

T.C
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİDE MDM2'NİN FARMAKOLOJİK
İNHİBİSYONUNUN KLİNİK ÖNCESİ YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞEYDA GÜNGÖRDÜ

TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ ERHAN APTULLAHOĞLU

BİLECİK, 2025

10701909

T.C
BİLECİK ŞEYH EDEBALI ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİDE MDM2'NİN FARMAKOLOJİK
İNHİBİSYONUNUN KLİNİK ÖNCESİ YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞEYDA GÜNGÖRDÜ

TEZ DANIŞMANI
DR. ÖĞR. ÜYESİ ERHAN APTULLAHOĞLU

BİLECİK, 2025

10701909

BEYAN

“Akut lenfoblastik lösemide MDM2'nin farmakolojik inhibisyonunun klinik öncesi yöntemlerle araştırılması.” adlı yüksek lisans tezinin hazırlık ve yazımı sırasında bilimsel ahlak kurallarına uyduğumu, başkalarının eserlerinden yararlandığım bölümlerde bilimsel kurallara uygun olarak atıfta bulunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, tezin herhangi bir kısmının Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını, aksinin tespit edileceği muhtemel durumlarda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim beyan ederim.

Bu tez çalışmasının yürütülmesinde 121S986 ve 323S070 numaralı TÜBİTAK ARDEB projelerinden altyapı ve sarf malzeme desteği alınmıştır.			
DESTEK ALINMIŞTIR	X	DESTEK ALINMAMIŞTIR	
Destek alındı ise;			
Destekleyen Kurum: TÜBİTAK			
Desteğin Türü		Proje Numarası	
1-BAP (Bilimsel Araştırma Projesi)		121S986	
2-TÜBİTAK	X	323S070	
Diğer			

Şeyda GÜNGÖRDÜ

Tarih

.....

İmza

.....

ÖN SÖZ

Tez çalışmam boyunca danışmanlığımı yürüten ve tez konumun belirlenmesinden çalışmanın sonuçlandırılmasına kadar değerli görüş ve önerilerini sunan, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yardımlarını ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, yoğun çalışmaları sırasında sabır gösterdikleri için Dr. Öğr. Üyesi Erhan APTULLAHOĞLU' na sonsuz teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Çalışmalarım boyunca bilgilerinden yararlandığım, desteklerini hiçbir şekilde esirgemeyen ve her koşulda yanımda olan Doç. Dr. Alev AKPINAR BORAZAN'a ve Dr. Öğr. Üyesi Emrah KAYGUSUZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisans eğitimim de dahil olmak üzere hayatımın her anında maddi ve manevi destekleriyle yanımda olan çok kıymetli annem Seyran GÜNGÖRDÜ, çok kıymetli babam Şaban GÜNGÖRDÜ, her zaman arkamda olan sevgili kardeşim Furkan GÜNGÖRDÜ' ve ablam Hatice AKTAŞ'a sonsuz teşekkür ederim.

Şeyda GÜNGÖRDÜ

2025

ÖZET

AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİDE MDM2'NİN FARMAKOLOJİK İNHİBİSYONUNUN KLİNİK ÖNCESİ YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Akut lenfoblastik lösemiye (ALL) yönelik mevcut tedavilere rağmen, terapi sonucu hastalığın yüksek klinik değişkenliği, özellikle yüksek risk özelliklerine sahip hastalar için yeni tedavi stratejileri gerektirmektedir. *TP53* geninin kodladığı ve genomun koruyucusu olarak bilinen tümör baskılayıcı protein p53, tümör gelişiminin engellenmesinde önemli rol oynamaktadır. ALL vakalarının %90'ından fazlası başlangıçta yabani tip *TP53*'ü barındırır. Yabani tip *TP53*'ten kodlanan ancak *TP53* mutasyonları ve MDM2'nin aşırı ekspresyonu gibi çeşitli nedenlerle işlevini kaybeden p53'ün yeniden aktivasyonu, kanser tedavisinde ilgi çekici bir terapötik yaklaşımdır. p53, birincil baskılayıcısı olan MDM2 proteinini hedef alarak genotoksik olmayan bir şekilde aktive edilebilir. Günümüzde MDM2 inhibitörlerini içeren klinik denemeler, bu tedavilerin kanser tedavisi stratejilerine dahil edilmesine olan ilgiyi yansıtan, giderek artan sayıda araştırma kapsamında yürütülmektedir. Erken faz klinik denemeleri, geliştirilen bileşiklerden biri olan idasanutlin'in (RG7388) umut vaat ettiğini ortaya konulmuştur. RG7388, geliştirme potansiyeli, seçiciliği ve biyoyararlanımı olan ikinci nesil bir MDM2-p53 bağlanma inhibitörüdür. Bu çalışmanın amacı, RG7388'in ALL için terapötik bir strateji olarak etkinliğini hücre hatlarında değerlendirmek ve daha ileri araştırmalar için bir ön veri oluşturmaktır. RG7388, çeşitli *TP53* mutasyon profillerine sahip beş ALL hücre hattından dördünde canlılığı azaltırken, yalnızca bir hücre hattı yüksek direnç sergiledi. RG7388, apoptozun içsel ve dışsal yollarında yer alan p53 hedef genlerinin yukarı regülasyonu ile pro-apoptotik gen ekspresyonları indüklendi. Bu çalışmada RG7388, yeni bir tedavi stratejisi olarak ALL hücrelerinde klinik öncesi yöntemlerle araştırıldı. Bu çalışma daha fazla fonksiyonel araştırma ve *in vivo* değerlendirme önermektedir ve p53-fonksiyonel ALL'nin MDM2 inhibitörleriyle tedavi edilmesi ihtimalini vurgulamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Akut Lenfoblastik Lösemi, p53, Antikanser Tedavisi, Hedefe Yönelik Tedaviler, MDM2.

ABSTRACT

INVESTIGATING PHARMACOLOGICAL INHIBITION OF MDM2 IN ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA USING PRECLINICAL METHODS

Despite available treatments for acute lymphoblastic leukemia (ALL), the disease's high clinical variability necessitates new therapeutic strategies, particularly for patients with high-risk features. The tumor suppressor protein p53, encoded by the *TP53* gene and known as the guardian of the genome, plays a crucial role in preventing tumor development. Over 90% of ALL cases initially harbor wild-type *TP53*. Reactivation of p53, which is encoded from the wild type *TP53* but lost its function for several reasons, is an attractive therapeutic approach in cancer treatment. p53 can be activated in a non-genotoxic manner by targeting its primary repressor, the MDM2 protein. Clinical trials involving MDM2 inhibitors are currently being conducted in a growing body of investigation, reflecting of the interest in incorporating these treatments into cancer treatment strategies. Early-phase clinical trials have demonstrated the promise of idasanutlin (RG7388), one of the developed compounds. It is a second-generation MDM2-p53 binding antagonist with enhanced potency, selectivity, and bioavailability. The aim of this study is to evaluate the efficacy of RG7388 as a therapeutic strategy for ALL and to investigate its potential impact on improving treatment outcomes for high-risk patients. RG7388 potently decreased the viability in four out of five ALL cell lines with diverse *TP53* mutation profiles, whereas only one cell line exhibited high resistance. RG7388 induced a pro-apoptotic gene expression signature with upregulation of p53-target genes involved in the intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis. In this research, RG7388 was investigated with pre-clinical methods in ALL cells as a novel treatment strategy. This study suggests further functional research and *in-vivo* evaluation, and it highlights the prospect of treating p53-functional ALL with MDM2 inhibitors.

Keywords: Acute Lymphoblastic Leukemia, p53, Anticancer Treatment, Targeted Therapies, MDM2.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖN SÖZ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar LİSTESİ	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)	1
1.1.1. ALL Tanımı ve Epidemiyolojisi	1
1.1.2. ALL Tanı ve Tedavi Yöntemleri	3
1.1.2.1. ALL’de Tanı	3
1.1.2.2. ALL’de Tedavi Yöntemleri	4
1.1.2.2.1. Kemoterapi ve Radyoterapi	4
1.1.2.2.2. İmmünoterapi	6
1.1.2.2.3. Hedefe Yönelik Tedaviler	9
1.1.3. ALL Tipleri ve Genetik Anomalileri.....	10
1.1.3.1. ALL’de Sınıflandırma	10
1.1.3.2. ALL Genetik Anomalileri.....	12
1.2. MDM2 (murine double minute 2)-p53 yolağı.....	13
1.2.1. TP53 geni ve p53 proteini	13
1.2.2. MDM2 geni.....	15
1.2.2.1. p53 Bağımsız MDM2 Etkileşimleri	18

1.2.3. ALL Tedavisinde MDM2-p53 Yolağının Hedeflenmesi	22
1.3. MDM2 İnhibitörleri	23
1.3.1. RG7388 (Idasanutlin) İnhibitörü	29
1.3.2. Tez Çalışmasının Gerekçesi ve Hedefleri.....	34
2. MATERYAL METOD	37
2.1. Hücre Soylarının Kültürü	37
2.2. İnhibitörün Hazırlanması	37
2.3. Sitotoksisite Ölçüm Yöntemi.....	38
2.4. Protein İmmünoblot Analizi (Western Blotlama)	38
2.5. Akım Sitometrisi	40
2.6. İstatistiksel Analiz	41
3. BULGULAR	43
3.1. RG7388, ALL hücrelerinde doza bağlı büyüme inhibisyonunu indükledi	43
3.2. RG7388'e yanıt olarak yabancı tip <i>TP53</i> ALL hücre hatlarında p53 yolunun fonksiyonel aktivasyonu.....	45
3.3. ALL hücrelerinde RG7388 (Idasonutlin) uygulaması erken ve geç apoptotik hücrelerin oranını arttırdı	46
4. TARTIŞMA	49
KAYNAKÇA	55

TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1.1. Klinik çalışmalardaki küçük molekül MDM2 inhibitörlerinin listesi.....	27
Tablo 3.1. ALL hücre soyu paneli için RG7388'in ortalama IC ₅₀ konsantrasyonları ± ortalamanın standart hatası (SEM).	44



ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Akut lenfoblastik lösemide immünoterapi (Inaba vd., 2020).	7
Şekil 1.2. ALL’de tanıya yardımcı olan mutasyonların dağılımı (Jeha vd., 2009).....	13
Şekil 1.3. Tümör baskılayıcılar ve onkoproteinler, MDM2-p53 etkileşimini düzenler (Subhasree vd., 2013).	21
Şekil 1.4. Geleneksel MDM2-p53 düzenleyici yolu (Nag vd., 2013).....	22
Şekil 1.5. Klinik çalışmalara konu olmuş bazı MDM2 inhibitörleri (Fang vd., 2020; Kocik vd., 2019; Wang vd., 2017; Zhao vd., 2013).	26
Şekil 1.6. RG7388’in MDM2 ile bağlanma şeklinin gösterimi (Zhu vd., 2022).....	30
Şekil 1.7. RG7388’in keşfi (Zhu vd., 2022).....	31
Şekil 3.1. 96 kuyucuklu tabakalarda RS4;11 (A), REH (B) ve MOLT4 (C) hücre hatlarının ilaç konsantrasyonunda artışa bağlı hücre canlılıklarındaki düşüşün görüntüsü.	43
Şekil 3.2. RG7388’in ALL hücrelerinin çoğalması üzerinde konsantrasyona bağlı etkisi.	43
Şekil 3.3. Tüm hücre soyları için RG7388’in özet IC ₅₀ değerleri.	45
Şekil 3.4. ALL hücrelerinin RG7388 uygulaması sonrası Western blotlama görüntüleri.	46
Şekil 3.5. RS4;11(A), REH(B) ve MOLT-4(C) hücrelerinde erken apoptotik ve geç apoptotik/nekrotik hücrelerin AnneksinV /PI boyama yoluyla tespiti.	47
Şekil 3.6. RS4;11, REH ve MOLT-4 hücrelerinde erken apoptotik ve geç apoptotik/nekrotik hücrelerin yüzdesel toplamının ilaç uygulamasına bağlı değişimleri.....	48

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

%: Yüzde

-: Negatif

+: Pozitif

<: Küçüktür

>: Büyüktür

µl: Mikrolitre

µM: Mikromolar

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

ALL: Akut lenfoblastik lösemi

AML: Akut miyeloid lösemi

ARF: Alternatif okuma çerçevesi

ATP: Adenozin trifosfat

BCL-2: B hücreli lenfoma geni-2

BCL-X_L: B hücreli lenfoma ekstra büyük

BiTE: Blinatumomab

°C: Santigrat

CAR T: Kimerik antijen reseptörü T

CD: Cluster of differentiation

CDKN2A: Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A

CO₂: Karbondioksit

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksiribo nükleik asit

ECL: Enzimatik kemiluminanslar

ETV6: ETS Varyant Transkripsiyon Faktörü 6

FAB: French-American-British

FC-MRD: Flow sitometri-minimal rezidüel hastalık

FDA: Gıda ve ilaç idaresi

Gr: Gram

IC₅₀: Enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu

Ig: İmmünoglobulin

IKZF3: Çinko parmak proteini 3

IL-7: İnterlökin-7

Kg: Kilogram

KMT2A: Lizin metiltransferaz 2A

M: Molarite

MDM2: Murine double minute 2

Mg: Miligram

ml: Mililitre

MLL: Yeniden düzenlenmiş akut lenfoblastik lösemi

mM: Milimolar

MRD: Minimal rezidüel hastalık

MSS: Merkezi sinir sistemi

NGS: Yeni nesil dizileme

nm: Nanometre

nM: Nanomolar

p21: Protein 21

p53: Protein 53

PARP: Poli -A DP riboz polimeraz

PBF1: Fotosistem biyogenez faktörü 1

PBS: Fosfat tamponlu salin

PCR-MRD: Polimeraz zincir reaksiyon-minimal rezidüel hastalık

pH: Hidrojenin gücü

Ph+: *Philadelphia* kromozomu pozitif

PHF6: PHD parmak proteini 6

PI: Propidyum iyodür

PML: Progresif multifokal lökoensefalopati

PVDF: Poliviniliden florür

RITA: p53'ün reaktivasyonu ve tümör hücre apoptozunun indüksiyonu

RPM: Dakikadaki devir sayısı

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

RUNX1: RUNX ailesi transkripsiyon faktörü 1

SDS: Sodyum dodesil sülfat

SEER: Surveillance, Epidemiology and End Results Registry

SEM: Ortalamanın standart hatası

SNP309: Promotör bölgesindeki nükleotid 309

STAT: Transkripsiyonun ilk sinyal dönüştürücüsü ve aktivatörü

TBS: Tris tamponlu tuzlu su

TCF3: Transkripsiyon faktörü 3

TCR: T hücre reseptörü

TKI: Tirozin kinaz inhibitörleri

TP53: Tümör protein 53

TP53^{MUT}: Tümör protein 53 mutant

TP53^{YT}: Tümör protein 53 yabani tip

Ts: Tümör baskılayıcı

WBC: Beyaz kan hücresi

1. GİRİŞ

1.1. Akut Lenfoblastik Lösemi (ALL)

Lösemi ile ilgili ilk tıbbi gözlemler 1827 yılında Alfred Velpeau tarafından yapılmıştır (Kampen, 2012). Velpeau, ateş, halsizlik ve yaygın ağrı şikayetleri ile başvuran bir hastanın otopsi sonucunu incelediğinde, aşırı büyük bir dalak ve damar içinde sarı-beyaz ile yeşili andıran bir kitle tespit etmiştir (Kampen, 2012). 1845 yılında Rudolf Virchow, John Hughes Bennett ve David Craigie, lösemiye ayrı bir hastalık olarak tanımlamış ve Virchow, 1847'de bu hastalığı "lösemi" terimiyle adlandırarak, hastalığı splenik (dalakla ilgili) ve lenfatik (lenf sistemi ile ilgili) olarak iki farklı tipe ayırmıştır (Kampen, 2012). 1870 yılında Ernst Neumann, löseminin kökeninin kemik iliği olduğunu belirlemiş ve hastalığı miyeloid, dalak ve lenfatik olmak üzere üç ana tipe sınıflandırmıştır (Deininger, 2008). 1891 yılında geliştirilen boyama yöntemleri, lösemi alt tiplerinin daha ayrıntılı olarak ayrılmasını sağlamıştır ve 1913'te ise Turk, lösemiye akut veya kronik, lenfatik veya myeloid olarak sınıflandırmıştır (C. H. Pui vd., 2015).

Akut lenfoblastik lösemi, en genel tanımıyla kan ve kemik iliği kanserlerinin bir türüdür (S. P. Hunger vd., 2015). ALL, lenfoid projenitör hücrelerin, kötü huylu çoğalması ve farklılaşmış hücrelerin kemik iliği, kan ve ekstramedüller bölgelere olan göçüyle meydana gelmektedir (Terwilliger vd., 2017). Kemoterapi ve hedefe yönelik tedavilerdeki önemli ilerlemelere rağmen, özellikle miyeloid mutasyonlar veya *Philadelphia* kromozomu pozitif (*Ph+*) t(9;22) ALL gibi yüksek riskli özelliklere sahip olan bir hasta alt grubu, kötü prognoz ve terapötik dirençle karşı karşıya kalmaya devam etmektedir (C. H. Pui vd., 2015; D. T. Teachey vd., 2019). Bu hastalık, B veya T lenfoid projenitör hücrelerinin olgunlaşmamış formlarının (lenfoblastlar) kontrolsüz çoğalması sonucunda ortaya çıkmakta ve normal kan hücrelerinin üretimini engelleyerek çeşitli sağlık sorunlarına yol açmaktadır (D. T. Teachey vd., 2019).

1.1.1. ALL Tanımı ve Epidemiyolojisi

ALL, kemik iliği, kan ve ekstramedüller bölgeleri istila edebilen ve hücre farklılaşmasının erken bir aşamasında bloke edilen lenfoid hücrelerin kötü huylu çoğalmasıdır (Hiroto vd., 2013). Hastalığın epidemiyolojisine bakıldığında, ALL' nin Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde yılda 6000 civarı yeni vakayla artış gösterdiği tespit edilmiştir ve ABD'deki 2016 yılına ait kayıtlara göre, 6500'den fazla yeni vakaya rastlanmaktadır (Stephen P Hunger vd., 2012). ABD'de görülme sıklığı 2014 yılında ise 100.000 kişide 1.57 olarak

belirlenmiştir (Hiroto Inaba vd., 2021). ABD'deki vaka insidansı ise 100.000 kişide 1.6 vakadır (S. P. Hunger vd., 2015; Hiroto Inaba vd., 2013). Ülkemizdeki görülme sıklığı ise 1.4/100000 olarak tahmin edilmektedir (Yümlü, 2015). ALL'nin çocuklara oranla yaşlılarda daha öldürücü olduğu araştırmacılar tarafından kaydedilmiştir (Horowitz, Akasha vd, 2018). Verilere göre %60 gibi bir oranla çocuklarda ve 20 yaşa kadar olan bireylerde görülmekle birlikte buna ek olarak bir milyon kişide 3,2 gibi bir görülme sıklığına sahipken, siyahi çocukların beyazlara göre üç kat daha az oranda ALL'ye yakalandığı araştırmacılar tarafından kaydedilmiştir (Horowitz vd., 2018). Diğer bir veri ise Down sendromlu bireylerin bu hastalığa yakalanmada artmış bir riske sahip olmasıdır (Hasle, Clemmensen vd., 2000). Yaşa ve etnik kökene bağlı olarak ALL insidansının değişiklik gösterdiği görülmektedir. Latinlerin Latin olmayanlara göre, beyazların (milyonda 35,6) ise siyahilere (milyonda 14,8) göre ALL'ye daha fazla yakalandığı kaydedilmiştir (Barrington-Trimis vd., 2017; Lim vd., 2014). Bu bilgilere 2016 yılında Surveillance, Epidemiology and End Results Registry (SEER)'deki kayıtlara bakılarak ulaşılmıştır. Bu kayıtlarda 23.829 vakanın 8.297'si (%35) Latin olarak bildirilirken 11.714'ü (%49) Latin olmayan beyazlar, 1.639'u(%7) ise Latin olmayan siyahiler olarak bildirilmiştir (Feng vd., 2021).

ALL'nin belirli yaşlarda pik yaptığı bilinmektedir. Bu piklerin doruk noktalarının 5 yaşında ve 50'li yaşlarda ortaya çıktığı gözlemlenmiştir (S. Paul vd., 2016). ALL'de yapılan immünofenotipleme sonucunda %75-85 oranında B soylu, %15-25 oranında ise T soylu hücrelerden meydana geldiği anlaşılmıştır fakat bu durum yaşa ve etnik kökene bağlı olarak değişim gösterebilmektedir. (Terwilliger vd., 2017). Kayıtlara bakıldığında oldukça öldürücü olan bu hastalığın yine ABD'de 2018'de teşhis edilen yaklaşık 5960 yeni vakanın 1470'i ölümle sonuçlandığı görülmüştür (Siegel vd., 2018). ALL' nin yaklaşık %60'ı 20 yaşından genç hastalardır. Son kırk yılda 5 yıllık genel sağ kalım önemli ölçüde artış göstermiş ve bu sağ kalım 1975'te %30'larda iken 2009'da yaklaşık %70'lere ulaşmıştır (Pulte vd., 2009). Ancak, çocuklarda %90'lara ulaşan bu 5 yıllık genel sağ kalım oranı 50 yaş üstü hastalarda %25'e kadar düşmektedir (Pulte vd., 2014). Özellikle yetişkin hastalar (>40 yaş) ve mevcut tedavilere dirençli diğer gruplar için daha etkili ve hedefe yönelik tedavi seçeneklerine ihtiyaç vardır (Stephen P Hunger vd., 2012). Belirtilmesi gereken bir diğer nokta ise, bazı düşük ve orta gelirli ülkelerde lösemi için etkili mevcut tedavilere sürekli erişim mümkün olamayabilmektedir (Bonaventure vd., 2017). Özellikle son on yılda ALL'nin patofizyolojisinin anlaşılmasında büyük ilerlemeler kaydedilmiş ve hedefe yönelik tedavi seçenekleri de gelişmektedir (Lanza vd., 2020). En yaygın tedavi yöntemi olarak kullanılan

kemoterapi özellikle yetişkin hastalarda, %80-90 oranında tedaviye tam yanıt elde edilebilmesine rağmen sadece %25-45 hasta 5 yıl remisyonda kalabilmektedir (Thomas vd., 2010). Ayrıca bu kemoterapi rejimlerinin tamamlanması yüksek toksisite nedeniyle zorluklarla karşı karşıyadır. Yetişkinlerin sadece %22'si kemoterapiyi tamamlayabilmektedir (Stock vd., 2013). Bu sebeplerden dolayı daha güvenli, daha geniş hasta gruplarında uygulanabilir ve daha etkili ajanlara ihtiyaç kaçınılmazdır.

1.1.2. ALL Tanı ve Tedavi Yöntemleri

1.1.2.1. ALL'de Tanı

Tanı anında ALL, yüksek lökosit sayısı, santral sinir sistemi tutulumunun sık olması, CD10 pozitif B hücre immüfenotipi, L1 tipi blast morfolojisi ve kötü prognoz ile ilişkili seyir özellikleriyle dikkat çeker (Garg vd., 2018). ALL tanısı genellikle tam kan sayımı (anemi, trombositopeni ve yüksek beyaz kan hücresi sayısı gibi anormalliklerin belirlenmesi (Vaitkevičienė vd., 2011).), kemik iliği biyopsisi (kemik iliğinden örnek alınarak lenfoblastların varlığı ve yüzdesinin tespiti (Percival, Lai, Estey vd., 2017), akış sitometrisi (kan veya kemik iliği örneklerindeki hücrelerin yüzey özelliklerinin belirlenmesi.) ve genetik testler (farklı genetik anormalliklerin (örneğin, *Philadelphia* kromozomu) saptanması) ile yapılmakta ve bu tedavi planının belirlenmesine yardımcı olmaktadır (Bauer, Bastian, Gozzi, vd., 2009). Kan testlerinde, anormal derecede yükselmiş beyaz kan hücresi sayısı ve trombosit sayısında düşüş gözlemlenir (Vaitkevičienė vd., 2011). Kemik iliği biyopsisi, lenfoblastların varlığını doğrulamak için gerekli olmakla birlikte immünohistokimyasal ve genetik testler, hastalığın alt tipini belirlemek için yapılmaktadır (Percival vd., 2017). ALL hastalarında, en önemli prognostik faktörlerden biri, kemoterapiye dirençli ve kalıcı kötü huylu hücreler olarak tanımlanan minimal rezidüel hastalık (MRD) durumudur (Brüggemann vd., 2017). MRD, 10.000 sağlıklı hücrede bir neoplastik hücrenin (%0,01) tespitiyle pozitif kabul edilir ve bu durum hastalığın nüks riskini ve tedaviye yanıtı değerlendirmede büyük önem taşır (Brüggemann vd., 2017). MRD durumu, tedavi sırasında hastanın kemosensitivitesini ve tedavi etkinliğini gösteren önemli bir belirteçtir (Brüggemann vd., 2017). Minimal rezidüel hastalığın tespiti için kullanılan iki ana yöntem vardır. Bunlar multiparametrik akış sitometrisi (FC-MRD) ve polimeraz zincir reaksiyonuna dayalı moleküler yöntemler (PCR-MRD) olarak ele alınmaktadır (Vaitkevičienė vd., 2011). FC-MRD, florokrom etiketli monoklonal antikorların kullanımıyla lösemiye özgü immünofenotiplerin tespiti için en hızlı ve en duyarlı yöntemlerden biridir (Nguyen vd., 2020). Bu yöntem, ALL hastalarının yaklaşık %90-98'inde uygulanabilir ve duyarlılığı, gerçek zamanlı kantitatif PCR yöntemleriyle karşılaştırıldığında

daha düşük olsa da yine de oldukça etkilidir (van Dongen, van der Velden, vd., 2015). PCR tabanlı yöntemlerde, immünoglobulin (Ig) ve T hücresi reseptörü (T-cell receptor:TCR) gen yeniden düzenlemeleri MRD belirteçleri olarak kullanılır (van Dongen vd., 2015). Ayrıca, yeni nesil dizileme (next generation sequencing: NGS) tabanlı Ig klonalite analizi geleneksel klonalite analizlerine kıyasla daha hassas sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır (van den Brand vd., 2021).

Diğer prognostik faktörler arasında tanı anındaki yüksek beyaz kan hücresi (White blood cell: WBC) sayısı da olumsuz bir etken olarak öne çıkar (van den Brand vd., 2021). Tedavi süreci boyunca, hastaların tedaviye verdikleri yanıtlar ve tedavi sürekliliği, kullanılan tedavi ajanlarına ve tedavi protokollerine bağlı olarak değişir (Möricke vd., 2016). ALL'nin prognozu, birçok faktöre bağlıdır; yaş, hastalığın tipi, tedaviye yanıt ve genetik faktörler bunlar arasındadır (S. Paul vd., 2016). Çocuklarda tedaviye iyi yanıt alınması durumunda genel iyileşme oranları oldukça yüksektir fakat yetişkinlerde prognoz genellikle daha kötü olabilmektedir (S. Paul vd., 2016). Hücrelerin B veya T hücresi kökenli olup olmadığını belirlemek için kullanılan immünohistokimya da hastalığın teşhisinde kullanılan yöntemler arasında yer almaktadır (D. T. Teachey vd, 2019). Genel olarak, çocuklarda ALL tedavi sonuçları oldukça umut vericidir ve iyileşme oranları %80-90 civarındadır (C.-H. Pui vd., 2006). Yetişkinlerde ise iyileşme oranları (%22) genellikle daha düşüktür (C.-H. Pui vd., 2006). ALL'nin teşhisinde morfolojik çalışmaların yanında immünofenotipleme ve akış sitometrisi testleri kullanılmaktadır (Dworzak vd., 2018). Tedavisinde ise genel olarak kemoterapi kullanılmaktadır (Lukenbill vd., 2013).

1.1.2.2. ALL'de Tedavi Yöntemleri

1.1.2.2.1. Kemoterapi ve Radyoterapi

Lösemi tedavisi son birkaç on yılda önemli bir gelişim göstermiştir ve bu iyileşmelerin ardından, araştırmalar artık hastaların tedaviye yanıtını etkileyen prognostik faktörleri belirlemeye odaklanmıştır (Berry vd., 2017). Prognostik faktörler, hastaları belirli bir risk grubuna yerleştirerek, tedavi yoğunluğunun ne şekilde düzenleneceğine karar verilmesinde önemli rol oynar (Berry vd., 2017). ALL tedavisi, hastalığın cinsine, evresine ve hastanın genel sağlık durumuna bağlı olarak değişir. ALL tedavisi, kemoterapi, radyoterapi, hedefe yönelik tedaviler ve kök hücre nakli gibi çeşitli yöntemleri içerebilir.

ALL tedavisi, genellikle üç aşamadan oluşmaktadır; İlki olan indüksiyon, hastalığın hızlı bir şekilde remisyona girmesini sağlamak için yoğun kemoterapi uygulanması, yani

lösemi hücrelerinin tamamını yok etmek veya kontrol altına almak için yapılan ilk tedavidir (Oeffinger vd., 2006; Schrappe vd., 2000). Bu aşamada genellikle yüksek doz kemoterapi uygulanmaktadır ve birkaç hafta sürerken hastanede yatışı gerekebilmektedir (Aureli Marziani vd., 2023). Diğer bir aşama olan konsolidasyon ise remisyonun sürdürülmesi ve nüksü önlemek için ek tedaviler yapılmasıdır (Young vd., 2017). Bu aşamda koruyucu tedaviyle lösemi hücrelerinin yeniden çoğalması engellenmeye çalışılır (C. H. Pui vd., 2015). Son aşama olarak ele alabileceğimiz bakım (maintenance) ise hastalığın tekrarlamasını önlemek için daha düşük dozlarda uzun süreli tedavi uygulanması olarak bilinmektedir (Group, 1996). Bu aşama genellikle 2-3 yıl sürebilir ve tedavi süresince düzenli kontroller gerektirir (Rudin Marable vd., 2017). Tüm bu tedavi yöntemleri dışında ek olarak bazı hastalarda, özellikle nüks durumunda, kök hücre nakli önerilebilmektedir. Hedefe yönelik ise spesifik bazı mutasyonları taşıyan veya bazı hedef genler için yabancı tip olan hastalar için planlanabilmektedir. Yoğun kemoterapi rejimleri ALL tedavisinde halen en yaygın başvuru yöntemlerdendir (Aureli vd., 2023). Özellikle yetişkin hastalarda, %80-90 oranında tedaviye tam yanıt elde edilebilmesine rağmen sadece %25-45 hasta 5 yıl remisyonunda kalabilmektedir (Stock vd., 2013; Thomas vd., 2010). Ayrıca bu kemoterapi rejimlerinin tamamlanması yüksek toksisite nedeniyle zordur. Yetişkinlerin sadece %22'si kemoterapiyi tamamlayabilmektedir (Stock vd., 2013). Kemoterapi dışında, bazı hastalar için hedefe yönelik tedaviler ve immünoterapiler de önerilebilmektedir (Aureli vd., 2023). Çoklu ajanlı ve yoğun kemoterapi rejimleri sayesinde, pediatrik hastalarda %80-90 arasında bir iyileşme oranı elde edilmiştir ve bu tedavi protokolleri, ergenler ve genç yetişkinlerde de önemli iyileşmeler sağlamıştır (S. P. Hunger vd., 2015). Bununla birlikte, bazı hastalarda farmakolojik direnç veya toksisite nedeniyle, özellikle "pediatrik benzeri" tedavi protokollerinin uygulanması durumunda, geleneksel tedavi yaklaşımları yetersiz kalabilmektedir (Bowling vd., 2016; S. P. Hunger vd., 2015). Bu, tedaviye cevap vermeyen veya tedavi sırasında ciddi yan etkiler gelişen hastalar için daha etkili stratejilerin geliştirilmesini gerektirmektedir.

