

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KRONİK MYELOİD LÖSEMİ
HÜCRE HATTINDA
TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİNE KARŞI
DİRENÇ MEKANİZMALARININ
ARAŞTIRILMASI**

SEDA BAYKAL KÖSE

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK
DOKTORA TEZİ

İZMİR-2018

DEU.HSI.PhD-2010970090

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KRONİK MYELOİD LÖSEMİ
HÜCRE HATTINDA
TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİNE KARŞI
DİRENÇ MEKANİZMALARININ
ARAŞTIRILMASI**

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK

DOKTORA TEZİ

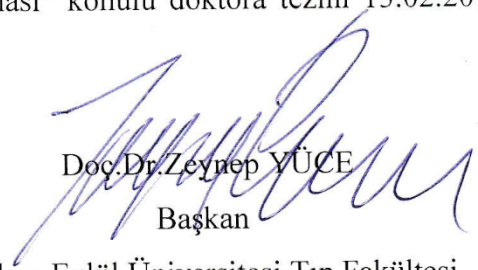
SEDA BAYKAL KÖSE

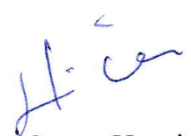
Danışman Öğretim Üyesi: Doç.Dr. Zeynep YÜCE

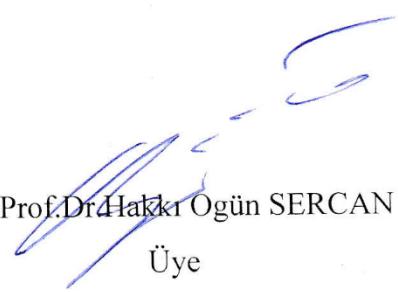
(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2012.KB.SAG.092 sayı ile desteklenmiştir)

DEU.HSI.PhD-2010970090

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Doktora Programı öğrencisi Seda BAYKAL KÖSE “Kronik Myeloid Lösemi Hücre Hattında Tirozin Kinaz İnhibitörlerine Karşı Direnç Mekanizmalarının Araştırılması” konulu doktora tezini 13.02.2018 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.


Doç.Dr.Zeynep YÜCE
Başkan
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi


Prof.Dr.Güner Hayri ÖZSAN
Üye
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi


Prof.Dr.Hakkı Ogün SERCAN
Üye
Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi


Prof.Dr.Batu ERMAN
Üye
Sabancı Üniversitesi
Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi


Prof.Dr.Osman Uğur SEZERMAN
Üye
Acıbadem Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Prof.Dr.Gülperi ÖKTEM
Yedek Üye
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi

Doç.Dr.Güneş ÖZHAN BAYKAN
Yedek Üye
Dokuz Eylül Üniversitesi-İBG

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLO DİZİNİ.....	v
ŞEKİL DİZİNİ.....	vi
KISALTMALAR	ix
TEŞEKKÜR.....	x
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1.GİRİŞ ve AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1 HEMATOPOEZ	6
2.2 LÖSEMİLER	8
2.2.1 Kronik Myeloid Lösemi (KML): Tanım ve Klinik.....	9
2.2.2 Kronik Myeloid Lösemi: Moleküler Biyolojisi	10
2.2.2.1. c-ABL geni	10
2.2.2.2 BCR geni	11
2.2.2.3 BCR-ABL füzyon geni.....	11
2.2.3 Kronik Myeloid Lösemi: Tedavi.....	14
2.2.3.1 Tirozin Kinaz İnhibitörleri ve KML’de kullanımı	16
2.2.3.1.1 İmatinib Direnci ve Direncin Moleküler Mekanizması.....	17
2.2.3.1.2 İkinci ve Üçüncü Nesil Tirozin Kinaz İnhibitörleri	20
2.3 FENOTİPİK ESNEKLİK, FARKLILAŞMA VE KÖK HÜCRE	22
2.3.1 Kanser Kök Hücresi	25
2.3.1.1 KML Kök Hücresi ve İlaç Direnci	26
3. GEREÇ ve YÖNTEM	29
3.1. ARAŞTIRMANIN TİPİ	29
3.2 ARAŞTIRMANIN YERİ VE ZAMANI	29
3.3 ARAŞTIRMANIN EVRENİ VE ÖRNEKLEMİ/ ÇALIŞMA GRUPLARI	29
3.4 ÇALIŞMA MATERYALİ.....	29
3.5 ARAŞTIRMANIN DEĞİŞKENLERİ.....	29
3.6 VERİ TOPLAMA ARAÇLARI	29
3.6.1 Hücre Hattı ve Hücre Kültürü	29
3.6.1.1 K-562 Hücre hattı	29

3.6.1.2 K562-İr hücre hattı ve Eldesi.....	30
3.6.1.3 Besi Ortamı Hazırlanması:	36
3.6.1.4 Hücre Dondurma Ortamı ve Dondurma Yöntemi:	36
3.6.2 Kullanılan Tirozin Kinaz İnhibitörleri	36
3.6.3 Hücre Ölümü Yöntemleri.....	37
3.6.3.1 Tripan Mavisı Canlılık Testi.....	37
3.6.3.2 Akış Sitometrisi (Flow cytometry) ile Annexin V/Mitokondrial membran potansiyeli ölçümü.....	38
3.6.4 Hücre Canlılık Testi	39
3.6.4.1 WST-1/WST-8 yöntemi	39
3.6.5 K562-İr Hücrelerinde Yeni Nesil Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin Uygulanması.....	40
3.6.5.1 Klinik Doz TKİ Uygulaması	40
3.6.5.2 Yüksek Doz TKİ Uygulaması	40
3.6.6 Abl Proteini Kinaz Bölgesinde Mutasyon Taraması.....	41
3.6.6.1 RNA İzolasyonu	41
3.6.6.1.1 RNA Miktarı Tayini	43
3.6.6.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR/PZR).....	44
3.6.7 Proliferasyon Deneyleri.....	47
3.6.7.1 Proliferasyon Hız Ölçümü	47
3.6.7.2 Hücre Döngüsü Deneyi	48
3.6.7.2.1 Senkronizasyon:	48
3.6.7.2.2 DNA Miktarının Akım Sitometrisi İle Ölçülmesi	48
3.6.8 FISH Yöntemi	49
3.6.9 Hücre Hattı Karakterizasyonu	50
3.6.10 Western Blot Yöntemiyle Protein Düzeyinde Gen Ekspresyonu Tayini	51
3.6.10.1. Hücre Lizatının Hazırlanması.....	52
3.6.10.2 Protein Konsantrasyon Ölçümü.....	52
3.6.10.3 SDS-PAGE Jel Elektroföresi	53
3.6.10.4 Jelden Membrana Islak Yöntem ile Protein Transferi (Wet Transfer).....	54
3.6.10.5 Blotlama Yöntemi:	55
3.6.10.6 Deteksiyon Yöntemi:	55
3.6.11 Akım Sitometrisi İle Yüzey Belirteçlerinin Tayini	56
3.6.12 İmmünfloresan Yöntemi İle Protein Düzeyinde Gen Ekspresyonu Tayini.....	60
3.6.13 Senesens Deneyi.....	61

3.6.14 Farklılaştırma Deneyleri.....	62
3.6.14.1 Adiposit Farklılaştırma Yöntemi:	62
3.6.14.1a Oil Red Boyama:	63
3.6.14.2 Osteosit Farklılaştırma Yöntemi:	63
3.6.14.2a Alizarin Red Boyama	64
3.6.14.2b Akım sitometrisi	65
3.6.15 Gen Ekspresyonu Mikrodizin (Microarray) Analizi	65
3.6.15.1 Mikrodizin Analizinin Yorumlanmasında İnternet Tabanlı Biyoinformatik Araçların Kullanılması	66
3.6.16 Kantitatif PCR.....	67
3.6.16.1 RNA Eldesi.....	67
3.6.16.2 cDNA Sentezi	68
3.6.16.3 Q-PCR	68
3.6.17 MikroRNA (miRNA) Mikrodizin Analizi	72
3.6.17.1 RNA Eldesi:.....	72
3.6.17.2 Kültür Hücrelerinden Total RNA'nın İzolasyonu:	73
3.6.17.3 RNA Miktarı Tayini	74
3.6.18 Üç-Boyutlu Hücre Kültürü.....	74
3.6.18.1 Agarlı Ortam Hazırlanması.....	74
3.6.18.2 Uygulama	75
3.7 ARAŞTIRMA PLANI VE TAKVİMİ	75
3.8 VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ	76
3.9 ARAŞTIRMANIN SINIRLILIKLARI.....	77
3.10 ETİK KURUL ONAYI.....	77
4. BULGULAR	78
4.1 Oluşturulan K562-İr Hücreleri İmatinib ve Yeni Nesil Tirozin Kinaz İnhibitörlerine Dirençlidir	78
4.1.1 Klinik Doz TKİ Uygulamaları	79
4.1.2 Yüksek Doz TKİ Uygulamaları	81
4.2 Abl Proteini Kinaz Bölgesinde Mutasyon Taraması	82
4.2.1 Sekans Analizi ve Karşılaştırma	85
4.3 K562 ile K562-İr Hücrelerinde Bcr-Abl Gen Amplifikasyonu Açısından Farklılık Bulunmamaktadır.....	89
4.3.1 FISH Bulguları	90

4.3.2 Q-PCR Bulguları	90
4.4 K562-Ir Hücrelerinde İmatinib Hücre İçine Alınıyor ve Atasal K562 Hücrelerinde Olduğu gibi Bcr-Abl Sinyal İleti Yolağını Baskılıyor	91
4.5 K562-Ir Hücrelerinde Apoptoz ile İlişkilendirilmiş Bcl-2, Bim ve RIP1 protein Düzeyleri Azalmıştır.....	93
4.6 İmatinib Baskısı Altında Çoğalan K562-Ir Hücreleri Morfolojik Plastisite Gösteriyorlar	94
4.6.1 Hücrelerin K562 Kökenli Olduklarının Gösterilmesi	96
4.7 Dirençli K562-Ir Hücrelerinin Proliferasyon Hızı K562 Hücrelerinden Dört Kat Daha Yavaştır	96
4.8 K562-Ir Hücreleri Doksorubisinle İndüklenmiş Senesense Dirençlidir	98
4.9 K562-Ir hücreleri Yarı-katı Ortamda Tümör Sferoidi Oluşturmaktadır	100
4.10 K562-Ir Hücrelerinde E-kaderin Gen İfadesi Artmıştır.....	101
4.11 K562-Ir Hücrelerinin Yüzey Belirteçlerinin Analizi Hematopoetik Hücre Özelliklerini Kaybettiklerini Göstermektedir	102
4.12 Mikrodizin (microarray) mRNA Ekspresyon Analizi Sonucu Fenotipik Plastisiteyi Desteklemektedir	104
4.12.1 Heatmap (Isı haritası) Analizi	105
4.12.2 Grupların Gen İfadesi Açısından Karşılaştırmaları.....	107
4.12.3 İnternet Tabanlı Biyoinformatik Araçların Kullanımıyla Mikrodizin Analizi.....	109
4.12.4 Venn Diyagramları	114
4.13 Mikrodizin Analizi Sonuçları Rasgele Seçilmiş Genlerde Yapılan Q-PCR Analizi ile Doğrulandı	118
4.14 K562-Ir Hücrelerinde CD44 Proteini Yüksek Düzeyde İfade Edilmektedir	119
4.15 K562-Ir Hücrelerinde Caveolin-1 Proteini Yüksek Düzeyde İfade Edilmektedir.....	121
4.15 miRNA Mikrodizin Analizi Sonuçları.....	122
4.16 K562-Ir Hücrelerini Farklılaştırma Deneyleri	123
5.TARTIŞMA.....	127
5.1 BULGU TARTIŞMASI.....	127
5.2 LİTERATÜR TARTIŞMASI	134
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	140
7. KAYNAKLAR.....	141
EK1.....	153

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Lösemi sınıflandırması	7
Tablo 2: Mikrodizin analizinin kantitatif PCR ile doğrulaması için kullanılan primer dizileri	69
Tablo 3: BCR-ABL Q-PCR koşulları	72
Tablo 4: Araştırma planı ve takvimi	75
Tablo 5: : Farklı zamanlarda yapılmış üç-tekrarlı kantitatif PCR Ct oranları	91
Tablo 6: Mikrodizinleme için gönderilen grupların kısaltmaları ve açıklamaları.....	104
Tablo 7: Gen ifadesi karşılaştırma kategorileri	108
Tablo 8: K562 ve imatinibli ortamdaki K562-Ir arasında (K ile Ir+i) farklı ifade olan 1640 genin dört ayrı çevrimiçi platformda ilişkilendirme analizi karşılaştırması.....	110
Tablo 9: K562 ve imatinibsiz ortamdaki K562-Ir arasında (K ile Ir) farklı ifade olan 1346 genin dört ayrı çevrimiçi platformda ilişkilendirme analizi karşılaştırması	111
Tablo 10: İmatinibli ortamdaki yüzen ve yapışan hücreler arasında (Ir+i ile M) farklı ifade olan 56 genin dört ayrı çevrimiçi platformda ilişkilendirme analizi karşılaştırması.....	112
Tablo 11: İmatinibli ve imatinibsiz ortamdaki dirençli hücreler arasında (Ir ile Ir+i) farklı ifade olan 259 genin dört ayrı çevrimiçi platformda ilişkilendirme analizi karşılaştırması.....	113
Tablo 12: Üç kümeli Venn diyagramının kesişim kümesindeki genler için dört ayrı çevrimiçi araçla yapılan Biological Process gen ontoloji karşılaştırma tablosu	115
Tablo 13: İkili Venn diyagramının (K ile Ir/ Kile Ir+i) kesişim kümesindeki genlerin dört ayrı çevrimiçi araçla yapılan Biological Process gen ontoloji karşılaştırma tablosu	116
Tablo 14: İkili Venn diyagramının (K ile Ir/ Kile Ir+i) kesişim kümesi dışında kalan genlerin dört ayrı çevrimiçi araçla yapılan Biological Process gen ontoloji karşılaştırma tablosu	117

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Hematopoez şeması.	7
Şekil 2: t(9;22)(q34;q11) resiprokal translokasyonunun şematik anlatımı	10
Şekil 3: ABL ve BCR gen kırılma bölgeleri ve bazı farklı kırılma bölgelerinin kodladıkları olası Bcr-Abl füzyon proteinleri.	12
Şekil 4: KML’de sinyal iletim yolları.....	13
Şekil 5: İmatinib’in işlev mekanizması.	16
Şekil 6: İmatinib direncinin mekanizması.....	18
Şekil 7: A. Abl kinaz alanında rapor edilmiş nokta mutasyonlarının bölgelere göre dağılımı. B. Abl ve İmatinib kompleksinin üç boyutlu gösterimi.....	19
Şekil 8: Bcr-abl kinaz domeyni mutasyonları, bulundukları bölgeler ve tirozin kinaz inhibitörlerin IC50 değerlerine göre etki katlarının tablosu.	19
Şekil 9: Waddington epigenetik zemin modeli üzerinde farklılaşma basamaklarının şematize gösterimi.	23
Şekil 10: Waddington epigenetik zeminde olabilecek hücre değişimleri.	24
Şekil 11: KML’de progresyon mekanizması modeli	26
Şekil 12: Kronik faz KML hastalarının TKİ kullanımında 5 yıllık tedavi yolculukları.....	28
Şekil 13: K562 hücrelerinden klonal seçilim yoluyla imatinib-dirençli K562-Ir alt-klonunun elde edilmesi	35
Şekil 14: abl gölgesi için planlanan sekanslama tekniğinin özeti	44
Şekil 15: Adiposit farklılaştırma yöntemi deney planı.....	63
Şekil 16: Osteosit farklılaştırma yöntemi ve akım sitometrisi ile tayini deney planı.....	64
Şekil 17: BCR-ABL primer bilgisi.....	71
Şekil 18: K562-Ir hücrelerine nilotinib, dasatinib, bosutinib ve imatinib maksimum plazma konsantrasyon uygulamaları sonrası tripan mavisi canlılık testi sonuç grafiği.	79
Şekil 19: K562 ve K562-Ir hücrelerinde 1nM, 1,5nM ve 137nM (Cmax) dozlarda ponatinib uygulamasının 24, 48 ve 72 saatlik tripan mavisi canlılık testi sonuç grafiği.....	80
Şekil 20: : K562-Ir hücrelerinde GNF-2 IC50 konsantrasyon uygulamasının tripan mavisi canlılık testi sonuç grafiği.....	80

Şekil 21: Yüksek doz TKİ uygulamaları akım sitometri sonuçları.	82
Şekil 22: Yüksek doz TKİ uygulama tripan mavisi sonuç grafiği.	82
Şekil 23: TKİ direncine neden olan mutasyonlar listesi.....	83
Şekil 24: HEK hücre hattı Abl kinaz bölgesi PCR sonrası jel görüntüsü.	84
Şekil 25: Atasal ve dirençli hücrelerde Abl kinaz bölgesi PCR sonrası jel görüntüsü.....	84
Şekil 26: Abl kinaz bölgesinden bir kesit sekanslama örneği.	85
Şekil 27: Abl kinaz bölgesinin P1 parçasının kontrol grubu ve dirençli grupta sekans karşılaştırması..	86
Şekil 28: Abl kinaz bölgesi P2 parçasının kontrol ve dirençli grupta sekans karşılaştırması.	87
Şekil 29: Abl kinaz bölgesi P3 parçasının kontrol ve dirençli grupta sekans karşılaştırması.	88
Şekil 30: Abl kinaz bölgesi P4 parçasının kontrol ve dirençli grupta sekans karşılaştırması.	89
Şekil 31: FISH yöntemi uygulanmış atasal ve dirençli hücre fotoğraflarından seçilmiş örnekler.	90
Şekil 32: Atasal ve dirençli hücrelerde Bcr-Abl ve alt-akış proteinlerinin Western blot görüntüsü.	92
Şekil 33: K562 ve K562-Ir hücrelerinin Bcl-2, Bim ve RIP ifadelerinin Western blot görüntüleri.	93
Şekil 34: (A)K562 ve (B)K562-Ir hücrelerinin kameralı inverted mikroskop kullanılarak çekilmiş görüntüleri.....	95
Şekil 35: Atasal ve dirençli hücrelerin köken analizi.....	96
Şekil 36: K562 ve K562-Ir hücrelerinde hücre döngüsü deney bulguları.....	97
Şekil 37: K562, imatinibsiz ortamda K562-Ir ve 10µM imatinib varlığında çoğalan K562-Ir hücrelerinin 72 saatlik proliferasyon grafiği.	98
Şekil 38: Senesens deneyi yapılmış hücrelerin ters bakışlı (inverted) ışık mikroskobu altındaki görüntüleri.....	99
Şekil 39: K562 ve K562-Ir hücrelerinin 3-boyutlu kültür ortamında 2 günde bir çekilen seçilmiş görüntüleri.....	101
Şekil 40: K562-Ir hücrelerinin 3-boyutlu kültür ortamındaki sferoid oluşumlarının çap ortalamaları grafiği.....	101
Şekil 41: K562 ve K562-Ir hücrelerinde e-kaderin immünfluoresan görüntüleri	102
Şekil 42: Atasal ve dirençli hücrelerin yüzey belirteçleri akım sitometri sinyallerinin karşılaştırma grafikleri.....	104

Şekil 43: K, Ir, Ir+i ve M gruplarının ısı haritası (heatmap)..	106
Şekil 44: Rasgele yakınlaştırılmış ısı haritası görüntüsü.....	107
Şekil 45: K ve Ir+i grubunun FEG listesinden bir kesitin ekran görüntüsü.	109
Şekil 46: GOrilla online sayfasında K ve Ir+i arasında FEG listesinde yer alan genlerin <i>Biological Process Gene Ontology Enrichment</i> analizinden ekran görüntü kesiti.	110
Şekil 47: M, Ir+i ve Ir hücrelerinin atasal K562 hücrelerinden farklı olarak eksprese ettiği genleri temsil eden üç kümeli Venn diyagramı.....	114
Şekil 48: Ir+i ve Ir hücrelerinin atasal K562 hücrelerinden farklı olarak eksprese ettiği genleri temsil eden iki kümeli Venn diyagramı	116
Şekil 49: mRNA mikrodizileme sonuçlarından rasgele seçilmiş genlerin Q-PCR doğrulama sonuçları.	119
Şekil 50: CD44 Western blot görüntüsü. B-actin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır	120
Şekil 51: K562 ve K562-Ir hücreleri arasındaki CD44 ekspresyon farkı.	121
Şekil 52: Caveolin-1 Western blot görüntüsü.	121
Şekil 53: K562 ve K562-Ir örneklerinin miRNA mikrodizin iki tekrarlı ısı haritası (heatmap)..	122
Şekil 54: 3T3L1 hücrelerinin adiposit farklılaştırması kontrol deneyi.....	124
Şekil 55: Atasal ve dirençli hücrelerde adiposit farklılaştırma deneyi.....	125
Şekil 56: Atasal ve dirençli hücrelerde osteost farklılaştırma deneyleri Alizarin kırmızısı boyama sonuçları.	125
Şekil 57: Atasal ve dirençli hücrelerde osteost farklılaştırma deneyleri akım sitometri sonuçları.	126
Şekil 58: KML ilaç direncinde “Adaptif Fenotipik Kayma” modeli.	139

KISALTMALAR

AFK.....Adaptif Fenotipik Kayma

AML.....Akut Myeloid Lösemi

ALLAkut Lenfoblastik Lösemi

CD.....Cluster of Differentiation

Bp/Bç.....Baz pair/ Baz çifti

EMT.....Epitelyal Mezenkimal Tranzisyon

FISH.....Fluorescence in situ Hybridisation

FEG..... Farklı Eksprese olan Genler

HKH.....Hematopoetik Kök Hücre

KLL.....Kronik Lenfoblastik Lösemi

KML..... Kronik Myeloid Lösemi

KKH..... Kanser Kök Hücresi

LKH.....Lösemik Kök Hücre

MET.....Mezenkimal Epitelyal Tranzisyon

MKH.....Mezenkimal Kök Hücre

Ph.....Philadelphia kromozomu

TKİ.....Tirozin Kinaz İnhibitörleri

Q-PCR.....Quantitatif Polymerase Chain Reaction/ Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi birikimime katkılarından dolayı başta Doç.Dr. Zeynep Yüce ve tüm Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilimdalı öğretim üyelerine teşekkür ederim. Danışmanım Doç.Dr. Zeynep Yüce'ye her an herşeyi danışma fırsatı verdiği ve eğitici tartışma ortamı sunduğu için, her zaman bir çıkış yolu gösterdiği ve yarattığı için, laboratuvarında sağladığı çalışma olanakları için, ilgisi ve pozitif iletişimi için sonsuz teşekkür ederim. Laboratuvardaki çalışma arkadaşlarım Öykü Gönül Geyik ve Hande Efe'ye dostlukları ve bilimsel paylaşımları için teşekkür ederim. Yüksek lisans ve doktora tezlerim süresince akım sitometrisi konusundaki yardımları için Halil Ateş'e, üç-boyutlu kültür tekniklerindeki yardımları için Prof.Dr.Gülperi Öktem ve doktora öğrencisi Eda Açıkgöz'e, mikrodizin analizlerindeki yardımları için Prof.Dr.Osman Uğur Sezerman ve doktora öğrencisi Ahmet Sinan Yavuz'a teşekkür ederim. Doktora çalışmalarım boyunca yaptıkları katkılar için Prof.Dr. Hayri Güner Özsan ve Prof.Dr.Hakkı Ogün Sercan'a teşekkür ederim. Bilgi paylaşımları ile eğitimime katkı sağlayan Prof.Dr.Batu Erman'a teşekkür ederim. Bütün eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi destekleri için başta anneme, babama, eşime ve tüm aileme teşekkür ederim.

ÖZET

Kronik Myeloid Lösemi Hücre Hattında Tirozin Kinaz İnhibitörlerine Karşı Direnç Mekanizmalarının Araştırılması

Seda Baykal Köse, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İnciraltı İzmir/Türkiye, seda.baykal@yahoo.com

Kronik myeloid lösemi (KML), kimerik Bcr-Abl onkoproteininin sentezlenmesinden sorumlu t(9;22)(q34;q11) translokasyonu ile karakterize bir hematopoetik kök hücre hastalığıdır. KML tedavisinde, imatinib gibi tirozin kinaz inhibitörlerinin Bcr-abl'in işlevini engelleyerek sağladıkları önemli başarıya rağmen ilaç direnci bugün hala hastaların %20-30'unu etkileyen ciddi ve belki de en önemli sorundur.

İlaç direncinin altında yatan sebepleri anlamak üzere *in vitro* olarak tasarlanan çalışmalarımızı, laboratuvarımızda daha önce imatinib baskısı altında doğal seçimle elde ettiğimiz, BCR-ABL mutasyonu/amplifikasyonu bulunmayan, yaşam sinyalleri Bcr-Abl'den bağımsız, tirozin kinaz inhibitörlerine dirençli bir K562 alt-klonu (K562-Ir) üzerinde yaptık. Tez kapsamında hücre ölümü çalışmaları, senesens çalışmaları, akım sitometrisi ile yüzey belirteç molekülleri taraması, üç-boyutlu hücre kültürü çalışmaları, farklı TKİ'lerle dozaj denemeleri, proliferasyon deneyleri, Western blot, immünofluoresans teknikleri ile gen ifadesi çalışmaları, hücre farklılaştırma deneyleri, mRNA mikrodizin (transkriptom) analizi, Q-PCR ile amplifikasyon varlığının saptanması ve ekspresyon doğrulama çalışmaları, microRNA mikrodizin analizi gerçekleştirildi.

K562-Ir hücrelerinin atasal hücrelerden farklı olarak *yapışkan (adherent)* özellik kazandığı gözlemlendi. Dirençli hücrelerin daha yavaş çoğaldıkları, tedavide kullanılan TKİ'lerden imatinib'e olduğu kadar nilotinib, dasatinib, bosutinib ve ponatinib'e de dirençli oldukları; hücre ölüm sinyallerinin azaldığı, embriyonik yüzey markerları kazandıkları, birçok hücre-doku-organ farklılaşmasında rol oynayan genleri yeniden regüle ettikleri; üç boyutlu hücre kültürü ortamında tümör sferoidleri oluşturabildikleri gözlemlendi. Ayrıca ilaç direnci, hücre çoğalması, apoptoz direnci, hücre farklılaşmasından sorumlu tutulan mikroRNA'ların ifadesinde artış olduğu izlendi.

Tüm verilerimiz bir arada değerlendirildiğinde, lösemik popülasyondaki bazı hücrelerde imatinib yanıtının transkripsiyonel instabilite ile sonuçlanmasıyla fenotipik adaptasyon gösteren, Bcr-Abl-bağımsız, agresif bir popülasyonun ortaya çıktığını ileri süren yeni bir TKİ direnç modeli sunulmuştur.

Anahtar Sözcükler: KML, imatinib, ilaç direnci, TKİ, plastisite, adaptif fenotipik kayma, adaptif esneklik



ABSTRACT

Investigation of Resistance Mechanisms Against Tyrosine Kinase Inhibitors in Chronic Myeloid Leukemia Cell Line

Seda Baykal Köse, Dokuz Eylül University Medical School, Medical Biology Department, İnciraltı İzmir/Turkey, seda.baykal@yahoo.com

Chronic myeloid leukemia (CML) is a hematopoietic stem cell disease characterized by the t(9;22)(q34;q11) translocation resulting in the chimeric BCR-ABL oncogene. Despite the significant success of tyrosine kinase inhibitors (such as imatinib) inhibiting Bcr-Abl oncoprotein function in the treatment of CML, drug resistance is still a serious and maybe the most important problem affecting 20-30% of patients.

Our *in vitro* studies are designed using a TKI resistant K562 subclone (K562-Ir) which does not harbour any BCR-ABL amplification or kinase domain mutation. The K562-Ir subclone was developed in our laboratory by natural selection under imatinib pressure, to understand the underlying causes of drug resistance. We performed immunofluorescence, Western blot and mRNA microarray (transcriptome) techniques for gene expression analyses; three-dimensional cell culture studies; cell differentiation experiments; different TKIs applications with cell death analysis; flow cytometric cell membrane marker screening; proliferation assays; senescence assays; Q-PCR for amplification and expression confirmation studies.

We observed that unlike K562 wild type cells, K562-Ir cells were adherent and resistant to nilotinib, dasatinib, bosutinib and ponatinib in addition to imatinib. K562-Ir cells are more resistant to cell death and proliferate slowly. They are capable of forming tumor spheroids in three-dimensional cell culture studies. We also showed a significant differences in the expression of genes that regulate cell-tissue-organ differentiation and development processes in K562-Ir cells. There is an increase in the expression of embryonic and cancer stem cell surface markers. There is also an increase in the expression of microRNAs that regulate the expression of genes involving cell differentiation, drug resistance, proliferation and apoptosis resistance.

In conclusion, we present a new TKI resistance model suggesting that under imatinib stress a sub-clone of the leukemic cells develop transcriptional instability resulting in a Bcr-Abl-independent/aggressive population with phenotypic adaptation capacity.

Keywords: CML, imatinib, drug resistance, TKI, plasticity, adaptive phenotypic shift, adaptive plasticity



1.GİRİŞ ve AMAC

KML patogenezinin temelinde, hematopoetik kök hücresinde gerçekleşen t(9;22)(q34;q11) translokasyonu ve bunun sonucu oluşan BCR-ABL kimerik geni yer alır. Hastalık, Bcr-Abl onko-proteininin sorumlu olduğu kontrolsüz bir myeloproliferasyon ile karakterizedir. Tedavi edilmeyen olgularda zaman içerisinde progresyon gözlenir. Ek somatik mutasyonlarla hücreler farklılaşma yeteneklerini giderek kaybederler. Hastalık ilerledikçe, başlangıçta gözlenen lösemik hücre/normal hücre oranı, lösemik hücrelerin lehine artar. Hastalığın ilerleme mekanizması oldukça karmaşıktır ve hastalığın davranışı her hasta için farklı seyretmektedir. Tedavi gören bazı hastalar, kronik fazda 20 yıla kadar yaşayabilmekteyken; bazı hastalarda KML tablosu tedaviye rağmen birkaç ay içinde ilerleyebilmektedir. Genel olarak bakıldığında hastalar arasındaki bu heterojen tablo, BCR-ABL⁺ klonun translokasyondan önce veya sonra edindiği genetik anomalilere, gen ifadesi paternleri arasındaki kişisel farklılıklara, DNA hasarı, epigenetik değişimler gibi yaşla birlikte gelişen hematopoezi etkileyebilecek birçok faktöre bağlıdır. Bugün altın standart olarak kabul edilen tedavi yöntemi, 2012 yılında FDA onayı ile kullanıma giren başta imatinib olmak üzere tirozin kinaz inhibitörlerinin (TKİ) kullanımınıdır. TKİ bugün KML'yi, pek çok hasta için kronik bir hastalığa dönüştürmeyi başarsa da ilaç direnci, bugün hala hastaların %20-30'unu etkileyen, tedavilere yanıtızsızlık ve ölümlerle sonuçlanabilen ciddi ve belki de en önemli sorundur.

