T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İMATİNİB-DİRENÇLİ LÖSEMİK HÜCRELERİN ATİMİK FARELERDE IN VIVO İZLENMESİ, HİSTOPATOLOJİK ANALİZİ VE LÖSEMİK KÖK HÜCRE BELİRTEÇLERİ AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ

Pelin YALÇIN

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2019

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc 2016970099

TC.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İMATİNİB-DİRENÇLİ LÖSEMİK HÜCRELERİN ATİMİK FARELERDE IN VIVO İZLENMESİ, HİSTOPATOLOJİK ANALİZİ VE LÖSEMİK KÖK HÜCRE BELİRTEÇLERİ AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Pelin YALÇIN

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Zeynep YÜCE

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc 2016970099

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans programı öğrencisi Tıbbi Biyoloji ve Genetik **Pelin YALÇIN 'İMATİNİB-DİRENÇLİ LÖSEMİK HÜCRELERİN ATİMİK FARELERDE IN VİVO İZLENMESİ, HİSTOPATOLOJİK İNCELENMESİ VE LÖSEMİK KÖK HÜCRE BELİRTEÇLERİ AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ'** konulu Yüksek Lisans tezini …….tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

Doç. Dr. Zeynep YÜCE
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

BAŞKAN

Prof. Dr. Hakkı Ogün SERCAN
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Anabilim Dalı

ÜYE

Dr.Öğr.Üyesi Melek PEHLİVAN
İzmir Katip Çelebi Üniversitesi
SHMY
Tıbbi Hizmetler ve Teknikler
Bölümü

ÜYE

Prof.Dr. Sefa KIZILDAĞ
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji ve Genetik
Anabilim Dalı

YEDEK ÜYE

Prof.Dr.Gülperi ÖKTEM
Ege Üniversitesi
Tıp Fakültesi
Histoloji-Embriyoloji
Anabilim Dalı

YEDEK ÜYE

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER I
TABLO DİZİNİ IV
ŞEKİL DİZİNİ V
KISALTMALAR VIII
TEŞEKKÜR X
ÖZET 1
ABSTRACT 2
1. GİRİŞ VE AMAÇ 3
2. GENEL BİLGİLER 4

2.1. KRONİK MYELOİD LÖSEMİ 4

2.1.1. Epidemiyoloji, Klinik Özellikler Ve Tanı 5
2.1.2. Moleküler Patogenez 6
2.1.2.1. Philadelphia Kromozomu 6
2.1.2.2. ABL1 ve BCR Genleri 8
2.1.3. Hücresel Patogenez 9

2.2. KRONİK MYELOİD LÖSEMİ VE TEDAVİ 11

2.2.1. Konvansiyonel Tedaviler ve Kök Hücre Transplantasyonu 12
2.2.2. Tirozin Kinaz İnhibitörleri 14
2.2.2.1. Birinci Nesil TKİ- İmatinib 14
2.2.2.2. İkinci Nesil TKİ'ler 15
2.2.2.3. Üçüncü Nesil TKİ'leri 16

2.3. KRONİK MYELOİD LÖSEMİ ve İMATİNİBE DİRENÇ 16

2.3.1. Bcr- Abl Bağımlı Direnç Mekanizmaları 17
2.3.2. Bcr- Abl Bağımsız Direnç Mekanizmaları 18
2.3.3. Lösemik Kök Hücre ve İmatinib Direnci 19

2.4. KRONİK MYELOİD LÖSEMİ ve IN VIVO MODELLER 21

2.4.1. Retroviral transdüksiyon / transplantasyon modeli 21
2.4.2. SCLtTA / BCR-ABL transgenik modeli 22
2.4.3. Xenograft Modelleri 23

2.5. İMATİNİB-DİRENÇLİ HÜCRE HATTI (K562-Ir) ÖZELLİKLERİ 25

2.6. IVIS® GÖRÜNTÜLEME 29

3. GEREÇ VE YÖNTEM 31

3.1. ARAŞTIRMANIN TİPİ 31

3.2. ARAŞTIRMANIN YERİ VE ZAMANI 31

3.3. ARAŞTIRMANIN EVRENI VE ÖRNEKLEMİ / ÇALIŞMA GRUPLARI 31

3.4. ÇALIŞMA MATERYALİ 32

3.5. ARAŞTIRMANIN DEĞİŞKENLERİ 32

3.6. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI 32

3.6.1. Hücre Hattı ve Hücre Kültürü 33
3.6.1.1. K-562 Hücre hattı 33
3.6.1.2. K562- Ir Hücre hattı 33
3.6.1.3. Besi Ortamı Hazırlanması ve Hücre Hatlarının İdamesi 33
3.6.1.4. Hücre Dondurma Ortamı Hazırlanması ve Dondurma Yöntemi 34
3.6.2. Kullanılan Tirozin Kinaz İnhibitörü ve Antibiyotik 34
3.6.3. Hücre Ölümü Yöntemleri 34
3.6.3.1. Tripan Mavisi Canlılık Testi 34
3.6.4. Antibiyotik (Puromycin) Seleksiyonu İçin Konsantrasyon Tayini 35
3.6.5. Atasal ve Dirençli Hücrelerin Lentivirüs ile Stabil Transdüksiyonu 36
3.6.5.1. Floresan Mikroskop Görüntüleme Çalışmaları 39
3.6.5.2. Atasal Hücrelerin In vitro Biyolüminesans Ölçümü 39
3.6.5.3. Akış Sitometrisi Cihazı(Flow Cytometry) ile Yeşil Floresan Protein Ölçümü 41
3.6.5.4. FACS İle Dirençli Hücrelerin Ayrımlanması İşlemi 42
3.6.6. In vivo Fare Deneyleri 44
3.6.6.1. Deney Gruplarına Uygulanacak Şekilde İlaçların Hazırlanması 45
3.6.6.2. Atimik Nude Fare Gruplarının Oluşturulması ve İlaç Başlanması 47
3.6.6.3. İnokülasyon Öncesi Akış Sitometrisi Cihazı ile Hücre Canlılığı ve GFP Değerlendirmesi 48
3.6.6.4. İnokülasyon Öncesi FACS İle Dirençli Hücrelerin Ayrımlanması İşlemi 49
3.6.6.5. İnokülasyon İçin Atasal ve Dirençli Hücrelerin Hazırlanması 50
3.6.6.6. Atimik Nude Farelere Hücre İnokulasyonu 51
3.6.6.7. IVIS Görüntüleme Cihazı ile In vivo Biyolüminesans Ölçümü 52
3.6.6.7.1. D-Lusiferin Hazırlanması 52
3.6.6.7.2. In vivo Biyolüminesans Ölçümü 53
3.6.7. IVIS Görüntüleme Cihazı İle in vitro Biyolüminesans Ölçüm 57
3.6.8. In vivo Deneylerin Sonlandırılması ve Ex-vivo Organ Görüntüleme 60

3.7. ARAŞTIRMA PLANI ve TAKVİMİ 61

3.8. VERILERIN DEĞERLENDİRİLMESİ 61

3.9. ARAŞTIRMANIN SINIRLILIKLARI 62

3.10. ETIK KURUL ONAYI....63
4. BULGULAR....64
4.1. ATASAL VE DİRENÇLİ HÜCRELER 4 µg / ml PUROMYCİN'DE ÖLMEKTEDİR....64
4.2. ATASAL VE DİRENÇLİ HÜCRELERİN LENTİVİRAL TRANSDÜKSİYONU GERÇEKLEŞTİRİLDİ....66
4.2.1. Floresan Mikroskop Görüntüleme Sonuçları....66
4.2.2. Atasal Hücrelerin In vitro Biyolüminesans Ölçüm Sonucu....67
4.3. DİRENÇLİ HÜCRELERİN AKIM SİTOMETRİ VE AYRIŞTIRMA (FACS) SONUÇLARI....68
4.4. IN VITRO BIYOLÜMİNESANS - IVIS GÖRÜNTÜLEME SONUÇLARI....76
4.5. IN VİVO BİYOLÜMİNESANS - IVIS GÖRÜNTÜLEME SONUÇLARI....77
5. TARTIŞMA....87
6. SONUÇ VE ÖNERİLER....91
7. KAYNAKLAR....92
8. EKLER....96
8.1. Ek2: 9 Eylül Üniversitesi Etik Kurul....96
8.2. Ek3-Bilkent Üniversitesi Etik Kurul....97
8.3. Ek4: Pelin Yalçin Arbis Özgeçmiş....98

TABLO DİZİNİ

Tablo 1-Veri Toplama Araçlarının İş Akış Şeması Halinde Gösterimi..... 32
Tablo 2 - Araştırma Planı ve Takvimi 61

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1-Ph Kromozomu..... 4
Şekil 2-KML Hastalık Progresyonu. Her bir faz kemik iliğinde bulunan olgunlaşmamış hücrelerin (blastlar) sayısı ile karakterize edilir. 5
Şekil 3-BCR ve ABL1' in şematik gösterimi ve BCR- ABL1 kinaz. 6
Şekil 4-Hematopoetik Sistem Hiyerarşisi 11
Şekil 5-KML tedavi seçeneklerinin geçmişten günümüze gelişimi. 13
Şekil 6-BCR- ABL1' in aksiyon mekanizması ve İmatinib tarafından inhibisyonu. 14
Şekil 7-TKİ' lere dirençli KML hücrelerinin mekanizmaları. 17
Şekil 8-Tümör Heterojenite Teorileri Şematik Gösterimi 19
Şekil 9-In vivo KML modelleri 21
Şekil 10-IVIS in vivo görüntüleme işlem basamakları. 29
Şekil 11-IVIS görüntüleme prensibi 30
Şekil 12-Biyolüminesans in vivo görüntüleme. 30
Şekil 13-Lusiferaz eksprese eden lentiviral vektörün şematize gösterimi. 37
Şekil 14-In vitro biyolüminesans ölçüm için 96-kuyulu plate'e ekimin şematize edilmesi. 40
Şekil 15-In vitro deney basamaklarının şematize edilmesi. 44
Şekil 16-Atimik nude farelerin deney gruplarına ayrılması ve ilaç başlanması.... 48
Şekil 17-Deney gruplarına subkutan hücre inokülasyonu 52
Şekil 18-Atimik nude farelere anestezi uygulaması 54
Şekil 19-Atimik nude fareler için anestezi kutusu..... 55
Şekil 20-IVIS görüntüleme öncesi intraperitoneal (IP) D-lusiferin enjeksiyonu.. 55
Şekil 21-Görüntüleme için IVIS cihazına yerleştirilen atimik nude fareler 56
Şekil 22-Atimik nude farelerin IVC kafesler ile barındırıldıkları özel odalar. 56
Şekil 23-IVIS ile in vitro biyolüminesans ölçüm için 96 - kuyulu plate' e ekimin şematize edilmesi. 59
Şekil 24-Ex vivo görüntüleme örneği. 60

Şekil 25-Atasal K562 hücrelerinde 0,5 µg/ml,1 µg/ml,2 µg/ml,4µg/ml,8µg/ml ve10 µg/ml dozlarda puromycin uygulamaları sonrası 24, 48, 72, 96 ve 120 saatlik tripan mavisi canlılık testi sonuç grafiği. 65
Şekil 26-Dirençli K562- Ir hücrelerinde 0,5 µg/ml,1 µg/ml,2 µg/ml,4µg/ml,8µg/ml ve10 µg/ml dozlarda puromycin uygulamaları sonrası 24, 48, 72, 96 ve 120 saatlik tripan mavisi canlılık testi sonuç grafiği. 65
Şekil 27-K562-lenti ve K562-Ir- lenti hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri. 67
Şekil 28-K562-lenti hücrelerinin in vitro biyolüminesans ölçüm sonucu. 68
Şekil 29-K562- Ir- lenti-1.sort hücrelerinin transdüksiyon sonrası Flow Cytometri ve FACS ile GFP yüzde oranlarının gösterimi 69
Şekil 30-K562- Ir- lenti-2.sort hücrelerinin transdüksiyon sonrası Flow Cytometri ve FACS ile GFP yüzde oranlarının gösterimi 70
Şekil 31-İnokülasyon öncesi ayrımlanmayan K562- Ir- lenti – before sorted hücrelerinin Flow Cytometri ile Kontrolü 71
Şekil 32-İnokülasyon öncesi ayrımlanmayan K562- Ir- lenti – before sorted hücrelerinin 10 µg/ml ve 100 µg/ml puromycin uygulamaları sonrası 24, 72, 96 ve 120 saatlik Flow Cytometri ile GFP yüzde oranlarının kontrol sonuçları 72
Şekil 33-İnokülasyon öncesi ayrımlanan K562- Ir- lenti – after sorted hücrelerinin Flow Cytometri ile Kontrolü 73
Şekil 34-İnokülasyon öncesi ayrımlanan K562- Ir- lenti – after sorted hücrelerinin 10 µg/ml ve 100 µg/ml puromycin uygulamaları sonrası 24, 72, 96 ve 120 saatlik Flow Cytometry ile GFP yüzde oranlarının kontrol sonuçları 73
Şekil 35-K562-lenti Akış Stometri Sonucu 74
Şekil 36-K562-Ir-lenti Akış Stometri Sonucu 75
Şekil 37-K562- lenti, K562-Ir- lenti before sorted ve K562-Ir- lenti after sorted hücrelerinin IVIS görüntüleme ile in vitro biyolüminesans sonuçları. 77
Şekil 38-Subkutan deney gruplarının 0. Gün smoothing 'none' IVIS görüntülemesi 79
Şekil 39-Subkutan deney gruplarının 0. Gün smoothing '3 X 3' IVIS görüntülemesi 80

Şekil 40-Subkutan deney gruplarının 8. Gün smoothing ‘none’ IVIS görüntülemesi 80
Şekil 41-Subkutan deney gruplarının 8. Gün smoothing ‘3 X 3’ IVIS görüntülemesi 81
Şekil 42- Subkutan deney gruplarının 7. hafta smoothing ‘none’ IVIS görüntülemesi 82
Şekil 43-Subkutan deney gruplarının 7. hafta smoothing ‘3 X 3’ IVIS görüntülemesi 82
Şekil 44-Subkutan deney gruplarının 8. hafta smoothing ‘none’ IVIS görüntülemesi 83
Şekil 45-Subkutan deney gruplarının 8. hafta smoothing ‘none’ IVIS görüntülemesi 84
Şekil 46-Subkutan deney gruplarının 8. hafta smoothing ‘none’ ve ‘karın bölgesi’ IVIS görüntülemesi..... 85
Şekil 47-Subkutan deney gruplarının 8. hafta smoothing ‘3 X 3’ ve ‘karın bölgesi’ IVIS görüntülemesi..... 85

KISALTMALAR

ABL1 geni- Abelson geni

B- ALL- B hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi

BCR geni- Kırılma noktası küme bölgesi

CCyR- Tam sitogenetik yanıt

Cdc24- Siklin bağımlı kinaz 24

CHR- Tam hematolojik yanıt

CR- Sitogenetik yanıt

CSC- Kanser Kök Hücresi

DMSO- Dimetil sülfoksit

DNA- Deoksiribonükleik asit

ESMO- Avrupa Tıbbi Onkoloji Derneği

FDA- Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

FISH- Floresan in situ hibridizasyon

GAP- GTPaz Aktive edici Protein

GDP- Guanozin difosfat

GEF- Guanin Nükleotid değiştirici Faktör

GMP- Gronülosit makrofaj progenitör

GTP- Guanozin trifosfat

Hh yolağı- Hedgehod yolağı

HSC- Hematopoetik Kök Hücre

IL-1- İnterlökin-1

IL1RAP- İnterlökin1 reseptör aksesuar protein

IRIS- Uluslararası Randomize İnterferon ve STI571 Çalışması

KML- Kronik Myeloid Lösemi

LSC- Lösemik Kök Hücre

LT-HSC- Uzun dönemli hematopoetik kök hücre

mRNA- mesajcı RNA

MR- Moleküler yanıt

NOD- Obez olmayan diyabetik

PCR- Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PCyR- Kısmi sitogenetik yanıt

Ph- Philedelphia kromozomu

qRT-PCR- Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

RNA- Ribonükleik asit

SAHA- Suberoilanilid Hidroksamik Asit

SCID- Ciddi kombine immün yetmezlik

TKİ- Tirozin Kinaz İnhibitörü

° C- Santigrat

kb- kilobaz

kD- kilodalton

µl- mikrolitre

µg- mikrogram

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilimsel eğitimime katkı sağlayan başta Doç.Dr. Zeynep YÜCE olmak üzere tüm Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilimdalı öğretim üyelerine teşekkür ederim. Doç.Dr. Zeynep YÜCE'ye akademik bilgi ve tecrübesiyle liderlik ettiği, bilimsel olarak ilham verdiği, eleştirel ve yapıcı bir tartışma ortamı ile daima çözüm sunduğu, laboratuvarında çalışma imkanı verdiği ve tecrübe edinme olanağı kazandırdığı ve bu süreçteki ilgi ve hoşgörüsünden dolayı teşekkür ederim. Tez dönemimin her aşamasında yardımını benden esirgemeyen, bilimsel ve teknik anlamda gelişimime katkı sağlayan Dr.Seda BAYKAL KÖSE'ye teşekkür ederim. Dostlukları ve bilimsel paylaşımları için Öykü GÖNÜL GEYİK, Hande EFE ve Özge UYSAL'a teşekkür ederim. Yüksek lisans tezim süresince akım sitometrisi çalışmalarımda ki yardımı nedeniyle Halil ATEŞ'e; in vivo fare deneyleri, hücre aşılama çalışmaları ve IVIS görüntüleme çalışmalarında ki destekleri için Prof.Dr.İhsan GÜRSEL, doktora öğrencisi Muzaffer YILDIRIM ve veteriner hekim Gamze AYKUT'a teşekkür ederim. Dokuların histolojik kesitlerinin incelenmesi ve analizlerinde yardımı nedeniyle Prof.Dr.Erdener ÖZER'e ederim. Tez yazım sürecindeki yardımları ve her daim dostluğu nedeniyle yüksek mimar Burçin ERGUNDA AKOĞLU'na teşekkür ederim. Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerinden dolayı aileme ve eşime teşekkür ederim.

Pelin YALÇIN

İMATİNİB- DİRENÇLİ LÖSEMİK HÜCRELERİN ATİMİK FARELERDE IN VIVO İZLENMESİ, HİSTOPATOLOJİK ANALİZİ VE KÖK HÜCRE BELİRTEÇLERİ AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Balçova İzmir Türkiye,

pelin_karadag@yahoo.com

ÖZET

Kronik Myeloid Lösemi, insanda 9. ve 22. kromozomların uzun kolları arasında gerçekleşen karşılıklı translokasyon sonucu oluşan hematopoetik klonal bir kök hücre hastalığıdır. Bu translokasyon sonucu ortaya çıkan füzyon protein, lösemik kuşakların genişlemesini sağlayan sürekli bir tirozin kinaz aktivitesi gösterir. Hedefe yönelik tirozin kinaz inhibitörlerinden biri olan İmatinib, bu füzyon proteinin enzimatik aktivitesini engeller ancak uzun dönemde hastalar bu moleküle karşı sekonder direnç geliştirir. Projemizin amacı, imatinib-dirençli K562-Ir hücrelerinin, hücre davranışı ve tümör oluşturma kapasitesinin değerlendirilebilmesi için, atimik farelere subkutan yolla atasal ve imatinib-dirençli hücrelerin aşılanarak, canlı sistemdeki davranış farklarının araştırılmasıdır.

Atasal ve imatinib-dirençli hücreler lusiferaz geni ve yeşil floresan protein geni içeren bir lentivirüs ile in vitro işaretlenmesi amacıyla stabil transdüksiyon deneyleri yapılmıştır. İşaretlenen bu iki hücre populasyonu, imatinib varlığı yada yokluğunda, Balb-c/ Nude farelere subkutan olarak aşılanmıştır. Deney süresince belirli aralıklarla lusiferaz assay yapılarak, IVIS görüntülemede biyolüminesans ölçümler alınmış ve kıyaslanmıştır.

Sonuç olarak, imatinib dirençli hücrelerimizin lentivirüs ile stabil transfeksiyonunda zamanla puromisine dirençli alt populasyonların ortaya çıktığı, in vivo atimik nude farelerde dokuda lokalize olmak yerine yayılım göstererek atasal hücrelere oranla daha farklı davranış sergilediği sonucuna varılmıştır. Bulgularımızın, KML biyolojisinde ilaç dirençli hücre populasyonlarının biyolojisinin anlaşılmasına katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler; kronik myeloid lösemi, imatinib, ilaç direnci, lösemik kök hücre, tümörojenez

IN- VIVO TRACKING, HISTOPATHOLOGICAL ANALYSES AND LEUKEMIC STEM CELL MARKERS ASSESSMENT OF IMATINIB- RESISTANT LEUKEMIC CELLS IN ATIMIC MICE

Dokuz Eylul University Health Sciences Institute, Department of Medical Biology

Balcova- Izmir/ Turkey,

pelin_karadag@yahoo.com

ABSTRACT

Chronic Myeloid Leukemia is a hematopoietic clonal stem cell disease that occurs as a result of respirocal translocation between the long arms of chromosomes 9 and 22. The fusion protein resulting from this translocation exhibits a continuous tyrosine kinase activity that allows expansion of the leukemic lines. Imatinib, one of the targeted tyrosine kinase inhibitors, inhibits the enzymatic activity of this fusion protein, but in the long term patients develop secondary resistance to this molecule. The aim of our project is to investigate the behavioral differences between imatinib-resistant K562-Ir cells and ancestral cells that in live system by inoculation the ancestral and imatinib-resistant cells subcutaneously into athymic mice in order to evaluate cell behavior and tumor formation capacity.

In vitro stable transduction assays were performed to mark the imatinib-resistant and ancestral cells with a lentivirus that containing the luciferase gene and the green fluorescent protein gene. These two marked populations were inoculated subcutaneously to Balb-c / Nude mice in the presence or absence of imatinib. Bioluminescence measurements were taken and compared in IVIS imaging by using luciferase assay with specific intervals throughout the experiment.

As a result, we concluded that in the stable transfection of imatinib-resistant cells with lentivirus, during experimental procedures puromycine resistant subpopulations have emerged, and they exhibit different behaviors compared to ancestral cells in vivo atimic nude mice rather than localized in tissue.

Keywords; chronic myeloid leukemia, imatinib, drug resistance, leukemic stem cell, tumorogenesis

1. GİRİŞ VE AMAÇ

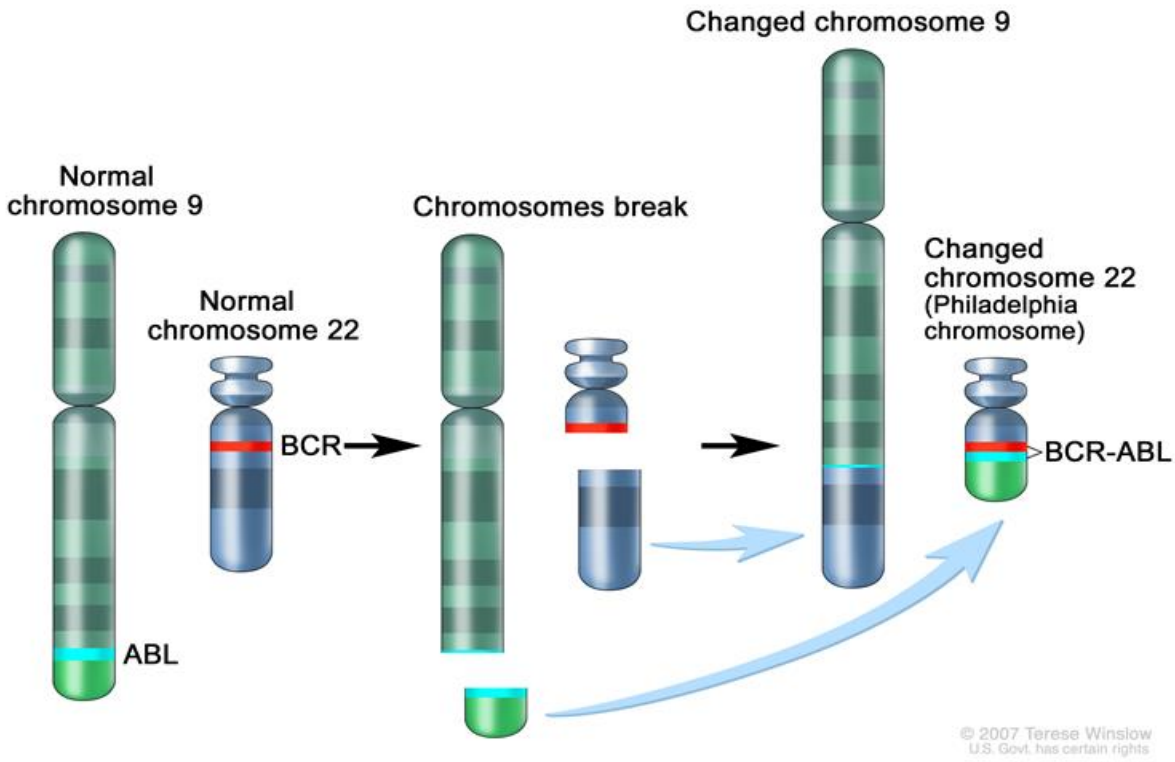
KML tüm yetişkin lösemilerin yaklaşık %15'ini oluşturur ve BCR-ABL füzyon onkogeni ile karakterize edilen hematopoietik bir kök hücre hastalığıdır. 9 ve 22. kromozomlar arasındaki respirokal translokasyon sonucu BCR-ABL füzyon geni oluşur ve bu gen sürekli tirozin kinaz aktivitesi gösteren, 210 kD ağırlığındaki BCR-ABL füzyon proteinini kodlar. BCR-ABL onkoproteini hücrelere sürekli bir yaşam sinyali sağlarken, anormal şekilde aktive olan bu tirozin kinaz, aşağı yönlü sinyal yolaklarını bozarak proliferasyonun artmasına, hücre diferansiyasyonunun bozulmasına ve hücre ölümüne karşı dirence neden olur. BCR-ABL tirozin kinaz proteininin enzimatik aktivitesini durdurmayı hedefleyen tirozin kinaz inhibitörleri (TKİ' ler), KML hastaları için hedefe yönelik en başarılı tedavilerdir. Birinci nesil TKİ olan imatinib (Glivec), KML'yi ölümcül bir hastalıktan, kronik ve yönetilebilir bir hastalığa dönüştürmüştür. Ancak uzun dönemde ortaya çıkan tedavi direnci veya intoleransının hastaların üçte birini etkilediği saptanmıştır. Bu nedenle direncin altında yatan nedenleri anlamak ve KML biyolojisine olan katkısının belirlenmesi, hastalıkla mücadelede son derece önemli bir adımdır.

Yüksek lisans tezim kapsamında, Doç. Dr. Zeynep YÜCE danışmanlığı altında Seda BAYKAL KÖSE'nin doktora tezi (DEU.HSI.PhD- 2010970090) çalışmalarında, K562 insan lösemik hücre hattından klonal seçilimle elde edilen imatinib-dirençli (K562-Ir) hücre hattı kullanıldı. Çalışmalarımızda, bu TKİ dirençli hücre hattı yardımıyla atasal ve imatinib-dirençli hücrelerin canlı sistemlerde davranış farklılıklarını incelemeyi hedefledik. Bu çalışmadan elde edilen verilerin KML ve ilaç direnci biyolojisinin anlaşılmasına katkı sağlaması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KRONİK MYELOİD LÖSEMİ

Kronik myeloid lösemi(KML), kemik iliğinde bulunan hematopoetik kök hücreden köken alan ve aşırı granülosit artışı ile karakterize edilen myeloproliferatif klonal bir hastalıktır. KML'deki tanısal ve karakteristik genetik anormallik Philadelphia (Ph+) kromozomudur.[1] Ph+ kromozomu, malign kökenli spesifik bir insan hastalığı ile ilişkilendirilen ilk kromozom anomalisidir.[2] (Şekil-1)



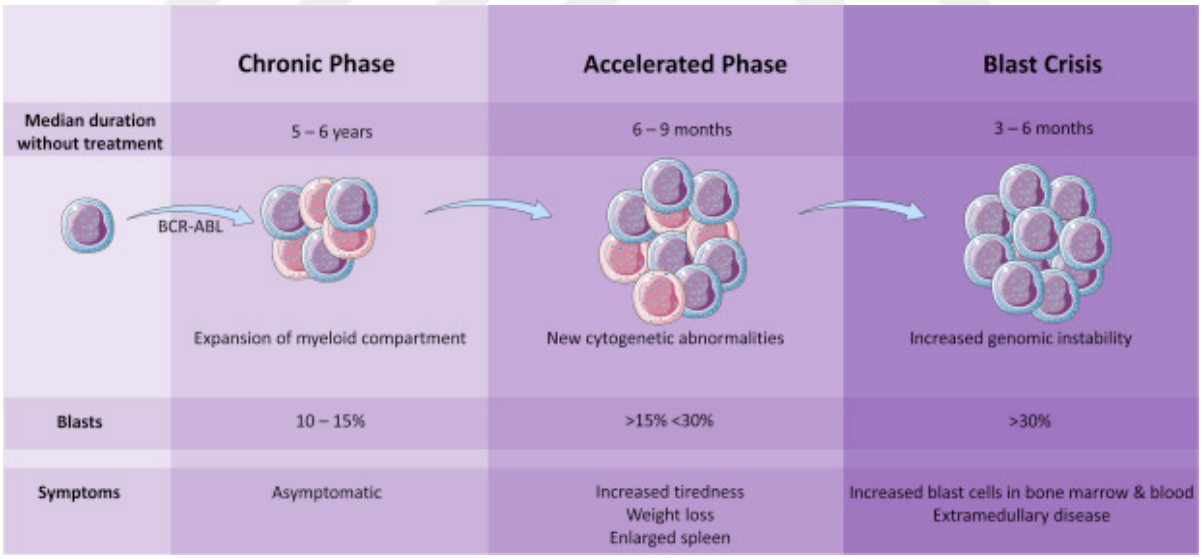
Şekil 1-Ph Kromozomu

(National Cancer Institute, Dictionary of Cancer Terms, Terese Winslow 2007)

2.1.1. Epidemiyoloji, Klinik Özellikler Ve Tanı

KML dünya genelinde yıllık olarak, 100.000 erişkinde 1-1,5 vaka insidansına sahiptir. Bu vakaların % 50 si 65 yaşından büyük erişkinleri işaret eder ancak her yaşta ortaya çıkabilir.[1]

KML kronik faz, akselere (hızlanmış) faz ve blastik faz olmak üzere üç temel evreden oluşur. Hastalık % 85 kronik fazda, %15 daha agresif seyreden akselere yada blastik fazda teşhis edilir.[1] Kronik fazda, myeloid progenitör hücrelerin sayısı artarken, farklılaşma devam eder ve periferik kanda olgun granülositler görülür[1,3]. Ancak akselere fazda, terminal farklılaşma hızla kaybolur ve trombositoz, bazofili ve çoklu sitogenetik farklılıklar bu tabloya eklenir[1,3]. Blast fazı ise olgunlaşmamış blast hücrelerinin sayıca önemli derecede arttığı bir fazdır. Bu faz, kemik iliği yada periferik kanda %30' un üzerinde lösemik hücre bulunmasıyla karakterizedir[13]. Bu nedenle periferik kan ve kemik iliği blast yüzdesi evreleme için önemlidir. Blast fazı, ölümcül tedavi direncinin sıklığı ve hızla gelişmesi nedeniyle, kötü prognoza sahip akut lösemiler gibi davranır. Tedavi edilmeyen KML hastalarında ortalama sağkalım 5-7 yıldır[1,3].(Şekil-2)



Şekil 2-KML Hastalık Progresyonu. Her bir faz kemik iliğinde bulunan olgunlaşmamış hücrelerin (blastlar) sayısı ile karakterize edilir. [4]

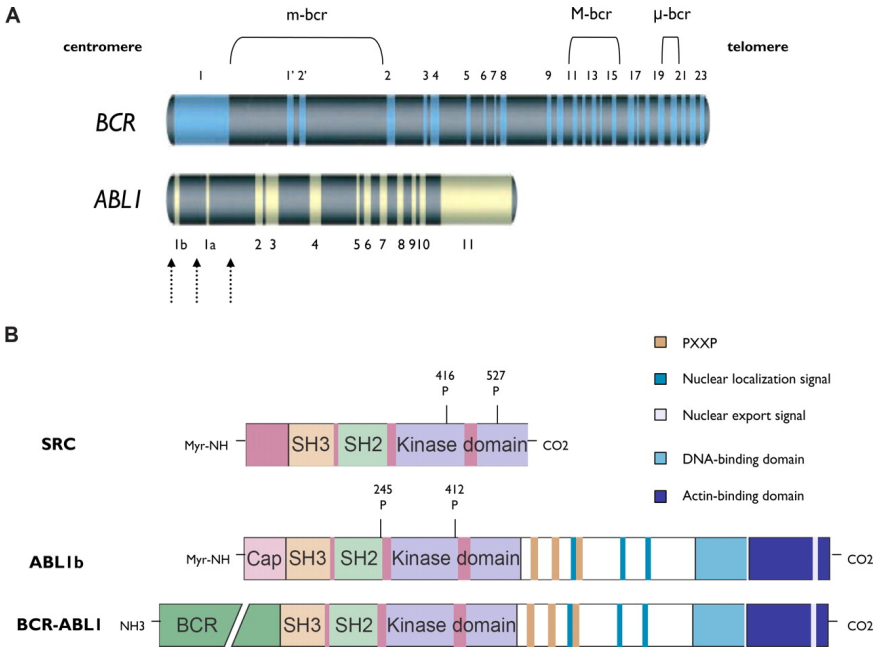
KML' li hastaların %30' u asemptomatiktir ve tanı kan sayımında tesadüfen saptanan lökositoz bulgusu sonrasında konur[1]. Periferik yaymada nötrofiller, bazofiller, eozinofiller ve bu hücrelerin prekürsörlerini içeren myeloid hücrelerin tüm kompartmanlarının genişlediği

görülür. Klinikte gözlenen semptomlar hastalığa spesifik değildir, splenomegali en sık karşılaşılan bulgudur. Bunun dışında gece terlemesi, spontan kanama veya morarma, halsizlik, kilo kaybı ve gece terlemesi gibi rahatsızlıklar görülebilir. Tanı için Ph+ kromozomu, FISH ve konvansiyonel sitogenetik teknikler yardımıyla saptanır[1]. Ayrıca BCR- ABL füzyon geni, periferik kan mononükleer hücrelerinin kalitatif polimeraz zincir reaksiyonu ile (PCR) gösterilebilir[1].

2.1.2. Moleküler Patogenez

2.1.2.1. *Philadelphia Kromozomu*

Ph kromozomu, 9. ve 22. kromozomların uzun kolları arasında gerçekleşen karşılıklı translokasyonda -t(9;22)(q34;q11)- derive 22. kromozoma verilen isimdir. Translokasyon sonucu BCR ve ABL1 genlerinin kırıldıkları bölgelerden birleşerek, BCR-ABL1 ve ABL-BCR kimerik genlerini oluşturur[5]. BCR-ABL1 onkogeni tarafından kodlanan farklı füzyon proteinlerinin BCR genindeki kırılma noktasına bağlı olarak boyutularının değişmesine rağmen, hepsi lökomojenezden sorumlu yüksek bir tirozin kinaz aktivitesini paylaşır. Şimdiye kadar BCR genindeki üç kırılma küme bölgesi tarif edilmiştir: majör (M-bcr), minor (m-bcr) ve mikro (µ-bcr) BCR kümeleri.[2] (Şekil-4A)



Şekil 3-BCR ve ABL1' in şematik gösterimi ve BCR- ABL1 kinaz. [6]

Genellikle ABL1 ekzon 2 ile 11 (a2- a11), BCR'ın ekzon 13 veya 14 (b2 - b3) arasında bulunan major kırılma kümesiyle (M-bcr) birleşir[7]. BCR-ABL1 mRNA'sı 8.5 kb üzerinde uzanır ve b2a2 veya b3a2 birleşimi içerir[7]. Bu iki transkript, p210 adı verilen 210 kD'luk kimerik bir proteine çevrilir[7]. KML hastalarında genellikle b2a2 veya b3a2 transkriptlerinden biri eksprese edilir ancak yaklaşık % 5 oranında alternatif uç eklenmesi, her iki formun birden ifade edilmesine neden olur[7]. Ph+ KML hastalarında kırılma noktası %95'in üzerinde bir oranla M-bcr bölgesinde bulunmaktadır[2].

KML'de gözlemlenen 210-kDa BCR-ABL1 proteini, ondan fazla protein alanı içerir[5]. BCR-ABL1, BCR geninde bulunan serin/treonin kinaz alanı, Rho/GEF alanı ve dimerizasyon (sarmal-sarmal) alanları ile ABL1 geninde bulunan prolince zengin alan (PxxP), DNA ve Aktin bağlayıcı alanlar, nükleer lokalizasyon sinyal alanı, nükleer eksport sinyal alanı ve SH-alanlarını yapısında bulundurur[5]. BCR-ABL1, ABL1 geninin büyük çoğunluğunu içermesine rağmen, ABL1'in N-terminal miristilasyon (posttranslasyonel modifikasyon türü - translasyon sonrası proteinlerin kimyasal değişime uğratılarak modifiye edilmesi) bölgesini kodlayan diziden yoksundur[5].(ŞEKİL-4B) Bu dizinin kaybının, BCR-ABL1' in yüksek kinaz aktivitesinden kısmen sorumlu olduğu düşünülmektedir[5].

İkinci bir kırılma noktası bölgesi, KML hastalarının % 50'sinde ve Ph+ akut lenfoblastik lösemi hastalarının %80'inde bulunur[7]. Minor kırılma küme bölgesi (m-bcr) olarak adlandırılan ve 22. kromozom üzerinde bulunan bu kırılma noktası, e1 ve e2 ekzonları arasında M-bcr' a merkezi yerleşimlidir[7]. Bu e1a2 füzyon geni, p190 olarak adlandırılan 190 kD' luk bir proteine çevrilir[7].

Üçüncü bir kırılma bölgesi, mikro kırılma küme bölgesi (µ-bcr) olarak adlandırılır[7]. M-bcr'a telomerik yerleşimli olan µ-bcr, e19a2 birleşimiyle bir füzyon transkripti yaratır ve p230 olarak adlandırılan 230 kD'luk bir protein oluşturur[7]. Bu protein kronik nötrofilik lösemi hastalarında izlenmektedir.

Respirokal ABL-BCR yeniden düzenlemesi, KML hastalarının yaklaşık % 60'ında derive kromozom 9q üzerinde tespit edilebilir. ABL ekzon 1'in 5' segmenti, BCR'ın ekson 14 veya 15 (b3 veya b4) 3' kuyruğuna aktarılır[7].

BCR-ABL1 proteini, hücrede sinyal yolaklarının anormal aktivasyonuna neden olur. Bu proteinin, in vivo ve in vitro çalışmalarda JAK/STAT, P13K/AKT, RAS/MEK hücre sinyal yolakları ve antiapoptotik proteinler üzerinden hücreleri transforme etme yeteneği, büyüme

faktörlerinden bağımsız olarak hücre proliferasyonuna neden olma özelliği ve apoptozu bloke etme kabiliyeti ortaya konmuştur[5].