Kemoterapiye ek olarak, radyoterapi de seçilmiş hasta gruplarında ALL tedavisinde kullanılmaktadır (Vora vd., 2016). Geçmişte, kraniospinal ışınlama ALL tedavisinde önemli bir yer tutmuşken, günümüzde bu tedavi yönteminin uygulanabilirliği, tanı anında belirli bir merkezi sinir sistemi (MSS) durumuna göre belirlenmektedir (Sun vd., 2017). MSS tutulumu olan ALL hastalarında, kötü tedavi sonuçları ve MSS lezyonlarının tekrar etme eğilimi nedeniyle, kraniospinal ışınlama MSS tekrarını engellemek amacıyla kullanılmaktadır (Sun

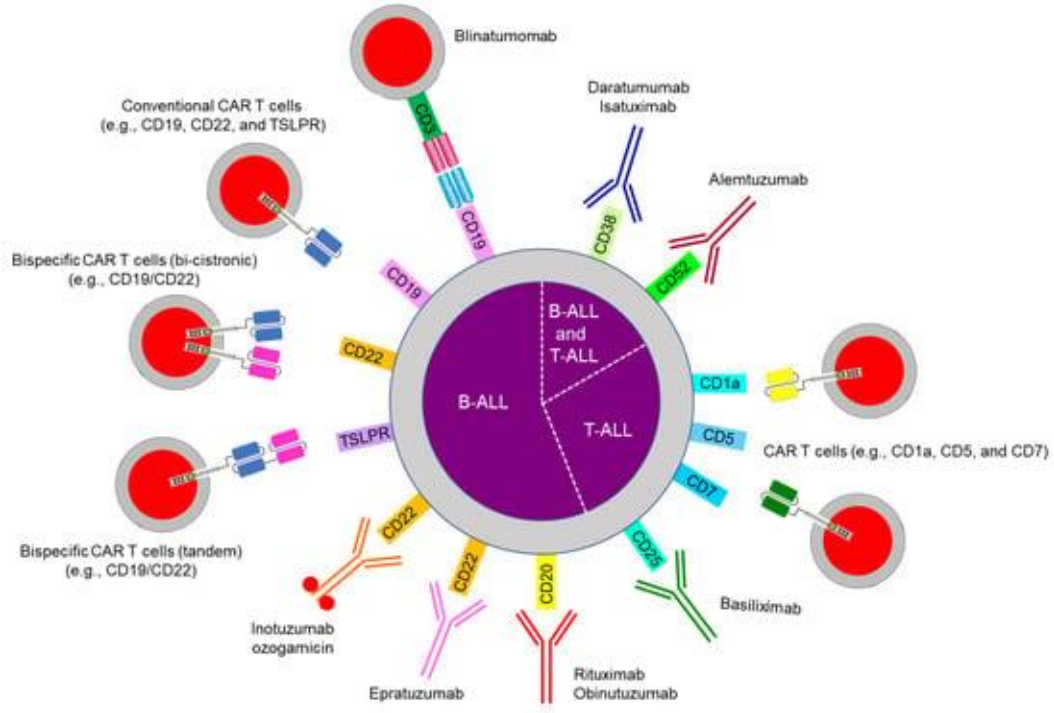
vd., 2017). Bu tedavi, genellikle MSS tutulumu gösteren yüksek riskli ALL hastalarında tercih edilir. Bununla birlikte, radyasyon tedavisinin yüksek toksisite riski nedeniyle, hastanın radyoterapi aldığı süre, kullanılan dozaj ve radyoterapinin tedavi planına dahil edilip edilmeyeceği konusunda pek çok araştırma yapılmaktadır (Arico vd., 2002). Bu çalışmalar, radyasyon dozunun azaltılması ve tedaviye yönelik daha etkili stratejilerin geliştirilmesi amacıyla sürdürülmektedir. En yaygın kullanılan kemoterapötik ajanlar arasında metotreksat, daunorubisin, doksorubisin, vinkristin, sitarabin, siklofosamid, tiyoguanin ve 6-merkaptopurin yer alır (Tallman vd., 2005; Young Simmons vd., 2017). Tüm tedavi süreci genellikle 2-3 yıl arasında sürer. Pediatrik ALL hastalarında, farklı tedavi protokollerinin etkinliği üzerine birçok araştırma gerçekleştirilmiştir (Conter vd., 2010; Möricke vd., 2016).

1.1.2.2.2. İmmünoterapi

Pediatrik ALL'de immünoterapiler ve diğer yeni hedeflenmiş tedavi stratejileri, geleneksel kanser tedavilerini desteklemek amacıyla kullanılmaktadır (Hiroto Inaba vd., 2019). Bu yenilikçi yaklaşımlar, tedaviye bağlı toksisiteyi azaltmayı ve tedavi sonuçlarını iyileştirmeyi hedefler (Hiroto Inaba vd., 2019). Monoklonal antikorlar, neoplastik hücreler tarafından ifade edilen spesifik antijenleri hedefleyen bir grup yeni, hedefli tedavi ajanını temsil eder (Raponi vd., 2011). Bu antikorlar, bağışıklık sistemini aktive ederek kanser hücrelerine karşı sitotoksik bir yanıt başlatır. Pediatrik ALL hastalarında, en yaygın hedefler arasında CD19, CD20 ve CD22 antijenleri bulunmaktadır (Raponi vd., 2011). Bu antijenleri hedefleyen antikor temelli ilaçlar, monoklonal antikor tedavilerinin yanı sıra, antikor-ilaç konjugatları gibi yenilikçi tedavi yaklaşımlarını da içermektedir (Stokke vd., 2021).

İmmünoterapiler, kanser hücreleriyle mücadele etmek için bağışıklık sistemini güçlendirmeyi amaçlayan ek tedavi yöntemleridir (Aureli vd., 2023). Pediatrik ALL tedavisinde şu anda üç ana immünoterapi kategorisi kullanılmaktadır. Bunlar bispesifik antikorlar, CAR T hücreleri (Kimerik Antijen Reseptörü T hücreleri) ve antikor-ilaç konjugatları olarak sıralanmaktadır (Şekil 1.1) (Hiroto Inaba vd., 2019; C. H. Pui vd., 2015). İmmünoterapiler, özellikle B hücreli ALL tedavisinde yaygın olarak kullanılır çünkü CD19, CD20 ve CD22 yüzey antijenleri yalnızca B hücrelerinde ifade edilir ve hematopoietik kök hücreler veya diğer dokularda bulunmaz (Hiroto Inaba vd., 2019). Bu tür tedavi, sadece B hücreli ALL hücrelerini değil, aynı zamanda normal B hücrelerini de hedef alabilir, bu da intravenöz veya subkutan immünoglobulin uygulamaları ile yönetilebilen hipogamaglobulinemiye neden olabilir (Fry vd., 2018; Hiroto Inaba vd., 2019). T hücreli ALL

için de antikor tedavisi ve CAR T hücreleri gibi tedavi yöntemleri araştırılmaktadır vd., 2016).



Şekil 1.1. Akut lenfoblastik lösemide immünoterapi

Kaynak:(Inaba vd., 2020).

FDA (açılımı: U.S. Food and Drug Administration, Türkçe: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi)) tarafından onaylanan tek monoklonal antikor, CD19 ve CD3'e karşı yönlendirilmiş iki antikor içeren bispesifik bir T hücresi bağlayıcısı (BiTE) olan blinatumomab'dır (Brischwein vd., 2006). CD19, tüm öncü B hücrelerinde ifade edilirken, CD3, T hücresine bağlı sinyalleme sürecinde önemli bir rol oynar. Bu bispesifik kombinasyon, T hücrelerinin tümör hücrelerine güçlü bir şekilde bağlanmasını sağlar. Sonuç olarak, bu bağlanma, aktive olan T hücrelerinin çoğalmasını ve kanser hücrelerinin öldürülmesini tetikler (Brischwein vd., 2006).

DM4 ve anti-CD19 antikorunun birleştirilmesiyle oluşturulan antikor-ilaç konjugatı SAR3419 (koltuksimab ravtansin), B hücreli ALL ve MLL gibi hastalık modellerinde preklinik olarak etkinliğini kanıtlamıştır (Carol vd., 2013). Fare ksenograft modellerinde hastalık progresyonunu önemli ölçüde geciktirdiği ve objektif bir tedavi yanıtı oluşturduğu gözlemlenmiştir (Carol vd., 2013). Ayrıca, SAR3419, hematolenfoid doku ve diğer organlarda (merkezi sinir sistemi hariç) hastalığın nüksünü önlemeyi başarmıştır. Bu bulgular

ışığında, SAR3419'un pediatrik CD19+ B hücreli ALL hastalarında tedavi sonuçlarını iyileştirme potansiyeline sahip olduğu öne sürülmüştür (Carol vd., 2013).

CD20, tüm olgun B hücrelerinin yüzeyinde bulunan ve *MS4A1* geni tarafından kodlanan bir proteindir (Pavlasova vd., 2020). B hücrelerinin gelişiminde ve olgunlaşmasında, aynı zamanda B hücrelerinin optimal işlevini sürdürebilmesi için önemli bir rol oynar (Pavlasova vd., 2020). Bu özgül B hücresi antijeni, şu anda B hücreli ALL tedavilerinde ikinci basamak tedavi hedeflerinden birini oluşturmakta olup, tüm hastaların yaklaşık %25'inin anti-CD20 immünoterapisi için uygun olduğu belirtilmektedir (Wei, Wang, Huang, vd., 2017).

CD22 antijeni, B hücreli ALL hücrelerinin yaklaşık %80 ila %90'ı tarafından ifade edildiği için, immünoterapide önemli bir hedef haline gelmiştir (Fry vd., 2018). Bu antijeni hedef alan mevcut antikorlar arasında epratuzumab ve moxetumomab pasudotox yer almaktadır (Fry vd., 2018). CAR-T hücreleri, hastadan türetilen ve genetik olarak modifiye edilen T hücreleridir (Raponi vd., 2011). Bu hücreler, genetik mühendislik ile tümör hücrelerindeki spesifik antijenlere bağlanabilen hücre dışı alanlar kazanır, böylece bir T hücresi tepkisini tetikleyerek kanser hücrelerinin yok edilmesini sağlar (Raponi vd., 2011). ALL hastalarında nüks oranı yaklaşık %20 civarındadır ve hastaların kalan %10'u geleneksel tedavilere direnç göstermektedir. Nükseden hastaların prognozu son derece kötüdür; 5 yıllık sağkalım oranı %5-10 arasındadır (Gökbuget vd., 2012). Nükseden ALL'li çocukların prognozu ise, nüksün gerçekleştiği zaman dilimi, tanı ile nüks arasındaki süre ve blast hücrelerindeki genetik değişikliklere bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Aureli vd., 2023).

Son yıllarda, refrakter ve nükseden ALL hastalarının tedavisinde yeni tedavi seçenekleri oldukça umut verici hale gelmiştir. Bu tedaviler, lösemik blast hücrelerinin yüzeyinde ifade edilen CD19, CD20, CD22 ve CD52 gibi antijenleri hedefleyen monoklonal antikorlara dayanmaktadır (Jabbour O'Brien, vd., 2015). Geleneksel kemoterapi ile kombinasyon halinde, anti-CD20 antikoru rituksimab, yeni teşhis konmuş CD20+ (CD20 pozitif) ALL hastalarında sağkalım oranlarını iyileştirdiği gösterilmiştir (Maury vd., 2016). CD19 ve CD3'e doğrudan etki eden bir T hücresi etkileşimli bispesifik tek zincirli antikor (BiTE) olan blinatumomab, nükseden ve refrakter ALL hastalarında monoterapi olarak kullanıldığında nüksüz sağkalımı uzatmaktadır (A. S. Stein vd., 2019). Ayrıca, inotuzumab ozogamisine, bir toksinle konjuge edilmiş anti-CD22 antikoru, tek başına veya kemoterapi ile birlikte kullanıldığında, relaps ve refrakter B hücreli ALL hastalarında ümit verici sonuçlar

sağlamaktadır (Yılmaz vd., 2015). Bunun yanı sıra, ofatumumab, obinutuzumab, epratuzumab, denintuzumab mafodotin ve moxetumomab pasudotox gibi yeni monoklonal antikörler, şu anda tek başına veya kemoterapiyle kombinasyon halinde araştırılmakta ve tedavi seçeneklerini genişletmektedir (Farhadfar vd., 2016).

1.1.2.2.3. Hedefe yönelik tedaviler

Kemoterapinin yan etkileri ve sağlıklı kök hücrelerdeki toksisitesi göz önüne alındığında daha etkili ve hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesi önem arz etmektedir. Ayrıca maliyetli lösemi tedavilerine bazı kesimlerin erişiminin zor olduğu bilinmektedir. Buda bize herkesin yararlanabileceği, sağlıklı hücrelerdeki toksisitesi düşük, daha etkili ve daha güvenli tedavi ajanlarının çeşitlendirilmesi gerektiğini göstermektedir (Shilpa Paul vd., 2016). Hedefe yönelik kanser tedavileri, kanser hücrelerine özgü moleküler değişimlere odaklandığından kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel tedavi yöntemlerinden daha etkilidir. Ayrıca sağlıklı hücrelere daha az zarar verir (S. Paul vd., 2016). Bu nedenle yeni nesil tedavi yaklaşımları, bu tür hedefe yönelik tedavi ajanlarının tekli veya kombine kullanımları üzerinde şekillenmektedir. ALL için farklı tedaviler mevcut olmakla birlikte, yüksek klinik heterojenite sebebiyle hiçbir mevcut tedavinin tüm vakalarda iyileştirici olamaması yeni stratejilerin ihtiyacını doğurur (Schultz vd., 2014). Tirozin kinaz inhibitörleri (TKI) ABL1 -sınıfı füzyonları olan hastaları tedavi etmek için kullanılır (Schultz vd., 2014). Bunun yanında BCL-2 (B hücreli lenfoma geni-2) ve BCL-X_L (B hücreli lenfoma ekstra büyük) inhibitörleri çeşitli genetik mutasyonlara sahip kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır (Autry vd., 2020).

Tirozin kinazlar, adenosin trifosfat (ATP) substratının hedef proteine transferini katalize ederek hücre içi sinyal iletimini düzenler (Thoreen vd., 2009). Onkogenik tirozin kinazlar, bu sinyal yollarının kontrolsüz bir şekilde aktive olmasına yol açarak kanser gelişimine katkıda bulunabilir. Bu onkogenik kinazlar, TKI adlı hedeflenmiş tedavi bileşenleri ile inhibe edilebilir. TKI'lar, kinazın aktif veya inaktif konformasyonuna bağlanabilme özelliklerine göre Tip I ve Tip II olarak iki ana grupta sınıflandırılabilir. Tip I inhibitörleri, ATP bağlanma bölgesine doğrudan rekabet ederken, Tip II inhibitörleri ATP ile rekabet etmeden farklı bir bağlanma alanını hedef alır (Kaczmarzka vd., 2021). Ayrıca, tirozin kinaz inhibitörleri, tedaviye dahil edildikleri zaman dilimine göre farklı nesillere ayrılabilir ve bu sınıflandırma tedavi stratejilerini belirlemede önemli rol oynar (Kaczmarzka vd., 2021). İnterlökin-7 (IL-7)/Janus kinaz (JAK)/sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü STAT (Transkripsiyonun ilk sinyal dönüştürücüsü ve aktivatörü) sinyal yolu, hem T hem de B

hücrelerinin gelişiminde önemli bir rol oynar (Schluns vd., 2000; Kieper vd., 2000; Sudo vd., 1993). Bu yol, STAT proteinlerinin antiapoptotik BCL-2 proteininin sentezini artırarak hücrelerin hayatta kalmasında kritik bir işlev görür (Ribeiro vd., 2018). Ayrıca, IL-7/JAK/STAT yolunun hem lösemik hücrelerde hem de T-ALL hücre hatlarında aktive olduğu gösterilmiş olup, bu aktivasyon kanser hücrelerinin hayatta kalma süresinin uzamasıyla ilişkilendirilmiştir (Zenatti vd., 2011).

B hücreli ALL'in bir alt kümesi, *Philadelphia* kromozomu adı verilen ve spesifik bir BCR-ABL1 tirozin kinaz füzyon proteinini kodlayan t(9:22) translokasyonunu içerir. Bu genetik değişiklik, pediatrik ALL vakalarının %3-4'ünde ve yetişkinlerin yaklaşık %25'inde görülür, ayrıca yaşla birlikte görülme sıklığı artmaktadır (Malagu vd., 2009). *Ph+* ALL hastaları, birinci basamak tedavi olarak BCR-ABL1, TKI ile büyük ölçüde fayda sağlarlar (Nacheva vd., 2013). Bununla birlikte, TKI monoterapisi, yaşlı hastalarda bile düşük toksisite profili ile %90-100 oranında tam remisyon sağlasa da, *Ph+* ALL tedavisinde TKI'nin standart kemoterapi ile kombinasyonu genellikle daha yüksek uzun vadeli hastalıksız sağ kalım oranları elde etmek için gereklidir (van Dongen vd., 2015). Bu, hem yetişkinlerde hem de çocuklarda uzun vadeli tedavi başarısını artıran önemli bir yaklaşım olarak düşünülmektedir. Bu bilgiler dışında birçok sinyal yolağı inhibitörleri de ALL tedavisi için kullanılmaktadır. Yeni nesil tedavi yaklaşımı spesifik olarak geliştirildiği için daha etkili sonuçlar elde edilmesini sağlayacaktır.

1.1.3. ALL Tipleri ve Genetik Anomalileri

1.1.3.1. ALL'de sınıflandırma

Lösemi ve lenfoma gibi kanserlerde tanı koyma sürecinde önemli bir dönüm noktası 1976 yılında gerçekleşmiştir (Bennet, 1976). Bu tarihte Fransız, Amerikan ve İngiliz hematologları, ALL olgularının periferik kan yaymaları ve kemik iliği aspirasyonu örnekleri üzerinde yaptıkları morfolojik incelemelerle FAB (French-American-British) klasifikasyonunu geliştirmiştir (Bennet, 1976). Bu klasifikasyon, hücrelerin büyüklüğü, çekirdek şekli, çekirdekçik sayısı ve sitoplazmanın bazofilik derecesi gibi özelliklere dayanarak yapılmış sonrasında ise, hücre tiplerinin daha ayrıntılı sınıflandırılması amacıyla L1, L2 ve L3 olarak güncellenmiştir (Bennet, 1976).

İmmünolojik sınıflandırma, lenfositlerin yüzeylerinde ve sitoplazmalarında bulunan Cluster of Differentiation (CD) olarak bilinen lenfoid farklılaşma antijenlerinin, akış sitometrisi ile incelenmesiyle yapılmaktadır (Bernard vd., 1984). B hücrelerinin

immüfenotipi, CD19, CD79a veya sitoplazmik CD22 belirteçlerinden en az ikisinin ekspresyonu ile tanımlanırken, T hücreleri ve miyeloid hücre belirteçlerinin ekspresyonu bu tanıya ters düşmektedir (Bernard vd., 1984; C. H. Pui vd., 2015). Özellikle CD10, ALL sınıflamasında kritik bir belirteç olup vakaların %80'inde görülmekle birlikte CD20, B hücreli ALL'nin önemli bir belirteci olarak ele alınmaktadır (C.-H. Pui vd., 2009).

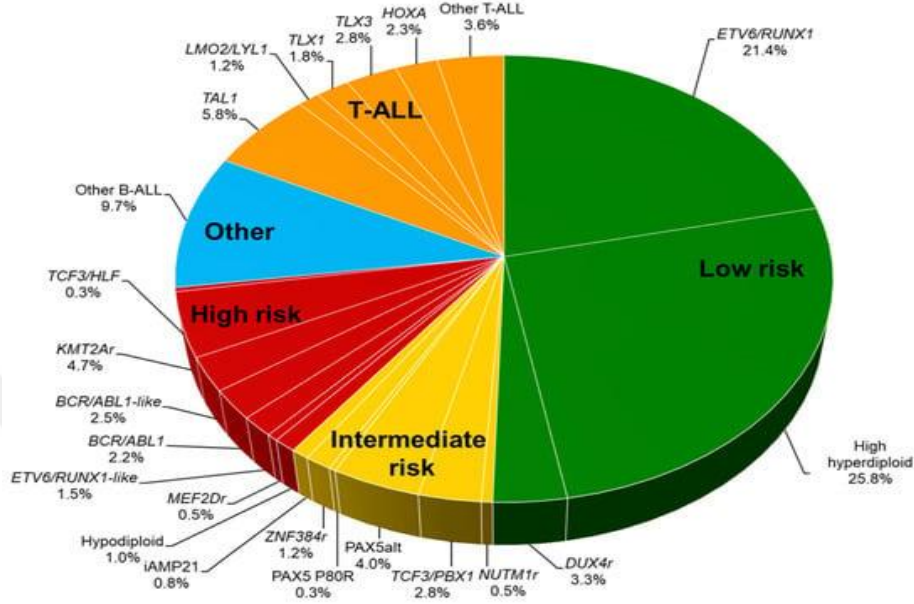
ALL, hastalığın seyrine ve hücrelerin özelliklerine göre B hücreli ALL, T hücreli ALL ve burkitt hücreli ALL olarak üç alt tipe ayrılmaktadır (Harris vd., 1999). Fakat sonrasında burkitt hücreli ALL, ALL'nin bir türü olarak görülmemesi sonucu T ve B hücreli ALL olarak sınıflandırılması yapılmıştır (Vardiman vd., 2009). B Hücreli ALL ise, tekrarlayan genetik anormallikleri olan B ALL ve başka türlü tanımlanmayan B ALL olarak iki başlık altında incelenmektedir (Vardiman vd., 2009). B hücreli ALL; B lenfositlerinin anormal çoğalması ile karakterizedir çoğunlukla çocukluk çağı çalışmalarına dayanan protokollere göre tedavi edilir, ayrıca daha yaygın olan ve daha iyi prognoza sahip olan ALL türüdür (Thomas vd., 2010). B hücreli ALL, biyolojik ve klinik açıdan farklı mutasyonları bir arada bulundurmasından dolayı heterojen bir hastalık olup pediatrik, ergen, yetişkin ve yaşlı hastaları etkileyebilir. Ancak, en sık çocukluk çağında görülür ve genellikle yetişkin hastalara göre daha iyi bir prognoza sahiptir (C. H. Pui vd., 2015). T Hücreli ALL ise, T lenfositlerinin anormal gelişimi ile ortaya çıkar ve genellikle daha kötü prognoza sahip olmaktadır. T hücreli ALL; ALL hastalarının %20-25'ini oluşturmakta ve erkek çocuklarında 2-3 kat daha yüksek oranda görülmektedir (D. T. Teachey vd., 2019). Bu T hücreli ALL vakalarının %16'sında görülen kromozom X üzerindeki tümör baskılayıcı bir gen olan *PHF6* (PHD parmak proteini 6)'nın inaktive edici mutasyonları veya delesyonları ile açıklanabilmektedir (Van Vlierberghe vd., 2010). T hücreli ALL'deki genetik değişiklikler çeşitlidir ve sonuçlarla ilgili henüz net bir ilişki oluşturulamamıştır (Y. Liu vd., 2017). B hücreli ALL vakaların yaklaşık %75-85'ini oluştururken geri kalan vakalar T hücreli ALL olarak alınabilir ancak bu yüzdeler tanı anındaki yaşa, ırka veya etnik kökene bağlı olarak farklılık gösterebilir (Arber vd., 2016).

1.1.3.2. ALL Genetik Anomalileri

Prognoz ve tedavi üzerinde en büyük etkiye sahip sitogenetik tanı, *Philadelphia* kromozomunun t(9;22)'nin varlığıdır (Moorman vd., 2007). Yetişkin ALL'de t(9;22) bulunma sıklığı %15-50 arasında değişebilmekte ve yaşla birlikte artmaktadır (Moorman vd., 2007). *Ph+*'in hem prognoz hem de tedavi açısından etkileri vardır. Tarihsel olarak, *Ph+* ALL'nin bir yılda yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır (Van Etten, 2001). Ancak, tedavi seçeneklerinin geliştirilmesiyle sağ kalım oranları iyileşmiş ve bu nedenle tedaviye başlamadan önce tüm hastaların *Ph+* durumu kontrol edilmelidir (Moorman vd., 2007). ALL kromozomal ve tek gen mutasyonları ile diğer lösemilerden ayırım göstermektedir ve 30'dan fazla genetik alt grubu olduğu genomik analizler sonucunda keşfedilmiştir (Gu vd., 2019). Daha fazla görülen ve yüksek risk barındıran birkaç türü sıralayacak olursak (Şekil 1.2);

Hiperdiploidi (>50 kromozom) ALL hastalarında en yaygın tip olarak görülürken, ETV6-RUNX1 (ETS Varyant Transkripsiyon Faktörü 6/ RUNX ailesi transkripsiyon faktörü 1) t(12;21)(p13;q32) birikiminden etkilenmektedir (Lopez-Lopez vd., 2020). Hipodiploidi (<44 kromozom)) ALL vakalarının %1-2'sini oluşturan yüksek riskli bir tip olmakla birlikte, RAS yolu mutasyonları, *TP53* (Tümör protein 53) mutasyonları ve *IKZF3* (Çinko parmak proteini 3) delesyonu ile yakından ilişkilidir (Holmfeldt vd., 2013). t(12;21) (ETV6-RUNX1) hastalığın ortaya çıkması için çift vuruşa ihtiyaç duymaktadır ve hastaların yaklaşık %21'inde bulunmaktadır (Alpar vd., 2015). TCF3/PBF1 (Transkripsiyon faktörü 3/ fotosistem biyogenez faktörü 1) füzonu t(1;19)(q23;p13) translokasyonu ile ortaya çıkmaktadır (Jeha vd., 2021). BCR/ABL1 füzonu t(9;22)(q34;q11) kemoterapi tedavisi ve kemik iliği nakli ile tedavide oldukça düşük iyileşme oranına sahip riskli bir tür olmakla birlikte, yeni nesil ajanların kemoterapiyle birlikte kullanılmasıyla daha yüksek oranlarda iyileşme göstermektedir (Arico vd., 2010; Schultz vd., 2014). 2013 yılında, BCR-ABL füzyon proteini içermeyen ancak BCR-ABL pozitif ALL'ye benzer gen ekspresyonu gösteren yeni bir ALL alt tipi tanımlanmıştır (Nacheva vd., 2013). Bu alt tip, "BCR-ABL benzeri ALL" olarak adlandırılmış ve tedaviye dirençli, kötü prognozlu bir hastalık profili sergilemektedir (Nacheva vd., 2013). KMT2A (Lizin metiltransferaz 2A) (MLL (Yeniden düzenlenmiş akut lenfoblastik lösemi)) kromozom 11q23'te bulunmakla birlikte, 80'den fazla gen ile yeniden düzenlenmesi mümkün olan ve yüksek risk bulunduran bir tür olarak ele alınmaktadır (Brown vd., 2019). Bu türler ve şekilde verilen diğer türler ALL için ayırt edici olarak kabul edilse de; Bu kanser türüne sahip bireylerde tekrarlı kromozomal anomaliler bulunmamaktadır (Moorman vd., 2007). Son birkaç yıldır genetik dizileme de yaşanan hızlı ilerlemeler, klonal

evrimde ve ALL'nin tekrarlama riskinde genetik mekanizmaların ve kalıtsal genetik varyantların rolünün anlaşılmasına çok büyük ölçüde katkı sağlamıştır (Mullighan vd., 2009). Ancak ALL'nin genetik temelini tam anlamıyla aydınlatılması birçok kanserde olduğu gibi henüz mümkün olamamıştır.



Şekil 1.2. ALL'de tanıya yardımcı olan mutasyonların dağılımı. Turuncu bölge: T hücreli ALL ; Yeşil bölge: Low risk (düşük risk); Mavi bölge: Other (diğer); Kırmızı bölge: High risk (yüksek risk); Sarı bölge: Intermediate risk (Orta seviye risk) Genetik alt gruplar, St. Jude Toplam Terapi Çalışması XVI'da tedavi edilen hastalara ve Çocuk Onkoloji Grubu çalışmalarında tedavi edilen ve Etkili Tedaviler Üretmek İçin Terapötik Olarak Uygulanabilir Araştırma girişimi kapsamında genetik açıdan değerlendirilen ALL hastalarına göre listelenmiştir (Jeha vd., 2009). Yüzdelere, pediatrik ALL'deki yaklaşık insidansları vermektedir. T hücreli ALL için, hiçbir genetik alt tip sonuçlarla açıkça ilişkili değildir, ancak grup bir bütün olarak orta riskli bir grup olarak kabul edilir. (H. Inaba vd., 2020)

Kaynak: (Jeha vd., 2009)

1.2. MDM2 (murine double minute 2)-p53 yolu

1.2.1. TP53 geni ve p53 proteini

TP53, kromozom 17p13.1 üzerinde yer alan ve kanser gelişimini engellemeye yönelik ana işlevi olan bir tümör baskılayıcı gendir (Brady vd., 2010). p53 proteini, farklı biyolojik işlevlere sahip çok sayıda hedef geni aktive eden ya da baskılayan bir transkripsiyon faktörüdür (Leenders vd., 2013). Bu nedenle, p53 (protein 53) çok çeşitli stres sinyalleri

sonucu hücre kaderini belirler; apoptoz (programlanmış hücre ölümü) başlatabilir veya hücreleri geri dönüşümlü olarak G1/S faz düzenleme noktasında durdurarak hücre döngüsünü kontrol edebilir (Burgess vd., 2016). Ayrıca, geri dönüşümsüz bir çoğalma kapasitesinin kaybıyla karakterize senesens olarak indüklenebilir. p53 disfonksiyonu, birçok insan tümörünün başlangıcını ya da ilerlemesini destekleyebilir, ayrıca hücrel farklılaşma bozukluklarına, genetik instabiliteye ve artmış metastatik potansiyele yol açabilir (Bieging vd., 2014). Genel olarak, *TP53*, yanlış anlamlı mutasyonlar ve delesyonlar yoluyla proteinin transkripsiyonel ekspresyonunu bozar ve bu da insan katı tümörlerinin çoğunda p53'ün inaktive olmasına neden olur (Olivier vd., 2010). Ancak, hematolojik malignitelerde *TP53* mutasyonları daha az yaygındır ve burada p53 proteininin işlevi, iki ana düzenleyicisi olan MDM2 ve ARF (p14/p19)(alternatif okuma çerçevesi) ile etkileşimler aracılığıyla da tehlikeye girebilir (Ishizawa vd., 2016). MDM2, p53'e bağlanarak onun stabilitesini ve hücrel lokalizasyonunu düzenler (Poyurovsky vd., 2010). Bu etkileşim, p53'ün transkripsiyonel aktivitesini inhibe eder ve p53'ün proteazomal degradasyonunu teşvik eder. ARF (p14/p19), MDM2 ile etkileşerek p53'ün düzenlenmesinin kontrol edilmesine katkı sağlar. *CDKN2A* (Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 2A) geni tarafından kodlanan bu tümör baskılayıcı, p53'ün degradasyonunu engeller ve böylece p53'ün çekirdek ve sitoplazma arasında düzgün bir şekilde mekik yapmasını sağlar (Vivo vd., 2015).