Doktora projem kapsamında, daha önceki yıllarda laboratuvarımızda K562 insan lösemik hücre hattından klonal seçimle elde ettiğimiz imatinib dirençli K562-Ir hücre hattı KML'de ilaç direncinin *in vitro* modeli olarak kullanıldı. Geliştirmiş olduğumuz K562-Ir hücre hattında imatinib baskısı altında morfolojik ve fenotipik değişiklikler izlendi. Hipotezimiz KML'de izlenen imatinib ve diğer TKİ direncinin temelinde bu fenotipik esnekliğin yer aldığıdır. Çalışmalarımızla KML ve ilaç direnci biyolojisine katkı sağlamak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Lösemi, kemik iliğinde üretilen beyaz kan hücrelerinin kanseridir. Normal kan hücrelerinin üretim süreci (hematopoez), kemik iliğinde bulunan kök hücrelerin, çok sıkı kontrol edilen çoğalma ve farklılaşmasını gerektirir. Lösemiler ise “öncül” kan hücrelerinden birinin, çeşitli genetik bozuklukların zemininde, farklılaşma sürecinin bir basamağında duraklaması ve kontrolsüz olarak çoğalmaya başlamasıyla ortaya çıkmaktadır. Lösemi patogenezi daha iyi anlayabilmek için öncelikle normal kan hücrelerinin üretim sürecine göz atmamız gerekir.

2.1 HEMATOPOEZ

Kan, işlev ve morfoloji olarak birbirinden çok farklı hücreler barındırır. Çekirdeksiz *eritrositler*, hemoglobin sayesinde dokulara oksijen taşımakla sorumludurlar. *Plateletler* (trombositler) hemostaz ve pıhtılaşmadan sorumlu çok küçük hücrelerdir. *Granülositler* (*nötrofil*, *eozinofil*, *bazofil*) ve *monositler* dokularda fagositöz ve inflamasyonda görev alırlar. Lenfositler, antikor üretiminden sorumlu *B lenfositler*, kendilerine diğer hücrelerin MHC kompleksleri tarafından sunulan yabancı antijenleri barındıran hücreleri öldüren *T lenfositler* ve patojen ve tümör hücrelere karşı litik etki gösteren “*doğal öldürücü hücreler (natural killers NK hücreleri)*” olarak üçe ayrılır. Tüm bu farklılıklarına rağmen kan hücreleri, tek bir hematopoetik kök hücrenden (HKH) köken alırlar. Hematopoetik hücreler, kemik iliğindeki kök hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasıyla meydana gelirler. *Hematopoez* de denilen bu süreç oldukça dinamiktir¹. Çevresel uyarılar, ortamda bulunan sitokin, hormon ve büyüme faktörlerine cevaben HKH, myeloid veya lenfoid birincil öncül (progenitör) hücresine farklılaşır. Bu myeloid veya lenfoid öncüller, alt hücre tiplerine farklılaşma potansiyeline sahiptirler. Moleküler uyarılara bağlı olarak lenfoid progenitör çoğalır ve T lenfosit, B lenfosit veya NK (natural killer) hücrelerine farklılaşır. Benzer şekilde myeloid progenitör ise granülosit, monosit, eritrosit veya megakaryosit serileri oluşturacak şekilde farklılaşır (Şekil 1). Bu farklılaşma ve hücre çoğalması, kemik iliğindeki stromal hücreler ve hücre dışı matriks tarafından kontrol edilir. SCF, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, TPO, EPO, TGF, IL-3, IL-6, IL-2, IL-7, IL-12, IL-1 gibi büyüme faktörleri ve sitokinler yardımıyla hücreler giderek özelleşmiş karakter kazanır ve olgunlaşırlar^{2,3}. Hücrelerin yaşam süreleri birbirlerinden farklıdır ve dolayısıyla erken embriyonik dönemde başlayan hematopoez hayat boyu devam eder⁴.

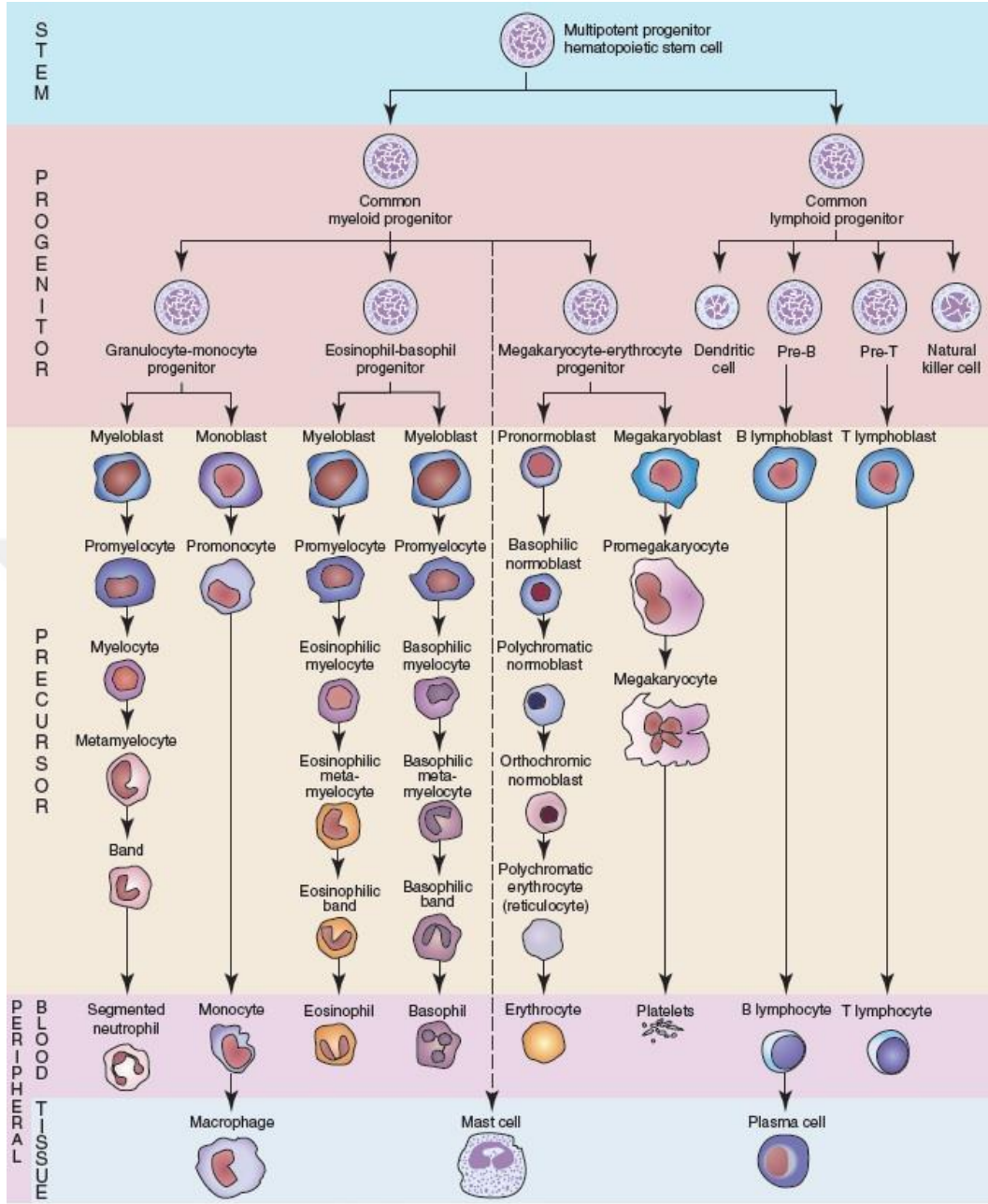


FIGURE 2-1 Chart of hematopoiesis.

Şekil 1: Hematopoez şeması. Üstteki mavi bölge kök hücreleri, turuncu bölge birincil öncül hücreleri (progenitörler), sarı bölge ikincil öncül hücreleri (prekürsörler) göstermektedir. En altta pembe ve maviyle gösterilmiş bölgelerde farklılaşmasını tamamlamış, olgun kan hücreleri gösterilmiştir. Pembe bölgedeki hücreler dolaşım kanında, mavi bölgedeki hücreler dokularda işlev göstermektedir. (Rodak, B. F. & Carr, J. H. Clinical hematology atlas)

Tezimizde kullandığımız K562 lösemik hücre hattı myeloid-eritroid kökenlidir (ATCC® CCL-243™).

2.2 LÖSEMİLER

Geleneksel olarak lösemiler, tutulan hücre tipi ve progresyon hızına göre sınıflandırılır. Lösemiler progresyon hızına göre *akut* ve *kronik* olarak ayrılır. *Akut lösemilerde* kemik iliğinde olgunlaşmamış hücre kompartımanının normal hücrelere oranı çok yüksektir ve hastalığın seyri oldukça hızlıdır. Hastalarda yorgunluk, çürükler ve enfeksiyon belirtileri tipiktir. Tedavisiz yaşam süresi aylarla sınırlıdır. *Kronik lösemilerin* seyri ise yavaştır. Lösemik hücreler hematopoezdeki olgunlaşma sürecinden “kısmen” geçmiştir ancak gerekli görevleri tam olarak yerine getiremezler. Başlangıçta hastalarda hiç şikayet gözlenmeyebilir ve hastalık basit bir kan testindeki yüksek lökosit sayısı ($>10000/uL$) ile ortaya çıkabilir. Tedavi edilmez ise akut lösemilere göre yaşam süresi daha uzundur, ancak kronik lösemilerden kronik myeloid löseminin akut lösemilere, kronik lenfositik löseminin agresif lenfomalara dönüşme potansiyeli bulunmaktadır. Akut ve kronik lösemiler hematopoezde tutulan öncül hücre serisine göre *myeloid* (*myelositik*, *myeloblastik*) veya *lenfoid* (*lenfositik*, *lenfoblastik*) olarak ikiye ayrılır. Böylece basit bir sınıflandırmayla lösemilerde dört ayrı grup ortaya çıkmaktadır: akut lenfoid lösemi (ALL), kronik lenfoid lösemi (KLL), akut myeloid lösemi (AML), kronik myeloid lösemi (KML) (Tablo 1)^{5, 6}.

Tablo 1: Lösemi sınıflandırması

Tutulan hücre tipi	Akut	Kronik
Lenfoid	ALL	KLL
Myeloid	AML	KML

Bu dört ana sınıflandırmadan başka, *T-hücre lösemisi*, akut lösemilerden sayılan *myelodisplastik sendrom*, KML'nin de içinde bulunduğu myeloproliferatif hastalıklar arasında *kronik nötrofilik lösemi (KNL)*, *kronik eozinofilik lösemi*, myelodisplastik hastalıklardan sayılan *juvenil myelomonositik lösemi (JMML)*, *kronik myelomonositik lösemi (CMML)*, *atipik-KML*, KLL 'nin de içinde bulunduğu lenfoproliferatif hastalıklar sınıflandırmasında *hairy cell lösemi* diğer lösemi tipleridir^{7,8,9,10,11,12,13}.

Tezimizde model olarak kronik myeloid lösemi (KML) hücre hattını aldığımızdan, moleküler mekanizmaları daha iyi anlayabilmek adına ilerleyen bölümlerde KML ile ilgili bilgiler verilmiştir.

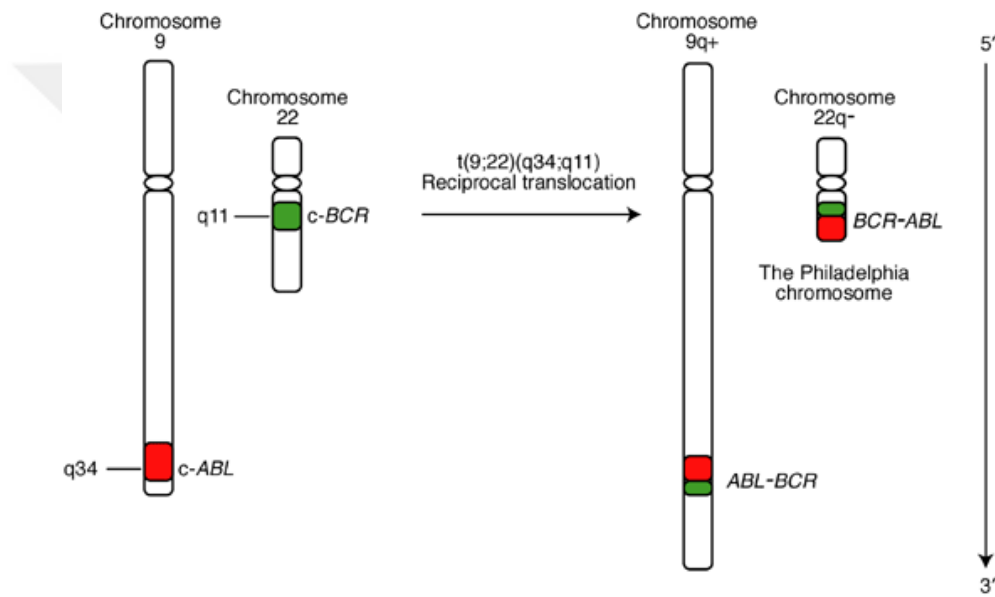
2.2.1 Kronik Myeloid Lösemi (KML): Tanım ve Klinik

Kronik myeloid lösemi, myeloid seri hücrelerinin aşırı çoğalmasıyla karakterize bir hematopoetik kök hücre hastalığıdır. Tüm lösemilerin %15 kadarını oluşturur ve yıllık insidansı 100.000/1-2 olarak izlenmektedir. Erkeklerde daha sık gözlenmekte olup; ortalama görülme yaşı 45-55'dir. KML insidansı yaşla birlikte artış gösterir. Hastaların %30'u 60 yaş üstündedir. KML vakaların çok az bir yüzdesi (yaklaşık %3 kadarı) çocukluk çağında gözlenir. Mutasyonlar germ hücre hattında olmadığından kalıtım riski yoktur.

Tedavi edilmeyen olgularda zaman içerisinde progresyon gözlenir. Ek somatik mutasyonlarla hücreler farklılaşma yeteneklerini giderek kaybederler. Hastalık ilerledikçe, başlangıçta gözlenen lösemik hücre / normal hücre oranı, lösemik hücrelerin lehine artar. KML klinik açıdan *kronik*, *akselere* (*hızlanmış*) ve *blastik* olmak üzere trifazik bir hastalıktır. Kronik fazda hastalarda fiziksel şikayetler ya yoktur ya da çok azdır. Periferik kanda ve kemik iliğinde blast oranı %10'dan azdır¹⁴. Kesin tanı, tam kan sayımında artmış lökosit sayısı ve Philadelphia kromozomu varlığı ile konur. Periferik kanda veya kemik iliğinde blastik hücre oranının %10-%19 aralığına yükselmesi, periferik kanda en az %20 bazofil oranı, hastanın tedaviye yanıtında azalma sonucu artan lökosit oranı/ splenomegali/ trombositoz/ trombositopeni, yeni kromozomal anomaliler, tirozin kinaz inhibitörlerine karşı direnç durumlarından en az birinin gözlenmesi durumunda *akselere faza* geçişten bahsedilir. Kanda ya da kemik iliğinde blastik hücre sayısının en az %20 oranında gözlenmesi ise *blastik faza* (blast krizi) işaret eder¹⁵. Blastik fazda hücreler artık kontrolsüz çoğalmakla birlikte hücre ölümüne de direnç göstermektedir. Bcr-Abl aşırı üretimi, artmış EVII gen ürünü, RB1, CDKN2A, TP53, p16 gibi tümör baskılayıcı genlerde mutasyonlar ve kromozom instabilitesi gözlenir¹⁶. Hastalarda ateş, iştah kaybı, kilo kaybı izlenir. Tedavi edilmediği takdirde tüm organlarda blast birikimi gözlenebilir. Hasta enfeksiyon, hemoraji, akciğer veya beyin trombozu vb. nedenlerle 3-6 ay içerisinde kaybedilir. Hastalığın oluşumunda etkili olan birincil genetik değişiklikler hastalığı taşıyan tüm bireylerde benzer olmakla beraber, bireylerin farklı prognoz ve tedavi yanıtları ikincil mutasyonlara bağlıdır.

2.2.2 Kronik Myeloid Lösemi: Moleküler Biyolojisi

KML'de birincil genetik anomali 9. ve 22. kromozomlarının q kolları arasında gerçekleşen bir resiprokal translokasyondur. 9. Kromozomun q34 ve 22. Kromozomun q11 bölgeleri arasında gerçekleşen bu dengeli translokasyon ($t(9;22)(q34;q11)$), Philadelphia kromozomu adı verilen derive (türemiş) kromozomu meydana getirir. Translokasyon sırasında 22. kromozomun kırılma bölgesinde yerleşik BCR geni 9. kromozomun kırılma bölgesinde yerleşik ABL geni ile birleşerek BCR-ABL kimerik genini oluşturur (Şekil 2). KML patogenezinden, bu genin sentezlediği Bcr-Abl onko-proteini sorumludur¹⁷.



Şekil 2: $t(9;22)(q34;q11)$ resiprokal translokasyonunun şematik anlatımı (Duncan L. Smith, Jhon Burtham, Anthony Whetton, Expert Reviews in Molecular Medicine, 2003, Cambridge University Press)

2.2.2.1. *c-ABL* geni

İnsanda c-Abl protoonkogeni Abelson fare lösemi virüsünde (Abelson Murine Leukemia Virus) bulunan v-ABL'nin homoloğu olarak bulunmuştur. c-ABL geni 9 no'lu kromozomun q34 bandında yerleşik ve 230 kb uzunlukta olup; 11 tane ekson içermektedir. Abelson protoonkogeni (ABL) Philadelphia kromozomunun oluşumu sırasında intron 1'den kırılmıştır. c-Abl geni hem sitoplazma hem de nukleusta saptanan ama daha çok nukleusa lokalize olan 145kDa bir reseptör olmayan protein kinazı kodlar ve fizyolojik olarak tüm insan hücrelerinde ifade edilir. Abl proteininin hücre döngüsü, DNA onarımı, stres yanıtları, integrin

sinyal iletimi, nöral gelişim ve apoptoz süreçlerinde hücre içi ve hücre dışı sinyallerin düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir^{18,19,20}.

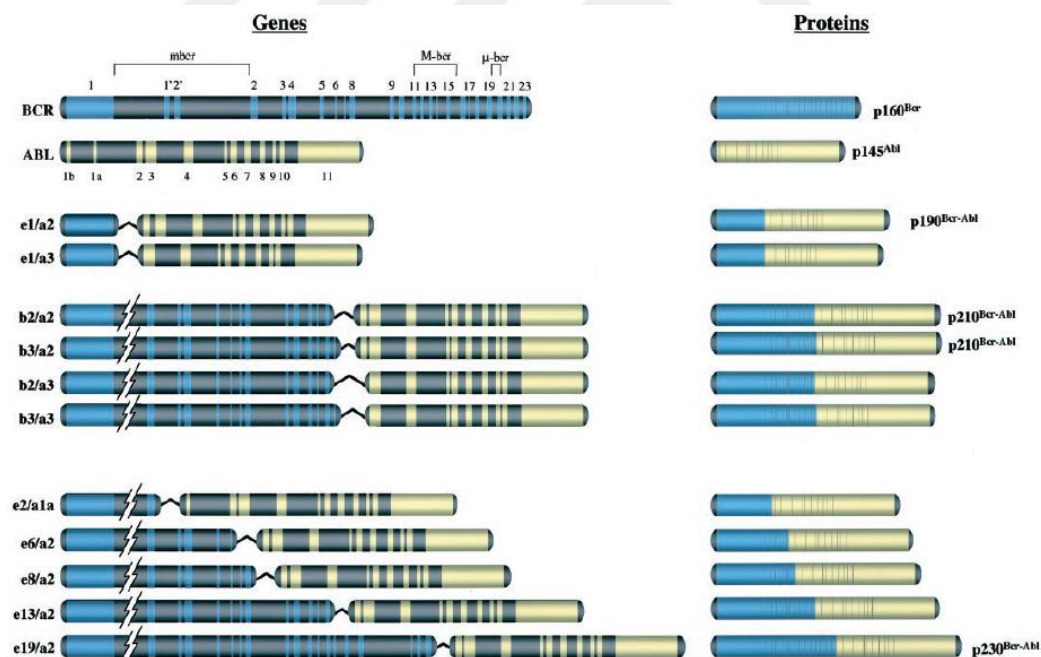
2.2.2.2 BCR geni

BCR geni 22q11'de yerleşiktir. Kinaz aktivitesine sahip 160kD'lik bir fosfoproteini kodlamaktadır. Normal hücrelerde Bcr proteini, öncelikli olarak myeloid farklılaşmasının ilk evrelerinde yoğun bir şekilde ifade edilirken; farklılaşmanın ilerleyen basamaklarında ifadesi azalır. Bu nedenle KML'de Bcr-Abl proteini sürekli yoğun ifade edildiğinden bu durumun myeloid kompartmanın farklılaşma basamaklarında sorun oluşturduğu düşünülmektedir. Bcr proteininin sitoplazmik yerleşimi olduğu bilinmektedir. Fakat yapılan çalışmalarda mitotik DNA'ya, özellikle yoğun heterokromatine bağlandığı da gösterilmiştir. XBP gibi DNA tamirinde görevli proteinlerle ilişkide olduğunu gösteren çalışmalar da vardır. İlk yıllarda Ph(+) hastalarda yapılan araştırmalarda 22. kromozomun q11 bölgesindeki kırıkların 5.8 kb'lık bir alanla sınırlı olduğu gösterilmiştir. Kırıklar intron dizileri içerisinde yer almaktadır. Gen çok sayıda kırılma bölgesi içerdiğinden "breakpoint cluster region" (bcr) adını almıştır. İlk tanımlanan kırılma bölgesi majör-BCR (M-BCR), daha sonraki yıllarda tanımlanan ikinci bölge minör-BCR (m-BCR) olarak isimlendirilmiştir. En son mikro-BCR (μ -BCR) olarak adlandırılan bir bölge daha tanımlanmıştır^{18,21,22}.

2.2.2.3 BCR-ABL füzyon geni

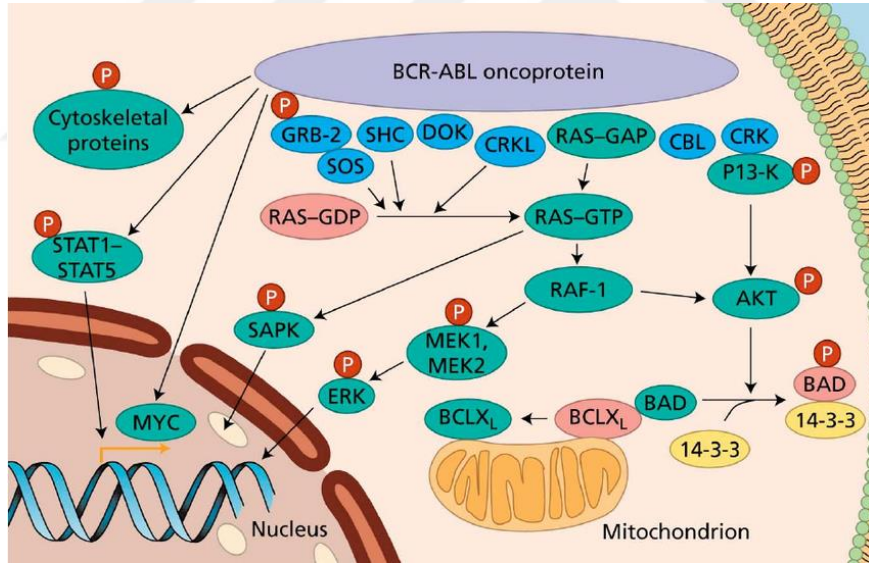
Translokasyon sırasında kromozomlar üzerindeki kırılmalar ABL geninde Ib eksonu öncesi ve Ia eksonu sonrasında herhangi bir bölgede veya daha sıklıkla bu iki eksonun arasında, BCR genindeki kırılmalar ise yukarıda bahsedildiği gibi genellikle üç bölgeyle sınırlıdır¹⁸. Füzyon sırasında ABL geninin 3' ucu BCR geninin 5' ucuna eklenir. Bu konfigürasyon füzyon genini BCR promotorunun kontrolüne sokmaktadır. BCR ve ABL genlerinin her ikisi de Alu sekansları içerir. Genler arasındaki bu yeniden düzenlenmeler sırasında çerçeve mutasyonu gözlenmez, okuma çerçevesi (open reading frame) korunmaktadır^{23,24}. 9. kromozomda ABL genindeki kırık 200kb'lık oldukça büyük bir alanda bazı hastalarda 5' uçta iki alternatif ekson (1a-1b) arasında, bazı hastalarda ise ilk intronun içinde gerçekleşir. BCR genindeki kırılma bölgeleri 1. ekson ile 2. ekson arasında, ekson 13-14 (e13-14) ekson 14-15 arasında veya ekson 19-20 arasındaki intronik bölgelerde gerçekleşir ve önceki bölümde bahsedildiği gibi bu bölgeler sırasıyla m-BCR, M-BCR ve μ -BCR olarak üçe ayrılmaktadır. M-BCR bölgesi BCR geninin orta bölümünde yerleşik b1, b2, b3, b4, b5 olarak adlandırılan, e12-16'ya karşılık gelen

BCR-ABL transkriptleri her ne kadar lösemilerin etyopatogenezinde yer alsa da t(9;22) translokasyonunun sağlıklı insanlarda da izlenebildiği ileri PCR teknikleriyle gösterilmiştir. Bu durumun hücre döngüsü sırasında iki kromozomun çok yaklaştığı S fazından G2 fazına geçerken gerçekleştiği ve hatanın immün sistem tarafından algılandığı düşünülmektedir²⁶.



12

KML’den sorumlu Bcr-Abl proteini 210 kDa boyutundadır. Kimerik proteinin Abl bölgesinde SH1, SH2 protein etkileşim bölgesi, aktin bağlanma bölgesi; Bcr bölgesinde fosforin/treonin sekansları ve tirozin barındıran sarmal-sarmal (coiled-coil) motifi proteinin işlevinde önemlidir. Bcr-abl füzyon proteininin yapısal tirozin kinaz aktivitesi çok artmıştır ve otofosforilasyonu Bcr üzerindedir. Abl’in aksine sitoplazmada lokalizedir. Bcr-abl birçok sitoplazmik substratı fosforile eder, büyüme, farklılaşma ve hematopoetik hücrelerin adezyonunu kontrol eden sinyal yollarını aktive eder. STAT (signal transducers and activators of transcription) molekülleri ve GRB-2, Crkl gibi Ras aktive edici adaptör moleküller aracılığıyla da mitojenik sinyal yollarını aktive ederek hücre proliferasyonunu artırır ve kontrolsüz büyümeye neden olur. Ayrıca aktin moleküllerine bağlanarak paxillin, talin gibi hücre iskeletinin düzenleyicilerini, FAK gibi fokal adezyon komplekslerini fosforilleyerek hücre adezyonunu değiştirir. Bcr-Abl hücreye sürekli bir yaşam sinyali sağlarken; STAT/Akt/PI63K molekülleri üzerindeki etkisiyle mitokondri üzerinden hücrelere anti-apoptotik özellik kazandırır ve proliferasyonunu artırır^{18,16} (Şekil 4) .



Şekil 4: KML’de sinyal iletim yollarları. Gen transkripsiyonunun aktivasyonu veya inhibisyonunu düzenleyen onkogenik sinyallerin, mitokondri bağımlı apoptotik yolak moleküllerinin, hücre iskelet elemanlarının Bcr-Abl molekülü ile ilişkisi anlatılmıştır. “P” harfi ile gösterilen moleküller, Bcr-Abl tarafından fosforillendiği bilinen moleküllerdir. (Mughal, Goldman, *Molecularly targeted treatment of chronic myeloid leukemia: Beyond the imatinib era*, *Frontiers in Bioscience* 11(1):209-2006)

Bcr-Abl endojen oksijen reaktiflerinin (ROS) salınımını artırarak hücre döngüsünün S ve G1/M fazlarında kronik oksidatif DNA hasarına, çift iplik kırıklarına ve sonuç olarak mutajenezeye yol açar. Birçok genin kodlanan bölgelerinde (kendisi de dahil olmak üzere) transisyon ve transversiyon baz değişimlerini indükler. Bcr-Abl proteini, ROS salınımı ve daha önce bahsedilen DNA onarımı proteinleriyle olan ilişkisiyle KML’de izlenen genomik instabilite ve sitogenetik anomalilerin sorumlusudur. Tümör süpresör genlerindeki mutasyonlar ve bu genlerin ürünleriyle olan ilişkisi hastalığın patogenezinde önemlidir. P16 ve p14 gibi tümör süpresör genlerindeki mutasyon/delesyonlar, p53’ün ifadesinde azalmaya ve G1/S fazı siklin D-cdk4/cdk6’nın inhibisyonuna yol açar. P16 homozigot delesyonu ve p53 mutasyonları çoğu blastik krizdeki hastada gözlenmektedir²⁸.

9. ve 22. kromozomlar arasındaki resiprokal translokasyon sonucu derive 9’da bulunan ABL-BCR geninin son yıllara kadar KML patogenezinde rolü olmadığı ileri sürülmüştür. ABL-BCR geninden transkribe olan ürünlerin (a1bb3- p40 ve a1bb4-p96) KML’deki rolü henüz tam olarak açığa kavuşmamıştır. Fakat yeni yapılan *in vitro* çalışmalarda bu kimerik ürünlerin de p210 Bcr-Abl gibi lökemojenik olduğu, özellikle hematopoeik kök hücrelerin çoğalmasında etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca a1bb3 ve a1bb4 transkriptlerinin CD4+ ve CD8+ T lenfositlerinde HLA-A2 tarafından sunulduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır^{29,30}.