2.1.2.2. *ABL1 ve BCR Genleri*

Abl ailesine ait genler, evrimsel süreç boyunca, insanlardan Drosophila melanogaster'e kadar yüksek derecede korunmuştur.[8] c-Abl (ABL1) protoonkogeni, Abelson murin lösemi virüsünün onkojenik elementi v-abl'in hücresel homologudur[6]. Bu virüs, farelerde B lenfositik lösemi gelişimine neden olur[8]. ABL1, 9. kromozomun uzun kolunda, q34 bandında 230 kilobaz(kb)'lık bir bölgeyi kapsayan, 2'den 11'e kadar numaralandırılmış on ortak ekzona ve 5 ' ucunda alternatif ilk eksonlara sahip (1b ve 1a') bir gendir[9]. Ekson 1a ve 1b kullanılarak alternatif uç birleşimi sonucunda, sırasıyla 7.0 kb ve 6.0 kb'lık bir mRNA transkripti elde edilir[9]. Sonuç olarak, 1143 ve 1130 aa uzunluğunda iki farklı protein üretilebilir[9]. Memeli ABL1 geni her yerde eksprese edilen, non-reseptör bir tirozin kinaz proteini kodlar[9]. ABL1 geni büyüme faktörleri, sitokinler, hücre adezyonu, DNA hasarı, oksidatif stres gibi sinyallere cevap olarak eksprese edilir[7]. Hücre proliferasyon, farklılaşma, hücre ölümü, retraksiyon (büzülme yada geri çekilme) ve migrasyon süreçlerinde önemli rol oynar[9]. ABL1 proteini, üç adet SRC homoloji alanına (SH1, SH2 ve SH3) sahiptir; SH1, tirozin kinaz fonksiyonuna sahiptir ve bu bölge onkojenik transformasyon için kritik alandır[9]. SH2 ve SH3 alanları, tirozin kinaz aktivitesini düzenleyen protein-protein etkileşimlerini kapsar ve sinyal iletim fonksiyonu için gereklidirler[9]. Bu alanlar, ABL1 proteinin aktivitesinin modülasyonu ve inhibisyonunda önemli bir rol oynar[9]. Abl SH3 alanı, transformasyon için önemli bir negative düzenleyici fonksiyon gösterir, bu alanın delesyonu ABL1'in transformasyona neden olan potansiyelini aktive eder[10]. ABL1 proteini ayrıca, üç nükleer lokalizasyon sinyal alanı, üç DNA-bağlama bölgesi ve bir F-aktin-bağlama alanı içerir[9]. Bu protein, aktin bağlama ve yeniden düzenlenme, hücre motilitesi ve adhezyonu, reseptör endositoz ve otofajisine katkıda bulunur[9]. Hematolojik malignitelerdeki ABL1 füzyon genlerini (ETV6-ABL1, ZMIZ1-ABL1, EML1-ABL1 ve NUP214-ABL1, SFPQ-ABL1 ve RCSD1-ABL1) inceleyen bir çok çalışma bulunmaktadır[9].

BCR geni 5' ucu merkeze yakın olacak şekilde, 5'-3' oryantasyonunda bulunmaktadır[10]. Genin tamamı 130 kb'lık bir alanı kaplar ve 23 ekzon içerir[10]. Kodladığı proteinin ifade paterni incelendiğinde, civciv embriyosu, fare ve insan dokularında yapılan çalışmalar, mRNA seviyelerinin beyin ve hematopoetik hücrelerde en yüksek olduğunu göstermiştir[10]. Ancak Bcr proteini, öncelikli olarak miyeloid hücre serisinin farklılaşmasının

erken aşamalarında ifade edilir ve polimorfonükleer lökositlere olgunlaşan hücrelerde önemli oranda azalır[10]. İmmünfloresan boyama ve hücre parçalama (fraksiyonasyon) çalışmalarını kapsayan ilk araştırmalar, Bcr proteininin sitoplazmik yerleşimde bulunduğunu göstermiştir[10]. Sonraki çalışmalar, Bcr proteininin, interfazdaki hücrelerde heterokromatin ve mitotik DNA ile de etkileşime girdiğini kanıtlamıştır[10].

BCR geni, birçok farklı fonksiyonel alan içeren karmaşık bir moleküldür. BCR'nin ilk ekzonunda yapısal olarak, özgün bir protein kinaz alanı bulunur[10]. Bilinen tüm Bcr-Abl füzyon proteinleri BCR geninin ilk ekzonunu içerdiğinden kritik öneme sahiptir[10]. İlk ekzon bölgesinde serin bakımından zengin serin/treonin kinaz alanı, iki adet SH2-bağlama alanı ve bir oligomerizasyon alanı bulunur[10]. Bcr'ın ilk ekzonunda yeralan SH2 alanları, yüksek oranda korunmuş bölgelerdir[10]. Bcr'ın merkezi ve COOH-terminal bölgeleri, G proteinleriyle çoklu seviyelerde etkileşime girmektedir[10]. BCR geninin merkezi kısmı, G proteinlerini aktive eden çeşitli GEF'lerle (guanin nükleotid değiştirici faktör) homolog diziler içerirken, COOH-terminal dizileri de G proteinlerini inaktive eden GAP (GTPaz aktive edici proteinler) homolojisine sahiptir[10]. Bu nedenle Bcr, hem GAP ve GEF fonksiyonlarına sahiptir ve G-protein ilişkili sinyal yolaklarında çift yönlü bir işlevi olduğu düşünülmektedir. Tüm bu veriler BCR'ın, ökaryotik hücrelerde (fosforilasyon ve GTP-bağlama), iki temel hücre içi sinyalizasyon mekanizmasına katılımını göstermektedir[10].

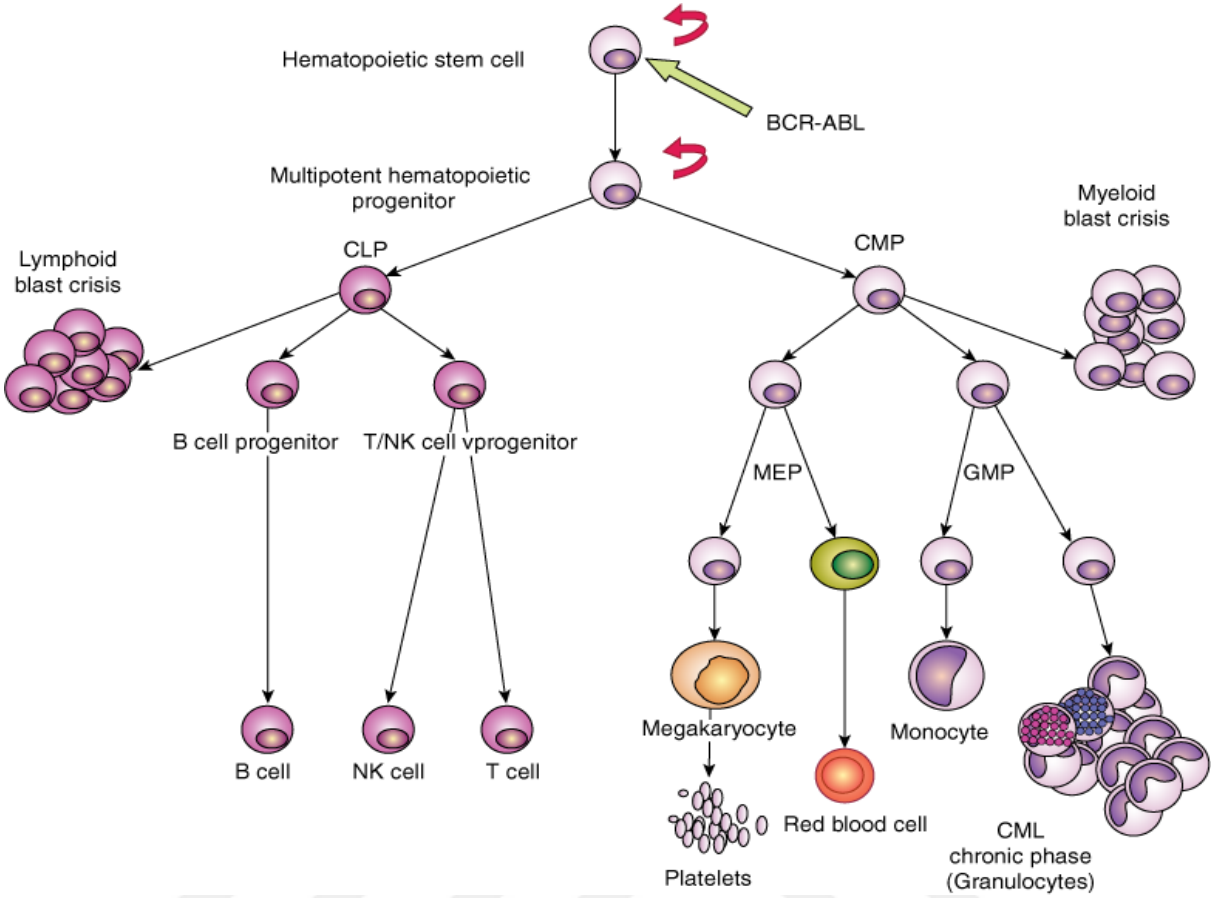
2.1.3. Hücresel Patogenez

KML'de hücresel patogenezin anlaşılabilmesi için öncelikle kök hücre, hematopoietik kök hücre ve lösemik kök hücre kavramlarının açıklanması faydalı olacaktır. Kök hücreler, morfolojik veya başka herhangi bir fiziksel özellikten ziyade fonksiyonel olarak üç farklı özellik ile karakterize edilir: kendini yenileme, farklılaşma kabiliyeti ve çoğalma potansiyeli[11, 12]. Kök hücreler, simetrik bölünmeler ile kendilerini yenileyerek farklılaşmamış durumlarını sürdürürler. Asimetrik bölünmeler ile çoklu hücre serilerini oluşturmak için farklılaşacak olan progenitör hücreleri üretirler[11, 12]. Ancak progenitör hücreler, kök hücre özelliği taşımazlar, kendilerini yenileyemezler ve mitoz bölünmeler ile çoğalıp farklılaşarak olgun hücre halini alırlar. Hematopoez hiyerarşisinde (Şekil-3), son basamakta olgunlaşan ve birbirlerinden farklı olan kan hücrelerinin tamamı, Hematopoietik Kök Hücre(HSC)'den köken alır ve diferansiye

olur. Bu hücreler yukarıda tanımlanan kök hücre özelliklerini taşırlar. Son yıllarda yapılan araştırma sonuçları, kanser patogenezinde kök hücrelerin rolünü vurgulamaktadır. KML, HSC'lerde sürekli tirozin kinaz aktivitesi gösteren BCR-ABL1'in kazanımı ile başlar[13]. BCR-ABL1 kazanımı, önceki bölümde anlatıldığı gibi çeşitli sinyal yolaklarının aktivasyonu ile miyeloid progenitör hücrelerin farklı olgunlaşma basamaklarında genişlemesine neden olur. Lösemik progenitörlerin kronik fazda düzensiz şekilde genişlemesi, hem proliferatif aktivitelerindeki değişiklikleri, hem de kendini yenileme ile farklılaşma arasındaki dengenin bozulmasını yansıtır.[7]

Olgunlaşma ve farklılaşmanın son basamağındaki farklı kan hücrelerinin kökeni nasıl ki HSC'ler ise, lösemik popülasyonu oluşturan farklı hücrelerinde Lösemik Kök Hücre(LSCs)'lerden köken aldığı düşünülmektedir[13]. LSC'ler ile ilgili araştırmalarda, kronik faz KML'nin, blastik faza ilerlemesini açıklayabilmek için iki model öne sürülmüştür[14]. İlk model, kronik fazdaki LSC'lerin, miyeloid soylarına doğru farklılaşmalarını saptırabilecek başka mutasyonlar kazanabildiğini öne sürer[14]. Bunun anlamı, mutasyonun HSC'lerde meydana geldiği ve HSC'lerin LSC'lere dönüştüğüdür. İkinci model ise, GMP(Granülosit Makrofaj Progenitör)'lerin daha başka mutasyonlar ve epigenetik değişiklikler ile kendini yenileme özelliği kazandığını ve bu nedenle lösemik kök hücreye dönüştüklerini öne sürer[14]. Bunun anlamı ise, HSC'lere göre daha farklılaşmış olan ve kendini yenileme özelliği olmayan hücrelerin, mutasyonlar ile kök hücre niteliği kazanmasıdır. Wnt/β-katenin yolağı, özellikle normal HSC'lerin kendi kendini yenilemesinde önemlidir. Çalışmalar ikinci modeli destekler şekilde, GMP'lerde Wnt/β-katenin yolağının anormal aktivasyonunu göstermiş ve bu sırasıyla farklılaşmamış blastlar oluşmasına neden olmuştur. KML'de HSC'lerin BCR-ABL1 kazanımı ve GMP'lerde Wnt/ β-katenin yolağı ile lösemik kök hücre niteliği kazanımı nedeniyle, LSC havuzunda biyolojik olarak ve davranışsal özellikler açısından iki farklı LSC popülasyonu olduğu söylenebilir[14,15,16].

Kanser kök hücresi(CSC), HSC ve LSC'ler ile ilgili konular araştırmamıza konu olduğundan, dirence olan katkısının anlaşılabilmesi için ilerleyen bölümde (Bknz. 2.3.3-Lösemik Kök Hücre ve Tedavi Direnci) daha detaylı olarak irdelenmiştir.



Şekil 4-Hematopoetik Sistem Hiyerarşisi[17]

2.2. KRONİK MYELOİD LÖSEMİ VE TEDAVİ

Geçmişten günümüze kadar, KML hastalarını tedavi etmek amacıyla konvansiyonel tedaviler, allojenik kök hücre transplantasyonu ve tirozin kinaz inhibitörleri kullanılmıştır[18]. Tedavinin ilk amacı, kan sayımının normalleştirilmesi, yani tam hematolojik yanıttır. Klinik uygulamada KML hastalarının tanı, tedavi ve takibi ile ilgili olarak güncel rehberler yayınlanmaktadır[19]. Bunlardan biri olan ESMO (The European Society for Medical Oncology) 2017 yılında yayınladığı klinik uygulama klavuzunda, KML hastalarının tedavi yanıtının değerlendirilmesi için tam hematolojik yanıt (CHR) , sitogenetik yanıt(CR) ve moleküler yanıt (MR) kriterlerini tanımlamıştır[19].

Tam hematolojik yanıt (CHR), beyaz kan hücresi sayımlarının normalizasyonu olarak tanımlanır[20]. Kemik iliği normal görünür ve morfolojik inceleme ile periferik kanda veya kemik iliğinde kronik miyeloid lösemi (KML) ile ilgili açık bir kanıt yoktur[20].

Sitogenetik yanıtın izlemi, konvansiyonel karyotip tekniği kullanarak, kemik iliği hücre metafazlarının analizi ile yapılır[19]. Analiz edilen en az 20 metafaz alanında bulunan Ph + yüzde oranı rapor edilir[19]. Buna göre, Ph + metafaz alanı %0 ise tam sitogenetik yanıt (CCyR), Ph + metafaz alanı %1 -%35 kısmi sitogenetik yanıt (PCyR), Ph + metafaz alanı % 36 -% 65 minor sitogenetik yanıt, Ph + metafaz alanı %66 -%95 minimal sitogenetik yanıt ve Ph+ metafaz alanı %95>'se yanıtsız olarak tanımlanmıştır. FISH verileri sitogenetik yanıt kategorilerini hesaplamak için kullanılamaz[19].

Moleküler yanıtın izlemi, her 3 ayda bir hastadan alınan 10- 20 ml. kandan qRT-PCR gerçekleştiren BCR-ABL1 mRNA ölçümü ile yapılır[19]. Bu yöntem, hastalık durumunun, özellikle ölçülebilir rezidüel hastalığın değerlendirilmesi için en hassas araçtır[15]. Uzun dönemli tedavi sırasında, BCR-ABL1 transkript seviyelerinin önemli artışları, tedavi başarısızlığının erken göstergeleridir[19].

2.2.1. Konvansiyonel Tedaviler ve Kök Hücre Transplantasyonu

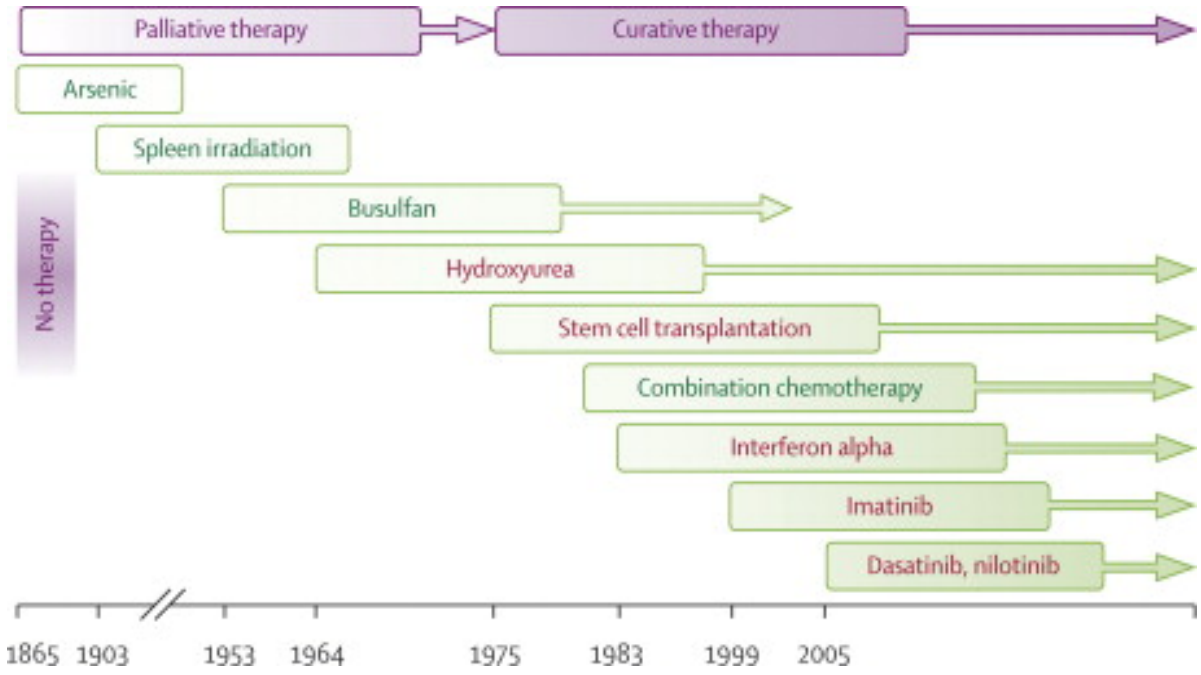
19. yüzyılda KML hastalarında arsenik kullanımı belgelenmiş tek tedavidir[21]. Bazı toksisitelere rağmen, 1900'lü yılların başlarında radyoterapinin kullanılmaya başlamasına kadar KML tedavisinde çeşitli arsenik preparatları kullanılmaya devam edildi[21]. Daha sonra, busulfan ve hidroksiüre kullanımı 1960'lı yıllarda büyük ölçüde radyoterapinin yerini aldı[21]. Ancak bu tedaviler sağkalımı iyileştirme veya sitogenetik yanıtı indükleme kapasitesine sahip değil[21].

1980'lerde allojenik kök hücre transplantasyonu KML için tam kür sağlayan tedavi haline geldi. Ancak yüksek maliyet ve mortalite oranları önemli bir dezavantaj oluşturdu[21]. Ayrıca, uygun donörlerin bulunmasındaki güçlük, allojenik kök hücre naklini sınırlayan en önemli nedenlerden biridir[21].

İnterferonlar, ökaryotik hücreler tarafından viral enfeksiyonlarda ve malign hastalıklarda meydana gelen antijenik uyaranlara cevap olarak üretilen glikoproteinlerdir[22]. İnterferon alfa, 1980'lerde nakil için uygun olmayan hastalarda kullanılmaya başlandı. [21] KML'de interferon alfa'nın kesin etki mekanizmaları bilinmemekle birlikte in vitro çalışmalarda

KML progenitör hücreler üzerinde doğrudan antiproliferatif etkisi gösterilmiş ve koloni oluşturan hücrelerin proliferasyonunu inhibe ettiği saptanmıştır[22]. İnterferon alfa, hastaların yaklaşık üçte birinde sağkalım ve sitogenetik yanıtlarda iyileşme sağlaması nedeniyle KML tedavisinde büyük oranda busulfan ve hidroksiürenin yerini aldı[21].

1998 yılında, Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin (TKI) geliştirilmesi, konvansiyonel tedaviler ile karşılaşılan limitlerin aşılmasında büyük katkı sağladı[21]. TKİ'lerin keşfi KML hastalarının hayatta kalım sürelerini uzatırken, aynı zamanda genel olarak diğer kanser türlerinin tedavisi ve bilimsel araştırmalar üzerinde etkili olmuştur[21].



Şekil 5-KML tedavi seçeneklerinin geçmişten günümüze gelişimi.[23]

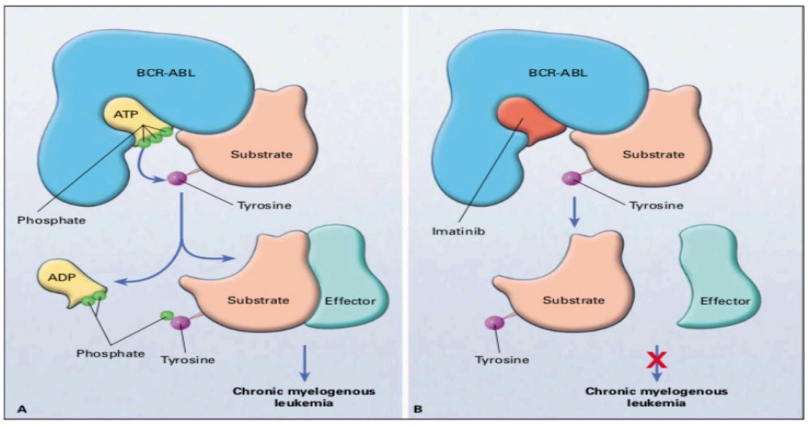
2018'de, KML hastaları 5 TKİ'ü (imatinib, nilotinib, dasatinib, bosutinib, ponatinib), omasetaksin (protein sentez inhibitörü) ve bazı konvansiyonel ajanlar (hidroksiüre, interferon alfa, busulfan, 6-merkaptopurin, sitarabin, desitabin ve diğerleri) dahil olmak üzere terapötik açıdan çoklu tedavi seçeneklerine sahiptir[24](Şekil-6).

2.2.2. Tirozin Kinaz İnhibitörleri

KML'nin terapötik mimarisi, 2000' li yılların başlarında, BCR-ABL1 onkoproteini ve adenozin trifosfat (ATP) arasındaki etkileşimi kuvvetli şekilde engelleyen, malign klonun hücresel çoğalmasını bloke eden, küçük moleküllü tirozin kinaz inhibitörlerinin (TKİ'ler) keşfiyle birlikte çarpıcı biçimde değişmiştir[24]. Bu "hedeflenmiş" yaklaşım, KML'nin doğal seyrini değiştirdi ve 10 yıllık sağkalım oranlarını yaklaşık % 20'lerden % 80-90'lara yükseltti[24].

2.2.2.1. Birinci Nesil TKİ- İmatinib

Birinci nesil TKİ olan imatinib mesylate (STI571), KML'yi ölümcül bir hastalıktan kronik ve yönetilebilir bir hastalığa dönüştürdü[21, 25]. Imatinib, KML hücrelerinde bulunan BCR-ABL1 onkoproteini inhibe eden bir 2-fenilaminopirimidin bileşiğidir [21,25]. BCR- ABL onkoproteini, KML hastalarında imatinib için ideal bir hedef olarak kabul edilir, çünkü neredeyse tüm lösemik hücrelerde bulunmasına rağmen normal hücrelerde yoktur[21, 25]. ABL kinazın katalitik bölgesine (ATP-bağlanma bölgesi), adenozin trifosfatın (ATP) bağlanmasını engelleyerek, tirozin kinaz aktivitesini baskılar[21, 25]. Böylece, lösemik fenotipe neden olan aşağı yönlü efektör moleküllerin fosforilasyonu engellenir[21, 25] (Şekil-7). İmatinib, BCR-ABL1'in inaktif formuna bağlanarak etki gösterir[21, 25].



Şekil 6-BCR- ABL1' in aksiyon mekanizması ve İmatinib tarafından inhibisyonu.

Panel A' da kinaz cebinde bir adenozin trifosfat olan BCR- ABL1 onkoproteini görülmektedir. Substrat, tirozin rezidülerinden birinin fosforilasyonuyla aktive edilir. Bu durum sonrasında aşağı yönlü efektör diğer molekülleri aktive edebilir. Panel B' de ise İmatinib BCR-ABL1'in kinaz cebini işgal ettiğinde, BCR- ABL1' in aktivitesi inhibe olur ve bu durum onun substratlarının fosforilasyonunu engeller. [26]

İmatinib 2001 yılında Ph+ KML'de blast faz, hızlandırılmış faz veya interferon tedavisine yanıt vermeyen kronik faz hastalarında kullanım için FDA'den onay almıştır[21,24,25,27]. KML-CP yeni tanı alan hastalarda, Uluslararası Randomize İnterferon ve STI571 Çalışması (IRIS) ile imatinibin hematolojik ve sitogenetik yanıt ve progresyon sıklığı açısından interferon tedavisine kıyasla üstün olduğu ve iyi tolere edildiği gösterilmiştir[21,24,25,27]. Bu yüksek verimin anahtarı ilacın özgüllüğüdür. Imatinib normal hücrelere en az düzeyde zararlıdır, bu nedenle imatinib ile yaşam kalitesinde de net bir şekilde avantaj elde edilmiştir[21,24,25,27]. Bu hastaların uzun süreli takibi, imatinib'e verilen yanıtların devamlı-kalıcı olduğunu göstermiştir[21,24,25,27]. Kronik faz KML'li hastalarda birinci basamak tedavide oral yoldan verilen günlük 400 mg imatinib dozu önerilir[21,24,25,27].

İmatinib kullanan hastaların uzun dönemli takibinin yapıldığı IRIS çalışmasının 10 yıllık takip sonuçları, başlangıçtan itibaren araştırmanın imatinib kolunda bulunan hastaların sadece % 48'inin tedaviye devam edebildiğini göstermiştir[21,24,25,27]. Bu tedavi başarısızlığının nedeni olarak etkinlik, tedavi direnci, toksisite veya diğer nedenler gösterilmiştir[21,24,25,27]. İmatinib tedavisinde, bu başarısızlığın üstesinden gelmek için, suboptimal sitogenetik yanıt veren veya direnci olan hastalarda, günlük imatinib dozunun 600-800 mg'a yükseltilmesi ya da ikinci nesil TKİ'lerine geçiş stratejisi uygulanmıştır[21,24,25,27]. Ek olarak, imatinib interferon gibi diğer ajanlarla kombine edilmiş ve tek başına imatinib tedavisinden daha üstün yanıt alınmıştır[17,21,20,23]. Tüm bu sonuçlar, imatinibe direnç veya intoleransı olan hastalar için ek tedavi seçeneklerine ihtiyaç olduğunu göstermiştir[21,24,25,27]. Bu durum ikinci ve üçüncü nesil TKİ'lerin gelişimine yol açmıştır[21,24,25,27].

2.2.2.2. İkinci Nesil TKİ'ler

İmatinib direncinin ortaya çıkması, tedaviye karşı gelişen intolerans ve hastaların bir kısmında zaman içinde meydana gelen terapötik yanıt eksikliği gibi nedenler, ikinci nesil TKİ'lerinin geliştirilmesinde etken olmuştur (dasatinib, nilotinib, bosutinib).

Dasatinib, ikinci nesil bir TKİ'dür[21]. ABL1 kinaz alanine (ATP bağlama yerine) imatinibden daha kuvvetli bir şekilde bağlanır ve imatinibten farklı olarak hem aktif hem de aktif olmayan durumdaki BCR-ABL1'e bağlanma yeteneğine sahiptir[21]. Dasatinib çoğu imatinib dirençli Abl mutasyonuna etki eder ancak T315I mutasyonunda etkili değildir[21]. 2007 yılında kronik faz KML hastaları için ikinci basamak tedavi seçeneği olarak FDA' den onay almıştır[21].

Nilotinib, BCR-ABL1 enziminin inaktif konformasyonuna bağlanan ve imatinib mesylate türevi ikinci nesil bir TKİ'dür. İmatinib ile kıyaslandığında 20-50 kat daha etkindir ve BCR-ABL1 onkoproteini üzerindeki ATP-bağlanma bölgesine daha güçlü bir şekilde bağlanır[21]. 2007 yılında kronik faz KML hastalarının ikinci basamak tedavi seçeneği olarak FDA'den onay almıştır[21]. Nilotinib, T315I ve Y253H mutasyonları dışında imatinibe dirençli mutasyonlara karşı etkin olması bakımından imatinibe karşı avantaja sahiptir. [21]

Bosutinib, KML hücre hatlarına karşı imatinib'den daha etkili olduğu gösterilen, yeni bir ikinci nesil oral ve çift yönlü Src/Abl TKİ' dür[21]. V299L ve T315I mutasyonu dışında kalan, pek çok imatinibe dirençli BCR-ABL1 mutasyonlarına karşı etkilidir[17]. 2012 yılında önceki TKİ tedavilerine dirençli ya da intoleransı olan kronik faz, akselere faz ve blastik faz KML'li erişkin hastalarda kullanılmak üzere FDA'den onay almıştır[21].

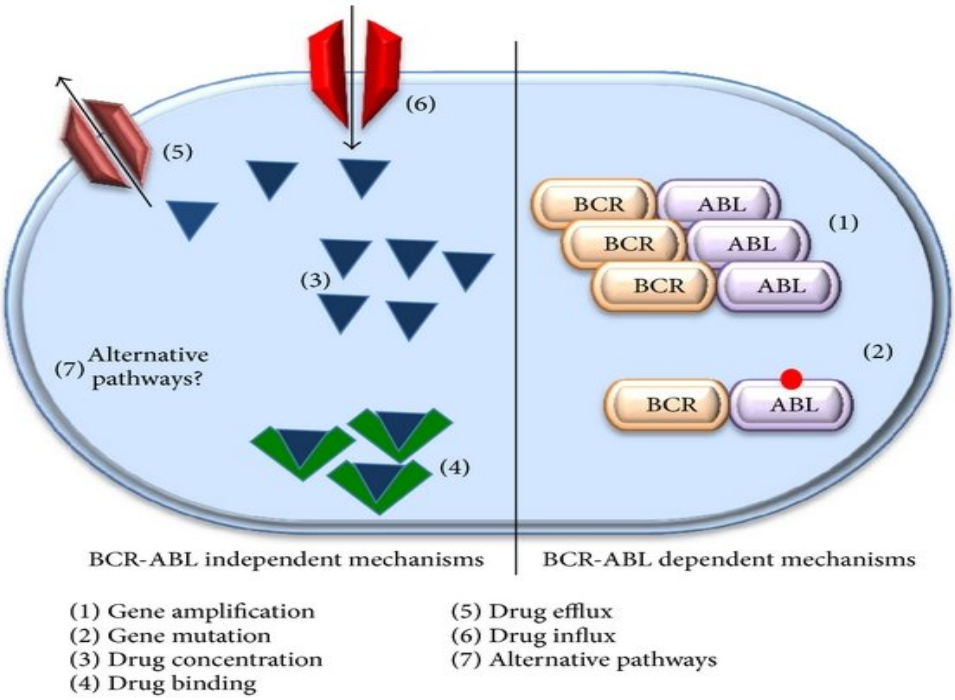
2.2.2.3. Üçüncü Nesil TKİ'leri

Ponatinib (AP24534), diğer TKİ'lerine karşı dirence neden olan T315I mutasyonu taşıyan BCR-ABL'ye karşı tasarlanmış 3. nesil bir TKİ' dür[21,24,25]. Bir pürin iskelesinin modifikasyonuna dayanır ve merkezde üçlü karbon-karbon bağına sahiptir[21,24,25]. Ponatinib, M244V, G250E, Q252H, Y253F/H, E255 K/V, F317L, M351T ve F359V dirençli mutasyonları taşıyan BCR- ABL proteinlerini de baskılama özelliğine sahiptir[21,24,25]. TKİ tedavilerine dirençli ya da intoleransı olan kronik faz, akselere faz ve blastik faz KML erişkin hastalarda kullanım için FDA'den onay almıştır[21,24,25].

2.3. KRONİK MYELOİD LÖSEMİ ve İMATİNİBE DİRENÇ

Daha önce belirtildiği şekilde imatinib, KML'li hastalar için iyi bir tedavi seçeneği olduğu kanıtlanmış olmasına rağmen, tedaviye direnç veya intolerans hastaların üçte birini etkiler[21]. Bazı hastalar tedavinin başlangıcında yanıt vermeyebilir ve hiçbir zaman tam bir hematolojik, sitogenetik veya moleküler yanıta ulaşamayabilir[21]. Bu, imatinibe karşı oluşan primer direnç olarak bilinir[21]. Tedaviye başlangıçta yanıt veren diğer hastalar ise belli bir süre sonra tedavi yanıtını kaybedebilir ve buna ikincil direnç denir[21]. Altta yatan direnç nedenlerini anlamak, hastalıkla mücadelede son derece önemli bir adımdır[21]. BCR-ABL'den bağımsız

mekanizmalar ve BCR-ABL'e bağımlı mekanizmalar olmak üzere iki ana direnç mekanizması grubu vardır(Şekil-8).



Şekil 7-TKİ' lere dirençli KML hücrelerinin mekanizmaları.[21]

BCR-ABL'ye bağlı mekanizmalar, yüksek bir ABL kinaz aktivitesine yol açabilecek BCR-ABL onkogenin duplikasyonu veya amplifikasyonunu(1) veya (2) TKI bağlanmasını etkileyen BCR-ABL mutasyonlarını kapsar. BCR- ABL bağımsız mekanizmalar ilaç konsantrasyonu (3), ilaç baglama (4) veya serum protein asit glikoprotein yoluyla plasmadaki imatinibin sekastrasyonu, P-glikoprotein dışa atım pompasının artmış ekspresyonu veya artmış ilaç atımı(5) ve organic katyon taşıyıcı hOCT1'in azalmış ekspresyonu veya ilaç içe alımı (6) gibi komplikasyonlarla ilgilidir. TKI direnci ve KML ilerlemesinde rol oynayan diğer mekanizmalar, BCR-ABL'nin aşağı yönlü alternatif sinyal yolaklarının aktivasyonunu içerir (7).

2.3.1. Bcr- Abl Bağımlı Direnç Mekanizmaları

BCR-ABL bağımlı direnç mekanizmalarının en önemlisi BCR-ABL mutasyonlarıdır[24]. Mutasyonlar imatinib direnci sırasında gözlenen en tutarlı genetik değişimdir[24]. BCR-ABL'de meydana gelen mutasyonların, BCR-ABL'in tetiklediği genetik kararsızlığın bir sonucu olarak ortaya çıktığı ve bu mutasyonların imatinibin seçici baskısından

bağımsız olarak meydana geldiği düşünülmektedir[28]. Imatinib, ABL enzimindeki ATP bağlanma bölgesi ile ancak inaktif konformasyondayken etkileşime girebilir[21,29]. BCR-ABL'in bağlanma alanında mutasyonlar, imatinib bağlanmasını etkiler ve bunun sonucunda ilaç BCR-ABL aktivitesini engellemek için yetersiz kalır[28]. BCR-ABL onkoproteininde imatinibin etkisiz bağlanmasına yol açan 55'in üzerinde mutasyon tanımlanmıştır[21,29]. En önemli mutasyonlardan biri, 315. pozisyonda izolösin ile treonin yer değiştirmesi ile sonuçalanan T315I'dir[21,29]. Bu mutasyon, imatinibin bağlanması için gerekli olan bir oksijen molekülünü ortadan kaldırarak ilacın ATP-bağlanma bölgesine bağlanmasını imkansız kılar[30].

BCR-ABL bağımlı direnç mekanizmalarından bir diğeri, BCR- ABL onkogeninin duplikasyonu veya amplifikasyonudur[28]. Bu durum, yüksek düzeyde ABL kinaz aktivitesine yol açabilir[28].

2.3.2. Bcr- Abl Bağımsız Direnç Mekanizmaları

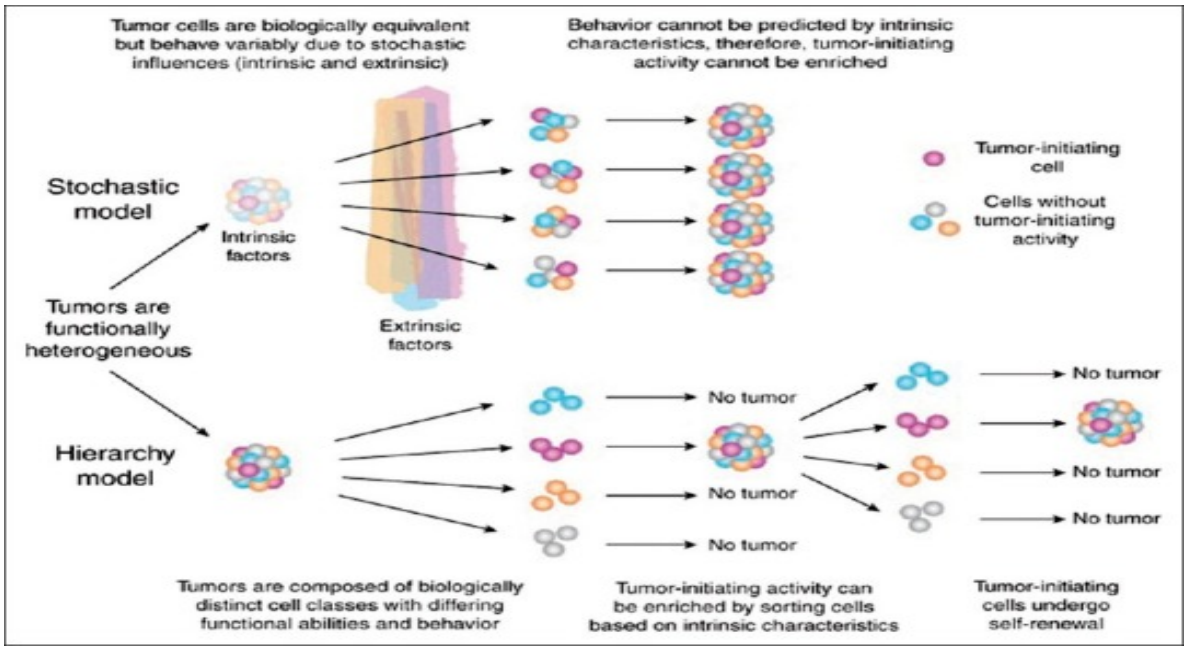
BCR-ABL bağımsız direnç mekanizmaları, hücrelerde ilaç dışa atımı, ilaç içeri alımı, plazma proteinlerine ilacın bağlanması veya ilaç konsantrasyonuyla ilgili komplikasyonlar nedeniyle hücre içi imatinib seviyesinde azalmaya yol açabilecek durumları kapsar[21,31]. Hücrelerde P-glikoprotein (Pgp) dışa atım pompasının ifadesinin artması, organik katyon taşıyıcı hOCT1' in ekspresyonunun azalması ve plazmada imatinibin serum protein asit glikoproteini (AGP) tarafından tutulması, BCR-ABL bağımsız mekanizmalara örnek olarak verilebilir[21,31]. KML progenitörlerinde ilaç alımı/atımı mekanizmalarının aktif olduğu, bu nedenle hücre içerisinde gereken konsantrasyonlardan daha düşük TKİ'ü seviyelerine neden olabileceği gösterilmiştir[28]. Src/Ras/Raf/MEK/Lyn, STAT, Wnt/beta katenin, Hedgehog, FoxO ve SIRT1 gibi sinyal yolaklarının BCR-ABL bağımsız aktivasyonu, direnç ve KML'nin progresyonunda rol oynadıkları gösterilmiştir [21,31]

Artan sayıda kanıt, alternatif BCR-ABL bağımsız mekanizmaların imatinib direncine ve gelişimine katkıda bulunduğunu göstermektedir[28]. Primer BCR-ABL+, imatinib almamış CD34+ hücre popülasyonlarının, in vitro imatinib veya dasatinibe birkaç gün maruz kaldıktan sonra apoptoza uğramadığı bilinmektedir[28]. Bu imatinib, dasatinib veya nilotinibin lösemik kök hücrelerde BCR-ABL kinaz aktivitesini in vitro inhibe etmediği gerçeğiyle açıklanır[28]. Ancak, bu durumun ortaya çıkmasına neden olan mekanizmalar çok net değildir[28]. KML kök

hücrelerinin, BCR-ABL inhibisyonuna rağmen imatinibe duyarsız olduğu ve BCR-ABL bağımsız mekanizmalar sayesinde imatinib direncine aracılık edebileceği düşünülmektedir[21,31].