Tümör baskılayıcı protein p53'ü kodlayan *TP53* geni, apoptoz, DNA (Deoksiribo nükleik asit) onarımı ve hücre döngüsünün tutuklanması gibi temel hücrel süreçleri düzenleyerek hücrel bütünlüğün korunmasında önemli bir rol oynar (Lane vd., 1997). *TP53* mutasyonları katı tümörlerin yaklaşık %50'sinde yaygındır ve hücrel çoğalmayı ve hayatta kalmayı artırarak onkogenik süreçleri teşvik eder (Olivier vd., 2010). Buna karşılık, *TP53* mutasyonları ALL'de nispeten nadirdir; tanı sırasında vakaların %10'undan azında ve nüks sırasında %30'a kadar ortaya çıkar (Holmfeldt vd., 2013; Mullighan vd., 2009). Bu nadirlik özellikle pediatrik ALL'de dikkat çekicidir (Holmfeldt vd., 2013). p53 aktivitesini düzenlemenin merkezinde, p53'e bağlanan, onun protein aktivitesini inhibe eden ve proteozomal bozulmasını teşvik eden bir E3 ubiquitin ligazı olan MDM2 yer alır (Marine Lozano vd., 2010). ALL dahil olmak üzere çeşitli kanserlerde gözlenen MDM2'nin aşırı ekspresyonu, p53 inaktivasyonuna ve tümör ilerlemesine katkıda bulunur (J. D. Oliner vd., 2016). MDM2-p53 etkileşiminin küçük molekül inhibitörleriyle hedeflenmesi, vahşi tip *TP53*'lü kanserlerde p53 tümör baskılayıcı fonksiyonunun yeniden sağlanması için umut verici bir terapötik yaklaşımı temsil etmektedir (Vassilev, 2007).

Protein p53, çeşitli streslere ve çevresel hakaretlere yanıt olarak aktive olan ve hücre döngüsü tutuklanması, apoptoz veya senesens indüksiyonuna yol açan güçlü bir transkripsiyon faktörüdür (Vousden vd., 2009). Bu nedenle p53'ün ana işlevi, genetik dengesizlikleri olan dönüştürülmüş hücrelerin ortaya çıkmasını sınırlamak ve 'genomun koruyucusu' olarak hareket etmektir (Vousden vd., 2009). *TP53* geninden kodlanan p53 proteini, tümör oluşumunu önleme açısından çok önemli görevlere sahiptir ve bu sebeple genomun koruyucusu olarak adlandırılmıştır (S. Nag vd., 2013). ALL vakalarının %90'ından fazlası hastalığın ilk teşhisinde yabancı tip *TP53* genine sahiptir (Hof vd., 2011). Yabancı tip *TP53* geninden kodlanan fakat *TP53* mutasyonları ve MDM2'nin aşırı ekspresyonu gibi farklı sebeplerle fonksiyonunu kaybetmiş p53'ün tekrar aktivasyonu kanser tedavisinde çekici bir terapötik yaklaşımdır (Rossi vd., 2009). p53, birincil baskılayıcısı olan MDM2 proteininin hedeflenmesi ile genotoksik olmayan bir şekilde aktive edilebilir. Son 20 yılda birçok küçük moleküllü MDM2 inhibitörü geliştirilmiş, bir kısmı da klinik değerlendirmeye değer bulunmuştur (Burgess vd., 2016).

1.2.2. *MDM2* geni

MDM2 geni, ilk olarak BALB/c 3T3 adlı ölümsüzleştirilmiş fare hücre hattının kendiliğinden dönüşümünde rol oynayan gen olarak tanımlanmıştır (Fakharzadeh, vd., 1991; Momand vd., 1992). Başlangıçta yapılan hücre kültürü çalışmalarında, *MDM2* geninin aşırı ekspresyonunun, nüde (genetik sistemi baskılanmış 'çıplak') farelerde kemirgen fibroblastlarını tümör oluşturu hale getirdiği görülmüş ve bu sebeple bir onkogen olarak tanımlanmıştır (Zhang vd., 2000). Sonraki araştırmalarla, *MDM2* geni klonlanmış ve kromozom 12q13-14 bölgesine yerleştirilmiştir. Ayrıca, bu genin biri p53'e bağımlı olmak üzere iki transkripsiyonel promotör elementi (P1 ve P2) içerdiği bulunmuştur (J. Oliner vd., 1992). *MDM2* geni, farklı izoformlar şeklinde ifade edilmektedir ve tam uzunluktaki transkript, 491 amino asitten oluşan bir proteini kodlar (Olson vd., 1993; Perry Mendrysa vd., 2000). Normal koşullarda MDM2 proteini çekirdekte bulunur, ancak proteazom aracılığıyla bazı hedef proteinlerin bozulmasını sağlamak amacıyla sitoplazmaya taşınır (Olson vd., 1993; Zhang vd., 2000).

MDM2 geninin yaygın kemik ve yumuşak doku kanserleri de dahil olmak üzere 47 farklı sarkom örneğinin üçte birinden fazlasında fazladan kopyaya sahip olduğu gösterilmiştir (Momand vd., 1998). *MDM2* geninin bu çoğaltılmasına, genin promotör bölgesindeki nükleotid 309'da (SNP309) bulunan tek nükleotid polimorfizmi ve bunun sonucunda artan transkripsiyon ve translasyon gibi çeşitli mekanizmalar neden olmaktadır (Cordon-Cardo vd.,

1994; Watanabe vd., 1996) . İnsan kanserlerinde, *MDM2* geninin aşırı ifadesi, kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir; Özellikle meme, akciğer, mide ve yemek borusunun katı tümörlerinde, liposarkomlar, glioblastomlar ve lösemilerde kötü prognozla bağlantılıdır (Rayburn vd., 2005). Ayrıca, *MDM2*'nin aşırı ekspresyonu, osteosarkomlar, kolon, meme ve prostat kanserlerinde metastaz ve hastalığın ileri evreleriyle ilişkilidir ve genellikle tedaviye dirençli tümörlerle birlikte görülür (Rayburn vd., 2005).

MDM2'nin p53 üzerindeki inhibe edici etkisi, hücrel yanıtın düzenlenmesi ve tümör gelişiminde önemli rol oynamaktadır (S. Nag vd., 2013). *MDM2* yolağı, özellikle kanser araştırmalarında dikkat çekmektedir. *MDM2*, 491 amino asitten oluşan bir proteindir ve çeşitli bağımsız yapısal bölgeler içerir (S. Nag vd., 2013). Bu yapılar; p53 ile bağlanma ve onu inhibe etme işlevini üstlenen N-Terminal bölge, ubiquitin taşıma ve p53'ün ubiquitinasyonunu kolaylaştırma işlevi taşıyan çinko parmak alanı ve *MDM2*'nin stabilitesini ve p53 ile etkileşimini etkileyen önemli alanlar içeren C-Terminal bölge olarak sıralanmaktadır (Poyurovsky vd., 2010). *MDM2*, p53'ü çoklu ubiquitin monomerleri ile işaretleyerek onu proteasomal yıkıma gönderen ve p53 seviyelerinin düşmesini sağlar. Böylece p53 inhibe edilir ve hasarlı DNA onarılmadan hücre döngüsü devam eder. Ayrıca önemli bir apoptoz düzenleyicisi olan p53'ün bu rolü de baskılanmış olur (Hof vd., 2011; S. Nag vd., 2013). Apoptoz düzenlemesi; p53'ün stres altında apoptozu tetiklemesiyle başlamaktadır (De Rozieres vd., 2000). *MDM2*, bu süreci inhibe ederek hücrelerin hayatta kalmasına katkıda bulunmaktadır (De Rozieres vd., 2000).

MDM2, p53 ile yüksek afiniteli bir şekilde bağlanarak onu inaktive etmektedir. Bu etkileşim, p53'ün transkripsiyonel aktivasyonunu inhibe etmekte ve hücrelerin yanıt vermesini engellemektedir (D. Wu vd., 2018). Normal koşullarda, *MDM2* ve p53 arasındaki bu denge, hücrel homeostazın korunmasına yardımcı olmaktadır (Furet vd., 2016). Ancak bazı durumlarda, bu denge bozulabilmekte ve *TP53* mutasyonları, p53'ün fonksiyonunu kaybetmesine neden olabilmektedir (Vousden vd., 2009). Bu durumda, *MDM2*'nin etkisi daha da belirginleşir. *MDM2*'nin aşırı üretimi, p53'ün sürekli olarak inhibe edilmesine yol açarak tümör gelişimini teşvik eder (Vousden vd., 2009). *MDM2* yolağı, p53 ile olan etkileşimleri ve tümör gelişimindeki rolü ile kanser araştırmalarında önemli bir odak noktasıdır. *MDM2*'nin p53 üzerindeki inhibe edici etkisi, kanser tedavisinde yeni stratejilerin geliştirilmesi için büyük bir fırsat sunmaktadır. *MDM2* inhibitörleri gibi yeni tedavi yöntemlerinin klinik uygulamalara girmesi, gelecekte kanser tedavisinin daha etkili hale gelmesine katkı sağlayabilir. *MDM2* yolağının daha iyi anlaşılması ve bu yolakla ilişkili yeni

tedavi hedeflerinin belirlenmesi, hem temel bilim hem de klinik onkoloji alanında önemli gelişmelere yol açacaktır.

MDM2 proteini p53'ün kritik bir negatif düzenleyicisidir ve fiziksel olarak p53 ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Momand vd., 1998). MDM2 p53'e bağlanır ve transkripsiyonel aktivasyon alanını bloke ederek p53'ün fonksiyonlarını düzenler (Momand vd., 1992). Yabani tip p53 protein inaktivasyonunun sebeplerinden biri MDM2'nin aşırı ekspresyonundan kaynaklanır (Momand vd., 1992; Picksley vd., 1993). Bu nedenle, sentetik küçük moleküller ile p53-MDM2 etkileşiminin inhibe edilmesi, yabani tip p53'ün aktivasyonu için bir terapötik strateji olarak araştırılmıştır. *TP53* geni, tümör baskılayıcı protein p53'ü kodlayarak apoptoz, DNA onarımı ve hücre bölümlerinin durdurulması gibi önemli parçacıkların düzenlenmesinde kritik bir rol üstlenir ve bu şekilde bütünlüğün korunmasına katkıda bulunur (Lane vd., 1997). Çeşitli kanser türlerinde, özellikle ALL gibi kanser türlerinde, *TP53* gen kaybı veya nokta mutasyonları, hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalmasına ve hayatta kalmasının yol açtığı tümör fonksiyonel gelişimini destekleyebilir (Lane vd., 1997). Ayrıca *TP53* mutasyonları katı tümörlerin yaklaşık %50'sinde gözlemlenmektedir (Olivier vd., 2010). Ancak, *TP53* mutasyonları ALL'de nispeten daha nadirdir; tanı sırasında vakaların %10'undan azında ve nüks durumunda %30'a kadar ortaya çıktığı görülmektedir (Holmfeldt vd., 2013; Mullighan vd., 2009). Bu durum, pediatrik ALL hastalarında dikkat çekicidir (Holmfeldt vd., 2013). MDM2-p53 kompleksinin küçük molekül inhibitörleriyle hedeflenmesi, p53 tümör baskılayıcı fonksiyonunun geri kazandırılması açısından umut verici bir tedavi stratejisidir (Vassilev, 2007).

MDM2, p53'ü proteazom aracılığıyla ubiquitinasyon ve bozunma için hedefler, aynı zamanda p53'ü çekirdekten dışarı taşır, p53'ün transkripsiyonel ko-aktivatörlerle etkileşmesini engeller ve p53'ün transkripsiyonel ko-represörleri çekmesini sağlar (Lane vd., 1997). Bunun yanı sıra, p53 de *MDM2*'nin onkoprotein ekspresyonunu düzenleyerek, *MDM2*'nin promotörüne bağlanır. Artan MDM2 seviyeleri, p53'ün transaktivasyonel alanını doğrudan bloke eder ve p53 proteininin proteazom aracılığıyla ubiquitin bağımlı bozunmasını tetikleyerek p53'ün etkisiz hale gelmesine yol açar (Haupt vd., 1997; Honda vd., 1997). Bu karmaşık otheregölasyon döngüsü, normal hücrelerde p53'ün düşük seviyelerde kalmasını sağlamaya yardımcı olur (Chi vd., 2005; X. Wu Bayle vd., 1993). Stres altında olmayan hücrelerde p53 düzeylerinin sıkı bir şekilde kontrol edilmesi gerekir, çünkü yüksek düzeydeki anti-proliferatif ve pro-apoptotik p53, hücre büyümesi ve gelişimi için zararlı olabilir (Sanjeev Shangary vd., 2009; Vousden vd., 2009).

Başlangıçta, MDM2-p53 etkileşiminin yalnızca MDM2 ve p53'ün N-terminal bölgeleri aracılığıyla karşılıklı bağlanmasından kaynaklandığı düşünülüyordu (Poyurovsky vd., 2010). Poyurovsky ve arkadaşları, p53'ün C-terminalindeki değişikliklerin (silinme, mutasyon veya asetilasyon gibi) MDM2-p53 etkileşimini etkileyebileceğini keşfetmişlerdir (Chi vd., 2005). Ayrıca, MDM2'nin C-terminal halka parmak bölgesi, p53 proteolizini gerçekleştiren bir E3 ubiquitin ligazı gibi çalışır ve p53'ü birkaç lizin kalıntısında ubiquitinleştirir (Böttger vd., 1997). Düşük MDM2 seviyeleri, p53'ün mono-ubikitinasyonunu ve nükleer ihracını tetiklerken, yüksek seviyeler p53'ün poli-ubikitinasyonunu ve nükleer bozunmasını destekler (Nakamura vd., 2000; Poyurovsky vd., 2010). MDM2'nin p53'ü düzenlemedeki rolü, farelerde *MDM2* geninin hedeflenmiş olarak silinmesinin embriyonik öldürücülüğüyle daha da pekiştirilmektedir (Haupt vd., 1997; Honda vd., 1997; Lai vd., 2001; Rodriguez, Desterro, Lain, Lane, vd., 2000). Bu gözlemler, MDM2-p53 etkileşiminin yalnızca basit bir protein bağlanmasıyla sınırlı olmadığını, çok daha karmaşık bir süreç içerdiğini ortaya koymaktadır (de Oca Luna vd., 1995).

1.2.2.1. p53 Bağımsız MDM2 Etkileşimleri

Giderek artan klinik ve klinik öncesi veriler, MDM2'nin p53'e bağımlı olmayan hücresel süreçlerde de önemli roller üstlendiğini göstermektedir (Poyurovsky vd., 2010) (Şekil 1.3). Bazı kanser türlerinde MDM2 aşırı ekspresyonunun yanında p53 proteininde mutasyonlar olduğu tespit edilmiştir. Bu MDM2'nin aşırı ekspresyonundaki duruma bağlı olarak da kanser hücrelerinin çoğalmasına ek avantaj kazandırdığı görülmüştür (Jones vd.,1998). MDM2 ile etkileşimde olan bazı proteinlerin ise MDM2 üzerinde çeşitli p53 bağımsız etkilere sahip olduğu görülmektedir (Jones vd.,1998).

pRb (ribozomal proteinler), p53 benzeri işlevlere sahip olan, hücre döngüsünü inhibe edebilen bir tümör baskılayıcıdır (Bouska vd., 2008). MDM2 ile oluşturduğu komplekste pRb aracılı G1 tutuklanmasını bozabilmekte ve aynı zamanda p53 ile oluşturduğu kompleksle de MDM2'nin işlevini bozabilmektedir (Bouska vd., 2008). pRb böylece MDM2'nin p53 aracılı apoptozu inhibe etme yeteneğini ortadan kaldırmaktadır.

MDMX, N-terminal p53 bağlanma bölgesinde MDM2 ile yüksek afiniteli bir şekilde bağlanabilmekte, p53 üzerinde MDM2 gibi etkiler göstermekte olan bir MDM2 varyantıdır (Wang vd., 2012). MDM2 yerine p53 ile bağlanarak bozunmasına yol açmadan p53'ü inhibe eder. Kanser türlerinde aşırı ifade edildiği ve MDM2 ile heterodimerize olarak onun E3 ligaz aktivitesini düzenlediği görülmüştür (Marine vd., 2004). MDM2'nin ayrıca DNA hasarı

uyarıları üzerine MDMX'i doğrudan ubiquitinleyebildiği ve parçalayabildiği görülmüştür (Zdzalik vd., 2010).

ARF (p14/p19) proteininin, MDM2'nin proteolitik bozunma için p53'ü hedefleme yeteneğini engelleyebildiği bilinmektedir (Kuo vd., 2004). Bu ARF-MDM2 etkileşimiyle birlikte, MDM2'nin sitoplazmaya olan hareketi engellenir ve MDM2 çekirdekçiğe hapsolür (Kuo vd., 2004). Sonuç olarak ARF (p14/p19) MDM2'nin aşırı ekspresyonuna neden olabilir ve ayrıca p53 serbest kaldığından p53 seviyesinde de artış görülebilir. ARF (p14/p19), p53'ten bağımsız olarak MDM2'nin aktivitesini etkilemektedir (Sherr vd., 2005).

Protein nükleofosmin (NPM) MDM2 ile rekabet edebilmekte, nükleustaki ARF (p14/p19)'nin konsantrasyonunu arttırabilmekte, ARF (p14/p19)'yi stabile edebilmekte ve p53 bozunmasını azaltabilmektedirler (Korgaonkar vd., 2005). Tıpkı MDMX gibi, MDM2'nin p53 ile bağlanma bölgesine bağlanarak p53 ubiquitasyonunu azalttığı görülmüştür (Korgaonkar vd., 2005). p53'ten bağımsız etkilerinin olduğu bilinen NPM'nin aşırı ekspresyonunun c-Myc modülasyonu yoluyla çoğalmayı ve onkogen aracılı dönüşümü arttırabileceği görülmüştür (Rayburn vd., 2009).

PML (Progresif multifokal lökoensefalopati), proteinlerin çekirdeğe yerleşmesini sağlamakta ve MDM2'yi izole ederek p53'ü MDM2 aracılı ubiquitasyondan korumaktadır (Louria-Haon vd., 2003). PML, Thr18 aracılı p53 fosforilasyonu ile p53 korunmasında rol oynar ve p53'ü MDM2 aracılı bozunmadan korur (Alsheich-Bartok vd., 2008). p53'ün alt akış hedefi olan 14-3-3-σ proteini ise, bazı proteinler aracılığıyla (CDK2, CDC2 gibi) hücre döngüsünü negatif yönde düzenlemektedir. Buna ek olarak MDM2'nin sitoplazmaya taşınmasını sağlayarak ve MDM2'nin otoubikitasyonunu arttırarak, p53'ün bozunmasını azaltmaktadır (Louria-Haon vd., 2003).

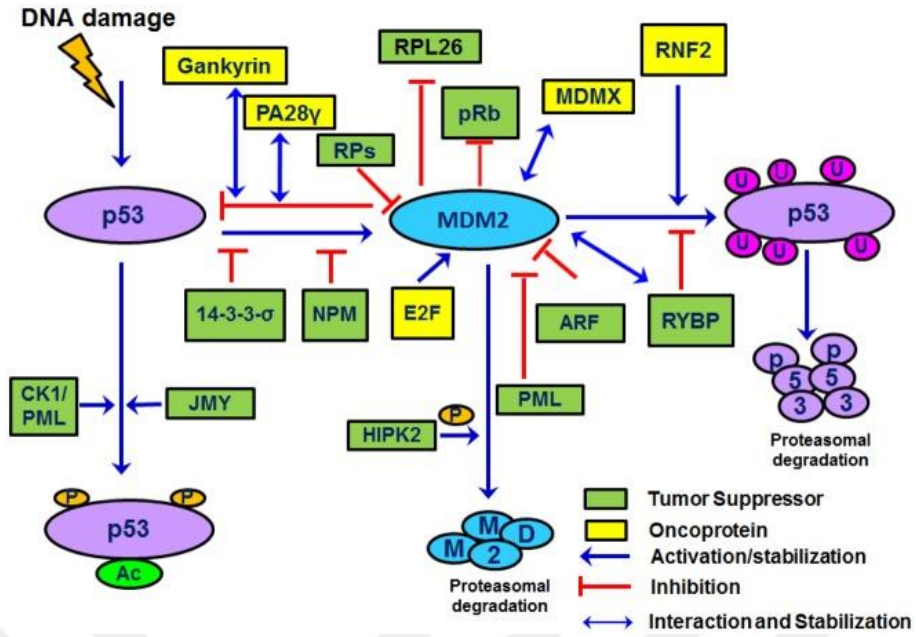
HIPK2, p53 ile doğrudan veya dolaylı olarak ilişkili olan faktörleri, düzenleyerek apoptozu teşvik eden bir tümör baskılayıcı proteindir (Bitomsky vd., 2009). HIPK2, proteazomal bozunma için MDM2'yi fosforile eder ve p53 apoptotik aktivitesini geri kazandırarak MDM2 kaynaklı p53 inaktivasyonunun sağlayabilir. Ayrıca, MDM2 ve HIPK2-p53 etkileşimi, DNA hasarının, p53 kaynaklı MDM2 aktivitesini içeren bir protein bozunma mekanizması ile HIPK2 inhibisyonuna yol açabilir. Tüm bunlar, MDM2'nin gereksinimlere göre p53 aracılı hücre döngüsünü durmasını ve apoptozda bir rolü olduğunu göstermektedir. Bu ayrıca, vahşi tip p53'ten bağımsız olarak, MDM2'yi aşırı ifade eden tümörlerde p53 inaktivasyonunu da açıklayabilir (Bitomsky vd., 2009).

Polikomb Proteinleri p53'ü, MDM2'yi bozarak aktive eden bir diğer tümör baskılayıcı proteinlerdir. RYBP'ler ubiquitin bağlayıcı protein olarak görev alan proapoptotik polikomb grubudur (Chen vd., 2009). RYBP, MDM2 ile etkileşime girerek MDM2 aracılı p53 ubiquitinasyonunu azaltır, p53'ün stabilizasyonuna ve p53 aktivitesinde artışa yol açarak hücre döngüsünün durmasına neden olur (Chen vd., 2009). Arıca bir diğer polikomb kompleks proteini RNF2'nin kolon kanseri hücre hatlarında hem p53 hem de MDM2 ile bağlandığı ve MDM2 aracılı p53 ubiquitinasyonunu sağladığı görülmektedir. RNF2 aşırı ekspresyonu ayrıca MDM2'nin yarı ömrünü artırır ve ubiquitinasyonunu inhibe eder (Su vd., 2013).

Proteazom aktivatörü PA28 γ proteazom aracılı fonksiyondan bağımsız olarak MDM2-p53 etkileşimini düzenler ve p53 bozunumunda görev alır (Zhang vd., 2008). Ek olarak, PA28 γ , ubiquitin bağımsız bir şekilde bozunmasını düzenlemek için p21'e, hücre döngüsü kontrol proteinleri ARF (p14/p19) ve p16'ya bağlanabilir (Zhang vd., 2008). Bu gözlemler, PA28 γ , p21 ve ARF (p14/p19) gibi MDM2 ile etkileşimli proteinlerin, hücre döngüsünde yer alan çeşitli proteinlerin proteazomal bozunmasını artırmak için bir kompleks oluşturabileceğini düşündürmektedir.

JMY proteini p53 yanıtı sırasında, p300 ko-aktivatörü ve MDM2 onkoproteini ile çekirdekte DNA hasarına bağlı bir kompleks oluşturur (Coutts vd., 2007). JMY ve p300 proteinleri, DNA hasarından sonra bir protein kompleksi tarafından p53 yanıtını artırmak için taşınır. JMY, MDM2 halka alanı tarafından ubiquitinasyonun ardından parçalanır (Coutts vd., 2007). Arıca, JMY'nin yakın zamanda kaderin ekspresyonunu ve aktin nükleasyonunu kontrol ettiği, böylece hücre hareketliliğini ve invazyonunu etkilediği görülmüştür (Coutts vd., 2010).

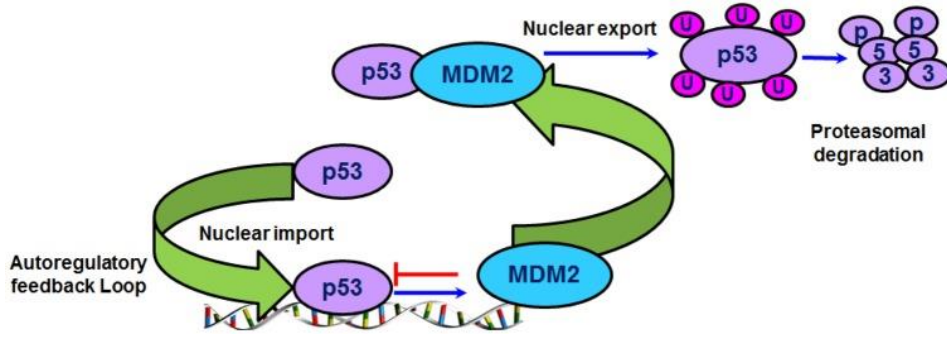
MDM2, p53'ten bağımsız olarak Rb-E2F kompleksi, DNA metiltransferaz DNMT3A, p107, MTBP, siklin kinaz inhibitörü p21 gibi çeşitli proteinlerle etkileşime girebilmekte ve hücre döngüsü ilerlemesini S fazında yönlendirebilmektedir (Xu vd., 2010). Benzer bir şekilde, MDM2 onkoproteini apoptozu engellemek için Rb-E2F yoluyla etkileşime girebilmektedir (Bouska vd., 2008).



Şekil 1.3. Tümör baskılayıcılar ve onkoproteinler, MDM2-p53 etkileşimini düzenler. Yeşil kutu: Tumor suppressor (tümör baskılayıcı); Sarı kutu: Oncoprotein (onkoprotein); Sola doğru olan mavi ok: Activation/stabilization (etkinleştirme/stabilizasyon); Kırmızı çizgi: Inhibition (inhibisyon); Mavi iki yönlü ok: Interaction and stabilization (etkileşim ve stabilizasyon). Ribozomal proteinler (Rps) büyük ve küçük alt birimler olarak p53 ile MDM2 arasında bir kompleks oluşturan MDM2 aracılı p53 ubiquitinasyonunu ve stabilizasyonunu engeller. ARF (p14/p19) ve PML, MDM2'yi nükleolusta izole ederek, MDM2'nin p53 ile bağlanmasını ve p53'ün parçalanmasını engeller. CK1, stres ve DNA hasarına yanıt olarak p53'ü Thr18'de fosforile eder ve bu şekilde p53 ile PML (Progresif multifokal lökoensefalopati) nükleer gövdelerine yerleşir. MDMX, MDM2 ile heterodimerler oluşturur ve p53'ün yıkımını başlatır. PA28γ proteini, hem MDM2 hem de p53 ile etkileşime girerek MDM2-p53 etkileşimini güçlendirir ve MDM2 aracılı p53 ubiquitinlenmesini ve parçalanmasını artırır. RYBP, MDM2 ile bağlanarak p53'ün ubiquitinlenmesini azaltırken, RNF2 'ün yok edilmesini teşvik eder. Tümör baskılayıcı (Ts) proteini HIPK2, MDM2'yi fosforile ederek proteazomal bozulmasını sağlarken, Rps proteini ise p53 ve MDM2 ile kompleks oluşturur.

Kaynak:(Subhasree vd., 2013)

1.2.3. ALL Tedavisinde MDM2-p53 Yolağının Hedeflenmesi



Şekil 1.4. Geleneksel MDM2-p53 düzenleyici yolu. Nuclear export: Nükleer dışı aktarma; Proteasomal degradation: Proteozomal bozulma; Nuclear import: Nükleer içe aktarma; Autoregulatory feedback loop: Otodüzenleyici geri bildirim döngüsü.

Kaynak: (Nag vd., 2013)

Kapsamlı mutasyon araştırmaları, *TP53* tümör baskılayıcı genindeki mutasyonların insan kanserlerinin yaklaşık %50'sinde meydana geldiğini göstermiştir (Hollstein vd., 1991). Bu mutasyonlar, yumurtalık, özofagus, kolorektal, baş ve boyun, gırtlak ve akciğer kanserleri gibi katı tümörlerde %38-50 gibi yüksek oranlarında görülmekle birlikte (Olivier vd., 2010) ALL ve kronik lenfositik lösemnin de içinde bulunduğu bazı hematolojik kanser türlerinin tanı aşamasında daha nadir olarak yaklaşık %10 oranında görüldüğü bildirilmiştir (Hof vd., 2011; Zenz vd., 2010). *TP53* mutasyonları lösemi ve lenfomalarda kötü prognoz ile ilişkilendirilmiştir (Rossi vd., 2009; Salmoiraghi vd., 2016). Bazı tümörlerde *TP53* geninin yabani tipte olmasına rağmen, p53 protein fonksiyonunun baskılandığı gösterilmiştir (Riley vd., 2016; Watanabe vd., 1994). *TP53* geninin yabani tip yani potansiyel olarak fonksiyonel olduğu ancak MDM2 aşırı ekspresyonu gibi sebeplerle p53 proteininin işlev dışı kaldığı vakalarda, MDM2 inhibitörlerinin kullanılması kanser tedavisi için bir strateji sunmaktadır. Bu tedavi yöntemleri, ALL hastalarının tedavi süreçlerinde umut verici sonuçlar göstermektedir. ALL ve MDM2 yolağı arasındaki ilişki, ALL'nin patogeneğinde önemli bir rol oynamaktadır. MDM2'nin p53 üzerindeki inhibe edici etkisi, ALL'nin gelişimini destekleyebilir ve tedavi süreçlerini zorlaştırabilir. MDM2-p53 etkileşiminin hedeflenmesi, ALL tedavisinde yenilikçi stratejilerin geliştirilmesine olanak tanımaktadır. MDM2-p53 yolağının detaylı incelenmesi hem temel bilim hem de klinik onkoloji alanında önemli gelişmelere yol açacaktır. Bu nedenle, MDM2 inhibitörlerinin kullanımı, ALL tedavisinde önemli bir araştırma alanı olarak öne çıkmaktadır.

1.3. MDM2 İnhibitörleri

Çeşitli klinik öncesi çalışmalar, MDM2 inhibitörlerinin yabani tip p53 taşıyan tümör hücrelerini öldürme konusunda *in vitro* ve *in vivo* etkilerini göstermiştir (Andreeff vd., 2016). Bu nedenle, kanser tedavisindeki potansiyel yararları nedeniyle, bu ilaçlar, hastalarda biyolojik etkilerini ve toksisitelerini daha ayrıntılı değerlendirmek için klinik çalışmalara dönüştürülmektedir. RG7112, klinik testlere giren ilk MDM2 inhibitörüdür ve faz I çalışması, ALL dahil olmak üzere hematolojik maligniteleri olan hastalarla gerçekleştirilmiştir (Andreeff vd., 2016). Bu çalışma, MDM2 antagonist tedavisinin ardından p53 stabilizasyonu ve p53 hedef genlerinin transkripsiyonel aktivasyonunu doğrulamış, aynı zamanda kötü prognozlu, relaps veya refrakter hastalarda klinik aktivite göstermiştir (Andreeff vd., 2016).

Küçük moleküllü MDM2 inhibitörlerini geliştirmek için farklı stratejiler benimsenmiştir ve çoğu çalışma, MDM2 ile p53 arasındaki etkileşimi engellemeye yönelik ajanların tasarımına odaklanmıştır (Kamal vd., 2012; Klein vd., 2004; S. vd., 2008). Bu ajanlara örnek olarak Nutlinler, spiro-oksindoller, benzodiazepinler ve p53'ü RITA (p53'ün Reaktivasyonu ve Tümör Hücre Apoptozunun İndüksiyonu) ile yeniden aktive eden bileşikler verilebilir (Kamal vd., 2012). Alternatif olarak, deazaflavinler gibi ubiquitin ligaz aktivitesini inhibe eden bileşikler de geliştirilmiştir. Bu bileşikler, IC₅₀ (Enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu) değerleri 20-50 µM (Mikromolar) arasında değişen ve p53'ün *in vitro* ubiquitinasyonunu inhibe eden etkiler göstermektedir (Kamal vd., 2012). Kanser hücrelerinde, bu bileşikler p53 sinyallemesini aktive ederek p53'e bağlı apoptozu indükler (De Rozieres vd., 2000). Ancak, MDM2 ile p53 arasındaki fiziksel etkileşim üzerinde herhangi bir etkileri olmadığı için, bu inhibitörlerin etkisinin allosterik bir mekanizma aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir (Kaur vd., 2022). Yani, bu bileşikler, MDM2'nin yapısal yeniden düzenlenmesini engelleyerek p53'ün ubiquitinasyonuna karşı bir blokaj oluşturabilirler, ancak MDM2'nin kendi otoubikitinasyonunu etkilemezler (Kamal vd., 2012; Yang vd., 2005).

