrı uygulandığı T-ALL hücre hattında, FoxM1 mRNA ekspresyonunun uygulanan bu ilaçların dozlarına bağlı olarak önemli oranda azaldığı ilk kez bu çalışmada gösterilmiştir. Siomisin A'nın FoxM1 *down-regülasyonu* yanında FoxM1 mRNA ve protein seviyelerini azalttığı bilinmektedir (27,28,30). Çalışmamızdaki bulgular da literatürü desteklemektedir.

FoxM1 inhibisyonunun hücre çoğalması üzerinde etkisini siomisin A ve deksametazon uyguladığımız T-ALL hücre hattında araştırdık. Bir ve 10 µM deksametazona maruz bırakılan T-ALL hücrelerinin çoğalması kontrol grubuna göre %8 ve %13 azalırken, aynı dozlarda deksametazonun, siomisin A ile beraber uygulanması durumunda hücrelerin çoğalmasını çok daha yüksek oranda (%74 ve %75) baskıladığını gösterdik. Bir glukokortikoid olan deksametazonun lenfoblastlar üzerindeki glukokortikoid reseptörlerine bağlandıktan sonra bir dizi mekanizma sonucu sitokin salınımını engellediği, bir çok onkogenin ekspresyonu değiştirdiği, hücre döngüsünde duraklamaya ve apoptoza neden olduğu bilinmektedir (50). Biz çalışmamızda, spesifik FoxM1 inhibitörü olan siomisin A kullanıldığında T-ALL hücrelerindeki çoğalmanın deksametazona göre çok daha yüksek oranda engellendiğini gösterdik. Yaptığımız izobologram analizde de deksametazon ve siomisin A'nın çok kuvvetli sinerji gösterdiklerini ve siomisin A'nın deksametazonun etkinliğini arttırdığını ortaya koyduk. Tüm bu veriler FoxM1 inhibisyonunun ALL tedavisinde etkin bir rolü olabileceği fikrini desteklemektedir.

Hücre döngüsünde ortaya çıkan bozuklukların bir çok kanser türünün gelişiminde rol aldığı bilinmektedir. T-ALL ve T hücreli lenfoma gibi T-lenfoblastik hücre kanserlerinin T-hücre maturasyonunun erken evrelerinde prekürsor T lenfoblastın belli bazı noktalarında gelişiminin duraklamaya uğraması ile ortaya çıktığı öne sürülmektedir (103). Yapılan çalışmalarda FoxM1'in hücre döngüsünün ilerlemesi ve hücre yaşlanmasının önlenmesinde kritik öneme sahip olduğu anlaşılmış ve hücre döngüsünün ilerlemesinde rol alan bazı genlerin ekspresyon seviyelerini arttırırken, hücre yaşlanmada önemli genlerin ekspresyon seviyelerini azaltarak tümör oluşumuna katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür (20,22,23,87). FoxM1 hücre döngü ilerlemesinin yönetilmesinde ve genomik bütünlüğün sağlanmasında çok önemli rol oynar, FoxM1 ekspresyonu ve transkripsiyonel aktivitesi hücre döngüsünün ilerlemesine bağlıdır. FoxM1 transkripsiyonel aktivitesini başlatmak ve sürdürmek siklin-CDK komplekslerinin