2.3.3. Lösemik Kök Hücre ve İmatinib Direnci

Son yıllarda araştırmacılar, tümörü oluşturan hücreler arasında, daha önceki bölümlerde bahsedilen kök hücre benzeri özellikler gösteren bazı hücrelerin varolduğunu ve bu hücrelerin tümör başlatma potansiyeli taşıdığını düşünmektedir. Tümör hücreleri arasında proliferatif potansiyel ve tümörijenite açısından belirgin bir fonksiyonel heterojenite gözlenir[32]. Bu heterojenite, iki teori ile açıklanır(Şekil-9): Birinci teori, blast hücre popülasyonu içindeki her bir hücrenin, hücre döngüsüne girerek tümörü başlatabilmek için, eşit fakat düşük bir olasılığa sahip olduğunu öne sürer[32]. Birçok araştırmacı tarafından önerilen alternatif ikinci teori ise her tümörün, kanser kök hücreleri (CSCs) olarak adlandırılan, fonksiyonel olarak farklı, nadir bir hücre popülasyonu barındırdığıdır[32]. Bu model neoplastik klonların, kök hücre özelliklerine sahip, nadir ve az miktarda hücre ile sürdürüldüğünü önermektedir[32]. CSC'ler, tümörün yeniden büyümesini sağlayabilir ve kendi kendini yenileme potansiyeline sahiptir[32]. CSC'ler tümörlerden izole edildiğinde, o dokuda bulunan normal kök hücre özelliklerini çeşitli yönlerden yansıtır[32].



Şekil 8-Tümör Heterojenite Teorileri Şematik Gösterimi[33]

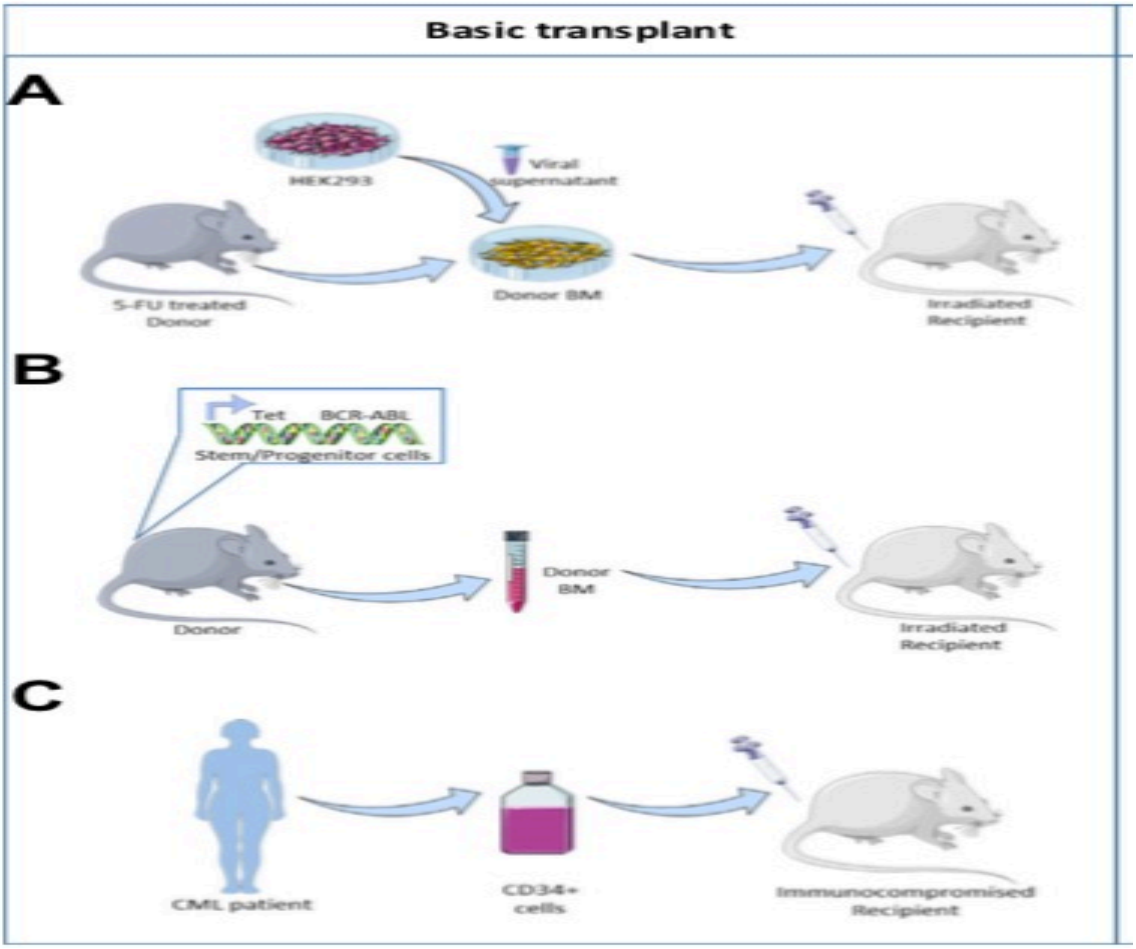
CSC'leri ile ilgili bu teoriler, hem solid tümörlerde hem de lösemilerde bu kök hücrelerin tanımlanması ve tümörijeniteye olan katkılarının saptanması açısından oldukça önemlidir. Önceki bölümlerde, kök hücre kavramı ve KML'nin hücresel patolojisine olan katkısı aktarılmıştır. Ancak araştırmamıza konu olan direnç mekanizmaları ile ilişkisi bu bölümde açıklanmaya çalışılmıştır.

HSC'ler ve LSC'ler kök hücre özellikleri açısından birbirine benzerdir. Örneğin, her iki kök hücre grubuda kendini yenileme özelliğine sahiptir ve her ikiside bulundukları popülasyon içerisindeki diğer kök hücre özelliği taşımayan hücrelere oranla daha yavaş prolifere olur ve her ikisinide tanımlayan yüzey belirteçleri benzerdir (Lin-,CD34+,CD38-,CD90+)[32]. Bu nedenle lösemi araştırmalarında, LSC'lerin normal HSC'lerden ayırtedilmesi ve tanımlanması, onların çalışılmasındaki en büyük zorluklardan biridir[32]. Ayrıca, araştırmalar LSC'lerin TKİ'ne karşı duyarsız olduğunu göstermektedir ve bu durum direnç mekanizmasının neden kaynaklanabileceği sorusunu gündeme getirmiştir(BCR-ABL'e bağımlı mekanizmalar veya BCR-ABL bağımsız mekanizmalar)[32]. TKİ'lerin, LSC'lerde BCR-ABL kinaz aktivitesini bloke ettiği gösterilmiştir[32]. Bununla birlikte, TKİ tedavilerinde LSC'lerde apoptoz oranı, progenitörlere göre anlamlı derecede düşüktür[32]. Ek olarak, LSC'lerin TKİ direnci BCR-ABL kinaz alanı mutasyonları ile ilişkili değildir. Tüm bu bilgiler ışığında, LSC'lerin BCR-ABL kinaz bağımlı olmadığı düşünülmektedir[32]. Bu nedenle TKİ tedavisinin, LSC'lerde BCR-ABL fonksiyonunu inhibe edebileceği, ancak LSC'leri ortadan kaldırılamayacağı belirtilir[32]. Ayrıca LSC'lerin hücre döngüsünde quiescence halinde bulunmalarının da tedavi direncine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir[11].

Bazı yayınlar, TKİ tedavisi almayan hastaların % 25'i ve TKİ-dirençli hastaların %50-90'ı ,TKİ dirençli Bcr-Abl kinaz mutantlarını ifade eden lösemik klonlar taşıdığını belirtmektedir[11]. Çalışmalar KML kök/progenitör hücrelerin artmış hayatta kalımına ve sürekli büyümesine , kritik sinyal iletim yolaklarının aktivasyonu, hücre döngüsü değişiklikleri, anormal epigenetik olaylar ve hematopoetik nişten gelen anormal mikroçevre dahil bir dizi faktörün katkıda bulunduğunu göstermiştir[11]. Güçlü kanıtlar, KML'de LSC'lerin, TKİ'lerinin etkilerine karşı dirençli olduklarını ve tüm hastalarda uzun süreli tedavilerde devamlı olduğunu göstermektedir. [34]

2.4. KRONİK MYELOİD LÖSEMİ ve IN VIVO MODELLER

In vitro tekniklerin kullanılması, terapötik fırsatlar yaratmaya devam eden tüm projeler için gerekli bir ön koşuldur[4]. Ancak in vivo modeller, daha uygun fizyolojik koşullar altında farklı hücre tipleri arasındaki etkileşimleri anlamamızı sağlayan bir mikroçevre sunar[4]. Günümüzde, KML araştırmalarında yaygın olarak kullanılan üç adet fare modeli vardır ve her bir modelin kendine özgü farklı avantajları ve sınırlılıkları bulunmaktadır[4]. En uygun modelin seçimi ise hipoteze bağlı olarak değişmektedir[4].



Şekil 9-In vivo KML modelleri [4]

2.4.1. Retroviral transdüksiyon / transplantasyon modeli

Murin retroviral model, 5-flüoroürasil (5-FU) ile muamele edilmiş fare kemik iliği hücrelerinin BCR-ABL'yi kodlayan retrovirüs ile enfekte edilmesini, ardından transdükte

hücrelerin ışınlanmış sinjenik alıcılara transplantasyonunu içerir[4](Şekil 11A). Alıcılar, insanda kronik faz KML'ye benzeyen, miyeloproliferatif KML benzeri hematolojik maligniteler geliştirir[4]. Bu modelde hastalığın insanlarda varolan KML'nin tipik ilerlemesinden çok daha hızlı ortaya çıkması, oldukça agresif olduğu şeklinde yorumlanmıştır[4]. Ancak deneysel düzenekte, bu durum in vivo olarak test edilen ajanların terapötik etkilerini değerlendirmek için etkin geri bildirime izin verebilir[4]. Retroviral yöntem aynı zamanda ilgilenilen diğer genlerin birlikte ekspresyonunun veya delesyonunun etkilerini ve bunların varyantlarını izlemek için etkili bir yöntemdir[4]. Gen ekspresyonu, retroviral transdüksiyon/transplantasyon modelinde kolaylıkla manipüle edilebilir ve bu yüzden bu model ile belirli ilgilenilen spesifik hedeflerin etkilerini, BCR-ABL ile etkileşimlerini ve hedeflenen tedavilere cevaplarını değerlendirmede etkili bir araçtır.[4]

2.4.2. SCLtTA / BCR-ABL transgenik modeli

SCLtTA/BCR-ABL transgenik fare modelinde, P210 BCR-ABL ekspresyonu, murin kök hücre lösemi geni 3'promotörünün (SCL) kontrolü altında tetrasiklin kontrollü bir işlemleştirici (tTA) tarafından düzenlenir[4](Şekil 11B). Tetrasiklin içme suyundan verildiğinde hematopoetik sistemin kök ve progenitör hücrelerinde BCR-ABL'nin ekspresyonu indüklenir[4]. Bu modeldeki BCR-ABL ekspresyonunu takip eden klinik özellikler nötrofili, lökositoz ve miyeloid hücrelerin karaciğer, akciğerler ve lenf düğümleri dahil olmak üzere çoklu organlara yayılmasıdır[4]. Bu nedenle BCR-ABL ekspresyonunun izlendiği farelere ‘’KML benzeri hastalık’’ adı verilir[4]. Retroviral modelin tersine bu sistem insan KML'sine benzer doğal bir ilerlemeye sahiptir ve bu nedenle başlangıçtan itibaren BCR-ABL ifadesini takip eden olayları çalışmak için uygundur[4]. Bu model, terapilerin uzun dönem HSC’ler (LT-HSCs) üzerindeki etkilerini, in vivo mikroçevrede değerlendirme olanağı sağlar[4]. Ayrıca, bu model ile potansiyel terapötik hedefleri belirlemek ve test etmek mümkündür[4]. Son olarak, mevcut hastalık modellerinin evrimi, hastalık süreçlerinin moleküler ilerlemesi hakkında ek bilgiler sağlayabilir[4].

2.4.3. Xenograft Modelleri

Xenograft modeller, immün sistemi baskılanmış farelerde insan hücre popülasyonlarının değerlendirilmesine olanak sağlar. Primer KML hücrelerinde bulunan spesifik alt popülasyonlar, uzun dönemli lösemi başlatma aktivitesine sahiptir. Bu populasyonlar aktiviteleri nedeniyle hematolojik maligniteleri incelemek için sıklıkla kullanılır[4](Şekil 11C).

Aşılamanın önemli bir avantajı, hastalardan gelen primer KML hücreleri ile doğrudan çalışma olanağıdır. [35] Sawyers ve arkadaşları, blastik faz KML' li hastalardan alınan hücreleri SCID (ciddi kombine immün yetmezlik) farelere transplante etmiş ve immün yetmezliği olan farelerin hematopoetik dokularında lösemik myoblastların yeniden üretilebilir- tekrarlanabilir büyümesini gözlemlemişlerdir[36]. İlerleyen çalışmalarda, kronik faz KML hastalarından elde edilen, normal hematopoetik hücre ve lösemik hematopoetik hücrelerin, sublethal olarak ışınlanmış SCID farelerinin kemik iliğine aşılanabilme yetenekleri olduğunu kanıtlamışlardır[36]. Kısa süre sonra, Wang ve ark. daha iyi sonuçlarla kronik faz KML hücrelerinin obez olmayan diyabetik NOD/SCID alıcılara aşılandığını bildirmiştir[36]. Bu çalışmanın sonuçları, kronik faz KML hastalarından gelen konsantre CD34+ hücrelerinin, NOD/SCID farelere implantasyonundan sonra, başarılı bir şekilde yeniden yapılandırma kabiliyeti olduğunu ortaya koymuştur[36]. Beklenebileceği gibi, akselere veya blast fazda olan KML hastalarından alınan hücreler, kronik fazdaki hastalardan alınan hücrelere göre daha hızlı aşılanmıştır[36]. Ayrıca yapılan bir çalışmada, kronik faz KML hastalarından alınan örnekler ile NOD/SCID farelerin aşılanması sayesinde quisence halinde ilkel lösemi hücrelerinin bir alt popülasyonu tanımlanmıştır[35]. NOD/SCID deney sistemi, KML'deki, en ilkel lösemi başlatıcı hücrenin özelliklerini aydınlatmak ve KML'nin hücresel biyolojisini araştırmak için değerli Kabul edilmektedir[35]. Ek olarak, in vitro transfekte edilmiş BCR/ABL kemik iliği hücreleri (stabil retroviral üretici hücrelerde kokültür yoluyla) doğrudan farelerin kuyruk damarına intravenöz olarak enjekte edildiğinde, miyeloproliferatif KML benzeri hastalık ürettikleri saptanmıştır[36]. 2015 yılında Schneckenleithner ve ark. bu protokolleri ayrıntılı olarak açıklamışlardır[36]. KML ksenograft modeli preklinik çalışmalar için in vivo olarak altın standart olmaya devam etmektedir[4]. İmmün yetmezliği olan farelere aktarılan KML primer kemik iliği hücreleri, KML progenitör hücrelerinin transplantasyonunu, KML'nin biyolojik özelliklerini incelemek için

kullanılabilir ve KML için terapötik tedavilerin tanımlanmasına yardımcı olabilir[36]. Son olarak, bu model gen terapisi gibi yeni tedavilerin test edilmesinde kullanılmaktadır[35].

Pek çok avantaja rağmen, aşılama modelinin bir takım sınırlılıkları vardır[35,4]. Birincisi, KML örnekleri arasındaki değişkenlik ve düşük aşılanma seviyeleridir[35,4]. Aynı hastadan türevlenen hücrelerin transplante edildiği farelerin bireysel aşılanma derecesi, hücre sayısı ve hastalık evresine göre değişebilir[35,4]. İkincisi, kronik faz KML hücreleri ile aşılanmış NOD/SCID alıcıları, insan KML'sini devam ettiren patofizyolojiyi doğru şekilde mimik edebileceğinin hala öngörülememesidir[35,4]. Alıcılar, dolaşımdaki insan miyeloid hücrelerine veya insan hücrelerinin karaciğere veya diğer ekstramedüller bölgelere yayılımına sahip değildir[354]. En önemlisi, bu gibi alıcıların uzun dönemli çalışmaları bildirilmemesine ragmen, KML kronik faz hücrelerinin alıcıları akut lösemi tablosuna dönüşmektedir[35,4]. Ayrıca, kemik iliği mikroçevresi gibi, konakçı immün yanıt dışında diğer faktörlerin de hesaba katılması gerekmektedir[35,4]. Lösemik süreçte Bcr/Abl ve aşağı yönlü yolakların rolünün doğrudan analizi gibi çalışmalar için aşılama sistemini deneysel olarak manipüle etmek zordur[35,4]. Kimyasal inhibitörler ve antisens tedavileri kullanılarak bu durum denenmesine rağmen, farklı Bcr/Abl formlarını ifade etmek veya sistemde diğer modülatör genleri veya proteinleri kullanmak mümkün değildir[35,4]. Son olarak, bu model için gereken uzun vadeli çalışmalar, zaman ve uygun fiyat açısından sınırlayıcı olabilir[35,4].

Son kısımda aktarılan in vivo deney modelleri ile, kanser araştırmalarında(özellikle KML'de) in vitro model oluşturulan hücrelerin çalışılması için kullanılabilicek alternatifler sıralanmıştır. Literatür bilgisinden de anlaşılacağı üzere, farklı hücre popülasyonlarının davranış biyolojisinin değerlendirilmesi için en uygun modelin Xenograft olduğu görülmektedir. Tez çalışmamız, dirençli hücre biyolojisinin anlaşılmasını hedeflediğinden, in vivo çalışmalarımızda bu modelin kullanılmasına karar verilmiştir.

Genel bilgilerin verildiği tezimizin bu bölümüne kadar olan bilgiler ışığında, dirençli hücrelerin biyolojisinin aydınlatılmasının, kök hücre özelliği potansiyelinin belirlenmesinin, köken aldıkları hücrelerden farklı davranışsal özelliklerinin saptanmasının, KML direnç biyolojisinin anlaşılması ve bu sayede KML tedavisinde yeni hedeflerin belirlenmesi açısından oldukça kritik olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle bir sonraki bölümde tezimize araştırma konusu olan ve Dr.Seda BAYKAL KÖSE tarafından geliştirilen imatinib-dirençli hücre hattının in vitro özellikleri paylaşılmıştır.

2.5. İMATİNİB-DİRENÇLİ HÜCRE HATTI (K562-Ir) ÖZELLİKLERİ

İmatinib-dirençli K562-Ir, klinikte sekonder direnç geliştiren(KML tanısı alan ve imatinib tedavisine yanıt veren ancak sonradan imatinibe direnç geliştiren) hastalar için modellenmiş hücre hattıdır. Atasal kökeni, tanımlanmış ve ticari olarak satın alınabilen, blastik faz da bulunan KML hastasından elde edilen imatinibe duyarlı K562 hücreleridir ve bu atasal hattın artan imatinib dozlarına maruziyeti ile klonal selleksiyon tekniği sonucu 1 yılı aşkın sürede geliştirilmiştir. Klonal seleksiyon sırasında 0,2 μM-10 μM aralığında imatinib dozu uygulanmıştır. Başlangıçta K562 hücreleri 0,2 μM imatinibe maruz bırakılmış, sonrasında %90'ı ölen populasyonun hayatta kalan hücreleri yaklaşık 1 ay boyunca çoğaltılarak genişletilmiş, sonrasında 0,4 μM doza çıkılmıştır. Bu şekilde her seferinde 2 kat imatinib dozu arttırılarak, imatinib-dirençli K562-Ir hücre hattı elde edilmiştir. Ardından bu imatinib-dirençli hücrelerin aşağıda özetlenen in vitro çalışmalar ile köken aldıkları atasal hücrelerden benzerlik ve farklılıkları tanımlanmıştır[37]:

- K562-Ir hücreleri, sadece imatinibe değil aynı zamanda dasatinib, nilotinib, bosutinib ve ponatibin yeraldığı 2. Ve 3. Nesil TKİ'lere dirençlidir.
- BCR-ABL gen bölgesi sekans analizi ile imatinib direncine neden olan (BCR-ABL bağımlı mekanizmalardan) BCR-ABL kinaz domeyni mutasyonu ve BCR-ABL gen bölgesi amplifikasyonuna bakılmış ve dirençli hücrelerde kinaz domeyninde herhangi bir mutasyon olmadığı, BCR-ABL gen bölgesi amplifikasyonu açısından her iki hücre hattı arasında bir fark olmadığı saptanmıştır.
- Western blot yöntemi ile imatinib direncine neden olan ve ilaçların hücre içinde etkili olabilicekleri terapotik konsantrasyona ulaşmaması(BCR-ABL bağımsız mekanizmalardan) test edilmiş ve hem atasal K562 hem de dirençli K562-Ir hücre hattında benzer şekilde hem BCR-ABL hemde yolağın aşağı yönünde bulunan proteinlerin fosforilasyonlarının azaldığı ve bu yolağın baskılandığı saptanmıştır. Bu durum, imatinibin dirençli hücreler içine girdiğini ve etki gösterdiğine işaret etmiştir. Ancak BCR-ABL baskılanmasına rağmen, dirençli hücreler çoğalmaya devam ettiği için BCR-ABL'in o hücreler için yaşam sinyali olmadığı sonucunu doğurmuştur.
- K562 hücreleri, hematopoietik kökenli, yuvarlak ve süspanse hücreler olmasına rağmen, klonal selleksiyon sürecinde K562-Ir hücrelerinde imatinib baskısı altında morfolojik değişiklikler gözlenmiştir. Bu dirençli hücreler ile yapılan hücre kültürü

çalışmalarında, yüzen-süspanse ve yere yapışan-adheren iki farklı morfoloji sergiledikleri saptanmıştır. Sonrasında adheren hücrelerin DNA profili ve hücre tanımı çalışmaları, bağımsız bir laboratuvar tarafından yapılmış ve sonuçlar bu hücrelerin, atasal hücre hattı olan K562'den köken aldıklarını ortaya koymuştur.

- K562-Ir hücreleri in vitro hücre kültüründe K562'ye göre 4 kat daha yavaş prolifere olmasına rağmen senesens çalışmaları (doksorubisin ile), bu hücrelerin doksorubisine dirençli olduğunu ve hücrelerin yavaş proliferasyonunun senesens ile ilişkili olmadığını ortaya koymuştur. Literatürlerde genellikle kanser populasyonlarında yavaş çoğalan hücreler önceki bölümlerde anlatılan CSC'ler ile ilişkilendirilmektedir.
- K562-Ir hücrelerinin yavaş proliferasyonu ve bu dirençli populasyonda adheren morfolojide hücrelerin varlığı, 3 boyutlu kültürlerde K562'den farklı davranabileceğini düşündürmüştür. Gerçektende yarı-katı besi ortamı olan agar'da atasal hücrelerin aksine imatinib-dirençli hücreler tümör sferoidi oluşturmuştur. Ve yine literatürlerde, tümör sferoidleri meydana getirme daha önce bahsedilmiş olan tümör başlatıcı hücre- CSC'leri yada CSC benzeri hücre varlığı ile ilişkilendirilmektedir. Ek olarak diğer yayınlarda, sferoid oluşumu E-Kadherin ile ilişkilendirilmiş olduğundan immunofloresans deneyleri yapılmıştır. Sonuç olarak K562 hücreleri epitel kökenli olmadığından E-Kadherin ifade etmemesine rağmen, K562-Ir hücrelerinin E-Kadherin genini yüksek seviyede eksprese ettikleri saptanmıştır. Epitel belirteçlerden biri olan E-Kadherininin, myeloid kökenli atasal hücrelerden türetilmiş dirençli hücreler tarafından sentezleniyor olması, popülasyon içerisinde bir grup hücrenin epigenetik değişiklik geçirdiğini düşündürmüştür.
- K562-Ir hücrelerini tanımlamak ve hücre tiplendirmesi yapmak için akım sitometri deneyleri ile yüzey belirteçleri(Cluster of Diffentiation (CD)) taranmıştır ve sonuçlar özetle dirençli hücrelerin köken aldıkları hematopoetik seri özelliklerinden uzaklaştıklarını desteklemektedir. Bu çalışmaların sonuçları aşağıda detaylandırılmıştır:
- Yapışan hücrelerin iğ şeklinde morfolojisi nedeniyle mezenkimal kök hücre benzeri oldukları düşünülmüş ve buna göre tarama yapılmıştır. CD45, atasal K562 hücrelerinin hematopoetik kökenli olduğunu gösteren en önemli belirteçtir ve K562-Ir hücrelerinde ekspresyonu önemli ölçüde azalmıştır. Bu bize dirençli hücrelerin, köken

aldıkları hücrelerin dahil olduğu hematolojik morfoloji ve biyolojiden uzaklaştığını göstermiştir. CD44 mezenkimal kök hücre ve CSC belirteçlerinden biridir ve K562'de negatif, K562-Ir hücrelerinde pozitiftir. CD146, K562 ve myeloid hücrelerde eksprese olmaktadır. Yapılan ölçümde atasal K562 pozitif iken, K562-Ir negatiftir.

- Hematolojik yüzey belirteçleri açısından da inceleme yapılmıştır. CD33, myeloid ve lenfoid kökenli hücrelerin genelinde eksprese edilmektedir. Atasal K562 hattında CD33 yüksek düzeyde eksprese ediliyorken, K562-Ir'de CD33 ekspresyonu azalmıştır. CD65, myeloid hücrelerde ifade edilen E-selektin ligandıdır ve K562'de gen ekspresyonu yüksek olmasına rağmen, K562-Ir'de gen ekspresyonu düşüktür. Hem CD33, hem de CD65 sonuçları, dirençli hücrelerin hematolojik hücre seri özelliklerinden uzaklaştığına işaret etmektedir. Hematopoetik kök hücre belirteci olan CD34 ise her iki hücre hattında düşük seviyede eksprese olmaktadır.
- EpCAM(CD326) proteini epitel kökenli hücrelerin hücre-hücre bağlantılarında rol oynar fakat K562 hücrelerinde de bulunabileceğini gösteren çalışmalar vardır. K562-Ir hücrelerinde akım sitometri ile ölçüldüğünde CD326 gen ekspresyonunun azaldığı saptanmıştır.
- Atasal K562, dirençli K562-Ir (imatinibsiz ortamda bulunan dirençli hücreler), dirençli K562-Ir+ i (imatinibli ortamda bulunan yüzen hücreler) ve dirençli K562-Ir+ M (imatinibli ortamda bulunan adheren hücreler) tüm genom mRNA mikrodizin analizine gönderilmiş ve bunun sonucunda yüzen ve yapışan dirençli hücrelerin gen ekspresyon profillerinin benzer olduğu sonucu ortaya çıkmıştır. Ancak ortamda imatinib bulunmadığı durumda bile, dirençli hücrelerin gen profilinin, atasal köken aldıkları hücrelere benzemediği, atasal ve dirençli hücreler kıyaslandığında yaklaşık 1640 genin ekspresyonunun değiştiği sonucuna ulaşılmıştır. Atasal hücrelere kıyasla ekspresyonu değişen genler arasında proliferasyon, doku oluşum genleri, anatomik yapı genleri, farklılaşma genleri ve adhezyon/migrasyon/motilite genleri, gelişim genleri bulunmaktadır.

İmatinib-dirençli K562-Ir hücrelerinin, bu bölümde açıklanan in vitro çalışmalar ile, (EpCAM, CD44, E-kadherin gibi yüzey moleküllerindeki değişiklikler, hücre morfolojisindeki değişiklikler, tümör sferoidi oluşturma ve 1640 genin ekspresyon profilindeki değişiklikler ve

benzeri) köken aldıkları atasal hücrelerden biyolojik ve davranışsal özellikler açısından uzaklaştığı gözlenmiştir[37].

Dirençli hücre hatlarının tüm in vitro çalışmaları, Doç.Dr.Zeynep YÜCE'nin danışmanlığında, Dr.Seda BAYKAL KÖSE tarafından yürütülen doktora tezi kapsamında tamamlanmıştır ve bu süreçte in vitro da yapılacak deneylerin sınırına gelinmiştir. Bu nedenle bu tez çalışması kapsamında, in vivo dirençli hücre davranışlarını araştırmayı ve KML'de ilaç direnci sorununun aşılmasına katkı sağlamayı hedefledik[37].

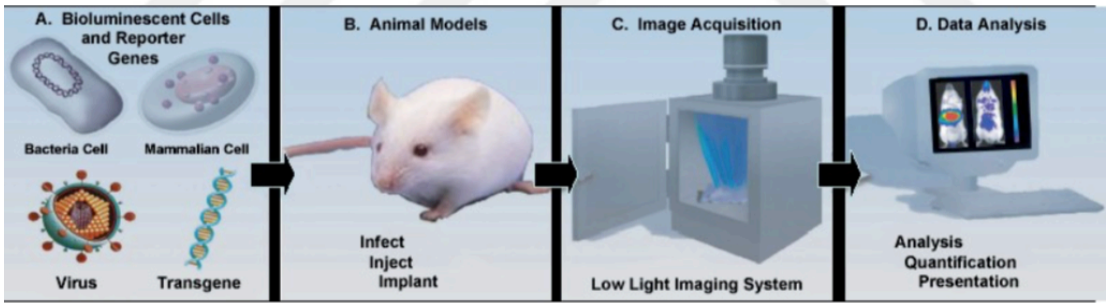
Önceki bölümlerde anlatıldığı üzere, tedavi direnci KML hastalarının %30'unu etkileyen önemli bir sorundur ve bu alanda yapılan çalışmalar tedavi direnci mekanizmalarının ortaya çıkarılmasını hedeflemektedir . Günümüzde gerek BCR-ABL bağımlı mekanizmalar, gerekse BCR-ABL bağımsız mekanizmaların rolleri halen araştırılmaya devam etmekte, kanser kök hücresi ve lösemik kök hücre çalışmalarına ilgi artmaktadır. Ancak direncin altında yatan moleküler mekanizmalar tam olarak aydınlatılabilmiş değildir. Klonal seleksiyon sonucunda laboratuvarımızda geliştirilen imatinib-dirençli hücreler yukarıda belirtilen biyolojik ve davranışsal farklılıkları nedeni ile klinikte sekonder direnç geliştiren hasta grubunu modellemektedir. Bu nedenle bu hücrelerin, in vivo hücre davranışlarını incelemek ve atasal hücrelerden farklılıklarını ortaya koymaya ihtiyaç vardır. Örneğin, atasal hücrelere kıyasla in vitro tümör sferoidi oluşturma potansiyeli farklılığına benzer şekilde, dirençli hücrelerin tümör yapısı içindeki morfolojisini araştırmak(hem yüzen hem adheren hücre popülasyonlarının varlığı) ve bu hücrelerin yuvalanma potansiyelleri ile yerleşim bölgelerini saptamak, atasal hücrelerin oluşturduğu tümör (K562'nin literatürde subkutan olarak tümör oluşturduğu bilinmektedir) ile imatinib dirençli hücrelerin oluşturduğu tümör yapısının farklarını belirlemek (daha yavaş proliferasyon veya daha agresif; yavaş prolifere olan ve aynı zamanda agresif davranış gösteren; in vitro bulguların tersine daha hızlı prolifere olan ve daha agresif davranış gösteren ve benzeri), bu dirençli hücrelerin metastaz kapasitesi olup olmadığını araştırmak (hücre popülasyonunda bulunan adheren morfoloji sergileyen hücreler) ve sonuç olarak dirençli hücre davranışları ve bunun KML direnç biyolojisine katkısının araştırılabilmesi için yükseklisans tezime konu olan atimik Balb-c/ nude farelerde subkutan in vivo çalışma tasarlanmıştır[37].

Bir sonraki bölümde, in vivo çalışmalarda hücre popülasyonları ve tümör oluşumunun görüntülenmesinde kullanılan ve bizim de çalışmalarımızda faydalandığımız görüntüleme cihaz teknolojileri hakkında bilgi verilmiştir.

2.6. IVIS® GÖRÜNTÜLEME

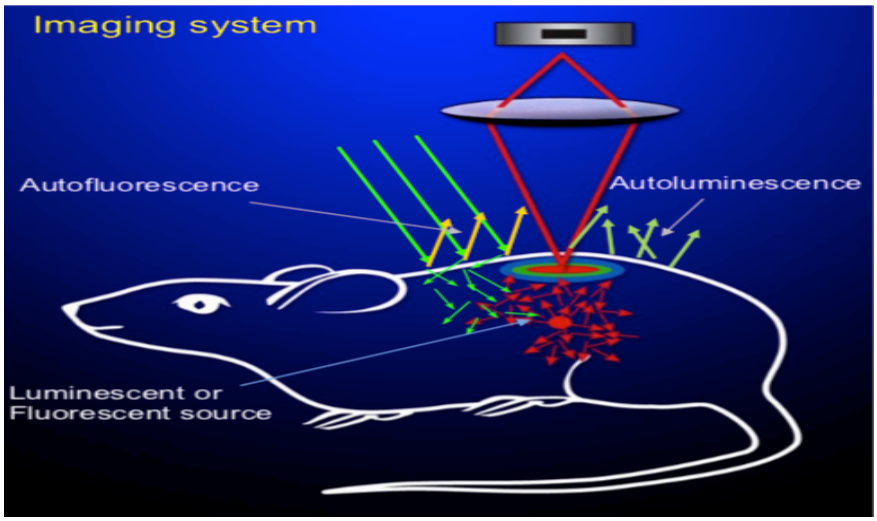
IVIS® preklinik araştırmalarda kullanılan ve invaziv olmayan, farelerde takip edilebilir ışık sinyali yayan lusiferazın(biyolüminesans) ve floresanın görüntülenebildiği, hassas optik görüntüleme cihazıdır. Bu teknoloji, görüntüleme öncesi hazırlığı kolayca yapılabilen, yüksek çözünürlüklü, radyasyon gerektirmeyen, hem floresans hemde biyolüminesans ölçüme izin veren ve fonksiyonel analizlere olanak sağlayan avantajlara sahiptir[38].

Cihazın görüntüleme kabiliyeti basitçe şu temele dayanır (Şekil-10): ilgilenilen alandaki memeli hücresine bakteri yada virüs transfeksiyonu ile biyolüminesans ve raportör genler aktarılır. Daha sonra ilgilenilen hayvan modelinin oluşturulması için, deney hayvanlarına hazırlanan hücreler araştırma planına uygun şekilde infeksiyon, enjeksiyon yada implant(örneğin kemik iliği/transgene ve benzeri) yapılır. Ve son basamakta görüntüleme öncesi biyolüminesans ölçümde lusiferaz için gereken subtrat lusiferin ile deney hayvanı doyurulduktan sonra, hayvanlar görüntüleme için IVIS® cihazına alınır ve sinyal verileri analiz edilir[38].



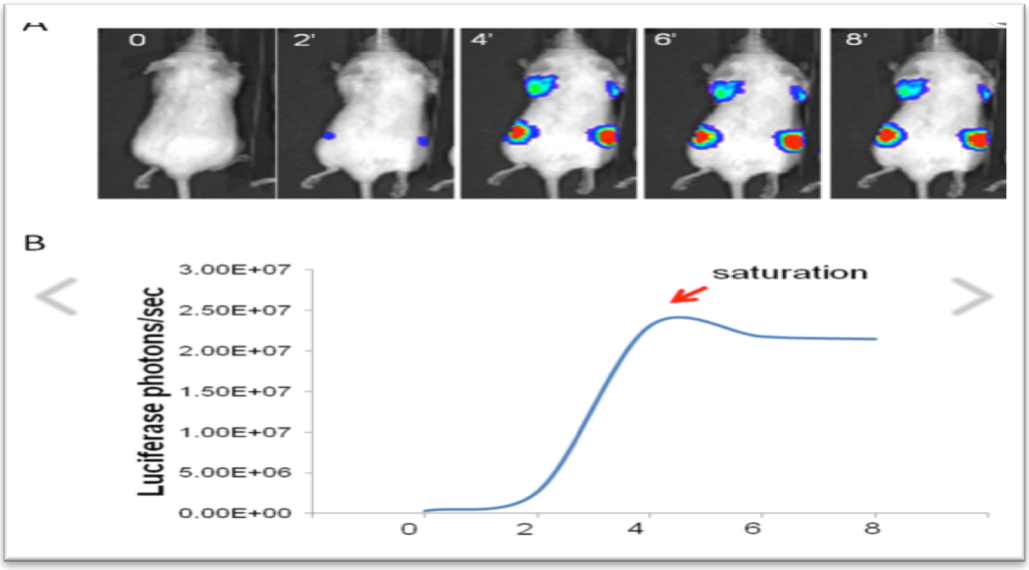
Şekil 10-IVIS in vivo görüntüleme işlem basamakları.[38]

İşaretlemede kullanılan floresan(ışık veren-floroklorm) moleküllerden biri olan yeşil floresan proteinin (GFP) görüntülenmesi ise, bu floresan moleküllerin ışık altında son yörüngelerinde bulunan elektronu bir üst orbitale sıçratarak kararsız hale geçmesi ve sonrasında kararlı hale geçmek için bu elektronlarını temel hale(ground state) döndürmek istediğinde ışıma yayması sayesinde olur. Cihaz biyolüminesans veya floresans kaynağından gelen ışıma sinyallerinin fotoğrafını çeker ve foton cinsinden miktarlarını kaydeder. Görüntüleme prensibi Şekil-11'de gösterilmektedir. Bu sayede tümör boyutu, geleneksel ve fiziksel yollarla palpabl hale gelmeden tümör oluşumu ve büyümesi izlenebilir[38].



Şekil 11-IVIS görüntüleme prensibi[38]

IVIS ile beyaz ışık ve nicel olarak ölçülen biyolüminesans ya da floresans sinyali altında hayvanlar canlı olarak görüntülenebilir. Biyolüminesans sinyali her bir saniye için foton cinsinden ifade edilir ve ekranda yoğun bir harita olarak görüntülenir(Şekil-12). Tümörden gelen foton akışı, luciferaz eksprese eden hücrelerin sayısı ile doğru orantılıdır. Bu nedenle biyolüminesans tümör boyutu ile uyumludur. Tümör boyutu insani son noktaya ulaşıncaya dek, biyolüminesans ölçüm belli aralıklarla planlanabilir[39].



Şekil 12-Biyolüminesans in vivo görüntüleme.[39]

A. Temsili olarak lusiferaz süreci her 2 dakikada bir olan, luciferin enjekte edilmiş deri altı tümör taşıyan farelerin görüntülenmesi. B. Grafik , A' da gösterilen deneyin sonuçlanmasına karar verilen 8. dakikaya kadar elde edilen tüm farelerin biyolüminesans doyma noktasını göstermektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ARAŞTIRMANIN TİPİ

Çalışmamız araştırma yöntemlerinden girişimsel olan - hayvan deneyleri ve deneysel laboratuvar methodları ile yapılmıştır.

3.2. ARAŞTIRMANIN YERİ VE ZAMANI

Bu çalışmanın in vivo görüntüleme için luciferaz transdüksiyonu ve optimizasyonu Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Buradaki çalışmanın tamamlanmasının ardından, in vivo deneyler Bilkent Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Ünitesinde yapılmıştır. Atimik fareler Bilkent Üniversitesinde üretilmektedir. Deney süresince fareler 8 hafta boyunca Bilkent Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Ünitesi'nde barındırılmıştır. Deney hayvanlarına subkutan olarak TKİ dirençli ve duyarlı lösemik hücreler enjekte edilmiş ve takip için 0. Gün, 8.gün, 7.hafta ve 8.hafta sonunda yine Bilkent Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ünitesinde in vivo görüntülemeden hemen önce anesteziye alınıp, IVIS optik görüntüleme yapılmış ve veriler kayıt altına alınmıştır. Deney sonunda hayvanlar sakrifiye edilmiş, organ ve dokulardan ex-vivo görüntüleme yapılmış ve toplanan örnekler paraformaldehit/PBS içerisinde fikse edilerek ileri ki çalışmalarımızda kullanılmak üzere laboratuvarımıza getirilmiştir. Araştırmamız için 9 Eylül Üniversitesi ve Bilkent Üniversitesinden alınan Etik Kurul Onay Belgesi ekte sunulmuştur.

3.3. ARAŞTIRMANIN EVRENI VE ÖRNEKLEMİ / ÇALIŞMA GRUPLARI

22 adet Atimik Balb-c/ Nude fare ile çalışılmıştır.