Buna ek olarak, ginseng türevleri, kurkumin ve genistein gibi flavonoid bileşenler gibi çeşitli kemopreventif ajanların MDM2 onkoprotein ekspresyonunu aşağı düzenlediği gösterilmiştir. Bu bileşikler, hem yabani tip p53'e hem de mutant p53'e sahip tümörlerde MDM2 seviyelerini etkileyerek, MDM2 inhibitörlerinin p53'ten bağımsız olarak işlev görebileceğini göstermektedir. Ayrıca, bazı bileşikler, MDM2'nin MDM2-DAXX-HAUSP kompleksini bozarak bu etkileşimi engeller. MDM2'nin doğal ürün inhibitörleri üzerine

yapılan kapsamlı bir inceleme, bu alandaki araştırmaların son gelişmelerini detaylandırmıştır (Qin vd., 2016).

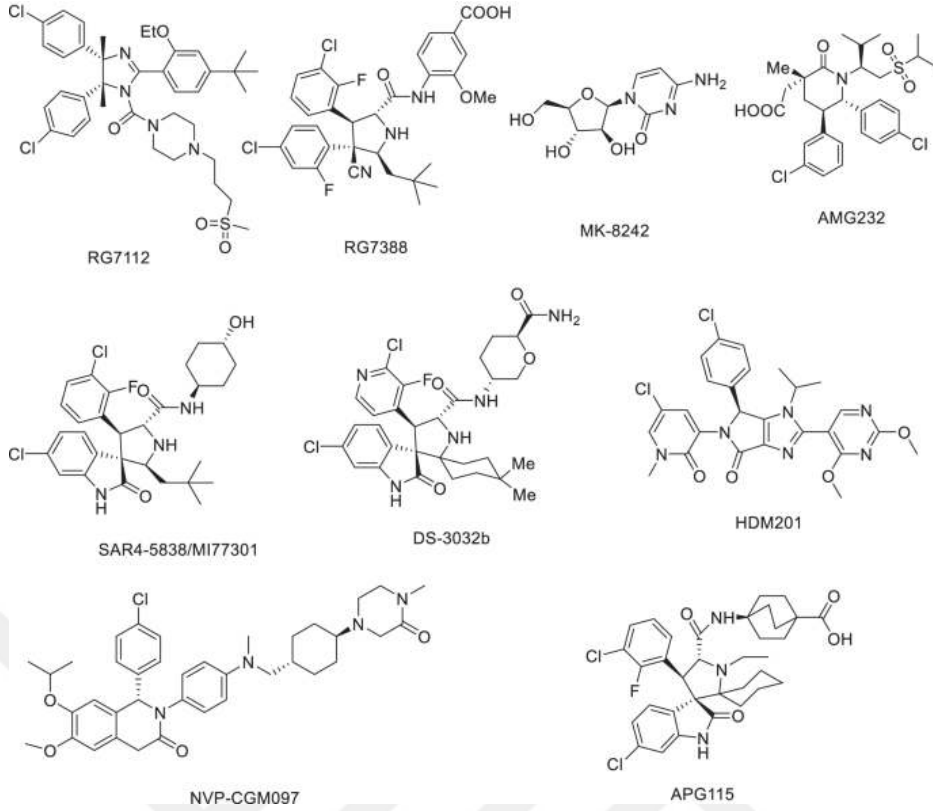
MDM2 inhibitörleri, diğerk onkolojik tedavi yöntemleriyle kombinasyon halinde kullanıldığında daha etkili olabilir. Örneğın, kemoterapi veya immünoterapilerle birlikte MDM2 inhibitörlerinin kullanılması, sinerjik etkiler gösterme potansiyeline sahiptir (Konopleva vd., 2020). MDM2 inhibitörlerinin etkinliğı üzerine birçok klinik çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmalar, çeşitli kanser türlerinde (sarkom, meme kanseri, ALL gibi) MDM2 inhibitörlerinin güvenliğini ve etkinliğini değerlendirmektedir. MDM2 inhibitörlerinin, özellikle ALL gibi hematolojik malignitelerde umut verici sonuçlar vermiştir (Hoffman-Luca vd., 2015). Bu inhibitörler, tedaviye dirençli hastalarda p53 aktivitesini artırarak tedavi etkinliğini artırma potansiyeline sahiptir (Q. Ding vd., 2013). MDM2 inhibitörlerinin, geleneksel kemoterapötik ajanlarla birlikte kullanılması, tedavi etkinliğini artırmak amacıyla değerlendirilmektedir. Bu kombinasyonların etkinliğı üzerine araştırmalar sürmektedir. MDM2 inhibitörleri, p53 aktivitesini artırarak kanser tedavisinde yeni bir yaklaşım sunmaktadır. MDM2'nin p53 üzerindeki inhibe edici etkisini hedef alan bu moleküller, çeşitli kanser türlerinde etkili bulunmuş ve klinik araştırmalarda umut verici sonuçlar göstermiştir. MDM2 inhibitörlerinin kullanımı, ALL gibi hematolojik malignitelerde yeni tedavi stratejileri geliştirilmesine olanak tanımakta ve onkolojide önemli bir araştırma alanı olarak öne çıkmaktadır. Bu alandaki çalışmalar, gelecekte kanser tedavisinin daha etkili ve hedefe yönelik hale gelmesine katkıda bulunacaktır.

Hedefe yönelik kanser tedavileri, kanser hücrelerine özğü moleküler değişimleri hedeflediklerinden kemoterapi ve radyoterapi gibi geleneksel tedavi yöntemlerinden daha etkilidir. Ayrıca sağlıklı hücrelere daha az zarar verir. Bu nedenle yeni nesil tedavi yaklaşımları, bu tür hedefe yönelik tedavi ajanlarının tekli veya çoklu kullanımları üzerinde şekillenmektedir. ALL için farklı tedaviler mevcut olmakla birlikte, yüksek klinik heterojenite sebebiyle hiçbir mevcut tedavinin tüm vakalarda iyileştirici olamaması yeni stratejilerin ihtiyaını doğurur. *TP53* geninden kodlanan p53 proteini, tümör oluşumunu önleme ačíından çok önemli görevlere sahiptir ve bu sebeple genomun koruyucusu olarak adlandırılmıştır (S. Nag vd., 2013). ALL vakalarının %90'ından fazlası hastalığın ilk teşhisinde yabani tip *TP53* genine sahiptir. Yabani tip *TP53* geninden kodlanan fakat farklı sebeplerle fonksiyonunu kaybetmiş p53'ün tekrar aktivasyonu kanser tedavisinde çekici bir terapötik yaklaşımdır (Graves vd., 2012). p53, birincil negatif regülatörü yani baskılayıcısı olan MDM2 proteininin hedeflenmesi ile genotoksik olmayan bir şekilde aktive edilebilir (Furet vd., 2016). Son 20

yılda birçok küçük molekül MDM2 inhibitörü geliştirilmiş, bir kısmı da klinik değerlendirmeye değer bulunmuştur.

Normal hücrelerde MDM2, p53'ün yıkımını teşvik ederek hücrel homeostazın korunmasına yardımcı olur. Ancak, kanser hücrelerinde MDM2'nin aşırı ekspresyonu, p53'ün inhibe edilmesine ve tümör gelişimine katkıda bulunur (Furet vd., 2016). Bu nedenle, MDM2 inhibitörleri, p53 aktivitesini artırmak ve tümör hücrelerinin büyümesini engellemek için önemli bir tedavi stratejisi olarak kabul edilmektedir. MDM2 inhibitörleri, MDM2'nin p53 ile olan etkileşimini hedef alarak p53'ün işlevselliğini artırır (Graves vd., 2012; Vousden vd., 2009). MDM2 inhibitörleri, MDM2'nin p53 ile olan bağlanma yerini işgal eder, böylece p53'ün MDM2 tarafından inhibe edilmesini engeller (S. Yu vd., 2009). Bu inhibitörler, p53'ün ubiquitin ile işaretlenmesini engelleyerek onun hücre içinde daha uzun süre stabil kalmasını sağlar (S. Yu vd., 2009). Bu, p53'ün hücrel stres koşullarına yanıt verme yeteneğini artırır. MDM2 inhibitörlerinin, ALL tedavisinde p53'ün yeniden aktive edilmesi yoluyla fayda sağlayabileceği gösterilmiştir. Nutlin-3, belirli sarkom türlerinde başarılı sonuçlar vermiştir (Michaelis, vd., 2011). MDM2 inhibitörlerinin meme kanseri tedavisinde p53'ün aktivitesini artırarak tümör büyümesini engellediği bildirilmiştir (Xiong vd., 2014). MDM2, kanser tedavisinde önemli bir hedef olarak kabul edilmektedir. MDM2 inhibitörleri, p53'ün aktivitesini artırmak ve tümör hücrelerinin büyümesini engellemek amacıyla geliştirilmiştir.

MDM2-p53 etkileşiminin inhibisyonu, kanser tedavisinde büyük bir araştırma alanı oluşturmuş ve bu konuda çok sayıda küçük molekül inhibitörü geliştirilmiştir. Bunlardan klinik çalışmalara girenlerden bazıları şunlardır: RG7112, RG7388 (Idasanutlin), MK-8242, AMG232, MI-77301 (SAR405838), DS-3032b, HDM201 (Siremadlin), NVP-CGM097 ve APG-115. Bu bileşiklerin birçoğunun yapısal modifikasyon süreçleri ve klinik sonuçları üzerinde yapılan araştırmalar, MDM2-p53 etkileşiminin engellenmesinin kanser tedavisindeki potansiyelini vurgulamaktadır (Şekil 1.5) (Tablo 1.1) (Fang vd., 2020; Kocik vd., 2019; Wang vd., 2017; Zhao vd., 2013).



Şekil 1.5. Klinik çalışmalara konu olmuş bazı MDM2 inhibitörleri

Kaynak: (Fang vd., 2020; Kocik vd., 2019; Wang vd., 2017; Zhao vd., 2013)

MDM2 inhibitörleri, p53'ün tümör baskılayıcı aktivitesini geri kazandırmayı amaçlayarak kanser tedavisinde büyük bir potansiyel sunmaktadır. Nutlin bileşiği klinik olarak uygun olmamakla birlikte, Nutlin türevi olarak geliştirilen bazı bileşikler, özellikle p53'ün p53-MDM2 etkileşimini engellemekte daha etkili olmuş ve ilk klinik denemelerde umut verici sonuçlar elde edilmiştir (Müller vd., 2007). Bununla birlikte, bu bileşiklerin etkinliği, çeşitli kanser türlerinde farklılık gösterebilir ve tedaviye karşı direnç geliştirme riski de bulunmaktadır. Bu nedenle, bu ilaçların etkinliğini artırmak için daha fazla araştırma ve yapısal optimizasyon gereklidir. Klinik çalışmalar devam etmekte ve bu bileşiklerin etkileri, gelecekteki tedavi stratejileri için önemli bir yol haritası oluşturacaktır. Nutlin-3 MDM2 ile p53 arasındaki etkileşimi engelleyen küçük bir moleküldür (Müller vd., 2007). Klinik denemelerde, Nutlin-3'ün bazı ALL ve meme kanseri hastalarında olumlu sonuçlar gösterdiği bildirilmiştir (Xiong vd., 2014). 2004 yılında, “nutlinler” adı verilen *cis* -difenil ikameli imidazolin içeren bileşiklerin, güçlü, spesifik ve oral yoldan etkili küçük molekül MDM2 inhibitörlerinin birinci sınıfı olduğu rapor edilmiştir. İlk rapordaki en etkili bileşiklerden biri, $IC_{50} = 90$ nM ile MDM2 proteinine bağlanan nutlin-3a (nutlin'in aktif izomeri) olarak bildirilmiştir (Vassilev vd., 2004).

Tablo 1.1.Klinik çalışmalardaki küçük molekülü MDM2 inhibitörlerinin listesi

İlaçlar	Klinik alışmalar	MDM2 ile Bağlanma Aktivitesi (nM)	Kullanılan Hastalıklar
RG7112 (RO5045337)	Faz II alışmaları	90	İleri Katı Tümlerler, Sarkomalar, Hematolojik Neoplazmlar, AML, KML (Vu vd., 2013)L. T. Vassilev vd., 2004).
RG7338 (Idasonutlin)	Faz I , Faz II alışmaları	6	Katı Tümlerler, AML, Nan-Hodgkin's Lenfomalar, Meme Kanseri, Glioblastomalar, Koleteral Kanselerler, Nöroblastomalar (Reis vd., 2016; Lakoma vd., 2015; Daver vd., 2023)
AMG-232 (KRT-232)	Faz I , Faz II alışmaları	0,6	AML, Beyin Kanseri, Glioblastomalar, İleri Katı Tümlerler, Melanomalar (Sahin vd., 2020; Gonzalez vd., 2014).
APG-115 (AA-115)	Faz I , Faz II alışmaları	<1	Katı Tümlerler, Lenfomalar, AML, Nöroblastomalar, ALL (Chen vd., 2017)
HDM-201	Faz I , Faz II alışmaları	0,015	Liposarkomalar, AML, Hematolojik Tümlerler, Meme Kanseri, Koleteral Kanselerler (E. M. Stein vd, 2021).
DS-3032b (Milademat)	<i>In vitro, in vivo</i>		AML, Lenfomalar, İleri Katı Tümlerler (Arnhold vd., 2018).
SAR405838	<i>In vitro, in vivo</i>	3	Kötü Huylu Tümlerler.
MK-8242	<i>In vitro, in vivo</i>		AML, Katı Tümlerler.
CGM097	<i>In vitro, in vivo</i>	1,7	İleri Katı Tümlerler (Holzer vd., 2015).

Roche tarafından geliştirilen RG7112, Nutlin serisinin yapısına dayalı olarak modifiye edilmiştir ve klinik çalışmalara dahil edilen ilk MDM2 inhibitörüdür (Vu vd., 2013). Nutlin-3a, MDM2 ile bağlanma aktivitesi gösteren ve p53'ün aktivitesini artıran güçlü bir bileşik olarak 2004 yılında keşfedilmiştir (L. T. Vassilev vd., 2004). RG7112, MDM2 ile p53 arasındaki etkileşimi engelleyerek p53'ün serbest kalmasını sağlar ve tümör hücrelerinin apoptozunu indükler. Klinik çalışmalarda, RG7112 bazı kanser türlerinde, özellikle meme kanseri ve lösemi gibi durumlarda olumlu sonuçlar göstermiştir (L. T. Vassilev vd., 2004).

AMG232, Amgen tarafından geliştirilen ve MDM2'nin p53 ile bağlanma alanını hedefleyen bir inhibitördür (Sahin vd, 2020). Morfolinon iskelesine dayalı olarak tasarlanan bu bileşik, MDM2-p53 etkileşimini engelleyerek p53'ün aktivitesini artırır (Gluck vd., 2020). Yapısal analizler, bu bileşiğin etkinliğini artırmak için çeşitli modifikasyonlarla geliştirilmiştir (Moschos vd., 2017). Ön değerlendirmeden sonra, morfolinon iskelesinin, p53'ün MDM2'ye bağlanmasının üç temel amino asit kalıntısını ($IC_{50} = 5,4 \mu M$) iyi bir şekilde simüle edebileceği ve C2 pozisyonuna bir benzil grubunun eklenmesinin AMG232 aktivitesini arttırdığı belirlenmiştir (Gonzalez vd., 2014).

NVP-CGM097, dihidroizokinolinon iskeleti kullanılarak tasarlanmış ve MDM2 ile bağlanma aktivitesi gösteren bir bileşiktir (Holzer vd., 2015). NVP-CGM097'nin kokristal yapısı, MDM2 ile farklı bağlanma modlarına sahip olduğunu ortaya koymuştur (Townsend vd., 2015). Yapısal optimizasyon yoluyla, bağlanma yeteneği artırılarak bu bileşik daha güçlü bir aktivite göstermektedir. (Zhu vd., 2022). NVP-CGM097, MDM2 proteinine bağlandığında, dihidroizokinolinon iskeleti tamamen düzlemsel değildir ve bu nedenle, NVP-CGM097 ve MDM2 proteininin kombinasyonu, van der Waals kuvvetleri veya bağlanma yerleriyle hidrojen bağı etkileşimleri tarafından üstesinden gelinebilen bir konformasyonel enerji kaybına neden olur (Holzer vd., 2015).

Novartis tarafından geliştirilen HDM201 (siremadlin), MDM2'nin p53 ile bağlanmasını engelleyen bir bileşiktir. Tasarımı, MDM2 proteininin dihidroizokinolinon bileşiklerine bağlanmasının konformasyonel analizlerine dayanmaktadır (A. S. Stein vd., 2019; E. M. Stein vd., 2022). Bu bileşik, MDM2 ile p53 arasındaki etkileşimi engelleyerek p53'ün hücredeki düzeylerini artırır (E. M. Stein vd., 2021).

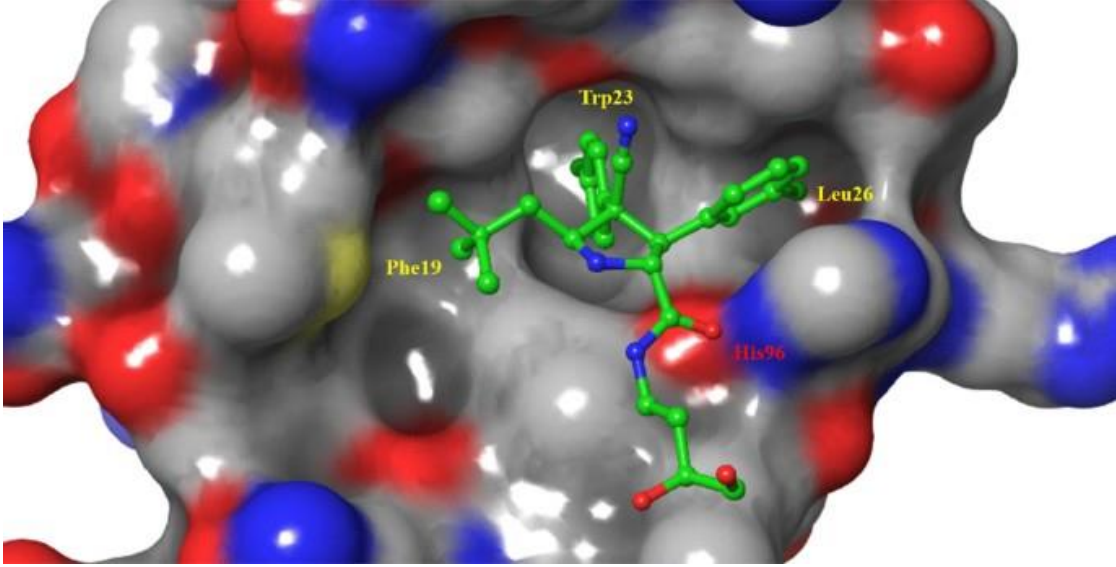
MI-77301 (SAR405838), daha yeni bir MDM2 inhibitörüdür ve p53'ün transkripsiyonel aktivitesini artırmayı hedefler (Wang vd., 2014). Bu bileşik, MDM2'nin p53 üzerindeki inhibe edici etkisini azaltarak p53'ün aktivitesini artırır (Wang vd., 2014). Klinik araştırmalar faz I ve II aşamalarında değerlendirilmektedir ve bazı kanser türlerinde umut

verici sonuçlar göstermektedir (de Jonge vd., 2017). SAR405838 ve APG-115, p53 ve MDM2'nin protein bağlanmasına dayanarak geliştirilen spirooksindollere aittir (Wang vd., 2014). İndol halkası, p53 ve MDM2 arasındaki bağlanmanın anahtarıdır. İndol halkasındaki amino grubu, MDM2 ile hidrojen bağları oluşturabilir ve ayrıca oksindolün, p53'ün triptofan 23 kalıntısının MDM2 ile bağlanma modunu mükemmel bir şekilde simüle edebildiği bulunmuştur (Koo vd., 2022).

DS-3032b, MDM2-p53 etkileşimini inhibe eden bir başka bileşiktir. Bu bileşik, p53'ün aktivitesini artırarak kanser hücrelerinin büyümesini engeller ve klinik çalışmalarda değerlendirilmiştir (Arnhold vd., 2018). Wang Shaomeng'in araştırma grubunun geliştirdiği APG-115, spirooksindol iskeleti taşıyan bir MDM2 inhibitörüdür (H. Chen vd., 2017). Bu bileşik, p53'ün MDM2 ile etkileşimini engelleyerek p53'ün hücredeki düzeylerini artırır ve kanser hücrelerinin büyümesini inhibe eder (H. Chen vd., 2017). APG-115'in çeşitli kanser türlerinde antitümör etkinliği gösterdiği bildirilmiştir (Rasco vd., 2019; Yi vd., 2018).

1.3.1. RG7388 (Idasanutlin) İnhibitörü

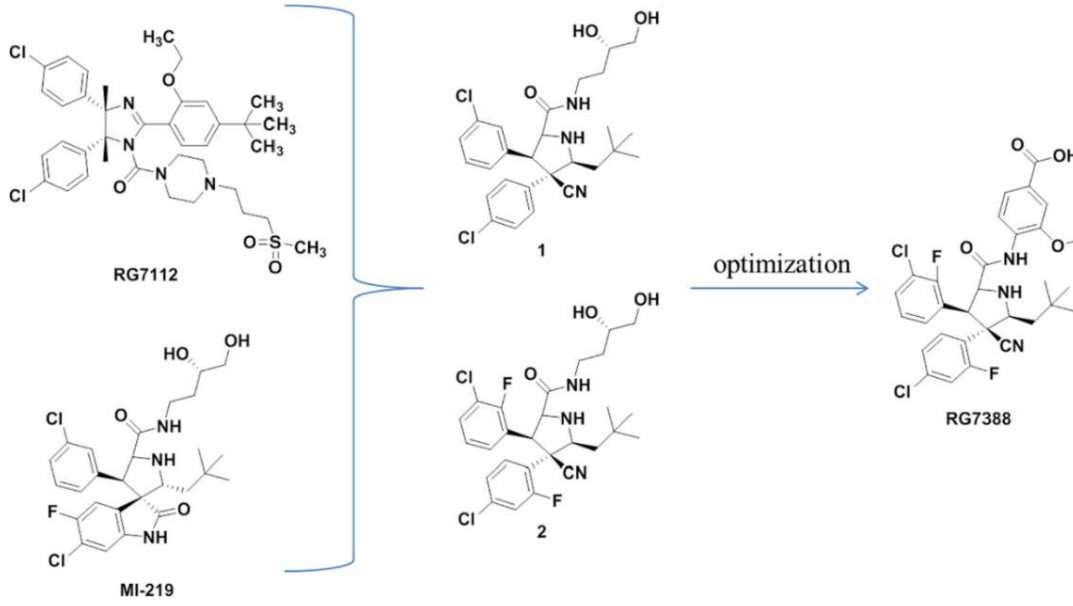
Roche araştırmacıları, bildirilen MDM2 inhibitörlerinin yapısındaki triptofan 23 ve lösin 26'nın aktif boşluklarına bağlı iki benzen halkasının hepsinin cis-konformasyon olduğunu, trans-konformasyonlu MDM2 inhibitörlerinin ise bildirilmediğini gözlemlemişlerdir (Şekil 1.6) (Ke Ding vd., 2006; S. Yu vd., 2009). Bu nedenle, MI-219 ve RG7112'ye dayanarak, siyanonun konformasyonunu ve aktivitesini sürdürmesi için kritik öneme sahip olduğu iki önemli benzen halkasının trans-konformasyonlarına sahip RG7388'i tasarlamış ve sentezlemişlerdir (Q. Ding vd., 2013) (Şekil 1.6). Yapısal optimizasyondan sonra, klinik çalışmalara giren ikinci MDM2 inhibitörü RG7388 elde edilmiştir (Q. Ding vd., 2013).



Şekil 1.6. RG7388'in MDM2 ile bağlanma şeklinin gösterimi

Kaynak: (Zhu vd., 2022)

Klinik açıdan bakıldığında, RG7112'nin etkinliği için yüksek doz gerekmesi ve bu yüksek dozların gastrointestinal intolerans ile birlikte değişken maruziyet seviyelerine yol açması gibi birkaç dezavantajı bulunmaktadır. Bu sınırlamaları aşmak amacıyla RG7388 adlı güçlü bir MDM2 inhibitörü keşfedilmiştir (Şekil 1.7) (Ding vd., 2013) ve bu ilaç, relaps/refrakter AML hastalarında faz 1/1b denemelerine dahil edilmiştir. Çalışma sonuçları, idasanutlin ile tedavi edilen lösemik blastlar ve kök hücrelerdeki MDM2 protein ekspresyon düzeylerinin, AML hastalarında tam remisyon ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Reis vd., 2016). Ayrıca, aynı çalışma idasanutlin'i monoterapi olarak veya sitarabin ile kombinasyon halinde değerlendirmiştir (Reis vd., 2016). Ancak, ALL hakkında henüz güncel bir veri mevcut değildir.



Şekil 1.7. RG7388'in keşfi

Kaynak: (Zhu vd., 2022)

RG7112, MDM2 proteininin üç temel aktif bölgesini işgal ederek, MDM2 ile bağlanma aktivitesi sergiler (B. Yu vd., 2018). Bu bağlanma aktivitesi, 196 nM'lik IC_{50} değeriyle ölçülmüştür. Ancak, RG7112'in yabani tip p53 tümör hücrelerine karşı orta düzeyde bir inhibe edici aktivitesi varken, p53 mutant hücrelere karşı belirgin bir etki göstermemektedir (B. Yu vd., 2018). Bu durum, p53 mutant hücrelerin MDM2-p53 etkileşimine daha az duyarlı olduğunu veya alternatif onkogenik yollarla tümör büyümesini sürdürebileceğini göstermektedir (Illidge vd., 2000).

RG7388, RG7112 ve MI-219'un daha gelişmiş bir türevidir ve farmakokinetik parametreleri iyileştirilmiş bir ikinci nesil MDM2 inhibitörüdür (Q. Ding vd., 2013). RG7388'in başarısı, onun bağlanma kapasitesinin 6 nM (Nanomolar)'a kadar düşmesi ve yabani tip p53'ün yüksek ekspresyonunu artırmasıyla açıklanabilir (Z. Zhou vd., 2021; Chitneni vd., 2021). Bu özellik, RG7388'in hücre döngüsünü durdurma veya apoptozu aktive etme yeteneğini büyük ölçüde artırmıştır (Z. Zhou vd., 2021). Ayrıca, bu bileşik, çıplak farelerdeki nöroblastoma ksenograft deneylerinde tümör proliferasyonunu inhibe etmiştir (Lakoma, vd., 2015). Farelerde yapılan ksenograft modelinde RG7388 (25 mg/kg (Miligram/Kilogram) oral doz) tümör büyümesinin inhibisyonuna ve gerilemesine yol açmış, apoptoz ve antiproliferatif etkiler göstermiştir (A. Lakoma vd., 2015). Bu, RG7388'in tümör hücrelerini hedef alırken sağlam bir antikanser etkinlik sergileyebileceğini işaret etmektedir (B. Higgins vd., 2014; A. Lakoma vd., 2015). Ayrıca, RG7388, klinik çalışmaların pek çok

aşamasında değerlendirilmiştir. Özellikle, relaps/refrakter AML tedavisinde sitarabin ile kombinasyon halinde yapılan faz III klinik çalışmalarda, tedavi öncesi MDM2 düzeyleriyle ilişkili olarak %25'lik tam remisyon oranı bildirilmiştir (Khurana vd., 2019). Ancak, bu çalışma, beklenmeyen sonuçlar nedeniyle durdurulmuştur (Brian Higgins vd., 2015). RO6839921, RG7388'in bir ön ilacıdır. Bu bileşik, RG7388'in farmakokinetik özelliklerini iyileştirmeyi ve maruz kalma değişkenliğini azaltmayı hedefler (Brian Higgins vd., 2015). RO6839921'in intravenöz enjeksiyonu, osteosarkom ve AML ksenograft modellerinde iyi bir anti-tümör aktivitesi göstermiştir. Ancak, faz I çalışmaları, RO6839921'in farmakokinetik parametrelerinde iyileşme sağlasa da, güvenlik profili RG7388 ile benzerdir ve klinik fayda açısından belirgin bir avantaj sunmamıştır (Uy vd, 2020; Zhu vd., 2022). Özellikle RG7388, farmakokinetik iyileştirmeleri ve daha güçlü etkinliğiyle öne çıkmakta ve klinik çalışmalarda umut verici sonuçlar göstermektedir. Ancak, tedaviye karşı edinilen direnç ve klinik çalışmalarda beklenmeyen sonuçlar gibi zorluklar, bu terapötik stratejilerin daha fazla optimize edilmesi gerektiğini göstermektedir. RO6839921'in intravenöz uygulama seçenekleri ve diğer farmasötik modifikasyonlarla birlikte, bu bileşiklerin gelecekte daha geniş bir tedavi yelpazesinde kullanılabilir hale gelmesi beklenebilir. Bu çalışmaların, özellikle AML ve ileri solid tümörlerde tedavi seçeneklerini çeşitlendirme potansiyeli vardır.

RG7388, MDM2-p53 etkileşimini bozacak şekilde tasarlanmış, kanser hücrelerinde p53'ün stabilizasyonuna ve aktivasyonuna yol açan güçlü ve seçici bir MDM2-p53 antagonisti olarak ortaya çıkmıştır (Q. Ding, Zhang, vd., 2013; Lyubomir T Vassilev vd., 2004). Klinik öncesi çalışmalar, idasanutlinin spesifik olarak *TP53* vahşi tip hücrelerde apoptozu indüklediğini, *TP53* mutant hücrelerinin ise direnç sergilediğini ve bunun terapötik özgüllüğünü vurguladığını göstermiştir (L. Chen vd., 2019; Ciardullo vd., 2019). Mekanik olarak, idasanutlin aracılı p53 aktivasyonu, hem içsel (mitokondri aracılı) hem de dışsal (ölüm reseptör aracılı) apoptotik yollarda yer alan pro-apoptotik genlerin yukarı regülasyonu ile sonuçlanır (Aptullahoglu vd., 2024). Bu aktivasyon, kaspaz aktivitesinin artması ve apoptotik hücre ölümünün anahtar belirteçleri olan poli (ADP-riboz) polimerazın (PARP) bölünmesiyle sonuçlanır. Son klinik araştırmalar, idasanutlinin hematolojik malignitelerdeki terapötik potansiyeline ilişkin cesaret verici bilgiler sağlamıştır. Tekrarlayan veya dirençli AML hastalarında idasanutlin'i standart kemoterapi veya venetoklaks ile kombinasyon halinde değerlendiren bir faz I çalışması, bir hasta alt kümesinin tam yanıtlara ulaşmasıyla yönetilebilir güvenlik profilleri ve umut verici etkinlik gösterdiği gösterilmiştir (Daver vd., 2023). Ayrıca, devam eden veya tamamlanmış ancak henüz yayınlanmamış klinik

araştırmalar, idasanutlin'i monoterapi olarak veya çeşitli hastalıklarda diğer ajanlarla kombinasyon halinde araştırarak klinik faydasını doğrulamayı ve optimal tedavi rejimlerini tanımlamayı amaçlamaktadır (ClinicalTrials.gov tanımlayıcı: NCT02633059 ve NCT03287245). Bu klinik deneylerin n sonuçları, idasanutlin'in *TP53* yabancı tip ALL için umut verici bir terapötik strateji olarak rolünün altını çizmekte ve potansiyel olarak sınırlı tedavi seçenekleri olan hastalarda sonuçları iyileştirmek için yeni bir yol sunmaktadır.