bağlanmasını ve ardından da fosforilasyonunu gerektir (19). Biz yaptığımız hücre döngüsü analizinde siomisin A ve deksametazonun ayrı ayrı ve beraber uygulanması ile elde edilen FoxM1 inhibisyonunun T-ALL hücrelerini G₁ fazında durdurduğunu ve hücrelerin bölünmesini anlamlı derecede engellediğini gösterdik. *FoxM1* geninin hücre döngüsü sırasında özel bir ekspresyon şekli gösterdiği, ekspresyonunun G₁ fazında başladığı, S-fazında artıp G₂ ve mitoz boyunca devam ettiği bilinmektedir (19). Daha önce yapılan çalışmalarda FoxM1 fosforilasyonunun çoğunlukla mitozda gerçekleştiği bildirilmiş olmasına rağmen, son çalışmalarda FoxM1 fosforilasyonunun siklin-CDK kompleksleri ile erken G₁ de başladığı ve hücre döngüsündeki G₂ ve M-fazları boyunca devam ettiği gösterilmiştir (11,78,79). Nakamura ve arkadaşları (26) ise AML hücrelerinde yaptığı çalışmada FoxM1 ekspresyonunun baskılanmasının hücre döngüsünü G₂/M fazında baskıladığını göstermişlerdir. Yaptıkları çalışmada, FoxM1 *down-regülasyonunun* AML hücrelerinde *Skp2*, *Cdc25b*, *siklin B1*, *Survivin*, *KIS* ve *Aurora B* kinaz gibi mitotik düzenleyici genlerin protein ekspresyonunu belirgin olarak azaltırken p27^{Kip1} ve p21^{Cip1} gibi hücre döngüsünün ilerlemesinde negatif etkiye sahip CDK inhibitörü olan protein miktarlarını arttırdığını ve böylelikle mitozun ilerlemesi ve hücre çoğalmasını engellediğini göstermişlerdir. Tüm bunlarla beraber FoxM1 inhibisyonunun özellikle AML hücrelerinde neden G₁ fazında değil de G₂/M fazında baskılandığı henüz net değildir. Çalışmamızda siomisin A uygulanan T-ALL hücrelerinin G₁ fazında baskılanmış olarak bulunması FoxM1'in ekspresyonundaki artışın G₁ fazında başladığını desteklemekte olup literatürde bu konu ile ilgili yapılmış olan diğer çalışmaları desteklemektedir.

Farklı insan kanser hücre hatlarında yapılan çalışmalarda siomisin A'nın FoxM1 inhibisyonuna neden olarak hücre büyümesini engellediği ve apoptoza neden olduğu gösterilmiştir. Bhat ve arkadaşları, siomisin A'nın insan melanoma hücre hattında ve lösemi, nöroblastom ve hepatosellüler karsinom gibi hücre hatlarında yaptıkları çalışmalarda siomisin A'nın kanser hücrelerinde apoptozu uyardığını göstermişlerdir (28,30). Biz çalışmamızda apoptozu Kaspaz-3 enzim aktivitesi, mitokondri zar potansiyeli ve Anneksin V apoptotik testleri kullanarak araştırdık ancak siomisin A uygulamasının T-ALL hücre hattı üzerinde apoptozu uyarıcı etkisini saptamadık.

FoxM1'in bir çok onkogenik yolakla kesiştiği, bu yolaklarla ve diğer sinyal ileti yolaklarıyla yaptığı *cross-talk* sayesinde tümör saldırganlığına önemli katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Karsinogenezde önemli olan CDK, PI3K/Akt, MAPK/ERK, NF- κ B, SHH gibi faktörlerin ve yolakların aktivasyonuna neden olurken; *p16*, *pRb*, *p53* ve *p19^{Arf}* gibi tümör supresor

genlerinin ekspresyon seviyelerinde azalmaya neden olur. Karsinogeneizde rol alan bu önemli yollardan; özellikle PI3K/Akt'nin ve CDK'ların T- ALL patogeneizinde önemli rol oynadıkları bilinmektedir (37). FoxM1 inhibisyonunun T- ALL hücre hattında hücre çoğalmasını bu kadar belirgin olarak azaltması FoxM1'in T-ALL lösemi patogeneizinde yer alan bu yollarla *cross-talk* yapmasının bir sonucu olabilir. Bu ikisini ilişkilendirmek için T-ALL'de FoxM1 inhibisyonu ile CDK, PI3K/Akt, MAPK/ERK, NF-KB, SHH yollarındaki genlerin ve *p16*, *pRb*, *p53*, *p19^{Arf}* gibi tümör supresor genlerin ekspresyon seviyelerini incelemek gerekmektedir.

Günümüzde lösemi üzerine yapılan çalışmalarda lösemi patogeneizinde belirlenen transkripsiyonel faktörlerin klinikte kullanımı üzerine odaklanılmıştır. Bu transkripsiyonel faktörlerin risk grubu belirlemede ve tedavinin yönlendirilmesinde kullanılabilecek önemli prognostik belirteçler olabileceği yanı sıra, hedefe yönelik tedaviler arasında da yer alabileceği ileri sürülmüştür (104-106). Biz de çalışmamızda hücre döngüsünün önemli düzenleyicilerinden biri olan FoxM1 transkripsiyon faktörünün ekspresyonunun T-ALL hücre hattında artmış olduğunu ve ekspresyon seviyelerinin deksametazon ve siomisin A uygulanması ile baskılandığını gösterdik. Hücre kültürü düzeyinde yapılan bu çalışmadan sonra, FoxM1'in ALL tedavisi süresince ekspresyon seviyesindeki değişiklikleri, ALL tedavisindeki prognostik önemini ve hedefe yönelik tedavideki yerini daha iyi belirlemek için T-ALL hastalarından elde edilen lösemi hücrelerinin kullanılacağı daha geniş kapsamlı, prospektif çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR

1. FoxM1 gen ekspresyon seviyesi T- ALL hücre hattında artmış olarak bulunmuştur.
2. Deksametazonun ve FoxM1 inhibitörü olan Siomisin A'nın ayrı ayrı uygulandığı T- ALL hücre hattında, FoxM1 mRNA ekspresyonunun uygulanan bu ilaçların dozlarına bağlı olarak önemli oranda azaldığı gösterilmiştir.
3. Yapılan izobologram analizinde deksametazon ve siomisin A'nın çok kuvvetli sinerji gösterdikleri ortaya konulmuştur.
4. Bir ve 10 µM deksametazona maruz bırakılan T-ALL hücrelerinin çoğalması kontrol grubuna göre %8 ve %13 azalırken, aynı dozlarda deksametazonun, siomisin A ile beraber uygulanması durumunda hücrelerin çoğalmasını çok daha yüksek oranda (%74 ve %75) baskıladığı gösterilmiştir.
5. Yapılan hücre döngüsü analizinde siomisin A ve deksametazonun ayrı ayrı ve beraber uygulanmasının T-ALL hücrelerini G₁ fazında durdurduğu ve hücrelerin bölünmesini anlamlı derecede engellediği gösterilmiştir.

7. KAYNAKLAR

1. Gurney JG, Severson RK, David S, Robison LL. Incidence of cancer in children in United States. Sex-, race-, and 1-year age-specific rates by specific histologic type. *Cancer* 1995;75: 2186-2195.
2. Barouchel A, Leblanc T, Schaison G. Pathology of acute lymphoblastic leukemias. In: *Pediatric Hematology*. 2nd ed. Lilleyman JS, Hann IM, Blanchette VS (editörler). London: Churchill Livingstone 1999:537-563.
3. Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S ve ark. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol* 2011;29:551-565.
4. Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2004;8:1535-1548.
5. Bhojwani D, Howard SC, Pui CH. High-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma* 2009;9 Suppl 3: 222-230.
6. Schultz KR, Bowman WP, Aledo A ve ark. Improved early event-free survival with imatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2009;27:5175-5181.
7. Salzer WL, Devidas M, Carroll WL ve ark. Long-term results of the pediatric oncology group studies for childhood acute lymphoblastic leukemia 1984-2001: a report from the Children's Oncology Group. *Leukemia* 2009;24:355-370.
8. Einsiedel HG, von Stackelberg A, Hartmann R ve ark. Long-term outcome in children with relapsed ALL by risk-stratified salvage therapy: results of trial acute lymphoblastic leukemia-relapse study of the Berlin-Frankfurt-Münster Group 87. *J Clin Oncol* 2005; 23:7942-7950.
9. Lee-Sherick AB, Linger RM, Gore L ve ark. Targeting paediatric acute lymphoblastic leukaemia: novel therapies currently in development. *Br J Haematol* 2010;151:295-311.
10. Wang Z, Ahmad A, Li Y ve ark. Forkhead box M1 transcription factor: a novel target for cancer therapy. *Cancer Treat Rev* 2009;36:151-156.
11. Liu M, Dai B, Kang SH ve ark. FoxM1B is overexpressed in human glioblastomas and critically regulates the tumorigenicity of glioma cells. *Cancer Res* 2006;66:3593-3602.
12. Kim IM, Ackerson T, Ramakrishna S ve ark. The Forkhead BoxM1 transcription factor stimulates the proliferation of tumor cells during development of lung cancer. *Cancer Res* 2006;66:2153-2161.