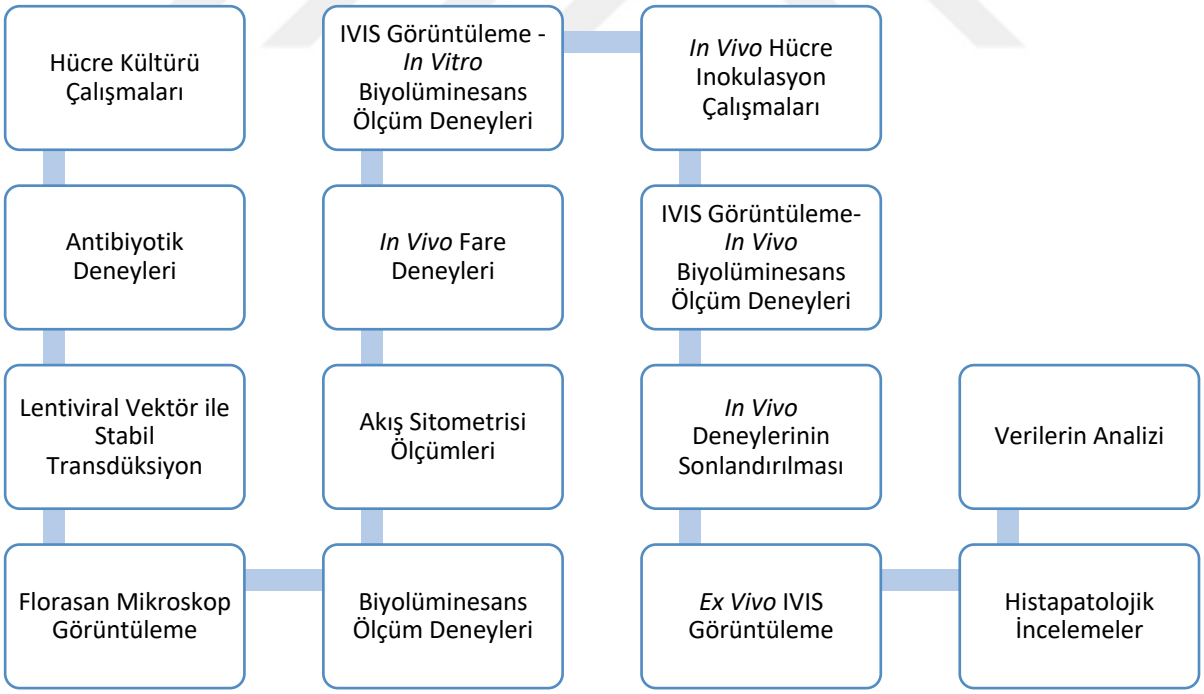
3.4. ÇALIŞMA MATERYALİ

Araştırmada temel olarak kullanılan hücre hattı K562, ticari olarak satılan insan kronik myeloid lösemi hücre hattıdır. Araştırma, K562 hücre hattı ve bu atasal hücre hattından imatinib baskısı altında klonal seçilimle elde edilmiş imatinib-dirençli K562-Ir hücre hattının atimik nude farelerde çalışılmasını kapsamaktır.

3.5. ARAŞTIRMANIN DEĞİŞKENLERİ

Atasal K562 hücre hattı, K62-Ir hücre hattı için kontrol grubu olarak kullanılacaktır. İmatinib bağımsız değişkendir.

3.6. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI



Tablo 1-Veri Toplama Araçlarının İş Akış Şeması Halinde Gösterimi

Veri toplama araçları iş akış şeması halinde Tablo-1'de verilmiştir.

3.6.1. Hücre Hattı ve Hücre Kültürü

3.6.1.1. *K-562 Hücre hattı*

K-562 hücre hattı, BCR- ABL geninini ifade eden, köken olarak blast krizinde olan bir kronik myeloid lösemi hastasından üretilmiştir. İkilenme zamanı yaklaşık 12 saat olup, hücreler yuvarlak, 20 µm çapında ve süspanse özellik göstermektedir.

3.6.1.2. *K562- Ir Hücre hattı*

Doç. Dr. Zeynep YÜCE danışmanlığı altında Dr.Seda BAYKAL KÖSE'nin doktora tezi kapsamında (DEU.HSI.PhD- 2010970090), K562 hücre hattından hücre kültürü modeliyle geliştirilen imatinib dirençli lösemik hücrelerdir. K562 hücre hattını artan İmatinib dozlarına maruz bırakarak hücrelerin *in vitro* koşullarda imatinib direnci kazanması sağlanmıştır. Dirençli hücreler ile atasal hücrelerle kıyaslandığında; bu hücrelerin yalnız imatinibe değil yeni nesil TKİ'lere de dirençli oldukları, doksorubisine bağlı DNA hasarına dirençli oldukları, yavaş çoğaldıkları, fenotipik esnekliğe sahip oldukları, tümör sferoidi oluşturabildikleri, hücre-doku-organ farklılaşmasında rol oynayan genleri farklı ifade ettikleri ve yüzey proteinlerinin değiştiğini ortaya koymuştur. Bu dirençli hücrelerimiz ile ilgili bilgiler genel bilgiler içerisinde detaylı olarak aktarılmıştır.(Bknz.2.5-İmatinib dirençli hücre hattı)

3.6.1.3. *Besi Ortamı Hazırlanması ve Hücre Hatlarının İdamesi*

1X 500 ml. RPMI 1640 besi ortamına, 2 mM konsantrasyonda L- Glutamin, 1 µg/ml konsantrasyonda Penisilin/Streptomisin ve %10 oranında FBS eklenmiş ve gerektiğinde kullanım için +4° C'de saklanmıştır. K562-Ir hücrelerinin idamesi için besi ortamına son konsantrasyonu 10 µM olacak şekilde imatinib eklenmiştir. Hücreler %5 CO_2 içeren 37 ° C'de inkübasyona bırakılmıştır. Hücre hatları, hücre yoğunluğu takip edilerek (%80- 90 konfluensiye ulaştığında) 2- 3 günde bir 1:2 veya 1:3 oranında pasajlanmıştır.

3.6.1.4. *Hücre Dondurma Ortamı Hazırlanması ve Dondurma Yöntemi*

Her iki hücre hattı sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere zaman zaman stok oluşturmak için dondurulmuştur. Hücre dondurma ortamı için %50 RPMI 1640, %40 FBS ve %10 DMSO kullanılmıştır ve +4° C de kullanım için saklanmıştır. Yöntem için aşağıdaki protokol uygulanmıştır:

1. Kültür ortamı resuspend edildikten sonra 15 ml'lik steril santrifüj tüpüne aktarılır.
2. 500 G hızında 5 dk. santrifüj edildikten sonra üst faz atılır.
3. Hücre pelleti üzerine 1 ml hazırlanan dondurma ortamı eklenir.
4. Pipetaj yapıldıktan sonra hücreler dondurma tüplerine aktarılır.
5. Donma işleminin yavaş olması için -20° C en az 1 saat bekletilir.
6. Gerektiğinde çözmek için -80° C ye kaldırılır.

3.6.2. Kullanılan Tirozin Kinaz İnhibitörü ve Antibiyotik

K562 ve K562-Ir hücreleri üzerinde imatinib mesylate (Acros Organics, Lot no:A0374689, İmatinib mesylate, 1 gr.) ve lentivirüs ile stabil transfeksiyon sonrası hücrelerin seleksiyonu için antibiyotik olarak puromycin (Puromycin dihydrochloride, Lot no:088M4043V-50 mg/ml stok) kullanılmıştır.

3.6.3. Hücre Ölümü Yöntemleri

3.6.3.1. *Tripan Mavisi Canlılık Testi*

Tripan mavisi canlılık testi, ölü hücrelerin membran bütünlüklerinin bozulması nedeniyle, tripan mavisi boyasının ölü hücre içerisine nüfuz etmesi, canlı hücrelerin ise hücre membran bütünlüğünün varolması nedeniyle boyanmaması sayesinde, canlı ve ölü hücreleri mikroskop altında ayırt etmemizi sağlayan bir tekniktir. Boyanan ölü hücreler mikroskop altında mavi sitoplazmalı gözlenirken, canlı hücrelerin ki saydam ve parlaktır. Hücre

kültüründe hücre sayımı hemositometri (Thoma Lamı) ile yapılır ve bu lamlar üzerinde bulunan bölümlenmiş 9 adet kare içerisindeki hücrelerin tamamı sayılarak , standart formülü yardımıyla 1 ml'deki hücre sayısı ve canlılık yüzdesi hesaplanır. Araştırmamız boyunca K562 ve K562-Ir hücrelerine çeşitli ölçüm ve analizler öncesinde aşağıdaki protokol ile canlılık testi uygulanmıştır:

1. Flasklar önce resuspend edilip, hücre süspansiyonundan 0,5 ml örnek alındı.
2. 1:1 oranında tripan mavisi boyası ve PBS mikrosantrifüj tüpünde pipetaj ile karıştırıldı.
3. Hazırlanan tripan mavisi boyası + PBS karışımından 0,5 ml alınıp 0,5 ml hücre süspansiyonu ile karıştırıldı.
4. Thoma laminin kenarlarına 1'er damla su damlatılıp lamel kapatıldı
5. Lam ile lamel arasında yeralan boşluktan 10 µl tripan mavisi + pbs +hücre süspansiyonu Thoma lamına yüklendi.
6. Işık mikroskobuna yerleştirilen Thoma lamı 10X objektifte incelenerek, hücre sayımı gerçekleştirildi.
7. Objektifte mavi boyanın nüfuz ettiği hücreler ölü, saydam renkte görülenler ise canlı olarak değerlendirildi.
8. 1 ml. de varolan canlı hücre sayısı ve % canlılık oranı aşağıdaki formüller ile hesaplandı.

Canlı hücre sayısı = (Toplam canlı hücre sayısı : 9) x Dilüsyon oranı x 10^4

Canlılık yüzdesi = Canlı hücre sayısı : Toplam hücre sayısı (Ölü hücre sayısı+ Canlı hücre sayısı)

3.6.4. Antibiyotik (Puromycin) Seleksiyonu İçin Konsantrasyon Tayini

K562(Atasal) ve K562- Ir (İmatinib dirençli) hücre hatlarının lentivirüs ile stabil transdüksiyon işlemi öncesinde, kullanılacak lentivirüste bulunan puromycin antibiyotiğine

karşı direnç geni sayesinde, transfekte olmayan hücrelerin, hücre populasyonundan elimine edilmesi amacıyla kullanılması gereken puromycin dozları aşağıdaki yöntem ile saptanmıştır:

1. Hücre hatlarının tripan mavisi canlılık testi ile hücre sayıları ve canlılık yüzdeleri hesaplandı.
2. Her iki hücre hattı için 2 ayrı 24- kuyulu plate kullanıldı.
3. Kontrol kuyusu (puromycin eklenmeyen) ve puromycin eklenecek kuyular ikişerli çalışılacak şekilde , 6 farklı son konsantrasyon dozu belirlendi.
4. 24- kuyulu plate' lere, her bir kuyuya 100.000 hücre/ml olacak şekilde hücre ekimi gerçekleştirildi.
5. Ekimi yapılan hücrelere son konsantrasyonu 1 µg/ml olan puromycinden, kontrol- 0,5 µg – 1 µg – 2 µg – 4 µg – 8 µg – 10 µg şeklinde toplam 6 farklı konsantrasyonda puromycin eklendi ve 24- kuyulu plate'ler 37° C %5 CO_2 de inkübasyona bırakıldı.
6. 24., 48., 72., 96. ve 120. saatler için tripan mavisi canlılık testi yapılarak hücre sayıları ve canlılık yüzdeleri hesaplandı.
7. Elde edilen tüm veriler en son aşamada grafik haline getirilerek, transfekte olmayan hücre eliminasyonu için gereken puromycin dozu saptandı.

3.6.5. Atasal ve Dirençli Hücrelerin Lentivirüs ile Stabil Transdüksiyonu

Amacımız imatinib dirençli K562-Ir hücrelerinin, hücre davranışı ve tümör oluşturma kapasitesinin değerlendirilebilmesi için, atimik farelerde subkutan enjeksiyon sonrası dirençli hücrelerin canlı sistemlerdeki davranışının araştırılması ve TKİ direncine yol açabilecek mekanizmaların ve lösemik kök hücre varlığının in vivo koşullarda incelenmesidir. Bu amaç doğrultusunda, atasal (K562) ve imatinib dirençli (K562-Ir) hücreler in vitro lusiferaz geni ve yeşil floresan protein geni (GFP) içeren bir lentivirüs ile işaretlenmesi amacıyla stabil transdüksiyon deneyleri yapılmıştır. Bu sayede IVIS görüntüleme çalışmaları sırasında, lusiferazın substratı olan lusiferin verilerek farelerde işaretli hücrelerin bulunduğu alan ve dokuların tespiti planlanmıştır.

Lentiviral parçacıklar uzun süreli ekspresyon için transdükte olmuş hücrelerin genomuna stabil olarak integre olur. Bu vektörler floreasan yada biyolüminesan proteinleri ya da her ikisini birden eksprese eder. Her floresan proteini, güçlü floresan sinyali gösterir ve bir promotör seçimi altında eksprese edilir. Lusiferazlar, gen ekspresyonu ile bağlantılı hücresel olayları izlemek için raportör deneylerinde yaygın olarak kullanılır. Ateşböceği luciferase (F-Luc) en yaygın kullanılan biyolüminesans raportördür. Lentiviral vektörler genellikle, transdüksiyona uğramış stabil hücrelerin seçimine izin veren farklı antibiyotik belirteçleri ile birlikte sunulmaktadır. Deneyimizde HIV-1 tabanlı plasmidlerden biri olan LPV437 lentiviral vektörünü kullandık(Şekil-13). Vektördeki EF1a promotörü dokuya özgü değildir, tüm hücre tiplerinde yüksek düzeyde aktiftir ve uzun süreli kültürden sonra knockout olasılığı oldukça düşüktür.

LPV437, EF1a promotörü kontrolünde biyolüminesan protein luciseraz ve floresan protein GFP exprese eder. Rsv promotörü kontrolü altında ise puromycin direnç geni bulunur.[40]



Şekil 13-Lusiferaz eksprese eden lentiviral vektörün şematize gösterimi. [41]

Kullandığımız vektörde promotör olarak EF1a lusiferaz ve GFP için Rsv ise puromycin markerı için promotördür.

Deneyimizde stabil hücre hatlarının oluşturulmasında LVP437 lentivirüsü ile transfeksiyonu takiben 24 saat sonunda LVP437 lentivirüsünde bulunan puromycin antibiyotik dirençliliği gen parçacığı ile antibiyotik seleksiyonu protokole uygun şekilde başlatılmıştır. Kullanılan antibiyotik konsantrasyonu önceki basamakta belirlendiği şekilde son konsantrasyonu 4 µg/ml olarak sürdürülmüştür. Yapılmış olan deneylerde hücrelerin stabil hale geldiği, transfekte olmamış hücrelerin, bu direnç genini içermediğinden ölümü ile ve ilerleyen aşamada biyolüminesans ölçümü, floresan mikroskop görüntüleme ve akış sitometrik ölçüm teknikleriyle doğrulanmıştır.

Lentivirüs ile stabil transfekiyon işlemi için aşağıdaki protokol uygulanmıştır:

Gereçler:

- Lentivirüs (Amsbio, Katalog: LVP437-PBS, EF1a Luciferase , 2A-GFP (Puro), in vivo ready)
- Polybren
- Puromycin
- Hücre kültürü gereçleri
- 12 ve 6 kuyulu plate
- İnverted mikroskop
- 37 ° C % 5 CO2 inkübatör
- Mikrosantrifüj tüpleri
- Santrifüj cihazı (Thermomixer Comfort)
- T- 25 ve T- 75 flask
- İnkübatör (Nuare)
- Mikroskop (Nikon ECLIPSE TS 100)

Yöntem:

1. K562 ve K562- Ir hücre hatlarının tripan mavisi canlılık testi ile hücre sayısı ve canlılık yüzdesi belirlendi.
2. Her iki hücre hattından 0,5 ml'de $5x10^5$ hücre olacak şekilde hücre süspansiyonu mikrosantrifüj tüpüne alındı.
3. Her bir hücre süspansiyonuna 20 µl lentivirüs ve 1,2 µl polybren eklendi.
4. Hazırlanan hücre süspansiyonu + lentivirüs + polybren karışımı 800G'de 60 dakika santrifüjlendi.
5. Her iki hücre hattı için tek bir 12- kuyulu plate kullanıldı.
6. Bir kuyuda 0,5 ml' de $5x10^5$ hücre olacak şekilde, aynı plate te farklı iki kuyuya K562 ve K562-Ir hücrelerinin ekimi yapıldı.
7. Ekim sonrası 12- kuyulu plate 37° C %5 CO_2'de 24 saat inkübasyona bırakıldı.
8. 24. saat sonunda ışık mikroskobu 10X objektifte hücre hatlarının konfluensisi kontrol edildi ve 0,5' er ml ortam her iki kuyuya eklendi.

9. Antibiyotik deneyi sonucunda belirlenen puromycin son konsantrasyonu 4 µg /ml her iki kuyuya eklendikten sonra plate 37° C %5 CO_2 de inkübasyona bırakıldı.

10. 48. saat sonunda plate mikroskop altında kontrol edildi ve 12- kuyulu plate'den 6- kuyulu plate'e geçiş yapıldı

11. Son konsantrasyon 4 µg/ml puromycin olacak şekilde antibiyotik eklenip plate 37° C %5 CO_2 de inkübasyona bırakıldı.

12. 72. saat sonunda her iki hücre hattının mikroskop altında hücre konfluensisi kontrol edildi ve hücre süspansiyonları plate'den alınarak, atasal ve dirençli olmak üzere iki ayrı T- 25 flaska hücre ekimi gerçekleştirildi.

13. Hücre hatlarının son konsantrasyon dozu 4 µg/ml olarak belirlenen puromycin seleksiyonu altında genişletilip, idame ettirilmesi amacıyla in vivo deney aşamasına kadar hücre kültür teknikleri uygulandı.

3.6.5.1. *Floresan Mikroskop Görüntüleme Çalışmaları*

Floresan mikroskop görüntüleme çalışmalarımız, İzmir Biyogenom Merkezi'nde yapılmıştır. Bu çalışmalarda kullandığımız cihaz Olympus 1X71, USA'dır.

3.6.5.2. *Atasal Hücrelerin In vitro Biyolüminesans Ölçümü*

Biyolüminesans yöntemi, yaşayan tüm hücrelerde varolan ATP'nin lusiferin ve lusiferaz enzimi ile reaksiyona girmesi ve bu reaksiyon sonucu meydana gelen lusiferil odenilat kompleksinin oksijen ile birleşerek oksilusiferin, CO_2, AMP ve ışık meydana getirmesi esasına dayanır. D-lusiferin, ATP ve Mg varlığında lusiferinin oksilusiferine oksidasyonunu katalizleyen lusiferazın substrattıdır.[42] K562 ve K562- Ir hücrelerinin lusiferaz geni içeren bir lentivirüs ile stabil transfeksiyonunu gerçekleştirdikten sonra, D- lusiferin verilerek biyolüminesans ölçümü alındı.

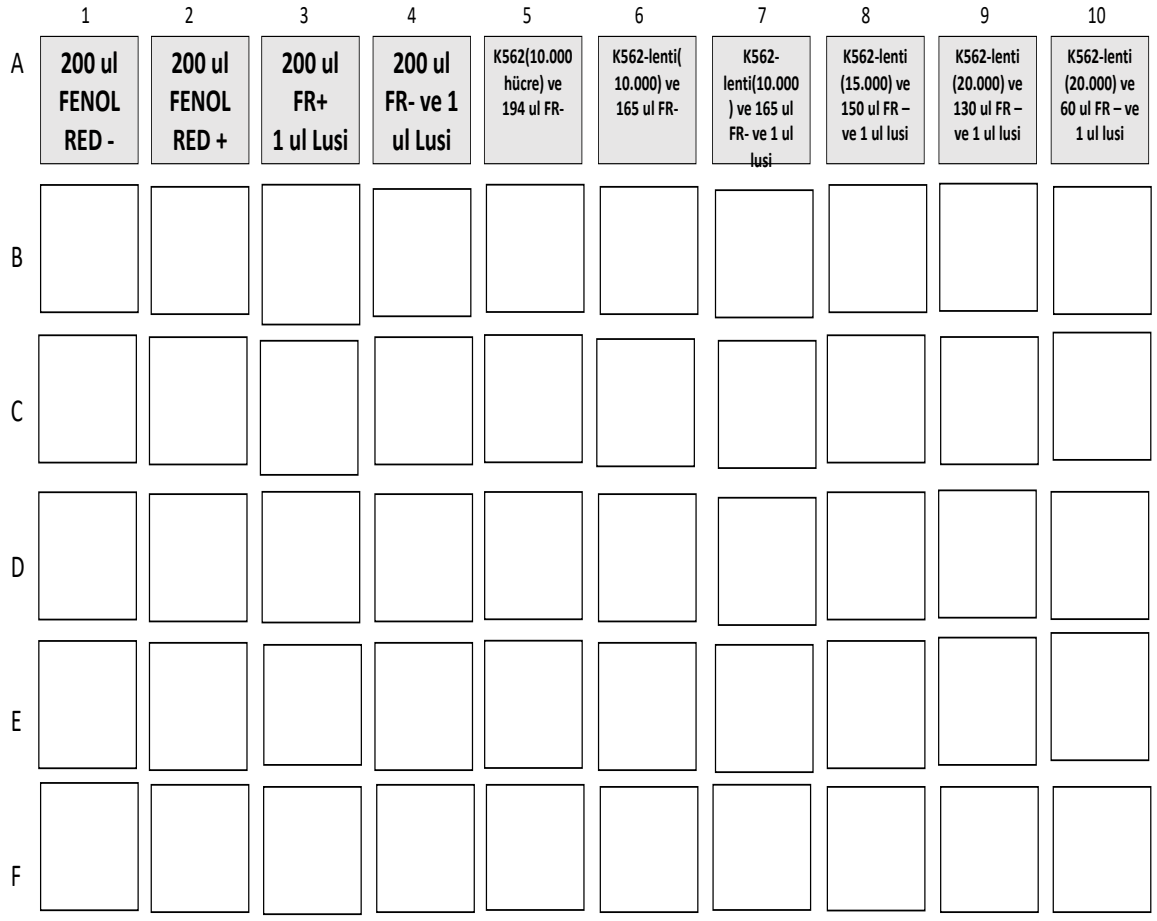
Gereçler:

- Pierce D- Luciferin, Monopotassium Salt, 100 mg.(Ürün kodu:88293)
- 96- kuyulu plate
- Ultra distile su (Invitrogen, Lot no: 1944284)
- RPMI 1640 tam besi ortamı (%1 penisilin/streptomisin,%10 FBS, %1 L-glutamin)
- Fenol Red' siz besi ortamı

- Biyolüminesans Cihazı(BioTek Synergy HT)

Yöntem:

1. K562 ve K562-lenti hücre hatlarının tripan mavisi canlılık testi ile hücre sayısı ve canlılık yüzdesi belirlendi.
2. Ultra distile su içerisinde 200X (30 mg/ml) lusiferin stok çözeltisi hazırlandı. Lusiferin tamamen çözülene kadar yavaşça ters çevrilerek karıştırıldı.
3. D-Lusiferin, Fenol Red olan ve Fenol Red olmayan besi ortamlarına son konsantrasyon 150 µg/ml olacak şekilde eklendi.
4. 96- kuyulu plate'e aşağıdaki şekilde hücre ekimi yapıldı ve lusiferin eklenerek 10 dakika karanlıkta inkübasyona bırakıldı.
5. Hazırlanan plate(Şekil-14) biyolüminesans ölçüm için cihaza verildi.



Şekil 14-In vitro biyolüminesans ölçüm için 96-kuyulu plate'e ekimin şematize edilmesi.

K562- lenti(atasal) hücre ekimi yapılan alan ve hücre sayıları gri renk ile gösterilmiştir. K562 :Lentivirüs ile işaretlenmemiş atasal hücre hattı. FR: Fenol Red, FR- : Fenol Red Olmayan Ortam, FR+ : Fenol Red İçeren Ortam, Lusi: D-Lusiferin (Plate'in tamamı çizilmemiş, sadece ekim yapılan alan gösterilmiştir)

3.6.5.3. *Akış Sitometrisi Cihazı(Flow Cytometry) ile Yeşil Floresan Protein Ölçümü*

Hücre biyolojisi çalışmalarında yeşil floresan proteini (GFP), tanımlayıcı gen ve hücre işaretleyici olarak kullanılmaktadır. GFP'nin en önemli katkılarından biri canlı hücreler içerisinde işaretleyici olarak kullanılabilmesidir. Bu çalışmamızda deney hayvanlarımıza inoküle edeceğimiz imatinib dirençli hücrelerimizi, in vitro takip edebilmek amacıyla GFP genini de içeren lentiviral vektör stabil transdüksiyonunun verimliliğini ölçmeyi amaçladık.

Akış sitometri, süspanse hücrelerin bir akış kanalı boyunca geçerken tek tek incelenmesini ve ayrımlanmasını sağlayan bir cihazdır. Bu cihaz sayesinde, her bir hücre lazer demetin içinden geçerken dalga boyuna göre yönlendirilen lazer ışığı ve hücreler tarafından yayılan fluoresan ışığı bir araya getirilir. Optik filtreler ve aynalar yardımıyla farklı dalga boylarına göre ayrılarak, sinyallere dönüştürülür. Bu sinyaller dijitalleştirilerek, ölçülen parametrelerin frekans dağılımlarını görselleştiren histogramlar elde edilir.[43]

Gereçler:

- Akış Sitometri Cihazı (Flow Cytometyri/ BD LSRFortessa-İzmir Biyogenom Merkezi)
- Steril akış sitometri tüpleri(FALCON, 5 ml polystyrene Round-bottom tube, 125/ pack, ürün kodu: REF 352054) .
- DAPI 5 mg/ml (İnvitrogen, ürün kodu: D3571)
- 1ml Kryovial
- 0,22 µm'lik filtre . (Sterile Syringe Filter CA membrane,Lot no:161031fx1)
- 50 ml sterile injeksiyon.
- 50 ml santrifüj tüpleri
- Steril PBS (Sigma, Lot no: RNGB5457)
- FBS (Gibco, Lot no: 42G2076K)

Yöntem:

DAPI solüsyonunun hazırlanması: Ana stok DAPI (5 mg/ml)'den son konsantrasyonu 50 µg/ml olacak şekilde ara stok hazırlandı. Bunun için kryovial içerisine 495 µl steril PBS ve 5 µl DAPI eklendi ve gerektiğinde kullanım için -20° C'ye kaldırıldı.

1. İki ayrı 50 ml santrifüj tüpü içerisine %1 FBS içeren steril PBS solüsyonu hazırlandı.
2. Her iki tüpte varolan solüsyon, ayrı tüpler halinde, 50 ml'lik steril enjeksiyon yardımıyla 0,22 µm' lik filtreden geçirildi.

3. Filtrelenen %1 FBS + PBS solüsyonlarından birine son konsantrasyonu 0,2 µg/ml olacak şekilde DAPI eklendi. (her 5ml için 20 µl DAPI)
4. K562-Ir (lentivirüs ile transdükte edilmeyen imatinib dirençli hücreler) ve K562- Ir-lenti (lentivirüs ile transdükte edilen imatinib dirençli hücreler) hücreleri tripan mavisi canlılık testi ile sayıldı.
5. Her bir hücre hattından $1x10^6$/ml hücre sayısı olacak şekilde alınan hücre süspansiyonları, 2 ayrı 15 ml'lik santrifüj tüpüne alındı ve 500G'de 5 dakika santrifüjlendi ve üst faz atıldı.
6. K52-Ir ve K562-Ir-lenti hücre pelletleri üzerine filtrelenmiş %1FBS+ PBS+DAPI solüsyonundan 2 ml eklenip, hücreler DAPI ile karanlıkta 10 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra akış sitometri tüplerine aktarıldı.
7. Bir diğer K562- Ir ve K562-Ir-lenti hücre peletleri üzerine ise filtrelenmiş %1 FBS + PBS solüsyonundan 2 ml eklendi ve pipetaj yapıldıktan sonra akış sitometri tüplerine aktarıldı.
8. Etiketlenen 4 adet akış sitometri tüpü (K562-Ir cells with DAPI, K562-Ir cells without DAPI, K562-Ir cells GFP + without DAPI, K562- Ir cells GFP+ with DAPI) ölçüm için cihaza yüklendi.

K562-Ir-lenti dirençli hücreler, çalışma boyunca farklı zamanlarda flow cytometri ile toplam 12 kez GFP+ yüzde oranı ölçülmüştür. Bunlardan ilki için İzmir Biyogenom Merkezinden, diğer üçü için 9 Eylül Hematoloji Laboratuvarı'nda görev yapan Halil ATEŞ'ten ve sekizi için Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. İhsan GÜRSEL ve doktora öğrencisi Muzaffer YILDIRIM'dan destek alınmıştır.

3.6.5.4. *FACS İle Dirençli Hücrelerin Ayrımlanması İşlemi*

Gereçler:

- Hücre Kültürü gereçleri
- 15 ve 50 ml'lik santrifüj tüpleri
- FACS cihazı (BD FACSAria III-İzmir Biyogenom Merkezi)
- DAPI 5 mg/ ml (İnvitrogen, ürün kodu: D3571)
- FBS (Gibco, Lot no: 42G2076K)
- Steril PBS (Sigma, Lot no: RNGB5457)
- 0,22 µm'lik filtre . (Sterile Syringe Filter CA membrane,Lot no:161031fx1)

- 50 ml’ lik steril injeksiyon
- Steril Akış Sitometri tüpleri (FALCON, 5 ml polystyrene Round-bottom tube, 125/ pack, Ürün Kodu: REF 352054)
- RPMI 1640 tam besi ortamı (Lot no: RNBG9151)
- Santrifüj cihazı (Hettich ZENTRIFUGEN, ROTANTA 460R)
- Hücre Sayım Cihazı (Arthur Novel Fluorescence Cell Counter)
- Cell strainer (Falcon, 40 µl, Ref no:352340)

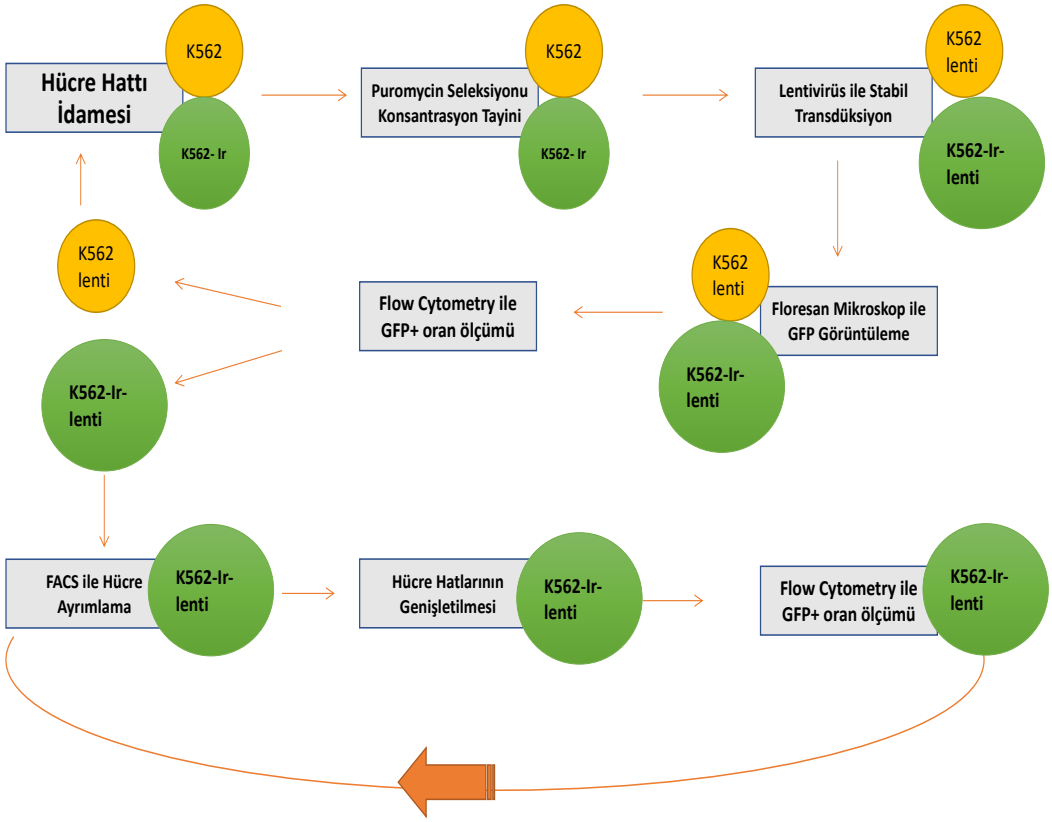
Yöntem:

1. K562-Ir ve K562-Ir- enti hücre süspansiyonlarının bulunduğu flasklardan 25 µl örnek alındı ve hücre sayım cihazında sayım yapıldı.
2. K562- Ir hücre hattı için $1x10^6$, K562- Ir- lenti hücre hattı için $30x10^6$ hücre olacak şekilde 15 ve 50 ml’lik santrifüj tüplerine hücre süspansiyonu alınarak, 500G’ de 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatan uzaklaştırıldı.
3. %1 FBS + PBS solüsyonu hazırlandı ve 50 ml’lik steril injeksiyon yardımıyla 0,22 µl’ lik filtreden geçirildi.
4. %1 FBS + PBS + DAPI (DAPI son konsantrasyon 0,2 µl/ml) solüsyonu hazırlandı ve bu solüsyon 50 ml’lik steril injeksiyon yardımıyla 0,22 µl filtreden geçirildi.
5. Hazırlanan DAPI’li solüsyondan, K562- Ir hücre peleti üzerine 2 ml, K562- Ir-lenti hücre peleti üzerine 5 ml aktarıldı ve 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
6. Süre sonunda hücre süspansiyonlarının bulunduğu santrifüj tüpleri, 500G’ de 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatan atılarak DAPI’li ortam uzaklaştırıldı.
7. Hazırlanan %1 FBS+ PBS solüsyonundan K562-Ir hücre pelleti üzerine 2 ml ve K562-Ir-lenti hücre pelleti üzerine 6ml eklenip pipetaj yapıldı.
8. Hücre örnekleri akış sitometri tüplerine aktarılmadan önce hücre kümelerinin açılması ve FACS cihazında tıkanmaya neden olmaması amacıyla cell strainer’dan geçirildi.
9. K562- Ir $5x10^5$/ml, K562-Ir-lenti $5x10^6$/ml olacak şekilde akış sitometri tüplerine alındı.
10. Ayrımlanan hücrelerin toplanacağı kollleksiyon ortamı için, %30 FBS içeren RPMI-1640 besi ortamı hazırlandı ve 2’şer ml olarak steril akış sitometri tüplerine dağıtıldı.

11. Hücre ayrımlama işlemi için tüpler FACS cihazına yüklendi.

12. İşlem sonunda koleksiyon tüpünde teslim alınan K562-Ir-lenti sorted hücreler, laboratuvarımıza getirilerek T- 25 flaska ekimi yapıldı ve çoğaltılmak üzere 37° C %5 CO_2 inkübasyona bırakıldı.

Çalışmamız boyunca bulgular ve tartışma kısmında açıklanan sebepler nedeniyle 6 kez hücre ayrımlama işlemi yapılmıştır. Bu deney setinin akış şeması Şekil-15'da özetlenmiştir. FACS ile hücre ayrımlama çalışmalarından beşi için İzmir Biyogenom Merkezinden, biri için Bilkent Üniversitesi Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. İhsan GÜRSEL ve doktora öğrencisi Muzaffer YILDIRIM'dan destek alınmıştır.



Şekil 15-In vitro deney basamaklarının şematize edilmesi.

3.6.6. In vivo Fare Deneyleri

Projemizin amacı, imatinib dirençli K562-Ir hücrelerinin, hücre davranışı ve tümör oluşturma kapasitesinin değerlendirilebilmesi için, atimik farelerde subkutan enjeksiyon

sonrası dirençli hücrelerin canlı sistemlerdeki davranışının araştırılması ve TKİ direncine yol açabilecek mekanizmaların ve lösemik kök hücre varlığının in vivo koşullarda incelenmesidir.

Bu amaç doğrultusunda önceki basamaklarda, in vivo görüntülemede kullanılmak üzere, atasal (K562) ve imatinib dirençli (K562-Ir) hücreleri in vitro lusiferaz geni ve GFP içeren bir vektörle işaretlenmiş ve bu hücreler farelere inoküle edilmeden önce gerekli in vitro optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu hücrelerde transdüksiyon verimliliğinin gösterilmesi için floresans mikroskop görüntülemesi, biyolüminesans ölçümü ve akış sitometrisi ile yeşil floresan protein ölçümü gerçekleştirilmiştir. Bu sonuçlara göre transdüksiyonun optimizasyon çalışmaları için pek çok kez FACS ile hücre ayrımlama işlemi yapılmıştır. Aşağıda anlatıldığı şekilde, işaretli kontrol K562 hücreleri ve dirençli K562-Ir hücreleri, imatinib varlığı ve yokluğunda, atimik farelere subkutan yoldan verilmiştir. Deneyin başlangıcı olan 0. gün, 8. gün ,7.hafta ve 8.haftada tümör oluşan bölgelerin tespiti için , farelere lusiferaz substratı lusiferin verilerek IVIS in vivo görüntüleme çalışmaları yapılmıştır. 8.haftada yapılan son görüntülemenin hemen ardından, fareler sakrifiye edilmiş, ex-vivo görüntüleme için sinyal gelen hayvanların çeşitli organ ve dokuları toplanmış ve tekrar lusiferin ile muamele edilerek IVIS görüntülemesine alınmıştır. In vivo ve ex-vivo fare deneyleri ile ilgili işlemlerin amacı genel bilgiler bölüm 2.5 ‘de detaylı olarak aktarılmıştır. Bu basamakta son olarak tümörler ve tümör saptanan dokulardan kesitler alınması ve histopatolojik incelemeler yapılarak lösemik kök hücre belirteçlerine bakılması planlanmıştır. Histopatolaojik inceleme basamağı tartışma kısmında açıklandığı üzere devam etmektedir. Bu hedeflerin gerçekleştirilmesi için yapılan deney çalışmalarının basamakları aşağıda verilmiştir:

3.6.6.1. *Deney Gruplarına Uygulanacak Şekilde İlaçların Hazırlanması*

Nude farelere intraperitoneal olarak dozlanacak imatinib ve kontrol (PBS) solüsyonları DEÜTF Tıbbi Biyoloji Laboratuarlarında aşağıda belirtilen işlem basamakları ile hazırlanıp, atimik nude fare deney gruplarına uygun şekilde alikotlandı.

Gereçler:

- İmatinib (Acros Organics, Lot no:A0374689, İmatinib mesylate, 1 gr.)
- Ultra distile su (Invitrogen, Lot no:1944284)
- 0,22 µm’lik filtre . (Sterile Syringe Filter CA membrane,Lot no:161031fx1)
- 1,5 ml’lik Kryovialler
- Steril PBS (Sigma, Lot no: RNGB5467)

- Hücre kültürü gereçleri
- -80° C buzdolabı

Yöntem:

1. Laboratuvarımızda mevcut 1 gr. toz imatinib son konsantrasyonu 200 mg/ml olacak şekilde, 5 ml ultra distile su biyogüvenlik kabini içerisinde eklenerek hazırlandı.
2. Hazırlanan imatinib 0,22 µm'lik filtreden geçirildi.
3. Farelere verilecek dozun belirlenmesi için aşağıdaki hesaplamalar yapıldı.

1 fare yaklaşık 22,5 gr. ve normal bir insan için imatinib günlük dozu 60 mg/kg

1000gr. 60 mg. İse

22,5gr. X

X=1,35 mg.(1 fare için gereken imatinib dozu)

Deneyimizde imatinib ilacı verilecek fare sayısı (kontrol dahil) = 11

Deneyimizde PBS uygulanacak vehicle kontrol fare sayısı (kontrol dahil) = 11

Fare sayısı x İmatinib dozu = 11 x 1,35 = 15 mg.(imatinib alacak fareler için günlük toplam doz)

1ml. de 200 mg. İmatinib varsa

X 15 mg. İmatinib var

X= 75 µl (1100 µl' de çözülecek miktar)

1500 µl ' de hazırlamak için;

1100 µl 75 µl imatinib

1500 µl X imatinib

X=102 µl imatinib ve 1398 µl PBS (1 adet kryovial)

ve

X=102 µl ultradistile su ve 1398 µl PBS(1 adet kryovial) hazırlandı.