RG7388, MDM2'nin p53 ile olan etkileşimini engelleyen hidrofobik ve elektrostatik etkileşimleri optimize etmek için tasarlanmıştır (Khurana vd., 2019). RG7388, MDM2'nin p53 ile olan bağlanma bölgesine bağlanır ve bu etkileşimi engeller. Sonuç olarak, p53'n hücre içindeki stabilitesi artar (Khurana vd., 2019; A. Lakoma vd., 2015). Aktifleşen p53, DNA onarımı ve hücresel stres yanıtını tetikler. Ayrıca, apoptoz yolu üzerindeki etkileriyle kanser hücrelerinin ölümünü artırır. p53, birçok hedef genin (rneğin, *CDKN1A*, *MDM2*, *BAX*) transkripsiyonunu artırarak hücresel yanıtları modüle eder (Ciardullo vd., 2016). RG7388 AML, ALL ve bazı lenfoma türlerinde test edilmiştir (Bell vd., 2020; Khurana vd., 2019). Meme kanseri, sarkom ve diğer katı tümörler üzerinde de denenmiştir (A. Lakoma vd., 2015). İlk bulgular, RG7388'in kanser hücrelerinin büyümesini önemli ölçüde engellediğini ve tedaviye dirençli hastalarda umut verici etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. RG7388'in diğer tedavi yöntemleriyle (rneğin, kemoterapi veya immnoterapilerle) kombinasyonu, daha etkin tedavi stratejileri geliştirmek için değerlendirilmektedir (A Lakoma vd., 2015). Bu kombinasyonlar, özellikle MDM2'nin aşırı ekspresyonu olan tümörlerde daha fazla etkili olabilir.

RG7388'nin diğer tedavi yöntemleriyle (kemoterapi, immünoterapiler) kombinasyonları, daha etkili tedavi stratejileri geliştirme potansiyeline sahip olabilir. Farklı kanser türlerinde etkinliğini değerlendirmek amacıyla yeni klinik çalışmalar yapılmaktadır (C.-E. Wu vd., 2022). RG7388'nin etkinliğini tahmin etmek için biyomarker araştırmaları, kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımlarını destekleyebilir. RG7388, MDM2 inhibitörleri sınıfında önemli bir adaydır. MDM2-p53 etkileşimini hedefleyerek, kanser tedavisinde umut verici bir yaklaşım sunmaktadır. Hem hematolojik malignitelere hem de katı tümörlerde etkili olabileceği düşünülmektedir. Klinik alışmalar, RG7388'nin güvenliğini ve etkinliğini daha fazla değerlendirmek amacıyla devam etmektedir. Onkolojik tedavi stratejilerinin gelişmesine katkıda bulunması beklenmektedir.

1.3.2. Tez Çalışmasının Gerekçesi ve Hedefleri

Bu tez çalışmasında temel amaç, ALL hastalarının tedavilerinin iyileştirilmesi için potansiyel bir hedefe yönelik tedavinin hücre hattı modellerinde test edilmesidir. ALL gelişiminde ve tedaviye yanıtta yer alan önemli bir sinyal iletim yolağı yeni nesil küçük molekülü inhibitör ile hedeflenecek ve günümüzde mevcut olan güncel klinik öncesi ilaç araştırma teknikleri kullanılarak bu tedavi stratejisinin etkileri araştırılacaktır. Hedefe yönelik ilaç tedavileri, kansere özel olan moleküler ve hücresel değişikliklere odaklanarak kemoterapi ve radyoterapi gibi diğer tedavi yöntemlerinden daha etkili olabilir, ayrıca normal hücrelere daha az zarar verir. Bu nedenle yeni nesil tedavi stratejileri bu tür hedefe yönelik ilaçların tekli veya çoklu kullanımları üzerinde şekillenmektedir. ALL klinik olarak birçok genetik anomaliyi anı anda bulundurduğundan heterojen bir hematolojik kanserdir (Horibata vd., 2019). Özellikle tedavi açısından en zorlu malignitelerinden biri olmaya devam etmektedir (C.-H. Pui vd., 2009). Ancak diğer birçok kanserden farklı olarak vakaların %90'ından fazlasında *TP53* geni hastalığın teşhisi aşamasında yabancı tip durumundadır (Comeaux vd., 2017). Nükseden ALL'de ise, *TP53* mutasyonları veya delesyonları daha sık görülmekte ve tedavi başarısızlığının önemli bir belirleyicisi olmaktadır (Hof vd., 2011). Geriye kalan yüksek orandaki bir hasta topluluğu ise fonksiyonel bir p53 proteinine sahiptir. MDM2 proteininin p53'ün birincil negatif regülatörlerinden biri olduğu düşünüldüğünde, MDM2 proteinini hedeflemek ALL tedavisi için de çekici bir terapötik yaklaşımdır. Bu yolla p53'ün stabilizasyonu ve böylece yeniden aktivasyonu sağlanabilir (Q. Ding, Zhang, vd., 2013). MDM2 inhibitörleri, yabancı tip p53 eksprese eden kanser hücrelerinde spesifik bir p53 aktivatörü olarak araştırılmıştır. Bu sebeple ALL'de de uygulanabilir çünkü birçok katı tümörün aksine, vakaların sadece %5'i ilk tanıda *TP53* delesyonlu veya mutasyonludur (K. Ding vd., 2005). ALL hücrelerinin çoğalması ve hayatta kalması yabancı tip p53 aktivitesinin kaybını gerektirdiğinden, bu mekanizmayı tersine çevirecek bir moleküler strateji güçlü bir büyüme inhibisyonu indükleyebilir (Q. Ding vd., 2013). Buradaki önemli diğer bir nokta, MDM2 inhibitörlerinin herhangi bir DNA hasarına neden olmadan yabancı tip p53'ü aktive edilebilmesi yani genotoksik olmayan bir hedeflenmiş tedavi seçeneği olmasıdır (Böttger vd., 1997). Ayrıca Faz III klinik çalışmalara giren ilk MDM2-p53 antagonistidir (NCT02545283). Idasanutlin (RG7388), MDM2-p53 etkileşimini bozacak şekilde tasarlanmış, kanser hücrelerinde p53'ün stabilizasyonuna ve aktivasyonuna yol açan güçlü ve seçici bir MDM2 antagonisti olarak ortaya çıkmıştır (K. Ding vd., 2005; Lyubomir T Vassilev vd., 2004). Klinik öncesi çalışmalar, idasanutlinin spesifik olarak *TP53* vahşi tip hücrelerde apoptozu

indüklediğini, *TP53* mutant hücrelerinin ise direnç sergilediğini ve bunun terapötik özgüllüğünü vurguladığını göstermiştir (L. Chen vd., 2019; Ciardullo vd., 2019).

MDM2, hücresel streslere yanıt olarak tümör baskılayıcı gen *TP53*'ün düzenleyicisi olan ve p53 fonksiyonunu baskılayan bir proteindir (S. Nag vd., 2013). Normalde p53, hücre döngüsünü düzenleyerek, DNA hasarını onarmak için hücrelerin apoptoz (programlanmış hücre ölümü) geçirmesini sağlar (De Rozieres vd., 2000). Ancak, p53'ün işlevinin engellenmesi, kanser hücrelerinin hayatta kalmasına ve çoğalmasına izin verir. MDM2'nin p53 ile olan etkileşimi, kanserin gelişmesinde kritik bir rol oynar, çünkü p53'ün baskılanması, hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalmasına neden olabilir (Vousden vd., 2009). MDM2 inhibitörleri, p53'ün işlevini yeniden aktive ederek kanser hücrelerinin ölümünü teşvik edebilir (Graves vd., 2012). Son yıllarda, MDM2 inhibitörlerinin hematolojik malignitelerde, özellikle ALL gibi hastalıklarda kullanımı büyük bir ilgi uyandırmıştır (M. Zhou vd., 2000). MDM2 inhibitörleri, p53'ün MDM2 tarafından inhibe edilerek fonksiyonlarını geri kazanmasına yardımcı olabilir. *TP53* geninin çoğu tümör tipiyle ilişkili olarak inaktif olduğunu ve genetik değişikliklere uğradığını bilmekteyiz (Olivier vd., 2010).

ALL tedavisinde kullanılan kemoterapi ve diğer tedavi yaklaşımlarına rağmen, nükseden vakalar hala büyük bir tedavi zorluğu yaratmaktadır. Bu nedenle, yeni tedavi stratejileri arayışı devam etmektedir. MDM2 inhibitörleri, bu yeni tedavi seçenekleri arasında umut verici bir yer tutmaktadır. Klinik öncesi çalışmalarda, MDM2 inhibitörlerinin ALL hücrelerinde etkili olduğu gösterilmiştir (Trino vd., 2016). Bu çalışmalar, MDM2 inhibitörlerinin p53'ün stabilizasyonunu sağladığını ve p53 hedef genlerinin transkripsiyonel aktivasyonunu tetiklediğini ortaya koymuştur (T. Liu vd., 2024). Bu mekanizma sayesinde, p53'ün indüklediği apoptoz ve hücre döngüsü duraklatma gibi süreçler tetiklenir. Bu, lösemik hücrelerin ölümüne yol açarak tedaviye dirençli hastalarda etkinlik sağlar (Hohtari vd., 2022).

RG7388 (Idasanutlin), güçlü bir MDM2 inhibitörü olarak geliştirilmiştir ve bazı çalışmalarda AML (Akut Miyeloid Lösemi) hastalarında diğer inhibitörler ile kombine kullanımıyla tam remisyona sağlanmıştır (Khurana vd., 2019). Bu ilaç, ALL üzerine de araştırılmaktadır. Çalışmalar, lösemik blastlarda ve kök hücrelerde MDM2 protein ekspresyonunun yüksek olduğunu ve bunun tam remisyona ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Bell vd., 2020). Ancak RG7388'in ALL hastalarındaki etkinliği hakkında daha fazla veri gereklidir. MDM2 inhibitörlerinin etkinliği, *TP53* mutasyon durumu ve MDM2 ekspresyon düzeyleri gibi biyomarkörlere bağlı olabilir. MDM2 inhibitörleri, ALL gibi hematolojik malignitelerde yeni bir tedavi umudu sunmaktadır. Ancak, bu tedavi yaklaşımının etkinliği,

özellikle p53 mutasyonu olmayan hastalar için daha belirgin olabilir. Sonuç olarak, MDM2 inhibitörleri, ALL tedavisinde önemli bir tedavi seçeneği olma potansiyeline sahiptir. Bununla birlikte, bu tedavi stratejisinin klinik etkinliğini tam olarak belirlemek için daha fazla araştırma ve klinik deneme yapılması gerekmektedir. MDM2 inhibitörlerinin toksisite ve yanıt biyomarkörlerinin belirlenmesi gibi zorlukların üstesinden gelmek, bu ilaçların ALL tedavisindeki başarısını artırmak için kritik öneme sahiptir. MDM2 ekspresyonunun birçok kanser türünde yüksek olması, MDM2'nin hedeflenmesinin gerekli olduğunu göstermektedir (Burgess vd., 2016). Kullanacağımız MDM2 inhibitörü *TP53* yabani tip hücrelerde oldukça etkilidir. Sağlıklı hücrelerde ise (örneğin sağlıklı kök hücreler) toksik olmadığı araştırmalarda gözlemlenmiştir (Hohtari vd., 2022; T. Liu vd., 2024). Ayrıca MDM2 inhibitörünün genotoksik olmaması, tedavi uygulanacak bireylerde ileriye dönük olumsuz sonuçların ortaya çıkmasının önüne geçecektir. MDM2 inhibitörleri halen aktif olarak test edilmektedir ve birçok inhibitör de klinik aşamalar için kullanılması uygun olarak görülmüştür.

2. MATERYAL METOD

2.1. Hücre Soylarının Kültürü

Bu tez çalışmasında kullanılan akut lenfoblastik lösemi (ALL) hücre soyları (bkz. Tablo 2.1) güvenilir hücre soyu koleksiyonlarından temin edilmiştir (ATCC veya DSMZ). RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) besiyeri (Sigma-Aldrich) ile %10 (hacmen) fetal buzağı serumu ve %1 (hacmen) 100X penisilin/streptomisin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) kullanılarak uygun hücre kültürü kaplarında ve inkübatör içerisinde (%5 CO₂ (Karbondiyoksit), 37°C) kültüre edilmiştir. Bunun için -80°C'de saklanan hücreler hızlıca çözündürülerek 5 ml besiyerinde, 1200 rpm (dakikadaki devir sayısı)'de 5 dakika olacak şekilde iki defa yıkandı. Yıkamanın ardından T75 (75cm² taban yüzey alanlı) flasklara 15 ml besiyeri içerisinde hücrelerin ekimi yapıldı. Gün aşırı hücrelerin durumu ve besiyeri kontrolü yapıldı. Bu hücre paneli, bahsedilen anti-kanser ilacının test edilmesi için uygundur. Çalışmada kullanılan *TP53* mutant ALL hücre soyları, literatürde sıklıkla mutasyona uğradığı bildirilen ve DNA bağlanma bölgesini içine alan bölgede nokta mutasyonlar taşımaktadır (Joerger vd., 2007). Seçilen hücre paneli p53 moleküler mekanizması ile ilişkili anti-kanser ilaçlarının test edilmesi için uygundur. MDM2 inhibitörleri, yabani tip p53 proteinine sahip hücrelerde sitotoksikite gösterdiği için (Lane vd., 1997; Vassilev, 2007) mutant hücre soyları kontrol olarak kullanılmış, böylece tedavinin hedefe yönelik özgünlüğü ve *TP53* gen durumuna bağlı olup olmadığı da gösterilmiştir. Besiyerindeki renk değişimi göz önüne alınarak yeterli yoğunluğa ulaşan hücreler pasajlanmak üzere toplandı. Toplanan hücreler 1200 rpm'de 5 dakika çöktürülerek üzerlerindeki besiyerleri atılıp, hücre yoğunluğuna göre 5-10 ml taze besiyerinde çözüldü. Hücre yoğunluğuna göre bir miktar hücre tekrar taze besiyeriyle seyreltilerek hemositometre (Neubauer improved) ile sayım yapıldı. Sayım sonucuna göre gerekli hesaplamalar yapılarak (Formül 1) gerekli miktarda hücreler son hacim 15 ml besiyeri olacak şekilde yeni flasklara ekildi.

Formül 1.

Hücre sayısı (hücre/ml) = (4 alanda sayılan hücre sayısı/4) X Dilüsyon faktörü X 10⁴

2.2. İnhibitörün Hazırlanması

MDM2 inhibitörü olarak idasanutlin (RG7388) (Q. Ding, Zhang, vd., 2013) kullanıldı. Bu küçük molekül inhibitörün kimyasal formülü bilinmekte ve ticari olarak temin edilebilmektedir. Toz halde temin edilen RG7388 (Cayman Chemicals #21532) gerekli hesaplamalardan sonra dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözündürülerek 10 mM'lik stoklar

hazırlandı ve -20°C'de muhafaza edildi. Her deney öncesinde DMSO kullanılarak seri seyreltmeler ile farklı konsantrasyonlarda inhibitörler hazırlandı. DMSO'nun sitotoksik etkisini minimuma indirmek için besiyeri içerisindeki hacimsel oranı en fazla %0,5 olacak şekilde hücreler inhibitörle muamele edildi.

2.3. Sitotoksite Ölçüm Yöntemi

Pasajlamadaki gibi hücreler toplanarak sayımları yapıldıktan sonra gerekli hesaplamalar yapıldı. 10 ila 3000 nM arasında değişen konsantrasyonlarda DMSO ile hazırlanan ilaçlar hücrelere uygulandı. İlaç uygulamasında izlenen süreç şöyledir: Kuyucuk başına 100 µl ve 2,5 x 100.000 hücre/ml yoğunlukta olacak şekilde hücreler 96 kuyucuklu bir plakaya (Labselect) ekildi. Ekildikten 24 saat sonra ise hesaplamalardan elde edilen ilaç miktarları uygun kuyucuklara eklendi. Her hücre hattı için üç adet kuyucuğa karşılaştırma yapmak için ilaç içermeyen DMSO eklendi (DMSO kontrol). Ayrıca üç adet kuyucuk da boş kontrol olarak kullanılması için sadece besiyeri ile muamele edildi. 72 saat sonra DMSO kontrolüne göre büyüme inhibisyonunu değerlendirmek için XTT Test Kiti (Cayman Chemical Company, MI, ABD) kullanıldı. XTT testi, hücre canlılığını metabolik olarak ölçmek için kullanılan bir test türüdür. Sağlıklı hücrelerde, XTT mitokondriyal enzimler tarafından turuncu bir formazan boyasına dönüştürülür. Daha sonra 450 nanometrede tespit edilen bağıl emilim, canlı hücre sayısını tahmin etmek için kullanıldı. Bu yöntemin hücre sabitleme, geçirgenleştirme veya ikincil tespit yöntemleri gerektirmemesi ve analizden sonra hücrelerin daha fazla incelenmesini sağlaması nedeniyle süspanse hücre hatları için oldukça avantajlı bir hücre canlılığı ölçme yöntemidir (Scudiero vd., 1988). Kitteki kılavuz kullanılarak uygun miktarda XTT solüsyonu hazırlanıp, gerekli miktarlar kuyucuklara dağıtıldı. Hazırlanan plakalar 4 saat boyunca %5 CO₂'de ve 37°C'de inkübasyon için bekletildi. Sonrasında 450 nm (nanometre) de absorbans ölçümü 96 kuyulu plaka okuyucu cihaz (Thermo Scientific) kullanılarak yapıldı.

2.4. Protein İmmünoblot Analizi (Western Blotlama)

Hücreler 1x10⁶ hücre/ml olacak şekilde 6 kuyulu plaklara (Labselect) 2 ml besiyeri içerisine ekildi ve seçilen dozlarda (15 nM, 50 nM, 150 nM ve 500 nM) inhibitörlerle muamele edildi. 24 saat sonrasında tüm örnekler ayrı ayrı ependorflara alındı. Örnekler, 4°C'de ve 2500 rpm'de santrifüjlenerek süpernatantları atıldı. Üzerlerine 50 µl liziz tamponu (Takara #635656) eklenerek vortekslenmiş ve lizatlar oda ısısında 10 dakika bekletilmiştir. 4°C'de ve 12.000 rpm'de tekrar santrifüjlenen lizatların süpernatantları western blotlama için

kullanılmak üzere yeni ependorlara toplanarak -20°C'ye kaldırıldı. Protein konsantrasyonları BCA protein test kiti (Takara #T9300A) kullanılarak ölçüldü.

Eşit miktarlarda protein %4-20'lik SDS (sodyum dodesil sülfat)-poliakrilamid jellere (Biorad Mini-PROTEAN Tetra Cell #1658001) yüklenerek proteinlerin jelde ayrımı sağlandı. Jelde moleküler ağırlıklarına göre ayrılan proteinler PVDF (Poliviniliden florür) membranlara (Biorad #1620177) aktarıldı. (Transkripsiyonun ilk sinyal dönüştürücüsü ve aktivatörü 3) primer antikorları ve sekonder tayin reaktifi olarak anti-mause ve anti-rabbit antikorları kullanıldı. Proteinler, geliştirilmiş kemilüminesans (ECL) (Biorad Clarity Western ECL #1705060) reaktifleri ve uygun deteksiyon platformu kullanılarak görüntülendi.

Protein lizatlarının jelde yürütülmesinde şu adımlar izlenmiştir; BCA protein test kiti ile hesaplanan protein konsantrasyonları, gerekli SDS/tris/glicine solüsyonu ve distile su ile birlikte ependorflara eklenildi. Proteinlerin lineer hale gelmesi için ependorf tüpler ısı bloğunda 95°C'de 10 dakika tutuldu. Ardından tüp içerisinde buharlaşan ve tüp çeperlerine dağılan karışımı dipte toplamak için 10 saniye santrifüj işlemi yapıldı. Örnekler yüklenmeden önce yürütme tamponu (running buffer) saf su ile 10X'ten 1X'e seyreltildi. Yürütme tamponunun içeriği; 0,5 molar (M) 13,11gr tris (200 ml saf suda ve pH'sı 6,8'e ayarlanmış olarak hazırlanmış), 0,5 M 0,2 ml pH'sı 6,8 ayarlanarak hazırlanmış tris, 0,4 gr SDS, 1 ml beta-merkaptoetanol, 2 ml gliserol, 1 ml % 0,1'lik bromofenol mavi ve 13,5 ml saf sudan oluşmaktadır. Daha öncesinde hazır olarak temin edilen yükleme jeli tank içerisine yerleştirildi. Ardından western tankı seyreltilen yürütme tamponu ile dolduruldu. Temin edilen uygun marker (Precision plus proteinTM Standards #161-0374) ve hazır halde bulunan örnekler tank içerisindeki jele belirli sırayla yüklenildi. 180 voltta 45 dakika yürütme işlemi gerçekleştirildi.

Yürütme işleminin ardından sırasıyla siyah sünger, filtre kağıdı, jel, etanolle aktifleştirilmiş PVDF membran, tekrar filtre kağıdı ve son olarak kırmızı sünger konularak sandviç şekli verildi (Siyah negatifi, kırmızı pozitifini temsil eder). Membran etanolle aktifleştirildikten sonra transfer tamponu ile yıkandı. Ayrıca sandviç oluşturmak için kullanılacak diğer tüm malzemeler hazırlanmadan önce transfer tamponu içinde bekletildi. Transfer tamponu hazırlamak için; 3 gram (gr) tris, 14,14 gr glisin, 200 mililitre (ml) metanol ve gerekli miktarda saf su kullanıldı. Transfer için kullanılacak tankın içi 1X transfer tamponu ile dolduruldu. Yönlere dikkat edilerek hazırlanan sandviç tanka yerleştirildi. 100 voltta 30 dakika transfer işlemi gerçekleştirildi.

Transferden sonra %5'lik süt tozu (1gr süt tozuna 20 ml TBS (Tris tamponlu tuzlu su) tween konularak hazırlandı. TBS-tween ise; 10X'lik TBS, saf su ile 1X'e seyreltildi ve litresine 1 ml olacak şekilde tween20 eklendi. Transfer işlemi tamamlanan membran hazırlanan süt tozu solüsyonu bulunan kapta ve yatay çalkalayıcı platform üzerinde 110 rpm'de 45 dakika olacak bloklandı. Bu işlem devam ederken antikorlarımız (anti-PARP (CST #46D11), anti-PUMA (CST #D30C10), anti-p53 (DO-7, CST), anti-p21 (CST #12D1), anti-aktin (Sigma)ve anti-MDM2) önceden hazırlanan %5'lik süt tozu solüsyonuyla 1/1000 olacak şekilde gerekli miktarda hazırlandı. Çalkalayıcıdan alınan membran belirlenen yerlerden kesilerek, önce hazırlanan PARP ve PUMA falkonları içerisine, transfer yapılan kısım falkon duvarına gelmeyecek şekilde yerleştirildi. Falkonlar, tüp çevirici cihaza (tube roller) yerleştirildi ve bir gece boyunca buzdolabı içerisinde (+4°C) inkübasyona bırakıldı. Bu işlemin sonrasında alınan membranlar 5'er dakika olacak şekilde 4 kez 1X TBS-tween20 ile yıkandı. Birincil (primer) antikorlardan tavşan kökenli olanlar anti-rabbit ikincil (sekonder) antikor, fare kökenli olanlar anti-mouse ikincil antikor ile %5'lik süt tozu solüsyonunda 1/2000 (1 hacim ikincil antikor, 2000 hacim %5'lik süt tozu) oranında ikincil antikorla inkübe edildi. Bunun için, birincil antikorlama sonrası yıkaması yapılan membranlar uygun bir kapta hazırlanan ikincil antikorlarla 60 dakika yatay çalkalayıcıda tutuldu. Bu işlem sonunda alınan membranlar tekrar 5 kez 1X TBS tween ile yıkandı. Yıkamadan alınan membranlar gerekli miktarda ve 1:1 oranında hazırlanan ECL solüsyon karışımı (Biorad Clarity Western ECL #1705060) ile karanlık bir ortamda birkaç dakika muamele edilerek fotoğraflamalar yapıldı. Fotoğraflama işlemi için 2D jel görüntüleme platformu (Syngene G:Box System) kullanıldı. Fotoğraflamadan sonra membranlar %5'lik süt tozu ile bir saat kadar bloklandı. Ardından p53, MDM2 ve p21 primer antikorları ile aynı işlemler yapılarak tekrar fotoğraflamalar yapıldı. Sekonder antikorla muamele aşamasında p53 primer antikoru mause olduğu için, ona ayrı olarak 1/2000 olacak şekilde anti- mause sekonder antikor hazırlandı. %5'lik süt tozu ile bir saat kadar tekrar bloklanan membranlar son primer antikor olan aktin ile aynı işlemler tekrarlanarak fotoğraflandı. Sadece p53 antikoru mause olarak kullanıldı.

2.5. Akım Sitometrisi

Akım sitometrisi tekniği, hücrelerin süspansiyon halinde bir akış kanalı boyunca tek tek geçmesi ve bu sırada hücre büyüklüğü ve granülaritelerine göre sınıflandırılması esasına dayanan bir tekniktir. Hücre yaşam döngüsünün farklı fazlarındaki (G1, S ve G2/M) hücrelerin yüzdesel dağılımları belirlenebilmekte veya fraksiyonel DNA içeriği olan apoptotik hücrelerin saptanması mümkün olmaktadır. Apoptoz veya diğer adıyla programlanmış hücre

ölümü, hücre büyümesi ve çoğalmasının önemli ve aktif bir düzenleyici yoludur. Hücreler, dışarıdan bir etki ile indüklenen spesifik sinyaller sonucunda karakteristik fizyolojik değişiklikler geçirirler. Apoptoz sırasında, normal sağlıklı hücrelerde hücre zarının iç kısmına lokalize olmuş fosfatidilserinler (PS) hücre zarının dışa bakan kısmına yönelir. Membran bütünlüğünün kaybı ise apoptozun son aşamalarında gerçekleşir. Annexin-V, kalsiyuma bağımlı bir maddedir ve PS'ye yüksek afiniteye sahiptir. Apoptotik yolun başlarında PS molekülleri, Annexin-V'in bulunduğu hücre zarının dış yüzeyine doğru yer değiştirir. Muse® Annexin-V ve ölü hücre testi, apoptotik hücrelerin dış membranındaki PS'yi tespit etmek için Annexin-V'i kullanır. Ölü hücre belirteci olarak ise hücre zarı yapısal bütünlüğünün bir göstergesi olarak 7-aminoaktinomisin D (7-AAD)'yi kullanır. Bu testte dört hücre popülasyonu ayırt edilebilir:

- apoptotik olmayan hücreler: Annexin V (-) ve 7-AAD (-)
- erken apoptotik hücreler: Annexin V (+) ve 7-AAD (-)
- geç aşama apoptotik ve ölü hücreler: Annexin V (+) ve 7-AAD (+)
- çoğunlukla nükleer enkaz: Annexin V (-) ve 7-AAD (+)

Akım sitometrisi analizinde şu yol izlenmiştir:

5×10^5 hücre/ml, 6 kuyulu plakta kuyu başına 2 ml tam besiyeri içerisinde ekildi. Ertesi gün (24 saat sonra) RG7388 eklendi ve 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saatlik inkübasyonu takiben hücreler iki kez $+4^\circ\text{C}$ Dulbecco's fosfat tampon çözeltisi (D-PBS) (Serox #SRX-0615) ile yıkandı. Son olarak 0,5 ml soğuk D-PBS içerisinde süspanse edilen hücreler analiz edileceği yere buz içerisinde transfer edildi. Canlı hücre, erken/geç apoptotik hücre ve hücre ölümünün kantitatif analizi için Muse® Annexin-V ve ölü hücre kiti (Cytex #MCH100105) kullanıldı. Kitin tavsiye edilen boyama ve analiz protokolü aynen takip edildi ve analizler Eskişehir Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde yer alan Guava® Muse® hücre analiz cihazı ile gerçekleştirildi. Her bir numune için en az 50.000 hücre analiz edildi.

2.6. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi ve grafiklerin oluşturulması için GraphPad Prism programı kullanıldı. İlgili kısımlarda aksi belirtilmedikçe, istatistiksel karşılaştırmalar için eşlenmiş veya eşlenmemiş t-testi kullanıldı. Her bir bağımsız değişken aynı deney seti içerisinde en az üçer kez tekrar edildi. Ayrıca tüm deneyler en az üç defa bağımsız olarak tekrarlandı. Veriler "ortalama $\pm$ standart hata" veya "ortalama $\pm$ standart sapma" olarak

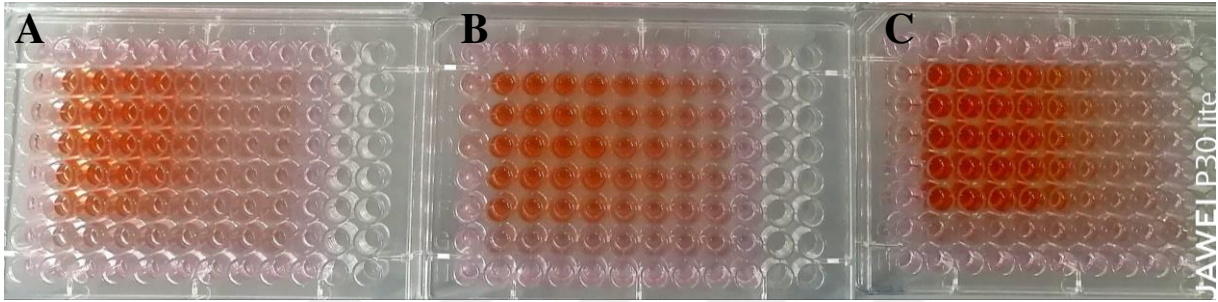
sunuldu. 0.05'ten küçük p değerleri %95 güven düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi ($p > 0.05$ ise anlamlı değil; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$).



3. BULGULAR

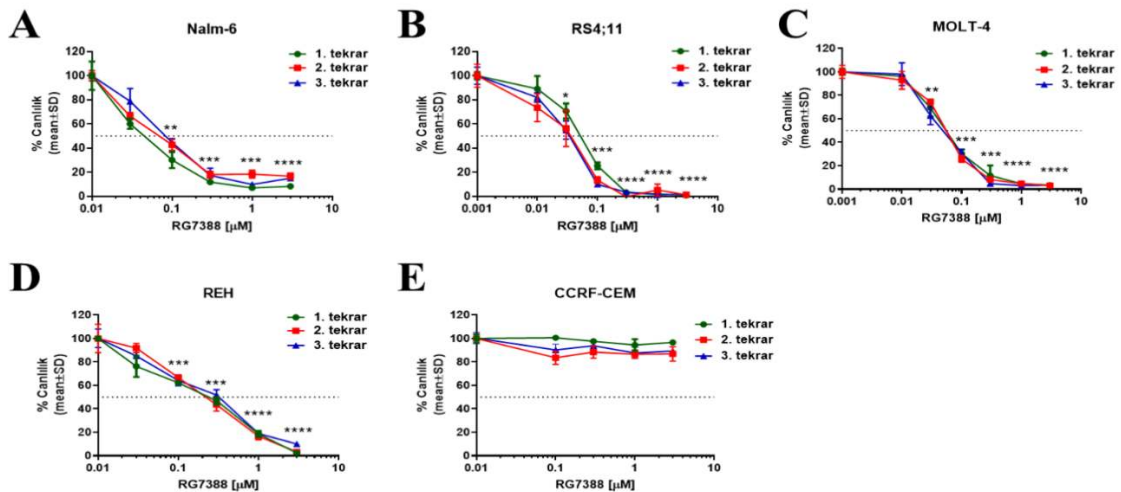
3.1. RG7388, ALL hücrelerinde doza bağlı büyüme inhibisyonunu indükledi

Beş farklı ALL hücre hattı, MDM2 inhibitörü RG7388'in artan konsantrasyonlarına (0 ila 3000 nM arası) maruz bırakıldı. Hücrelerin göreceli büyümesini ölçmek için bir XTT testi kullanıldı. Şekil 3.1, 72 saat boyunca RG7388'in artan dozlarına maruz bırakılan ALL hücre hatları için büyüme inhibisyonunun renge göre değişimini gösteren örnek bir plate görüntüsüdür. Üç ALL hücre hattında (A:RS4;11; B:REH; C:MOLT4) her bir 96 kuyucuklu plakanın kendi içinde soldan sağa doğru konsantrasyon artışına bağlı renk değişimi yani hücre canlılığında azalma görülmektedir.