2.2.3 Kronik Myeloid Lösemi: Tedavi

1950 yıllarında ilk KML tedavisi, alkilleyici bir ajan olan *Busulfan* (Myleran, GlaxoSmithKline) ile başlamıştır. Hastaların %90’ına yakını tedaviye cevap verse de hastalığın ilerlemesini önleyememiş, ayrıca hastalar ciddi yan etkiler yaşamışlardır. 1970 yıllarında bir ribonükleotid redüktaz inhibitörü olan *Hidroksiüre* (Hydrea, Bristol-Myers Squibb Oncology) daha hızlı etki etmesi ve busulfana göre daha iyi bir yan etki profili göstermesi sebebiyle kullanıma sokulmuştur^{31,32}. Ancak hidroksiüre de busulfan gibi hastalığın ilerlemesini önleyememiştir. 1990’ların sonlarına kadar standart tedavi olarak kullanılan bir diğer ilaç, lenfositlerden salgılanan interferon-alfa (IFN- α)’dır. IFN- α ‘nın işlevi tam olarak kesinlik kazanmamış olsa da anti-lösemik bağışıklık cevabını arttırdığı düşünülmektedir^{32,33}. IFN- α , biyolojik bir ajanın bir kanser türünü regüle edebileceğinin ilk göstergesi olması açısından önemlidir. Tirozin kinaz inhibitörlerinin tedaviye girmesinden önceki dönemlerde en önemli tedavi seçeneklerinden biri de uygun hastalarda allojenik kök hücre nakli olmuştur. 1998

yılında spesifik bir Bcr-Abl tirozin kinaz inhibitörü olan İmatinib mesilat (Gleevec, Glivec, STI571, Novartis Pharmaceuticals, Basel, İsviçre) bir ilaç olarak klinik uygulamaya girdikten sonra interferon-alfa tedavisinden daha etkili olduğu gösterilmiş, 2002 yılında FDA (Food and Drug Administration, USA) onayıyla KML tedavisinde “İmatinib Dönemi” başlamıştır³¹. İmatinib’in kullanımı, bir hastalığın başarılı tedavisinde o hastalığın moleküler mekanizmasının anlaşılmasının önemini ortaya çıkarmasından ötürü bir dönüm noktasıdır. Son dönemlerde daha etkili ikinci ve üçüncü nesil tirozin kinaz inhibitörleri (TKİ) de kullanıma girmiştir. TKİ’ler hakkında daha geniş bilgi ileriki bölümlerde anlatılacaktır. 2012 yılında FDA onayı alan bir diğer molekül *Omacetaxine* (Synrivo, Teva Oncology) isimli bir protein translayon inhibitörüdür. Omasetaksin en az iki TKİ tedavisine yanıt vermemiş veya TKİ tedavisini tolere edemeyen hastalarda kullanılmaktadır^{34,35}.

Uygulanan tedavi protokolü ne olursa olsun yanıt hematolojik yanıt (remisyon), sitogenetik yanıt ve moleküler yanıt olmak üzere başlıca üç kriter ile değerlendirilir. Hematolojik yanıtta dalak büyüklüğünün, akyuvar ve trombosit sayısının normale dönmesi esas alınmaktadır. Sitogenetik yanıtta (cytogenetic response, CyR) ise kemik iliğindeki Ph(+) hücre sayısının düşmesi yani Ph kromozomu taşıyan hücre klonunda azalma beklenir. Moleküler yanıtta (molecular response, MR) ise Q-PCR ile yapılan testlerde kemik iliğinde Bcr-Abl kimerik gen ürün miktarının düşmesi (%0.1) beklenir. Bugüne kadar kullanılan ajanlar arasında en iyi hematolojik, sitogenetik ve moleküler yanıt tirozin kinaz inhibitörüyle elde edilmiştir (imatinib için, kronik fazda %98 tam hematolojik, %57-88 tam sitogenetik yanıt, %18-58 tam moleküler yanıt)³⁶. Bu nedenle, günümüzde kullanılan ilk basamak tedavi, istisnai durumlar haricinde, tirozin kinaz inhibitörleridir.

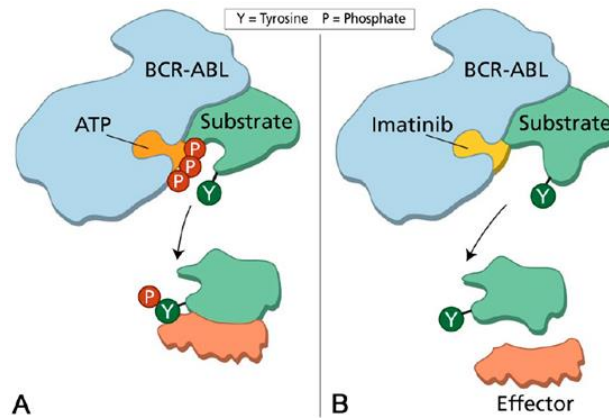
Uygulanan tedavide bu üç kriter birlikte değerlendirildiğinde istenilen ve/veya beklenen yanıt alınamadığında *allojenik kök hücre nakli (kemik iliği nakli)* gündeme gelir. Her ne kadar kemik iliği nakli tam tedavi yöntemi olarak gösterilse de yaş faktörü, uygun donör bulunmasındaki güçlükler, verimlilik ve dayanırlılık gibi faktörler uygulama alanını daraltmakta; morbidite ve mortalitenin yüksekliği nedeniyle yaygın bir tedavi yöntemi olarak kullanılamamaktadır^{37,38}.

Tezimde tirozin kinaz inhibitörleri kullandığımızdan, ilerleyen bölümlerde TKİ’ler hakkında daha detaylı bilgi verilmiştir.

2.2.3.1 Tirozin Kinaz İnhibitörleri ve KML’de kullanımı

Protein kinazlar sübstrat özgünlüğüne göre serin/treonin kinazlar ve tirozin kinazlar olarak ikiye ayrılır. Tirozin kinazlar ATP’den aldığı fosfat grubunu sübstrat proteinin tirozin rezidüsüne bağlarlar. Serin/treonin kinazlar ise sübstrattaki serin veya treoninin hidroksil grubunu fosforiller. Abl proteininde tirozin kinaz alanı, Bcr proteininde ise serin/treonin alanı bulunmaktadır. Abl proteini reseptör olmayan tirozin kinaz ailesine ait bir enzimdir ve Bcr-Abl onkoproteininde tirozin kinaz aktivitesinde gözlenen artış hücrede aşırı proliferasyona yol açar. O nedenle bu aktiviteyi düşürecek, proteine spesifik inhibitörlere ihtiyaç vardır³⁹. Son 20 yıldır, hücre biyolojisi ve moleküler biyoloji alanında yapılan çalışmalar bunu mümkün kılmıştır.

1998 yılında İmatinib, Abl tirozin kinazın ATP-yarışmalı inhibitörü olarak geliştirilmiştir (Şekil 5). 2- phenylaminopyrimidine türevidir. Hücre içinde c-Kit, PDGF-R (platelet-derived growth factor receptor) ve ARG kinazları da inhibe ettiği bilinmektedir³¹. İmatinib tüm hücrelerdeki serbest c-abl üzerinde inhibisyona yol açar. Ancak sağlıklı hücreler sinyal ileti yolları ağının diğer bileşenleriyle hayatta kalmaya devam eder. Lösemik hücreler ise Bcr-Abl’ye bağımlıdır. Bu durum tedavi açısından önemli bir silahtır. Bcr-Abl kinaz aktivitesinin durdurulması hücre döngüsünün düzenlenmesini, hücre adezyonunu, hücre iskelet organizasyonunu ve apoptotik süreci tetikleyecek genlerin transkripsiyonel düzenlenmesiyle sonuçlanır ve normal hücrelerin proliferasyonuna fırsat verir⁴⁰.



Şekil 5: İmatinib’in işlev mekanizması. A. Bcr-Abl kinaz alanına substrat protein bağlanır. ATP-ADP döngüsü sayesinde substrat protein tirozin rezidüsünden fosforillenir ve sinyal kaskadı devam eder. B. İmatinib ATP cebine bağlanmak için onunla yarışır. İmatinib ATP bölgesine bağlandığında substrat protein fosforillenemez ve kanser hücresi çoğalma sinyallerini alamaz. (Mughal, Goldman, *Molecularly targeted treatment of chronic myeloid leukemia: Beyond the imatinib era*, *Frontiers in Bioscience* 11(1):209-2006)

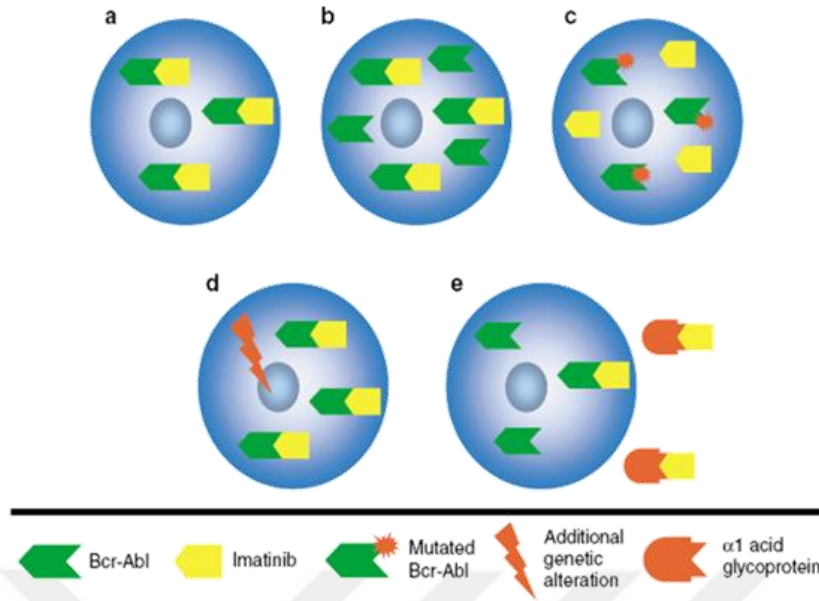
İmatinib genellikle iyi tolere edilir. Oral şekilde 400mg ilaç alındığında yarılanma ömrü 18 saattir. En yüksek plazma konsantrasyonu 5.4µM, en düşük plazma konsantrasyonu 1.43µM olarak ölçülmüştür⁴⁰.

Tirozin kinazların bağlanma bölgelerinin boyutu ve şekli bağlanacak olan ligand, ATP, ve inhibitörün seçiciliğini etkiler. Kinazların aktivasyon halkasının N-terminali katalitik aktiviteyi sağlarken C-terminali substratın bağlanması için zemin hazırlar. İmatinib, abl'ye aktivasyon halkasının N-terminali ATP-bağlanma bölgesinin içine katlanıp inaktif formunu aldığı anda bağlanabilmektedir. Bu bağlanma hidrojen ve Van der Waals bağları ile gerçekleşir. İmatinib ve Abl kompleksinin sıkı moleküler yapısı, proteinin bağlanma bölgesindeki herhangi bir değişikliğin bu yapıyı bozmasıyla engellenir. Abl kinaz bölgesinde sekonder anomaliler barındıran blast krizindeki hastalarda ilaca direncinin gelişmesine neden olur⁴¹.

2.2.3.1.1 İmatinib Direnci ve Direncin Moleküler Mekanizması

Kronik fazdaki çoğu hastada uzun süreli remisyon gözlenirse de blastik krizdeki hastaların çoğunda ilaca karşı direnç gelişmektedir. Bu durumda onkoprotein Bcr-Abl İmatinib varlığında dahi aktivitesine devam eder . Bu direnç genellikle, füzyon proteininin ABL kinaz kısmındaki ATP bağlama alanında oluşan nokta mutasyonlardan ve/veya füzyon genin amplifiye olmasından kaynaklanır.

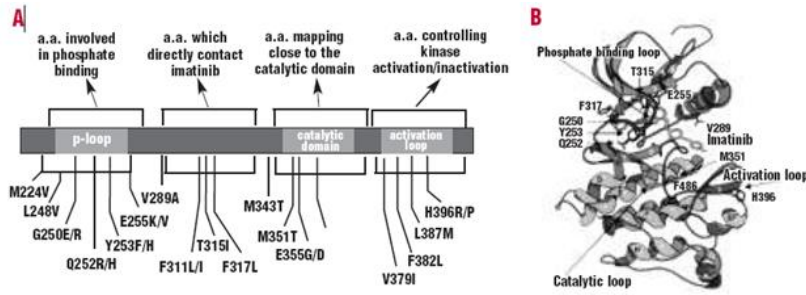
Mutasyonlar genellikle proteinin inaktif konformasyonunun aktif konformasyona dönüşmesine neden olur ve bu durum imatinibin bağlanmasının engellenmesiyle sonuçlanır. Bazen de Bcr-Abl onkoproteininden bağımsız olarak nükleus içindeki farklı genetik değişiklikler hücre proliferasyonunu artırıyor olabilir. 8. kromozomun trizomisi nedeniyle veya blast krizindeki gen amplifikasyonu MYC geninin ifadesinde de artış söz konusudur. Ayrıca albumin, alfa-1 asit glikoprotein (AGP) gibi plazma proteinlerinin hücre içindeki serbest imatinibe bağlanabildikleri gösterilmiştir. Bu proteinlerin miktarlarındaki artış ilacın inhibisyonuna neden olabilmektedir (Şekil 6). Fakat *in vitro* yapılan çalışmalarda AGP'den arındırılmış hücrelerde imatinib işlevini yerine getirememektedir. Dolayısıyla plazma proteinleri ve imatinib arasındaki ilişki tartışmalı olmakla birlikte dirençlilikte rolü olduğu düşünülmektedir⁴².



Şekil 6: İmatinib direncinin mekanizması. (a) İmatinib hücredeki tüm Bcr-Abl proteinini bloklamada yeterlidir. (b) Bcr-Abl'nin aşırı ifadesi lösemik hücrelerin İmatinibin varlığına rağmen bazal düzeyde hayatta kalmasını sağlar. (c) Abl kinaz alanındaki spesifik mutasyonlar İmatinib'e bağlanmayı engeller fakat ATP bağlanması engellenmediğinden Bcr-Abl işlevine devam etmektedir. (d) genetik instabilite ikincil mutasyonlarla lösemik hücrelerin bcr-abl den bağımsız çoğalmasını ve hayatta kalmasını sağlayabilir. (e) alfa-1 asit glikoproteinindeki artış Bcr-Abl' e bağlanacak olan serbest İmatinib miktarını düşürebilir. (Bubnoff, N. von, Peschel, C. & Duyster, J. Resistance of Philadelphia-chromosome positive leukemia towards the kinase inhibitor imatinib (STI571, Glivec): a targeted oncoprotein strikes back. *Leukemia*, (2003)

Dirençli hasta gruplarında ve dirençli hücre hatlarında yapılan çalışmalarda Bcr-Abl proteininde yaklaşık 18 farklı pozisyonda nokta mutasyonlarına rastlanmıştır. Yapılan çalışmalarda ikincil mutasyonların dört ana bölgede toplandığı görülmektedir. Bir grup mutasyon (G250E, Q252R, Y253F/H, E255K/V) ATP'nin bağlandığı fosfat-bağlanma bölgesindedir (P-loop). İkinci grup mutasyonlar (V289A, F311L, T315I, F317L) Van der Waals ve hidrojen bağlarının gerçekleştiği İmatinib bağlanma bölgesindedir. Üçüncü grup (M351T, E355G) katalitik bölgeye yakın mutasyonları içerir. Dördürüncü grup mutasyonlarda (H396R/P) ise kinazın aktive/inaktif durumunu kontrol eden aktivasyon bölgesinde olduğu bulunmuştur⁴³ (Şekil 7). Bunların arasında abl T315I mutasyonu, çoğu dirençli klonda görüldüğünden dikkat çekicidir. Proteinin 315inci pozisyonundaki treoninin izolösine dönüşmesi İmatinibe bağlanmada anahtar rol oynar. Bu değişim proteinin yan zincirinde

hidrojen bağı yerine fazladan bir hidrokarbon grubunun eklenmesine neden olur. Böylece İmatinib ile protein arasında kimyasal bir uyumsuzluk meydana gelir. Bu bağlamda normal Bcr-Abl'in otofosforilasyonunu engelleyecek konsantrasyondaki İmatinib, mutant Bcr-Abl'in fosforillenmesini engelleyememektedir. T315I, ATP afinitesini iki kat arttırmaktadır. Bu durum Abl'nin ATP bağlanma bölgesindeki mutasyonlara direnç kazanmasına katkıda bulunur. F317, F359 pozisyonlarındaki mutasyonların dirençlilik sağlamadaki rolleri T315'e benzerdir. Yapılan çalışmalar diğer mutasyonların proteinin tamamının veya aktif bölgesinin konformasyonunu değiştirerek ilacın bağlanmasını engellediklerini göstermektedir⁴².



Şekil 7: A. Abl kinaz alanında rapor edilmiş nokta mutasyonlarının bölgelere göre dağılımı. B. Abl ve İmatinib kompleksinin üç boyutlu gösterimi. (Martinelli, G., ve ark, M. New tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. *Haematologica*, 2005)

Activity of imatinib, bosutinib, dasatinib, nilotinib, ponatinib and DCC-2036 against clinically relevant mutated forms of BCR/ABL

	IC50-fold increase (WT=1)					
	Imatinib	Bosutinib	Dasatinib	Nilotinib	Ponatinib	DCC-2036
Parental	10.8	38.3	568.3	38.4	570.0	13.1
WT	1	1	1	1	1	1
M244V	0.9	0.9	2.0	1.2	3.2	0.8
L248R	14.6	22.9	12.5	30.2	6.2	0.4
L248V	3.5	3.5	5.1	2.8	3.4	1.3
G250E	6.9	4.3	4.4	4.6	6.0	3.0
Q252H	1.4	0.8	3.1	2.6	6.1	2.1
Y253F	3.6	1.0	1.6	3.2	3.7	2.3
Y253H	8.7	0.6	2.6	36.8	2.6	2.7
E255K	6.0	9.5	5.6	6.7	8.4	3.5
E255V	17.9	5.5	3.4	10.3	12.9	2.1
D276G	2.2	0.6	1.4	2.0	2.1	4.5
E279K	3.6	1.0	1.6	2.0	3.0	6.5
E292L	0.7	1.1	1.3	1.8	2.0	1.0
V299L	1.5	26.1	8.7	1.3	0.6	0.3
T315A	1.7	6.0	58.9	2.7	0.4	0.4
T315I	17.5	45.4	75.0	39.4	3.0	0.7
T315V	12.2	29.3	738.8	57.0	2.1	0.6
F317L	2.6	2.4	4.5	2.2	0.7	1.1
F317R	2.3	33.5	114.8	2.3	4.9	21.0
F317V	0.4	11.5	21.3	0.5	2.3	6.6
M343T	1.2	1.1	0.9	0.8	0.9	1.0
M351T	1.8	0.7	0.9	0.4	1.2	2.2
F359I	6.0	2.9	3.0	16.3	2.9	0.7
F359V	2.9	0.9	1.5	5.2	4.4	0.9
L384M	1.3	0.5	2.2	2.3	2.2	0.9
H396P	2.4	0.4	1.1	2.4	1.4	1.5
H396R	3.9	0.8	1.6	3.1	5.9	0.7
F486S	8.1	2.3	3.0	1.9	2.1	0.5
L248R + F359I	11.7	39.3	13.7	96.2	17.7	1.0

Sensitivity	IC50
Sensitive	≤ 2
Moderately resistant	2.1-4
Resistant	4.1-10
Highly resistant	> 10

From: Redaelli S, Mologni L, Rostagno R, Piazza R, Magistrini V, Ciccon M, Vitadi M, Flynn D, Gambacorti-Passerini C - Three novel patient-derived BCR/ABL mutants show different sensitivity to second and third generation tyrosine kinase inhibitors - Am J Hematol. 2012 Nov;87(11):E125-8

Şekil 8: Bcr-abl kinaz domeyni mutasyonları, bulundukları bölgeler ve tirozin kinaz inhibitörlerin IC50 değerlerine göre etki katlarının tablosu. (Redaelli S. Ve ark, *Journal of Clinic Oncology*, 2012)

Laboratuvarımızda klonal seçilimle elde ettiğimiz K562-Ir dirençli hattımızda, yukarıdaki kaynakta verilmiş mutasyonların barınmadığı sekans analizleriyle gösterilmiştir.

Epigenetik modifikasyonların da sürece katkıda bulunduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Histon olmayan proteinlerin asetilasyon paternlerindeki değişiklikler, lösemi gelişiminde etkili olan hücresel proliferasyonu ve apoptoz direncini kontrol etmektedir. İmatinib rezistansında, sınıf I ve III deasetilazları (HDAC)'nın aşırı ifade edilmesinin ve bazı histon asetiltransferazların ifadelerindeki azalmanın etkisi olduğu gösterilmiştir. KML hücrelerine HDCA inhibitörü SAHA uygulandığında birçok proteinin asetilasyon paterninin ve apoptotik yolağın düzenini sağladığı gösterilmiştir⁴⁴. Ancak henüz klinik olarak uygulamaya geçilmemiştir.

İmatinib tedavisine yanıtta direnç görülmesinden ve/veya bazı hastalardaki ilaç toleransının düşük olması ve önemli yan etkiler gözlenmesinden sonra ikinci ve üçüncü nesil tirozin kinaz inhibitörleri dizayn edilmiştir ve kullanıma geçmiştir.

2.2.3.1.2 İkinci ve Üçüncü Nesil Tirozin Kinaz İnhibitörleri

İmatinib'den sonra ikinci-nesil tirozin kinaz inhibitörleri olarak adlandırılan “dasatinib” (Bristol-Myers, New York, USA), “nilotinib” (Novartis, Basel, İsviçre) ve “bosutinib” (Wyeth- Pfizer, Amerika) geliştirilmiştir. Üçüncü-nesil tirozin kinazlar grubunda ise “ponatinib” (ARIAD Pharmaceuticals, USA) bulunmaktadır⁴⁵.

2006 yılında piyasaya giren Dasatinib (Sprycel, BMS-354825), IC₅₀ değeri 1nM konsantrasyonun altında c-abl'yi inhibe etme potansiyeli imatinibden 325 kat daha fazla olan bir tirozin kinaz inhibitörüdür. Bcr-Abl'nin aktif formuna bağlanır. Dasatinib aynı zamanda c-abl ile birlikte Src, Lyn, Yes1, Fyn gibi Src ailesi kinazları, EphA2 ve Pdgfr beta moleküllerini de inhibe etmektedir. T315I mutasyonu hariç diğer ikincil mutasyon barındıran KML hücrelerinde de nispeten etkilidir^{46,47}. 2008 yılında piyasaya sürülen nilotinib (Tasigna, AMN107) Bcr-Abl'in inaktif formunda ATP bağlanma bölgesine ek olarak lipofilik bir cebe daha bağlanabilmektedir. Böylelikle Bcr-Abl'nin Tyr-177 rezidüsünden oto-fosforilasyonunu da engeller. Nilotinib Bcr-Abl'in yanında Pdgfr, Kit, Csflr, Ddr1 moleküllerini de inhibe eder. Bcr-Abl'yi inhibe etme potansiyeli imatinib'den 30 kat fazladır. Nilotinib de dasatinib gibi T315I mutasyonu hariç diğer ikincil mutasyon barındıran KML hücrelerinde de nispeten

etkilidir^{48,49}. 2013 yılında kullanıma giren bosutinib (Bosulif, SKI-606) Bcr-Abl kinazın yanında Src, Lyn ve Hck gibi Src ailesi kinazları da etkin şekilde inhibe ettiği için Abl/Src inhibitörü olarak anılmaktadır. Bcr-Abl'nin aktif ve inaktif formlarına bağlanabilmektedir. V299L ve T315I mutasyonu hariç diğer ikincil mutasyon barındıran Bcr-Abl kinazlarda etkilidir⁴⁹⁻⁵¹. 2012'den beri kullanımda olan ponatinib (Iclusig, AP24534) in üçüncü-nesil tirozin kinaz inhibitörü olarak anılmasını sağlayan ve diğer inhibitörlerden farklı kılan özellik, T315I dahil bilinen tüm ikincil Bcr-Abl mutasyonlarında etkili oluşudur. Proteinin inaktif formuna bağlanır. Vegfr, Pdgfr, Fgfr, Src, EPH reseptörleri ailelerini, Kit, Ret, Tek, Flt3 proteinlerini de inhibe etmektedir^{45,49,52,53}.

Uzun yıllarca altın standart olarak kabul gören imatinib tedavisinin yanında nilotinib, dasatinib ve bosutinibin de birincil tedavide (first-line therapy, front-line therapy) kullanımları kabul görmüştür. Ponatinib ise birincil tedaviye yanıt vermeyen ve/veya diğer ilaçların kullanımında yan etki görülen, T315I ikincil kinaz mutasyonu barındıran hastalarda kullanılmaktadır. Yeni nesil tirozin kinaz inhibitörlerinin birbirlerine olan üstünlükleri, hastalığın fazına, özelliklerine, hastanın durumuna ve ilaç toleransına bağlı olarak değişmektedir⁵².

Yukarıda anlatılan kronik myeloid lösemi hastalığının genel bilgilerinden de anlaşılacağı gibi ilaç direnci halen çok önemli bir problemdir. Bu kapsamda doktora projemiz için blastik faz kronik myeloid lösemi hücre hattı K562 ve laboratuvarımızda daha önceden imatinib baskısı altında K562'den klonal seçimle elde ettiğimiz K562-Ir hücrelerini karakterize etmeye çalışarak direncin moleküler biyolojisini anlamaya yönelik çalışmalar yürüttük. K562-Ir dirençli hücrelerin imatinib baskısı altında elde edilmesi çalışmalarında, doğası gereği süspanse olan hücrelerin adherent özellik gösterdiğini gözlemlemeye başladık. Hücrelerdeki bu fenotipik değişim tezimizin odak noktası olduğundan ilerleyen bölümlerde hücre plastisitesi, kök hücre ve kanser kök hücre kavramlarının üzerinden geçilecektir.

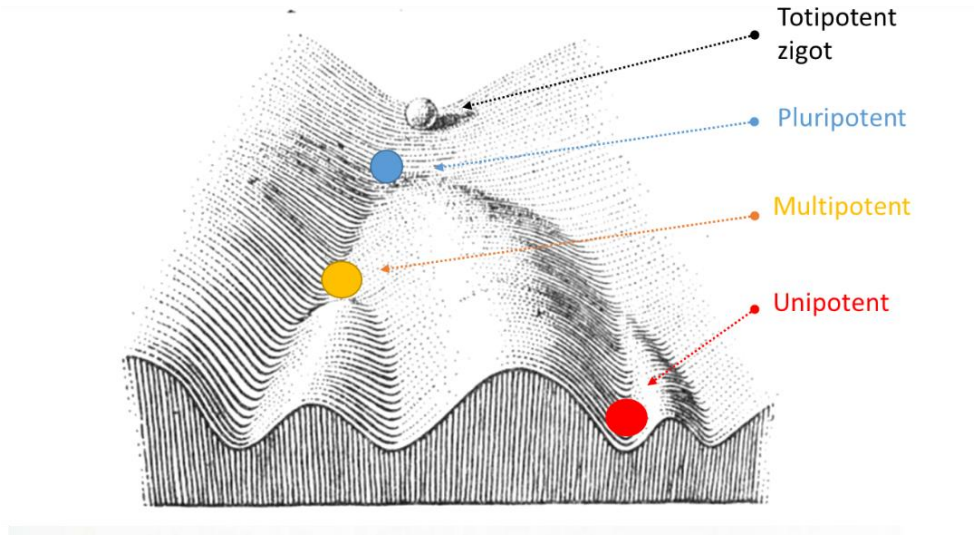
2.3 FENOTİPİK ESNEKLİK, FARKLILAŞMA VE KÖK HÜCRE

Genellikle evrim literatüründe kullanılan “fenotipik plastisite” ya da “fenotipik esneklik” terimi, çevre koşullarına cevaben bir genotipin birden fazla morfoloji, fizyolojik durum ve/veya davranışı üretme yeteneği olarak tanımlanabilir. Evrimsel perspektifte adaptif esneklik, mevcut veya oluşan genetik varyasyonlar sayesinde genotipe çoklu çevresel değişimlere karşı uyum avantajı getirmektedir. Yeni ortama adaptasyon hızı, yeni ortama uygun optimum fenotipe erişme esnekliğine sahip olma derecesine göre değişmektedir. Hücresel düzeyde bu beceri, genetik ve epigenetik mekanizmaların mevcut potansiyellerini, değişimler karşısında nasıl kullandıklarıyla ilişkilidir. Hücresel düzeyde düşünüldüğünde, bir hücre popülasyonundaki bazı hücrelerin çevresel streslere yanıt olarak fenotip değiştirmesi onlara mevcut stresle baş etmede avantaj sağlıyorsa, o hücrelerin seçilimi ile sonuçlanır⁵⁴⁻⁵⁷.

Hücre fenotipi, hücrenin içinde bulunduğu ya da bulunacağı ortam (niş, çevre) ile gen ifadesinin ilişkisi sonucu ortaya çıkar. Bu durumda “çevre”, hücre dışı matriks proteinlerinin, büyüme ve farklılaşma faktörlerinin, sitokinlerin, hücrelerarası etkileşimlerin, kimyasal, fiziksel, parakrin ve/veya otokrin tetikleyicilerin ve/veya baskılayıcıların ortaya çıkardığı biyolojik ortamdır. Fenotipik plastisiteyle ilgili en bilinen örnek kuşkusuz zigotik bölünmeden organizmanın oluşumuna kadar geçen embriyonik süreçte hücre farklılaşmalarıdır (diferansiasyon). Memeli blastositinin iç duvarındaki embriyonik kök hücreler germ hattındaki tüm katmanlara (endoderm, mezoderm, ektoderm) farklılaşabilme potansiyellerine sahiptir. Embriyonik süreçte, hücrelerdeki genler epigenetik mekanizmalarla düzenlenirler ve oluşturacakları dokuya özgü farklılaşma/olgunlaşma/özelleşme gösterirler. Embriyonik kök hücrelerde gerçekleşen kromatin düzenlenmesi, histon modifikasyonları (asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, glikozilasyon, übikitinasyon), DNA metilasyonu, imprintlenme (basılama), gen ifadesinin mRNA düzeyinde sessizleştirmeleri vb. olaylarla gerçekleşir ve bu modifikasyonlar organogenez sürecinde hücrenin kaderini belirler^{55,58,59}.