4. Yukarıda yeralan hesaplamalara uygun şekilde, 20 adet kryoviale imatinib ve 20 adet kryoviale PBS alikotlanmış ve gerektiğinde kullanılmak üzere -80° C buzdolabına kaldırılmıştır.

3.6.6.2. *Atimik Nude Fare Gruplarının Oluşturulması ve İlaç Başlanması*

1. Deneyimizde kullanılan atimik fareler Bilkent Üniversitesinde üretilmektedir. Balb/c nude türü, insan ya da hayvanlardaki patolojiyi simüle etmek için çok uygun bir fizyolojik model oluşturmaktadır. 22 adet ortalama 22,5 gram 6-8 haftalık erkek nude fare Bilkent Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Ünitesinden temin edilmiştir ve in vivo deneylerin tamamı Bilkent Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Ünitesi'nde yapılmıştır. Deney süresince fareler 8 hafta boyunca Bilkent Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Ünitesi'nde barındırılmıştır. Fareler burada 4 farklı grupta, 5'erli olarak, otoklavlanmış yem, su ve altlık barındıran IVC (İndividual Ventilated Cage) kafeslerde barındırılmıştır. 2 adet negatif kontrol ise 2 ayrı kafeste barındırılmıştır. 12 saat gece 12 saat gündüz foto periyodu uygulanmıştır. Deney hayvanı sayısına grup başına istatistiksel anlamlılık hesabını etkilemeyecek en az sayıda hayvan olacak şekilde karar verilmiştir.

2. Subkutan grup için deney ve kontrol olarak her birinde 5 atimik nude fare olan toplam 4 grup oluşturulmuştur(Şekil-16):

1.Grup= K562 (PBS verilen)- 5 atimik nude fare

2.Grup= K562+imatinib(ilaç verilen)- 5 atimik nude fare

3.Grup= K562-Ir (PBS verilen)- 5 atimik nude fare

4.Grup= K562-Ir +imatinib(İlaç verilen)- 5 atimik nude fare

5.Grup= Negatif Kontrol Grubu- 2 atimik nude fare

3. Farelere hücre inokulasyonundan iki gün önce bulundukları gruplara uygun şekilde IP olarak 100 µl imatinib yada PBS olarak verilmeye başlanmıştır ve deney süresince haftada 3 gün (Pazartesi, Çarşamba ve Cuma) olmak üzere IP imatinib yada PBS uygulaması devam etmiştir.

4. Negatif kontrol grubunda yer alan 2 adet nude fareye ise herhangi bir hücre inokulasyonu yapılmamıştır. Ancak deney başlangıcından iki gün önce ve deney süresince ilaç uygulaması diğer gruplara paralel şekilde birine sadece 100 µl imatinib, bir diğerine sadece 100 µl PBS olacak şekilde IP olarak uygulanmıştır.



Şekil 16-Atimik nude farelerin deney gruplarına ayrılması ve ilaç başlanması.

3.6.6.3. *İnokülasyon Öncesi Akış Sitometrisi Cihazı ile Hücre Canlılığı ve GFP Değerlendirmesi*

Gereçler:

- Akış Sitometri Cihazı (ACEA/ NovoCyte)
- Hücre kültürü gereçleri
- DAPI (İnvitrogen, Lot no: 796309)
- 1,5 ml steril ependorf

Yöntem:

1. Her iki hücre hattının bulunduğu flasklardan 1 ml hücre süspansiyonu örneği alındı.

2. Örneklere son konsantrasyonu 50 µl/ml olan DAPI' den 4 µl eklendi ve örnekler 10 dakika karanlıkta DAPI ile inkübe edildi.

3. Süre sonunda DAPI' li ortam uzaklaştırılmadan direk olarak ölçüm için Akış Sitometri cihazına verildi.

4. K562-lenti hücre hattının GFP pozitiflik oranı %99 olarak tespit edildi. Ancak K562-IR-lenti hücre hattının GFP pozitiflik oranı yaklaşık %45 olduğundan, farelere inokülasyon yapılmadan önce imatinib dirençli hücrelerin FACS ile ayrımlanmasına karar verildi.

3.6.6.4. *İnokülasyon Öncesi FACS İle Dirençli Hücrelerin Ayrımlanması İşlemi*

Gereçler:

- FACS cihazı (BD FACS Melody)
- Santrifüj cihazı (Hettich ZENTRIFUGEN, ROTINA 420)
- 40 µm'lik Cell Strainer Falcon, 40 ul, Ref no:352340)
- 50 ml steril santrifüj tüpü
- 1,5 ml steril ependorf
- FBS (Gibco, Lot no: 42G2076K)
- RPMI 1640 tam besi ortamı (Lot no: RNGB9151)
- DAPI (İnvitrogen, Lot no: 796309)
- Steril FACS tüpleri

Yöntem:

1. Her seferinde 20 x 10^6 hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonlarından örnek alındı. 500 G' de 5 dakika santrifüjlendi ve süpernatan uzaklaştırıldı.

2. Önceden hazırlanan ve +4 C de buzdolabında saklanan filtrelenmiş %1 FBS + PBS solüsyonundan 2 ml hücre pelleti üzerine aktarıldı ve pipetaj yapıldı.

3. Bu hücre süspansiyonu 40 µl'lik cell strainer ile filtrelenerek FACS tüpüne alındı.

4. Ayrımlanan hücrelerin toplanacağı kolleksiyon tüplerine, %30 FBS içeren besi ortamından oluşan kolleksiyon ortamından 200'er µl eklendi.

5. Hazırlanan hücre süspansiyonu ayrımlama için cihaza yüklendi ve önceki basamakta Akış Sitometri cihazında belirlenen DAPI'li ölü hücre alanlarına göre cihaz ayarları yapıldı.

6. Bu çalışma sonucunda toplam 575 ml. dirençli hücre süspansiyonundan, GFP pozitifliği %95 olan 10.5 x 10^6 K562-Ir-lenti hücresi elde edilmiştir.

3.6.6.5. *İnokülasyon İçin Atasal ve Dirençli Hücrelerin Hazırlanması*

Gereçler:

- 50 ml steril santrifüj tüpleri
- Santrifüj cihazı (Hettich ZENTRIFUGEN, ROTINA 420)
- Steril PBS (Sigma, Lot no: RNGB5467)
- 1,5 ml steril ependorflar
- Buz

Yöntem:

1. İnokulasyon için hücreler hazırlandı. Akış sitometri cihazı ile ölçüm yapılan K562-lenti ve K562-Ir-lenti hücre hatlarından 9,5x10^5 hücre temini için hesaplama yapıldı.

K562-lenti hücre hattı için:

1 ml 550.000 hücre

X ml 950.000 hücre

X= 1,72 ml (bir fare için)

1,72 ml 1 fare

X ml 10 fare

X =17,2 ml hücre süspansiyonu

K562-Ir-lenti hücre hattı için:

1 ml 250.000 hücre

X ml 950.000 hücre

X= 3,8 ml (bir fare için)

3,8 ml 1 fare

X ml 10 fare

X= 38 ml hücre süspansiyonu

2. Yukarıda hesaplanan hücre süspansiyonları steril santrifüj tüplerine alındı ve 300G de 5 dakika santrifüjlendi. Süpernatan uzaklaştırıldı.

3. Çöken K562-lenti ve K562- Ir- lenti hücre pelletleri üzerine 1050'şer µl steril PBS aktarılıp, pipetaj yapıldı ve 1,5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.

4. Hazırlanan ependorflar buz üzerinde inokülasyon için deney hayvanları laboratuvarına taşındı.

3.6.6.6. *Atimik Nude Farelere Hücre İnokulasyonu*

Gereçler:

- 25 G şırınga
- İnokulasyon için hazırlanan hücre süspansiyonlarının bulunduğu ependorflar
- 22 adet balb/c nude fare
- Vorteks (Labnet VX100)

Yöntem:

1. Her bir fare başına 1 x 10^6 hücre(100 µl) sayıda lösemik hücre subkutan olarak ve gruplarına uygun şekilde farelerin kalça bölgesinden 24 G'luk şırınga ile transplante edildi(Şekil-17).

1.grup: K562- lenti(Atasal) + PBS (5 adet fare) : 100'er µl K562-lenti hücre süspansiyonu inoküle edildi.

2.grup: K562-Ir- lenti(Dirençli) + PBS (5 adet fare): 100'er µl K562-Ir-lenti hücre süspansiyonu inoküle edildi.

3.grup: K562- lenti(Atasal) + imatinib (5 adet fare): 100'er µl K562-lenti hücre süspansiyonu inoküle edildi.

4.grup: K562-Ir- lenti(Dirençli) +imatinib (5 adet fare): 100'er µl K562-Ir-lenti hücre süspansiyonu inoküle edildi.



Şekil 17-Deney gruplarına subkutan hücre inokülasyonu

3.6.6.7. *IVIS Görüntüleme Cihazı ile In vivo Biyolüminesans Ölçümü*

3.6.6.7.1. D-Lusiferin Hazırlanması

D-lusiferin Perkin Elmer firmasının önerdiği prtokole göre hazırlanmıştır [44.]

Gereçler:

- D-lusiferin(Xenolight, Lot no: K9906PE- 150 mg/kg)

- Steril PBS (Sigma, Lot no: RNGB5467)
- Vorteks (Labnet VX100)
- 1,5 ml steril ependorflar
- Buz

Yöntem:

1. Lusiferin son konsantrasyonu 150 mg/kg olacak şekilde hazırlandı.
2. D-lusiferin -20° C buzdolabından alınıp biyogüvenlik kabini içerisine yerleştirildi.
3. 15 ml'lik steril santrifüj tüpü içerisine 0,124 mg toz D-lusiferin tartılarak aktarıldı. Üzerine 4,13 ml steril PBS eklendi.Son konsantrasyon 2 µg/ml elde edildi.
4. Hazırlanan solusyon D- lusiferin çözününceye kadar yaklaşık 5 dakika vortekslendi.
5. Elde edilen D-lusiferin solüsyonu 3 adet 1,5 ml'lik steril ependorfa paylaştırıldı ve buz üzerine alınarak, deney hayvanları laboratuvarına taşındı.

3.6.6.7.2. In vivo Biyolüminesans Ölçümü

Çalışmaya alınan deney hayvanları, deneyin başlangıç günü olan 0. gün, hücre inokülasyonları yapıldıktan sonra, Bilkent Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarında IVIS görüntüleme cihazı ile biyolüminesans görüntülemeye alınmıştır. Cihaz kullanımından 10 dk önce hayvanlara IP yoldan, vücut ağırlığı gram başına 100 µl, 150 mg/ml konsantrasyonda D-lusiferin (lüsiferaz sübstratı) verilmiştir. Böylece lüsiferaz sentezleyen K562 ve K562-Ir hücrelerin ışıması sağlanmıştır. Hayvanlar görüntülemeden hemen önce isofluran ile anestezi altına alınmıştır.

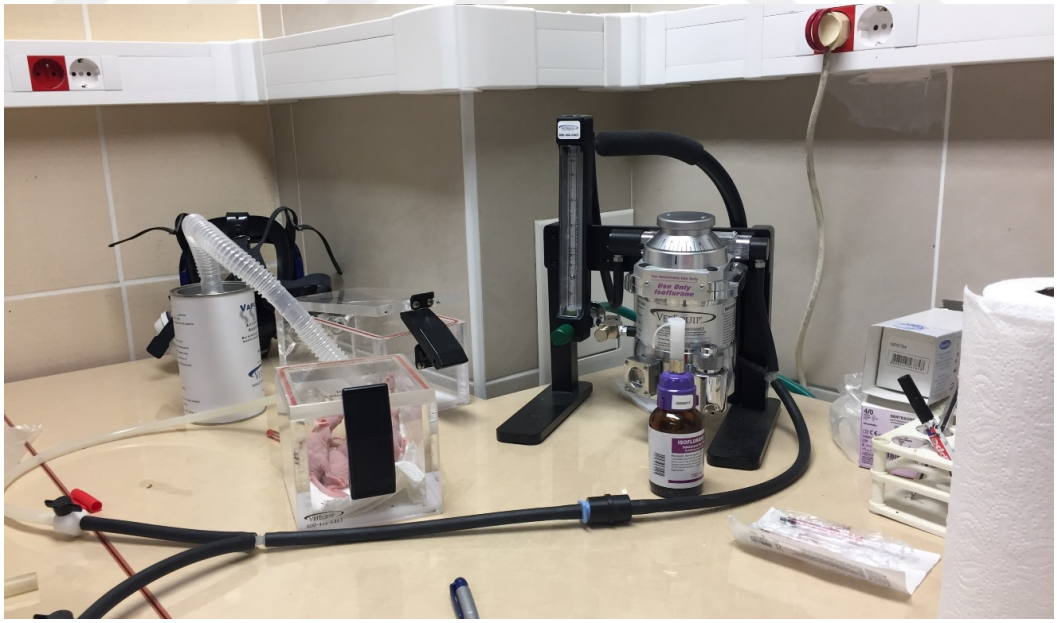
Gereçler:

- Isoflurane- usp 100 ml (Piramal, IAS082515)
- Anestezi Ekipmanı (VetEquip, V-1 Table top Laboratory Animal Anesthesia System)
- Lusiferaz assay için hazırlanan D-lusiferin solüsyonu
- 24 G şırınga

- IVIS cihazı (Caliper Life Science, Lumina Series III)

Yöntem:

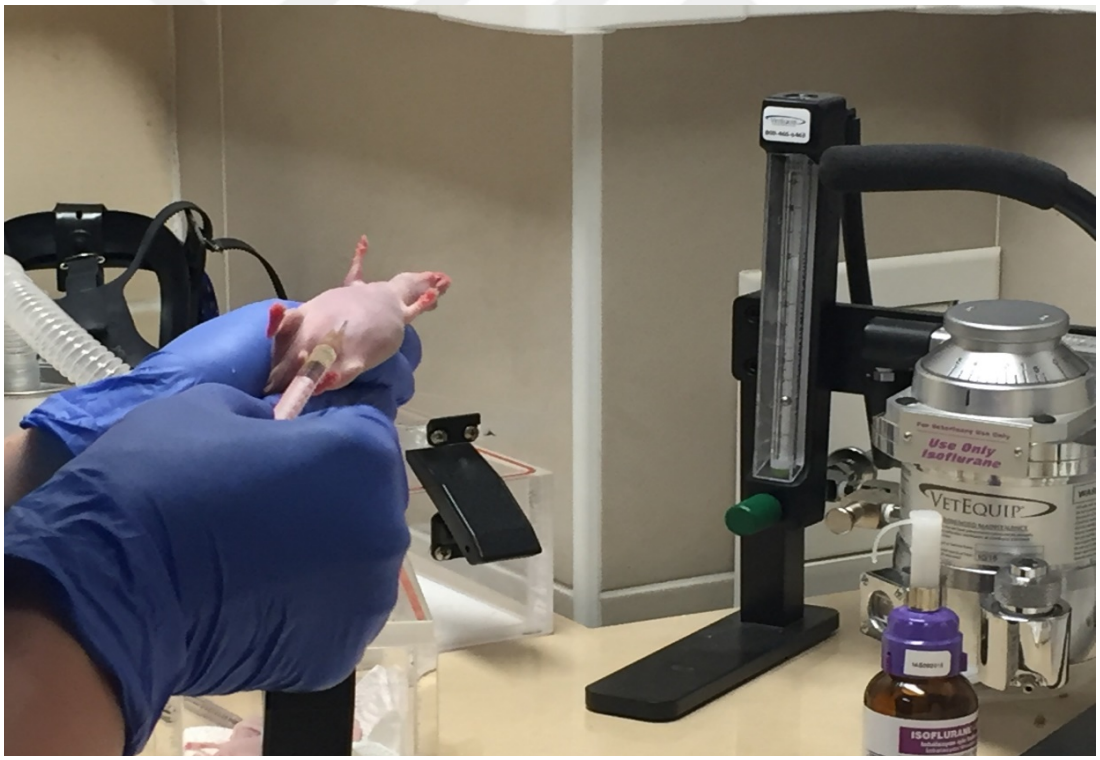
1. Nude fareler gruplar halinde ilk olarak %2,5'luk isofluran verilen anestezi ekipmanına ait kutuda birkaç dakika bekletilerek anesteziye tabi tutuldu (Şekil-18, Şekil-19).
2. Anestezi işlemini takiben farelere, önceki basamaklarda hazırlanan D- lusiferin solüsyonundan 100 µl intraperitoneal (IP) olarak enjekte edildi(Şekil-20).
3. Her bir grup 5' şerli olarak IVIS görüntüleme çalışmasına alındı(Şekil-21).
4. Takip görüntüleme her bir grup için otomatik seçenek kullanıldı ve 1 foton/second alındı. Lusiferin sinyali düşmeye başladığında görüntüleme sonlandırıldı.
5. Tüm gruplara ait görüntülemeler cihazın yazılımı içerisinde bulunan dosyalara kaydedildi.
6. IVIS görüntülemesi tamamlanan fare grupları, kendi IVC (İndividual Ventilated Cage) kafeslerine alındı ve grupta bulunan tüm farelerin uyanması beklendi.
7. Deney bitiminde hayvanlar, IVC kafesleriyle barındırıldıkları özel odaya yerleştirildiler(Şekil-22).



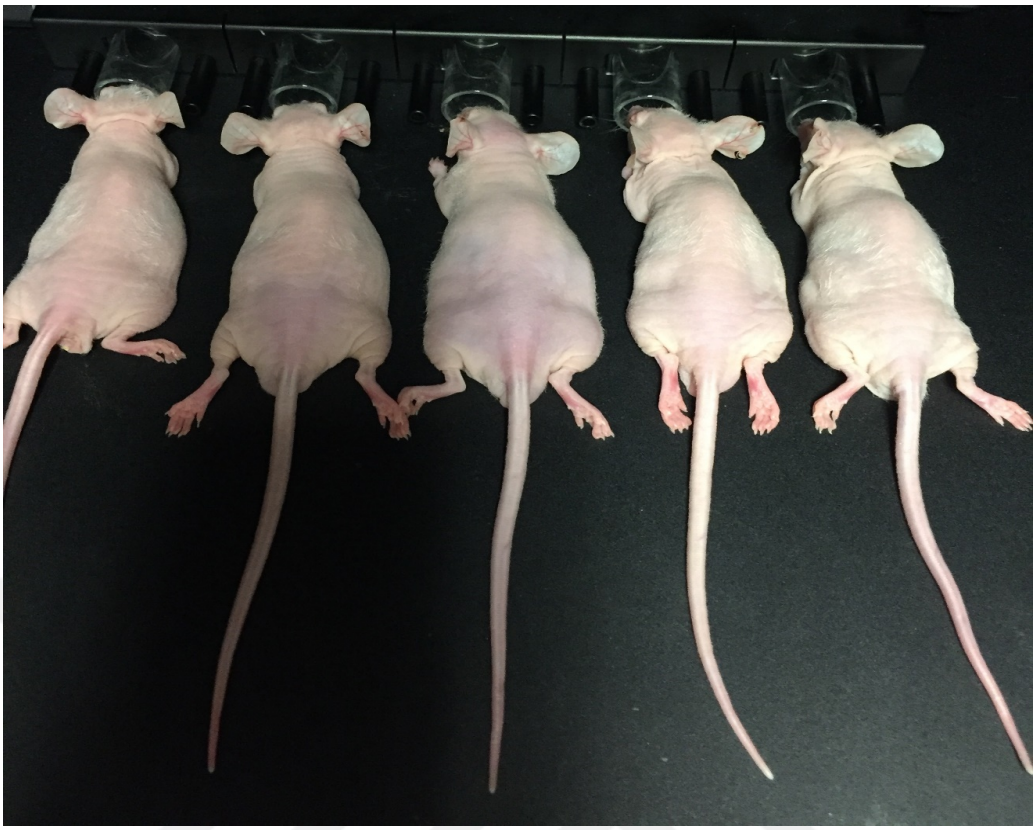
Şekil 18-Atimik nude farelere anestezi uygulaması



Şekil 19-Atimik nude fareler için anestezi kutusu



Şekil 20-IVIS görüntüleme öncesi intraperitoneal (IP) D-lusiferin enjeksiyonu



Şekil 21-Görüntüleme için IVIS cihazına yerleştirilen atimik nude fareler



Şekil 22-Atimik nude farelerin IVC kafesler ile barındırıldıkları özel odalar.

3.6.7. IVIS Görüntüleme Cihazı İle in vitro Biyolüminesans Ölçüm

In vivo fare deneylerine eş zamanlı olarak atasal ve dirençli hücrelerin IVIS ile in vitro biyolüminesans ölçümü alınmıştır. Ancak bu deney setine, in vivo deney çalışmalarının yazım sırasında kesintiye uğramaması açısından burada yer verilmiştir. Fare deneylerimiz başlamadan önce 3.6.6.3 ve 3.6.6.4. deney setlerinde anlatıldığı üzere K562-Ir lenti hücre popülasyonu için akış sitometri ve FACS çalışmaları yapılmıştır. Bu esnada bu popülasyondan, in vitro biyolüminesans deney seti için, bir miktar hücre ayrımlamaya dahil edilmemiş ve K562-Ir-lenti before olarak etiketlendirilmiştir. Farelere verilmeden önce ayrımlanan dirençli hücre popülasyonu ise K562-Ir-lenti after olarak etiketlendirilmiştir. Bu bölüm ve ilerleyen kısımlarda metin içerisinde geçen bu etiketlendirme ile bu iki hücre popülasyonu kastedilmektedir. Bu deney setinin amacı, farelere hücre inokulasyonu öncesinde negatif kontroller ile birlikte 5 farklı hücre popülasyonunun (atasal(K562), dirençli(Ir), atasal-vektörle işaretlenen(K562-Ir-lenti), dirençli-vektörle işaretlenen-ayrımlanan(K562-Ir-lenti after), dirençli-vektörle işaretlenen-ayrımlanmayan(K562-Ir-lenti before)) biyolüminesans sinyal miktarlarının ölçülmesi ve farelerde de inokulasyon sonrası ışıma olup olmayacağının doğrulanmasıdır(Şekil-23).

Gereçler:

- IVIS cihazı(Caliper Life Science, Lumina Series III)
- D- Lusiferin (Xenolight, Lot no: K9906PE- 150 mg/kg)
- Hücre kültür gereçleri
- RPMI 1640 besi ortamı (Lot no: RNGB9151)
- Santrifüj cihazı (Hettich ZENTRIFUGEN, UNIVERSAL 320)
- 96-kuyulu plate
- Propodium Iodide (HPLC-SİGMA, Lot No: SLB1920, 10ug)
- Flow Cytometri cihazı(ACEA Novocyte)

Yöntem:

1. K562, K562-lenti(iki tekrarlı çalışıldı), K562-Ir(iki tekrarlı), K562-Ir-lenti after(iki tekrarlı) ve K562-Ir-lenti before(iki tekrarlı) hücre süspansiyonlarından 100 µl örnek alındı ve son konsantrasyonu 0,2 µl/ml IP eklendi. Akış sitometri cihazına yüklenip GFP +'liği ve canlı hücre sayıları tespit edildi.

2. 96- kuyulu plate'e ekim için gereken hücre sayıları hesaplanıp, beş hücre hattından gereken miktarda hücre süspansiyonu alındı ve 500 G de çöktürülüp, süpernatan uzaklaştırıldı.

3. Her dört hücre hattı için 200 µl ortamda 128.000 hücre olacak şekilde, hücre pelleti üzerine 200 µl ortam eklendi ve pipetaj yapıldı.

4. 4 ayrı 1,5 ml'lik steril tüpe tam besi ortamından 1'er ml eklendi.

5. A1 ve A2 ye 200 µl kontrol için sadece ortam, A3 ve A4'e ise sadece lusiferin aktarıldı.

6. Seri dilüsyon ile ekimin gerçekleştirilmesi için B2'den B9'a, C2'den C9'a, D2'den D9'a, E2'den E9'a, G2'den G9'a (2. ve 9. kuyular dahil) kuyuların tamamına 100'er µl tam besi ortamı eklendi.

7. A5, A6, A7 ve A8 kuyularına 100'er µl ortam eklendi. A5 ve A6 ya 100 µl K562, A7 ve A8'e 100 µl K562- Ir eklendi. Bu sayede 200 µl ortamda 64.000 hücre/ kuyu elde edildi.

8. B1 ve C1 K562-lenti, D1 ve E1 K562-Ir-lenti before ve F1 ve G1'e K562-Ir-lenti after 200 µl hücre süspansiyonu eklendi. Bu sayede ilk kuyularda 200 µl'de 128.000 hücre/ kuyu elde edildi.

9. Seri dilüsyona başlandı. Öncelikle B1 kuyusu pipetaj yapıldı ve 100 µl hücre süspansiyonu çekilip, B2 kuyusuna aktarıldı ve pipetaj yapılıp 100 µl çekildi ve B3'e aktarıldı. B3 kuyusu pipetaj yapılıp 100 µl çekildi ve B4 kuyusuna aktarıldı. B4 kuyusu pipetaj yapılıp 100 µl çekildi ve B5 kuyusuna aktarıldı. B5 kuyusu pipetaj yapılıp 100 µl örnek alındı ve B6 kuyusuna aktarıldı. B6 kuyusu pipetaj yapılıp, 100 µl örnek B7' ye aktarıldı. B7 pipetaj yapılıp 100 µl örnek B8' e aktarıldı. B8 pipetaj yapılıp 100 µl B9' a aktarıldı ve son kuyu olan B9 pipetajlanıp 100 µl çekildi ve atığa atıldı. Tüm bu işlemler C1-C9, D1-D9, E1-E9, F1-F9 ve G1-G9 kuyuları için aynı şekilde gerçekleştirildi.

10. D-lusiferin deneyimizde kullanılmak üzere hazırlandı. Bunun için ara stok 150 µg/ml olan D-lusiferin'den alınan 60 µl alındı ve 540 µl ortamda çözdürüldü.

11. Lusiferin uygulanacak kuyulara 10 µl hazırlanan D-Lusiferin eklendi ve 96-kuyulu plate'in ekimi aşağıda şematize edildiği şekilde gerçekleştirildi. Bu assay, K562-lenti, K562-Ir-lenti before ve K562-Ir-lenti after hücre hatları için duplike çalışılmıştır.

12. Plate ekimi tamamlandıktan sonra ölçüm için IVIS cihazına yerleştirildi.



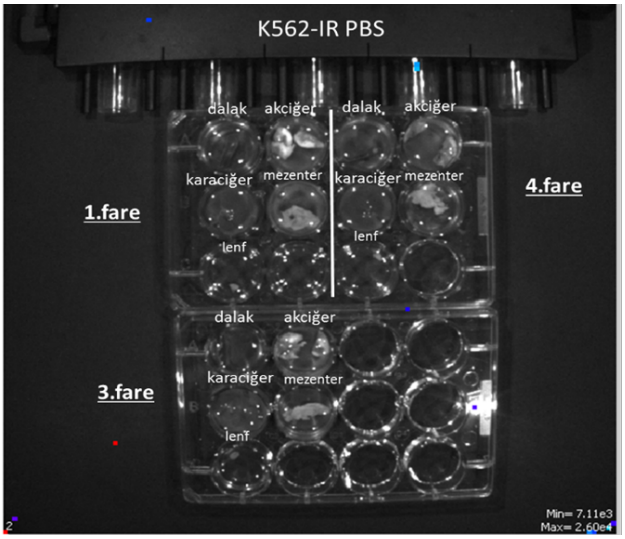
Şekil 23-IVIS ile in vitro biyolüminesans ölçüm için 96 - kuyulu plate' e ekimin şematize edilmesi.

K562: Atasal hücre hattı, K562-Ir: Dirençli hücre hattı, K562-lenti: Lentivirüs ile işaretlenmiş atasal hat, Ir-lenti-before : Lentivirüs ile işaretlenmiş ancak in vivo deney öncesi ayrımlanmamış hücre hattı, Ir-lenti-after : Lentivirüs ile işaretlenmiş ancak in vivo deney öncesi farelere inoküle edilmeden önce FACS ile ayrımlanmış hücre hattı. Lusi:D-lusiferin(150 µg /ml).

3.6.8. In vivo Deneylerin Sonlandırılması ve Ex-vivo Organ Görüntüleme

8.hafta sonunda tüm hayvanlara önce 150 mg/kg D-luciferin i.p. yoldan verilip 3.6.6.7 bölümünde anlatıldığı şekilde IVIS'te görüntülenmiştir. Tüm hayvanların tartımı yapıldıktan sonra ötenazi işlemine geçilmiştir. Ötenazi için anestezi altında (anestezik ajanlar: Alfazyne %2 (20mg/kg Ksilazin) ve Ketasol %10 (100mg/ml Ketamin)) şırınga ile kalp kanı toplanmıştır. Kanlar cam tüplere konulup 2 saat bekletilmiş ardından 1500 rpm'de 10 dk ve +4° C derecede santrifüjlenmiştir. Üst fazdaki serum örnekleri 1.5 ml'lik tüpelere aktarılmış ve ileriki çalışmalarda kullanılmak üzere -80° C derecede saklanmıştır.

Ex-vivo görüntüleme için hayvanlardan doku ve organ toplanmıştır. Bu işlemin amacı varsa organlara göç etmiş hücre gruplarını tespit etmek ve histopatoloji kesitleri için ön veri sağlamaktır. IVIS görüntülemesinde sinyal gelen farelerden (grup başına 3 fare) ve hücre inoküle edilmemiş 2 kontrol fareden dalak, akciğer, büyümüş lenf nodları, mezenter, karaciğer ve enjeksiyon bölgesi derisi çıkarılıp PBS ile yıkanmış daha sonra büyüklüklerine göre 6-kuyulu veya 12-kuyulu kültür kaplarına PBS içerisine alınmıştır. Her kuyuya son konsantrasyonu 300 µg/ml olarak şekilde D-lüsiferin eklenmiş ve görüntülenmiştir. Hiçbir grup organdan sinyal alınamamıştır (Şekil-24). Lüsiferin miktarı 5 kat artılırılıp (1.5 mg/ml) tekrar görüntü alınmış ancak sonuç değişmemiştir. Exposure "auto" moduna ayarlanmıştır. Görüntülemeden sonra her bir organ 15 ml tüplerde 3'er ml %4 Paraformaldehit/PBS (Santa Cruz sc-281692) içerisinde fikse edilmiştir.



Şekil 24-Ex vivo görüntüleme örneği.

IVIS görüntülemisinde K562-IR PBS grubu içerisinde en çok sinyal alınan hayvanlar olan soldan sağa 1., 3. ve 4. farenin ex vivo görselidir. Exposure zamanı "auto" dur.

3.7. ARAŞTIRMA PLANI ve TAKVİMİ

Araştırma planı ve takvimi aşağıdaki şekilde tablo haline getirilmiştir.

Haziran - Ekim 2018	• Literatür araştırması ve projelendirme
Ekim 2018- Mart 2019	• Atasal ve dirençli hücrelerin, lentivirüsle stabil transdüksiyonunun yapılarak hücrelerin işaretlenmesi ve optimizasyon deneyleri • Hücre kültürü idamesi.
Nisan - Mayıs 2019	• Xenograft model oluşturarak, in vivo atimik farelere işaretlenmiş atasal ve dirençli hücrelerin inoküle edilmesi ve izlemlerinin yapılması.
Mayıs - 2019	• Verilerin değerlendirilmesi • Tez taslağı yazımı

Tablo 2 - Araştırma Planı ve Takvimi

3.8. VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Araştırmamızın verilerini elde etmek için kullandığımız yöntemler in vitro hücre kültürü çalışmaları ve in vivo hayvan deneylerini kapsamaktadır. Bu araştırmayı oluşturan ve yukarıda detaylı olarak açıklanmış olan deney basamaklarında in vitro da hücrelerimizin vektörümüz ile

stabil transdüksiyon verimliliği çeşitli yöntemler ile değerlendirilmiş (FACS, Akış sitometri, Biyolüminesans Ölçüm ve Floresan Mikroskop Görüntüleme) ve in vivo hayvan deneylerimizde görüntüleme çalışmaları ile biyolüminesans ölçümler yapılarak tümör oluşumu ve büyümesi ile ilgili veriler kayıt altına altına alınmıştır. Çalışmamızda hedeflenen, dirençli hücre davranış biyolojisinin canlı sistemlerde farklılığının saptanması olduğundan istatistiksel analiz kullanılmamıştır. IVIS biyolüminesans görüntüleme ile ölçülen sinyaller ve kaydedilen görüntüler aracılığıyla, hem farelerde hem de ex-vivo olarak doku ve organlarda bu hücrelerin köken aldıkları hücre populasyonundan farklarının gösterilebilmesi araştırma verilerinin değerlendirmesinde kullanılmıştır. Çalışmanın histopatolojik inceleme basamağı devam etmektedir ve henüz tamamlanmamıştır. Bu nedenle, ex-vivo olarak alınan örneklerde histopatolojik incelemeler ile doku ve organ kesitlerinde GFP+ yada BCR-ABL+'liği ve yine kesitlerde lösemik kök hücre belirteçlerinin taranması farkların değerlendirilmesi için kullanılacaktır.

3.9. ARAŞTIRMANIN SINIRLILIKLARI

Canlı sistemlerde yürütülen araştırmaların pek çok sınırlılıkları bulunmaktadır. In vivo deney hayvan modellerinin kullanıldığı çalışmalar, yaşam alanlarında yaralanma (bireyler arasında çatışma nedeniyle), uygulanan ilaçlar nedeniyle beklenmeyen yan etki, ilaç etkileşimi yada korku ve stres faktörleri, enjeksiyon manüplasyonundan kaynaklanan hatalar, enfeksiyon gelişimi (özellikle immune sistemi baskılanmış olan fareler), doğru anestezi ajanının kullanılmaması yada anestezi ajanlarına uzun süre maruziyet (görüntüleme çalışmalarının gerekenden uzun süre devam ettirilmesi) gibi çok sayıda sebeple hayvan kaybına neden olabilen riskler taşır. Hayvan kaybına ek olarak, modellenmek istenen hastalık gelişimi gözlenemeyebilir örneğin beklenen tümör oluşumu ve/veya tümör gelişimi meydana gelmeyebilir. Ancak bu ve benzeri sınırlılıklar in vivo hayvan deneyleri için beklenen düzeydedir ve bulgular/tartışma kısmında çalışmamız sırasında karşılaşılan sınırlılıklar detaylandırılmıştır.

3.10. ETIK KURUL ONAYI

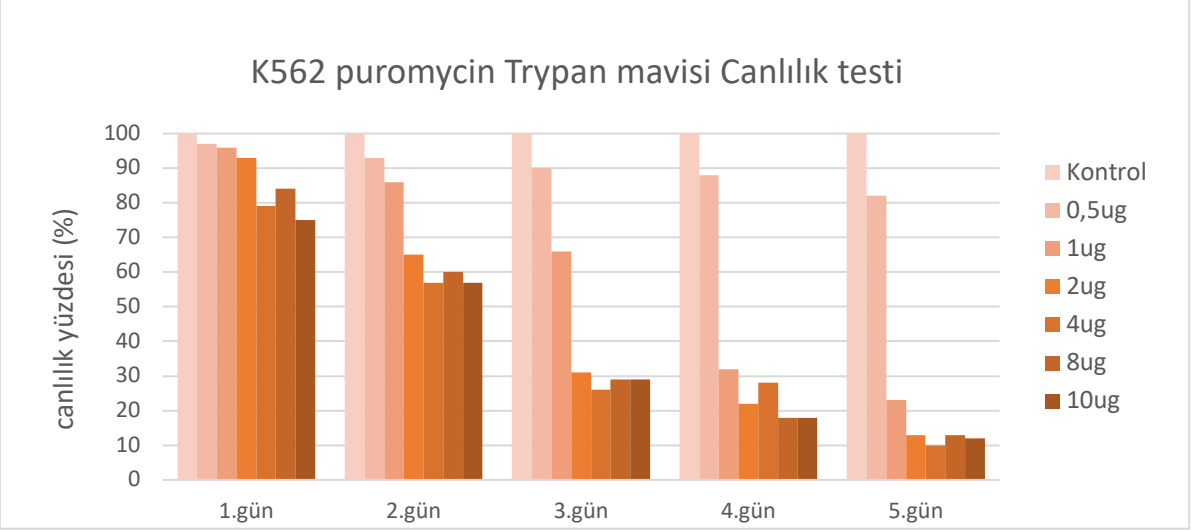
Deney çalışmalarımıza başlayabilmek için, Dokuz Eylül Üniversitesi Multidisiplin Laboratuvarı Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu **(Ek-1)** ve Bilkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan etik onayı alınmıştır (**Ek-2**).

4. BULGULAR

4.1. ATASAL VE DİRENÇLİ HÜCRELER 4 µg / ml PUROMYCİN'DE ÖLMEKTEDİR

Yöntemde anlatıldığı şekilde puromycin antibiyotiğine direnç geni taşıyan, GFP ve lusiferaz geni bulunduran lentivirüs ile atasal ve dirençli hücre popülasyonlarının stabil transdüksiyonu öncesinde, puromycin baskısı altında işaretli hücrelerin seçiliminin yapılabilmesi amacıyla, hücrelerin ortamda farklı puromycin dozları varlığında nasıl yanıt verdiği, hücre ölüm düzeylerine bakılarak incelendi. Deneylerde literatürde belirtildiği şekilde puromycin seleksiyonu için kullanılan doz aralıklarının uygulanmasına özen gösterildi. Hücreler son konsantrasyonu 1 µg/ml olan puromycinin, (kontrol- 0,5 µg – 1 µg – 2 µg – 4 µg – 8 µg – 10 µg) 6 farklı dozuna ve 5 gün boyunca maruz bırakıldı. Her 24 saatlik dilimin sonunda (24., 48., 72., 96. ve 120. saatler) hücrelere tripan mavisi canlılık testi uygulandı ve buna göre IC50(half-maximal inhibitor concentration) değerleri saptandı. IC50 değeri, in vitro olarak inhibe edici özelliği olduğu bilinen bir maddenin, tam inhibisyon sağlayacak konsantrasyonunun yarı değerini ifade eder[45]. Bu nedenle hücre popülasyonlarının çeşitli maddeler ile muamelesi sonrasında, canlılık yüzdeleri hesaplanarak, canlılık yüzdesi 50'nin altına düşen dozlar IC50 değeri olarak kaydedilir. Buna göre deney setimizin sonunda elde edilen veriler grafik haline getirilerek atasal ve dirençli hücreler için hücre ölüm profilleri çıkarıldı.

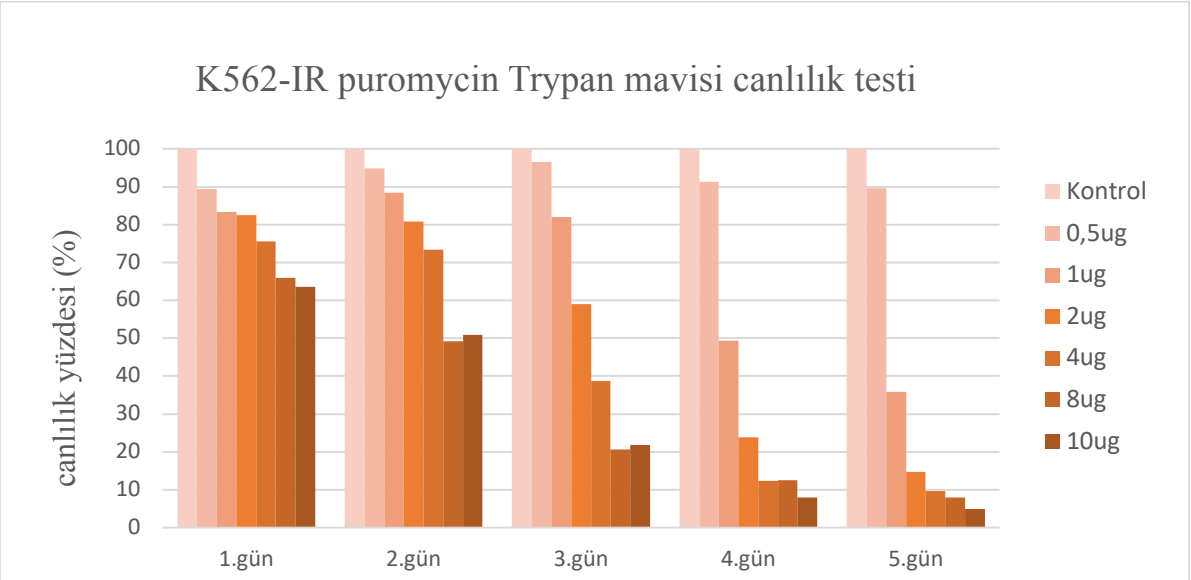
K562 ve K562-Ir hücre populasyonlarının puromycin baskısından etkilendiği ve bu maruziyet nedeniyle değişen yüzde oranlarda popülasyona ait hücrelerin öldüğü saptanmıştır. Şekil 25 ve 26'de gösterildiği gibi hem dirençli hemde atasal hücrelerin 24. ve 48. saat ölçümlerinde canlılık yüzdeleri puromycinin 0,5- 10 µg/ml'de değişen konsantrasyonları için yaklaşık %95-%55 aralığındadır. Her iki hücre hattının ilk 24 saatten itibaren 4 µg/ml puromycinden etkilendiği ve 72. saat sonunda atasal ve dirençli hücrelerin canlılık yüzdesinin sırasıyla %30 ve %40'ın altına indiği gözlendi. K562(Atasal) ve K562- Ir(Dirençli) hücrelerinin seçilimi için kullanılacak puromycin dozunun 4 µg/ml olmasına karar verildi(Şekil-25).