13. Kalin TV, Wang IC, Ackerson TJ ve ark. Increased levels of the FoxM1 transcription factor accelerate development and progression of prostate carcinomas in both TRAMP and LADY transgenic mice. *Cancer Res* 2006;66:1712-1720.
14. Katoh M. Human FOX gene family. *Int J Oncol* 2004;25:1495-1500.
15. Korver W, Roose J, Wilson A, Clevers H. The winged-helix transcription factor Trident is expressed in actively dividing lymphocytes. *Immunobiology* 1997;198:157-161.
16. Leung TW, Lin SS, Tsang AC ve ark. Over-expression of FoxM1 stimulates cyclin B1 expression. *FEBS Lett* 2001;507:59-66.
17. Wonsey DR, Follettie MT. Loss of the forkhead transcription factor FoxM1 causes centrosome amplification and mitotic catastrophe. *Cancer Res* 2005;65:5181-5189.
18. Ye H, Holterman AX, Yoo KW ve ark. Premature expression of the winged helix transcription factor HFH-11B in regenerating mouse liver accelerates hepatocyte entry into S phase. *Mol Cell Biol* 1999;19:8570-8580.
19. Laoukili J, Stahl M, Medema RH. FoxM1: at the crossroads of ageing and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2007;1775:92-102.
20. Wang X, Krupczak-Hollis K, Tan Y ve ark. Increased hepatic Forkhead Box M1B (FoxM1B) levels in old-aged mice stimulated liver regeneration through diminished p27^{Kip1} protein levels and increased Cdc25B expression. *J Biol Chem* 2002;277:44310-44316.
21. Wang X, Hung NJ, Costa RH. Earlier expression of the transcription factor HFH-11B diminishes induction of p21(CIP1/WAF1) levels and accelerates mouse hepatocyte entry into S-phase following carbon tetrachloride liver injury. *Hepatology* 2001; 33:1404-1414.
22. Fu Z, Malureanu L, Huang J ve ark. Plk1-dependent phosphorylation of FoxM1 regulates a transcriptional programme required for mitotic progression. *Nat Cell Biol* 2008;10:1076-1082.
23. Wang X, Kiyokawa H, Dennewitz MB, Costa RH. The Forkhead Box M1b transcription factor is essential for hepatocyte DNA replication and mitosis during mouse liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:16881-16886.
24. Teh MT, Wong ST, Neill GW ve ark. FOXM1 is a downstream target of Gli1 in basal cell carcinomas. *Cancer Res* 2002;62:4773-4780.

25. Wang Z, Banerjee S, Kong D ve ark. Down-regulation of Forkhead Box M1 transcription factor leads to the inhibition of invasion and angiogenesis of pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2007;67:8293-300.
26. Nakamura S, Hirano I, Okinaka K ve ark. The FOXM1 transcriptional factor promotes the proliferation of leukemia cells through modulation of cell cycle progression in acute myeloid leukemia. *Carcinogenesis* 2010;31:2012-2021.
27. Radhakrishnan SK, Bhat UG, Hughes DE ve ark Identification of a chemical inhibitor of the oncogenic transcription factor forkhead box M1. *Cancer Res* 2006;66:9731-9735.
28. Bhat UG, Zipfel PA, Tyler DS, Gartel AL. Novel anticancer compounds induce apoptosis in melanoma cells. *Cell Cycle* 2008;7:1851-1855.
29. Gartel AL. A new target for proteasome inhibitors: FoxM1. *Expert Opin Investig Drugs* 2010;19:235-242.
30. Bhat UG, Halasi M, Gartel AL. Thiazole antibiotics target FoxM1 and induce apoptosis in human cancer cells. *PLoS One* 2009;4:5592.
31. Çetingül N. Lökomegenezis:Patogenez. Anak S, Aydoğan G, Çetin M, İrken G (editörler). *Pediyatrik Hematoloji*, İstanbul Medikal Yayıncılık 2011; 557.
32. Graux C. Biology of acute lymphoblastic leukemia (ALL): clinical and therapeutic relevance. *Transfus Apher Sci* 2011;44:183-189.
33. De Keersmaecker K, Marynen P, Cools J. Genetic insights in the pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2005;90:1116–11127.
34. Pui CH, Jeha S. New therapeutic strategies for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Drug Discovery* 2007;6:149–165.
35. Graux C, Cools J, Michaux L ve ark. Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic leukemia: from thymocyte to lymphoblast. *Leukemia* 2006;20:1496–1510.
36. Murre C. Intertwining proteins in thymocyte development and cancer. *Nat Immunol* 2000;1:97–98.
37. Kraszevska MD, Davidowska M, Szczepanski T, Witt M. T-cell acute lymphoblastic leukemia: recent molecular biology findings. *Br J Haematol* 2011;156:303-315.
38. Vlierberghe P, Pieters R, Beverloo HB, Meijerink J. Molecular genetic insights in paediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Br J Haematol* 2008;143:153-168.
39. Kutluk T, Yeşilipek A. Turkish National pediatric cancer registry 2002-2008 (Turkish Pediatric Oncology Group and Turkish Pediatric Hematology Society). *Pediatr Blood Cancer* 2009;53:851.