Şekil 3.1. 96 kuyucuklu tabakalarda RS4;11 (A), REH (B) ve MOLT4 (C) hücre hatlarının ilaç konsantrasyonunda artışa bağlı hücre canlılıklarındaki düşüşün görüntüsü. Renk yoğunluğundaki azalma Metabolik aktivitedeki azalmayı göstermektedir.

Şekil 3.2, 72 saat boyunca RG7388'e maruz bırakılan ALL hücre hatları için büyüme inhibisyon eğrilerini göstermektedir. Beş ALL hücre hattından dördü (Şekil 3.2A-D), diğer hücre hattı CCRF-CEM'e (Şekil 3.2E) kıyasla MDM2 inhibitörüne karşı duyarlıydı ($IC_{50} \leq 346$ nM).

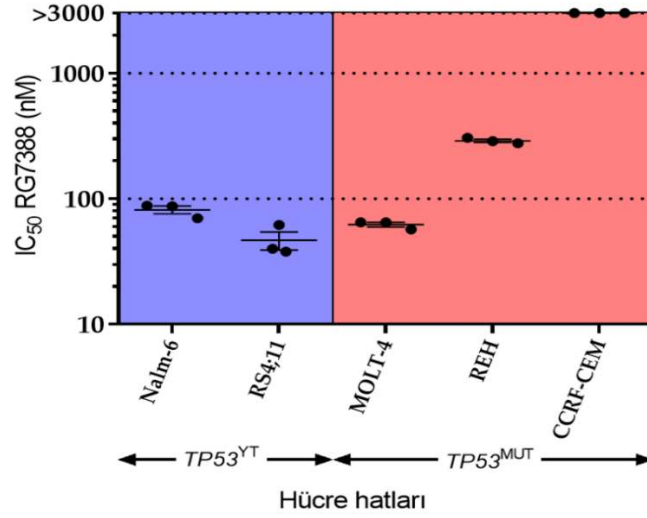


Şekil 3.2. RG7388'in ALL hücrelerinin çoğalmasında üzerindeki konsantrasyona bağlı etkisi. (A) Nalm-6, (B) RS4;11, (C) MOLT-4, (D) REH ve (E) CCRF-CEM. Grafikler üzerindeki herbir çizgi bağımsız bir tekrar gösterir (1. tekrar: yeşil, 2. tekrar: kırmızı ve 3. tekrar: mavi). Hata barları ortalama $\pm$ SD'yi gösterir. Yıldızlar, DMSO kontrolüne kıyasla ilacın her dozda hücre ölümüne ne kadar anlamlı baskıladığını gösterir (n=3 bağımsız tekrar için eşleştirilmiş t-testi uygulandı. *, p< 0,05; **, p< 0,01; ***, p< 0,001; ****, p< 0,0001).

RG7388, 3 μ M'e kadar olan konsantrasyonlarda dahi *TP53* çift mutant CCRF-CEM hücreleri üzerinde anlamlı bir etki göstermedi (Şekil 3.2E ve Şekil 3.3). Tablo 3.1, bu çalışmada kullanılan tüm ALL hücre hatlarında *TP53* gen durumunu ve RG7388 IC_{50} değerlerini özetlemektedir. *TP53* genindeki heterozigot c.541C>T mutasyonunu taşıyan REH hücre hattı, diğer duyarlı hücrelerle karşılaştırıldığında nispeten daha yüksek bir IC_{50} değerine sahipti (Nalm-6 IC_{50} =82 $\pm$ 6 nM vs. REH IC_{50} =289 $\pm$ 9) nM; eşleştirilmemiş t-testi, p=0,0022). Bu artışa rağmen mutant p53 REH ilaca duyarlı aralıkta kalmaktadır (Zanjirband vd., 2023), bu da tedaviye hala yanıt verdiğini göstermektedir.

Tablo 3.1. ALL hücre soyu paneli için RG7388'in ortalama IC_{50} konsantrasyonları $\pm$ ortalamanın standart hatası (SEM).

Hücre soyu	Hücre tipi	* <i>TP53</i>	**RG7388 (nM)
Nalm-6	B-ALL	YT	82 $\pm$ 6
RS4;11	B-ALL	YT	47 $\pm$ 8
MOLT-4	T-ALL	Anlamsız mutasyon (heterozigot) <u>c.916C>T;p.R306*</u>	52 $\pm$ 11
REH	B-ALL	Yanlış anlamlı mutasyon (heterozigot) <u>c.541C>T;p.R181C</u>	346 $\pm$ 38
CCRF-CEM	T-ALL	Yanlış anlamlı mutasyonlar (Heterozigot) c.524G>A;p.R175H c.43G>A;p.R248Q	>3000
*<i>TP53</i> gen mutasyon durumları, IARC <i>TP53</i> (//p53.iarc.fr/) ve COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) veri tabanlarından alınmıştır. **IC_{50} değerleri, en az 3 bağımsız tekrarın ortalamasını ve $\pm$ ortalamanın standart hatasını (SEM) göstermektedir. YT:yabani tip nM:nanomolar ALL: akut lenfoblastik lösemi			

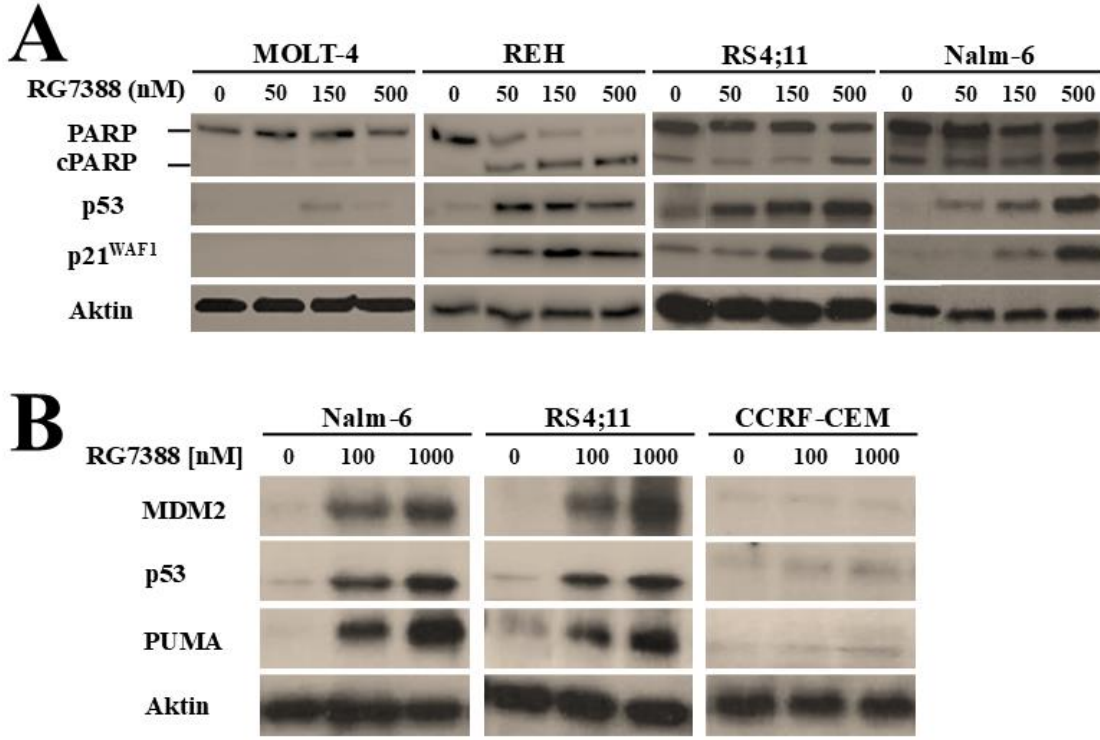


Şekil 3.3. Tüm hücre soyları için RG7388'in özet IC_{50} değerleri. $TP53^{YT}$ ve $TP53^{MUT}$ hücrelere ilişkin sonuçlar sırasıyla mavi ve kırmızı bölümlerde gösterilmektedir. Her nokta bağımsız bir tekrarı gösterir. Çubuklar ortalama $\pm$ SEM'yi gösterir.

3.2. RG7388'e yanıt olarak yabani tip $TP53$ ALL hücre hatlarında p53 yolunun fonksiyonel aktivasyonu

p53 proteininin stabilizasyonunu ve hücre döngüsünün durdurulması ve apoptozda yer alan aşağı yöndeki hedef genlerin ekspresyonunu değerlendirmek için western blot analizi kullanıldı. RG7388 ile tedavinin ardından, vahşi tip $TP53$ durumuna sahip olduğu bilinen Nalm-6 ve RS4;11 hücre hatlarında p53 proteininin konsantrasyona bağlı stabilizasyonu gözlemlendi. Bu stabilizasyona, hücre döngüsünün durdurulmasında yer alan p53'ün iyi bilinen bir aşağı akış hedefi olan p21^{WAF1} protein seviyelerinde bir artış eşlik etti (Şekil 3.4.A). RG7388 tedavisi, p53 vahşi tip hücrelerde MDM2 protein seviyelerinin konsantrasyona bağlı bir şekilde yukarı regüle edilmesiyle sonuçlandı (Şekil 3.4.B). Tersine, $TP53$ -mutant hücre hattı CCRF-CEM'de RG7388, p53'ün stabilizasyonunu veya MDM2'nin yukarı regülasyonunu indüklemedi (Şekil 3.4.B). MOLT-4 hücrelerinde fonksiyonel p53 aktivasyonuna herhangi bir kanıt görülmedi (Şekil 3.4.A). Fonksiyonel olarak, Nalm-6 ve RS4;11 hücrelerinde RG7388 ile indüklenen p53 aktivasyonu, pro-apoptotik protein PUMA'nın (apoptozun p53 ile yukarı regüle edilmiş modülatörü) yukarı regülasyonu ile kanıtlandığı gibi, apoptotik yolların indüksiyonu ile ilişkilendirilmiştir (Şekil 3.4.B). Ek olarak, mutasyona rağmen REH hücreleri, p53 aktivasyonu ve p21^{WAF1} yukarı regülasyonu

sergiledi; bu spesifik mutasyonun hala ilaca yanıt vermeye izin verdiğini ve klinik öneme sahip olduğunu gösterebilir (Şekil 3.4.A).

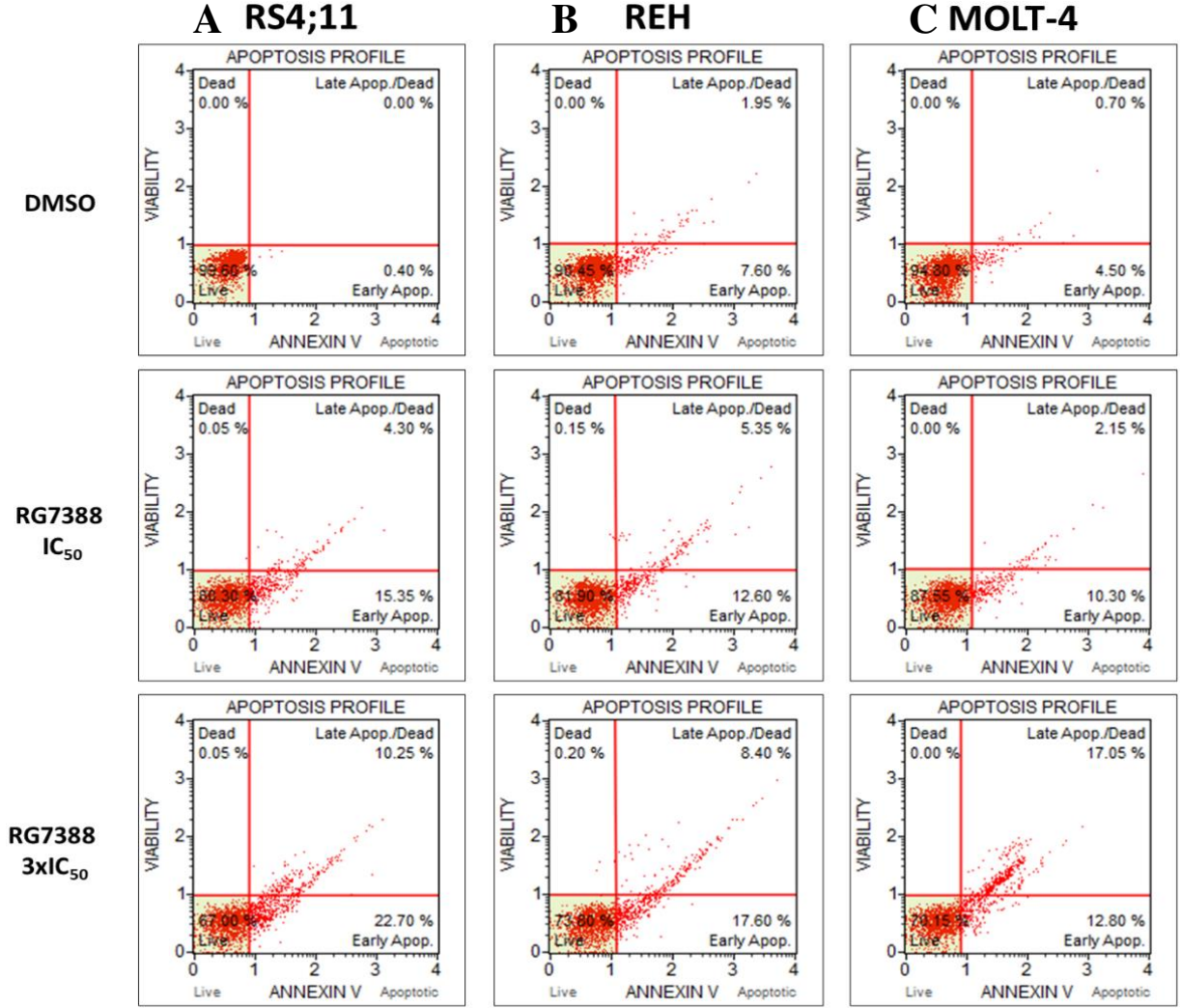


Şekil 3.4. ALL hücrelerinin RG7388 uygulaması sonrası Western blotlama görüntüleri. (A) MOLT-4, REH, RS4;11 ve Nalm-6 hücreleri, 24 saat süresince farklı konsantrasyonlarda (0, 50, 150 ve 500nM) RG7388 ile muamele edildi. p53 stabilizasyonu ve p21^{WAF1} ekspresyonuna bakıldı. Tam boyutlu PARP'taki azalma ve cPARP'taki artış apoptozla ilişkilendirilebilir. Aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Nalm-6, RS4;11 ve CCRF-CEM hücreleri, 24 saat süresince farklı konsantrasyonlarda (0, 100 ve 1000nM) RG7388 ile muamele edildi. p53 stabilizasyonu, PUMA ve MDM2 ekspresyonuna bakıldı. Aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı.

3.3. ALL hücrelerinde RG7388 (Idasonutlin) uygulaması erken ve geç apoptotik hücrelerin oranını arttırdı

ALL hücrelerinin 24 saat boyunca 1xIC₅₀ RG7388 ve 3xIC₅₀ RG7388 ile muamele edilmesi, apoptotik hücre sayısının (erken+geç apoptotik) artışına ve canlı hücre popülasyonunun anlamlı bir şekilde azalmasına neden oldu. Test edilen hücre hatlarındaki toplam apoptotik hücre yüzdesi, RG7388 1xIC₅₀'ye kıyasla RG7388 3xIC₅₀'de yaklaşık iki katlık bir artış gösterdi (Şekil 3.6). DMSO kontrolüne göre apoptotik hücrelerin (erken+geç) toplam hücre popülasyonlarına oranında 24 saatlik RG7388 tedavisinin ardından bir artış

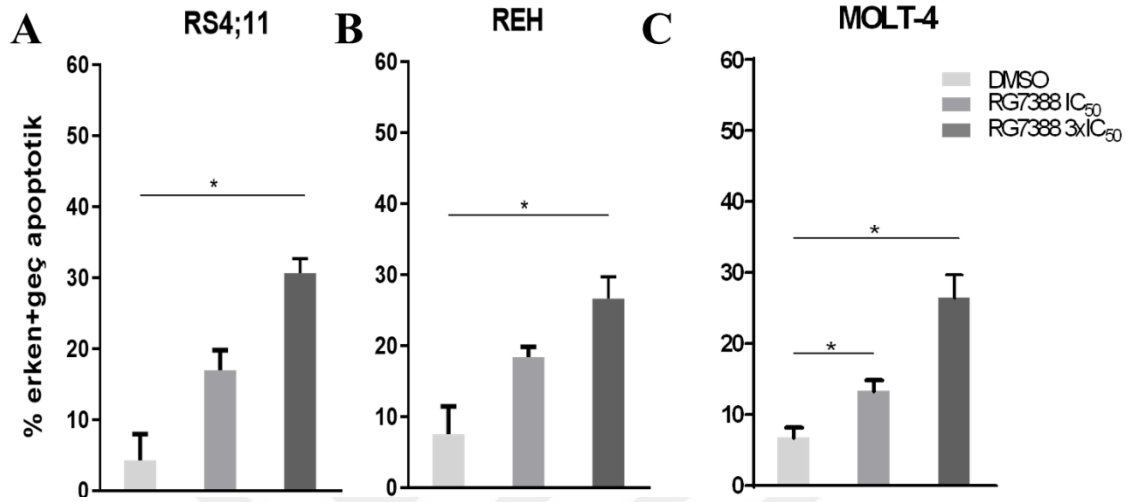
olduğu görüldü (Şekil 3.6). Annexin V/PI analizi ile ölçüldüğü üzere, ALL hücrelerinde gözlemlenen canlılıktaki bu azalma ve apoptotik hücrelerdeki artış, XTT hücre canlılığı testinde elde edilen sonuçlarla paralel olarak ilerlediği görülmektedir (Şekil 3.2 ve Şekil3.5). Tüm bu sonuçlar RG7388'in ALL tedavisinde kullanılmasının ve RG7388'in daha ayrıntılı araştırılmasının oldukça önem arz ettiğini göstermektedir.



Şekil 3.5. RS4;11(A), REH(B) ve MOLT-4(C) hücrelerinde erken apoptotik ve geç apoptotik/nekrotik hücrelerin AnneksinV /PI boyama yoluyla tespiti.

Hücreler 24 saat boyunca 1xIC₅₀ RG7388 ve 3xIC₅₀ RG7388 ile muamele edilmiş ve apoptotik hücre yüzdeleri Guava® Muse® hücre analiz cihazı ile analiz edilmiştir. 24 saatlik RG7388 tedavisinden sonra canlı hücrelerin oranında önemli bir azalma gözlemlendi. Canlı hücrelerin normalleştirilmiş yüzdeleri, RG7388 IC₅₀'ye kıyasla RG7388 3xIC₅₀ yaklaşık iki kat daha fazla artış gösterdi (Şekil 3.6). DMSO kontrolüne göre erken ve geç apoptotik hücre

oranları 24 saatlik RG7388 tedavisinin ardından anlamlı bir şekilde arttı (Şekil 3.6). Annexin V/PI boyamanın analizi ile ölçüldüğü üzere, ALL hücrelerinde gözlemlenen canlılıktaki bu azalma, XTT hücre canlılığı testinde elde edilen sonuçlarla güçlü bir pozitif korelasyon gösterdi.



Şekil 3.6. RS4;11, REH ve MOLT-4 hücrelerinde erken apoptotik ve geç apoptotik/nekrotik hücrelerin yüzdesel toplamının ilaç uygulamasına bağlı değişimleri. ALL hücreleri (A) RS4;11, (B) REH ve (C) MOLT-4, her bir hücre soyunun kendisi için karşılık gelen 1xIC₅₀ RG7388 veya 3xIC₅₀ RG7388 ile ayrı ayrı 24 saat inkübe edildi. Erken ve geç apoptotik hücre yüzdeleri, Annexin-V/PI boyama sonrasında akım sitometrisi tekniğiyle ölçüldü. Örnekler arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farklar, eşleştirilmiş t-testi (*p<0,05) ile analiz edildi.

4. TARTIŞMA

Bu tez çalışması, ikinci nesil bir MDM2 inhibitörü ve Nutlin ailesinin bir türevi olan RG7388'in, değişen *TP53* gen durumuna sahip ALL hücrelerini hedeflemedeki etkinliğini ve mekanizmalarını araştırdı. Elde ettiğimiz bulgular, RG7388'in MDM2-p53 interaksiyonunun yeni nesil bir küçük molekül inhibitörü olarak ALL tedavisindeki potansiyel katkısına ışık tutarak p53 yolu aktivasyonu ve apoptotik indüksiyon üzerindeki genotipe özgü etkileri hakkında fikir verdi. Hücre proliferasyonu ve canlılık analizi, ALL hücre hatları arasında RG7388'e karşı farklı hassasiyet profilleri ortaya çıkardı. Çalışmada ALL hücre modeli olarak tercih edilen beş hücre hattından dördü, RG7388'e karşı nanomolar seviyelerinde IC_{50} değerleriyle yüksek hassasiyet sergiledi. Bu da bize MDM2 inhibisyonuna yanıt olarak güçlü büyüme inhibisyonunu işaret etmektedir. Buna karşılık, *TP53* geninde iki farklı nokta mutasyon içeren CCRF-CEM hücre hattı direnç sergileyerek ($IC_{50} > 3 \mu M$) RG7388 uygulamasının gen durumuna bağlı özgünlüğünü ortaya koymaktadır.

MOLT-4 hücreleri, *TP53* geninde erken durdurma kodonuna (p.R306*) neden olan bir mutasyona sahiptir. Bu, p53 proteinini keser ve muhtemelen proteinin fonksiyon kaybına yol açar. Mutasyon, p53'ün nükleer lokalizasyon bölgesinde (Harms vd., 2006), özellikle ekzon 8'de yer almaktadır. Bu hücrelere ait western blot sonuçlarına göre fonksiyonel p53'e dair hiçbir kanıt tespit edilemedi (Şekil 3.4A). Bununla birlikte, bu hücrelerde MDM2 baskılamasına karşı hassas yanıt, RG7388'in, p53'ten bağımsız alternatif yollar yoluyla hücre büyümesini baskıladığını göstermektedir. MDM2 en iyi p53'ün birincil negatif düzenleyicisi olarak bilinmesine rağmen, artan sayıda kanıt MDM2'nin p53 aktivasyonunu modüle etmedeki rolünden bağımsız bir dizi fonksiyona sahip olduğunu göstermektedir (Bohlman vd., 2014; Thomasova vd., 2012).

REH hücre çizgisi, ekson 5 tarafından kodlanan DNA bağlama alanında (DNA binding domain veya kısaca DBD) bulunan p53 proteini içindeki 181. pozisyonunda arjinin-sistein ikamesi ile sonuçlanan bir *TP53* mutasyonunu barındırır. Bu mutasyona rağmen REH hücreleri, *TP53* yabani tip hücre hatlarıyla karşılaştırıldığında biraz daha yüksek bir IC_{50} 'ye sahip olsa da MDM2 inhibitörü RG7388'e karşı duyarlılık sergiledi (Şekil 3.3). Western blot analizi, RG7388'in p53'ü stabilize ettiğini ve REH hücrelerinde transkripsiyonel hedefi p21^{WAF1}'in ekspresyonunu arttırdığını ortaya koydu (Şekil 3.4A). Bu da bize, *TP53* mutasyonunun varlığına rağmen test edilen inhibitöre spesifik bir tepki verildiğini göstermektedir. Diğer bir ifadeyle, REH hücrelerinde mutasyona uğramış p53'ün bile RG7388 tarafından hedeflenebilecek fonksiyonel aktivitesini korumaktadır (Sabapathy vd., 2018).

CCRF-CEM hücreleri, *TP53*'te iki yanlış anlamlı mutasyon taşır. c.524G>A mutasyonu, 175. pozisyonundaki (ekzon 5) arjinin yerine histidin koyar ve c.743G>A mutasyonu, 248. pozisyonundaki (ekson 7) arjinini glutamin ile değiştirir. Her iki mutasyon da sıcak nokta mutasyonlarıdır ve p53'ün DBD'sinde bulunur (Sabapathy vd., 2018). Bu alandaki mutasyonlar, p53'ün spesifik DNA dizilerine bağlanma yeteneğini bozabilir ve dolayısıyla onun transkripsiyonel aktivitesini etkileyebilir (Sabapathy vd., 2018). Sonuçlarımız CCRF-CEM hücrelerinin RG7388'e karşı oldukça dirençli olduğunu gösterdi (Şekil 3.2E). Yakın zamanda yayınlanan bir çalışmayla tutarlı olarak bu mutasyonlar muhtemelen DNA bağlama kapasitesinin kaybı veya diğer düzenleyicilerle etkileşimin bozulması yoluyla p53 fonksiyonunu ciddi şekilde bozmaktadır (Zanjirband vd., 2023). Özetle, bu hücre hatlarında RG7388'e duyarlılık veya direnç, özellikle bu mutasyonların p53 proteininin DNA bağlanma alanı içindeki konumu göz önüne alındığında, barındırdıkları *TP53* mutasyonlarının fonksiyonel sonuçlarıyla ilişkilidir (Kato vd., 2003). Bu çalışmada kullanılan hücre modelleri göz önüne alındığında, p.R306* gibi erken durdurma kodonu mutasyonu p53'ün fonksiyonelliğini bir miktar koruyabilirken p.R175H ve p.R248Q gibi yanlış anlamlı mutasyonlar, p53 fonksiyonunun bozulması nedeniyle ciddi ilaç direncine yol açabilir.

RG7388, MDM2-p53 etkileşimini bozarak hem *TP53* yabancı tipte (Nalm-6 ve RS4;11) hem de mutant (REH) ALL hücrelerinde p53 stabilizasyonuna ve aktivasyonuna yol açtı (Şekil 3.4A). Bu aktivasyon, hücre döngüsü ilerlemesini düzenleyen p21^{WAF1} (Engeland, 2022) transkripsiyonunu indükledi (Şekil 3.4A). RG7388 aynı zamanda oto düzenleyici bir geri besleme döngüsü nedeniyle *TP53* vahşi tip hücrelerde (Şekil 3.4B) MDM2 seviyelerini konsantrasyona bağlı bir şekilde yukarı regüle etti (D. Wu vd., 2018). PUMA'nın indüksiyonu ve PARP-1'in kaspazlar tarafından kesilerek cPARP'a dönüşmesi, RG7388'in *TP53* vahşi tip ALL hücrelerinde p53 aracılı mekanizmalar yoluyla apoptotik hücre ölümünü indüklemeye yeteneğini desteklemektedir. MOLT-4 hücreleri ise fonksiyonel p53 aktivasyonu sergilemedi (Şekil 3.4A), bu da potansiyel diğer düzenleyici mekanizmaların veya translasyon sonrası modifikasyonların p53 işlevselliğini farklı şekilde etkileyebileceğini göstermektedir. İlginçtir ki, MOLT-4 hücreleri, Kanseri Sanger Veri Tabanı tarafından belirtildiği üzere, *SF3B1* geninde yanlış anlamlı mutasyonlar barındırır. Bu, bu hücrelerde p53 yolunu potansiyel olarak etkileyen protein varyantlarının (hatalı alternatif splicing varyantları) varlığını düşündürmektedir (Aptullahoglu vd., 2023). Bu, bu hücre hattının ilaca duyarlılığına rağmen western blot analizlerinde fonksiyonel p53 kanıtlarının bulunmamasını kısmen açıklayabilir. Bu alanda daha fazla araştırma yapılması oldukça değerli olabilir.

Yapılan çalışmada western blot analizlerinde kaspaz aktivitesindeki artış sonucunda, cPARP'larda artış olduğu düşünülmekte ve hücrelerin AnneksinV /PI boyama yoluyla tespiti sonucunda, apoptozda artış olduğu görülmektedir. Bu iki sonuç apoptoza teşviki göstermektedir. Ayrıca birbirini ve kullandığımız inhibitörü destekler niteliktedir. İnhibitörümüzün vahşi tip ve mutasyona sahip kanser hücre hatlarını apoptoza teşvik ettiği p53 stabilizasyonunu sağladığı görülmektedir. Bu sonuca bağlı olarak inhibitörümüzün spesifik olarak çalıştığı ve klinik olarak değere sahip olduğu söylenebilir. Proapoptotik bir protein olan PUMA'daki yukarı regülasyonuna bağlı olarak, MDM2'nin p53 proteinini aktive ederek p53'e bağlı proapoptotik proteinleri etkiliyor olabileceği düşünülmektedir. p53'ün aşağı akış hedefi olan ve kanserli hücrelerin hücre döngüsünü durmaya teşvik eden p21^{WAF1}'in RG7388 ile muamelesinden sonra, doza bağlı olarak artış gösterdiği görülmektedir. Buda bize ilacımızın kullanımıyla birlikte kanserli hücrelerin hücre döngüsünün durdurulması yoluyla da tedavi sağlandığını göstermektedir.

Bulgularımız, idasanutlin'in vahşi tip *TP53*'lü çeşitli kanser türlerinde etkinliğini gösteren önceki çalışmalarla tutarlı olup, bunun hedefe yönelik bir tedavi olarak potansiyelini vurgulamaktadır. İdasanutlin'in *TP53* vahşi tip ALL hücreleri için özgüllüğü, pediatrik ALL popülasyonları gibi *TP53* mutasyonlarının nadir olduğu ortamlarda potansiyel klinik faydasını ortaya koymaktadır (Holmfeldt vd., 2013; Zanjirband vd., 2023). Bu çalışma, p53'ü yeniden aktive etme ve kanser hücrelerinde apoptozu tetikleme stratejisi olarak MDM2 inhibisyonunu destekleyen giderek artan kanıtlara katkıda bulunmaktadır. Bu yaklaşım özellikle apoptozdan kaçışın standart tedavilere karşı direncin yaygın bir mekanizması olduğu hematolojik malignitelerde geçerlidir (Qian vd., 2022; Testa vd., 2007).

Gelecekteki klinik araştırmalar, idasanutlin'in *TP53* vahşi tip durumu doğrulanmış hasta popülasyonlarından elde edilecek primer örneklerdeki etkinlik ve güvenlik profillerinin doğrulanmasına odaklanmalıdır. Biyobelirteç çalışmaları, idasanutlin yanıtının öngörücü belirteçlerini belirlemek ve potansiyel olarak kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerini mümkün kılmak için çok önemlidir. Genomik ve moleküler profil oluşturma tekniklerinin entegrasyonu, idasanutlin tedavisinden en çok fayda görmesi muhtemel hastaların belirlenmesini kolaylaştırabilir. Ayrıca, idasanutlin'i standart kemoterapötik ajanlarla veya yeni hedefe yönelik tedavilerle birleştiren kombinasyon tedavileri (Aptullahoglu vd., 2023; Chamberlain vd., 2021), tedavi sonuçlarını geliştirmek ve direnç mekanizmalarını hafifletmek için yeni tedavi stratejileri sunabilir. Sinerjistik etkileri araştırmak ve toksisiteyi en aza

indirirken terapötik etkinliği en üst düzeye çıkaran dozlama rejimlerini optimize etmek için klinik öncesi modeller kullanılmalıdır.