Şekil 25-Atasal K562 hücrelerinde 0,5 µg/ml,1 µg/ml,2 µg/ml,4µg/ml,8µg/ml ve10 µg/ml dozlarda puromycin uygulamaları sonrası 24, 48, 72, 96 ve 120 saatlik tripan mavisi canlılık testi sonuç grafiği.

Canlılık yüzdeleri kontrol grubundaki canlılık % 100 olacak şekilde normalize edilmiştir.

Atasal hücrelerin 72. Saat sonrasında canlılık yüzdelerinin 4 µg/ml'den etkilendiği ve canlılık yüzdesinin neredeyse %30'lar seviyesine düştüğü yukarıda bulunan grafikten açıkça anlaşılabilmektedir. Antibiyotik çalışmalarımız 96 ve 120 saat için devam ettirilmiş ve canlılık %'si takip edilmek istenmiştir(Şekil-26).



Şekil 26-Dirençli K562- Ir hücrelerinde 0,5 µg/ml,1 µg/ml,2 µg/ml,4µg/ml,8µg/ml ve10 µg/ml dozlarda puromycin uygulamaları sonrası 24, 48, 72, 96 ve 120 saatlik tripan mavisi canlılık testi sonuç grafiği.

Canlılık yüzdeleri kontrol grubundaki canlılık % 100 olacak şekilde normalize edilmiştir.

Dirençli hücrelerin 72. Saat sonrasında canlılık yüzdelerinin 4 µg/ml'den etkilendiği ve canlılık yüzdesinin neredeyse %40'lar seviyesine düştüğü yukarıda bulunan grafikten açıkça anlaşılabilmektedir. Antibiyotik çalışmalarımız 96 ve 120 saat için devam ettirilmiş ve canlılık %'si takip edilmek istenmiştir.

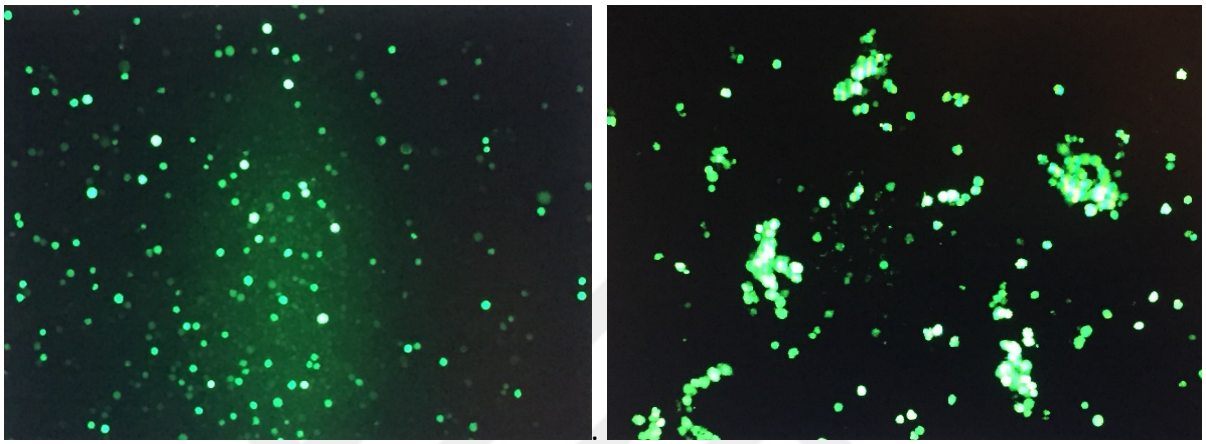
4.2. ATASAL VE DİRENÇLİ HÜCRELERİN LENTİVİRAL TRANSDÜKSİYONU GERÇEKLEŞTİRİLDİ

Dirençli hücre davranışının, in vivo olarak incelenmesi amacıyla her iki hücre hattı lusiferaz ve GFP ile işaretlenmiştir. Bu sayede lusiferazın substratı olan lusiferinin verilerek deney hayvanlarında dirençli lösemik hücrelerin yuvalandığı bölgelerin IVIS görüntülemesi ile tespit edilmesi amaçlanmıştır. In vitro çalışmalarımızda ise hücreler hem lusiferaz hem de floresan proteini olan GFP yardımıyla takip edilmiştir. İşaretli hücrelerin bulundukları hücre popülasyonlarından seçilimi, önceki basamakta saptanan puromycin dozuna maruziyetle sağlanmıştır. Stabil transdüksiyon deneyimizin verimliliği ilk basamakta floresan mikroskop görüntüleme tekniği ve sonraki basamakta in vitro biyolüminesans ölçüm ve akış sitometri çalışmaları ile yapılmıştır. Ancak tüm bu deneyler sonrasında dirençli (K562-Ir-lenti) hücrelerin pasajlanarak idamesinin sağlandığı sırada, GFP ışımasının zamanla azaldığı farkedilmiştir. K562-Ir hücrelerinin akış sitometrik ölçümü ile bu durum doğrulanmış, GFP pozitifliği oranının yaklaşık %2,5'lar seviyesinde olduğu saptanmıştır. Bu nedenle optimizasyon için, 6 defa FACS ile GFP pozitif dirençli hücreleri ayrımlama ve dirençli hücre popülasyonunu genişletme çalışmaları yapılmıştır. Bu süre zarfında toplam 12 defa GFP pozitifliğinin tespiti için akım sitometri ile doğrulama yapılarak dirençli hücrelerin stabil transdüksiyon da varolan davranış farklılığı ortaya çıkan verilerle yorumlanmaya çalışılmıştır. Aşağıda yeralan bölümler ve tartışma kısmında bu bölüm bulguları yorumlanmıştır.

4.2.1. Floresan Mikroskop Görüntüleme Sonuçları

Atasal ve dirençli hücrelerin stabil transdüksiyon verimliliği ilk olarak, transdüksiyon sonrası 6. gün floresan mikroskop görüntülemesi ile değerlendirilmiştir. Şekil- 27'de

görülebileceği üzere, hem atasal hem de dirençli hücrelerin, GFP filtresi seçilerek yapıldığı bu çalışmada, her iki hücre hattının transfekte olduğu izlenmektedir. Ancak tartışma kısmında detaylandırılan sebepler nedeniyle, bu deney seti sonuçlarının akış sitometri sonuçları ile birbirini tutmadığı, bu nedenle transfeksiyon verimliliğin floresan mikroskop görüntüleme yerine mutlaka bir akış sitometri cihazında doğrulanması gerektiği sonucuna varılmıştır.



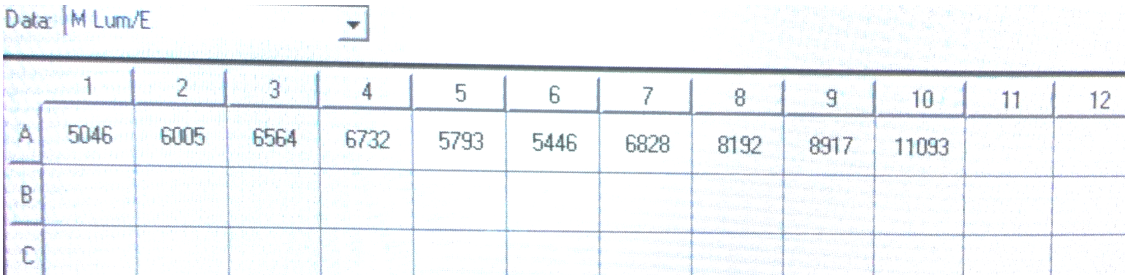
(a)K562-lenti **(b)K562-Ir-lenti**

Şekil 27-K562-lenti ve K562-Ir- lenti hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri.

Atasal ve dirençli hücrelerin lentivirüs ile stabil transdüksiyon deneyi sonrası 6. gün görüntüleri, kameralı floresan mikroskop kullanılarak çekilmiştir.(Olympus 1X71, USA- İzmir Biyogenom Merkezi)

4.2.2. Atasal Hücrelerin In vitro Biyolüminesans Ölçüm Sonucu

Atasal hücrelerin lusiferaz içeren vektör ile stabil transdüksiyonu sonrası 18. günde biyolüminesans ölçümü yapılmış ve bu sayede transdüksiyon verimliliği değerlendirilmiştir. 96 kuyulu plate'te A5-A6-A7-A8-A9-A10 numaralı kuyulara artan sayıda hücre ekimi gerçekleştirilmiş ve kendileri dahil A6 ve A10 arasındaki kuyulara lusiferin substrat olarak eklenmiştir. Beklendiği üzere hücre sayısı arttıkça biyolüminesans sinyal ölçüm değerleri artmıştır (Şekil-28). Bu deney setinin sonucu, bize atasal hücrelerin stabil transdükte olabildiklerini ve atasal hücre popülasyonu açısından transdüksiyon verimliliğinin doğrulanmasını sağlamıştır. Bu sonuçlar nedeniyle hücre hatları pasajlanarak in vivo deneyler için genişletilmeye başlanmıştır.



Data: M Lum/E

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	5046	6005	6564	6732	5793	5446	6828	8192	8917	11093		
B												
C												

Şekil 28-K562-lenti hücrelerinin in vitro biyolüminesans ölçüm sonucu.

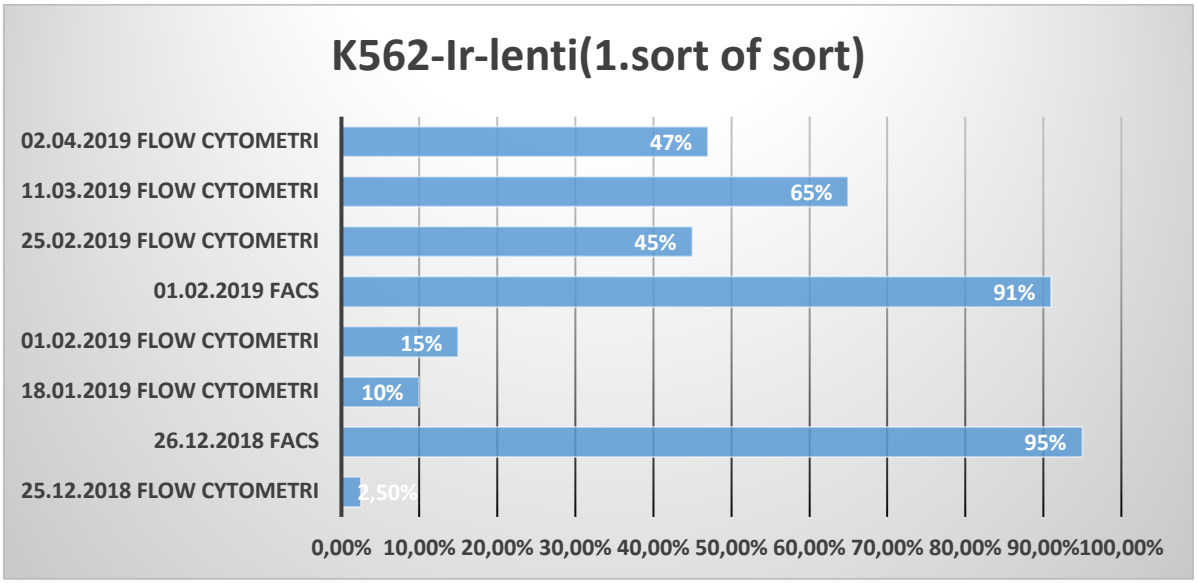
Lentivirüs ile stabil transdüksiyon deneyi sonrası 18. gün, in vitro biyolüminesans ölçüm ekranı görüntüsü. Biyolüminesans Cihazı(BioTek Synergy HT)Ekim yapılan alanlar için hatırlatma: A1:200 µl FenolRed negatif, A2:200 µl FenolRed pozitif, A3:200 µl FenolRed pozitif + 1 µl Lusiferin, A4:200 ul FenolRed negatif + 1 µl Lusiferin, A5:6 µl K562(10.000hücre)+ 194 µl FenolRed negatif, A6:35 µl K562-lenti(10.000)+ 165 µl FenolRed negatif, A7:35 µl K562-lenti(10.000)+ 165 µl FenolRed negatif + 1 µl Lusiferin,A8:52,8 µl K562-lenti (15.000)+ 150 µl FenolRed negatif + 1 µl Lusiferin, A9:70 µl K562-lenti (20.000) + 130 µl FenolRed negatif+ 1 µl Lusiferin, A10:140 µl K562-lenti (40.000)+ 60 µl FenolRed negatif +1 µl Lusiferin

Biyolüminesans çalışmasının ardından, atasal ve dirençli hücre populasyonlarının in vivo deneyler için çoğaltılıp genişletildiği, hücre kültürü idame ve pasaj çalışmalarına geçilmiştir. Bu çalışmalarda, laboratuvarımızda bulunan floresan hücre sayım cihazında yapılan dirençli hücre sayımı ile bu hücre populasyonunda GFP oranının düştüğü tesadüfi olarak gözlenmiştir. Bu verinin doğrulanması amacıyla sonraki basamakta akış sitometri çalışmalarına başlanmıştır. Bu çalışmaların sonuçlarının yorumlanması tartışma kısmında detaylandırılmıştır.

4.3. DİRENÇLİ HÜCRELERİN AKIM SİTOMETRİ VE AYRIŞTIRMA (FACS) SONUÇLARI

K562-Ir-lenti hücrelerinin ortamda puromycin baskısına rağmen GFP miktarının popülasyonda düşmesi nedeniyle, pasajlanarak genişletilen dirençli hücre popülasyonu, iki kısım halinde FACS ile ayrımlanmıştır. K562-Ir-lenti-1.sort ilk ayrımlanan popülasyon, K562-Ir-lenti- 2.sort ise tarihsel olarak daha sonra ayrımlanan popülasyonu temsil etmektedir. Bu ayrımlanan hücre popülasyonları ilerleyen aşamada ikinci kez FACS ile ayrımlandığında ise

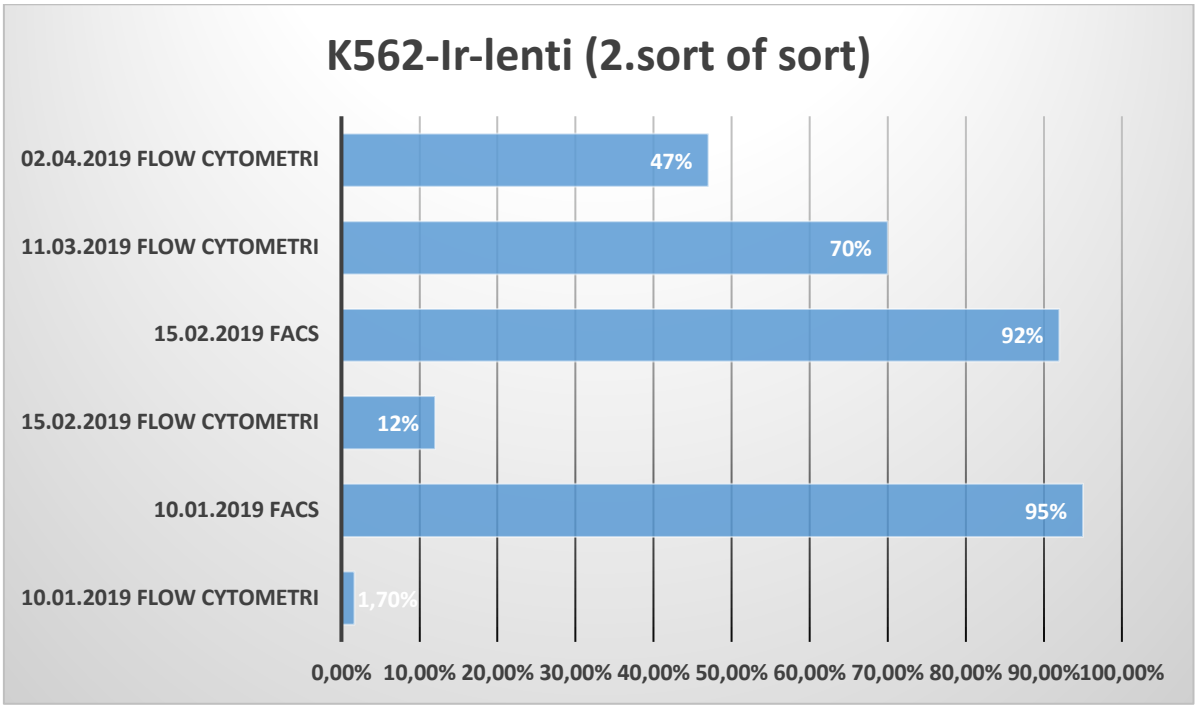
1.sort of sort(ilk olarak ayrımlanan dirençli hücre popülasyonunun ikinci kez ayrımlanmasını ifade eder) ve 2.sort of sort(tarihsel olarak daha sonra ayrımlanan hücre popülasyonunun ikinci kez ayrımlanmasını ifade eder) olarak etiketlendirilmiştir. Ve bu nedenle okuyucu açısından bir karışıklık olmaması adına, metin içerisinde ve şekillerde etiketler bu şekilde kullanılmaya devam etmiştir. Ayrımlanan hücreler akış sitometrik ölçümler ile takip edilmiş ve GFP oranları düştüğünde hücreler FACS cihazı ile yeniden ayrımlanmıştır. Dirençli hücre popülasyonu in vivo deneyler başladıktan sonra da bir süre daha akım sitometri cihazı ile GFP oranlarının takibi için izleme devam edilmiştir.



Şekil 29-K562- Ir- lenti-1.sort hücrelerinin transdüksiyon sonrası Flow Cytometri ve FACS ile GFP yüzde oranlarının gösterimi

Şekil-29 ilk ayrımlanan dirençli hücrelerin(K562-Ir-lenti-1.sort) farklı tarihlerde akış sitometri ile ölçülen GFP oranlarını ve FACS çalışmalarını göstermektedir. Grafikten de anlaşılacağı üzere, dirençli hücreler ilk transfeksiyonun yapılmasının ardından idameleri esnasında yaklaşık 2 aylık bir zaman diliminde floresan mikroskop görüntülemelerinin aksine akış sitometride %2,5 GFP oranı sergilemişlerdir. Bu çalışmanın hemen ardından yapılan FACS ile GFP pozitif hücrelerin ayrımlanma işlemi(K562-Ir-lenti-1.sort of sort) sonrası 3. ve 4. hafta yapılan akım sitometri çalışmasında yine hücre populasyonunda GFP oranının %95'ler seviyesinden %10'lara kadar düştüğü gözlenmiştir. Bu aşamada vakit kaybetmeden yeniden FACS planlanmış, GFP pozitif hücreler ayrımlanmış ancak %91 seviyesinde gözlenen GFP oranı akış sitometride 3. hafta da yarı yarıya azalmış ve %45 seviyesine gerilemiştir. Sonuç bu şekilde alınınca, dirençli hücrelerimizin oluşturduğu popülasyonda puromycinede dirençli bir

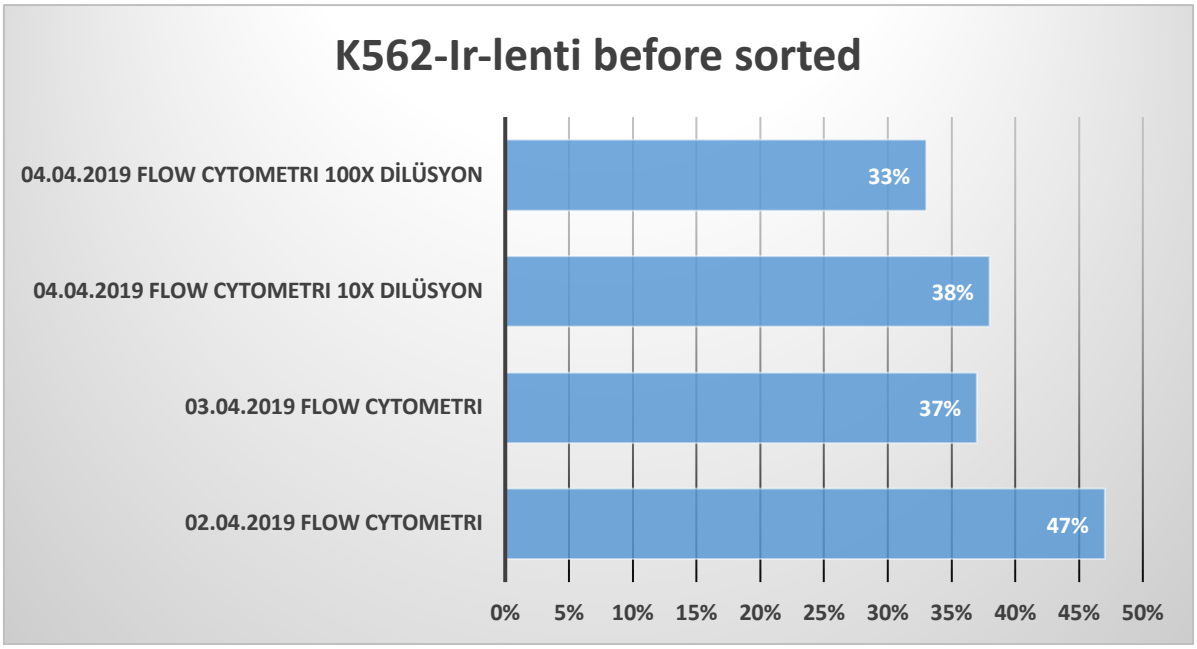
alt popülasyonun zamanla ortaya çıkması ihtimali üzerinde durulmuş ve GFP oranının popülasyonda arttırılması için çözüm olarak 4 µg/ml olarak belirlenen puromycin dozunun 10 µg /ml'e çıkılmasına karar verilmiştir ve yine akış sitometri ölçümler ile GFP oranı takip edilmiştir. İki hafta sonra GFP oranının popülasyonda %45'ler seviyesinden %65'lere çıktığı gözlensede, bu durumun bir sonraki ölçümde geçici olduğu ve GFP oranının yeniden %47 seviyesine gerilediği saptanmıştır.



Şekil 30-K562- Ir- lenti-2.sort hücrelerinin transdüksiyon sonrası Flow Cytometri ve FACS ile GFP yüzde oranlarının gösterimi

Şekil-30 tarihsel olarak ikinci kısımda ayrımlanan dirençli hücrelerin(K562-Ir-lenti-2.sort) farklı tarihlerde akış sitometri ile ölçülen GFP oranlarını ve FACS çalışmalarını göstermektedir. Grafikten de anlaşılacağı üzere, dirençli hücreler ilk transfeksiyonun yapılmasının ardından idameleri esnasında yaklaşık 3 aylık bir zaman diliminde floresan mikroskop görüntülemelerinin aksine akış sitometride %1,7 GFP oranı sergilemişlerdir. Bu çalışmanın hemen ardından yapılan FACS ile GFP pozitif hücrelerin ayrımlanma işlemi(K562-Ir-lenti-2.sort of sort) sonrası 5. hafta yapılan akım sitometri çalışmasında yine hücre populasyonunda GFP oranının %95'ler seviyesinden %12'lere kadar düştüğü gözlenmiştir. Bu aşamada diğer grup hücrelerde olduğu gibi, vakit kaybetmeden yeniden FACS planlanmış, GFP pozitif hücreler ayrımlanmış ancak %92 seviyesinde gözlenen GFP oranı akış sitometride 4. hafta da %70'ler seviyesine gerilemiştir. Ek olarak, bu grupta FACS'tan hemen sonra, 4 µg /ml

olarak belirlenen puromycin dozu 10 µg/ml'e arttırılmıştır ve yine akış sitometri ölçümler ile GFP oranı takip edilmiştir. Yani 4. Haftada meydana gelen %70'e düşüş, 2 katından fazla puromycin dozuna maruziyete rağmen ortaya çıkmıştır. İki hafta sonra ise GFP oranının yeniden %47 seviyesine gerilediği saptanmıştır.



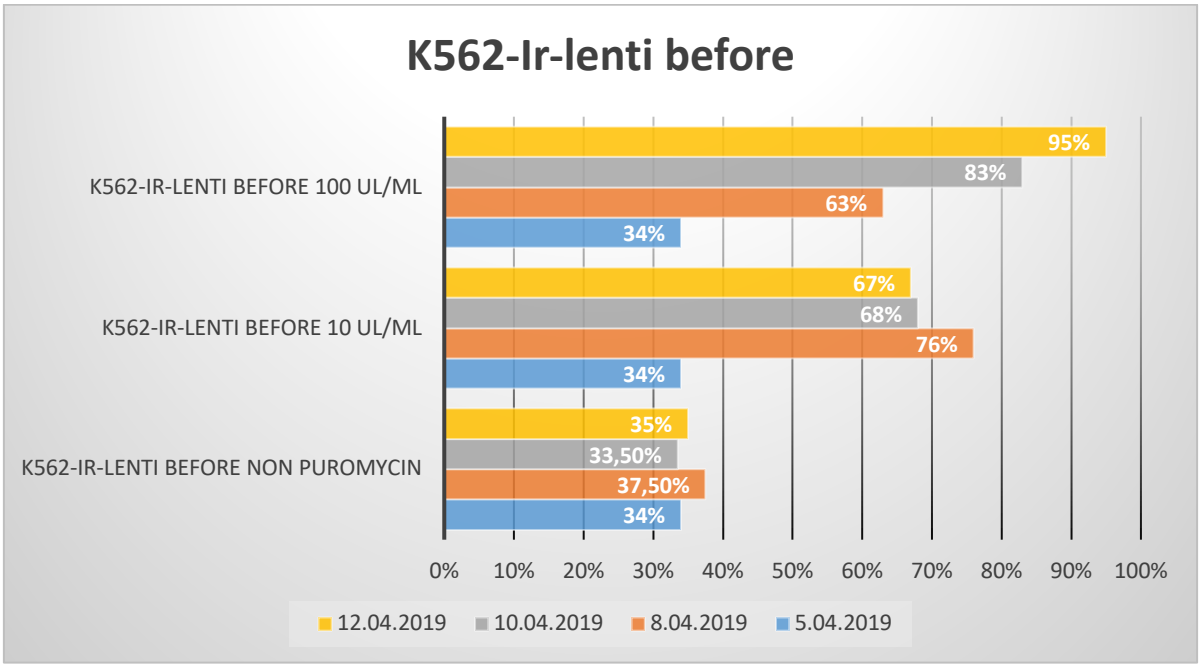
Şekil 31-İnokülasyon öncesi ayrımlanmayan K562- Ir- lenti – before sorted hücrelerinin Flow Cytometri ile Kontrolü

Bilkent Üniversitesi'nde in vivo deneylere başlanmadan önce lentivirüs ile işaretlenen atasal ve dirençli hücre popülasyonları akış sitometrisi ile GFP oranları kontrol edilmiştir. Dirençli hücrelerin bulunduğu popülasyonlar büyük çoğunluğu farelere inoküle edilmesi amacıyla FACS ile ayrımlanmıştır. Bir miktar hücre ise in vitro biyolüminesans ve akış sitometri çalışmaları için inkubasyonda bırakılmıştır. Ayrımlanan ve ayrımlanmayan hücreler 3.6.7'de belirtildiği şekilde etiketlendirilmiştir. Fare deneylerine başlandıktan sonra eş zamanlı olarak bu hücrelerin akış sitometri ile takibi yapılmıştır. Şekil-31 FACS'a alınmamış olan hücre grubunu temsil ediyor(K562-Ir-lenti-before) İlk gün ölçülen GFP oranı %47 iken, sonraki iki günde yine GFP oranlarının düştüğü gözlenmektedir.Bu çalışma esnasında hücreler 10 µg/ml puromycin idamesi altındadır.

Şekil-32 ise K562-Ir-lenti-before hücrelerinin farklı puromycin dozları uygulanarak GFP oranlarının takibi sürecini göstermektedir. Daha önce bahsedilen puromycin dirençli alt popülasyonların ortaya çıkmış olma ihtimalinin değerlendirilebilmesi için, hücre popülasyonu

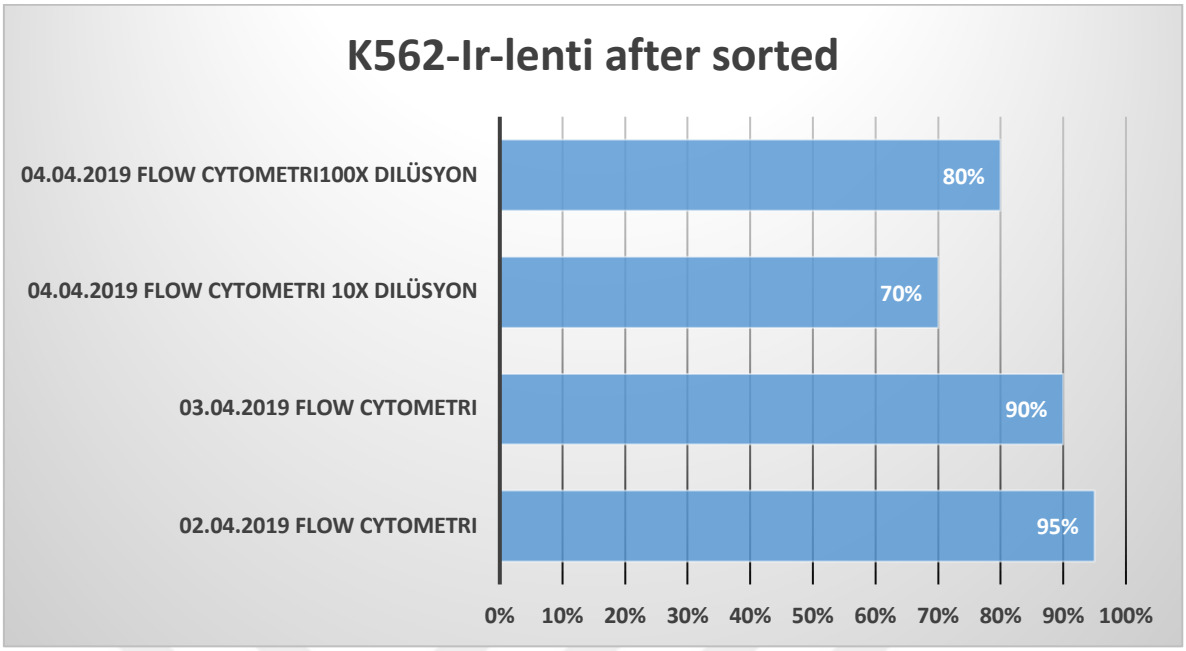
3’e bölünmüştür. Bir kısım hücre puromycin verilmeden sadece flow ile takip edilmiştir. Diğer bir kısım hücreye 10 µg/ml konsantrasyonda puromycin uygulanmaya devam edilmiştir. 3. kısımdaki hücreler ise 100 µg/ml konsantrasyona maruz bırakılmıştır. Benzer işlem basamakları K562-Ir-lenti after hücre popülasyonu içinde yapılmıştır ve Şekil-33’te grafik olarak gösterilmiştir.

Bu çalışmamızın amacı gerçekten şüphelendiğimiz biçimde bir alt popülasyon oluşmuş ise normalde literatürlerde belirlenen maximum puromycin dozunun 10 katına çıkarak canlılığın sürdürülebilir olmadığı konsantrasyonda GFP oranı değişimine bakılarak bunun tespit edilebilmesidir.



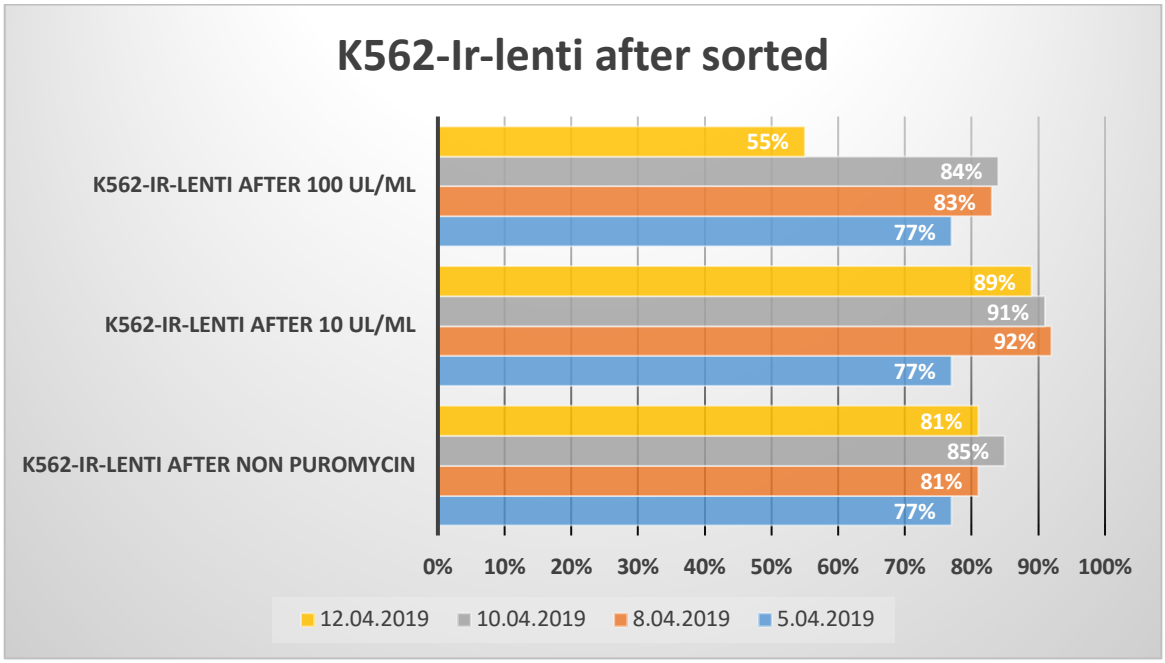
Şekil 32-İnokülasyon öncesi ayrımlanmayan K562- Ir- lenti – before sorted hücrelerinin 10 µg/ml ve 100 µg/ml puromycin uygulamaları sonrası 24, 72, 96 ve 120 saatlik Flow Cytometri ile GFP yüzde oranlarının kontrol sonuçları

Şekil-32’te K562-Ir-lenti- before hücrelerinin 1.,3.,4. ve 5. Gün puromycin almayan,10 µg /ml uygulanan ve 100 µg /ml uygulanan hücre popülasyonlarında GFP % değerleri görülmektedir. Bu 5 günlük takip sonuçları değerlendirildiğinde, puromycin almayan grupta GFP oranının %33-%35 aralığında sabit kaldığı, 10 µg /ml puromycin varlığında 72 saat sonunda GFP oranının %76’ya çıktığı ancak 96 ve 120. Saatlerde yapılan ölçümlerde yeniden düşüş trendine girdiği, 100 µg /ml puromycin varlığında ise 72 saat sonunda GFP oranının %63’e çıktığı ve 96. ve 120. saatlerde artış trendine girdiği ve 120. Saatte %95 seviyesini yakaladığı saptanmıştır.



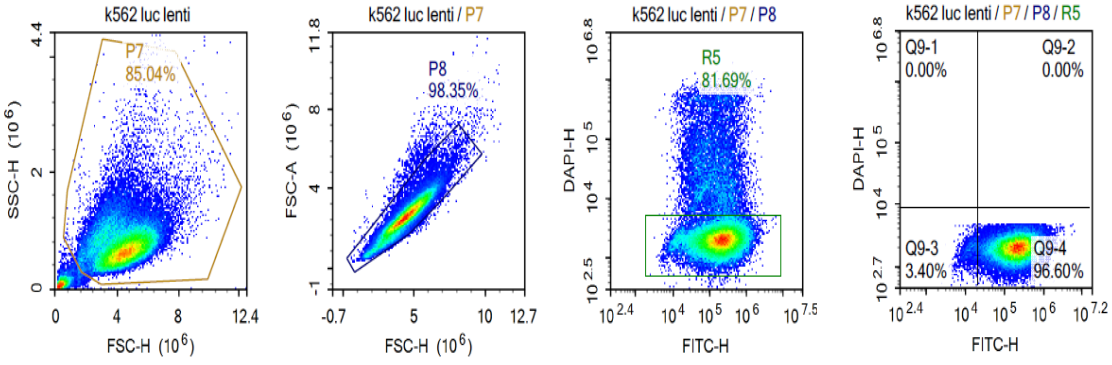
Şekil 33-İnokülasyon öncesi ayrımlanan K562- Ir- lenti – after sorted hücrelerinin Flow Cytometri ile Kontrolü

Şekil-33 FACS'a ile ayrımlanmış olan hücre grubunu temsil ediyor(K562-Ir-lenti-after) Ayrımlandıkları gün ölçülen GFP oranı %95'iken, sonraki iki günde yine GFP oranlarının sırasıyla %90 ve %70'e gerilediği gözlenmektedir. Bu çalışma esnasında hücreler 10 µg /ml puromycin idamesi altındadır.



Şekil 34-İnokülasyon öncesi ayrımlanan K562- Ir- lenti – after sorted hücrelerinin 10 µg/ml ve 100 µg/ml puromycin uygulamaları sonrası 24, 72, 96 ve 120 saatlik Flow Cytometry ile GFP yüzde oranlarının kontrol sonuçları

Şekil 34'te yeralan grafikte, K562-Ir-lenti- after hücrelerinin 1.,3.,4. ve 5. Gün puromycin almayan,10 µg/ml uygulanan ve 100 µg/ml uygulanan hücre popülasyonlarında GFP % değerleri görülmektedir. Bu hücreler in vivo deneyler öncesi ayrımlanmıştır ve aslında ayrımlandıkları gün %95 seviyesinde(grafikte gösterilmemiştir) olan GFP oranı, 72 saat içerisinde ve puromycin maruziyeti 10 µg /ml olarak idame edilirken, %77'ye düşmüştür. Ek olarak, grafikte yeralan 5 günlük takip sonuçları değerlendirildiğinde, puromycin almayan grupta GFP oranının %81-85 aralığında sabit kaldığı, 10 µg /ml puromycin varlığında 72 saat sonunda GFP oranının %92'ye çıktığı ancak 120. saatte yapılan ölçümde %89 ile yeniden düşüş trendine girdiği, 100 µg/ml puromycin varlığında ise 72 saat sonunda GFP oranının %83'e çıktığı ve 96.'te benzer oranın devam ettiği ancak 120. saat ölçümünde %55 seviyesine gerilediği ve popülasyonda canlılığın dramatik şekilde azaldığı saptanmıştır.