40. Soycan LY. ALL: Tanı, Klinik. Anak S, Aydoğan G, Çetin M, İrken G (editörler). Pediatrik Hematoloji, İstanbul Medikal Yayıncılık 2011; 597-609.
41. Bene MC, Castoldi G, Knapp W ve ark. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL): Proposals for the immunological classification of acute leukemias. Leukemia 1995;9:1783-1786.
42. Jeha S, Pui CH. Risk-adapted treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. Hematol Oncol Clin North Am 2009;23:973-90.
43. Pieters R, Carroll WL. Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. Hematol Oncol Clin North Am 2010;24:1-18.
44. Vrooman LM, Silverman LB. Childhood acute lymphoblastic leukemia: update on prognostic factors. Curr Opin Pediatr 2009;2:1-8.
45. Rabin KR, Berg S, Steuber P, Poplack DG. Clinical manifestations of acute lymphoblastic leukemia. In: Hematology Basic Principles and Practise. 5th ed. Hoffman R, Benz EJ, Shattil S (editörler). Philadelphia:Churchill Livingstone 2008: 1023.
46. Ağaoğlu L, Akçay A. ALL: Tedavi. Anak S, Aydoğan G, Çetin M, İrken G (editörler). Pediatrik Hematoloji İstanbul Medikal Yayıncılık 2011; 597-609
47. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML ve ark. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 2000;96:2691-2696.
48. Izraeli S, Waldman D. Minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: current status and challenges. Acta Haematol 2004;112:34-39.
49. Anak S, Aydoğan G, Çetin M, İrken G ve ark. Destek Tedavileri. Pediatrik Hematoloji, İstanbul Medikal Yayıncılık 2011; 597-609.
50. Inaba H, Pui CH. Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukemia. Lancet Oncol. 2010;11:1096-106.
51. Kaspers GJ, Veerman AJ, Popp-Snijders ve ark. Comparison of the antileukemic activity in vitro of dexamethasone and prednisolone in childhood acute lymphoblastic leukemia. Med Pediatr Oncol 1996;27:114-121
52. Bostrom BC, Sensel MR, Sather HN ve ark. Dexamethasone versus prednisone and daily oral versus weekly intravenous mercaptopurine for patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Cancer Group. Blood 2003;101:3809-3817.

53. Waber DP, Carpentieri SC, Klar N ve ark. Cognitive sequelae in children treated for acute lymphoblastic leukemia with dexamethasone or prednisone. *J Pediatr Hematol Oncol* 2000;22:206-213.
54. Pui CH, Evans WE. Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2006;354:166–78.
55. Bleyer WA, Poplack DG. Prophylaxis and treatment of leukemia in the central nervous system and other sanctuaries. *Semin Oncol* 1985;12:131-148.
56. Pui CH. Toward optimal central nervous system-directed treatment in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2003;21:179-181.
57. Ertem M. Kök hücre nakli endikasyonları. Anak S, Aydoğan G, Çetin M, İrken G (editörler). *Pediyatrik Hematoloji*, İstanbul Medikal Yayıncılık 2011; 822-823.
58. Handgretinger R, Kurtzberg J, Egeler RM. Indications and donor selections for allogeneic stem cell transplantation in children with hematologic malignancies. *Pediatr Clin North Am* 2008;55:71-96.
59. Lee-Sherick AB, Linger RM, Gore L ve ark. Targeting paediatric acute lymphoblastic leukaemia: novel therapies currently in development. *Br J Haematol* 2010;151:295-311.
60. Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H ve ark. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 2006;354:2531–2541.
61. Kantarjian H, Giles F, Wunderle L ve ark. Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *N Engl J Med* 2006;354:2542–2551.
62. Weng AP, Ferrando AA, Lee W ve ark. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 2004;306:269-271.
63. Milano J, McKay J, Dagenais C ve ark. Modulation of notch processing by gamma-secretase inhibitors causes intestinal goblet cell metaplasia and induction of genes known to specify gut secretory lineage differentiation. *Toxicol Sci* 2004;82:341-358.
64. Gandhi V, Kilpatrick JM, Plunkett W ve ark. A proof-of-principle pharmacokinetic, pharmacodynamic, and clinical study with purine nucleoside phosphorylase inhibitor immucillin-H (BCX-1777, forodesine). *Blood* 2005;106:4253–4260.
65. Berg SL, Blaney SM, Devidas M ve ark. Phase II study of nelarabine (compound 506U78) in children and young adults with refractory T-cell malignancies: a report from the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol* 2005;23:3376–3382.
66. Brown P, Levis M, McIntyre E ve ark. Combinations of the FLT3 inhibitor CEP-701 and chemotherapy synergistically kill infant and childhood MLL-rearranged ALL cells in a sequence-dependent manner. *Leukemia* 2006;20:1368-1376.