Farklılaşabilme kapasitelerine göre hücreler birkaç gruba ayrılır. Farklılaşabilme potansiyeli yüksek kapasiteden düşük kapasiteye doğru “totipotent”, “pluripotent”, “multipotent”, “oligopotent” ve “ünipotent” olarak sıralanır. Farklılaşma basamakları Şekil 9’da Waddington epigenetik zemin üzerinde hücre farklılaşması modeli temel alınarak şematize edilmiştir. İlk sıradaki “totipotent kök hücreler”, uterusu ekildiği an plasenta dahil tüm oluşturabilecek potansiyele sahip hücrelerdir. Zigot totipotent bir hücredir. İkinci sıradaki

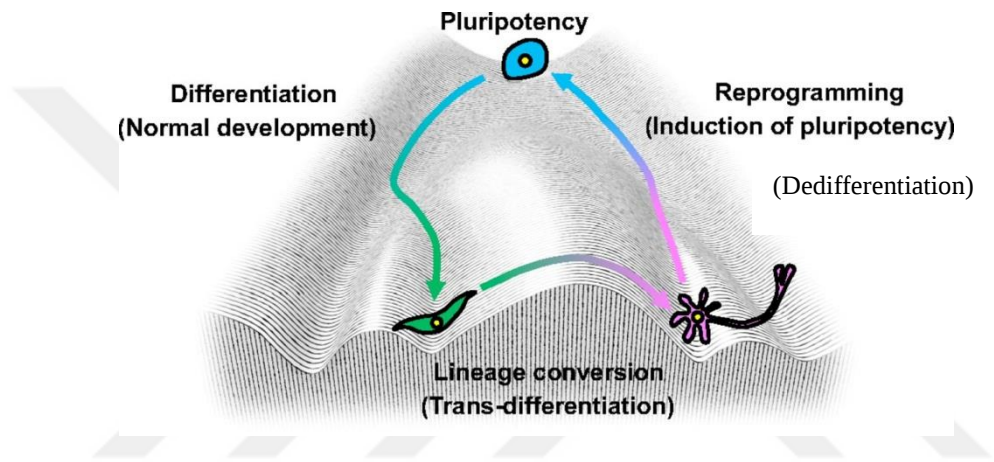
“plüripotent kök hücreler”, plasentaya ait embryo-dışı dokular hariç organizmadaki her tür hücre tipine dönüşme potansiyele sahip kök hücre grubudur. Embriyonik kök hücreler plüripotent özelliktedir⁵⁸. Terminal farklılaşmasını tamamlamış hücrelerin (ünipotent) belirli faktörler varlığında plüripotent hücrelere dönüşebildiklerini 2006 yılında Dr. Shinya Yamanaka, dört transkripsiyon faktörü ile (Oct4, Sox2, cMyc, ve Klf4) fibroblast hücrelerinin yeniden programlanmasını sağlayarak göstermiştir. Bu hücreler “indüklenmiş plüripotent kök hücreler-induced pluripotent stem cells” kısaca iPSC olarak adlandırılır⁶⁰. Üçüncü sırada ise belirli hücre hatlarını oluşturma kapasitesine sahip “multipotent kök hücreler” gelir. Erişkin kök hücreler multipotenttir. Kan hücrelerinin yapımından sorumlu hematopoietik kök hücreler, erişkin kök hücrelere örnek olarak verilebilir. Erişkin kök hücre kavramı, farklılaşmış dokularda dokunun idamesini sağlamak üzere organizmanın ömrü boyunca var olan, belirli şartlar/sinyaller altında kendini yenileme (self-renewal) ve farklılaşma özelliği gösteren kök hücreleri ifade eder⁶¹. Oligopotent hücreler ise “progenitör” olarak da adlandırılır ve az sayıda hücreye farklılaşma potansiyeline sahiptirler. Lenfoid progenitör hücrelerin B ve T lenfosit farklılaşması örnek olarak verilebilir. Olgunlaşma sürecini tamamlamış, farklılaşmış hücreler ve aynı hattaki tek bir hücre tipine dönüşebilen prekürsör hücreler - eritositlere dönüşen eritroblastlar gibi- ise “ünipotent” olarak anılır.



Şekil 9: Waddington epigenetik zemin modeli üzerinde farklılaşma basamaklarının şematize gösterimi.(

⁶²ten modifiye edilmiştir.)

iPSC ile gösterilmiş olan, farklılaşmış hücrelerin belirli faktörler varlığında farklılaşma basamaklarından geriye giderek (dediferansiasyon) pluripotensi kazanma özelliği- diğer bir ifadeyle- bir yeniden programlanma (reprogramming) mekanizmasının varlığı tıp dünyasında çığır açmıştır. Ayrıca iPSC hücreleriyle yapılan çalışmalara eş zamanlı olarak, terminolojisi kesin olmamakla birlikte literatürde “trans-diferansiasyon” (trans-differentiation), “doğrudan yeniden programlanma” (direct-reprogramming), “doğrudan dönüşüm” (direct conversion) şeklinde isimlendirilen, olgunlaşmış bir hücrenin, belirli transkripsiyon faktörleri yardımıyla, dediferansiye olmadan bir diğer hücre tipine dönüştürülebildiği de gösterilmiştir (Şekil 10)^{63,64,65}.



Şekil 10: Waddington epigenetik zeminde olabilecek hücre değişimleri. (Takahashi K. *Induced pluripotent stem cells in medicine and biology*, 2013, *Development*)

Epigenetik mekanizmalar öncülüğünde doğal yollarla gerçekleşen tipik hücre farklılaşmaları daha önce de bahsettiğimiz gibi embriyonik gelişim sırasında gözlemlenir. Gastrulasyon ve nöral tüp oluşumu sırasında nöroektodermin epitel hücreleri polarite ve motilite kazanarak nöral katmandan ayrılıp farklı hücre tipleri oluşturmak üzere farklılaşırlar. Bu hücelere “nöral krest” hücreleri, bu tip hücre farklılaşmasına da epitelyal-mezenkimal transizyon, kısaca “EMT” (epithelial-mesenchymal transition) adı verilmektedir. Hücre katmanlarını birarada tutan adheren bağlantılar, dezmozomlar, sıkı bağlantılar ve bazal-apikal polaritenin kaybı yerini mobilitesi yüksek fibroblastoid morfolojiye bırakır. Bu mezenkimal morfoloji, hücelere göç etme ve gittikleri yerde farklılaşma ve/veya diğer hücrelerin farklılaşmasına zemin hazırlama özelliği kazandırır. Hücre plastisitesinin bu ilginç örneği tıp

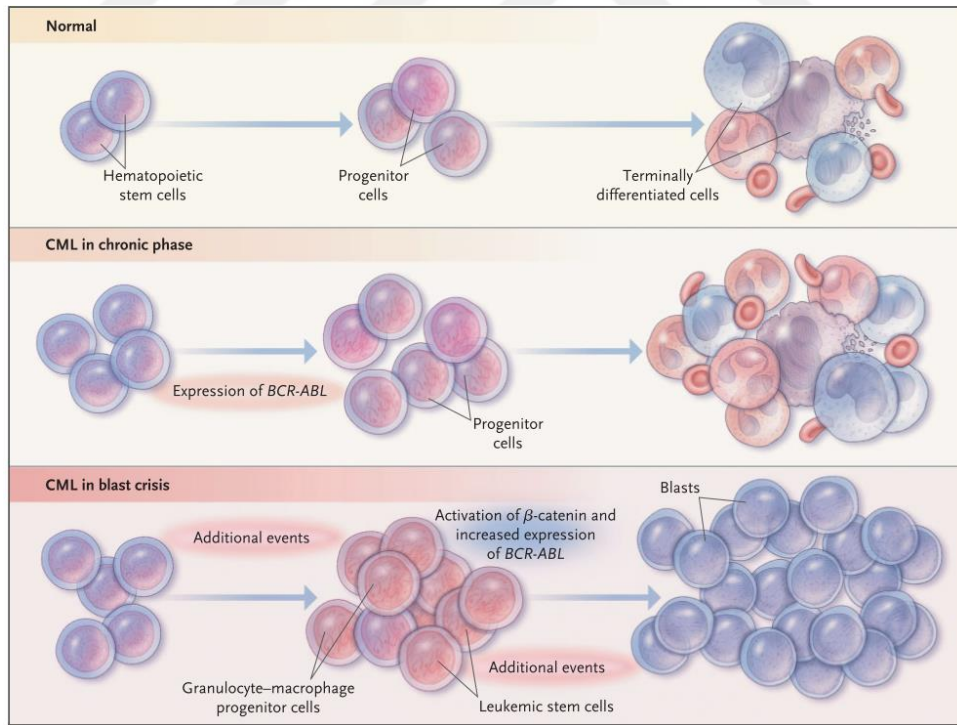
dünyasına kanser metastazı çalışmaları için ilham kaynağı olmuştur. Son 10 yılda yapılan çalışmalar epitel kökenli kanserlerde (karsinoma) kanser hücrelerinin EMT ile metastatik özellik kazanabildiğini göstermiştir. EMT yolaklarının daha iyi anlaşılması kanser hücrelerinin solid dokudan serbestleşmesini engelleyebilmek adına önemlidir. Kanser metastazında motilite kadar invazyon da kritiktir. Tümoral dokudan ayrılan hücre, kan yoluyla bir diğer dokuya ulaşır ve penetre olmak zorundadır. Bu durumda epitelyal karakterler olan apikal-bazal polarite ve hücre adhezyon moleküllerinin yeniden kazanımı gereklidir⁶⁶⁻⁷⁰. Epitelyal genlerin yüksek ifadesi ve mezenkimal genlerin düşük ifadesi ile gerçekleşecek olan bu olaya literatürde mezenkimal-epitelyal tranzisyon, kısaca MET denilmektedir. MET de EMT gibi embriyogenez ve gelişimin erken evrelerinde farklılaşan hücre gruplarında doğal olarak gerçekleşmektedir^{71,72}.

2.3.1 Kanser Kök Hücresi

Kanser gelişim mekanizmasını açıklayan, mutasyonların birikimi sonucu klonal evrimle adım adım daha agresif alt-klonların oluşması ve baskın olması hipotezine ek veya alternatif olarak, “kanser kök hücresi” kavramı ortaya atılmıştır. Kanser kök hücresi (KKH), kanser dokusunda bulunan, tıpkı normal kök hücrelerde olduğu gibi kendini yenileme, tümör başlatma ve kanserli dokunun farklı tipteki hücrelerine dönüşebilme özellikleri olan ve tümörü oluşturan çoğu kanser hücresinin aksine sınırlı çoğalma kapasitesine sahip hücre olarak tanımlanmaktadır⁷³⁻⁷⁵. KKH ile ilgili ilk delil, Bonnet ve Dick tarafından 1997 yılında, akut myeloid lösemide CD34⁺/CD38⁻ hücrelerin tümör başlatma (tumor-initiating) potansiyellerinin NOD/SCID farelerde gösterilmesiyle ortaya konmuştur⁷⁶. Kanser kök hücresinin ortaya çıkışı ile ilgili iki baskın teori vardır: 1) normal kök hücrelerin onkojenik dönüşümü ile 2) nispeten özelleşmiş hücrelerin kök hücreye özgü karakterleri geri kazanması ile (yanlış farklılaşma, kontrolsüz kendini-yenileme, artmış hayatta kalma kapasitesi)⁷⁷. KKH’lerde görülen plastisite, klonal evrim modelleri ve tümör heterojenitesine yeni bakış açıları kazandırmıştır. Bugüne kadar yapılan çalışmalar birçok solid tümörde de kanser kök hücrelerinin varlığını göstermiştir. Solid tümörlerde kanser tedavilerinde kullanılan ilaçların çoğunluğu hızlı çoğalan hücrelere etkili olduğundan KKH’ler de ilaçlara dirençlidir. Buradan yola çıkarak kanser tedavilerindeki en önemli sorunlardan olan ilaç direnci, relaps ve metastazdan KKH’lerin sorumlu olabileceğini öne süren araştırmacılar vardır. KKH plastisitesinde EMT ve MET mekanizmalarının rolü literatürde aktif araştırma alanlarıdır^{73-75,78}.

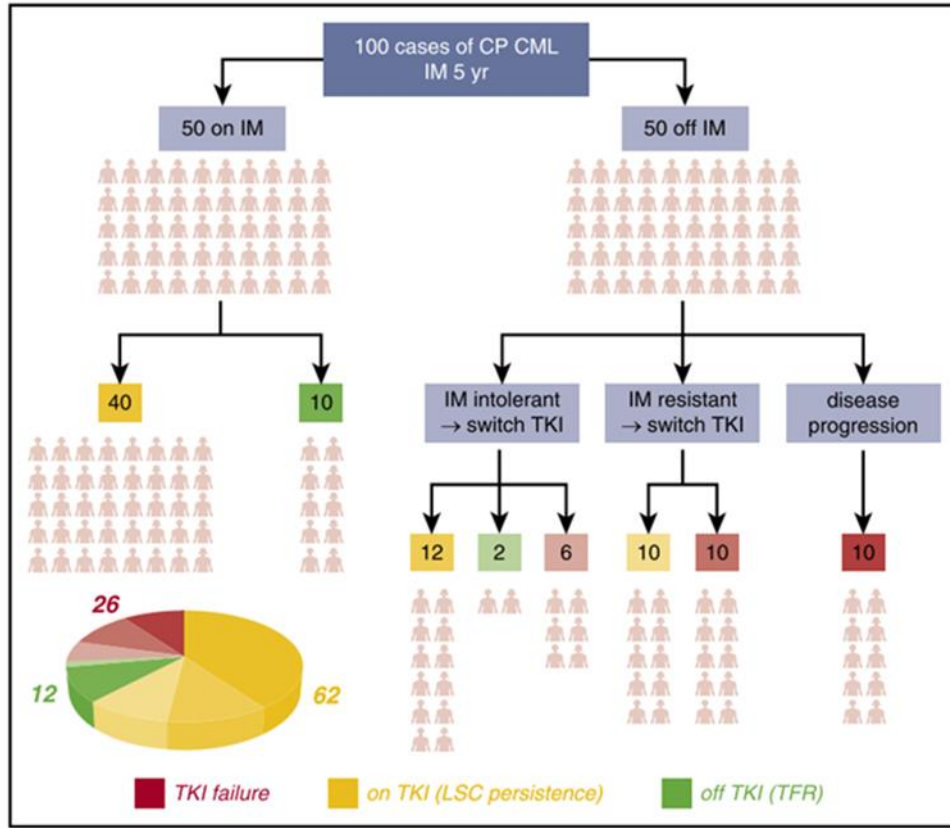
2.3.1.1 KML Kök Hücresi ve İlaç Direnci

Önceki bölümlerde bahsedildiği gibi KML, hematopoietik kök hücrenin bir kanseridir. Bcr-Abl translokasyonunun hematopoietik kök hücrede ($CD34^+CD38^-CD90^+Lin^-$) gerçekleşmesiyle ilk "lösemik kök hücre" ortaya çıkar. Lösemik kök hücre (LKH) normal kök hücreler gibi yeni bir kök hücre yaparak kendini yenileme ve farklılaşarak çoğalma özelliğini korur. KML de kronik fazda gerçekleşen bu olay sonucu kök hücre ve progenitör hücrelerde proliferasyon artar ve sonucunda farklılaşmış/olgunlaşmış hücre kompartmanlarında sayıca artış gözlenir. Zamanla lösemik kök hücrede ve/veya özellikle granülosit-makrofaj progenitör (GMP) seride ($CD34^+CD38^+Lin^-$), Bcr-Abl ekspresyonunun tetiklediği Wnt/B-catenin yolu gibi bazı yollar sayesinde, genetik/epigenetik/hücrel ek değişiklikler meydana gelir. Akselere ve blastik faza geçişten sorumlu bu ikincil değişiklikler sonucu hücreler farklılaşma yeteneklerini kaybederek blast hücrelerine dönüşürler. Bu süreçte özellikle GMP hücrelerinin kendini-yenileme özelliği kazanarak ikinci bir lösemik kök hücre kompartmanı oluşturdukları gösterilmiştir (Şekil 11)^{79,80}.



Şekil 11: KML’de progresyon mekanizması modeli (C. Jamieson ve ark, *Granulocyte–Macrophage Progenitors as Candidate Leukemic Stem Cells in Blast-Crisis CML*, NEJM, 2004)

Bcr-Abl⁺ GMP hücreler klonal büyümeyi ve kendini-yenilemeyi destekleyecek IL-3 ve G-CSF gibi otokrin faktörler salgırlar. LKH'ler Bcr-Abl onkoproteini ifade etmelerine rağmen quiescent/dormant kalabilmektedirler. Kronik fazda hastalar tedavilere yanıt verirken akselere ve blastik fazda tedavi imkanı son derece kısıtlıdır. İlaçlara duyarsızlık ve relapstan GMP hücrelerinden gelişen lösemik kök hücre kompartmanının sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu ikinci lösemik kök hücre kompartmanı için Bcr-Abl, yaşam sinyali değildir. Farklı bir deyişle diğer lösemik hücrelerin aksine bu hücreler “onkogen-bağımsız”dır. Dolayısıyla tirozin kinaz inhibitörleri gibi mevcut hedefli-tedavi stratejileri KML tedavisinde yetersiz kalmaktadır. TKİ tedavi stratejileri hastaya göre çeşitlilik gösterse de Şekil 12’de özetlendiği gibi, 5 yıl boyunca imatinib tedavisinden sonraki farklı stratejilere rağmen genel tabloya bakıldığında yalnızca %12 hastanın remisyona kavuştuğu, hastaların %62’sinde uzun tedavilere rağmen moleküler ve sitogenetik kalıntıya rastlandığı, hastaların %26’sı ise TKİ tedavisine yanıt göstermemiş ve hastalığın ilerlemesiyle sonuçlanmıştır. Tedavi yanıtıslığı ve residual hastalık tablosunun kemik iliğindeki lösemik kök hücrelerden kaynaklandığı düşünülmektedir⁸¹.



Şekil 12: Kronik faz KML hastalarının TKİ kullanımında 5 yıllık tedavi yolculukları.. Şema birçok kaynaktan elde edilen verilerin birleştirilmesiyle elde edilmiştir. 100 kronik faz KML hastasının 5 yıl boyunca imatinib tedavisi görmesi sonrası, imatinib tedavisine devam edilen 50 hasta ve imatinib tedavisi intolerans sebebiyle veya zamanla gelişen imatinib direnci nedeniyle ikinci-nesil TKİ kullanılan veya primer direnç gösteren 50 hastanın progresyonu şematize edilmiştir. Yeşil renk ile belirtilen grup remisyon gösteren hastalar, sarı ile belirtilen grup residual hastalık nedeniyle tedaviye devam etmek zorunda olan ve kırmızı ile gösterilen grup TKİ tedavisinin başarısız olduğu hastaları belirtmektedir. (*The chronic myeloid leukemia stem cell: stemming the tide of persistence, 2017, Blood*)

Evrimsel perspektifte, bir kromozomal translokasyonla başlayan tüm bu plastisite süreci, lösemik kök hücrelere çoğalma avantajı sağlamaktadır⁸². Lösemik/kanser kök hücrelerinin keşfinden sonra bu hücrelerin biyolojisinin anlaşılmasına yönelik yapılmakta olan çalışmalar yeni tedavi stratejilerinin geliştirilebilmesi açısından literatürde önemli yer sahibi olmuştur.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. ARAŞTIRMANIN TİPİ

Araştırmamızın tipi deneysel çalışmadır.

3.2 ARAŞTIRMANIN YERİ VE ZAMANI

Araştırma literatür taraması ile 10 Mart 2011 tarihinde başlamış olup; 13 Şubat 2018 tarihinde tez savunması ile sonlanmıştır. Araştırma verilerinin elde edildiği laboratuvar çalışmaları Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doç.Dr.Zeynep Yüce'nin laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.3 ARAŞTIRMANIN EVRENİ VE ÖRNEKLEMİ/ ÇALIŞMA GRUPLARI

Araştırma K562 hücre hatlarında gerçekleştirilmiştir.

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 hücre hattından imatinib baskısı altında klonal seçimle elde edilmiş K562-Ir hücre hattı ile yapılmıştır.

3.5 ARAŞTIRMANIN DEĞİŞKENLERİ

Atasal K562 hücre hattı, K562-Ir hücre hattı için kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Her iki hücre hattının karşılaştırılması için yapılmış her bir deneydeki farklı değişkenler protokoller içerisinde detaylıca anlatılmıştır.

3.6 VERİ TOPLAMA ARAÇLARI

3.6.1 Hücre Hattı ve Hücre Kültürü

3.6.1.1 K-562 Hücre hattı

İnsandan elde edilmiş ilk ölümsüz daimi myelositik lösemi hücre hattıdır. 1970 yılında 53 yaşında KML blastik kriz döneminde olan kadın hastanın plevral sıvısından elde edilmiştir. Hücreler 20 µm çapında, düzgün yüzeyli, yuvarlak, ve yüzeye tutunmaz (süspanse) özelliktedir.

Lenfositik belirteçleri içermezler. Diferansiye olmamış granülosit ve eritrosit hücreleriyle proteomik benzerlik gösterirler. Hücreler erken-evre granülosit, eritrosit ve monositlere dönüşebilirler. Epstein-Bar virüs ve benzeri diğer herpesvirüsleri barındırmadıkları gösterilmiştir. İnküleme zamanı yaklaşık 12 saattir.

BCR-ABL pozitif hücre hattı olduğundan tezimizde K-562 hücre hattı tercih edilmiştir.

3.6.1.2 K562-İr hücre hattı ve Eldesi

K562 hücre hattını artan İmatinib dozlarına maruz bırakarak hücrelerin direnç kazanmasını sağlamak üzere artan mikromolar dozlar belirlenmiştir. İlk deneme dozu 0,5 μM 'dür. Beklenenden fazla miktarda ölüm gerçekleştiğinden 0,1 μM ile deneye başlanılmasına karar verilmiştir. Her doz artırımından önce kontrol grubuyla eşit sayıda ve benzer canlılık oranında hücre sayılıp ekilmiştir. İlacın ekleneceği gün tekrar hücre sayımı yapıp çoğalma hızlarının benzer olduğu gösterildikten sonra ilaç eklenmiştir. 72 saat inkübasyondan sonra kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak canlılık testi yapılmıştır. İlaç eklenmiş gruptaki hücreler, kontrol grubuyla benzer çoğalma hızında olduğu gözlemlendikten sonra bir sonraki doza geçilmiştir. Her doz aşımında bir önceki basamaktaki dirençli hücre grubu ve o grubun kontrolleri -80°C de dondurulup yedeğe alınmıştır. Sırasıyla 0,1 μM – 0,2 μM – 0,4 μM – 0,8 μM – 1,2 μM - 2 μM - 4 μM – 8 μM - 10 μM doz uygulanmıştır.

0,4 μM doza kadar 72 saatten sonraki inkübasyon sırasında normal ortam kullanılmıştır. Daha sonraki doz artırımlarında yöntem modifiye edilerek hücreler sürekli olarak artan dozlardaki molaritelere eş olacak şekilde ilaç eklenmiş ortamlarda üretilmiştir.

K562-İr hücrelerinin idamesi 10 μM imatinib barındıran RMPI tam ortamı ile yapılmıştır.

Gereçler:

1. İmatinib (Gleevec- Novartis Company (Basel, Switzerland) :

Doç. Dr. Hakkı Ogün SERCAN'dan alınan 2mg İmatinib serumsuz RMPI ortamında çözdürülerek 2 mM ana stok elde edilmiştir. 2 mM ana stoktan ara stoklar elde edilmiş, $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır. Ana stok gerektiğinde kullanmak üzere -20°C 'ye kaldırılmıştır.

2. Pipet pompası (Greiner Labortechnik 000424NS – 9)

3. İverted (ters bakış) faz kontrast ışık mikroskobu (Nikon – Diaphot 200)
4. 10 ml'lik ve 5 ml'lik steril pipetler.
5. 25 cm²' lik filtreli flasklar
6. CO₂' li inkübatör.
7. RPMI 1640 besi ortamı (Biochrom).
8. L-glutamin
9. FBS (Fetal bovine serum)
10. Penisilin/streptomisin

Yöntem:

-80C ° 'de dondurulmuş K562 hücreleri 37C ° lik su banyosunda çözündürüldükten sonra 25 cm² lik hücre kültürü flasklarına ekildi. (Tüm deneyler 25 cm² lik flasklarda yapılmıştır.) Hücrelere canlılıklarını geri kazandırmak üzere 5'er ml ortam eklenerek %5 karbondioksitli inkübatörde 37C ° de inkübasyona bırakıldı.

1. Hücreler canlılık testi yapılarak canlılıklarını geri kazandıkları gözlemlendikten sonra (~ %95 canlı hücre) 1,000,000 canlı hücre sayılarak iki ayrı flaska ekildi. Flasklardan biri kontrol diğeri deney flaskı olarak belirlendi. İlk deneme ilaç dozu 0,5µM İmatinib olarak düşünüldü.
2. Flasktaki son molarite 0,5 olacak şekilde 2mM stok İmatinib'den 1,25 µl alınarak 5ml lik kültür ortamına eklendi. Hücreler 72 saat inkübasyona bırakıldı. 72 saat sonunda hücre sayımı ve canlılık testi sonucu %10 dan daha az canlılık gözlemlendiğinden daha düşük bir ilaç dozunda başlanmasına karar verildi.

3. Aynı deney 0,1µM imatinib ile tekrarlandı. Stok çözeltinin moralitesi yüksek olduğundan çok küçük miktarlarda sıvı çekmenin zorluğundan dolayı ilk olarak 5µM'lık ara stok hazırlandı. Bundan sonraki deneylerde farklı molaritelerde ara stoklar kullanıldı.
4. 0,1µM imatinibli ortam için 5µM ara stoktan 100µl imatinib deney flaskına eklendi. 72 saat inkübasyona bırakıldı. 72 saat sonunda kontrol grubuyla yapılan karşılıklı canlılık testinde iki grupta da yaklaşık %92 civarında canlılık gözlemlendi.
5. Aynı deney grubundaki hücreler sayılarak 1'er milyon hücre tekrar ekilip deney flaskına 0,2 µM imatinib olacak şekilde ara stoktan ilaç eklendi. Tekrar 72 saat inkübe edildi. 72 saat sonunda deney hücre grubunda belirgin hücre ölümü gözlemlendi (kontrol grubu: %95, deney grubu: %40 canlılık). İlaçlı ortamda hayatta kalan hücrelerin çoğalması adına kültür ortamı üç ayrı flaska bölündü. İnkübasyona bırakıldı.
6. 7 gün sonra ilaçlı ortamdaki canlı hücre sayısında artış gözlemlendiğinden hücreler pasajlandı. (Süre zarfında kontrol grubu ve deney grubundaki hücreler gözlemlenip gerektiği zamanlarda pasajları devam ettirilmiştir.)
7. Yaklaşık 3 hafta sonra deney grubu kontrol grubuyla benzer davranışta olduğu gözlemlendi. Yukarıda anlatıldığı gibi gerekli sayımlar yapılarak hücreler ekildi. 0,2 µM den 0,4µM'e çıkmak için aradaki molaritenin farkı alınıp gerekli miktar deney flaskına eklendi. 72 saat inkübasyona bırakıldı.

$$5\mu\text{M}(\text{ara stok}) \cdot X = 0,2\mu\text{M} \cdot 5\text{ml}(\text{ortam})$$

X= 200µl ilaç 0,2µM'e dirençli hat üzerine eklendi

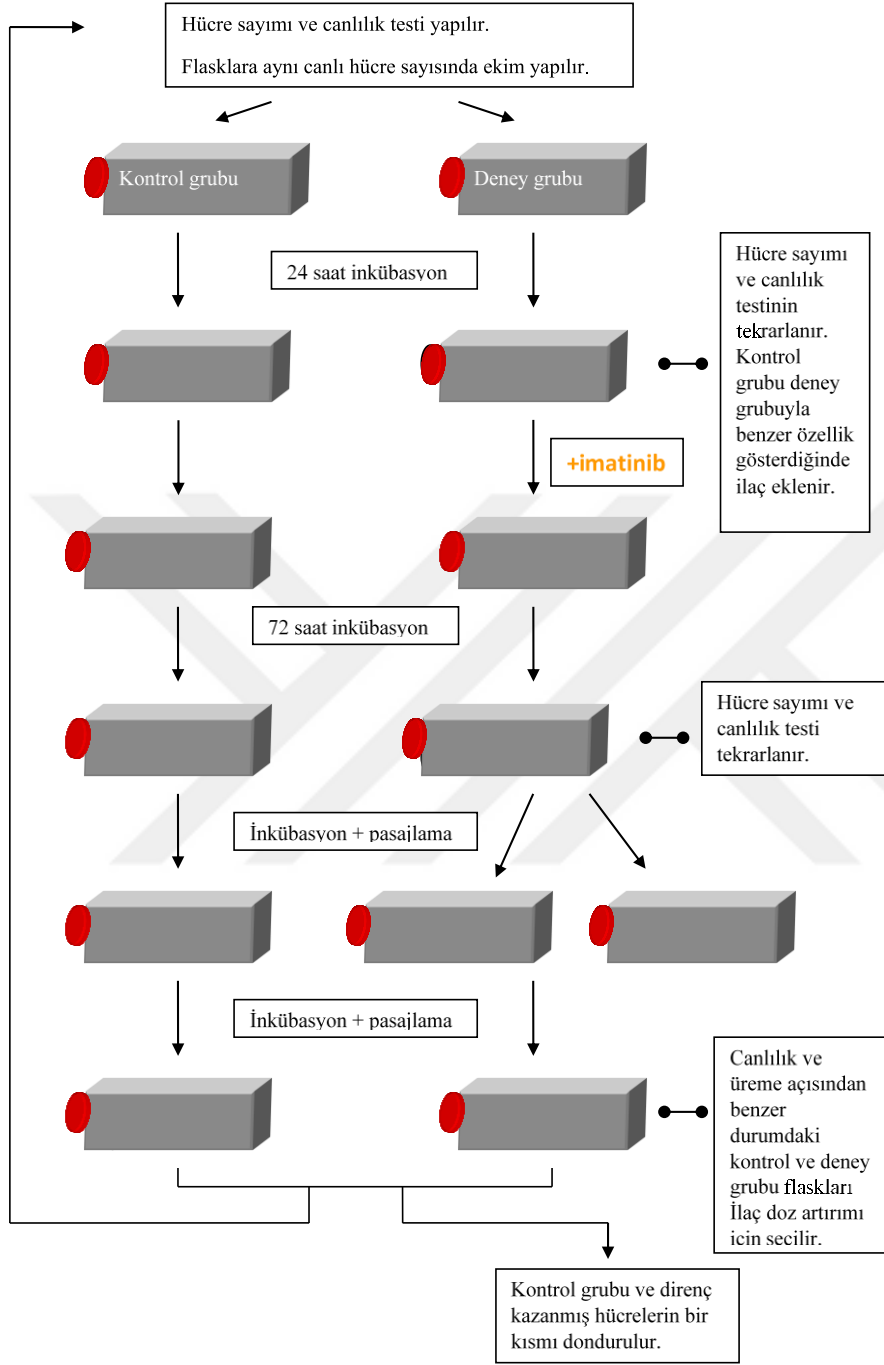
8. 72 saat sonunda canlılık testi yapıldı. Canlılık yüzdesi kontrol grubunda ortalama %87 iken deney grubunda ortalama %42 olduğu belirlendi. Hücreler inkübasyona bırakıldı.