Bu çalışma, RG7388'in farklı *TP53* durumlarına sahip ALL hücreleri hedefleme potansiyelini vurgulamıştır. Çalışmanın sınırlamaları arasında klinik doğrulamanın bulunmaması yer almaktadır. Bununla birlikte, çalışmanın güçlü yönleri, genotipe özgü tepkilerin kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesinde ve RG7388'in etkinliğini ve mekanizmasını değerlendirmek için çeşitli analizlerden yararlanan kapsamlı yaklaşımında açıkça görülmektedir. Bu bulgular, RG7388'in hedefe yönelik tedavi potansiyelini desteklemekte, gelecekteki daha ileri klinik öncesi ve klinik araştırmalar için bir temel oluşturmaktadır. Çalışmanın temel güçlü yönleri arasında RG7388'in farklı *TP53* mutasyonları üzerindeki etkilerinin ayrıntılı analizi yer almaktadır. REH hücreleri bir mutant p53 barındırır da RG7388'in neden olduğu büyüme inhibisyonuna karşı yanıt verdiler. Çalışmamız, kanser hücrelerinde p53 fonksiyonunu yeniden sağlama ve apoptozu teşvik etme stratejisi olarak MDM2 inhibisyonunu destekleyen artan kanıtlara katkıda bulunmaktadır. Gelecekteki araştırmalar, idasanutlin yanıtı için öngörücü biyobelirteçlerin belirlenmesine ve ALL ve diğer *TP53* vahşi tip kanserlerde sonuçları iyileştirmek için kombinasyon tedavilerinin optimize edilmesine odaklanmalıdır. Sonuç olarak, idasanutlin, *TP53* vahşi tip ALL'ye karşı yeni bir terapötik ajan olarak umut vaat etmekte ve klinik ortamlarda araştırmaya devam edilmesini önermektedir.

p53-MDM2 etkileşimleri, kanser tedavisini iyileştirme amacıyla büyük bir odak noktası oluşturur. MDM2, p53 aktivitesini translasyon sonrası düzeyde düzenler (Lai vd., 2001). Bu da, MDM2-p53 etkileşiminin inhibisyonunun, p53 aracılı yanıtları tetikleyebileceği anlamına gelir. Bu etkileşimi doğrudan hedeflemek veya hücredeki işlevsel p53 seviyelerini artırmak ya da MDM2 seviyelerini azaltmak, kanser tedavisinde etkili stratejiler sunabilir. Ancak, p53-MDM2 etkileşiminin yalnızca bu iki proteinin birbirine bağlanmasından ibaret olduğu görüşü, konuya dar bir perspektiften bakmak anlamına gelir. p53 tabanlı kanser tedavisinin temel amacı, işlevsel p53 seviyelerini artırmak ve/veya p53'ün daha fazla bozulmasını engellemek için MDM2 seviyelerini inhibe etmektir. Bununla birlikte, ARF (p14/p19) gibi endojen sinyal bileşenlerini taklit eden bileşikler, MDM2'yi p53 ile etkileşiminden engelleyerek, veya MDM2'nin ubiquitinleme yeteneklerini bozarak p53'ün işlevini yeniden kazandıran ilginç yaklaşımlar sunar. Benzer şekilde, ubiquitin ligaz modülatörleri de benzer şekilde p53'ün bozulmasını engelleyebilir. NFAT1 gibi transkripsiyon faktörlerinin MDM2 transkripsiyonunu yukarı düzenlediği bilindiğinden, bu

transkripsiyon faktörlerinin inhibisyonu, MDM2'yi inhibe etmek ve p53 seviyelerini artırmak için başka bir strateji sağlayabilir. Ancak, bu tür bir yaklaşımın olası dezavantajı, transkripsiyon faktörlerinin geniş bir düzenleyici protein yelpazesi üzerinde etkili olması nedeniyle diğer sinyal yollarında istenmeyen etkilere yol açabilmesidir. Ayrıca, MDM2 ve MDMX arasındaki etkileşim de önemli bir araştırma alanıdır. MDM2 ve MDMX'in tümör oluşumunda hem örtüşen hem de örtüşmeyen rolleri olduğu ve sadece MDM2-p53 etkileşiminin inaktivasyonu ile MDMX'in p53 üzerindeki onkojenik inhibe edici etkilerinin engellenemeyeceği görülmüştür (Pazgier vd., 2009; Wade vd., 2013).

MDM2-p53 etkileşimini bozan küçük molekülü inhibitörler, kanser tedavisinde cazip bir strateji olsa da, bu konseptin tedavi açısından ne kadar uygulanabilir olduğu hala belirsizdir. Nutlin serisi bileşiklerden biri olan RG7112 üzerinde yapılan klinik çalışmalar, doz artışına karşı iyi bir tolerans göstermiş olsa da, MDM2 inhibitörlerine uzun süreli maruziyetin toksik etkileri henüz belirlenmemiştir. Ayrıca, MDM2-p53 etkileşiminin inhibitörleri, p53 aktivasyonuna karşı edinilmiş direnç riski de taşır. Vahşi tip p53'ün ekspresyonu, MDM2 inhibitörlerinin kanser karşıtı etkileri için kritik olduğundan, kanser hücrelerinde p53 mutant klonlarının veya edinilmiş p53 mutasyonlarının bu tedavilere direnç geliştirebileceği bir sorun teşkil etmektedir. Birçok küçük molekül inhibitörü klinik çalışmalara girmiş olsa da, nihai kavram kanıtı henüz sağlanamamıştır. Ancak, özellikle nutlinler, klinik öncesi çalışmalarda oldukça etkili olduklarını kanıtlamış ve MDM2 inhibisyonu dışında kanser büyümesini engelleme potansiyeli göstermiştir. Ayrıca bu çalışmada ve halen yapılan çalışmalarda görüldüğü üzere RG7388 düşük toksisitesi, düşük IC₅₀ değerleri, vahşi ve mutant kanser hücre hatları üzerindeki inhibe edici özelliği ile dikkat çekmektedir. Buda, bu inhibitör üzerinde yapılacak çalışmaların umut verici sonuçlar verebileceğini göstermektedir.

MDM2-p53 etkileşimi üzerine devam eden büyük bir araştırma çabası mevcuttur ve tıbbi kimyagerler, bu etkileşimi hedeflemek için yeni sentetik bileşikler geliştirmektedirler. Ancak, p53 ve MDM2'nin yanı sıra, bu protein-protein etkileşimini çoklu düzenleyici seviyelere tabi tutan güçlü "destekleyici oyuncular"ın varlığını unutmamak gerekir. Bu etkileşimlerin her birinin rolünü netleştirmek ve başarılı bir şekilde hedeflenebileceği koşulları belirlemek için daha fazla araştırma gereklidir (Zhuang vd., 2012). Kombine tedavi alternatiflerinin ve yüksek verimli araştırma tekniklerinin kullanımı, MDM2 ve düzenleyicilerinin biyokimyası ve moleküler biyolojisi hakkındaki derinlemesine anlayışla

birleştiğinde, umarız ki yeni ve daha etkili tedavilerin geliştirilmesi her geğen gün daha da artacak ve daha geniş hasta grupları bu farklı tedavilerden faydalanabilecektir.



KAYNAKÇA

Alpar, D., Wren, D., Ermini, L., Mansur, M., Van Delft, F., Bateman, C., . . . Gonzalez, D. (2015). Clonal origins of ETV6-RUNX1+ acute lymphoblastic leukemia: studies in monozygotic twins. *Leukemia*, 29(4), 839-846.

Alsheich-Bartok, O., Haupt, S., Alkalay-Snir, I., Saito, S., Appella, E., & Haupt, Y. (2008). PML enhances the regulation of p53 by CK1 in response to DNA damage. *Oncogene*, 27(26), 3653-3661.

Andreeff, M., Kelly, K. R., & Yee, K. (2016). Results of the phase I trial of RG7112, a small-molecule MDM2 antagonist in leukemia. *Clin Cancer Res*, 22. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-0481

Aptullahoglu, E., Ciardullo, C., Wallis, J. P., Marr, H., Marshall, S., Bown, N., . . . Lunec, J. (2023). Splicing modulation results in aberrant isoforms and protein products of p53 pathway genes and the sensitization of B cells to non-genotoxic MDM2 inhibition. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2410.

Aptullahoglu, E., Nakjang, S., Wallis, J. P., Marr, H., Marshall, S., Willmore, E., & Lunec, J. (2024). RNA sequencing reveals candidate genes and pathways Associated with Resistance to MDM2 Antagonist Idasanutlin in TP53 Wild-Type Chronic lymphocytic leukemia. *Biomedicines*, 12(7), 1388.

Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., . . . Vardiman, J. W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 127(20), 2391-2405.

Arico, M., Schrappe, M., Hunger, S. P., Carroll, W. L., Conter, V., Galimberti, S., . . . Vetteenranta, K. (2010). Clinical outcome of children with newly diagnosed Philadelphia chromosome–positive acute lymphoblastic leukemia treated between 1995 and 2005. *Journal of Clinical Oncology*, 28(31), 4755-4761.

Arico, M., Valsecchi, M. G., Conter, V., Rizzari, C., Pession, A., Messina, C., . . . Locatelli, F. (2002). Improved outcome in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia defined by prednisone-poor response treated with double Berlin-Frankfurt-Muenster protocol II. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 100(2), 420-426.

- Arnhold, V., Schmelz, K., Proba, J., Winkler, A., Wünschel, J., Toedling, J., . . . Schulte, J. H.** (2018). Reactivating TP53 signaling by the novel MDM2 inhibitor DS-3032b as a therapeutic option for high-risk neuroblastoma. *Oncotarget*, 9(2), 2304.
- Aureli, A., Marziani, B., Venditti, A., Sconocchia, T., & Sconocchia, G.** (2023). Acute Lymphoblastic Leukemia Immunotherapy Treatment: Now, Next, and Beyond. *Cancers (Basel)*, 15(13). doi:10.3390/cancers15133346
- Autry, R. J., Paugh, S. W., Carter, R., Shi, L., Liu, J., Ferguson, D. C., . . . McCorkle, J. R.** (2020). Integrative genomic analyses reveal mechanisms of glucocorticoid resistance in acute lymphoblastic leukemia. *Nature cancer*, 1(3), 329-344.
- Barrington-Trimis, J. L., Cockburn, M., Metayer, C., Gauderman, W. J., Wiemels, J., & McKean-Cowdin, R.** (2017). Trends in childhood leukemia incidence over two decades from 1992 to 2013. *Int J Cancer*, 140(5), 1000-1008. doi:10.1002/ijc.30487
- Bauer, R. M., Bastian, P. J., Gozzi, C., & Stief, C. G.** (2009). Postprostatectomy incontinence: all about diagnosis and management. *European urology*, 55(2), 322-333.
- Bell, H. L., Singh, M., Blair, H. J., van Delft, F. W., Moorman, A. V., Lunec, J., & Irving, J.** (2020). Preclinical investigation of the p53-MDM2 antagonist idasanutlin (RG7388) demonstrates significant activity in high risk adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 136, 38.
- Bennet, J.** (1976). Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT. Proposals for the classification of the acute leukemias. *Br J Haematol*, 33(4), 451-458.
- Bernard, A., & Boumsell, L.** (1984). The clusters of differentiation (CD) defined by the first international workshop on human leucocyte differentiation antigens. *Human immunology*, 11(1), 1-10.
- Berry, D. A., Zhou, S., Higley, H., Mukundan, L., Fu, S., Reaman, G. H., . . . Radich, J. P.** (2017). Association of minimal residual disease with clinical outcome in pediatric and adult acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *JAMA oncology*, 3(7), e170580-e170580.
- Bieging, K. T., Mello, S. S., & Attardi, L. D.** (2014). Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nature Reviews Cancer*, 14(5), 359-370.

- Bitomsky, N., & Hofmann, T. G.** (2009). Apoptosis and autophagy: Regulation of apoptosis by DNA damage signalling—roles of p53, p73 and HIPK2. *The FEBS journal*, 276(21), 6074-6083.
- Bohlman, S., & Manfredi, J. J.** (2014). p53-independent effects of Mdm2. *Mutant p53 and MDM2 in Cancer*, 235-246.
- Bonaventure, A., Harewood, R., Stiller, C. A., Gatta, G., Clavel, J., Stefan, D. C., . . . Peris-Bonet, R.** (2017). Worldwide comparison of survival from childhood leukaemia for 1995–2009, by subtype, age, and sex (CONCORD-2): a population-based study of individual data for 89 828 children from 198 registries in 53 countries. *The Lancet Haematology*, 4(5), e202-e217.
- Bouska, A., Lushnikova, T., Plaza, S., & Eischen, C. M.** (2008). Mdm2 promotes genetic instability and transformation independent of p53. *Molecular and cellular biology*.
- Bowling, R. D., Brewer, M. J., Kerns, D. L., Gordy, J., Seiter, N., Elliott, N. E., . . . Biles, S.** (2016). Sugarcane aphid (Hemiptera: Aphididae): a new pest on sorghum in North America. *Journal of Integrated Pest Management*, 7(1), 12.
- Böttger, A., Böttger, V., Garcia-Echeverria, C., Chène, P., Hochkeppel, H.-K., Sampson, W., . . . Lane, D. P.** (1997). Molecular characterization of the hdm2-p53 interaction. *Journal of molecular biology*, 269(5), 744-756.
- Brady, C. A., & Attardi, L. D.** (2010). p53 at a glance. *Journal of cell science*, 123(15), 2527-2532.
- Brischwein, K., Schlereth, B., Guller, B., Steiger, C., Wolf, A., Lutterbuese, R., . . . Raum, T.** (2006). MT110: a novel bispecific single-chain antibody construct with high efficacy in eradicating established tumors. *Molecular immunology*, 43(8), 1129-1143.
- Brown, P., Pieters, R., & Biondi, A.** (2019). How I treat infant leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 133(3), 205-214.
- Brüggemann, M., & Kotrova, M.** (2017). Minimal residual disease in adult ALL: technical aspects and implications for correct clinical interpretation. *Hematology 2014, the American Society of Hematology Education Program Book*, 2017(1), 13-21.
- Burgess, A., Chia, K. M., Haupt, S., Thomas, D., Haupt, Y., & Lim, E.** (2016). Clinical overview of MDM2/X-targeted therapies. *Frontiers in oncology*, 6, 7.

- Carol, H., Szymanska, B., Evans, K., Boehm, I., Houghton, P. J., Smith, M. A., & Lock, R. B.** (2013). The anti-CD19 antibody–drug conjugate SAR3419 prevents hematolymphoid relapse postinduction therapy in preclinical models of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Clinical cancer research*, 19(7), 1795-1805.
- Chamberlain, V., Drew, Y., & Lunec, J.** (2021). Tipping Growth Inhibition into Apoptosis by Combining Treatment with MDM2 and WIP1 Inhibitors in p53WT Uterine Leiomyosarcoma. *Cancers*, 14(1), 14.
- Chen, H., Luo, D., Zhang, L., Lin, X., Luo, Q., Yi, H., . . . Chen, Y.** (2017). Restoration of p53 using the novel MDM2-p53 antagonist APG115 suppresses dedifferentiated papillary thyroid cancer cells. *Oncotarget*, 8(26), 43008.
- Chen, D., Zhang, J., Li, M., Rayburn, E. R., Wang, H., & Zhang, R.** (2009). RYBP stabilizes p53 by modulating MDM2. *EMBO reports*, 10(2), 166-172.
- Chen, L., Pastorino, F., Berry, P., Bonner, J., Kirk, C., Wood, K. M., . . . Veal, G. J.** (2019). Preclinical evaluation of the first intravenous small molecule MDM2 antagonist alone and in combination with temozolomide in neuroblastoma. *International journal of cancer*, 144(12), 3146-3159.
- Chi, S.-W., Lee, S.-H., Kim, D.-H., Ahn, M.-J., Kim, J.-S., Woo, J.-Y., . . . Han, K.-H.** (2005). Structural details on mdm2-p53 interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 280(46), 38795-38802.
- Ciardullo, C., Aptullahoglu, E., Woodhouse, L., Lin, W.-Y., Wallis, J. P., Marr, H., . . . Lunec, J.** (2019). Non-genotoxic MDM2 inhibition selectively induces a pro-apoptotic p53 gene signature in chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica*, 104(12), 2429.
- Ciardullo, C., Woodhouse, L., Aptullahoglu, E., Wallis, J. P., Marr, H. J., Marshall, S. R., . . . Lunec, J.** (2016). The p53-MDM2 antagonist RG7388 activates p53 and induces a predominantly pro-apoptotic gene expression signature in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 128(22), 893.
- Comeaux, E. Q., & Mullighan, C. G.** (2017). TP53 mutations in hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 7(3), a026286.
- Conter, V., Aricò, M., Basso, G., Biondi, A., Barisone, E., Messina, C., . . . Pession, A.** (2010). Long-term results of the Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology

(AIEOP) Studies 82, 87, 88, 91 and 95 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 24(2), 255-264.

Cordon-Cardo, C., Latres, E., Drobnjak, M., Oliva, M. R., Pollack, D., Woodruff, J. M., . . . Levine, A. J. (1994). Molecular Abnormalities of mdm 2 and p53 Genes in Adult Soft Tissue Sarcomas. *Cancer research*, 54(3), 794-799.

Coutts, A. S., Weston, L., & La Thangue, N. B. (2010). Actin nucleation by a transcription co-factor that links cytoskeletal events with the p53 response. *Cell Cycle*, 9(8), 1511-1515.

Coutts, A. S., Boulahbel, H., Graham, A., & La Thangue, N. B. (2007). Mdm2 targets the p53 transcription cofactor JMY for degradation. *EMBO reports*, 8(1), 84-90.

Daver, N. G., Dail, M., Garcia, J. S., Jonas, B. A., Yee, K. W., Kelly, K. R., . . . Paolini, S. (2023). Venetoclax and idasanutlin in relapsed/refractory AML: a nonrandomized, open-label phase 1b trial. *Blood*, 141(11), 1265-1276.

Davila, M. L., & Brentjens, R. J. (2016). CD19-Targeted CAR T cells as novel cancer immunotherapy for relapsed or refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Clinical advances in hematology & oncology: H&O*, 14(10), 802.

de Jonge, M., de Weger, V. A., Dickson, M. A., Langenberg, M., Le Cesne, A., Wagner, A. J., . . . Tuffal, G. (2017). A phase I study of SAR405838, a novel human double minute 2 (HDM2) antagonist, in patients with solid tumours. *European Journal of Cancer*, 76, 144-151.

de Oca Luna, R. M., Wagner, D. S., & Lozano, G. (1995). Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. *Nature*, 378(6553), 203-206.

De Rozieres, S., Maya, R., Oren, M., & Lozano, G. (2000). The loss of mdm2 induces p53 mediated apoptosis. *Oncogene*, 19(13), 1691-1697.

Deininger, M. W. (2008). Chronic myeloid leukemia: an historical perspective. *ASH Education Program Book*, 2008(1), 418-418.

Demir, S., Selivanova, G., Tausch, E., Wiesmüller, L., Stilgenbauer, S., Te Kronnie, G., . . . Meyer, L. H. (2015). Targeting mutant p53 in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 126(23), 903.

Ding, K., Lu, Y., & Nikolovska-Coleska, Z. (2005). Structure-based design of potent non-peptide MDM2 inhibitors. *J Am Chem Soc*, 127. doi:10.1021/ja051147z

- Ding, K., Lu, Y., Nikolovska-Coleska, Z., Wang, G., Qiu, S., Shangary, S., . . . Krajewski, K.** (2006). Structure-based design of spiro-oxindoles as potent, specific small-molecule inhibitors of the MDM2– p53 interaction. *Journal of medicinal chemistry*, 49(12), 3432-3435.
- Ding, Q., Zhang, Z., & Liu, J. J.** (2013). Discovery of RG7388, a potent and selective p53-MDM2 inhibitor in clinical development. *J Med Chem*, 56. doi:10.1021/jm400487c
- Ding, Q., Zhang, Z., Liu, J. J., Jiang, N., Zhang, J., Ross, T. M., . . . Graves, B.** (2013). Discovery of RG7388, a potent and selective p53-MDM2 inhibitor in clinical development. *J Med Chem*, 56(14), 5979-5983. doi:10.1021/jm400487c
- Dworzak, M. N., Buldini, B., Gaipa, G., Ratei, R., Hrusak, O., Luria, D., . . . Schumich, A.** (2018). AIEOP-BFM consensus guidelines 2016 for flow cytometric immunophenotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*, 94(1), 82-93.
- Engeland, K.** (2022). Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death & Differentiation*, 29(5), 946-960.
- Fakharzadeh, S. S., Trusko, S. P., & George, D. L.** (1991). Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *The EMBO journal*, 10(6), 1565-1569.
- Fang, Y., Liao, G., & Yu, B.** (2020). Small-molecule MDM2/X inhibitors and PROTAC degraders for cancer therapy: advances and perspectives. *Acta Pharm Sin B*, 10. doi:10.1016/j.apsb.2020.01.003
- Farhadfar, N., & Litzow, M. R.** (2016). New monoclonal antibodies for the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia research*, 49, 13-21.
- Feng, Q., de Smith, A. J., Vergara-Lluri, M., Muskens, I. S., McKean-Cowdin, R., Kogan, S., . . . Wiemels, J. L.** (2021). Trends in acute lymphoblastic leukemia incidence in the United States by race/ethnicity from 2000 to 2016. *American journal of epidemiology*, 190(4), 519-527.
- Fry, T. J., Shah, N. N., Orentas, R. J., Stetler-Stevenson, M., Yuan, C. M., Ramakrishna, S., . . . Yates, B.** (2018). CD22-targeted CAR T cells induce remission in B-ALL that is naive or resistant to CD19-targeted CAR immunotherapy. *Nature medicine*, 24(1), 20-28.

- Furet, P., Masuya, K., & Kallen, J.** (2016). Discovery of a novel class of highly potent inhibitors of the p53-MDM2 interaction by structure-based design starting from a conformational argument. *Bioorg Med Chem Lett*, 26. doi:10.1016/j.bmcl.2016.08.010
- Garg, N., Kotru, M., Kumar, D., Pathak, R., & Sikka, M.** (2018). Correlation of expression of aberrant immunophenotypic markers in T-ALL with its morphology: A pilot study. *Journal of laboratory physicians*, 10(04), 410-413.
- Gluck, W. L., Gounder, M. M., & Frank, R.** (2020). Phase 1 study of the MDM2 inhibitor AMG 232 in patients with advanced P53 wild-type solid tumors or multiple myeloma. *Invest New Drug*, 38. doi:10.1007/s10637-019-00840-1
- Gonzalez, A. Z., Li, Z., & Beck, H. P.** (2014). Novel inhibitors of the MDM2-p53 interaction featuring hydrogen bond acceptors as carboxylic acid isosteres. *J Med Chem*, 57. doi:10.1021/jm401911v
- Gökbuget, N., Stanze, D., Beck, J., Diedrich, H., Horst, H.-A., Hüttmann, A., . . . Reichle, A.** (2012). Outcome of relapsed adult lymphoblastic leukemia depends on response to salvage chemotherapy, prognostic factors, and performance of stem cell transplantation. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 120(10), 2032-2041.
- Graves, B., Thompson, T., & Xia, M.** (2012). Activation of the p53 pathway by small-molecule-induced MDM2 and MDMX dimerization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109. doi:10.1073/pnas.1203789109
- Group, C. A. C.** (1996). Duration and intensity of maintenance chemotherapy in acute lymphoblastic leukaemia: overview of 42 trials involving 12 000 randomised children. *The Lancet*, 347(9018), 1783-1788.
- Gu, Z., Churchman, M. L., Roberts, K. G., Moore, I., Zhou, X., Nakitandwe, J., . . . Berns, H.** (2019). PAX5-driven subtypes of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Nature genetics*, 51(2), 296-307.
- Harms, K., & Chen, X.** (2006). The functional domains in p53 family proteins exhibit both common and distinct properties. *Cell Death & Differentiation*, 13(6).
- Harris, N. L., Jaffe, E. S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H. K., Vardiman, J., . . . Bloomfield, C. D.** (1999). World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory

Committee meeting—Airlie House, Virginia, November 1997. *Journal of Clinical Oncology*, 17(12), 3835-3849.

Hasle, H., Clemmensen, I. H., & Mikkelsen, M. (2000). Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *Lancet*, 355(9199), 165-169. doi:10.1016/S0140-6736(99)05264-2

Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., & Oren, M. (1997). Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 387(6630), 296-299.

Higgins, B., Glenn, K., & Walz, A. (2014). Preclinical optimization of MDM2 antagonist scheduling for cancer treatment by using a model-based approach. *Clin Cancer Res*, 20. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0460

Higgins, B., Tovar, C., Glen, K., Railkar, A., Filipovic, Z., Qureshi, F., . . . Chen, L.-C. (2015). Abstract A156: preclinical activity of MDM2 antagonist RO6839921, a pegylated prodrug for intravenous administration. *Molecular Cancer Therapeutics*, 14(12_Supplement_2), A156-A156.

Hof, J., Krentz, S., Van Schewick, C., Körner, G., Shalapour, S., Rhein, P., . . . Henze, G. (2011). Mutations and deletions of the TP53 gene predict nonresponse to treatment and poor outcome in first relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 29(23), 3185-3193.

Hoffman-Luca, C. G., Ziazadeh, D., & McEachern, D. (2015). Elucidation of acquired resistance to Bcl-2 and MDM2 inhibitors in acute leukemia in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*, 21. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-2506

Hohtari, H., Kankainen, M., Adnan-Awad, S., Yadav, B., Potdar, S., Ianevski, A., . . . Kytölä, S. (2022). Targeting apoptosis pathways with BCL2 and MDM2 inhibitors in adult B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Hemasphere*, 6(3), e701.

Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., & Harris, C. C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science*, 253(5015), 49-53.

Holmfeldt, L., Wei, L., Diaz-Flores, E., Walsh, M., Zhang, J., Ding, L., . . . Chen, S.-C. (2013). The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Nature genetics*, 45(3), 242-252.

- Holzer, P., Masuya, K., & Furet, P.** (2015). Discovery of a dihydroisoquinolinone derivative (NVP-CGM097): a highly potent and selective MDM2 inhibitor undergoing phase 1 clinical trials in p53wt tumors. *J Med Chem*, 58. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00810
- Honda, R., Tanaka, H., & Yasuda, H.** (1997). Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS letters*, 420(1), 25-27.
- Horibata, S., Gui, G., Lack, J., DeStefano, C. B., Gottesman, M. M., & Hourigan, C. S.** (2019). Heterogeneity in refractory acute myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(21), 10494-10503.
- Horowitz, N. A., Akasha, D., & Rowe, J. M.** (2018). Advances in the genetics of acute lymphoblastic leukemia in adults and the potential clinical implications. *Expert Rev Hematol*, 11(10), 781-791. doi:10.1080/17474086.2018.1509702
- Hunger, S. P., Lu, X., Devidas, M., Camitta, B. M., Gaynon, P. S., Winick, N. J., . . . Carroll, W. L.** (2012). Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. *Journal of Clinical Oncology*, 30(14), 1663-1669.
- Hunger, S. P., & Mullighan, C. G.** (2015). Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N Engl J Med*, 373(16), 1541-1552. doi:10.1056/NEJMra1400972
- Illidge, T. M., Cragg, M. S., Fringes, B., Olive, P., & Erenpreisa, J. A.** (2000). Polyploid giant cells provide a survival mechanism for p53 mutant cells after DNA damage. *Cell biology international*, 24(9), 621-633.
- Inaba, H., Greaves, M., & Mullighan, C. G.** (2013). Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*, 381(9881), 1943-1955.
- Inaba, H., & Mullighan, C. G.** (2020). Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 105(11), 2524-2539. doi:10.3324/haematol.2020.247031
- Inaba, H., & Pui, C.-H.** (2019). Immunotherapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer and Metastasis Reviews*, 38(4), 595-610.
- Inaba, H., & Pui, C.-H.** (2021). Advances in the diagnosis and treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Journal of clinical medicine*, 10(9), 1926.
- Ishizawa, J., Kojima, K., Chachad, D., Ruvalo, P., Ruvalo, V., Jacamo, R. O., . . . Tabe, Y.** (2016). ATF4 induction through an atypical integrated stress response to ONC201 triggers

p53-independent apoptosis in hematological malignancies. *Science signaling*, 9(415), ra17-ra17.

Jabbour, E., O'Brien, S., Ravandi, F., & Kantarjian, H. (2015). Monoclonal antibodies in acute lymphoblastic leukemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 125(26), 4010-4016.

Jeha, S., Choi, J., Roberts, K. G., Pei, D., Coustan-Smith, E., Inaba, H., . . . Raimondi, S. C. (2021). Clinical significance of novel subtypes of acute lymphoblastic leukemia in the context of minimal residual disease-directed therapy. *Blood cancer discovery*, 2(4), 326-337.

Jeha, S., Pei, D., Raimondi, S. C., Onciu, M., Campana, D., Cheng, C., . . . Howard, S. C. (2009). Increased risk for CNS relapse in pre-B cell leukemia with the t (1; 19)/TCF3-PBX1. *Leukemia*, 23(8), 1406-1409.

Joerger, A. C., & Fersht, A. R. (2007). Structure-function-rescue: the diverse nature of common p53 cancer mutants. *Oncogene*, 26(15), 2226-2242. doi:10.1038/sj.onc.1210291

Jones, SN, Hancock, AR, Vogel, H., Donehower, LA, & Bradley, A. (1998). Farelerde Mdm2'nin aşırı ekspresyonu, tümör oluşumunda Mdm2 için p53'ten bağımsız bir rol olduğunu ortaya koymaktadır. *Ulusal Bilimler Akademisi Bildirileri* , 95 (26), 15608-15612.

Kaczmarzka, A., Śliwa, P., Lejman, M., & Zawitkowska, J. (2021). The Use of Inhibitors of Tyrosine Kinase in Paediatric Haemato-Oncology—When and Why? *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 12089.

Kamal, A., Mohammed, A. A., & Shaik, T. B. (2012). p53–MDM2 inhibitors: patent review (2009–2010). *Expert opinion on therapeutic patents*, 22(2), 95-105.

Kampen, K. R. (2012). The discovery and early understanding of leukemia. *Leukemia research*, 36(1), 6-13.

Kato, S., Han, S.-Y., Liu, W., Otsuka, K., Shibata, H., Kanamaru, R., & Ishioka, C. (2003). Understanding the function–structure and function–mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14), 8424-8429.

Kaur, K., Anant, A., & Asati, V. (2022). Structural aspects of mTOR inhibitors: search for potential compounds. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 22(6), 1037-1055.