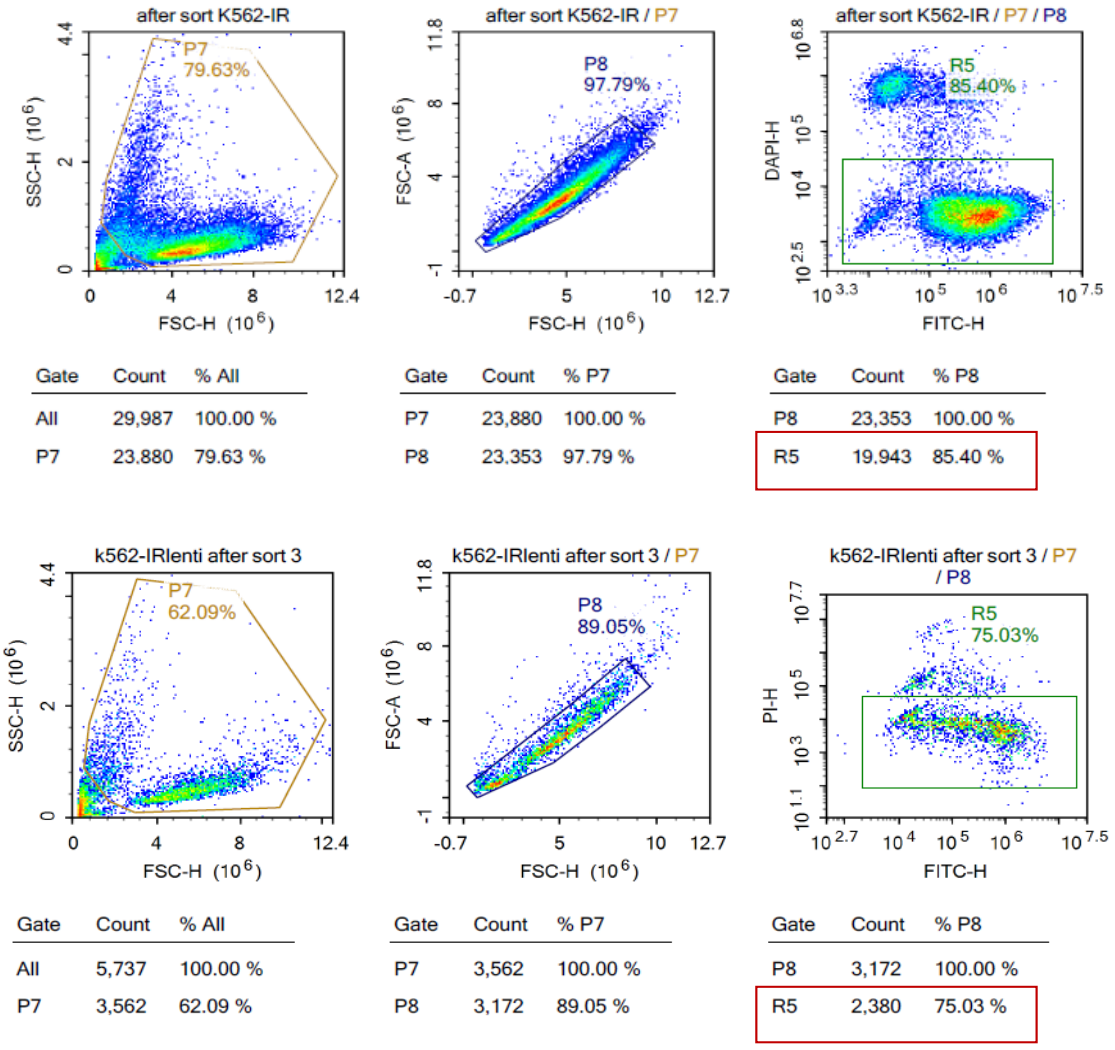
Gate	Count	% All
All	68,542	100.00 %
P7	58,288	85.04 %

Gate	Count	% P7
P7	58,288	100.00 %
P8	57,327	98.35 %

Gate	Count	% P8
P8	57,327	100.00 %
R5	46,828	81.69 %

Gate	Count	% R5
R5	46,828	100.00 %
Q9-1	0	0.00 %
Q9-2	0	0.00 %
Q9-3	1,593	3.40 %
Q9-4	45,235	96.60 %

Şekil 35-K562-lenti Akış Stometri Sonucu



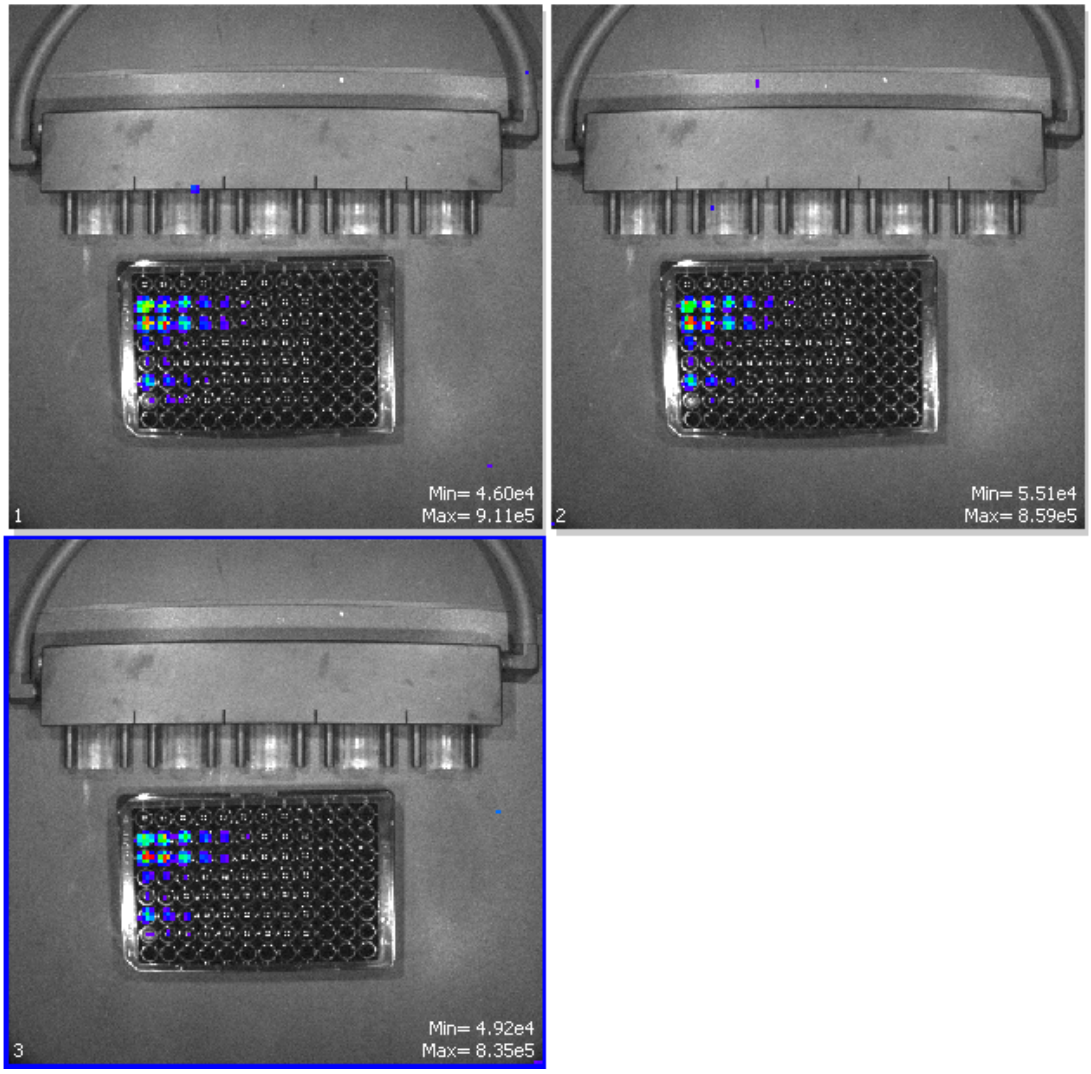
Şekil 36-K562-Ir-lenti Akış Stometri Sonucu

K562-lenti hücre hattı in vivo fare deneyleri öncesi akış sitometri ölçümde GFP yüzde oranı %96,6'dır(Şekil-35) Buna rağmen K562- Ir-lenti hücre hattının Şekil 36'da ayrımlama sonrası 12. Saat ve 36. Saat GFP oranı sırasıyla %85,4 ve %75 olarak ölçülmüştür. Bu bize kısa sürelerde bile dirençli popülasyonda GFP oranının sabit tutulamadığını göstermektedir.

Bu deney setinde elde edilen veriler, dirençli hücre populasyonlarının GFP pozitifliğini puromycin varlığında ve farklı doz aralıklarında dahi hiçbir zaman koruyamadığının ve her daim düşen bir trend izlediğinin kanıtıdır. Oysa ki atasal hücre transdüksiyonu verimliliği değerlendirildiğinde, GFP oranları %90-95 aralığında olduğu ve hücre idamesi esnasında yaklaşık bu oranlarda sabitlendiği ve bunu yaklaşık 6 ay boyunca koruduğu saptanmıştır. Bu verilerin tümü, tartışma kısmında detaylı biçimde yorumlanmıştır.

4.4. IN VITRO BIYOLÜMİNESANS - IVIS GÖRÜNTÜLEME SONUÇLARI

In vivo fare deneyleri için hazırlıklar yapılırken eş zamanlı olarak, K562-lenti,K562-Ir-lenti-after ve K562-Ir-lenti-before hücrelerinin in vitro IVIS biyolüminesans görüntüleme çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmada amaç, hücrelerden gelen sinyal miktarının IVIS ile test edilmesi, cihazın minimum kaç hücreyi in vitro değerlendirdiğinin tespit edilebilmesi ve sonraki basamakta farelerde de inokulasyon sonrası minimum kaç hücreden ışıma alınacağının öngörülebilmesidir. 96 kuyulu platede yapılan ekim sonrası ekran görüntüsü Şekil-37'de gösterilmiştir. Plate'te B ve C kuyularında bulunan K562-lenti atasal hücrelerinin ışıma oranlarına bakıldığında 4000 hücreye kadar cihazın biyolüminesans ışımayı okuyabildiğini, D - E sırasında bulunan K562-Ir-lenti after hücreleri ve F-G sırasında bulunan K562-Ir-lenti before hücrelerinin cihazda ölçülen ışıma miktarlarının atasal hücrelere kıyasla daha az olduğu, hatta fareler için sort edilen hücrelerin(K562-Ir-lenti-after) edilmeyenlere göre de sinyalinin daha düşük olduğu ve ışımanın 16.000 hücreye kadar varolduğu, sonraki kuyularda seri dilüsyon ile giderek azalan hücre sayılarında herhangi bir ışıma olmadığı gözlenmiştir. Kuyularda yukarıdan aşağıya doğru hücre sayıları eşit olmasına rağmen atasal hücrelerin 64.000,32.000,16.000 hücre/kuyu için daha güçlü sinyal verdiği görülmektedir.



Şekil 37-K562- lenti, K562-Ir- lenti before sorted ve K562-Ir- lenti after sorted hücrelerinin IVIS görüntüleme ile in vitro biyolüminesans sonuçları.

Hücreler 96 kuyulu plate'e seri dilüsyon tekniği ile ekilmiş ve hücre hatlarının bulunduğu kuyulara 150 µl / ml olan D-lusiferin 10 µl eklenmiştir. Ekimi yapılan hücre hatlarının sayıları sırasıyla; 1-64.000 hücre/kuyu, 2-32.000 hücre/kuyu, 3-16.000 hücre/kuyu, 4-8000 hücre/kuyu, 5-4000 hücre/kuyu, 6-2000 hücre/kuyu, 7-1000 hücre/kuyu, 8-500 hücre/kuyu, 9-250 hücre/kuyu şeklindedir. A1 ve A2- 200 µl ortam, A3 ve A4- 200 µl ortam + Lusiferin, A5 ve A6- K562 (62.500 hücre/kuyu), A7 ve A8- K562-Ir (62.500 hücre/kuyu), B ve C- K562-lenti, D ve E- K562-Ir-lenti after sorted, F ve G- K562-Ir-lenti before sorted.

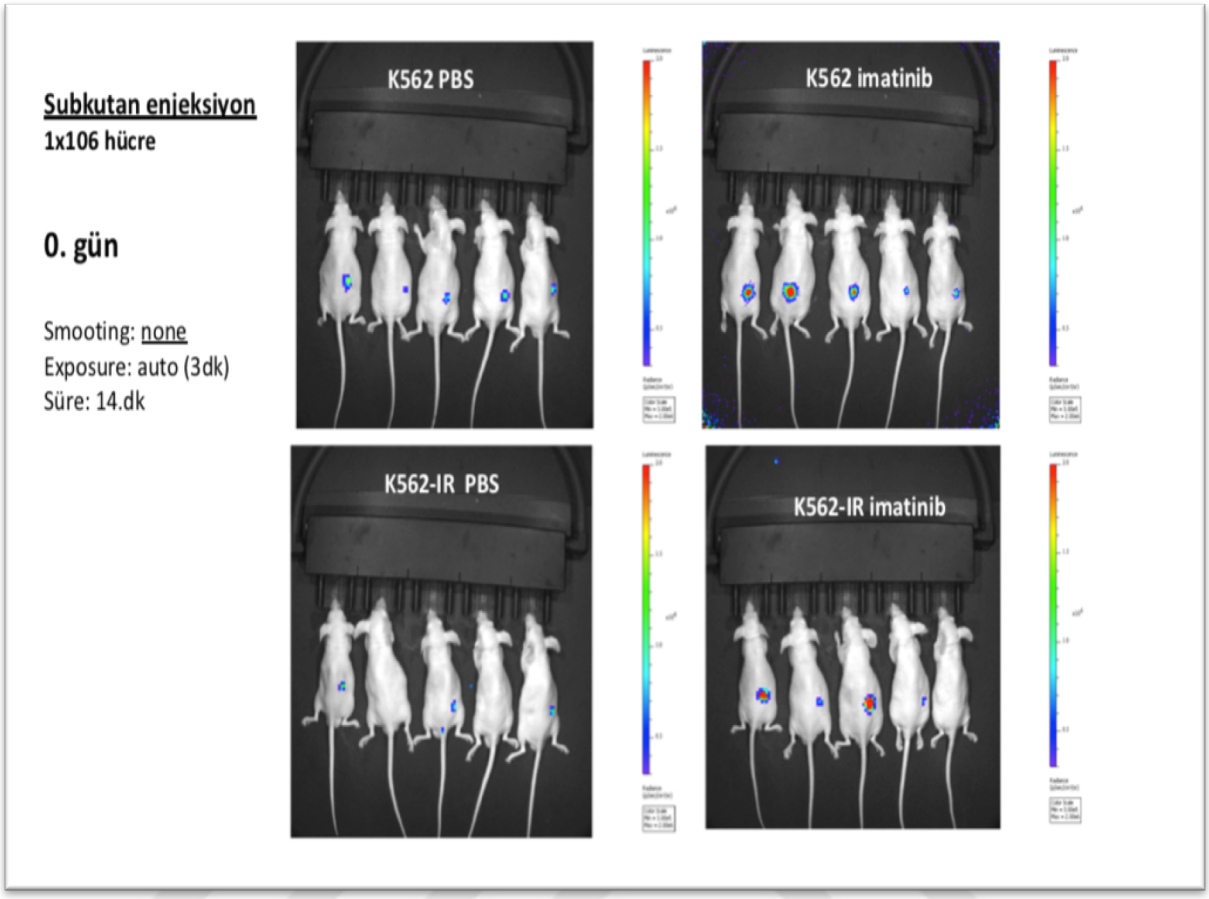
4.5. IN VİVO BİYOLÜMİNESANS - IVIS GÖRÜNTÜLEME SONUÇLARI

Bu bölüme kadar planlandığı biçimde gerçekleştirilen deneylerimizin son aşaması in vivo görüntüleme çalışmalarıdır. In vivo biyolüminesans görüntüleme çalışmaları dirençli hücre ve atasal hücrelerin canlı bir sistem altında davranış farklarının gösterilmesi açısından

amacımıza uygun şekilde deney setlerimizin içerisinde en önemli basamağı teşkil etmektedir. Veri toplama araçları bölümünde belirtildiği üzere, deney gruplarında bulunan atimik fareler görüntüleme için hazırlanarak, planlanan deney süresince 0. gün, 8.gün, 7.hafta ve 8.hafta görüntüleme çalışmalarına alınmış ve veriler kaydedilmiştir. 8. haftada yapılan son görüntülemenin hemen ardından hayvanlar, sakrifiye edilmiş ve çeşitli organ ve dokular ex-vivo olarak tekrar görüntülemeye alınmıştır.

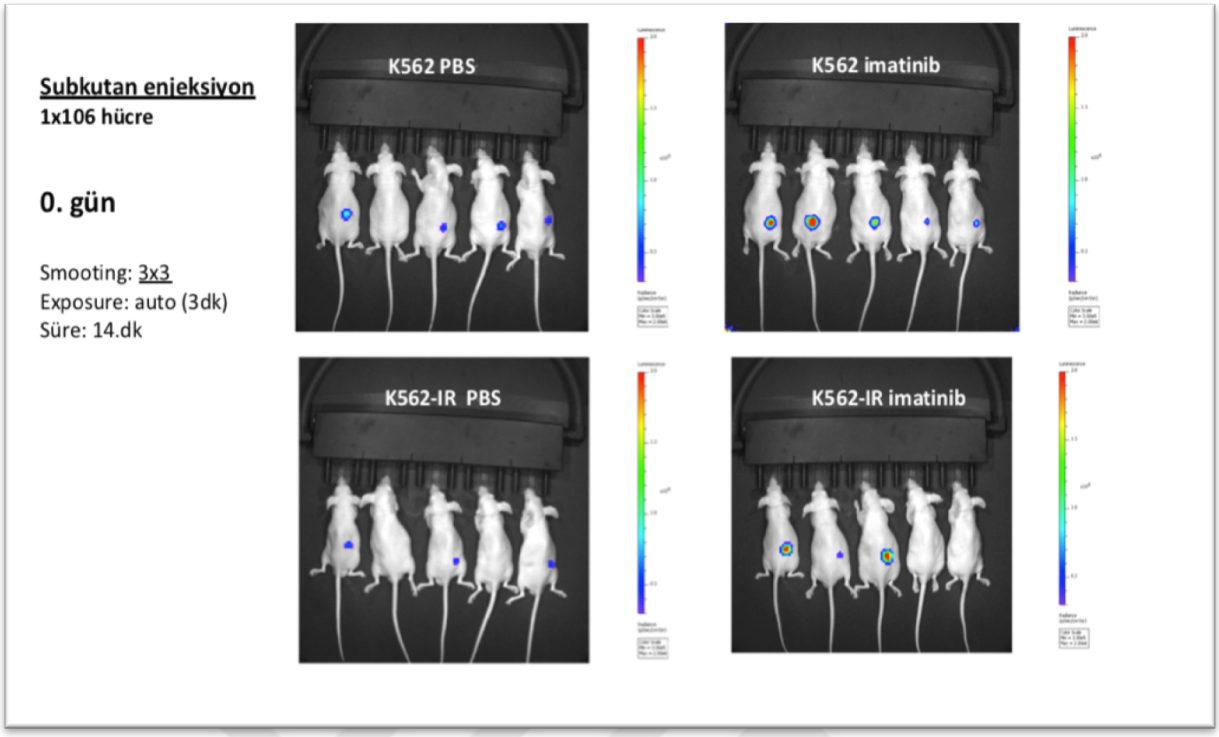
IVIS cihazında 'smoothing' olarak isimlendirilen bir seçenek ayarı bulunmaktadır. Bu ayarlama seçeneği seçildiğinde, sinyal gelen bölgeleri optimize ederek görüntüyü optimize ettiği farkedilmektedir. Cihazın kullanım klavuzunda bu ayarın, sinyal gelen ilgili bölgeden çok düşük ve çok yüksek sinyalleri ekarte ettiği ve ortalamasını aldığı şekliyle görüntü sağladığı belirtilmektedir. Smoothing ayarı 'none' bu seçeneğin kapalı olduğu, smoothing '3 X 3' ise bu ayarın açık olduğunu ve optimizasyon derecesini ifade eder. Deney süresince belirli aralıklarla yapılan görüntüleme çalışmalarının ilk görüntülerinde bu ayar smoothing 'none' , ikinci görüntülerinde ise bu seçeneğin açık olduğu smoothing '3 X 3' seçeneği yeralamaktadır. Exposure time (pozlama süresi) 'auto' olarak seçildiğinde cihaz o deney seti için otomatik olarak pozlama süresi seçmektedir. Cihaz bizim deney setlerimiz için 3dk. seçti ancak sinyal daha şiddetli olsaydı 1dakika veya 10 saniye gibi daha kısa süreleri seçebilirdi. Yani exposure time sinyal şiddetine göre pozlama süresini(kaç dakika da bir görüntü alacağını) belirlemektedir. Exposure time 3 dakika olduğunda cihaz 20 dakika boyunca her 3 dakika bir sinyal görüntülemesini fotoğraflamaktadır.

Aşağıda deney gruplarının IVIS görüntüleme sonuçları bulunmaktadır ve karşılaştırmalı şekilde her bir görüntüleme günü için listelenmiştir. Görüntülerin hepsinde exposure time 3 dakika ve her bir deney hayvanı için 14.dakika verileri kıyaslanmıştır(maksimum biyolüminesans doygunluk noktası 14. dakikada elde edilmiştir, sonrasında sinyaller düşmektedir, Bknz Şekil-12).



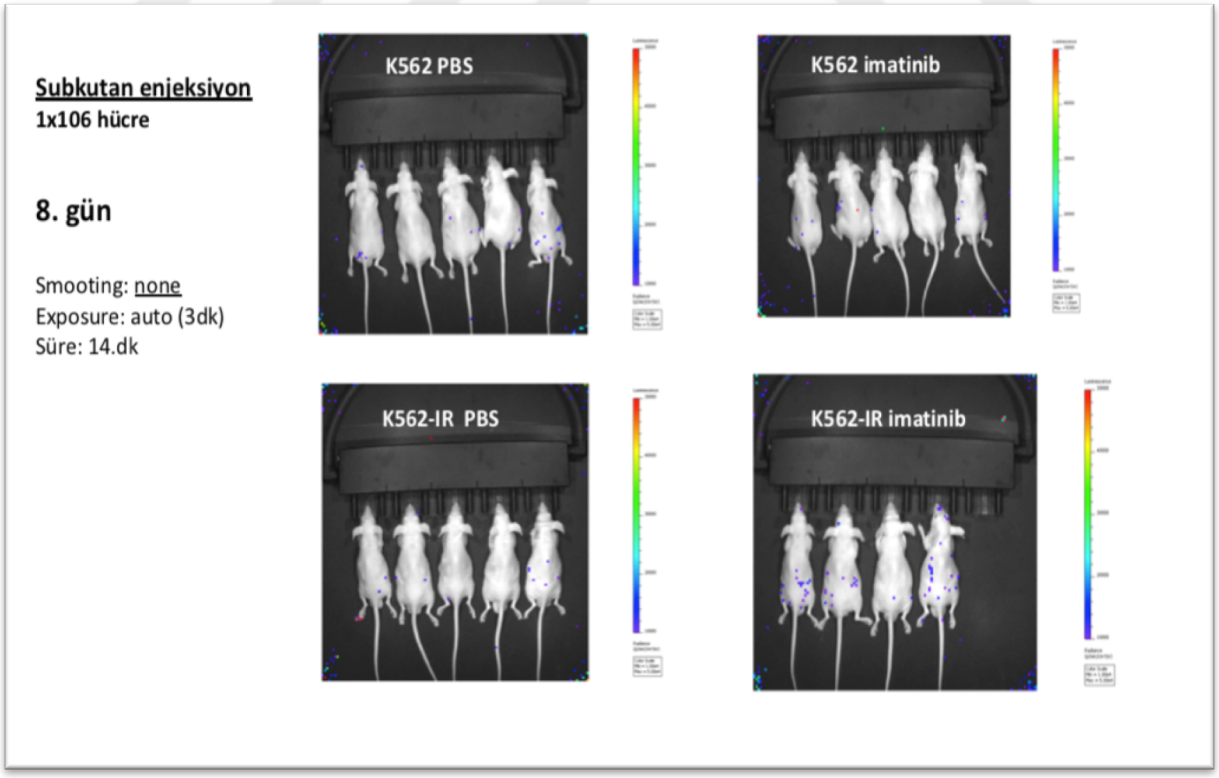
Şekil 38-Subkutan deney gruplarının 0. Gün smoothing 'none' IVIS görüntülemesi

Şekil-38, subkutan gruplar için 0.gün, none ayarında ve 14.dakikada bulunan IVIS görüntülemesidir. Farelere 0. gün 1 x 10^6 hücre inoküle edildi. Sağ tarafta bulunan lüminesans skalası 0,5 x 10^6 ve 2 x 10^6 aralığındadır. Bu cihazdan gelen ve otomatik olarak alınan ilk sinyaldir çünkü 1 x 10^6 hücre inoküle edildikten hemen sonra cihaz hücrelerden gelen şiddetli sinyali görmüş ve lüminesans değerinin bu aralıkta olduğunu saptamıştır. Burada hayvanların kalça bölgesinde hücrelerden sinyal geldiği için hücrelerin deney hayvanlarına doğru şekilde inoküle edildiği görülebilmektedir.

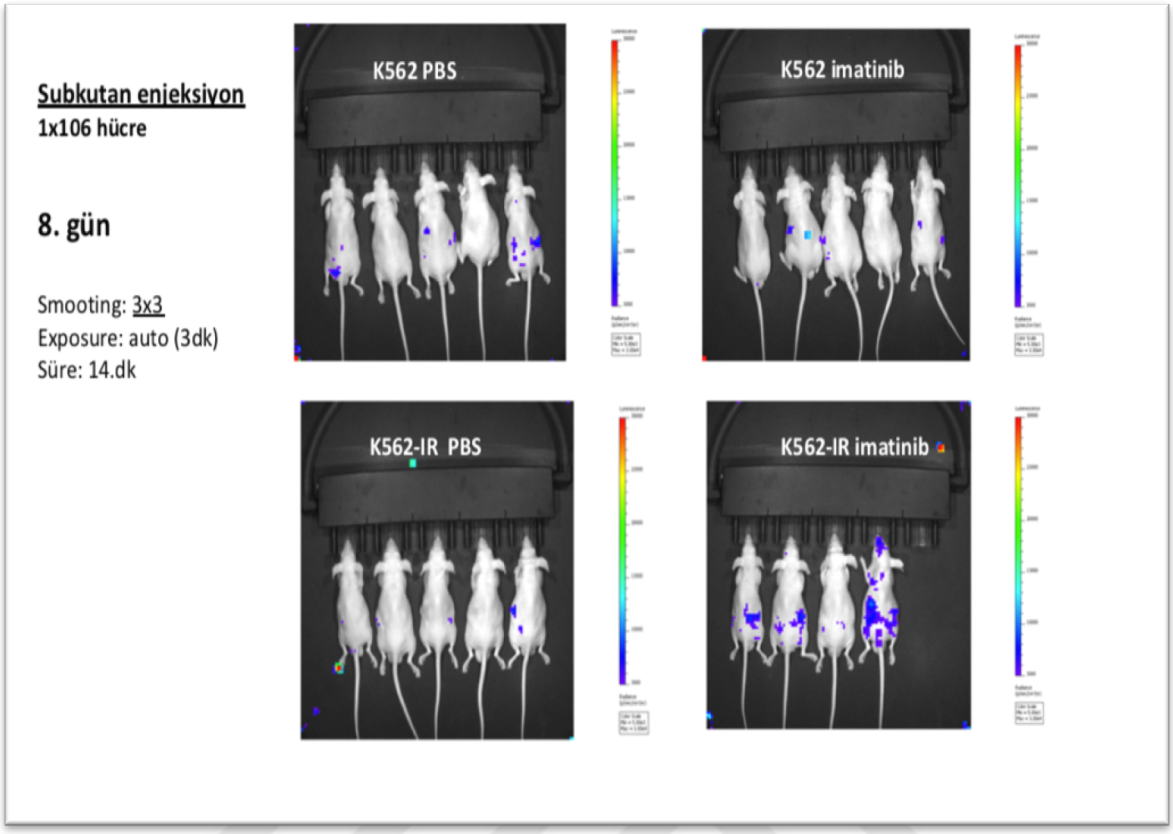


Şekil 39-Subkutan deney gruplarının 0. Gün smoothing '3 X 3' IVIS görüntülemesi

Şekil- 39' da yeralan smoothing 3 X 3 görüntüsüde 0. gün için smoothing 'none' görüntüsüne benzerdir.



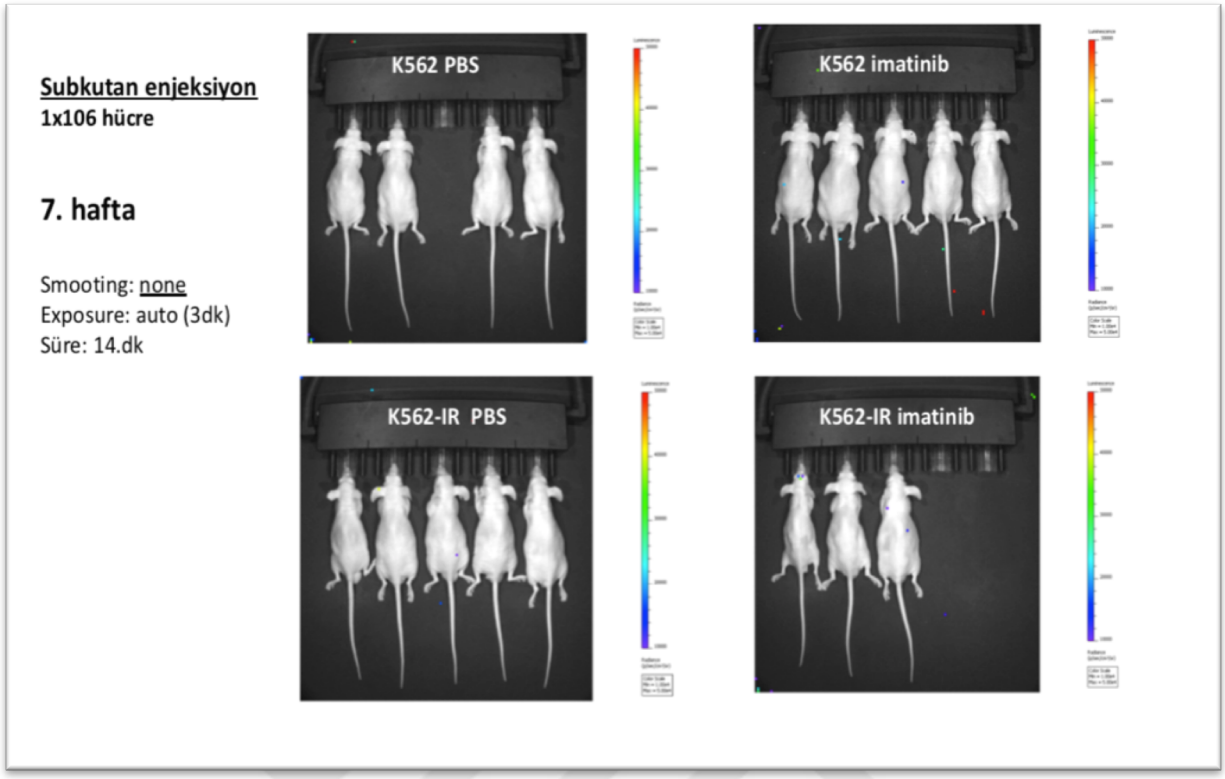
Şekil 40-Subkutan deney gruplarının 8. Gün smoothing 'none' IVIS görüntülemesi



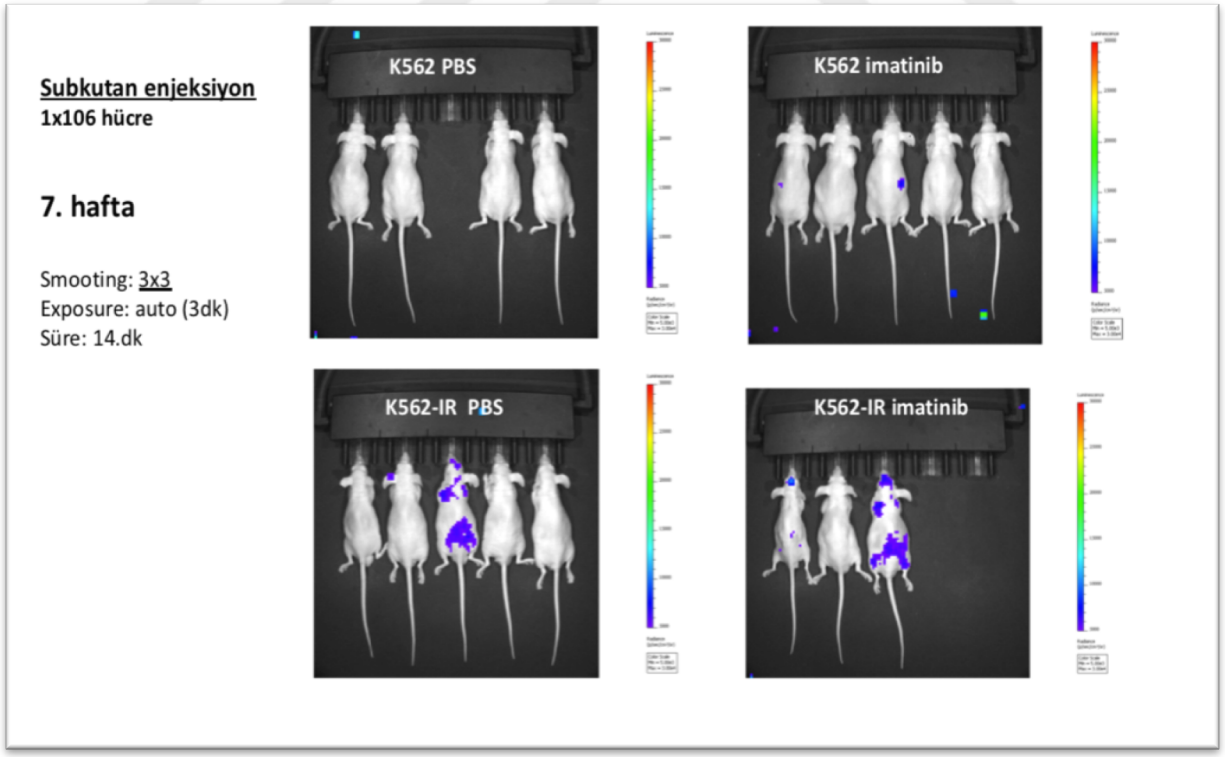
Şekil 41-Subkutan deney gruplarının 8. Gün smoothing '3 X 3' IVIS görüntülemesi

Şekil 40 ve 41'de 8. gün ve sırasıyla 'none' ve '3 X 3' görüntülemeleri bulunmaktadır. 0. Gün dışında geri kalan görüntülemelerde sinyal alınan hücre sayısı düştüğü için lüminesans değeri 5000- 30000 aralığındadır. Aslında 8.gün kaydedilen iki görüntünün 0.günde olduğu gibi birbirine benzer olması beklenir(Bknz.Şekil-38 ve 39) çünkü sadece optimizasyon derecesi açısından farklılık bulunmaktadır.

7 ve 8. hafta subkutan none görüntülerinde hayvanların hiçbirinde sinyal tespit edilememiştir. 7.hafta none ve 3 X 3 görüntüleri kendi arasında kıyaslandığında bu iki görüntü arasında çok büyük veri farkı olduğu gözlenmektedir. 7. hafta none görüntüsünde hiçbir hayvandan sinyal alınamamasına ragmen, 3 X 3 formatında K562-imatinib, K562-Ir-PBS ve K562-Ir-imatinib gruplarından bazı hayvanlarda sinyal gözlenmektedir. Smoothing 3 X 3 ayarında, K562-Ir-PBS grubundaki 3. hayvan, K562-imatinib 3.hayvan ve K562-Ir-imatinib 1 ve 3 nolu hayvanlardan sinyal gelmektedir(Şekil-42,43).

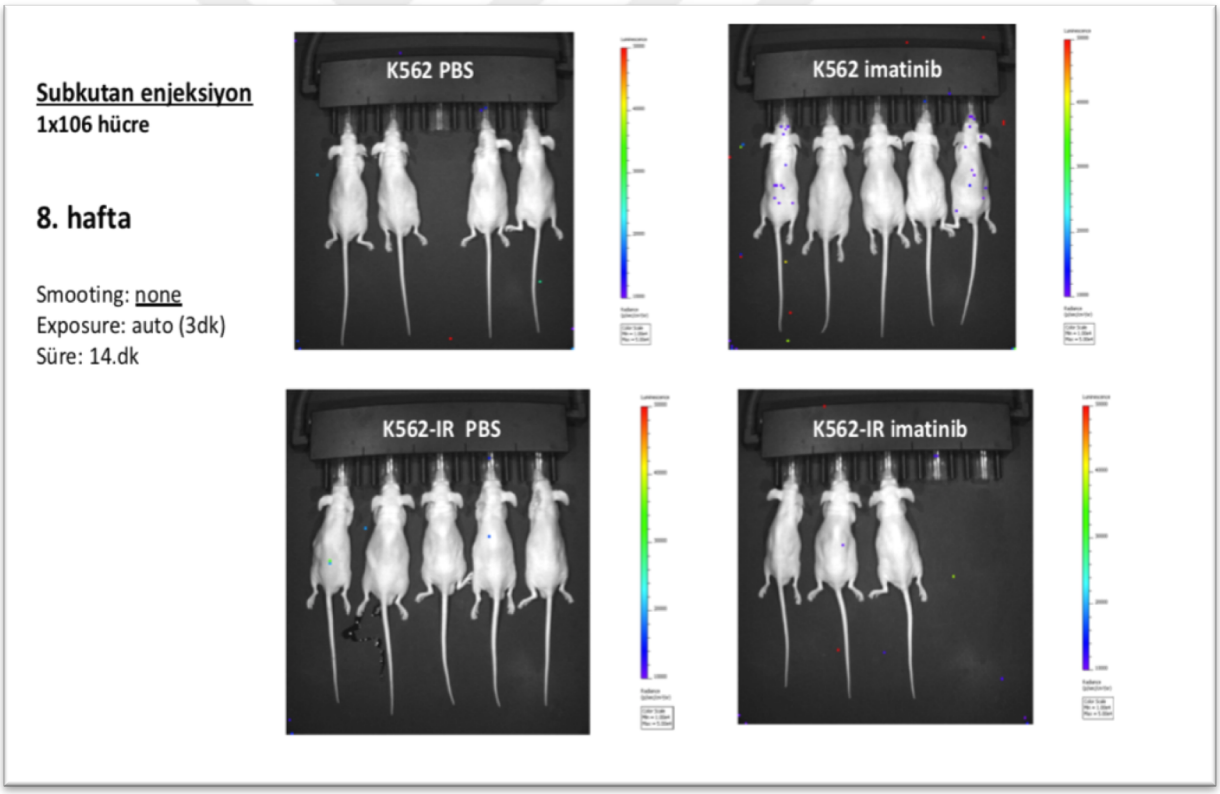


Şekil 42- Subkutan deney gruplarının 7. hafta smoothing 'none' IVIS görüntülemesi

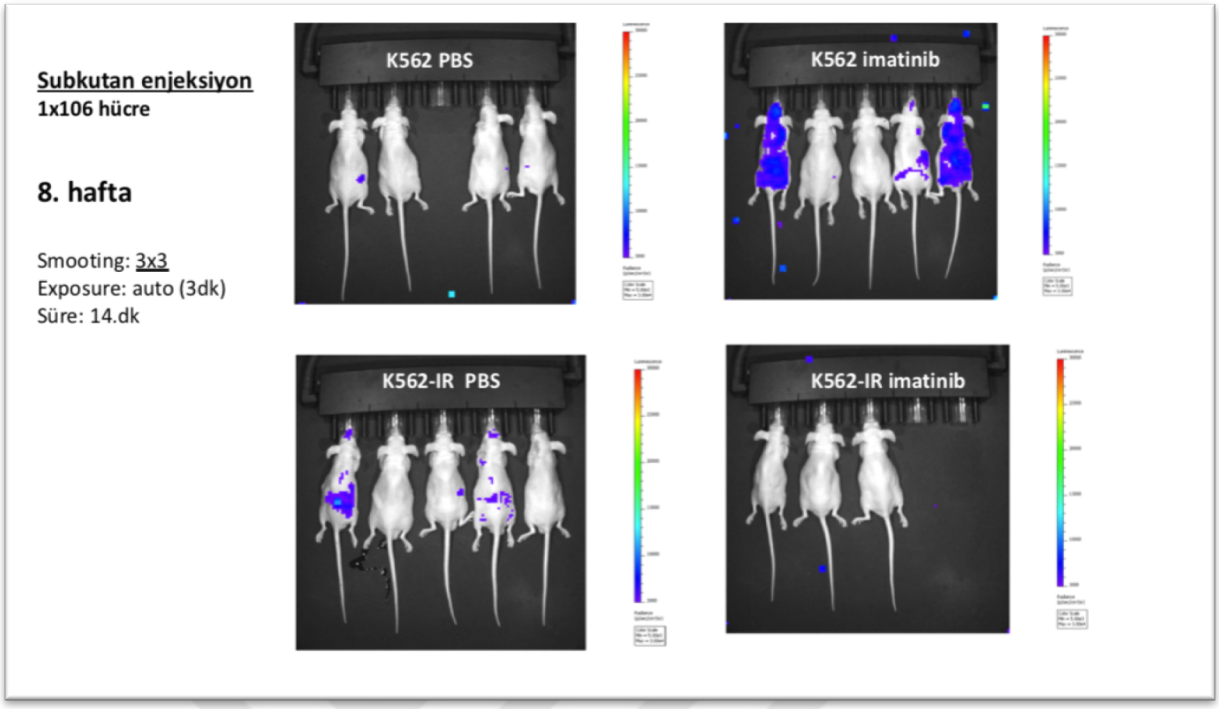


Şekil 43-Subkutan deney gruplarının 7. hafta smoothing '3 X 3' IVIS görüntülemesi

Şekil 44 ve 45'de 8. hafta son görüntüleme verileri görülmektedir. 7. hafta 3 X 3 görüntülerde sinyal gelen K562-imatinib 3.hayvan ve K562-Ir-imatinib 1 ve 3 nolu hayvanın 1 hafta sonra sinyalini kaybettiği gözlenmiştir. Ayrıca 7. haftada sinyal alınamayan K562-imatinib 1 ve 5 nolu hayvanlardan, 1 hafta sonra, cihazın hem none hem de 3 X 3 değerlendirmesinde sinyal gelmesi oldukça şaşırtıcıdır. Ek olarak, 7. hafta özellikle 3 X 3 ayarında, K562-Ir-imatinib 1 ve 3 nolu hayvanlardan gelen sinyallerin, 8. Hafta hem none hem 3 X 3 ile kaybolmuş olmasıda oldukça düşündürücüdür. 8. Gün, 7. ve 8. hafta none ve 3 X 3 görüntülerinin kendi arasındaki dramatik farkı ve farklı zamanda yapılan görüntülemelerde bazı sinyallerin kaybolup, hiç sinyal alınmayan hayvanlardan ise 1 hafta içerisinde sinyal geliyor olması ve luminesans değerinin başlangıca göre oldukça düşük olması nedeniyle gelen sinyallerin fos+ olabileceği ihtimali üzerinde durulmuştur.