9. 20 gün sonunda 0,4µM imatinibli ortamdaki hücreler kontrol grubuyla benzer özellik gösterdiği gözlemlendi. Canlılık testi yapıldı. (Kontrol grubu %91, deney grubu %89 canlı). Kontrolle eşit sayıda hücre ekilip, ertesi gün deney flasks üzerine 0,8µM olacak şekilde ilaç eklendi. 72 saat inkübasyona bırakıldı.
10. 72 saat sonunda yapılan canlılık testinde kontrol grubunda %93, deney grubunda %49 canlı hücre olduğu hesaplandı. Hücreler farklı flasksa pasajlanarak inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sırasında kullanılan besi ortamına 0,8µM olacak şekilde imatinib eklendi.
11. Yaklaşık 1,5 ay sonunda kontrol grubunda %91 canlılık, 0,8µM dirençli grupta % 86 canlılık hesaplanmıştır. Kontrol ile eş miktarda hücre ekilip ertesi gün canlılıklarının ve çoğalma hızlarının benzerliği doğrulandı. Deney grubuna toplam molarite 1,2µM olacak şekilde hesaplanıp ara stoktan 40µl ilaç eklendi. 72 saat inkübasyona bırakıldı.
12. 72 saat sonunda kontrol grubundaki canlılık %96, deney grubundaki canlılık %38 olarak hesaplandı. Hücreler farklı flasksa bölünerek 1,2µM imatinibli ortamda inkübasyona bırakıldı.
13. Yaklaşık 1 ay sonunda benzer özellik gösteren kontrol ve deney grubunda canlılık testi ve hücre sayımı yapıldı. Her iki grupta canlılık %91 olarak hesaplandı. 1,2µM dirençli hücrelere 2µM olacak şekilde ara stoktan 72µl ilaç eklendi. 72 saat inkübasyona bırakıldı.
14. 72 saat sonunda kontrol grubundaki canlılık %95, deney grubundaki canlılık %79 olarak hesaplandı. Deney grubundaki hücreler farklı flasksa bölünüp inkübasyona bırakıldı. Kullanılan besi ortamının ilaç molaritesi 2µM'e yükseltildi.
15. Yaklaşık 2 ay sonunda benzer özellik gösteren kontrol ve deney grubunda canlılık testi ve hücre sayımı yapıldı. Kontrol grubunda canlılık %94, 2µM dirençli grupta %87 olduğu

belirlendi. Kontrol ve dirençli flastaki canlı hücre sayıları eşitlenerek ertesi gün tekrar sayım yapıldı. Artmış hücre sayıları ve benzer canlılık yüzdesi elde edildi. 2µM dirençli hücreler üzerine toplamda 4µM olacak şekilde ilaç eklendi. 72 saat inkübasyona bırakıldı.

16. 72 saat sonunda kontrol grubundaki canlılık yüzdesi % 92 iken, deney grubundaki canlılık %47 olarak hesaplandı. Deney flaskı 1/2 oranında pasajlanıp inkübasyona bırakıldı. Kullanılan ilaçlı besi ortamının ilaç molaritesi 4µM'e yükseltildi.
17. Yaklaşık 1 ay sonunda kontrol grubu ve 4µM dirençli grup arasında hücre sayımı ve canlılık testi yapılmıştır. Kontrol grubunda canlılık oranı % 87 4µM dirençli grupta %84 civarında olduğu gözlenmiştir. Her iki gruptan eşit miktarda hücre ayrı flasklara ekildi. 24 saat sonunda hücre sayısının her iki grupta benzer oranda arttığı (yaklaşık iki kat) canlılık yüzdelерinin eşite yakın olduğu (sırasıyla %94-%95) gözlemlendi. 4µM dirençli gruba ilaç molaritesi 8µM olacak şekilde imatinib eklendi. 72 saat inkübasyona bırakıldı.
18. 72 saat sonunda canlılık oranları kontrol grubunda %95 deney grubunda %80 olarak hesaplandı.
19. Yaklaşık 1 ay sonunda kontrol grubu ve 8µM dirençli grup arasında hücre sayımı ve canlılık testi yapıldı. Kontrol grubundaki canlılık oranı %91, 8µM dirençli grupta canlılık oranı %89 olarak gözlenmiştir. Her iki gruptan eşit miktarda hücre ayrı flasklara aktarılıp 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonunda hücre sayısının benzer miktarlarda arttığı hücre sayımıyla belirlendikten sonra 8µM ilaçlı ortamda büyüyen dirençli gruba ilaç molaritesi
20. 10µM olacak şekilde imatinib eklendi. 72 saat inkübasyona bırakıldı. 72 saat sonunda canlılık oranı kontrol grubunda % 92 deney grubunda %90 olarak hesaplandı.

Anlatılan yöntemin şematik özeti aşağıda gösterilmiştir (Şekil 13).



Şekil 13: K562 hücrelerinden klonal seçim yoluyla imatinib-dirençli K562-İr alt-klonunun elde edilmesi

3.6.1.3 Besi Ortamı Hazırlanması:

1X 500 ml RPMI besi ortamı içerisine 2 mM konsantrasyonda L glutamin, 1µg/ml konsantrasyonda penisilin/streptomisin ve % 10 oranında FBS eklenmiştir. Gerekğinde kullanmak üzere +4 C° de saklanmıştır. K562-Ir hücreleri için ortama 10µM son konsantrasyonunda imatinib eklenmiştir. Hücreler 37C° CO₂'li inkübatörde inkübe edilmiştir. 2-3 günde bir hücre yoğunluğuna göre 1/2 veya 1/3 oranında pasajlama yapılmıştır.

3.6.1.4 Hücre Dondurma Ortamı ve Dondurma Yöntemi:

Hem k562 hem K562-Ir hücreleri zaman zaman stoklama amaçlı donduruldu. %50 RPMI 1640, %40 FBS, %10 DMSO oranında olacak şekilde dondurma ortamı hazırlandı. Gerekğinde kullanmak üzere +4 C 'de saklandı.

Yöntem:

1. Kültür ortamı 12ml'lik steril santrifüj tüpüne aktarılır.
2. 600 G hızında 5dk santrifüj edilip üst faz atılır.
3. Hücre pelleti üzerine 1 ml dondurma ortamı eklenir.
4. Pipetaj yapıtıktan sonra hücreler dondurma tüplerine aktarılır.
5. Donma işleminin yavaş olması için -20C ° de en az 1 saat bekletilir.
6. Gerekğinde çözmek üzere -80C° ye kaldırılır.

3.6.2 Kullanılan Tirozin Kinaz İnhibitörleri

K562 ve K562-Ir hücreleri üzerinde imatinib (sc-202180A), nilotinib (sc-202245), dasatinib (sc-218081), bosutinib (sc-202084), ponatinib (sc-362710) ve GNF-2 (sc-364428) tirozin kinaz inhibitörleri kullanılmıştır.

3.6.3 Hücre Ölümü Yöntemleri

3.6.3.1 Tripan Mavisi Canlılık Testi

Canlı hücreler membran bütünlüğüne sahip olmaları nedeniyle tripan mavisi boyasını hücre içine almazlar fakat ölü hücrelerin membran bütünlükleri bozulduğundan hücreler boyayı geçirir. Bu testte bir hücre süspansiyonu tripan mavisi ile karıştırılır ve hücrelerin boyayı alıp almadığı mikroskopta kontrol edilir. Canlı hücreler parlak ve temiz bir sitoplâzmaya sahip olarak görülürken, ölü hücreler ise mavi sitoplâzmalı olarak görülür.

Hücre kültürü çalışmalarında tripan blue ile boyama ve hemositometre (Neubauer ya da Thoma lamı) ile hücre sayımı altın standart olarak kabul edilir. Lamaların sayım yapılan bölümlerinde 9 adet büyük kare içerisindeki hücreler tek tek sayılarak formül yardımıyla 1 ml'deki hücre sayıları hesaplanır.

Deneyler süresince hücrelere hücre ölümüne neden olacak muameleler yapıldıktan sonra aşağıdaki şekilde canlılık testi yapılmıştır.

1. Süspanse hücre kültüründen 0,5 ml örnek alındı.
2. 1:1 Oranında tripan mavisi ve PBS bir mikrosantrifüj tüpünde karıştırıldı.
3. Tripan mavisi + PBS karışımından 0,5ml alınıp 0,5ml hücre süspansiyonu ile karıştırıldı.
4. Neubauer lamının kenarlarına 1'er damla su damlatılıp üzerine lamel kapatıldı.
5. Lamel ile lam arasındaki boşluktan 10µl tripan mavisi + hücre karışımından eklendi.
6. Işık mikroskobunda 10X objektifte sayım yapıldı.
7. Mavi boyayı almamış olan hücreler canlı, almış olanlar ise ölü olarak değerlendirildi.
8. 1 ml ortamdaki canlı hücre sayısı = 1 büyük karede sayılan canlı hücre x dilüsyon faktörü x 10^4 formülü ile belirlendi. (1ml'deki ölü hücre sayısı da aynı şekilde hesaplanır.)
9. Canlı hücre sayısının toplam hücre sayısına oranı hesaplanarak canlılık yüzdesi hesaplandı.

3.6.3.2 Akış Sitometrisi (Flow cytometry) ile Annexin V/Mitokondrial membran potansiyeli ölçümü

Gereçler:

- 6-well plate
- Mitokondrial membrane Potential/Annexin V Apoptosis Kit with Mitotracker Red and Alexa Fluor 488 annexin V (Invitrogen)
- FACSCalibur

Yöntem:

Canlı hücrelerde mitokondrilerin sağlam olduğu durumda Mitotracker Red maddesi organel içine geçip ışımı vermektedir. Hücre mitokondrial membran potansiyelini kaybettiğinde (apoptozda olduğu gibi) marker ışımı vermemektedir. Bu durumda apoptotik ölçüm için Mitotracker Red pozitifliği canlı hücre grubunu gösterirken Alexa flour 488 Annexin V pozitifliği ölü hücre grubunu gösterir.

1. 5X binding bufferdan 1X buffer hazırlandı.
2. Toz halindeki Mitotracker Red tüpüde 9.4µl DMSO eklenerek 10 nM stok solüsyon hazırlandı. (-20°C de saklandı)
3. Stok solüsyondan 10µM çalışma solüsyonu hazırlandı. Çalışma solüsyonundan 1µl çekilip 1ml serumsuz RPMI kültür ortamına eklenip +4 derecede saklandı.
4. Dirençli-K562 hücre flaskı imatinibli ortamı uzaklaştırmak için 5 dakika 1200 rpm de santrifüj edildi.
5. Hücrelere belirlenen son konsantrasyonlara göre ilaç eklemeleri yapıldı.
6. 24. saatte kuyulardan 500'er ul ortam çekilip eppendorf tüplere aktarıldı.
7. Üzerlerine 2µl 10µM Mitotracker Red eklenip 30 dk 37°C de inkübe edildi.
8. Hücreler 5dk 1200 rpm de samtrifüjlenip PBS ile resüspanse edildi.
9. Üzerlerine 100µl 1X Annexin buffer eklendi
10. Buffer ile resüspanse edilmiş hücreler üzerine 5'er µl Alexa flour 488 Annexin V eklenip 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
11. Akım sitometrisi ile ölçüldü.
12. Aynı uygulama basamakları 48. ve 72. saatler için de gerçekleştirildi.

3.6.4 Hücre Canlılık Testi

3.6.4.1 WST-1/WST-8 yöntemi

WST-1 ve WST-8 (daha kararlı form) mitokondriyal süksinat-tetrazolium redüktaz enzimi tarafından sarı renkli formazan kristaline parçalanan bir tetrazolium tuzu türevidir. Hücre süspansiyonu üzerine direkt olarak 1:10 oranında eklendiğinde canlı hücreler tarafından metabolize edilir. CO₂'li 37 C inkübatörde 0.5-4 saat aralığında inkübasyona bırakılır. Inkübasyon süresi hücre tipine ve sayısına göre değişmektedir. Literatürde kontrol grubunun 450nm'deki fotometrik ölçüm değerinin 0.6-0.8 aralığında olması uygun görülmektedir. Deneylerimizde Roche Cell Proliferation Reagent WST-1 (Cat No: 05015944001) ve Sigma Aldrich (#96992) Cell Counting Kit-8 kullanılmıştır.

Deneyler için 6-kuyulu plate'ler kullanılmıştır.

Yöntem:

- 1) Hücreleri, WST-1 için 100 L de 1000-50.000 hücre koşuluna göre, 100 l ye yaklaşık 30.000 hücre gelecek şekilde 3ml RPMI 1640 %10 FBS'li ortama ekilmiştir.
- 2) ilaç eklenecek kuyular üçerli hazırlanıp belirlenen son konsantrasyonlarda ilaç eklenmiştir. Kontrol grubuna yalnız DMSO eklenmiştir.
- 3) Inkübasyondan sonra kuyulardan 3X 100  l örnek çekilip 96-kuyulu plate'lere ekilmiştir. Ayrıca Blank olarak kullanılmak üzere hücrelerin kültüre edildiği besi ortamından 3X 100  l çekilerek kuyulara eklenmiştir. Blank dahil tüm kuyulara 10'ar  l WST-1 solüsyonu eklenip yaklaşık 45 dk inkübe edilmiştir. 450nm de plate okuyucuda ölçüm yapılmıştır. Aynı işlem 48. ve 72. Saatler için tekrar edilmiştir.
- 5) İlaç eklenmemiş kontrol grubunun OD değeri %100 canlılığı temsil edecek şekilde ilaç eklenen hücrelerin canlılık yüzdeleri hesaplanıp grafik haline getirilmiştir.

3.6.5 K562-Ir Hücrelerinde Yeni Nesil Tirozin Kinaz İnhibitörlerinin Uygulanması

Elde ettiğimiz imatinib dirençli K562-Ir hücre hattının dasatinib, nilotinib, bosutinib, ponatinib tirozin kinaz inhibitörlerine cevabının belirlenmesi amaçlanmıştır. Tripan mavisi, WST-1 ve akış sitometrisi yöntemleriyle, ilaçlara maruz bırakıldıktan sonra 24., 48. ve 72. saatlerde hücre canlılık yüzdeleri belirlenmiştir.

3.6.5.1 Klinik Doz TKİ Uygulaması

Klinikte kullanılan ilaç dozlarının K562-Ir hücreleri üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Literatürde belirtilen verilere göre klinikte hastalar üzerinde uygulanan ilaç dozlarının 24-72 saat aralığında en yüksek plazma konsantrasyonları (C_{max}); günde iki kez 400mg nilotinib için 1,7µM⁸³; günlük 100mg dasatinib için 0,2µM⁸⁴; 600mg bosutinib için 0,3µM⁸⁵, imatinib için 5µM⁸⁶, günlük 45mg ponatinib için 137nM⁸⁷, GNF-2 için IC50 273nM⁸⁸ olduğu belirtilmiştir. GNF-2 klinik onay almadığından *in vitro* IC50 dozu kullanılmıştır. Bu bilgiler ışığında aynı ilaç dozajları K562-Ir hücrelerine uygulanmış, 24., 48. ve 72. saatlerde canlılık testleri yapılmıştır. Kontrol olarak ilaç eklenmemiş K562-Ir hücreleri kullanılmıştır.

Not: C_{max} için verilen kaynaklarda belirtilen plazma konsantrasyonları ilaçların moleküler ağırlıklarına bölünerek molariteleri hesaplanmıştır.

3.6.5.2 Yüksek Doz TKİ Uygulaması

Klinik dozlarda yeni nesil TKİ uygulanmış K562-Ir hücrelerinin %50'den fazlasının canlı kaldığı görüldükten sonra, imatinibde olduğu gibi son konsantrasyonu 10'ar µM olacak şekilde tekrar uygulama yapılmasına karar verildi.

- 10 µM imatinib-dirençli K562 alt klonundan 100.000'er canlı hücre sayılarak 6-kuyulu kültür flasklarına ekim yapıldı. Üzerlerine 5'er ml %15 FBS, %1 penisilin/streptomisin, %1 L-glutamin barındıran RPMI 1640 kontrol besi ortamı eklendi. Dirençli hücreler üzerine 10µM imatinib, 10µM dasatinib, 10µM nilotinib ve 10 µM bosutinib eklendi. Belirtilen dört koşul için dört ayrı dirençli kontrol grubu hücrelerine yalnız DMSO eklendi. 72 saat inkübasyona bırakıldı. Her 24 saatte bir tripan mavisi canlılık testi uygulanarak kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak canlılık oranları hesaplandı

- 10 µM imatinib-dirençli K562 alt klonundan 100.000'er canlı hücre sayılarak 6-kuyulu kültür flasklarına ekim yapıldı. Üzerlerine, içerisinde 10µM imatinib barındıran RPMI 1640 kontrol besi ortamından eklendi. Hücreler üzerine 10µM imatinib ($\Sigma 20 \mu M$), 10µM dasatinib, 10µM nilotinib, 10µM bosutinib ve 10µM ponatinib eklendi. Belirtilen dört koşul için dört ayrı dirençli kontrol grubu hücrelerine yalnız DMSO eklendi. 72 saat inkübasyona bırakıldı. Her 24 saatte bir tripan mavisi canlılık testi uygulanarak kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak canlılık oranları hesaplandı.

3.6.6 Abl Proteini Kinaz Bölgesinde Mutasyon Taraması

İmatinib'e direnç gösteren KML hastalarında yapılan araştırmalarda Bcr-Abl proteininin abl kinaz bölgesinde tespit edilen L248V, G250E, Q252H, Y253F, E255K, E255V, D276G, E279K, V299L, T315I, F317L, M351T, F359V, L384M, H396P, H396R, G398R, F486S ikincil mutasyonların (40), oluşturduğu Muz imatinib dirençli K562-Ir hücrelerinde varlığının araştırması planlanmıştır. Bu bağlamda RNA izolasyonu ve cDNA eldesinden sonra PCR metodu için dizayn edilen primerlerin optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. K562 ve K562-Ir hücreleri için tekrarlanan bu deneyler sonucu elde edilen PCR ürünleri DATEKS tedarikçi firması aracılığı ile Macrogen (Kore) firmasına 3 farklı zamanda örnekler gönderilerek sekans analizleri yapılmıştır. Primerlerin optimizasyonu öncelikle HEK hücre hattında gerçekleştirilmiş daha sonra K562 ve K562-Ir hücrelerinde tekrar edilmiştir.

3.6.6.1 RNA İzolasyonu

Gereçler:

- Nucleospin RNA II kiti (Cat. No: 740955.50)
- Hücre kültürü gereçleri
- β -merkapttoetanol
- % 96'lık ve %70'lik etanol
- Standart masa üstü mikrosantrifüj (Eppendorf centrifuge 5417 R).
- Mikrosantrifüj tüpleri
- Santrifüj (Eppendorf santrifuge 5417 R)

Kit içeriği :

- Liziz tamponu RA1
- Yıkama tamponu RA2
- Yıkama tamponu RA3 (konsantre)
- Membran tamponu MDB
- rDNase reaksiyon tamponu
- rDNase
- Filtreli tüpler
- Toplama tüpleri

Yöntem :

Çalışma solüsyonlarının hazırlanması

- ✓ rDNase 540 µl RNase-free suda seyreltili. Alikatlanarak - 20°C 'ye kaldırıldı.
- ✓ Yıkama tamponu RA3'e 50 ml %96'lık etanol eklendi.

1. Yüzeye yapışan hücreler tripsinizasyon ile resüspanse edilip 600 x g'de 5 dk çöktürüldü. 1 kez PBS ile yıkanarak tekrar pellet elde edildi.
2. 350µl RA1 tamponu 3.5µl β-merkaptöetanol ile karıştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine eklendi ve vortekslendi.
3. Lizat mor filtreli tüplere aktarıldıktan sonra toplama tüpü yerleştirilip 1 dk 11,000 x g de santrifüjlendi.
4. Filtreli tüp atıldı. Toplama kabına 350 µl %70'lik etanol eklendi ve pipetaj yapıldı.
5. Örnek mavi filtreli RNA bağlama tüplerine aktarıldı. Toplama tüpü yerleştirildikten sonra 30 sn 11,000 x g 'de santrifüjlendi.
6. 350µl MBD tamponu eklendi. 1 dk 11,000 g 'de santrifüjlendi. Toplama kabında biriken süpernatant atıldı.

7. 90µl rDNase reaksiyon tamponu ile 10 µl rDNase karıştırıldı. Karışımın 95 µl'si filtrenin ortasına damlatıldı. 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
8. 200µl yıkama tamponu RA2 eklendi. 30 sn 11,000 x g 'de santrifüjlendi.
9. 600µl yıkama tamponu RA3 eklendi. 30 sn 11,000 x g 'de santrifüjlendi.
10. 250 µl yıkama tamponu RA3 ile 2dk 11,000 x g 'de tekrar santrifüjlendi.
11. Filtre santrifüj tüpüne aktarıldı. 60-40µl RNase'dan arındırılmış su eklendi. 1 dk 11,000 x g'de santrifüjlendi.
12. RNA örnekleri konsantrasyon ölçümü için kullanıldıktan sonra -80 °C 'ye kaldırıldı.

3.6.1.1 RNA Miktarı Tayini

İzole edilen RNA'ların belli oranda seyreltme yapıp, spektrofotometre ile 260 ve 280 nm de absorbansları ölçüldü.

A_{260} x dilüsyon faktörü x 40 µg/ml formülü ile RNA konsantrasyonları hesaplandı.

A_{260} / A_{280} oranı hesaplanarak RNA'ların saflık dereceleri belirlendi. (En iyi saflık için A_{260} / A_{280} oranının 1,8 ile 2,0 arasında olması beklenir.)

3.6.6.2 RNA'dan cDNA eldesi

Gereçler:

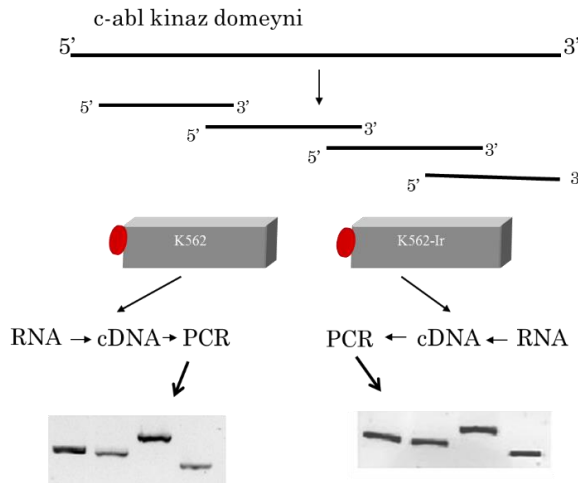
- Total RNA
- M-MuLV Reverse Transkriptaz enzim (Fermentas #K1611)
- 5X reaksiyon tamponu
- Oligo dT Primer
- 10 mM dNTP mix
- Ribolock RNase inhibitor
- DEPC'li su

Yöntem:

1. Kalıp cDNA'dan yaklaşık 1 µg olacak şekilde örnek alındı. 1 µl oligo dT primer, 3 µl dNTP ile karıştırıldı toplamda 20 µl olacak şekilde üzeri DEPC'li su ile tamamlanarak 1. karışım elde edildi.
2. 1. karışım 70 °C'de 5 dk inkübe edildi. Buz üzerine alındı.
3. 5X reaksiyon tamponundan 8µl, RNase inhibitörden 2 µl, DEPC'li sudan 8 µl , mMLV Reverse transkriptase enzimden 2µl alınarak toplamda 20 µl'lik ikinci karışım elde edildi. 37 °C'de 5dk inkübe edildi.
4. 1. ve 2. karışımlar birleştirildi. Termal cyclor aletinde; 37 °C'de 1h, 70 °C'de 10 dk inkübe edildi.
5. Elde edilen cDNA örnekleri -20°C 'ye kaldırıldı.

3.6.6.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR/PZR)

K562 dirençli hastalarda daha önce bahsi geçen mutasyonların barındığı yaklaşık 1600 bç uzunluğundaki abl mRNA kinaz bölgesini çoğaltmak için bu bölge birbiriyle örtüşen dört ayrı parçaya bölünmüş (P1, P2, P3, P4) bu parçalara özgü primer çiftleri dizayn edilmiştir. Her bir primer seti için ayrı PCR reaksiyonları yapıp jelde görüntülenmiştir. Yapılan işlemlerin özeti Şekil 14'de verilmiştir.



Şekil 14: abl gölgesi için planlanan sekanslama tekniğinin özeti

Dizayn edilen primer çiftlerinin sekansları aşağıdaki gibidir:

P1. F= 5'ACAAGCCCACTGTCTATGGTGTGT 3'

R= 5'AGATCTGAGTGGCCATGTACAGCA 3'

P2. F= 5' ACAGAGATCTTGCTGCCCCGAAACT 3'

R= 5' TCAGAGGGATTCCACTGCCAACAT 3'

P3. F= 5' TGAAGACCTTGAAGGAGGACACCA 3'

R= 5' AGCAATACTCCAAATGCCCAGACG 3'

P4. F= 5' ACGTCTGGGCATTTGGAGTATTGC 3'

R= 5' CAAGGTACTCACAGCCCCACGGAC 3'

Gereçler:

- 10X Maxima ® Hot Start Taq buffer (Fermentas #EP0602)
- Maxima ® Hot Start Taq DNA Polymerase (Fermentas #EP0602)
- 25 mM MgCl₂
- Distile su
- Primer çifti
- Kalıp DNA
- dNTP mix
- elektroforez tankı
- agaroz
- etidyum bromür
- Fermentas 6X Orange yükleme boyası #R0631

Yöntem :

1. PCR tüpleri içerisinde her primer çifti için aşağıda verilen reaktif değerleriyle 25'er µl reaksiyon karışımı hazırlandı. Hazırlanan PCR tüpleri aşağıda belirtilen termal döngüde inkübe edildi.

Termal döngü:

95°C 5'

95°C 30''

58°C 30'' (x 33)

72°C 45''

72°C 7'

(+4 °C)

Reaktifler	µl
H ₂ O	14,25
10X Buffer	2,5
Primer çifti	0,5+0,5
25 mM MgCl ₂	1,5
10mM dNTP	0,5
cDNA	5
HotStartTaq polimeraz	0,25

2. Elektroforez işlemi için %1,5 luk agaroz jel hazırlanmıştır.

0,45g agaroz 30 ml TBE içinde çözündürülmüştür. Mikrodalgada kaynatılıp hafif soğumuMası beklendikten sonra içerisine 2µl etidyum bromür eklenerek elektroforez tankına konmak üzere taraklı kalıba dökülmüştür. 40dk jelin donması beklenmiştir. Jel elektroforez tankına yerleştirilip, tank belirli seviyeye kadar TBE ile doldurulmuştur.

3. Jelin ilk kuyusuna Roche 100bp marker yüklenmiştir. Her bir 5µl'lik PCR ürünü, 1µl 6X yükleme boyasıyla karıştırılarak jelin kuyularına sırasıyla yüklenmiştir. 50V da elektroforez uygulanıp görüntülenmiştir.

Sekans karşılaştırmalarında internet tabanlı MultAlin programı kullanılmıştır.

3.6.7 Proliferasyon Deneyleri

3.6.7.1 Proliferasyon Hız Ölçümü

Rutin hücre kültürü sırasında edindiğimiz gözlemlere göre dirençli hücreler normal K562 hücrelerinden çok daha yavaş çoğalmaktadır. Bu gözlemin doğrulanması amaçlanmıştır.

Proliferasyon deneyi daha önce canlılık testleri bölümünde anlatılan WST-8 temelli yapılmıştır.

Gereçler:

- Sigma Aldrich Cell Counting Kit-8 #96992
- 96-well plate
- Plate okuyucu (450nm)

Yöntem:

1. Hücre flasklarından örnekler alınarak 1200 rpm de 5 dk santrifüjlendi.
2. Hücreler fenol red siz RPMI da resüspanse edilip canlı hücre sayımı yapıldı. (Fenol red'li ortamda da yapılabilir)
3. 0, 24, 48, 72 saat için 4 ayrı 96-well plate hazırlandı.
4. Her plate e K562 hücre süspansiyonundan 1000, 1500, 2000, 2500, 5000, 7500, 10000, 15000, 20000 hücre ekilip üzeri 100 µl ortama tamamlandı. K562 süspansiyonundan 5000 er canlı hücre 3 kuyuya, K562-Ir süspansiyonundan 5000 er canlı hücre 6 kuyuya eklenip üzerleri 100 µl ortama tamamlandı. K562-Ir kuyularından 3 tanesine ayrıca 10 µM imatinib eklendi (DMSO mikatrının %0.1 i geçmemesine dikkat edildi). Ayrıca bir kuyuya hiç hücre eklenmeyip 100 µl ortam eklenerek Blank olarak ayrıldı.
5. 0. (ekim yapılır yapılmaz), 24. , 48. ve 72. saatlerde kuyulara 10'ar µl WST-8 eklenerek 1-3 saat inkübasyon sonunda 450nm de optik dansiteler ölçüldü.
6. Ölçüm sonuçlarına göre hücre sayısı belli olan kuyular için kalibrasyon eğrisi çizildi. Eğri denklemi baz alınarak test kuyularındaki hücre sayısı hesaplandı.
7. 0. Saatteki hücre sayıları 5000 varsayılarak veriler normalize edilip grafik haline getirildi.

3.6.7.2 Hücre Döngüsü Deneyi

K562-Ir hücrelerinde gözlenen proliferasyon yavaşlamasının deneysel olarak ispatlanması amaçlanmıştır.

3.6.7.2.1 Senkronizasyon:

Amaç: Kültürdeki hücrelerin her biri aldıkları hücre dışı sinyaller doğrultusunda farklı zamanlarda bölündüklerinden tüm hücreleri aynı anda bölünmeye teşvik edecek ortam oluşturulmalıdır. Ortamdaki besinin uzaklaştırılmasıyla bölünen hücreler de dahil tüm hücrelerin G1 fazında arreste girmeleri amaçlanmaktadır. G1 fazı arrestinden sonra ortama tekrar besin eklenerek hücrelerin aynı anda hücre döngüsünde ilerlemesi beklenmektedir.