- Khurana, A., & Shafer, D. A.** (2019). MDM2 antagonists as a novel treatment option for acute myeloid leukemia: perspectives on the therapeutic potential of idasanutlin (RG7388). *Onco Targets Ther*, 12. doi:10.2147/OTT.S172315
- Klein, C., & Vassilev, L.** (2004). Targeting the p53–MDM2 interaction to treat cancer. *British journal of cancer*, 91(8), 1415-1419.
- Kocik, J., Machula, M., Wisniewska, A., Surmiak, E., Holak, T. A., & Skalniak, L.** (2019). Helping the released guardian: drug combinations for supporting the anticancer activity of HDM2 (MDM2) antagonists. *Cancers (Basel)*, 11. doi:10.3390/cancers11071014
- Konopleva, M., Martinelli, G., Daver, N., Papayannidis, C., Wei, A., Higgins, B., . . . Andreeff, M.** (2020). MDM2 inhibition: an important step forward in cancer therapy. *Leukemia*, 34(11), 2858-2874.
- Koo, N., Sharma, A. K., & Narayan, S.** (2022). Therapeutics targeting p53-MDM2 interaction to induce cancer cell death. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 5005.
- Korgaonkar, C., Hagen, J., Tompkins, V., Frazier, A. A., Allamargot, C., Quelle, F. W., & Quelle, D. E.** (2005). Nucleophosmin (B23) targets ARF to nucleoli and inhibits its function. *Molecular and cellular biology*, 25(4), 1258-1271.
- Kuo, M. L., den Besten, W., Bertwistle, D., Roussel, M. F., & Sherr, C. J.** (2004). N-terminal polyubiquitination and degradation of the Arf tumor suppressor. *Genes & development*, 18(15), 1862-1874.
- Lai, Z., Ferry, K. V., Diamond, M. A., Wee, K. E., Kim, Y. B., Ma, J., . . . Auger, K. R.** (2001). Human mdm2 mediates multiple mono-ubiquitination of p53 by a mechanism requiring enzyme isomerization. *Journal of Biological Chemistry*, 276(33), 31357-31367.
- Lakoma, A., Barbieri, E., & Agarwal, S.** (2015). The MDM2 small-molecule inhibitor RG7388 leads to potent tumor inhibition in p53 wild-type neuroblastoma. *Cell Death Discov*, 1. doi:10.1038/cddiscovery.2015.26
- Lakoma, A., Barbieri, E., Agarwal, S., Jackson, J., Chen, Z., Kim, Y., . . . Kim, E.** (2015). The MDM2 small-molecule inhibitor RG7388 leads to potent tumor inhibition in p53 wild-type neuroblastoma. *Cell death discovery*, 1(1), 1-9.
- Lane, D. P., & Hall, P. A.** (1997). MDM2--arbiter of p53's destruction. *Trends Biochem Sci*, 22(10), 372-374. doi:10.1016/s0968-0004(97)01119-5

- Lanza, F., Maffini, E., Saraceni, F., Massari, E., Rondoni, M., Daghia, G., . . . Martinelli, G.** (2020). New monoclonal antibodies and tyrosine kinase inhibitors in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Minerva Medica*, 111(5), 478-490.
- Leenders, G. B., & Tuszynski, J. A.** (2013). Stochastic and deterministic models of cellular p53 regulation. *Frontiers in oncology*, 3, 64.
- Lim, J. Y. S., Bhatia, S., Robison, L. L., & Yang, J. J.** (2014). Genomics of racial and ethnic disparities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*, 120(7), 955-962.
- Liu, T., Gu, L., Mui, A., Wu, Z., Albadari, N., Li, W., & Zhou, M.** (2024). An MDM2 degrader shows potent cytotoxicity to MDM2-overexpressing acute lymphoblastic leukemia cells with minimal toxicity to normal cells/tissues. *Cancer letters*, 598, 217126.
- Liu, Y., Easton, J., Shao, Y., Maciaszek, J., Wang, Z., Wilkinson, M. R., . . . Shi, L.** (2017). The genomic landscape of pediatric and young adult T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Nature genetics*, 49(8), 1211-1218.
- Lopez-Lopez, E., Autry, R. J., Smith, C., Yang, W., Paugh, S. W., Panetta, J. C., . . . Pei, D.** (2020). Pharmacogenomics of intracellular methotrexate polyglutamates in patients' leukemia cells in vivo. *The Journal of Clinical Investigation*, 130(12), 6600-6615.
- Louria-Hayon, I., Grossman, T., Sionov, R. V., Alsheich, O., Pandolfi, P. P., & Haupt, Y.** (2003). The promyelocytic leukemia protein protects p53 from Mdm2-mediated inhibition and degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(35), 33134-33141.
- Lukenbill, J., & Advani, A. S.** (2013). The treatment of adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*, 8(2), 91-97. doi:10.1007/s11899-013-0159-0
- Malagu, K., Duggan, H., Menear, K., Hummersone, M., Gomez, S., Bailey, C., . . . Quesada, M. J.** (2009). The discovery and optimisation of pyrido [2, 3-d] pyrimidine-2, 4-diamines as potent and selective inhibitors of mTOR kinase. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 19(20), 5950-5953.
- Marine, J.-C., & Lozano, G.** (2010). Mdm2-mediated ubiquitylation: p53 and beyond. *Cell Death & Differentiation*, 17(1), 93-102.
- Marine, J. C., & Jochemsen, A. G.** (2004). Mdmx and Mdm2: brothers in arms?. *Cell Cycle*, 3(7), 898-902.

- Maury, S., Chevret, S., Thomas, X., Heim, D., Leguay, T., Huguet, F., . . . Escoffre-Barbe, M.** (2016). Rituximab in B-lineage adult acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*, 375(11), 1044-1053.
- Michaelis, M., Rothweiler, F., & Barth, S.** (2011). Adaptation of cancer cells from different entities to the MDM2 inhibitor nutlin-3 results in the emergence of p53-mutated multi-drug-resistant cancer cells. *Cell Death Dis*, 2. doi:10.1038/cddis.2011.129
- Momand, J., Jung, D., Wilczynski, S., & Niland, J.** (1998). The MDM2 gene amplification database. *Nucleic acids research*, 26(15), 3453-3459.
- Momand, J., Zambetti, G. P., Olson, D. C., George, D., & Levine, A. J.** (1992). The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*, 69(7), 1237-1245.
- Moorman, A. V., Harrison, C. J., Buck, G. A., Richards, S. M., Secker-Walker, L. M., Martineau, M., . . . Dewald, G. W.** (2007). Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of cytogenetic data from patients treated on the Medical Research Council (MRC) UKALLXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial. *Blood*, 109(8), 3189-3197. doi:10.1182/blood-2006-10-051912
- Moschos, S. J., Sandhu, S. K., & Lewis, K. D.** (2017). Phase 1 study of the p53-MDM2 inhibitor AMG 232 combined with trametinib plus dabrafenib or trametinib in patients (Pts) with TP53 wild type (TP53WT) metastatic cutaneous melanoma (MCM). *Cancer Res*, 35.
- Mörücke, A., Zimmermann, M., Valsecchi, M. G., Stanulla, M., Biondi, A., Mann, G., . . . Arico, M.** (2016). Dexamethasone vs prednisone in induction treatment of pediatric ALL: results of the randomized trial AIEOP-BFM ALL 2000. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 127(17), 2101-2112.
- Mullighan, C. G., Collins-Underwood, J. R., Phillips, L. A., Loudin, M. G., Liu, W., Zhang, J., . . . Willman, C. L.** (2009). Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor–and Down syndrome–associated acute lymphoblastic leukemia. *Nature genetics*, 41(11), 1243-1246.
- Müller, C. R., Paulsen, E. B., Noordhuis, P., Pedoutour, F., Sæter, G., & Myklebost, O.** (2007). Potential for treatment of liposarcomas with the MDM2 antagonist Nutlin-3A. *International journal of cancer*, 121(1), 199-205.

- Nacheva, E. P., Grace, C. D., Brazma, D., Gancheva, K., Howard-Reeves, J., Rai, L., . . . Russell, N.** (2013). Does BCR/ABL 1 positive Acute Myeloid Leukaemia Exist? *British journal of haematology*, 161(4), 541-550.
- Nag, S., Qin, J., Srivenugopal, K. S., Wang, M., & Zhang, R.** (2013). The MDM2-p53 pathway revisited. *Journal of biomedical research*, 27(4), 254.
- Nag, S., Qin, J., Srivenugopal, K. S., Wang, M., & Zhang, R.** (2013). The MDM2-p53 pathway revisited. *J Biomed Res*, 27(4), 254-271. doi:10.7555/jbr.27.20130030
- Nakamura, S., Roth, J. A., & Mukhopadhyay, T.** (2000). Multiple lysine mutations in the C-terminal domain of p53 interfere with MDM2-dependent protein degradation and ubiquitination. *Molecular and cellular biology*.
- Nguyen, A. M., Tse, V., Lapp, K., Yang, G., Peng, E., Cunnien, K., . . . Tirado, C. A.** (2020). Molecular Cytogenetic Characterization of a Complex Karyotype of a Pediatric Male Patient with B-Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of the Association of Genetic Technologists*, 46(1).
- Nomdedéu, J. F., Lete, I., Baiget, M., Lasa, A., Estivill, C., Rubiol, E., . . . Mateu, R.** (1997). Mutational analysis of p53 in 16 cases of acute lymphoblastic leukemia and Burkitt's lymphoma. *Haematologica*, 82(5), 550-554.
- Oeffinger, K. C., Mertens, A. C., Sklar, C. A., Kawashima, T., Hudson, M. M., Meadows, A. T., . . . Robison, L. L.** (2006). Chronic health conditions in adult survivors of childhood cancer. *N Engl J Med*, 355(15), 1572-1582. doi:10.1056/NEJMsa060185
- Oliner, J., Kinzler, K. W., Meltzer, P. S., George, D. L., & Vogelstein, B.** (1992). Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature*, 358(6381), 80-83.
- Oliner, J. D., Saiki, A. Y., & Caenepeel, S.** (2016). The role of MDM2 amplification and overexpression in tumorigenesis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(6), a026336.
- Olivier, M., Hollstein, M., & Hainaut, P.** (2010). TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(1), a001008.
- Olson, D., Marechal, V., Momand, J., Chen, J., Romocki, C., & Levine, A.** (1993). Identification and characterization of multiple mdm-2 proteins and mdm-2-p53 protein complexes. *Oncogene*, 8(9), 2353-2360.

- Paul, S., Kantarjian, H., & Jabbour, E. J.** (2016). Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mayo Clin Proc*, 91(11), 1645-1666. doi:10.1016/j.mayocp.2016.09.010
- Paul, S., Kantarjian, H., & Jabbour, E. J.** (2016). *Adult acute lymphoblastic leukemia*. Paper presented at the Mayo Clinic Proceedings.
- Pavlasova, G., & Mraz, M.** (2020). The regulation and function of CD20: an “enigma” of B-cell biology and targeted therapy. *Haematologica*, 105(6), 1494.
- Pazgier, M., Liu, M., Zou, G., Yuan, W., Li, C., Li, C., . . . Tarasov, S. G.** (2009). Structural basis for high-affinity peptide inhibition of p53 interactions with MDM2 and MDMX. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(12), 4665-4670.
- Percival, M.-E., Lai, C., Estey, E., & Hourigan, C. S.** (2017). Bone marrow evaluation for diagnosis and monitoring of acute myeloid leukemia. *Blood reviews*, 31(4), 185-192.
- Perry, M. E., Mendrysa, S. M., Saucedo, L. J., Tannous, P., & Holubar, M.** (2000). p76MDM2 inhibits the ability of p90MDM2 to destabilize p53. *Journal of Biological Chemistry*, 275(8), 5733-5738.
- Picksley, S. M., & Lane, D. P.** (1993). What the papers say: The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop: A paradigm for the regulation of growth control by p53?
- Poyurovsky, M. V., Katz, C., Laptenko, O., Beckerman, R., Lokshin, M., Ahn, J., . . . Zupnick, A.** (2010). The C terminus of p53 binds the N-terminal domain of MDM2. *Nature structural & molecular biology*, 17(8), 982-989.
- Pozarowski, P., & Darzynkiewicz, Z.** (2004). Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Checkpoint Controls and Cancer: Volume 2: Activation and Regulation Protocols*, 301-311.
- Pui, C.-H., Campana, D., Pei, D., Bowman, W. P., Sandlund, J. T., Kaste, S. C., . . . Onciu, M.** (2009). Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *New England Journal of Medicine*, 360(26), 2730-2741.
- Pui, C.-H., & Evans, W. E.** (2006). Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*, 354(2), 166-178.
- Pui, C. H., Yang, J. J., Hunger, S. P., Pieters, R., Schrappe, M., Biondi, A., . . . Mullighan, C. G.** (2015). Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. *J Clin Oncol*, 33(27), 2938-2948. doi:10.1200/jco.2014.59.1636

- Pulte, D., Gondos, A., & Brenner, H.** (2009). Improvement in survival in younger patients with acute lymphoblastic leukemia from the 1980s to the early 21st century. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 113(7), 1408-1411.
- Pulte, D., Jansen, L., Gondos, A., Katalinic, A., Barnes, B., Ressing, M., . . . Group, G. C. S. W.** (2014). Survival of adults with acute lymphoblastic leukemia in Germany and the United States. *PLoS ONE*, 9(1), e85554.
- Qian, S., Wei, Z., Yang, W., Huang, J., Yang, Y., & Wang, J.** (2022). The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. *Frontiers in oncology*, 12, 985363.
- Qin, J. J., Sarkar, S., Voruganti, S., Agarwal, R., Wang, W., & Zhang, R.** (2016). Identification of linearifollianoid A as a novel dual NFAT1 and MDM2 inhibitor for human cancer therapy. *J Biomed Res*, 30.
- Raponi, S., Stefania De Propriis, M., Intoppa, S., Laura Milani, M., Vitale, A., Elia, L., . . . Guarini, A.** (2011). Flow cytometric study of potential target antigens (CD19, CD20, CD22, CD33) for antibody-based immunotherapy in acute lymphoblastic leukemia: analysis of 552 cases. *Leukemia & lymphoma*, 52(6), 1098-1107.
- Rasco, D. W., Lakhani, N. J., & Li, Y.** (2019). A phase I study of a novel MDM2 antagonist APG-115 in patients with advanced solid tumors. *Cancer Res*, 37.
- Rayburn, E., Zhang, R., He, J., & Wang, H.** (2005). MDM2 and human malignancies: expression, clinical pathology, prognostic markers, and implications for chemotherapy. *Current cancer drug targets*, 5(1), 27-41.
- Rayburn, E. R., Ezell, S. J., & Zhang, R.** (2009). Recent advances in validating MDM2 as a cancer target. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, 9(8), 882-903.
- Ribeiro, D., Melão, A., van Boxtel, R., Santos, C. I., Silva, A., Silva, M. C., . . . Barata, J. T.** (2018). STAT5 is essential for IL-7-mediated viability, growth, and proliferation of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood Advances*, 2(17), 2199-2213.
- Riley, M. F., You, M. J., Multani, A. S., & Lozano, G.** (2016). Mdm2 overexpression and p73 loss exacerbate genomic instability and dampen apoptosis, resulting in B-cell lymphoma. *Oncogene*, 35(3), 358-365.

- Rodriguez, M. S., Desterro, J. M., Lain, S., Lane, D. P., & Hay, R. T.** (2000). Multiple C-terminal lysine residues target p53 for ubiquitin-proteasome-mediated degradation. *Molecular and cellular biology*, 20(22), 8458-8467.
- Rossi, D., Cerri, M., Deambrogi, C., Sozzi, E., Cresta, S., Rasi, S., . . . Capello, D.** (2009). The prognostic value of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia is independent of Del17p13: implications for overall survival and chemorefractoriness. *Clinical cancer research*, 15(3), 995-1004.
- Rudin, S., Marable, M., & Huang, R. S.** (2017). The promise of pharmacogenomics in reducing toxicity during acute lymphoblastic leukemia maintenance treatment. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*, 15(2), 82-93.
- Sabapathy, K., & Lane, D. P.** (2018). Therapeutic targeting of p53: all mutants are equal, but some mutants are more equal than others. *Nat Rev Clin Oncol*, 15. doi:10.1038/nrclinonc.2017.151
- Sahin, I., Zhang, S., & Navaraj, A.** (2020). AMG-232 sensitizes high MDM2-expressing tumor cells to T-cell-mediated killing. *Cell Death Discov*, 6. doi:10.1038/s41420-020-0292-1
- Salmoiraghi, S., Montalvo, M. L. G., Ubiali, G., Tosi, M., Peruta, B., Zanghi, P., . . . Bungaro, S.** (2016). Mutations of TP53 gene in adult acute lymphoblastic leukemia at diagnosis do not affect the achievement of hematologic response but correlate with early relapse and very poor survival. *Haematologica*, 101(6), e245.
- Schluns, K. S., Kieper, W. C., Jameson, S. C., & Lefrançois, L.** (2000). Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. *Nature immunology*, 1(5), 426-432.
- Schrapppe, M., Reiter, A., Ludwig, W. D., Harbott, J., Zimmermann, M., Hiddemann, W., . . . Riehm, H.** (2000). Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. *Blood*, 95(11), 3310-3322.
- Schultz, K., Carroll, A., Heerema, N., Bowman, W., Aledo, A., Slayton, W., . . . Davies, S.** (2014). Long-term follow-up of imatinib in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: Children's Oncology Group study AALL0031. *Leukemia*, 28(7), 1467-1471.

Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., . . . Boyd, M. R. (1988). Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer research*, 48(17), 4827-4833.

Shangary, S., Qin, D., & McEachern, D. (2008). Temporal activation of p53 by a specific MDM2 inhibitor is selectively toxic to tumors and leads to complete tumor growth inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105. doi:10.1073/pnas.0708917105

Shangary, S., & Wang, S. (2009). Small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 protein-protein interaction to reactivate p53 function: a novel approach for cancer therapy. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 49(1), 223-241.

Sherr, C. J., Bertwistle, D., Den Besten, W., Kuo, M. L., Sugimoto, M., Tago, K., ... & Roussel, M. F. (2005, January). p53-Dependent and-independent functions of the Arf tumor suppressor. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 70, pp. 129-137). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Siegel, S. E., Stock, W., Johnson, R. H., Advani, A., Muffly, L., Douer, D., . . . Shah, B. (2018). Pediatric-inspired treatment regimens for adolescents and young adults with Philadelphia chromosome–negative acute lymphoblastic leukemia: a review. *JAMA oncology*, 4(5), 725-734.

Stein, A. S., Schiller, G., Benjamin, R., Jia, C., Zhang, A., Zhu, M., . . . Topp, M. S. (2019). Neurologic adverse events in patients with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia treated with blinatumomab: management and mitigating factors. *Annals of hematology*, 98, 159-167.

Stein, E. M., Chromik, J., & Carpio, C. (2021). Siremadlin (HDM201) is well tolerated and demonstrates clinical activity in patients with acute myeloid leukemia who have relapsed after allogeneic stem cell transplantation: a subset analysis of safety and preliminary efficacy. *Blood*, 138. doi:10.1182/blood-2021-149751

Stein, E. M., DeAngelo, D. J., & Chromik, J. (2022). Results from a first-in-human phase I study of siremadlin (HDM201) in patients with advanced wild-type TP53 solid tumors and acute leukemia. *Clin Cancer Res*, 28. doi:10.1158/1078-0432.CCR-21-1295

Stock, W., Johnson, J. L., Stone, R. M., Kolitz, J. E., Powell, B. L., Wetzler, M., . . . Vardiman, J. W. (2013). Dose intensification of daunorubicin and cytarabine during

treatment of adult acute lymphoblastic leukemia: results of Cancer and Leukemia Group B Study 19802. *Cancer*, 119(1), 90-98.

Stokke, J. L., & Bhojwani, D. (2021). Antibody–drug conjugates for the treatment of acute pediatric leukemia. *Journal of clinical medicine*, 10(16), 3556.

Su, W. J., Fang, J. S., Cheng, F., Liu, C., Zhou, F., & Zhang, J. (2013). RNF2/Ring1b negatively regulates p53 expression in selective cancer cell types to promote tumor development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(5), 1720-1725.

Sudo, T., Nishikawa, S., Ohno, N., Akiyama, N., Tamakoshi, M., Yoshida, H., & Nishikawa, S.-I. (1993). Expression and function of the interleukin 7 receptor in murine lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(19), 9125-9129.

Sun, J., Wei, Q., Zhou, Y., Wang, J., Liu, Q., & Xu, H. (2017). A systematic analysis of FDA-approved anticancer drugs. *BMC systems biology*, 11, 1-17.

Tallman, M. S., Gilliland, D. G., & Rowe, J. M. (2005). Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood*, 106(4), 1154-1163.

Teachey, D. T., & Pui, C.-H. (2019). Comparative features and outcomes between paediatric T-cell and B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet Oncology*, 20(3), e142-e154.

Teachey, D. T., & Pui, C. H. (2019). Comparative features and outcomes between paediatric T-cell and B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol*, 20(3), e142-e154. doi:10.1016/s1470-2045(19)30031-2

Terwilliger, T., & Abdul-Hay, M. (2017). Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood cancer journal*, 7(6), e577-e577.

Testa, U., & Riccioni, R. (2007). Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 92(1), 81-94.

Thomas, D. A., O'Brien, S., Faderl, S., Garcia-Manero, G., Ferrajoli, A., Wierda, W., . . . Bueso-Ramos, C. (2010). Chemoimmunotherapy with a modified hyper-CVAD and rituximab regimen improves outcome in de novo Philadelphia chromosome–negative precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 28(24), 3880-3889.

- Thomasova, D., Mulay, S. R., Bruns, H., & Anders, H.-J.** (2012). p53-independent roles of MDM2 in NF- κ B signaling: implications for cancer therapy, wound healing, and autoimmune diseases. *Neoplasia*, 14(12), 1097-1101.
- Thoreen, C. C., Kang, S. A., Chang, J. W., Liu, Q., Zhang, J., Gao, Y., . . . Gray, N. S.** (2009). An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *Journal of Biological Chemistry*, 284(12), 8023-8032.
- Townsend, E. C., DeSouza, T., & Murakami, M. A.** (2015). The MDM2 inhibitor NVP-CGM097 is highly active in a randomized preclinical trial of B-cell acute lymphoblastic leukemia patient derived xenografts. *Blood*, 126. doi:10.1182/blood.V126.23.797.797
- Trino, S., De Luca, L., Laurenzana, I., Caivano, A., Del Vecchio, L., Martinelli, G., & Musto, P.** (2016). P53-MDM2 pathway: Evidences for a new targeted therapeutic approach in B-acute lymphoblastic leukemia. *Frontiers in Pharmacology*, 7, 491.
- Uy, G. L., Assouline, S., & Young, A. M.** (2020). Phase 1 study of the MDM2 antagonist RO6839921 in patients with acute myeloid leukemia. *Investig New Drugs*, 38. doi:10.1007/s10637-020-00907-4
- Vaitkevičienė, G., Forestier, E., Hellebostad, M., Heyman, M., Jonsson, O. G., Lähteenmäki, P. M., . . . Oncology.** (2011). High white blood cell count at diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukaemia: biological background and prognostic impact. Results from the NOPHO ALL-92 and ALL-2000 studies. *European journal of haematology*, 86(1), 38-46.
- van den Brand, M., Rijntjes, J., Möbs, M., Steinhilber, J., van der Klift, M. Y., Heezen, K. C., . . . Darzentas, N.** (2021). Next-Generation Sequencing–Based Clonality Assessment of Ig Gene Rearrangements: A Multicenter Validation Study by EuroClonality-NGS. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 23(9), 1105-1115.
- van Dongen, J. J., van der Velden, V. H., Brüggemann, M., & Orfao, A.** (2015). Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 125(26), 3996-4009.
- Van Etten, R. A.** (2001). Pathogenesis and treatment of Ph+ leukemia: recent insights from mouse models. *Current opinion in hematology*, 8(4), 224-230.

- Van Vlierberghe, P., Palomero, T., Khiabani, H., Van der Meulen, J., Castillo, M., Van Roy, N., . . . Toribio, M. L.** (2010). PHF6 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature genetics*, 42(4), 338-342.
- Vardiman, J. W., Thiele, J., Arber, D. A., Brunning, R. D., Borowitz, M. J., Porwit, A., . . . Tefferi, A.** (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 114(5), 937-951.
- Vassilev, L. T.** (2007). MDM2 inhibitors for cancer therapy. *Trends Mol Med*, 13(1), 23-31. doi:10.1016/j.molmed.2006.11.002
- Vassilev, L. T., Vu, B. T., & Graves, B.** (2004). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*, 303. doi:10.1126/science.1092472
- Vassilev, L. T., Vu, B. T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., . . . Klein, C.** (2004). In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*, 303(5659), 844-848.
- Vivo, M., Matarese, M., Sepe, M., Di Martino, R., Festa, L., Calabro, V., . . . Pollice, A.** (2015). MDM2-mediated degradation of p14ARF: a novel mechanism to control ARF levels in cancer cells. *PLoS ONE*, 10(2), e0117252.
- Vora, A., Andreano, A., Pui, C.-H., Hunger, S. P., Schrappe, M., Moericke, A., . . . Goulden, N.** (2016). Influence of cranial radiotherapy on outcome in children with acute lymphoblastic leukemia treated with contemporary therapy. *Journal of Clinical Oncology*, 34(9), 919-926.
- Vousden, K. H., & Prives, C.** (2009). Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell*, 137(3), 413-431.
- Vu, B., Wovkulich, P., Pizzolato, G., Lovey, A., Ding, Q., Jiang, N., . . . Wen, Y.** (2013). Discovery of RG7112: a small-molecule MDM2 inhibitor in clinical development. *ACS medicinal chemistry letters*, 4(5), 466-469.
- Wade, M., Li, Y.-C., & Wahl, G. M.** (2013). MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 13(2), 83-96.
- Wang, S., Sun, W., & Zhao, Y.** (2014). SAR405838: an optimized inhibitor of MDM2-p53 interaction that induces complete and durable tumor regression. *Cancer Res*, 74. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-0799

- Wang, S., Zhao, Y., Aguilar, A., Bernard, D., & Yang, C. Y.** (2017). Targeting the MDM2-p53 protein-protein interaction for new cancer therapy: progress and challenges. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 7. doi:10.1101/cshperspect.a026245
- Wang, X., & Jiang, X.** (2012). Mdm2 and MdmX partner to regulate p53. *FEBS letters*, 586(10), 1390-1396.
- Watanabe, T., Hotta, T., Ichikawa, A., Kinoshita, T., Nagai, H., Uchida, T., . . . Saito, H.** (1994). The MDM2 oncogene overexpression in chronic lymphocytic leukemia and low-grade lymphoma of B-cell origin.
- Watanabe, T., Ichikawa, A., Saito, H., & Hotta, T.** (1996). Overexpression of the MDM2 oncogene in leukemia and lymphoma. *Leukemia & lymphoma*, 21(5-6), 391-397.
- Wei, G., Wang, J., Huang, H., & Zhao, Y.** (2017). Novel immunotherapies for adult patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Journal of hematology & oncology*, 10, 1-13.
- Wu, C.-E., Chen, C.-P., Pan, Y.-R., Jung, S.-M., Chang, J. W.-C., Chen, J.-S., . . . Lunec, J.** (2022). In vitro and in vivo study of GSK2830371 and RG7388 combination in liver adenocarcinoma. *American Journal of Cancer Research*, 12(9), 4399.
- Wu, D., & Prives, C.** (2018). Relevance of the p53-MDM2 axis to aging. *Cell Death Differ*, 25. doi:10.1038/cdd.2017.187
- Wu, X., Bayle, J. H., Olson, D., & Levine, A. J.** (1993). The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes & development*, 7(7a), 1126-1132.
- Xu, H., Zhang, Z., Li, M., & Zhang, R.** (2010). MDM2 promotes proteasomal degradation of p21Waf1 via a conformation change. *Journal of Biological Chemistry*, 285(24), 18407-18414.
- Xiong, J., Yang, Q., Li, J., & Zhou, S.** (2014). Effects of MDM2 inhibitors on vascular endothelial growth factor-mediated tumor angiogenesis in human breast cancer. *Angiogenesis*, 17, 37-50.
- Yang, Y., Ludwig, R. L., Jensen, J. P., Pierre, S. A., Medaglia, M. V., Davydov, I. V., . . . Phillips, A. C.** (2005). Small molecule inhibitors of HDM2 ubiquitin ligase activity stabilize and activate p53 in cells. *Cancer cell*, 7(6), 547-559.

- Yi, H., Yan, X., Luo, Q., Yuan, L., Li, B., Pan, W., . . . Zhang, Y.** (2018). A novel small molecule inhibitor of MDM2-p53 (APG-115) enhances radiosensitivity of gastric adenocarcinoma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 37, 1-10.
- Yilmaz, M., Richard, S., & Jabbour, E.** (2015). The clinical potential of inotuzumab ozogamicin in relapsed and refractory acute lymphocytic leukemia. *Therapeutic Advances in Hematology*, 6(5), 253-261.
- Young, J. S., & Simmons, J. W.** (2017). Chemotherapeutic medications and their emergent complications. *Hematology/Oncology Clinics*, 31(6), 995-1010.
- Yu, B., & Liu, H.-M.** (2018). The development of new spirooxindoles targeting the p53–MDM2 protein-protein interactions for cancer therapy. *Targeting Protein-Protein Interactions by Small Molecules*, 213-237.
- Yu, S., Qin, D., & Shangary, S.** (2009). Potent and orally active small-molecule inhibitors of the MDM2-p53 interaction. *J Med Chem*, 52. doi:10.1021/jm901400z
- Yümlü, K. (2015). Çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemileri. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 16(1), 83-90.
- Zanjirband, M., Rahgozar, S., & Aberuyi, N.** (2023). miR-16-5p enhances sensitivity to RG7388 through targeting PPM1D expression (WIP1) in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Drug Resistance*, 6(2), 242.
- Zdzalik, M., Pustelny, K., Kedracka-Krok, S., Huben, K., Pecak, A., Wladyka, B., ... & Dubin, G.** (2010). Interaction of regulators Mdm2 and Mdmx with transcription factors p53, p63 and p73. *Cell cycle*, 9(22), 4584-4591.
- Zenatti, P. P., Ribeiro, D., Li, W., Zuurbier, L., Silva, M. C., Paganin, M., . . . Cardoso, B. A.** (2011). Oncogenic IL7R gain-of-function mutations in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nature genetics*, 43(10), 932-939.
- Zenz, T., Vollmer, D., Trbusek, M., Smardova, J., Benner, A., Soussi, T., . . . Fuge, M.** (2010). TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia*, 24(12), 2072-2079.
- Zhang, R., & Wang, H.** (2000). MDM2 oncogene as a novel target for human cancer therapy. *Current pharmaceutical design*, 6(4), 393-416.

- Zhang, Z., & Zhang, R.** (2008). Proteasome activator PA28 γ regulates p53 by enhancing its MDM2-mediated degradation. *The EMBO journal*, 27(6), 852-864.
- Zhao, Y., Liu, L., & Sun, W.** (2013). Diastereomeric spirooxindoles as highly potent and efficacious MDM2 inhibitors. *J Am Chem Soc*, 135. doi:10.1021/ja3125417
- Zhou, M., Gu, L., Abshire, T., Homans, A., Billett, A., Yeager, A., & Findley, H.** (2000). Incidence and prognostic significance of MDM2 oncoprotein overexpression in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 14(1), 61-67.
- Zhou, Z., Zalutsky, M. R., & Chitneni, S. K.** (2021). Fluorine-18 labeling of the MDM2 inhibitor RG7388 for PET imaging: Chemistry and preliminary evaluation. *Molecular pharmaceutics*, 18(10), 3871-3881.
- Zhu, H., Gao, H., Ji, Y., Zhou, Q., Du, Z., Tian, L., . . . Zhou, Z.** (2022). Targeting p53–MDM2 interaction by small-molecule inhibitors: Learning from MDM2 inhibitors in clinical trials. *Journal of hematology & oncology*, 15(1), 91.
- Zhuang, C., Miao, Z., Zhu, L., Dong, G., Guo, Z., Wang, S., . . . Sheng, C.** (2012). Discovery, synthesis, and biological evaluation of orally active pyrrolidone derivatives as novel inhibitors of p53–MDM2 protein–protein interaction. *Journal of medicinal chemistry*, 55(22), 9630-9642.