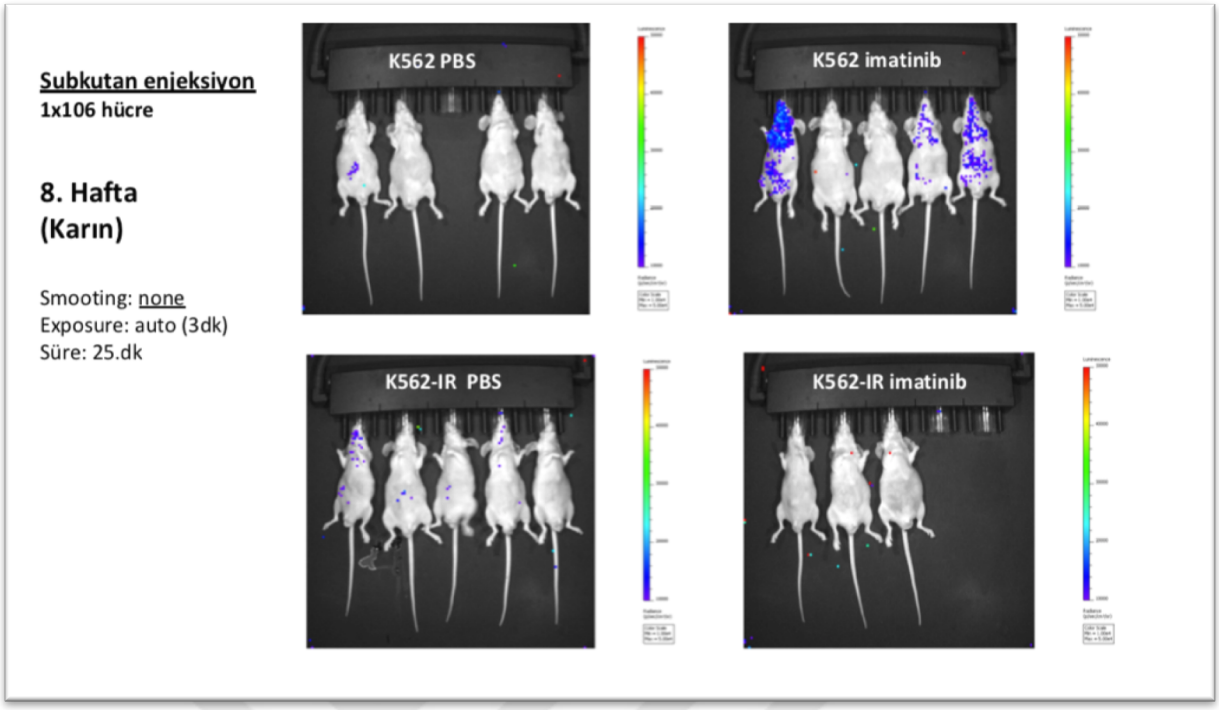


Şekil 44-Subkutan deney gruplarının 8. hafta smoothing 'none' IVIS görüntülemesi



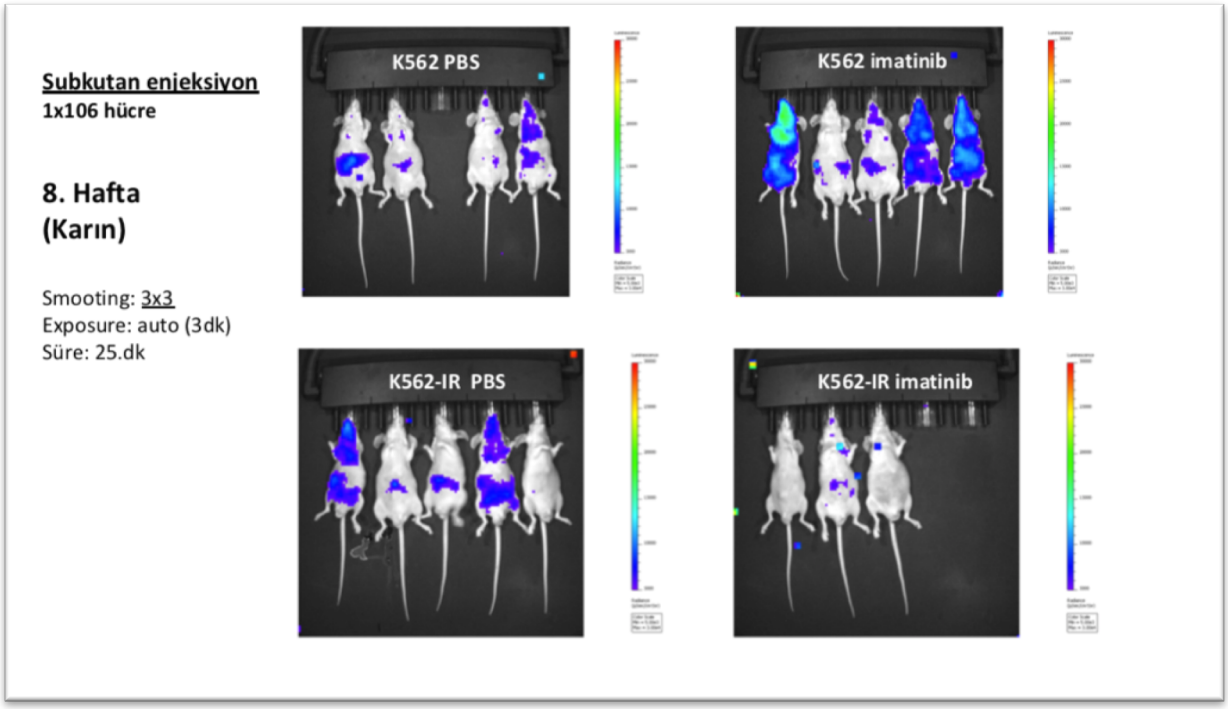
Şekil 45-Subkutan deney gruplarının 8. hafta smoothing 'none' IVIS görüntülemesi

Ancak bazı görüntülerde cihaz içerisinde değişik renklerde bulunabilen artefaktların verileri saptırabileceği ihtimalide gözden kaçmamalıdır. Görüntüleme sırasında bu artefaktların rengi cihaz tarafından okunup maksimum kabul ediliyor ve buna göre hayvanlardan gelen sinyaller okunuyor ise none ve 3 X 3 görüntüler arasındaki fark anlaşılabilir ve bu nedenle cihaz tarafından veriler hatalı kaydediliyor olabilir. Şekil–42'de none ayarında, K562-imatinib grubundaki fotoğrafta kırmızı renkli artefaktlar rahatlıkla görülebilir, aynı grubun Şekil-43, 3 X 3 smoothing ayarında, artefaktın rengi ise turkuaz yada yeşildir. Eğer cihaz none ayarında kırmızı noktayı maksimum ışıma referansı kabul ediyorsa, bizim luminesans aralığımız ve hücrelerden gelen sinyal çok düşük olduğundan, none ayarında hayvanlardan sinyal alamıyor olmamız normaldir. Smoothing 3 X 3 te artefaktın rengi turkuaz olduğundan cihaz bu ışımayı maksimum olarak referans aldığında ise hayvanlardan gelen sinyaller görülebilir hale geçer. Bu artefaktların, ham datalarda, kendi yazılım programı ile giderilmesi ve buna göre sinyal verilerinin düzeltilmesi için çalışmalarımız sürmektedir.



Şekil 46-Subkutan deney gruplarının 8. hafta smoothing 'none' ve 'karın bölgesi' IVIS görüntülemesi

Subkutan deney gruplarımızda ortaya çıkan bu sonuçlar ve elde edilen veriler ile hayvanlardan gelen ışıma sinyallerinin hangi görüntülerde doğru sinyali yansıttığı yukarıdaki sebeplerden ötürü netleşmemiştir. Sakrifikasyon öncesi son olarak, hayvanların karın bölgesinden none ve 3 X 3 ayarında 2 görüntü alınmıştır (Şekil 46 ve 47).



Şekil 47-Subkutan deney gruplarının 8. hafta smoothing '3 X 3' ve 'karın bölgesi' IVIS görüntülemesi

Şekil 46 ve 47'de gözlendiği üzere, subkutan hücre inokülasyonu yapılan hayvanların hem none hem de 3 X 3 ayarında, bazı hayvanların karın, baş ve boyun bölgelerinde sinyal olduğu gözlenmektedir. Hayvanların kalça bölgesinden uygulanan subkutan hücre inokulasyonu ile 8. hafta karın bölgesinden yapılan görüntülemede sinyal geliyor olması şaşırtıcıdır. Özellikle K562- imatinib grubu atasal hücre popülasyonunu temsil ettiği ve imatinib tedavisi altında olduğu için, none ayarında 3 hayvandan 3 X 3 ayarında 5 hayvanda ve 3 hayvanda neredeyse tüm vücuttan sinyal geliyor olması beklenmeyen bir durumdur. İnoküle edilen hücre popülasyonlarının agresif biçimde deri altından yayıldığı düşünülse bile K562-imatinib grubundaki sonuç bu hayvanlar imatinib tedavisi altında olduğundan beklentimize uygun değildir.

5. TARTIŞMA

Temel araştırmalarda viral vektörler sıklıkla kullanılır. Lentivirüsler, retrovirüslerin bir alt grubudur ve diğer retrovirüslerden farklı olarak bölünmeyen hücrelerin genomlarına entegre olma özelliği taşırlar. Virüs, konakçı hücre içine girdikten sonra, RNA'dan oluşan viral genom ters transkripsiyona uğrayarak kendi DNA parçasını üretir ve bu virüse ait DNA parçası, viral entegraz enzimi sayesinde konakçı hücre genomu içinde rastgele bir yere entegre olur. Bu aşamada 'provirüs' olarak adlandırılan vektör, konakçı genomu içinde kalır ve hücre bölündükçe viral DNA parçası yavru hücrelere aktarılır[46]. Lentiviral parçacıklar uzun süreli ekspresyon için transdükte olmuş hücrelerin genomuna stabil olarak entegre olur[40]. Bu vektörler ilgilenilen genlerin ekspresyonu için kullanılan araçlardır. Hücre işaretlemesi için kullanıldığı zaman floreasan yada biyolüminesan proteinleri yada her ikisini birden eksprese eder[40]. Her floresan proteini, güçlü floresan sinyali gösterir ve bir promotör seçimi altında eksprese edilir[40]. Lusiferazlar, gen ekspresyonu ile bağlantılı hücresel olayları izlemek için raportör deneylerinde yaygın olarak kullanılır. Ateşböceği Luciferase (Firefly-Luc) en yaygın kullanılan biyolüminesans raportörüdür[40]. Lentiviral vektörler genellikle, transdüksiyona uğramış stabil hücrelerin seçimine izin veren farklı antibiyotik belirteçleri ile birlikte sunulmaktadır[40]. Deneyimizde HIV-1 tabanlı plasmidlerden biri olan lentiviral vektör kullandık (EF1-GFP-luc-Rsv-Puro) [40]. Bu vektördeki EF1a promotörü dokuya özgü değildir, tüm hücre tiplerinde yüksek düzeyde aktiftir ve uzun süreli kültürden sonra knockout olasılığı oldukça düşüktür[40]. EF1a promotörü kontrolünde biyolüminesan protein luciseraz ve floresan protein GFP exprese eder[40]. Rsv promotörü kontrolü altında ise puromycin direnç geni bulunur[40]. Lentivirüs ile stabil transdüksiyon deneylerimizin tamamlanmasının ardından, ilk basamakta floresan mikroskop görüntüleme tekniği ile K562-lenti ve K562-Ir-lenti GFP içeren hücreleri görüntüledik. Ayrıca, K562-lenti atasal hücrelerin in vitro biyolüminesan ölçümü yine bu hücre hattının lusiferaz ile işaretlendiğini işaret etmiştir. Fakat her iki hücre hattının transdüksiyon sonrası idamesi sağlanırken, akım sitometri ölçümü ile K562-lenti hücrelerinin GFP+ hücre oranı %88 olarak tespit edilirken, K562-Ir-lenti hücrelerinin GFP+ hücre oranı %2,5 olarak ölçülmüştür. FACS ile ayrımlanan K562-Ir-lenti hücreleri puromycin baskısı altında çoğaltılmış ancak yeniden yapılan akım sitometri ölçümleri ile bu hücre hattının GFP+'lik oranının hücre popülasyonu artmasına rağmen zamanla %15'lere kadar düştüğünü göstermiştir.Bu sorunun üstesinden gelmek için puromycin dozu 2 kat arttırılmış, ancak çözüm

olmamıştır. K562-lenti hücrelerinde de aynı puromycin viali kullanılmasına rağmen yine de puromycinin etki etmiyor olabileceği düşünülmüştür. Ancak dirençli hatta farklı vial kullanımıda benzer sonuçları getirmiştir. Arka arkaya yapılan ve uzun süre devam eden FACS ve akım sitometri çalışmaları ile K562-Ir-lenti hücre hattı in vivo atimik farelere verilmesi öncesinde optimize edilmeye çalışılmıştır. Stabil transfeksiyon verimliliği açısından K562-Ir-lenti ile kıyaslandığında, K562-lenti hücre hattında GFP+'liği oranı düşmemiş aksine, %90'lara varan oranlarda verimlilik elde edilmiştir. Bu nedenle K562-lenti hücre hattı puromycin baskısı altında idame edilmeye devam etmiştir. K562-Ir hücreleri DEU.HSI.PhD- 2010970090 nolu doktora tezi kapsamında imatinibe maruziyet sonucu oluşturulmuş imatinib-dirençli hücre hattıdır. Bu kapsamda yapılan çalışmada, dirençli hücreler ile K562 kıyaslandığında, 1640 adet genin ekspresyonunun değiştiği ve yüzey moleküllerinin de farklı olduğu tespit edilmiştir. K562 blast fazında bulunan bir kadın hastadan elde edilmiş, kimlik kartı tanımlanmış ve standart bir hücre hattıdır. K562-Ir hücre hattı ise, yukarıda belirtilen nedenlerden dolayı stabil tanımlanmış bir hat değildir ve iki hücre hattı arasındaki stabil transfeksiyonda oluşan bu dramatik farkın gen ekspresyonu ve yüzey molekülleri ile ilgili olabileceğini düşündürmektedir.

Lentiviral transfeksiyon sonrasında işaretli hücrelerin bulundukları hücre popülasyonlarından seçilimi, transfekte edildikleri lentivirüste bulunan puromycin direnç geni sayesinde yapılmış ve antibiyotik dozunun belirlendiği basamakta saptanan puromycin dozuna maruziyetle sağlanmaya çalışılmıştır. Yaptığımız deneylerde puromycin dozu son konsantrasyonu 4 ug/ml olarak saptanmıştır. K562-lenti hücreleri idamesinde bu puromycin dozu yeterli gelmiştir ve seleksiyon başarıyla tamamlanmıştır. Ancak K562-Ir-lenti hücre hattında yapılan akım sitometri ve FACS çalışmaları sonuçları nedeniyle, puromycin dozu 10 ug/ml'e arttırılmış, en son aşamada ise puromycin son konsantrasyonu 100 ul/ml' de %90' lara varan GFP+'liği elde edilmiştir. Tüm bu bilgiler ışığında, yukarıda belirtilen sebeplere ek olarak, dirençli hücreler arasında zamanla puromycine dirençli alt populasyonların oluştuğunu düşünmekteyiz.

KML'de xenograft modeler ile yapılan in vivo çalışmalar incelendiğinde, kullanılan fare türü ve aşılanan hücre inokülasyon sayılarının oldukça değişken olduğu göze çarpmaktadır. KML'de subkutan xenograft model çalışma sayısı, intravenöz yoldan hücre inokulasyonu ile kıyaslandığında oldukça sınırlıdır. Bu çalışmaların bazıları NOD/SCID yada SCID fareler ile yürütülürken, bazı çalışmalar BALB/C nu/nu yada Taconic fareler ile yapılmıştır. Genel olarak, literatürler incelendiğinde, aşılanan K562 hücre sayılarının $1x10^6$ ile

$5x10^7$ arasında geniş bir yelpazede yeraldığı görülmektedir. Ortalama hücre sayılarının ise fare başına $5x10^6$ olduğu söylenebilir[47,48,49,50]. Kronik myeloid lösemi kök hücre hattı üretimi ile ilgili Üniversitemizin yayınladığı bir makalede ise 21 haftalık dişi atimik nude farelere, K562 ve K562/IMA-3(imatinib dirençli) $1x10^6$ hücre aşılandığı ve hayvanlarda 2 hafta sonra tümör oluşumu gözlendiği belirtilmiştir[51].

Dirençli hücrelerimizde puromycine dirençli alt populasyonların ortaya çıkması, hücre hattı idamesi sırasında GFP+ hücre populasyonunun zamanla azalması ve FACS cihazı ile hücre ayrımlama yönteminin bu hücreler üzerinde yarattığı stress nedeniyle yaşanan hücre kayıpları, atimik farelere $1x10^6$ hücre aşılanmasına neden olmuştur. Bu nedenle, hücre inokulasyonunu takiben 0. Gün,8.gün,7.hafta ve 8.hafta görüntüleme çalışmaları yapılmış ve 8 hafta boyunca K562- PBS, K562-Ir-PBS ve K562-Ir- imatinib deney gruplarında palpable tümör oluşumu olup olmadığı takip edilmiştir. 8. haftanın sonunda yapılan IVIS görüntüleme ile K562-imatinib , K562-Ir-PBS ve K562-Ir-imatinib deney gruplarından elde edilen veriler, aşılanan dirençli hücrelerin, doku içerisine lokalize olmadığı, palpable tümör oluşturmak yerine, deri altından tümör hücrelerinin hayvanların çeşitli vücut bölgelerine yayıldığı izlenimini vermektedir . K562-PBS grubunda 8. Gün ve 8. Hafta karın görüntülemesi haricinde sinyal gözükmemektedir. DEU.HSI.PhD- 2010970090 nolu doktora tezi kapsamında, in vitro hücre kültürü çalışmaları sırasında K562-Ir hücrelerinin imatinibten bağımsız olarak, K562 atasal hücrelerinden 4 kat daha yavaş çoğaldığı tespit edilmiştir. Ancak in vivo atimik nude farelerde K562-Ir- PBS ve K562-Ir-imatinib deney gruplarında elde ettiğimiz veriler K562-imatinib grubunun verileriyle bulgularda da bahsedilen nedenlerden ötürü kıyaslanamamaktadır. Sadece K562-PBS deney grubu verisi ile K562-Ir-PBS verisi kıyaslandığında ise in vitro da tespit edilen proliferasyon farkının tersine işaret ettiğini söylemek mümkündür. K562-Ir hücreleri canlı sistem altında öngördüğümüz şekilde, köken aldıkları atasal hücrelerden farklı davranış sergiliyor gibi gözükmektedir. Hayvanlara inokule edilen hücre sayısının görece düşük olması bu deneylerin verilerini yorumlamayı güçleştirmektedir. Örneğin literatürde K562'nin subkutan palbaple tümör oluşturduğu bilinmesine ragmen, K562-PBS deney grubunda beklenen tümör gelişimi olmamıştır. Ek olarak, none ve 3 X 3 görüntülemeler arasındaki dramatik farkın artefakt kaynaklı olup olmadığının belirlenmesi yorumlamayı değiştirecektir. Çalışmamızın son basamağı olan histopatolojik inceleme ve lösemik kök hücre belirteçlerinin araştırması halen devam

etmektedir. Araştırmamız hakkında net yanıtlar hayvanlardan toplanan doku ve organlarda histapatolojik incelemelerden elde edilen veriler ile yapılabilecektir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmalarımız sonucunda, imatinib dirençli hücrelerimizin lentivirüs ile stabil transfeksiyonunda yaşanan güçlükler, zamanla puromycine direnç geliştirdiğini düşündüğümüz alt populasyonların ortaya çıkması, in vivo atimik nude farelerde farklı görüntüleme verileri elde edilmesi nedeniyle in vivo subkutan fare deneylerimizin daha yüksek hücre sayılarıyla tekrar edilmesi gerekliliği olduğunu düşünmekteyiz. Ancak histopatalojiden gelecek sonuçların değerlendirilmesi ve buna göre sonuçların yeniden gözden geçirilmesi gerekecektir. Bu tez çalışmasının devamında, sekonder direnç geliştiren hastalardan alınan myeloid hücrelerin, K562- Ir hücreleri ile in vitro ve in vivo xenograft yada diğer çeşitli hayvan modellerinde kıyaslanması KML'de relapsların daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayabilir.

7. KAYNAKLAR

1. Hanlon K. Chronic myeloid leukaemia Key points. Medicine (Baltimore). 2017:1-5. doi:10.1016/j.mpmed.2017.02.004
2. Chasseriau J, Rivet J, Bilan F, et al. Characterization of the different BCR-ABL transcripts with a single multiplex RT-PCR. *J Mol Diagnostics*. 2004;6(4):343-347. doi:10.1016/S1525-1578(10)60530-2.
3. Faderl, S ; Talpaz, M. ;Estrov, Z.; O'Brien, S.;Kurzrock, R.; Kantarjian HM. Review Articles Mechanisms of Disease. *N Engl J Med*. 1999.
4. Clarke CJ, Holyoake TL. Preclinical approaches in chronic myeloid leukemia: from cells to systems. *Exp Hematol*. 2017;47:13-23. doi:10.1016/j.exphem.2016.11.005
5. Chereda B, Melo J V. Natural course and biology of CML. *Ann Hematol*. 2015;94(2):107-121. doi:10.1007/s00277-015-2325-z
6. Quintás-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2009;113(8):1619-1630. doi:10.1182/blood-2008-03-144790
7. DeVita Jr. V, Rosenberg SA, Hellman S. DeVita - Cancer : Principles and Practice of Oncology. 2001;(July).
8. Westbrook CA, Rubin CM, Bernards A, Baltimore D, Paskind M. The first intron in the human c-abl gene is at least 200 kilobases long and is a target for translocations in chronic myelogenous leukemia. *Mol Cell Biol*. 2015;7(9):3231-3236. doi:10.1128/mcb.7.9.3231.
9. De Braekeleer E, Douet-Guilbert N, Rowe D, et al. ABL1 fusion genes in hematological malignancies: A review. *Eur J Haematol*. 2011;86(5):361-371. doi:10.1111/j.1600-0609.2011.01586.x.
10. Laurent E, Talpaz M, Kantarjian H, Kurzrock R. The BCR gene and Philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer Res*. 2001;61(6):2343-2355.
11. Zhou H, Xu R. Leukemia stem cells: the root of chronic myeloid leukemia. *Protein Cell*. 2015;6(6):403-412. doi:10.1007/s13238-015-0143-7.
12. Enzmann V. Embryonic Stem Cells & Adult Stem Cells. *Princ Tissue Eng*. 2011;740:1-36. doi:10.1016/B978-0-12-370615-7.50034-2
13. Holyoake TL, Vetrie D. The chronic myeloid leukemia stem cell: Stemming the tide of persistence. *Blood*. 2017;129(12):1595-1606. doi:10.1182/blood-2016-09-696013
14. Carla Di Stefano GM. Cancer Stem Cells in Chronic Myelogenous Leukemia. *J Leuk*.

2015;02(05):1-7. doi:10.4172/2329-6917.1000159.

15. Kavalerchik E, Goff D, Jamieson CHM: Chronic myeloid leukemia stem cells. J Clin Oncol, 26: 2911-2915, 2008.
16. Jamieson CH, Ailles LE, Dylla SJ, Muijtjens M, Jones C, Zehnder JL, Gotlib J, Li K, Manz MG, Keating A, Sawyers CL, Weissman IL: Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML. N Engl J Med, 351: 657-667, 2004
17. McKean S, Ross JJ, Brotman DJ, Ginsberg JS, Principles and Practice of Hospital Medicine, www.accessmedicine.com
18. Casolari DA, Melo J V. Chronic myeloid leukaemia. *Chromosom Translocat Genome Rearrange Cancer*. 2015;385(9976):107-138. doi:10.1007/978-3-319-19983-2_7.
19. Hochhaus A, Saussele S, Rosti G, et al. Chronic myeloid leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2017;28(Supplement 4):iv41-iv51. doi:10.1093/annonc/mdx219.
20. Savona M, Talpaz M. Getting to the stem of chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2008;8(5):341-350. doi:10.1038/nrc2368.
21. Hamad A, Sahli Z, Sabban M El, Mouteirik M, Nasr R. Emerging Therapeutic Strategies for Targeting Chronic Myeloid Leukemia Stem Cells. 2013;2013.
22. Estrov Z.,et al.,Supression of chronic myelogeous leukemia colony growth by interleukin-4.*Leukemia* 7,214-226, 1993.
23. Apperley JF. Seminar Chronic myeloid leukaemia. 2014;370. doi:10.1016/S0140-6736(13)62120-0.
24. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. *Am J Hematol*. 2018;93(3):442-459. doi:10.1002/ajh.25011.
25. Saglio G, Cortes J, Gambacorti-Passerini C, et al. Chronic myeloid leukemia: reminiscences and dreams. *Haematologica*. 2016;101(5):541-558. doi:10.3324/haematol.2015.139337.
26. Liu LX, Weller PF. Review Article. Drug Therapy. Antiparasitic Drugs. *New Engl J Med*. 2002;334(18):1178-1184. doi:10.1111/anae.12900.
27. Kaeda JS, Rudoltz MS, Wehrle E, et al. Long-term prognostic significance of early molecular response to imatinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: an analysis from the International Randomized Study of Interferon and STI571 (IRIS). *Blood*. 2010;116(19):3758-3765. doi:10.1182/blood-2010-03-273979.

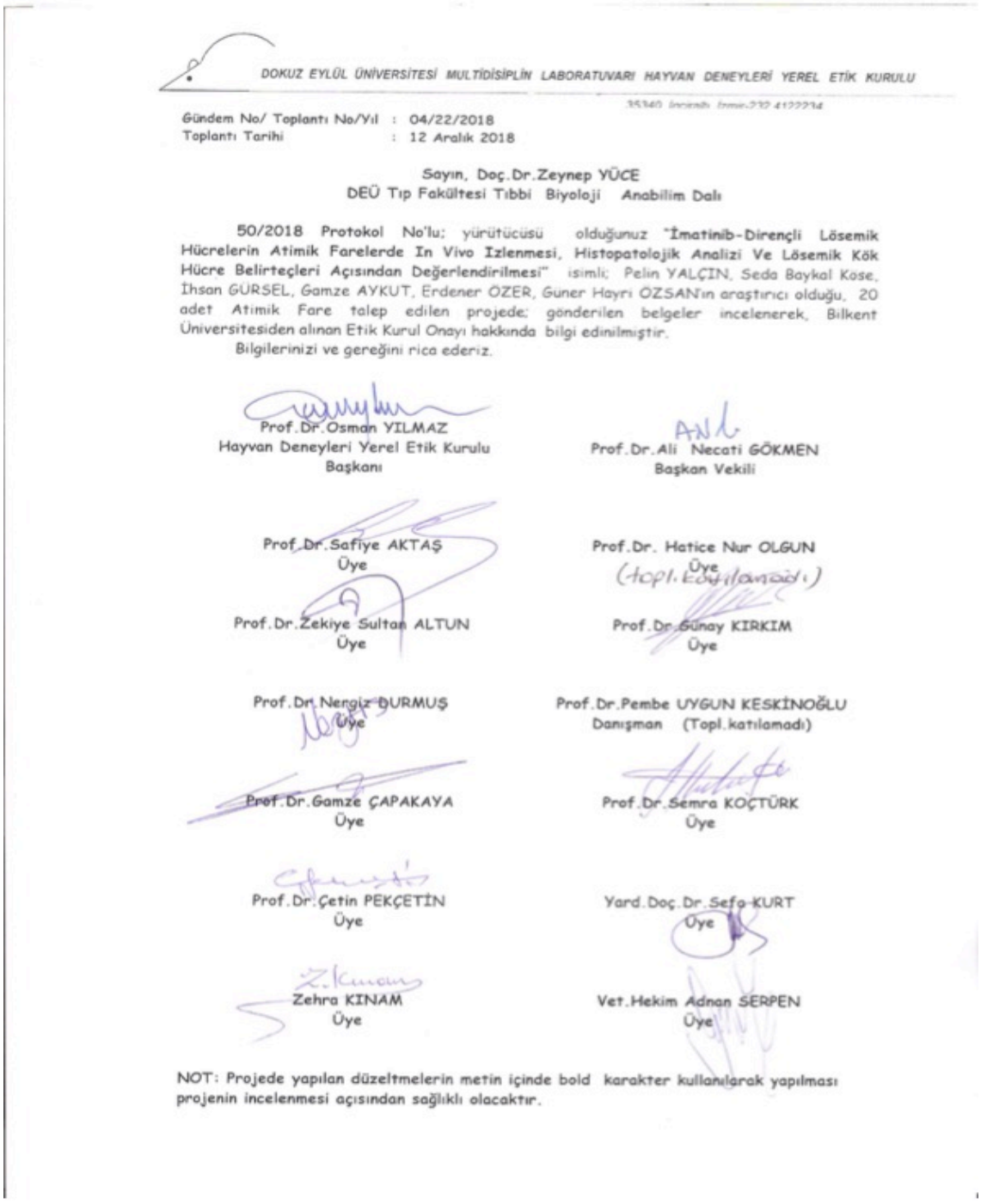
28. Burchert A. Roots of imatinib resistance: A question of self-renewal? *Drug Resist Updat*. 2007;10(4-5):152-161. doi:10.1016/j.drup.2007.06.001.
29. Hochhaus A, Kreil S, Corbin AS, et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia*. 2002;16(11):2190-2196. doi:10.1038/sj.leu.2402741.
30. Tamai M, Inukai T, Kojika S, et al. T315I mutation of BCR-ABL1 into human Philadelphia chromosome-positive leukemia cell lines by homologous recombination using the CRISPR/Cas9 system. *Sci Rep*. 2018;8(1):1-12. doi:10.1038/s41598-018-27767-6.
31. Hamilton A, Helgason GV, Schemionek M, et al. Chronic myeloid leukemia stem cells are not dependent on Bcr-Abl kinase activity for their survival. *Blood*. 2012;119(6):1501-1510. doi:10.1182/blood-2010-12-326843.
32. Carla Di Stefano GM. Cancer Stem Cells in Chronic Myelogenous Leukemia. *J Leuk*. 2015;02(05):1-7. doi:10.4172/2329-6917.1000159.
33. John DE. The history of the stem cell field offers pointers for future research on cancer stem cells. *Nat Biotechnol*. 2009;27(1):13-18. doi:10.1038/mt.2008.213.
34. Holyoake TL, Vetrie D. The chronic myeloid leukemia stem cell: Stemming the tide of persistence. *Blood*. 2017;129(12):1595-1606. doi:10.1182/blood-2016-09-696013.
35. Van Etten RA. Models of chronic myeloid leukemia. *Curr Oncol Rep*. 2001;3(3):228-237. doi:10.1007/s11912-001-0055-y.
36. Ma WX, Ma N, Chen XH, Zhang YY, Zhang WQ. An overview of chronic myeloid leukemia and its animal models. *Sci China Life Sci*. 2015;58(12):1202-1208. doi:10.1007/s11427-015-4965-6.
37. Köse Baykal S.,*Kronik Myeloid Hücre Hattında Tirozin Kinaz İnhibitörlerine Karşı Direnç Mekanizmalarının Araştırılması*.Doktora Tezi, 2018
38. National Cheng Kung University, *IVIS imaging system*, 2019(http://www.ncku.edu.tw/animal/pdf/IVIS.pdf)
39. Carceles-Cordon, M., Rodriguez-Fernandez, I., Rodriguez-Bravo, V., Cordon-Cardo, C. and Domingo-Domenech, J. (2016). *In vivo* Bioluminescence Imaging of Luciferase-labeled Cancer Cells. *Bio-protocol* 6(6): e1762.
40. Amsbio data sheet, Ready-to-use Lentiviral Particles for Fluorescent Proteins. (http://www.amsbio.com/datasheets/Ready-to-

use_Lentiviral_Particles_for_Fluorescent_Proteins_-_AMSBIO.pdf)

41. Amsbio data sheet, Ready- to- use Lentiviral Expression Particles for Luciferase (Firefly , Gaussia , Renilla and Cypridina). (http://www.amsbio.com/datasheets/Ready-to-use_Lentiviral_Particles_for_Luciferase_Expression.pdf) :1-12.
42. Gürgün V HAK. Biyolüminessens Yöntemi 1. (7):1990.
43. Ay C., Cantürk Z., Flow sitometrinin mikrobiyoloji alanında kullanımı. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi,2015. 30(3):144-151.
44. Perkin Elmer, manual. Cell preparation and imaging protocol. (https://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/TCH_invivo_bioware_subcutaneous.pdf)
45. Aykul S, Martinez-Hackert E. Determination of half-maximal inhibitory concentration using biosensor-based protein interaction analysis, *Analytical Biochemistry*, 2016; (508): 97-103
46. Cattoglio C, Facchini G, Sartori D, et al. Hot spots of retroviral integration in human CD34+ hematopoietic cells. *Blood.*2007 Sep 15;110(6):1770-1778
47. Katia Beider et al.Combination of Imatinib with CXCR4 Antagonist BKT140 Overcomes the Protective Effect of Stroma and Targets CML In Vitro and In Vivo.1156 Mol Cancer Ther; 13(5) May 2014)
48. Athanasios P. Glekas et al. In Vivo Imaging of Bcr-Abl Overexpressing Tumors with a Radiolabeled Imatinib Analog as an Imaging Surrogate for Imatinib. J Nucl Med 2011; 52:1301–1307
49. Yan-lin WEI et al. Berbamine exhibits potent antitumor effects on imatinib-resistant CML cells in vitro and in vivo. Acta Pharmacologica Sinica (2009) 30: 451–457)
50. Beatriz Sanchez-Sanchez et al. NADPH Oxidases as Therapeutic Targets in Chronic Myelogenous Leukemia Clin Cancer Res; 20(15); 4014–25.)
51. Ozturk S. et al. Chronic Myeloid Leukemia Stem Cell Line Production. Journal of Cancer Stem Cell Research (2017), 5:e1002)

8. EKLER

8.1. Ek1: 9 Eylül Üniversitesi Etik Kurul



DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ MULTİDİSİPLİN LABORATUVARI HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 04/22/2018
Toplantı Tarihi : 12 Aralık 2018

Sayın, Doç.Dr.Zeynep YÜCE
DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

50/2018 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "İmatinib-Dirençli Lösemik Hücrelerin Atimik Farelerde In Vivo Izlenmesi, Histopatolojik Analizi Ve Lösemik Kök Hücre Belirteçleri Açısından Değerlendirilmesi" isimli; Pelin YALÇIN, Seda Baykal Kose, Ihsan GÜRSEL, Gamze AYKUT, Erdener ÖZER, Güner Hayri ÖZSAN'ın araştırıcı olduğu, 20 adet Atimik Fare talep edilen projede; gönderilen belgeler incelenerek, Bilkent Üniversitesiden alınan Etik Kurul Onayı hakkında bilgi edinilmiştir.

Bılgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı

Prof.Dr.Ali Necati GÖKMEN
Başkan Vekili

Prof.Dr.Safiye AKTAŞ
Üye

Prof.Dr. Hatice Nur OLGUN
Üye
(Topl.katılamadı)

Prof.Dr.Zekiye Sultan ALTUN
Üye

Prof.Dr.Günay KIRKIM
Üye

Prof.Dr.Nergiz DURMUŞ
Üye

Prof.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Danışman (Topl.katılamadı)

Prof.Dr.Gamze ÇAPAKAYA
Üye

Prof.Dr.Semra KOÇTÜRK
Üye

Prof.Dr.Çetin PEKÇETİN
Üye

Yard.Doç.Dr.Sefa KURT
Üye

Zehra KINAM
Üye

Vet.Hekim Adnan SERPEN
Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde bold karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

8.2. Ek2-Bilkent Üniversitesi Etik Kurul



Bilkent Üniversitesi
Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

BİLKENT ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİH : 5.12.2018
TOPLANTI NO : 7
DOSYA NO : 34
KARAR NO : 2018/34

Doç.Dr. Zeynep Yüce'nin proje yürütücüsü olduğu "İmatinib-dirençli lösemik hücrelerin atimik farelerde in vivo izlenmesi, histopatolojik analizi ve lösemik kök hücre belirteçleri açısından değerlendirilmesi" başlıklı araştırma deney protokolü Bilkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nda incelenmiş, yapılan inceleme sonucunda çalışmanın Bilkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak onaylanmasına katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir. Prof.Dr. İhsan Gürsel ve Dr.Gamze Aykut projedeki görevi gereği toplantıya katılmamış ve oy kullanmamıştır.

İhsan Gürsel (Başkan) (Katılmadı ve oy kullanmadı)

Ergin Atalar (Üye)

Michelle Adams (Üye)

Can Akçalı (Üye)

Gamze Aykut (Üye) (Katılmadı ve oy kullanmadı)

Necdet Karadoğan (Üye)

Bilkent Üniversitesi, 06800 Bilkent, Ankara • Telefon: (312) 266 50 81 • Faks: (312) 266 50 97 • e-posta: bilmbg@fen.bilkent.edu.tr

8.3. Ek3: Pelin Yalçin Arbis Özgeçmiş



PELİN YALÇIN

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Kimlik Numarası	28408796318
Doğum Tarihi	30/03/1981
İletişim Adresi	Mithatpaşa Cad. No:1606 Inciraltı Sağlık Yerleşkesi Balçova/izmir
Telefon	(533) 338 02 44
E-posta	pelin_karadag@yahoo.com
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri

03 Eylül 2016 - Şu Anda (2 yıl 9 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK (YL) (TEZLİ)
Diploma Numarası: -
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.85 / 4.0

06 Ağustos 2015 - 01 Ağustos 2018 (3 yıl)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, İZMİR EKONOMİ ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
İLETİŞİM FAKÜLTESİ, MEDYA VE İLETİŞİM PR. (İNGİLİZCE) (%25 BURSLU)
Diploma Numarası: -

03 Eylül 1998 - 05 Temmuz 2002 (3 yıl 11 ay)
Lisans, İkinci Öğretim, MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
BİYOLOJİ BÖLÜMÜ, BİYOLOJİ PR. (İÖ)
Diploma Numarası: 235
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 63.45 / 100.0