Yöntem:

- 1) Hücreler 450g de 5 dk santrifüjlenerek kültüre edildikleri ortamdan uzaklaştırılır.
- 2) Pellet üzerinde kalan süpernatant kalıntısı otomatik pipetör ile çekilir.
- 3) Pellet üzerine %1 L-glutamin, %1 P/S içeren serumsuz RPMI ortamı eklenerek resüspanse edilir.
- 4) Literatürde K562 hücre hattının ikilenme zamanı ort. 24h gösterildiğinden hücreler 24 saat serumsuz ortamda inkübe edilerek aç bırakılır.
- 5) 24 saatin sonunda flasklara %15 oranında FBS eklenerek tekrar 24 saat inkübe edilir.
- 6) DNA miktarı belirli saat aralıklarında FACS analizi ile ölçülür.

Senkronizasyon deneyleri hem 24 saat hem 36 saat açlık durumunda yapılmıştır.

3.6.7.2.2 DNA Miktarının Akım Sitometrisi İle Ölçülmesi

Gereçler:

BD Cell Cycle Test Plus Kit kullanılmıştır.

Kit içeriği:

1X Buffer solüsyonu: Sodyum sitrat, DMSO içeren tampon hücre eldesi ve dondurma (tercihen) işleminde kullanılır.

A solüsyonu: Tripsin ve non-iyonik deterjan ile hücre membranını parçalar.

B solüsyonu: Sitrata buffer içerisinde tripsin inhibitörü ve ribonükleaz A ile tripsini inhibe eder ve RNA'ları parçalar.

C solüsyonu: sitrata buffer içerisinde propidüM iodide (PI) boyası ile DNA boyanır.

Yöntem:

1. Tüm solüsyonlar oda sıcaklığına getirilir. (C solüsyonu hariç)
2. 25cm² 'lık flasklarda kültüre edilmiş K562 ve K562-Ir hücreleri 5dk 300g de santrifüjlenir.
3. Pellet üzerine 500µl 1X buffer solüsyonu eklenerek yavaşta pipetaj yapılır.
4. 5dk 300g de santrifüjlenir.
5. Pellet tekrar aynı miktarda buffer solüsyonu ile resüspanse edilip tekrar santrifüjlenir.
6. Pellet üzerine 100µl A solüsyonu eklenir. 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilir
7. A solüsyonunda resüspanse edilmiş hücreler üzerine 80µl B solüsyonu eklenir. 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilir.
8. A ve B solüsyonu içerisindeki hücreler üzerine 80µl soğuk C solüsyonu eklenir. 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilip ışık geçirmeyen bir kaba alınarak soğukta saklanır.
9. 3 saat içinde akım sitometrisi analizi yapılır.

Grafiklerde 24 ve 36 saat aşıktan sonra %15 FBS eklenmiş hücrelerin belirtilen saatlerdeki DNA miktarları karşılaştırılmıştır.

3.6.8 FISH Yöntemi

Bcr-Abl füzyon geninin kromozomal düzeyde görüntülenip amplifikasyonlar açısından değerlendirilmesi için K562 ve K562-Ir hücrelerinde FISH tekniği uygulanmıştır. ABL1 ve BCR gen bölgeleri için fluoresan işaretli DNA problemleri kullanılmıştır. ABL1 için prob kırmızı işaretli ve 9q34.11-9q34.12 bölgesine özgüdür. BCR bölgesi için ise prob yeşil işaretli ve 22q11.22-22q11.23 bölgesine özgüdür.

Yöntem:

1. Kırmızı kapaklı tüplere 8'er mililitre hücre süspansiyonu konuldu.

2. 85µl kolsemid eklendi. 25 dk 37°C de inkübe edildi.
3. 10dk 1200rpm de santrifüjlendi. Ortam uzaklaştırıldı.
4. 37C de ısıtılmış 0.075M KCl solüsyonu hafif vorteks eşliğinde damlatılarak eklendi.
5. 30dk 37°C inkübe edildi.
6. 10dk 1200rpm de santrifüjlendi. Ortam uzaklaştırıldı.
7. Pellet üzerine vorteks eşliğinde 7ml Carnoy fiksatif eklendi. (Carnoy fiksatif: 3 hacim metanol: 1 hacim glacial asetik asit)
8. Lamlar üzerinde damlatma yapıldı. 24h oda sıcaklığında kurutuldu.
9. Lamlar üzerinde elmas kalemle damlatma alanı çizildi.
10. Lamlar oda sıcaklığında 2X SSC de 2dk bekletildi.
11. 2şer dakika %70, %85, %100 etanol serilerinden geçirilip kurumaya bırakıldı.
12. Cytocell aquarius BCR/ABL Translocation Dual Fusion Prob önce oda sıcaklığında sonra 37C de lamellerle birlikte ısıtıldı.
13. 10'ar µl prob lamlarda belirlenen alanların ortasına damlatıldı. Üzerine ısıtılmış lameller kapatıldı.
14. Lamellerin etrafı yapıştırıldı.
15. 2dk 75°C de denatürasyon işlemi yapıldı
16. Örnekler 37C de karanlık nemli ortamda bir gece inkübasyona bırakıldı. Nemli ortam için lamların bulunduğu şale, içi su dolu kaplara konulup üzeri alüminyum folyo ile kapatılıp 37C ye kaldırıldı.
17. Ertesi gün lamel kaldırılıp örnekler 0.4X SSC (pH 7.0) solüsyonda 2dk 72°C de inkübe edildi.
18. Lamlar kurutulup 2X SSC, %0.05 Tween-20 solüsyonda oda sıcaklığında 30 saniye bekletildi.
19. Lamlar kurutulup DAPI ile muamele edildi.

3.6.9 Hücre Hattı Karakterizasyonu

Deneylerimizi sürdürdüğümüz K562 ve dirençli K562-İr hücrelerimizin, K562 hücre hattı kökenli olduğunun, 8 farklı STR bölgesinin karşılaştırılmasıyla ispatlanması amaçlanmıştır. Yurtdışı hizmet alımı yapılmıştır. Örnekler isimsiz gönderilmiştir.

1. K562 ve K562-Ir kültür flasklarından örnek alınıp 1200 rpm 5dk santrifüj edildi. Supernatan atıldı.
2. Hücrelerden, Roche High Pure PCR Template Preparation Kit #11796828001 kullanılarak DNA izole edildi.
3. 80'er µl Elution Buffer içerisindeki örneklerden 5'er µl alınarak jelde yürütüldü.
4. Görüntüleme sonrasında DNA'nın degrade olmadığı gözlemlendikten sonra geri kalan örnekler Türkiye DATEKS firması aracılığı ile Almanya'daki DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) Authentication Service'e postalandı.

3.6.10 Western Blot Yöntemiyle Protein Düzeyinde Gen Ekspresyonu Tayini

Hücrelerden elde edilen total protein lizatında, aranan proteinin olup olmadığını ve varsa ne kadar olduğunu (o genin ekspresyonun düzeyi) spesifik antikorlar yardımıyla gösteren bir yöntemdir. Hücreler lize edilip proteinler izole edilir, ayrıştırma jeline eşit miktarda yüklenen lizatlar elektriksel akım yardımıyla yürütülür, membrana transfer edilir, ekspresyon düzeyi merak edilen proteine özgü antikorla muamele edilir ve X-ray filmde görüntülenir. Detaylar aşağıda anlatılmıştır. Burada anlatılan Western blot tekniği laboratuvarımızda kullanılan genel protokoldür.

- Kontrol grubu ve belirlenen dirençli K562-Ir hücre flasklarından hücre lizatı elde edildi.
- Pierce BCA Protein Assay kullanılarak lizatların protein konsantrasyonları ölçüldü.
- Mini-PROTEAN 3 Cell cihazı kullanılarak SDS-PAGE jel elektroforezi yapıldı.
- Biorad Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell cihazı kullanılarak yarı kuru SDS-PAGE jelinde PVDF membranına proteinler transfer edildi.
- Primer antikor ile membran inkübe edildi.
- Pierce Supersignal Dura Chemiluminescent Substrat, Biorad Western Clarity kitleri ile deteksiyon yapıldı.

3.6.10.1. Hücre Lizatının Hazırlanması

Gereçler :

- Lizis Tamponu RIPA (içerik için bkz. Ek1)
- Proteaz ve fosfataz inhibitörleri
- Buz
- PBS
- Santrifüj tüpü
- Mikrosantrifüj tüpü
- Soğutmalı mikrosantrifüj (Eppendorf centrifuge 5417 R)

Yöntem :

1. Süspanse hücreler 15 ml santrifüj tüpüne alınıp 600 G hızda 5 dk santrifüj edilir.
2. Üst faz atıldıktan sonra pellet PBS ile resüspanse edilerek tekrar santrifüj işlemi yapılır (yıkama).
3. Pelletin üç katı hacimde lizis tamponu eklenir.
4. 10 dakika buz üzerinde inkübe edilir.
5. Sürekli pipetaj yapıp köpürtülür.
6. Tüpler -80 dereceye atılıp çıkartılarak 4-5 kez çöz-dondur işlemi uygulanır. (mekanik parçalama)
7. 45 dakika en yüksek hızda (15000 G) +4°C’de santrifüjlenir.
8. Üst fazdaki sıvı (lizat) başka bir santrifüj tüpüne aktarılıp kullanılana kadar -80°C’de saklanır. Pellet atılır.

3.6.10.2 Protein Konsantrasyon Ölçümü

BCA Protein Assay BCA (bicinchronic acid) temelli, kolorimetrik olarak total protein konsantrasyonu ölçülmesi için geliştirilmiş bir yöntemdir. BCA ile ortamdaki bakır iyonunun şelat oluşturması mor renkli bir ürünün açığa çıkmasını sağlar. Bu renk değişimi spektrofotometrede 562nm dalga boyunda absorbans vermektedir. Konsantrasyonları bilinen örnekler ile absorbans değer grafiği elde edilir. Konsantrasyonu bilinmeyen örneklerin absorbansları bu grafikte karşılaştırılarak protein konsantrasyonları belirlenir.

Gereçler:

- Pierce BCA Protein Assay Kit
- Plate okuyucu (BioTek Synergy HT)

Yöntem:

1. 50 kat hacimde A solüsyonu, 1 kat hacimde B solüsyonu karıştırılarak reaksiyon karışımı hazırlandı.
2. 96 well plate'in belirlenen gözlerine 200'er µl reaksiyon karışımı eklendi.
3. 8000, 6000, 4000, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 ve 125'er µg/ml konsantrasyonlardaki standartlardan 10'ar µl reaksiyon karışımlarının bulunduğu kuyulara eklenmiştir. Bir adet kuyu "blank" olarak bırakılmıştır. Konsantrasyonu belirlenmek istenen lizattan 10µl alınarak reaksiyon karışımının bulunduğu bir başka kuyuya eklenmiştir.
4. 30 dakika 37 C°'de inkübe edilmiştir.
5. Plate okuyucuda 562nm dalga boyunda karşılaştırmalı absorbanlar ölçülmüştür. Konsantrasyonlar µg/ml cinsinden belirlenmiştir.

3.6.10.3 SDS-PAGE Jel Elektroforezi

Proteinlerin büyüklüklerine göre ayrıştırıldığı bir yöntemdir. Lizat jel kuyularına yüklendikten sonra elektrik akımı yardımıyla proteinler önce yükleme jelinden daha sonra ayrıştırıcı jelden geçerek sıralanırlar.

Gereçler:

- Mini-Protean 3 Cell cihazı (katalog numarası: 165-3301)
- Elektroforez tankı
- Güç kaynağı
- %10'luk ayrıştırıcı jel ve %5lik yükleme jeli (bkz. Ek 1)
- Yürütme tamponu
- Biorad 2X Laemni buffer veya Nupage 4X LDS Sample buffer
- 50ml'lik ve 15ml'lik tüp
- Protein markeri (İnvitrogen-SeeBlue Pre-Stained Standart, katalog numarası: LC5625)

Yöntem:

1. %10'luk ayrıştırıcı jel iki cam arasına (1mm) döküldü. Jel yüzeyinin düzgün donması için üzeri izopropanol ile kaplandı. 15 dakika jelin polimerleşmesi beklendi.
2. İzopropanol döküldü. 5 dk alkolün buharlaşması beklendi. Üzerine %5'lik yükleme jeli döküldü. Yükleme kuyuları oluşturmak üzere tarak yerleştirildi. 15 dakika jelin polimerleşmesi beklendi.
3. Protein konsantrasyonları belirlenen hücre lizatlarından gerekli miktarda (20-40µg olacak şekilde) örnek mikrosantrifüj tüplerine alındı. 1:1 oranın 2X Laemni buffer veya 1:3 oranında 4X LDS Sample buffer lizatla karıştırıldı. 95 °C 'de (laemni için) veya 75°C 'de (LDS sample için) 5 dakika inkübe edilerek proteinler denatüre edildi.
4. Tüpler spin edildi.
5. Lizatlar ve 5-10µl protein markeri, belirlenen kuyulara eklendi.
6. Elektroforez tankı yürütme tamponu (running buffer) ile dolduruldu.
7. 70V'da 30 dakika, 110V'da 1,5 saat elektrik akımı uygulandı.

3.6.10.4 Jelden Membrana Islak Yöntem ile Protein Transferi (Wet Transfer)

Jeldeki proteinlerin elektrik akımı yardımıyla kağıt bir membrana aktarılmasını sağlar.

Gereçler:

- Thermo Scientific Vep-2 wet transfer system
- 0.45µM PVDF membran
- Transfer tamponu (%20 metanol)
- Wattman ince blot kağıdı

Yöntem:

1. Jel büyüklüğünde PVDF kağıdı kesildi.
2. Membran 1dk %98 metanolde aktive edildi.
3. Jel, membran ve Wattman kağıtları transfer tamponu ile ıslatıldı.
4. Cihazın transfer kasetinin siyah yüzüne sırasıyla sünger, iki ince Wattman, jel, membran, iki ince wattman, sünger konuldu.

5. Oluşabilecek hava kabarcıklarını yok etmek adına katlı yapının üzerine cam pipet yardımıyla birkaç kez bası uygulanıp kaset kapatıldı.
6. Kaset wet transfe buffer la kaplı tanka yerleştirildi.
7. Tank içerisine ısınmayı engellemek üzere buz kalıpları yerleştirildi.
8. Tank soğuk odaya taşındı ve 300mA sabitlenerek yaklaşık 120-150V aralığında 1-3 saat transfer yapıldı.

3.6.10.5 Blotlama Yöntemi:

- Transferi yapılmış membran
- Çalkalayıcı
- Süt tozu
- TBS-T (%0.01 Tween-20)
- Primer antikor

1. Membran 1 kez TBS-T den geçirildi.
2. %5 süt tozu barındıran 10 ml TBS-T hazırlanıp membran üzerine döküldü. Kaset çalkalayıcıda RT'de 1 saat bloklandı. (blocking)
3. Membran, 1:250-1:1000 oranında primer antikor %5 BSA veya %5 süt tozu barındıran TBS-T solüsyonunda overnight +4C de inkübasyona bırakıldı.
4. Membran çalkalayıcıya yerleştirilip 15'er dakika 3 kez TBS-T ile yıkandı.
5. 10 ml %5 süt tozu barındıran TBS-T içerisine 1:1000 oranında HRP-işaretli (horse radish peroksidaz) sekonder antikor eklendi.
6. Hazırlanan sekonder antikor solüsyonu membran üzerine eklendi. Kaset çalkalayıcıya yerleştirilip RT 'de 1,5 saat inkübe edildi.
7. 10'ar dakika üç kez TBS-T yıkama yapıldı.

3.6.10.6 Deteksiyon Yöntemi:

Sekonder antikorlara HRP (Horseradish peroxidase) bağlanmıştır. HRP, deteksiyon kitleri yardımıyla lüminesans oluşturur. Fotoğraf filmi veya CCD kamera ile aranan proteine ait ışımlar gözlenebilmektedir.

Gereçler:

- SuperSignal West Dura Chemiluminescent Substrate Kit (Pierce- katalog no: 34080)
- Film kaseti (Kodak, Biomax- katalog no: 115193)
- Poşet dosya
- Film (Kodak, Biomax Light Film – katalog no: 8761520, Kodak X-Ray Film Katalog no: 8143059)
- Developer
- Fixer
- Deterjanlı su

1. SuperSignal West Dura Chemiluminescent Substrate Kit'in peroksit ve enhancer solüsyonları 1:1 oranında karıştırıldı.
2. Membran kasetine karışım eklenip 5 dakika inkübe edildi.
3. Membran süzdürülüp aynı boyutlarda kesilmiş poşet dosya içerisine yerleştirildi ve film kasetine konuldu.
4. Karanlık odada, fotoğraf filmi kasete yerleştirildi. 1 dk (exposure time) kaset içerisinde bekletildi. Film kasetten çıkartılıp 45 saniye developer solüsyonundan 30 saniye fixer solüsyonunda bekletilip son olarak deterjanlı sudan geçirildi. 1 dakikada görüntü elde edilemediyse bekleme süreleri , 5, 10, 15 veya 30 dk olarak denendi.

3.6.11 Akım Sitometrisi İle Yüzey Belirteçlerinin Tayini

Dirençli K562-Ir hücrelerindeki morfolojik farklılıklar göz önüne alınarak hücrelerin yüzey belirteçleriyle tiplendirilmesi amaçlanmıştır.

Kullanılan antikorlar:

- Cell Signaling Stemlight Pluripotency Marker Antibody kit #9094 kullanılmıştır. Kit içerisinde 3 adet antikor mevcuttur: SSEA-4, TRA-1-60 ve TRA-1-81 mouse mAb
- R&D Systems #SC017 Human Mesenchymal Stem Cell Marker Antibody Panel kullanılmıştır. İçerisinde anti-CD19, CD44, CD45, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166, Stro-1 antikorları mevcuttur. Panele göre CD19 ve CD45 hematolojik belirteçler olduğundan mezenkimal kök hücre için negatif, diğer CD44, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166, Stro-1 belirteçler pozitif olmalıdır.

- CD3, CD10, CD13, CD15, CD19, CD22, CD24, CD33, CD34, CD38, CD45, CD62E, CD65, CD117, CD123 yüzey antikorları Dokuz Eylül Üniversitesi Hematoloji Anabilim dalı Prof.Dr. Güner Hayri Özsan ve Onkoloji Anabilim Dalı Dr.Halil Ateş'ten temin edilmiştir. Antikorlar aşağıda liste halinde verilmiştir.

Antikor	Proteinin işlevi	Marka/ürün kodu
Anti-CD3	T hücre antijen reseptörü	BD Bioscience
Anti-CD10-PE	Nötral endopeptidaz ALL antijeni ,granülosit/stroma hücreleri/ B hücreler ve fibroblastlarda ifade	BD Bioscience #332776
Anti-CD13-PE	GM-progenitör hücreler/ granülosit, monosit ve mast hücrelerinde ifade	BD Biosciences #347406
Anti-CD15, SSEA-1	Granülositlerde ve monositlerde ifade Fagositoz ve kemotaksisde görev alır.	BD Bioscience
Anti-CD19-APC	B-lenfosit farklılaşma antijeni	BD Bioscience #345791
Anti-CD22-PE-Cy TM 5	B-hücre aktivasyonu	BD Pharmingen #555425
Anti-CD24-PE	B-hücrelerde ve granülositlerde ifade B-hücre çoğalması ve olgunlaşması	BD Pharmingen #555428
Anti-CD24-PE	B-hücrelerde ve granülositlerde ifade	BD Pharmingen #560991

	B-hücre çoğalması ve olgunlaşması	
Anti-CD33-APC	Monositler, aktive T-hücreler, myeloid progenitörler ve mast hücrelerinde ifade	BD Bioscience #345800
Anti-CD34-PE-Cy™7	Hematopoietik progenitör hücreler, vasküler endotel, stroma hücreleri ve embriyonik fibroblastlarda ifade	BD Bioscience #348811
Anti-CD38-PE	Aktive T hücreleri ve olgunlaşmış B hücrelerde (plazma hücreler), monosit, makrofaj, dendritik, NK, myeloid ve eritroit prekürsör ve bazı epitel hücrelerde ifade	BD Bioscience #345806
Anti-CD45-PerCP (2D1)	Hematopoietik kökenli tüm nükleuslu hücrelerde ifade Leukocyte Common Antigen (LCA)	BD Bioscience #345809
Anti-CD62E-PE	E-selektin, endotel-lökosit adezyon molekülü, Endotel hücrelerde ifade	BD Pharmingen #551145
Anti-CD65-FITC	E-selektin ligandı,	EBioscience Inc. #11-0659-41

	Gelişim sürecinde myeloid hücrelerde, granülosit ve monositlerde ifade	
Anti-CD117-PE (104D2)	c-kit, hematopoietik progenitör hücreler, mast hücreleri (mast cell growth factor), hepatosit hücreleri	BD Bioscience #332785
Anti-CD123- PE-Cy TM 5	Hematopoietik progenitör hücreler	BD Pharmingen #561009

Yöntem:

1. K562, ilaçsız K562-Ir, ilaçlı (10µM) K562-Ir, HL-60, ilaçlı (10µM) HL-60 hücre örneklerinden 10'ar ml hacimde örnek alınıp kırmızı kapaklı tüplere aktararak santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
2. Pellet üzerine 1 ml PBS eklendi. %37,5 formaldehit'ten 100'er µl eklenip (%3,75 seyrelti) hücreler fiks edildi.
3. Hücre yüzey antijenlerine bakılacağı için permeabilizasyon yapılmadı.
4. Hücreler çötürüldü. Süpernatant atıldı.
5. 50 ml PBS'e 0,25 g BSA eklenerek inkübasyon tamponu hazırlandı. Tampondan 1'er ml pelletler üzerine eklenerek yıkama yapıldı (x2)
6. Her örnek için 4'er tüp hazırlandı (20 tüp) her tüpe 100'er µl hücre süspansiyonu eklendi. Her gruba SSEA-4 için 1:200, TRA-1-60 için 1:100 ve TRA-1-81 için 1:200 oranında primer antikor eklendi. Her gruptan birer tüp background kontrol için antikor eklenmeden ayrıldı.
7. 1 saat oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı.
8. 2'şer ml inkübasyon tamonu ile resüspanse edilip santrifüj edildi (yıkama)
9. 16 tüp için (4 tüp kontrol olmak üzere ayrılmıştı) inkübasyon tamponunda 1:1000 ikincil antikor eklendi (Mouse)
10. 30 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

11. Santrifüjlenip PBS ile yıkama yapıldı (X2)
12. Örnekler FACS analizine götürüldü.

Tüm gruplarda antikor kullanılmayan örneklerin histogramları background kabul edilerek antikor konulan örneklerin histogramları background ile karşılaştırılmıştır.

3.6.12 İmmü Floresan Yöntemi İle Protein Düzeyinde Gen Ekspresyonu Tayini

Fikse edilmiş hücrelerin, incelenmek istenen proteine özgü floresan boya işaretli-antikoruyla muamele edilmesi ve dijital ortamda görüntülenmesi esasına dayanır. Aşağıda anlatılan yöntem tezimizde kullandığımız e-kaderin primer antikoruna için olsa da laboratuvarımızda kullanılan temel immü floresan protokolüne örnektir.

1. 2 adet 4 kuyucuklu slayt flaklara 250'şer µl poli-L-lizin damlatılarak kültür kabininde 15 dk inkübe edildi. Poli-L-lizin uzaklaştırılıp 1 kez steril su ile yıkanıp 1-2 saat kuruma bırakıldı.
2. Her bir lamdaki kuyuların ilk ikisine K562 hücre süspansiyonundan, üçüncüsüne K562-İr hücre süspansiyonundan 250'şer µl eklendi. Ayrıca K562 hücre kuyusundan birine 5µM imatinib eklendi. Lamalar ertesi güne kadar inkübatörde bekletildi.
3. Ortamlar boşaltılıp hücreler üzerine %4'lük paraformaldehit damlatıldı (fiksasyon). 15 dk oda sıcaklığında (RT) inkübe edildi
4. 3 kez PBS ile yıkama yapıldı.
5. PBS içerisine %0,1'lik TritonX-100 eklendi. Karışım, hücreler üzerine damlatılıp 15 dk RT de inkübe edildi (permeabilizasyon).
6. 2 kez PBS ile yıkama yapıldı.
7. Kuyular boşaltılıp üzerlerine PBS ile hazırlanan %5'lik BSA bloklama solüsyonu eklenip 30 dk RT da inkübe edildi.
8. Bloklama solüsyonu boşaltılıp %1 BSA içeren yeni bloklama solüsyonuna; her kuyuya 1:200 oranında e-cadherine (ab1416, Abcam) primer antikor eklenip kuyulara dağıtıldı. +4C de overnight (geceboyu) inkübe edildi.
9. Primer antikor boşaltılıp 3 kez PBS ile yıkama yapıldı.
10. Bloklama solüsyonunda 1:200 oranında anti-mouse-FITC sekonder antikor eklenerek 1 saat çalkalayıcıda inkübe edildi.

11. Sekonder antikorlar boşaltılıp tekrar 3 kez PBS ile yıkama yapıldı.
12. Kuyular 3µM DAPI ile 2-3 dk muamele edildi.
13. Kuyular 1 kez dH₂O ile yıkandıktan sonra lam üzerindeki kuyu çerçevesi söküldü.
14. Lam üzerindeki bölmeler üzerine birer damla mounting medium konulup lamel kapatıldı.
15. DAPI ve FITC e uygun filtrelerde floresan mikroskopide görüntülendi.

3.6.13 Senesens Deneyi

Hücrelere, literatürde K562 hücrelerini senesense soktuğu bilinen DNA hasarına yol açan doxorubicin verilerek senesens (drug-induced senescence) cevapları karşılaştırılmıştır. Cell Signaling #9860 Senescence Assay kit kullanılmıştır. Yöntem aşağıdaki şekilde uygulanmıştır.

1. Hücreler deneyden 3 gün önce 6-well plate lere ekilmiştir. K562, ilaçlı K562-Ir, ilaçsız K562-Ir hücreleri kontrol olarak normal RPMI da üretilmiş. Diğer gruba son konsantrasyonu 50nM olacak şekilde senesens indükleyici ajan olarak Doxorubicin eklenmiştir. 3 gün sonra tüm ortamlar tazelenmiştir.
2. 7.gün hücrelerdeki ortamlar uzaklaştırıldı.
3. 1X PBS ile yıkama yapıldı.
4. 10X fiksatif solüsyondan su ile 1X hazırlanıp 1'er ml kuyulara dağıtıldı
5. 15dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
6. PBS ile 2X yıkama yapıldı.
7. B-galactosidase Stainin Solution hazırlandı.
 - i. 930µl 1X Staining Solution
 - ii. 10µl Staining Supplement A
 - iii. 10µl Staining Supplement B
 - iv. 50µl 20mg/ml X-gal in DMSO
8. Solüsyonun pH değeri 5N Hcl ile 5.9-6.1 aralığına indirildi.
9. Kuyulara B-gal solüsyonu eklendi. Plate'in kenarları parafilm ile sarılıp 37°C CO₂'siz inkübatörde 12-16 saat (overnight) inkübasyona bırakıldı.
10. Ertesi gün solüsyon içerisinde bırakılarak görüntülü inverted mikroskopla görüntülendi.

3.6.14 Farklılaştırma Deneyleri

Dirençli K562-Ir hücrelerindeki morfolojik farklılıklar göz önüne alınarak hücrelerin mezenşimal kök hücre özellikleri gösterdiği yönündeki hipotezimizin, hücrelerin belirli şartlar altında mezenşim kaynaklı hücrelere dönüşüp dönüşmediğinin gösterilmesi amaçlanmıştır. İlk olarak adiposit ve osteosit farklılaştırma deneyleri yapılmıştır.

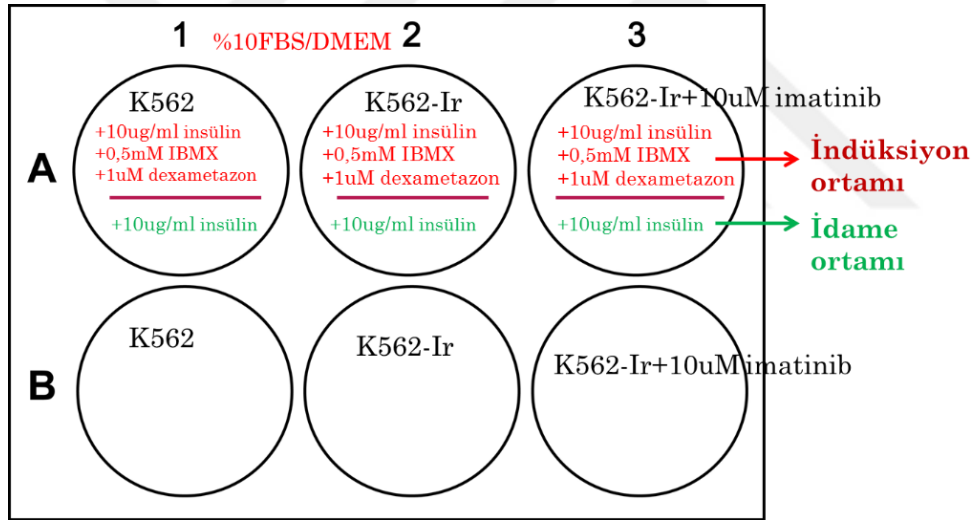
3.6.14.1 Adiposit Farklılaştırma Yöntemi:

1. K562-Ir hücreleri 1200 rpm de 5 dk santrifüj edildi. RPMI da resüspanse edildi.
2. 6-well plate e K562, K562-Ir ve K562-Ir +10 μ M imatinib hücreleri dublike şekilde ekildi.
3. Ayrıca yağ hücresine dönüşebilen mouse embriyonel fibroblast hücre hattı 3T3L1 de pozitif kontrol olarak ayrı bir 6-well plate'e ekildi.
4. İlk 3 gün birer kuyu K562, K562-Ir, K562-Ir+10 μ M imatinib kuyusu RPMI indüksiyon ortamı ile muamele edildi:
5. İndüksiyon ortamı: 0.5mM isobutylmethylexanthine (IBMX), 1 μ M Dexmethasone, 10ug/ml insulin %10 FBS %1 L-Glutamin %1 P/S RPMI veya DMEM
6. İkinci seri hücre grubuna hiçbir kimyasal eklenmedi.(Kontrol grubu) 3 gün sonunda hücreler plate santrifüjünde 5dk 1200 rpm de santrifüjlendi. İndüksiyon ortamı pipetaj ile çekilerek yerine *RPMI idame ortamı* eklendi:
7. İdame ortamı: 10ug/ml insulin, %10 FBS, %1 L-glutamine, %1 P/S RMPI veya DMEM
8. 3 gün sonra ortam DMEM indüksiyon ortamı ile değiştirildi.
9. 4 gün sonra DMEM indüksiyon ortamı uzaklaştırılarak DMEM idame ortamı eklendi.
10. Yukarıdaki şekilde indüksiyon ve idame ortamlar dirençli ve K562 hücrelerine 21 gün, 3T3L1 hücrelerine ise 15 gün boyunca uygulandı.
11. Bahsi geçen süreler sonunda kültür kapları yağ asitlerini kırmızı görünmesini sağlayan Oil Red ile boyandı.