67. Stam RW, den Boer ML, Passier MM ve ark. Silencing of the tumor suppressor gene FHIT is highly characteristic for MLL gene rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2006;20:264–271.
68. Meinhardt A, Burkhardt B, Zimmermann M ve ark; Berlin-Frankfurt-Münster group. Phase II window study on rituximab in newly diagnosed pediatric mature B-cell non-Hodgkin's lymphoma and Burkitt leukemia. *J Clin Oncol* 2010;28:3115-3121.
69. Raetz EA, Cairo MS, Borowitz MJ ve ark; Children's Oncology Group Pilot Study. Chemoimmunotherapy reinduction with epratuzumab in children with acute lymphoblastic leukemia in marrow relapse: a Children's Oncology Group Pilot Study. *J Clin Oncol* 2008;26:3756-3762.
70. Angiolillo AL, Yu AL, Reaman G ve ark. A phase II study of Campath-1H in children with relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group report. *Pediatr Blood Cancer* 2009;53:978-983.
71. O'Leary M, Krailo M, Anderson JR, Reaman GH; Children's Oncology Group. Progress in childhood cancer: 50 years of research collaboration, a report from the Children's Oncology Group. *Semin Oncol* 2008;35:484-493.
72. Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev* 2000;14:142–146.
73. Myatt SS, Lam EW. The emerging roles of forkhead box (fox) proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7:847-859.
74. Korver W, J. Roose, H. Clevers ve ark. The winged-helix transcription factor. Trident is expressed in cycling cells. *Nucleic Acids Res* 1997;25:1715–1719.
75. Yao KM, Sha M, Lu Z, Wong GG. Molecular analysis of a novel winged helix protein, WIN. Expression pattern, DNA binding property, and alternative splicing within the DNA binding domain. *J Biol Chem* 1997; 272:1927–1936.
76. Ye H, Kelly TF, Samadani U ve ark. Hepatocyte nuclear factor 3/fork head homolog 11 is expressed in proliferating epithelial and mesenchymal cells of embryonic and adult tissues. *Mol Cell Biol* 1997;17:1626–1641.
77. Ahn JI, Lee KH, Shin DM ve ark. Temporal expression changes during differentiation of neural stem cells derived from mouse embryonic stem cell, *J. Cell Biochem* 2004;93:563–578.
78. Karsten SL, Kudo LC, Jackson R ve ark. Global analysis of gene expression in neural progenitors reveals specific cell-cycle, signaling, and metabolic networks. *Dev Biol* 2003;261:165–182.