3.6.14.1a Oil Red Boyama:

1. 300mg toz halindeki Oil Red O 100ml izopropanol ile solüsyon haline getirildi (Stok Solüsyon)
2. 3 birim Oil Red Solüsyonu 2 birim dH₂O ile karıştırıldı (working solution)
3. Kuyulardaki hücreler üzerine 2'şer ml %60 isopropanol eklenip fiksasyon için 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
4. Fiksatif atılıp kuyulara 1,5 ml Oil Red working solüsyonu eklendi. 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
5. dH₂O ile 4 kez yıkandı.
6. Hücrelerin kurumasını engellemek için kuyulara tekrar dH₂O eklenerek kameralı inverted mikroskopta görüntüleme yapıldı.

Deney planı Şekil 15'te verilmiştir.



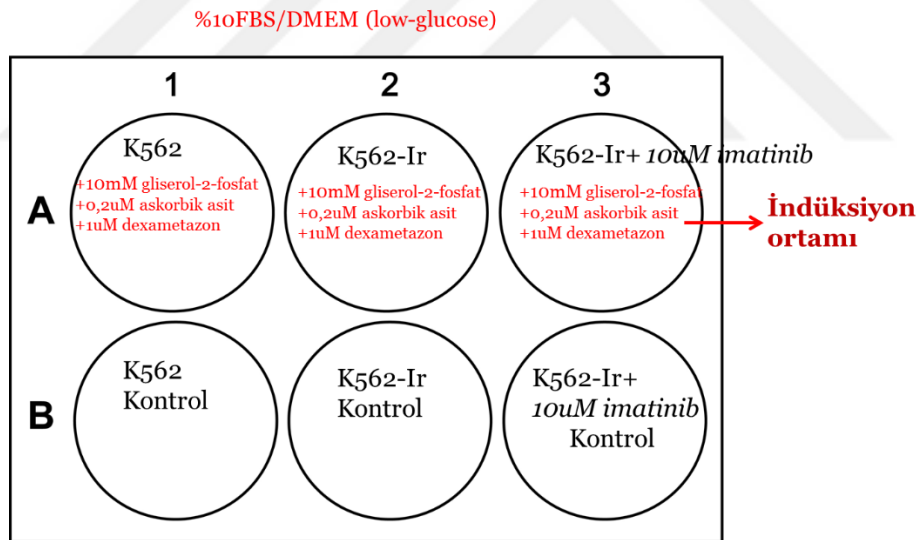
Şekil 15: Adiposit farklılaştırma yöntemi deney planı

3.6.14.2 Osteosit Farklılaştırma Yöntemi:

Millipore Mesenchymal Stem Cell Osteogenesis Kit #SCR028 kullanıldı.

1. Kit içerisinde bulunan her biri 150µg/ml olan (stok) Tip I kollajen ve vitronektin'den 6 ml'de her biri 12µg/ml olacak şekilde PBS ile seyreltilmek üzere ayrı tüplere alındı.
2. Hazırlanan karışımdan 6-kuyulu kapların her kuyusuna 1ml eklendi. 1 gün oda sıcaklığında bekletildi

3. Ertesi gün kuyular karışımdan uzaklaştırılıp 1X PBS ile yıkandı.
4. Kuyulardan ikisine biri kontrol olmak üzere K562 ve kuyulardan dördüne ikisi kontrol olmak üzere K562-Ir hücreleri ekildi.
5. K562-Ir hücrelerinin bir grubuna (2 kuyu) 10µM imatinib eklendi. Diğer iki kuyudaki K562-Ir hücreleri ilaçsız bırakıldı.
6. Kültür ortamı olarak düşük glukozlu DMEM %10 FBS %1 P/S %1 L-glutamin kullanıldı.
7. Kontrol hücrelerine sadece bu ortam kullanılırken diferansiyasyon kuyularına ortama ilaveten 0.1µM deksametazon, 0.2µM askorbik asit 2-fosfat, 10mM gliserol-2-fosfat eklendi (indüksiyon ortamı). İlaç barındıran K562-Ir kontrol ve test kuyularına ayrıca 10µM imatinib eklendi.
8. İndüksiyon ve kontrol ortamları 3-4 günde bir tazelendi.
9. İşlemlere 3 hafta devam edildikten sonra hücrelerdeki kalsiyumu turuncu renklendiren Alizarin Red boyaması yapıldı.
10. Aynı işlemler 15. ve 30. günlerde akım sitometrisi analizleri yapılmak için tekrar edildi.



Şekil 16: Osteosit farklılaştırma yöntemi ve akım sitometrisi ile tayini deney planı

3.6.14.2a Alizarin Red Boyama

1. 6-kuyulu kaplardaki ortamlar uzaklaştırıldı.
2. Hücreler üzerine %70 etanol eklenerek oda sıcaklığında 1 saat fiksasyon yapıldı.
3. Alkol çekilip 2 kez 5 dk dH₂O ile yıkama yapıldı.
4. Su uzaklaştırılıp kuyulara 1,5ml Alizarin Red (Millipore) solüsyonu eklendi.

5. 30dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra boya uzaklaştırıldı.
6. 4kez dH₂O ile yıkama yapıldı.
7. Kuyulara tekrar su konularak kameralı inverted mikroskop ile görüntüleme yapıldı.

3.6.14.2b Akım sitometrisi

Literatürde osteocalcin ekspresyonunun indüksiyondan sonra ilk 15 gün içerisinde arttığı ve sonrasında azaldığı yönünde bilgi olduğundan ikinci bir osteocyte marker da deney setine eklenmiştir. R&D Human Osteocalcin PE- conjugated Antibody Monoclonal Mouse IgG1Clone # 190125, Human Osteopontin PE- conjugated Antibody Monoclonal Mouse IgG2A Clone # 223126, Mouse IgG1 Isotype Control-PE, Mouse IgG2A Isotype Control-PE Isotype Control antikorları kullanılmıştır. Deney düzeneği 15 ve 30 günlük olmak üzere iki set olarak kurulmuştur. Deney 2 kez tekrar edilmiştir.

3.6.15 Gen Ekspresyonu Mikro dizin (Microarray) Analizi

K562-Ir hücrelerindeki direnç mekanizmalarını açıklamaya yardımcı olmak üzere tüm genlerin mRNA düzeyinde ekspresyon profilinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem:

1. Atasal K562 hücreleri (K), 3 hafta ilaçsız ortamda üreyen K562-Ir hücreleri (I w/o i), sürekli 10µM imatinibli ortamda üreyen yüzen hücreler (I) ve aynı flasttaki yere yapışan mekik hücrelerden (M) 1.5 milyon hücre sayılıp eppendorflarda çötürüldü.
2. Pelletler 500µl Ambion RNAlater solüsyonunda resüspanse edildi.
3. Örnekler Danimarka AROS firmasına İllumina platformunda HumanHT-12 v.4 Ekspiration BeadChip ile analiz edilmek üzere gönderildi. RNA izolasyonu firma tarafından her grup için üç tekrarlı olacak şekilde yapıldı.
4. 1 ay sonunda ham veri internet ortamında elimize ulaştırıldı.
5. Ham veriler firma tarafından internet ortamında ulaştırılan Illumina GenomeStudio programı kullanılarak analiz edildi. Ham verilerin arka plan düzeltmeleri, kuantil normalizasyonu ve varyans-stabilize edici dönüşümü ile, R (sürüm 3.0.2, Statistical

Computing için R Vakfı, Viyana, Avusturya; <http://www.r-project.org>) içindeki “LUMI” paketi kullanılarak gerçekleştirildi.

6. Bu ön işlemde sonra algılama filtresinden (p-değeri <0.01) geçen problemler değerlendirilmeye alındı. Problem anotasyonları lumi tarafından nuID kullanılarak dönüştürüldü.
7. Gruplar arasında farklı eksprese edilen genler, LIMMA (Mikroarray Verileri İçin Lineer Modeller) kullanılarak tanımlandı. Bir gen, FDR ile ayarlanmış p-değeri 0.05'den düşük olduğunda, LIMMA tarafından “farklı eksprese olan” olarak ifade edildi.
8. Farklı olarak eksprese edilen genler kat-farkı (fold change) ile tekrar filtrelendi. Belirgin derecede daha yüksek (≥ 2 kat değişiklik) eşik değerinin (threshold) üstündeki bir orana sahip genler, farklı eksprese olan genler olarak rapor edildi ve listelendi.
9. FEG listeleri (farklı eksprese olan genler listesi) dört farklı çevrimiçi anotasyon aracı ile (GORILLA, WebGestalt, PANTHER, DAVID) gen ontolojileri açısından analiz edildi.

Ham verilerin istatistiksel analizi için Sabancı Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi Biyoinformatik Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof. Dr. Uğur Sezerman ve asistanı Ahmet Sinan Yavuz’dan destek alınmıştır.

3.6.15.1 Mikrodizin Analizinin Yorumlanmasında İnternet Tabanlı Biyoinformatik Araçların Kullanılması

Ekspresyon düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde değişmiş problemlerin, biyolojik açıdan taşıdığı anlamların ortaya konması için ücretsiz ve çevrimiçi olarak sunulan “WebGestalt”, “DAVID”, “PANTHER” ve “GORilla” fonksiyonel anotasyon araçları kullanıldı. Bu araçlar sayesinde, belirli bir listedeki birbiriyle ilintili genlerin gruplandırılıp, gen ontolojisi (Gene Ontology-GO) çözümlemesinde yani hangi gen kümelerinin hangi biyolojik süreçte yer aldıkları, hangi hücresel bölgede hangi moleküler fonksiyona sahip oldukları istatistiksel olarak skorlanır (Enrichment Analysis). Araçlardaki istatistiksel analizler, internet sitesinin analizler için uygun gördüğü varsayılan anlamlılık sınırlarında veya daha üstünde tutulmaya özen gösterilmiştir. Ekspresyon analizi anlamlandırılırken yukarıda bahsi geçen dört online araç birlikte değerlendirilmiştir. Bu biyoinformatik araçların kullanımı ile ilgili Sabancı Üniversitesi Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi öğretim üyesi Prof.Dr. Uğur Sezerman ve doktora öğrencisi Ahmet Sinan Yavuz’dan destek alınmıştır.

Anotasyon araçlarının internet siteleri ve kullanılan ayarlar aşağıdaki gibidir:

- WebGestalt: <http://www.webgestalt.org/option.php>, *Organism*:hsapiens; *Method of interest*: ORA analysis; *Functional database*: Gene Ontology/Biological Process; *Gene ID type*: Gene symbol; *Reference Set for Enrichment Analysis*: illumina humanht 12 v4
- DAVID version 6.8: <https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>, *Identifier*: Official Gene Symbol; *Background*: Homo sapiens; *Analyse Type*: Functional Annotation Clustering; *Gene ontology*: GOTerm BP Direct
- PANTHER: <http://www.pantherdb.org/> ; *List Type*: ID list; *Organism*: Homo sapiens; *Analysis*: Functional classification viewed in pie chart
- GOrilla: <http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il/> ; *Organism*: Homo sapiens; *Running mode*: Single ranked list of genes; *Ontology*: Biological Process

Her sitedeki analizler için gen sembollerini içeren listeler yüklenmiş, tür olarak homo sapiens seçilmiştir. “Biological Function” sınıflandırması üzerinde durulmuştur. İstatistiksel olarak en anlamlı gruplar değerlendirilmiştir. Her sitenin kendi “default” analiz ayarları değiştirilmemiştir.

3.6.16 Kantitatif PCR

A. Mikroarray ile ekspresyon analizi verilerine göre FEG listelerinin (dirençli hücre gruplarında referans grup olan wild-type K562’dekinden farklı eksprese olan genlerin listesi) en başındaki ve en sonundaki (ekspresyonu en fazla artmış ve en fazla azalmış) genlerden 15 tanesi seçilip Real-Time PCR yöntemi ile microaraydeki ekspresyonlarının doğrulanması amaçlanmıştır.

B. K562 ve K562-Ir hücrelerinde BCR-ABL gen amplifikasyonu açısından karşılaştırılması amaçlanmıştır.

A.

3.6.16.1 RNA Eldesi

1. Roche High Pure RNA izolasyon kiti ile K562 ve K562-Ir hücrelerinde RNA izolasyonu yapıldı.
2. Picodrop analiz sistemi ile RNA ölçüldü.

3. Elde edilen Total RNA'nın bir kısmı spektrofotometrik ölçüm, geri kalanı ise ters transkriptaz ile cDNA sentezi yapmak için kullanıldı.
4. RNA'ların konsantrasyon ve saflık tayinleri 260 nm ve 280 nm'deki absorbansları Picodrop (Picodrop, Picopet01) ile spektrofotometrik olarak saptandı. A260/A280 oranından faydalanarak RNA saflık değerleri elde edildi. En iyi sonuç için RNA'ların saflıkları 1.6-1.8 arasında olmasına dikkat edildi. Protein veya DNA bulaşı olan RNA'lar saf dışı bırakıldı.

3.6.16.2 cDNA Sentezi

1. Fermentas cDNA sentez kiti #K1612 kullanıldı.
2. Her reaksiyon için 1 µg RNA kullanıldı.
3. İşlemler termal döngüleyici (cycler) Eppendorf.... yardımıyla kit önerileri doğrultusunda yapıldı. Total RNA, "Random primer" ve su içerisinde hazırlandıktan sonra 70°C'de 5 dk inkübe edildi.
4. Daha sonra karışıma 5X reaksiyon tamponu, ribonükleaz inhibitörü ve "M-MuLV Reverse Transcriptase" eklenip, 25°C'de 10 dk ve ardından 42°C'de 60 dk inkübe edilerek 70°C'de 10 dk inkübasyon ile sonlandırıldı.

3.6.16.3 Q-PCR

Kantitatif PCR reaksiyonları için Roche Light Cycler Syber Green FastStart #12 239 264 001 kit veya Thermo Scientific DyNAmo Flash Syber Green qPCR Kit #F-415L kullanılmıştır. Primerler Entrez ve Ensembl gen bankalarında yer alan diziler üzerindeki korunmuş bölgelere özgü olan web tabanlı "IDT Oligodesign" programı (www.idtdna.com) kullanılarak, PCR ve gerçek zamanlı PCR primerleri kriterlerine uygun olacak şekilde tasarlandı.

1. Primerler DATEKS firmasından hizmet alımı yapılarak edinilmiştir.
2. Termal döngü, bir kez yapılan 95°C (10dk) aktivasyon basamağından sonra, 95°C de denatürasyon, 55-65°C aralığında annealing ve 72°C de extension amplifikasyon basamakları 30-35 kez tekrarlanacak şekilde ayarlanmıştır. Kullanılan her primer

çifti için optimizasyon yapılmış, amplifikasyon basamaklarındaki süreler ve annealing basamağındaki derece her primere özgü değiştirilmiştir.

- Her reaksiyonda internal kontrol olarak B-actin veya GAPDH primerleri kullanılmıştır. Ayrıca negatif kontrol olarak tüpe cDNA yerine su konulmuştur.
- Her reaksiyonda Melting curve analizi yapılmıştır.
- Analizler için Roche Capillaire LightCycler 2.0 kullanılmıştır.
- K562/ GAPDH: reference calibrator, K562/ seçili gen: reference unknown, K562-Ir/GAPDH: target calibrator, K562-Ir/seçili gen: target unknown olarak analiz yapılmıştır.
- Reaksiyon bittikten sonra kapillerlerdeki örnekler santrifüjle eppendorflara aktarılıp ürün büyüklüğüne göre %1-%1.2'lik agaroz jelde yürütülmüştür. Görüntülenen bantlar doğru yerinde olup olmadığı ve *non-specific* bağlanma gözlenip gözlenmediği kontrol edilmiştir.
- Her gen en az üç kez çalışılmıştır.

Seçilen genler ve dizayn edilen primer çiftleri Tablo 2'deki gibidir:

Tablo 2: Mikrodizin analizinin kantitatif PCR ile doğrulaması için kullanılan primer dizileri

Gen Adı	NCBI Referans sekansı	Forward (ileri) 5'→3' Reverse (geri) 5' →3'	Ürün boyutu	Annealing derecesi
CD44	NM_001001391.1	F: CCATCCCAGACGAAGACAGT R: CCAGAGGTTGTGTTTGCTCC	169bp	59
EMP1	NM_001423.1	F: TTGCCCTCCTGGTCTTCGTG R: TAGCCGTGGTGATACTGCGTT	166bp	62
S100A10	NM_002966.2	F: TGTAGAGATGGCAAAGTGGG R: TTTATTGAGGGCAAGGGGATG	336bp	57
BMP6	NM_001718.4	F: ACTCTGACCTGTTTTTGTGGA R: TGTTGTAATCTGAAGCACTGGA	354bp	58
IGFBP5	NM_000599.2	F: TTCCACCCATTCTCCCTTTG R: GTAGTTCCTGGCTCAGTCTTT	104bp	57
PBX1	NM_002585.1	F: CCAGTGAGGAAGCCAAAGAGGA R: TGGGAGTTGAGGGCGAGTTAG	207bp	62
ALDH1A2	NM_170697.1	F: TTCAGTTGTGCCTCTTCCTCTC	175bp	60

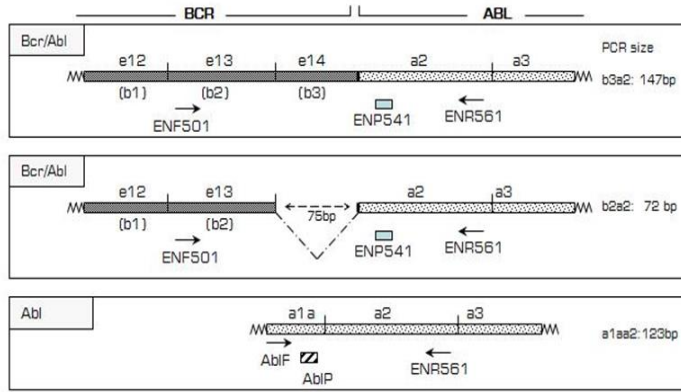
		R: CATGGTTGCAAGAACTGCCC		
EPCAM	NM_002354.1	F:GCTGGTGTTATTGCTGTTATTGTGG R: GCCTTCTCATACTTTGCCATTCTCT	104bp	61
SRGN	NM_002727.2	F:ACTTGAATCGTATCTTCCCACCTTT R:GTAATCCTGTTCCATTTCCGTTAG	116bp	58
VCX	NM_013452.2	F: TGTGGACACTGGGAGAAGGAAG R: TGGTCAACACTCCACTACCC	106bp	59
PTGS1	NM_080591.1	F: CCGGAGTCTCTTGCTCTGGT R: TCACACTGGTAGCGGTCAA	165bp	59
DPYSL2	NM_001386.4	F: GGACATCAGCGAGTGGCAT R: GCAATCCGTTAGCTGGAAG	121bp	60-56
BTG2	NM_006763.2	F: CTCCTCTAACCCTCCCCTCC R: GACTAGCCAGCCATCATCCC	207bp	60
PIM1	NM_002648.2	F: CTCCTCTGACTTGGGGACCT R: GGCTACCTGCTGCTCAAAAC	258bp	60
HOOK1	NM_015888.4	F: GGGAGGTGTTTATTGACTG R: TTGCTGGAACCTTTCGCCTT	244bp	55-58
HOXA10	NM_018951.3	F: CCTGATGAATCTCCAGGCGA R: GTCAGAACAAACCAGCCCT	170bp	59

- Herbir primer çifti için ayrı optimizasyon yapılmıştır.
- Her primer çifti en az 3 kez farklı zamanlarda çalışılmıştır.
- Relatif kantitasyon analizinde K562/GAPDH: reference calibrator, K562/seçilen gen: reference unknown, K562-Ir/GAPDH: target calibrator, K562-Ir /seçilen gen: target unknown olarak ayarlanmıştır.
- PCR reaksiyonları sonucunda elde edilen ürünlerin herbirinden 10'ar µl kullanılarak 6X DNA yükleme tamponu yardımıyla jelle yüklendi. %1'lik agaroz (Applichem, 5510UB) jelle kullanıldı. Jel içerisine 0.5 µg/ml etidyum bromür eklenerek DNA floresan olarak boyandı. Bantlar açılana kadar (30-60 dk) 50V'luk gerilim uygulanarak örnekler TBE ile dolu elektroforez tankında yürütüldü. Daha sonra amplifiye edilmiş olan DNA'lar transillüminatör ile UV ışığı altında DNA'ya interkale olan etidyum bromür aracılığı ile incelendi.

- Çoklu tekrarlarda yalnız jel görüntülemeye bant yeri doğru olan, smear ve non-spesific bant gözlenmeyen, melting curve analizi tek pik olan reaksiyon sonuçları doğru kabul edilmiştir.

B.

BCR-ABL amplifikasyonu için Prof. Dr. Hakkı Ogün SERCAN'ın TaqMan® kiti kullanılarak BCR-ABL kinaz dizisine özgü hidroliz probu ile kantitatif ekspresyon ölçümü yapılmıştır. Kullanılan primerler aşağıdaki tabloda dizileri ve açıklamalarıyla verilmiştir. RNA ve cDNA eldesi yukarıda anlatıldığı gibidir. Forward ve reverse primerler karıştırılarak mix olarak kullanılmıştır.



Primer Name	Primer/probe localization	Sequence 5'-3'
ENF501*	BCR, 3173-3193 ^a	TCCGCTGACCATCAATAAGGA
ENR561*	ABL, 277-257 ^b	CACTCAGACCTGAGGCTCAA
AblF	ABL, 155-174 ^b	AGATCTGCCTGAAGCTGGTG
ENP541*	ABL, 230-254 ^b	CCCTTCAGCGCCAGTAGCATCTGA
AblP	ABL, 200-226 ^b	CCTCGTCCCTCCAGCTGTATTCTGGAAG

^a X02596 (BCR), ^b X16416 (ABL)

- Major/minör Bcr-Abl Bcr forward primer
- Hem major/minor Bcr-Abl Abl hem sitoplazmik Abl reverse primer
- Sitoplazmik Abl forward primer
- Major/minör Bcr-Abl hidroliz probu
- Sitoplazmik Abl hidroliz probu

Şekil 17: BCR-ABL primer bilgisi. BCR-ABL kimerik geni için forward primerler BCR bölümünden reverse primerler ABL bölümünden seçilmiştir. Sitoplazmik ABL için primerler yalnız ABL'e özgüdür

- Relatif kantitasyon analizinde K562/ABL: reference calibrator, K562/BCR-ABL: reference unknown, K562-Ir/ABL: target calibrator, K562-Ir / BCR-ABL: target unknown olarak ayarlanmıştır.

Tablo 3: BCR-ABL Q-PCR koşulları

	K562		K562-Ir		Termal Cyclers Profili:
	Bcr-Abl	Abl	Bcr-Abl	Abl	
<i>dH₂O</i>	10ul	10ul	10ul	10ul	95C 10dk
<i>Reaksion mix</i>	4ul	4ul	4ul	4ul	95C 10sn
<i>primer</i>	1ul	1ul	1ul	1ul	58C 40sn x45
<i>prob</i>	1ul	1ul	1ul	1ul	72C 2sn
<i>K562 cDNA/ K562Ir cDNA</i>	4ul	4ul	4ul	4ul	+4C

3.6.17 MikroRNA (miRNA) Mikrodizin Analizi

3.6.17.1 RNA Eldesi:

Gereçler:

- Hücre kültürü
- PBS
- % 96'lık etanol
- Standart masa üstü mikrosantrifüj (Eppendorf centrifuge 5417 R).
- Mikrosantrifüj tüpleri
- “High pure” RNA izolasyon kiti (Roche - Cat. No. 11 828 665 001)

Kit içeriği:

- Liziz/Bağlama Tamponu
- DNase I
- DNase inkübasyon tamponu
- Yıkama tamponu I
- Yıkama tamponu II
- Elüsyon Tamponu
- Filtre tüpleri
- Toplama Tüpleri

Çalışma Solüsyonlarının Hazırlanması:

1. DNase I 0,55ml elüsyon tamponu içerisinde çözöldü. Alikatlanarak -20°C'ye kaldırıldı.
2. Yıkama tamponu I' e 20ml. % 96'lık etanol eklendi.
3. Yıkama tamponu II' ye 40ml. % 96'lık etanol eklendi.

3.6.17.2 Kültür Hücrelerinden Total RNA'nın İzolasyonu:

1. Yüzeye tutunarak üreyen hücreler tripsinizasyon ile yüzeyden kaldırıldı. Besi ortamı içerisinde homojenize edildi.
2. Hücreler 1100 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek çöktüröldüler.
3. 200µl PBS içerisinde süspanse edildiler.
4. Üzerine 400µl liziz/bağlama tamponu eklendi ve 15 sn. vortekslendi.
5. Filtre tüpü toplama tüpü içerisine yerleştirilip üzerine tüm hücre süspansiyonu eklendi.
6. 8000 g.'de 15 sn. santrifüjlendi. Toplama tüpünde biriken sıvı dököldü.
7. Bir ependorfta 90µl Dnase I inkübasyon tamponu ve 10µl Dnase I eklendi ve karıştırıldı. Karışım filtre tüpünün üzerine aktarıldı.
8. Oda sıcaklığında 15 dak. inkübe edildi.
9. 500µl Yıkama tamponu I eklendi.
10. 15 sn 8000 g.'de santrifüj edildi. Tüpte biriken sıvı dököldü.
11. 500µl Yıkama tamponu II eklendi.
12. 15 sn 8000 g.'de santrifüj edildi. Tüpte biriken sıvı dököldü.
13. 200µl Yıkama tamponu II eklendi.
14. 2 dk en yüksek hızda santrifüj edildi.
15. Filtre tüpü toplama tüpünden çıkarılıp temiz bir 1,5 ml.'lik mikrosantrifüj tüpe aktarıldı.
16. Filtre tüpü üzerine 50 -100µl elüsyon tamponu eklendi.
17. 1 dak. 8000 g.'de santrifüj edilerek RNA elde edildi.
18. İzole edilen RNA – 80 °C'de saklandı.

3.6.17.3 RNA Miktarı Tayini

İzole edilen RNA'ların belli oranda dilusyonları yapıp, spektrofotometre (Pharmacia Biotech, Ultraspec 2000) ile 260 ve 280 nm de absorbansları ölçüldü.

$A_{260} \times \text{dilüsyon faktörü} \times 40 \mu\text{g/ml}$ formülü ile RNA konsantrasyonları hesaplandı.

A_{260} / A_{280} oranının 1,8 ile 2,0 arasında olması RNA'nın saf olduğunun göstergesidir.

A_{260} / A_{280} oranı hesaplanarak RNA'ların saflık dereceleri belirlendi.

K562 ve K562-Ir hücreleri her bir tüpte $1 \mu\text{g}$ RNA olacak şekilde üçerli tüpler halinde (biyolojik tekrarlı) kuru buzda, Almanya/Berlin ATLAS Biolabs GmbH şirketine gönderilmiştir.

3.6.18 Üç-Boyutlu Hücre Kültürü

Multiselüler Tümör Sferoid (MTS) Modeli

Mültisellüler Tümör Sferoid (MTS) hücre kültürü modeli; tek-tabaka hücre kültürü modelinden yararlanılarak oluşturulmuş, üç boyutlu hücre kültürüdür. MTS modeli radyoterapi, immunoterapi, kemoterapi, anjiyogenez, direnç, invazyon, metastaz, gen ekspresyonu ve ekstraselüler matriks gibi kanser araştırmalarında farklı uygulamalarda kullanılmaktadır. Tümör sferoidleri, solid tümörlerin üç boyutlu büyüme ve organizasyonunu oldukça gerçekçi bir biçimde yansıtmakta ve bunun sonucunda tümörlerde söz konusu hücreler arası ilişkileri ve mikroçevresel koşulları çok daha net olarak ortaya koyabilmektedir.

3.6.18.1 Agarlı Ortam Hazırlanması

1. 3 gr. Select agar (Gibco Bil Kat no: 152-00391m) su içerisinde iyice erinyinceye kadar vorteks ile karıştırıldı.
2. 121°C 'de 1,2 atm basınç altında 15-20 dk otoklavda steril edildi. Kullanılacağı zaman agar alüminyum bir kap içine şişenin yarısına kadar su konduktan sonra eriyene kadar kaynatıldı.
3. Aynı kap içinde agar dondurulmadan ısısı 60°C ye ayarlandı. Kullanılacak ortam ısısı 37°C su banyosunda ısıtıldı.
4. 1:4 oranında (1 ml agar, 4 ml ortam) agar/ortam karışımı hazırlandı. Bir beher içine önce gerekli miktar agar sonra da ortam eklendi.

5. Köpürmeden karışım yapılarak seri bir şekilde agar donmadan 6-kuyucuklu kültür kaplarına (her bir kuyucuğa 1'er ml) karışımdan ilave edildi.
6. Karışım yavaşça tüm kuyucuklara yayılarak buzdolabına kaldırılıp iyice donması için 10 dk bekletildi.

3.6.18.2 Uygulama

Hücre kültürlerinden scrapper ile kaldırılan (yapışan hücreler için) ve süspanse hücreler RMPI ortamında 1×10^4 hücre/kuyucuk olacak şekilde süspanse edilerek agar ile kaplanmış 6 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. Değişik zaman periyotlarında sferoid çapı inverted mikroskop kullanılarak hesaplandı ve fotoğrafları çekildi. Yapılan analizler 3'er kez tekrar edildi.

Bu deneyler Ege Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji Anabilimdalı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.7 ARAŞTIRMA PLANI VE TAKVİMİ

Araştırma planı ve takvimi aşağıdaki şekilde tablo haline getirilmiştir.