79. Luscher-Firzloff JM, Lilischkis R, Luscher B. Regulation of the transcription factor FOXM1c by Cyclin E/CDK2, FEBS Lett 2006;580:1716–1722.
80. Major ML, Lepe R, Costa RH. Forkhead box M1B transcriptional activity requires binding of Cdk–Cyclin complexes for phosphorylation-dependent recruitment of p300/CBP coactivators. Mol Cell Biol 2004;24:2649–2661.
81. Ma RY, Tong TH, Cheung AM ve ark. Raf/MEK/MAPK signaling stimulates the nuclear translocation and transactivating activity of FOXM1c. J Cell Sci 2005;118:795–806.
82. Kalinichenko VV, Major ML, Wang X ve ark. FoxM1b transcription factor is essential for development of hepatocellular carcinomas and is negatively regulated by the p19ARF tumor suppressor. Genes Dev 2004;18:830–850.
83. Krupczak-Hollis K, Wang X, Kalinichenko VV ve ark. The mouse Forkhead Box m1 transcription factor is essential for hepatoblast mitosis and development of intrahepatic bile ducts and vessels during liver morphogenesis. Dev Biol 2004;276:74–88.
84. Kim IM, Ramakrishna S, Gusarova GA ve ark. The forkhead box m1 transcription factor is essential for embryonic development of pulmonary vasculature. J Biol Chem;2005 280:22278–22286.
85. Zhang H, Ackermann AM, Gusarova GA ve ark. The Foxm1 transcription factor is required to maintain pancreatic beta cell mass. Mol Endocrinol 2006;20:1853–1866.
86. Ye H, Holterman AX, Yoo KW ve ark. Premature expression of the winged helix transcription factor HFH-11B in regenerating mouse liver accelerates hepatocyte entry into S phase. Mol Cell Biol 1999;19:8570–8580.
87. Laoukili J, Kooistra MR, Bras A ve ark. FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability. Nat Cell Biol 2005;7:126–136.
88. Wang IC, Chen YJ, Hughes D ve ark. Forkhead Box M1 regulates the transcriptional network of genes essential for mitotic progression and genes encoding the SCF (Skp2-Cks1) ubiquitin ligase. Mol Cell Biol 2005;25:10875–10894.
89. Cardozo T, Pagano M. The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. Nat Rev Mol Cell Biol 2004;5:739–751.
90. Ahmad A, Wang Z, Kong D ve ark. FoxM1 downregulation leads to inhibition of proliferation, migration and invasion of breast cancer cells through the modulation of extracellular matrix degrading factors. Breast Cancer Res Treat 2010;122:337–346.

91. Bektas N, Haaf A, Veeck J ve ark. Tight correlation between expression of the Forkhead transcription factor FOXM1 and HER2 in human breast cancer. *BMC Cancer* 2008; 8:42.
92. Li Q, Zhang N, Jia Z ve ark. Critical role and regulation of transcription factor FoxM1 in human gastric cancer angiogenesis and progression. *Cancer Res* 2009;69:3501-3509.
93. Koo CY, Muir KW, Lam EW. FOXM1: From cancer initiation to progression and treatment. *Biochim Biophys Acta* 2012;1819:28-37.
94. Gartel AL. FoxM1 inhibitors as potential anticancer drugs. *Expert Opin Ther Targets* 2008;12:663–665.
95. Radhakrishnan SK, Gartel AL. FOXM1: the Achilles' heel of cancer? *Nat Rev Cancer* 2008;8: c1; author reply c2.
96. Adami GR, Ye H. Future roles for FoxM1 inhibitors in cancer treatments. *Future Oncol* 2007;3: 1–3.
97. Bhat UG, Halasi M, Gartel AL. FoxM1 is a general target for proteasome inhibitors. *PLoS ONE* 2009;4:1-5.
98. Hagg M, Biven K, Ueno T ve ark. A novel high-through-put assay for screening of pro-apoptotic drugs. *Invest New Drugs* 2002;20:253-259.
99. Erdal H, Berndtsson M, Castro J ve ark. Induction of lysosomal membrane permeabilization by compounds that activate p53-independent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*,2005;102:192-7.
100. Baran Y, Salas A, Şenkal CE ve ark. Alterations of ceramide/sphingosine 1-phosphate rheostat involved in the regulation of resistance to imatinib-induced apoptosis in K562 human chronic myeloid leukemia cells. *J Biol Chemistry* 2007; 282:10922-10934.
101. Baran Y, Ural AU, Gunduz U. Mechanisms of cellular resistance to imatinib in human chronic myeloid leukemia cells. *Hematology* 2007;12:497-503.
102. Zhao L, Au JL, Wientjes M.G. Comparison of methods for evaluating drug-drug interaction. *Frontiers in Bioscience* 2010;2:241-249.
103. Bonn BR, Krieger D, Burkhardt B. Cell cycle regulatory molecular profiles of pediatric T-cell lymphoblastic leukemia and lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 2012;53:557-68.
104. Hunger SP, Raetz EA, Loh ML, Mullighan CG. Improving outcomes for high-risk ALL: translating new discoveries into clinical care. *Pediatr Blood Cancer*. 2011;56:984-93.

105. Roberts KG, Mullighan CG. How new advances in genetic analysis are influencing the understanding and treatment of childhood acute leukemia. *Curr Opin Pediatr.* 2011;23:34-40.
106. Liu H, Chiang MY, Pear WS. Critical roles of NOTCH1 in acute T-cell lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol.* 2011;94:118-25.