Tablo 4: Araştırma planı ve takvimi

2011-2012	Literatür araştırması ve hücre kültürü idamesi
2012-2013	Atasal ve dirençli hücrelerde imatinible birlikte yeni nesil tirozin kinaz inhibitörlerinin uygulanması
2013-2014	Hücrelerin proliferasyon, hücre döngüsü, senesens ve yüzey molekülleri açısından karşılaştırılması
2014-2015	- Farklılaştırma ve sferoid oluşturma deneylerinin yapılması - mRNA ve miRNA tüm genom ekspresyon analizlerinin yaptırılması ve değerlendirilmesi - Western blot ve immünfloresans deneylerinin yapılması

2015	TUBİTAK 2214/A Doktora Yurtdışı Araştırma Bursu ile Fransa Paris Sud Üniversitesi Inserm U935 araştırma biriminde KML biyolojisi ile ilgili çalışmalar
2016-2017	• Verilerin değerlendirilmesi • Tez ve makale taslağı yazımı

3.8 VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Tezimizde kullandığımız Western blot ve immünfluoresan teknikleri, sferoid oluşumu gibi hücre kültürü teknikleri, senesens deneyi, akım sitometri ile yüzey belirteçleri deneyleri kalitatif olarak değerlendirilmiştir. Her deney seti kendi içerisinde en az üç kez tekrar edilmiştir. Mikrodizin verilerinin doğrulanması ve amplifikasyon deneylerinde kullandığımız Q-PCR tekniği, Roche Light Cycler cihazıyla gerçekleştirilmiş ve Ct değerlerinin istatistiksel analizi cihaz tarafından yapılmıştır. Her bir gen en az üç kez çalışılmıştır.

mRNA tüm genom ekspresyon analizi için (mikrodizin) firmaya dört farklı grup için üç ayrı örnek gönderilmiştir. Mikrodizinlemeden çıkan veriler önce firma tarafından sağlanan Illumina GenomeStudio programı kullanılarak analiz edildi. Ham verilerin arka plan düzeltmeleri, kuantil normalizasyonu ve varyans-stabilize edici dönüşümü ile, R (*sürüm 3.0.2, Statistical Computing için R Vakfı, Viyana, Avusturya; <http://www.r-project.org>*) içindeki “LUMI” paketi kullanılarak gerçekleştirildi. Bu ön işlemde sonra algılama filtresinden (p-değeri <0.01) geçen problemler değerlendirilmeye alındı. Prob anotasyonları lumi tarafından nuID kullanılarak dönüştürüldü. Gruplar arasında farklı eksprese edilen genler, LIMMA (Mikroarray Verileri İçin Lineer Modeller) kullanılarak tanımlandı. Bir gen, FDR ile ayarlanmış p-değeri 0.05'den düşük olduğunda, LIMMA tarafından “farklı eksprese olan” olarak ifade edildi. Farklı olarak eksprese edilen genler kat-farkı (fold change) ile tekrar filtrelendi. Belirgin derecede daha yüksek (≥ 2 kat değişiklik) eşik değerinin (threshold) üstündeki bir orana sahip genler, farklı eksprese olan genler olarak rapor edildi ve listelendi. FEG listeleri (farklı eksprese olan genler listesi) dört farklı çevrimiçi anotasyon aracı ile (GORİLLA, WebGestalt, PANTHER, DAVID) gen ontolojileri açısından analiz edildi. İnternet sitelerinin istatistiksel ilişkilendirmelerde kullandıkları temel (default) ayarlar değiştirilmedi.

3.9 ARAşTIRMANIN SINIRLILIKLARI

Araştırmamız *in vitro* bir çalışmadır. *İn vitro* gözlemler klinik yansımaları değerlendirmekte sınırlı kalmaktadır.

3.10 ETİK KURUL ONAYI

Etik Kurul'un 21.03.2013 tarih ve 955-GOA protokol numaralı 2013/10-14 karar numarası ile görüşülen projemiz etik açıdan uygun görülmüştür (EK1).



4. BULGULAR

4.1 Oluşturulan K562-Ir Hücreleri İmatinib ve Yeni Nesil Tirozin Kinaz İnhibitörlerine Dirençlidir

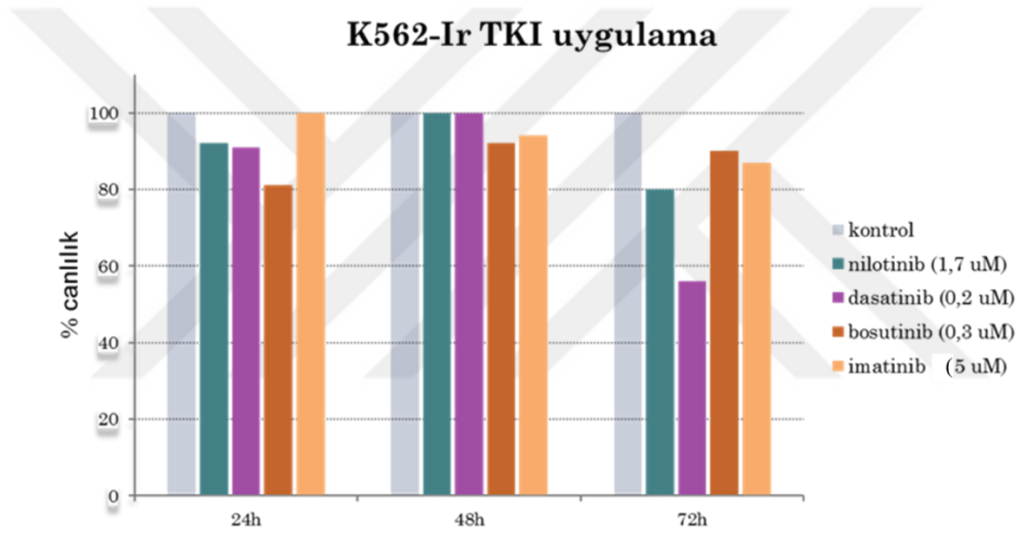
Yöntemde anlatıldığı gibi imatinib baskısı altında K562'nin klonal seçilimiyle elde ettiğimiz K562-Ir hücrelerinin imatinib ve diğer tirozin kinaz inhibitörlerine nasıl yanıt verdiğini araştırmak üzere nilotinib, dasatinib, bosutinib, ponatinib ve GNF-2 varlığında hücre ölüm düzeyleri incelendi. Deneylerde TKI'lerin klinik dozlarının kullanımına özen gösterildi. Hücreler üç gün boyunca imatinib (5µM), dasatinib (0,2µM), nilotinib (1,7µM), bosutinib (0,3µM), ponatinib (137nM) inhibitörlerinin literatür taraması sonunda belirlenen insanda günlük hap kullanımlarındaki en yüksek plazma konsantrasyonuna maruz bırakıldı⁸⁴⁻⁸⁷. Üç gün sonunda tripan mavisi canlılık testi uygulandı. GNF-2 klinik aşamaya geçmiş bir molekül olmadığından literatürde belirtilen IC50 dozu olan 273nM kullanıldı⁸⁸. İmatinib, nilotinib, dasatinib ve bosutinibin klinik doz deneylerinde yalnızca K562-Ir hücreleri kullanılmıştır. Ponatinib ve GNF-2 için K562 ve K562-Ir hücreleri kullanılmıştır. Daha sonra aynı ilaçların 10'ar µM yüksek dozları denendi. K562, ilaç eklenmiş K562, 10µM imatinibli ortamda barındırılan K562-Ir ve imatinibli ortama ek olarak daha fazla ilaca maruz bırakılan hücre gruplarıyla çalışılmış, 24. 48. ve 72. saatlerde Mitotracker Red/Annexin akım sitometrisiyle hücre ölümü profilleri çıkartılmıştır.

K562-Ir hücrelerinin (imatinib dirençli hücreler), klinik dozlarda diğer tirozin kinaz inhibitörlerine de dirençli olduğu gösterilmiştir. Şekil 18'de gösterildiği gibi 24. ve 48. saat ölçümlerindeki canlılık yüzdeleri nilotinib, dasatinib, bosutinib ve imatinib için %80'in üzerindedir. 72. saatte en çok etkiyi dasatinib göstermiştir ancak yine de canlılık yüzdesi %50'nin üzerinde seyretmektedir. Şekil 19'daki ponatinib klinik doz deneyinde K562 hücreleri 1nM, 1,5nM ve 137nM ponatinib varlığından ilk 24 saatten itibaren etkilenmeye başlamış, 72. saatte 137nM dozda canlılık neredeyse kalmamıştır. Öte yandan K562-Ir hücreleri 72 saat sonunda 1nM ve 1,5nM ponatinibden neredeyse hiç etkilenmemiş 137nM ponatinib hücrelerin ancak %30'unu etkilemiştir. Şekil 20'de K562-Ir hücrelerinde GNF-2 IC50 konsantrasyon uygulaması (273nM) bulgusunda K562 hücreleri 72 saat içinde canlılık yüzdesi dramatik şekilde düşerken K562-Ir hücrelerinde %60 civarında seyrettiği görülmektedir. Şekil 21'de K562 ile karşılaştırıldığında K562-Ir'in dasatinib, nilotinib ve GNF-2'in 10µM gibi, klinik kullanımın çok üstündeki yüksek konsantrasyonlarda (>100 kat) dahi etkilenmediği görülmektedir. Ponatinib ve bosutinib ise 10µM konsantrasyonda kullanıldığında (ponatinib

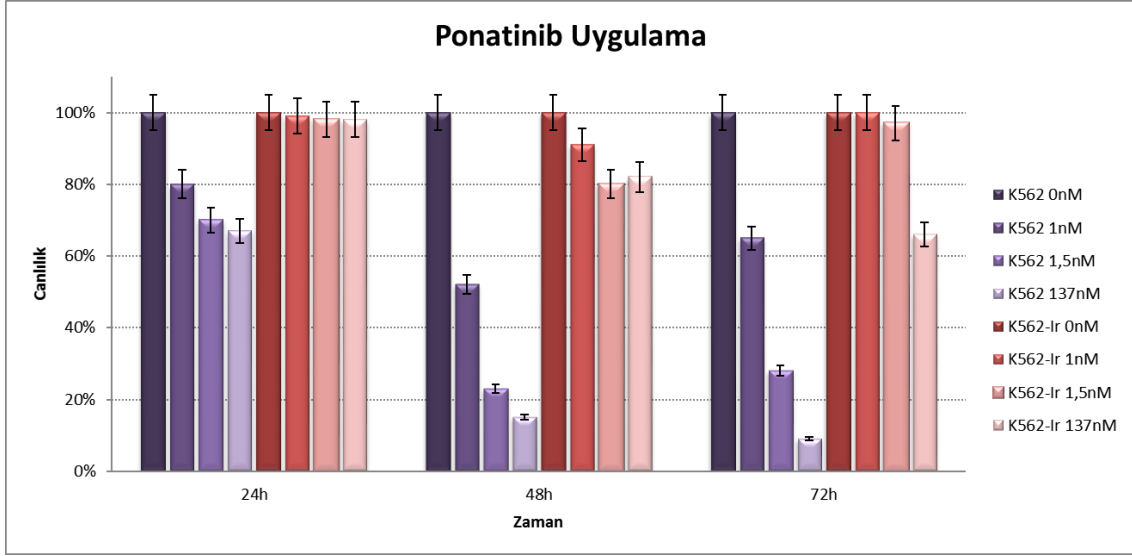
için klinik kullanımın 80, bosatinib için 30 katı) K562 ve K562-Ir hücrelerinin tamamını 72 saat içinde öldürmektedir. Ortamda imatinibin bulunup bulunmaması diğerk tirozin kinazların etkisini değiştirmemiştir. Çift doz imatinib (20μM) alan kuyularda K562-Ir hücrelerinin hiç etkilenmediği de göze çarpmaktadır.

Sonuç olarak oluşturulan K562-Ir imatinib dirençli hücrelerin imatinibe olduğu kadar diğerk yeni nesil TKİ'lere dirençli olduğu gösterilmiştir.

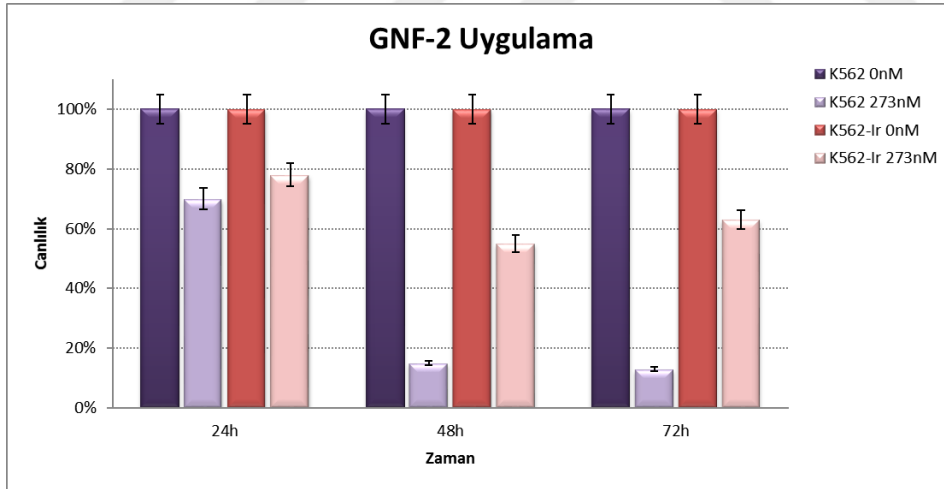
4.1.1 Klinik Doz TKİ Uygulamaları



şekil 18: K562-Ir hücrelerine nilotinib, dasatinib, bosutinib ve imatinib maksimum plazma konsantrasyon uygulamaları sonrası 24, 48 ve 72 saatlik tripan mavisi canlılık testi sonuç grafiği. Canlılık yüzdeleri kontrol gruplarındaki canlılık %100 olacak şekilde normalize edilmiştir

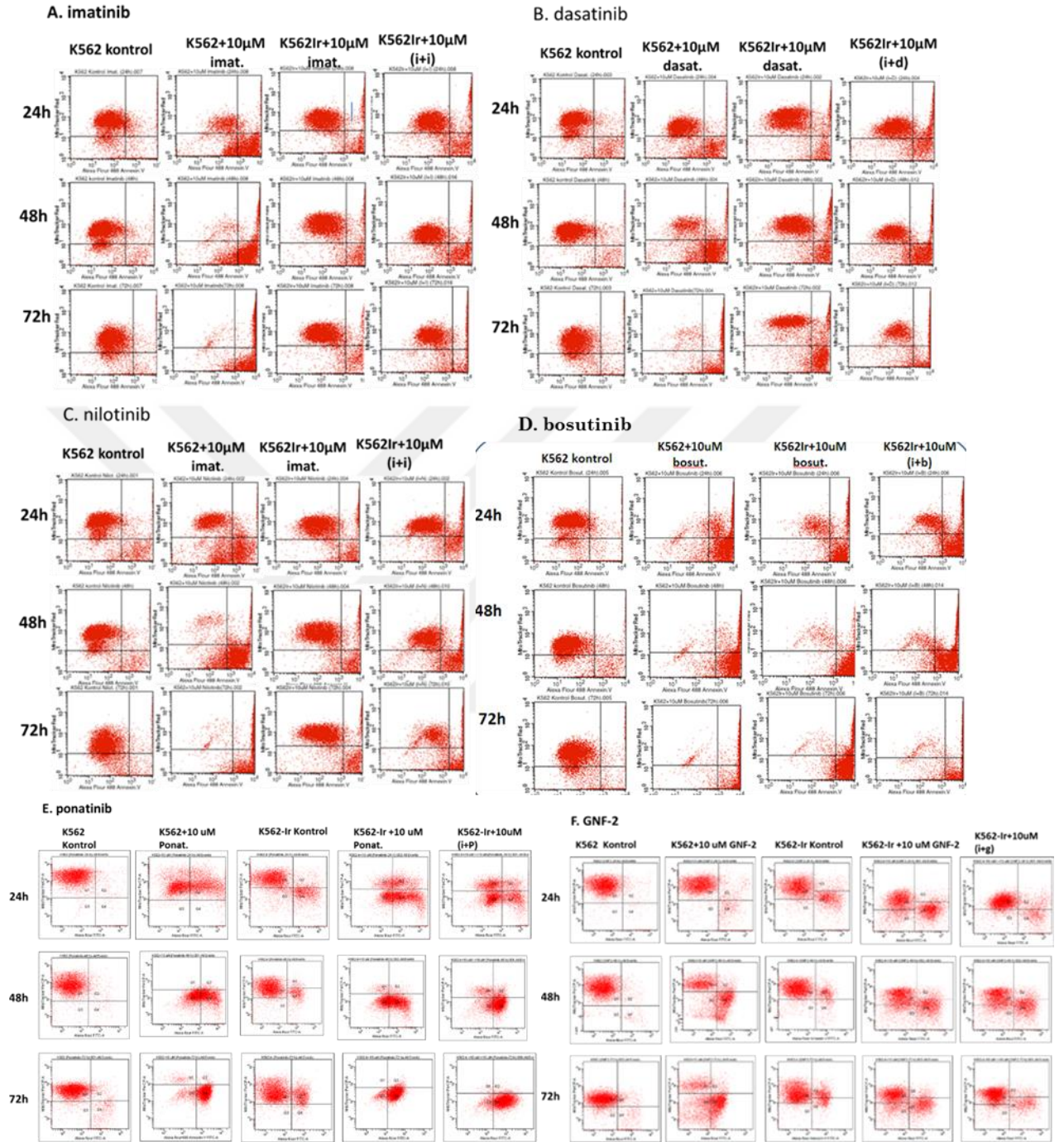


Şekil 19: K562 ve K562-Ir hücrelerinde 1nM, 1,5nM ve 137nM (Cmax) dozlarda ponatinib uygulamasının 24, 48 ve 72 saatlik tripan mavisi canlılık testi sonuç grafiği. Mor barlar K562 hücrelerini kırmızı barlar K562-Ir hücrelerini temsil etmektedir. Canlılık yüzdeleri kontrol gruplarındaki canlılık %100 olacak şekilde normalize edilmiştir.

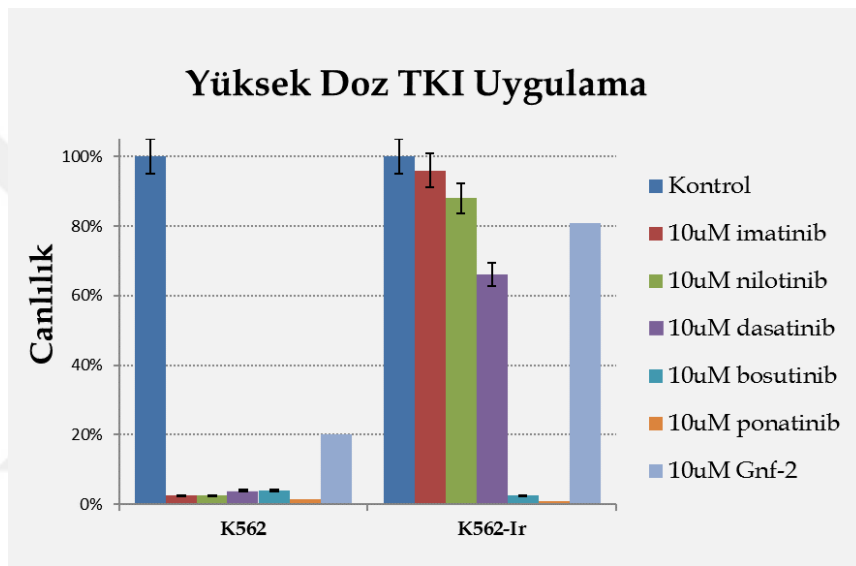


Şekil 20: : K562-Ir hücrelerinde GNF-2 IC50 konsantrasyon uygulamasının (273nM) 24, 48 ve 72 saatlik tripan mavisi canlılık testi sonuç grafiği. Canlılık yüzdeleri kontrol gruplarındaki canlılık %100 olacak şekilde normalize edilmiştir.

4.1.2 Yüksek Doz TKİ Uygulamaları



Şekil 21: Yüksek doz TKİ uygulamaları akım sitometri sonuçları. Tüm grafiklerin x aksı *Annexin V*, y aksı *Mitotracker red* ışımasını göstermektedir. A, B, C, D, E ve F grafiklerinde sırasıyla imatinib, dasatinib, nilotinib, bosutinib, ponatinib ve GNF-2 deneylerinin 24. 48. ve 72. saat Mitotraker red /Annexin V akım sitometrisi sonuçları sunulmuştur. **K562 kontrol:** atasal K562 hattı üç gün kültüre edilmiştir, **K562+10µM imat./dasat./nilot./bosu./pona./GNF-2:** atasal K562 hücreleri üç gün boyunca ayrı ayrı 10 µM TKİ'lere maruz bırakılmıştır. **K562-Ir+10µM imat./dasat./nilot./bosu./pona./GNF-2:** imatinib dirençli K562-Ir hücreleri üç gün boyunca ayrı ayrı 10µM TKİ'lere maruz bırakılmıştır. **K562-Ir+10µM (i+i)/(i+d)/(i+n)/(i+b)/(i+p)/ (i+g):** imatinib dirençli K562-Ir hücreleri 10 µM imatinibli ortamda kültüre edilmiş, ek olarak 10'ar µM imatinib (Σ 20µM imatinib), dasatinib, nilotinib, bosutinib,



Şekil 22: Yüksek doz TKİ uygulama tripan mavisi sonuç grafiği. K562 ve K562-Ir hücrelerine 72 saat 10'ar µM imatinib, nilotinib, dasatinib, bosutinib, ponatinib ve GNF-2 uygulaması sonrası tripan mavisi canlılık test sonuçları gösterilmektedir. Veriler kontrol v grubu %100 olacak şekilde normalize edilmiştir.

4.2 Abl Proteini Kinaz Bölgesinde Mutasyon Taraması

İmatinib direnci -tezimizin genel bilgiler kısmında detaylandırıldığı gibi- sıklıkla zaman içinde gelişen Bcr-Abl ikincil mutasyonlarıyla ilişkilendirilmektedir. K562-Ir hücrelerinin gösterdiği imatinib direncinin bu mutasyonların varlığına bağlı olup olmadığını araştırdık. KML hastalarında yapılan araştırmalarda bcr-abl proteininin abl kinaz bölgesinde tespit edilen M244V, L248R, L248V, G250E, Q252H, Y253F, Y253H, E255K, E255V, D276G, E279K, E292L, V299L, T315A, T315I, T315V, F317L, F317R, F317V, M343T,

M351T, F359I, F359V, L384M, H396P, H396R, F486S ikincil mutasyonları, tirozin kinaz inhibitörlerine karşı dirençten sorumlu tutulmaktadır (Şekil 23). Bu ikincil mutasyonların oluşturduğumuz imatinib dirençli K562-Ir hücrelerinde varlığının araştırması planlanmıştır. Bu bağlamda RNA izolasyonu ve cDNA eldesinden sonra PCR metodu için dizayn edilen primerlerin optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Abl bölgesinin büyüklüğü nedeniyle bölgenin çoğaltılması için birbiriyle örtüşen dört bölge ayrılmış ve her bölgeye özgü primerler dizayn edilmiştir. Primerler öncelikle HEK293T hücre hattında optimize edilmiş daha sonra K562 ve K562-Ir hücreleri için tekrarlanmıştır (Şekil 24, Şekil 25). Elde edilen PCR ürünleri MacroGen (Kore) firmasına üç ayrı zamanda gönderilerek sekans analizleri yaptırılıp karşılaştırılmıştır (Şekil 26-30).

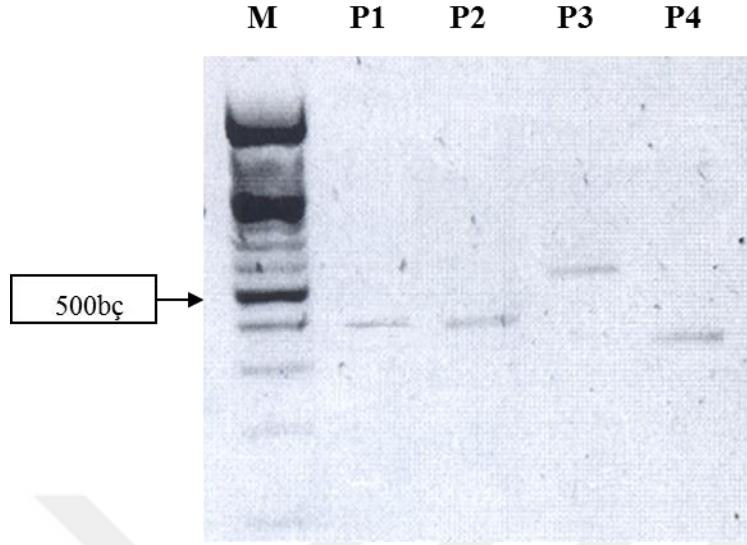
Activity of imatinib, bosutinib, dasatinib, nilotinib, ponatinib and DCC-2036 against clinically relevant mutated forms of BCR/ABL

	IC50-fold increase (WT=1)					
	Imatinib	Bosutinib	Dasatinib	Nilotinib	Ponatinib	DCC-2036
Parental	10.8	38.3	568.3	38.4	570.0	13.1
WT	1	1	1	1	1	1
M244V	0.9	0.9	2.0	1.2	3.2	0.8
L248R	14.6	22.9	12.5	30.2	6.2	0.4
L248V	3.5	3.5	5.1	2.8	3.4	1.3
G250E	6.9	4.3	4.4	4.6	6.0	3.0
Q252H	1.4	0.8	3.1	2.6	6.1	2.1
Y253F	3.6	1.0	1.6	3.2	3.7	2.3
Y253H	8.7	0.6	2.6	36.8	2.6	2.7
E255K	6.0	9.5	5.6	6.7	8.4	3.5
E255V	17.0	5.5	3.4	10.3	12.9	2.1
D276G	2.2	0.6	1.4	2.0	2.1	4.5
E279K	3.6	1.0	1.6	2.0	3.0	6.5
E292L	0.7	1.1	1.3	1.8	2.0	1.0
V299L	1.5	26.1	8.7	1.3	0.6	0.3
T315A	1.7	6.0	58.9	2.7	0.4	0.4
T315I	17.5	45.4	75.0	39.4	3.0	0.7
T315V	12.2	29.3	738.8	57.0	2.1	0.6
F317L	2.6	2.4	4.5	2.2	0.7	1.1
F317R	2.3	33.5	114.8	2.3	4.9	21.0
F317V	0.4	11.5	21.3	0.5	2.3	6.6
M343T	1.2	1.1	0.9	0.8	0.9	1.0
M351T	1.8	0.7	0.9	0.4	1.2	2.2
F359I	6.0	2.9	3.0	16.3	2.9	0.7
F359V	2.9	0.9	1.5	5.2	4.4	0.9
L384M	1.3	0.5	2.2	2.3	2.2	0.9
H396P	2.4	0.4	1.1	2.4	1.4	1.5
H396R	3.9	0.8	1.6	3.1	5.9	0.7
F486S	8.1	2.3	3.0	1.9	2.1	0.5
L248R + F359I	11.7	39.3	13.7	96.2	17.7	1.0

Sensitive	≤2
Moderately resistant	2.1-4
Resistant	4.1-10
Highly resistant	>10

From: Redaelli S, Mologni L, Rostagno R, Piazza R, Magistrini V, Ceccon M, Viltadi M, Flynn D, Gambacorti-Passerini C - Three novel patient-derived BCR/ABL mutants show different sensitivity to second and third generation tyrosine kinase inhibitors -- Am J Hematol. 2012 Nov;87(11):E125-8

Şekil 23: TKİ direncine neden olan kinaz domeyni mutasyonlarının listesi



Şekil 24: HEK293T hücre hattı Abl kinaz bölgesi PCR sonrası jel görüntüsü. HEK293T hücre hattı cDNA'sı Abl kinaz bölgesinin dört parça halinde çoğaltılmış dijital agaroz jel görüntüsüdür. M: Roche DNA Molecular Weight Marker XIV (100 bp ladder) ;P1: 381bç 'lik bölgeyi temsil etmektedir; P2: 364 bç'lik bölgeyi temsil etmektedir; P3: 478 bç'lik bölgeyi temsil etmektedir; P4: 305 bç'lik bölgeyi temsil etmektedir.

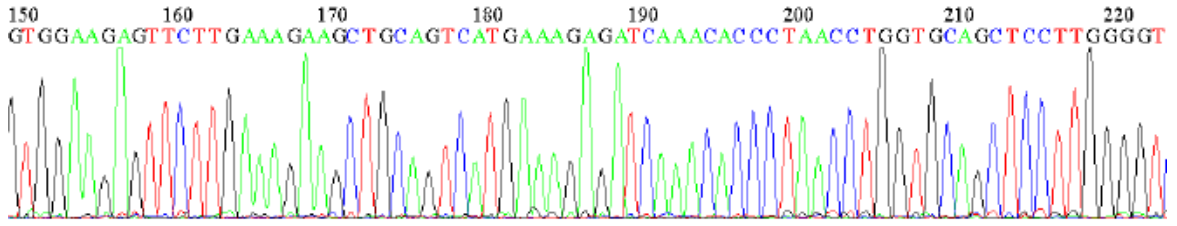
HEK293T hücre hattında beklenen bantlar elde edildikten sonra, aynı primerler kullanılarak optimize edilen PCR koşulları ile K562 ve K562-Ir hücrelerinde amplifikasyon gerçekleştirilmiştir (Şekil 25).



Şekil 25: Atasal ve dirençli hücrelerde Abl kinaz bölgesi PCR sonrası jel görüntüsü. A. K562 kontrol grubu cDNA'sının Abl kinaz bölgesinin dört parça halinde çoğaltılmış dijital agaroz jel görüntüsü. B. K562 dirençli grup cDNA'sının Abl kinaz bölgesinin dört parça halinde çoğaltılmış dijital agaroz jel görüntüsü

4.2.1 Sekans Analizi ve Karşılaştırma:

MacroGen firmasından tarafımıza iletilen sekans verileri yorumlanmaya uygun kalitededir (Şekil 26). Sekanslar internet tabanlı “Multalin” ve “NCBI Blast” araçları ile karşılaştırılmıştır. K562 ve K562-Ir hücrelerinde Abl kinaz bölgesinin her dört parçası ayrı ayrı ana sekansla karşılaştırmalı olarak analiz edildiğinde her iki grupta da herhangi bir baz değişikliği gözlenmemiştir (Şekil 27-30).



Şekil 26: Abl kinaz bölgesinden bir kesit sekanslama örneği.

	1251		1300
dir	AGTACGGGGA	GGTGTACGAG	GGCGTGTGGA AGAAATACAG CCTGACGGTG
K19_K1-P1F	AGTACGGGGA	GGTGTACGAG	GGCGTGTGGA AGAAATACAG CCTGACGGTG
K21_K8-1-P	AGTACGGGGA	GGTGTACGAG	GGCGTGTGGA AGAAATACAG CCTGACGGTG
Consensus	AGTACGGGGA	GGTGTACGAG	GGCGTGTGGA AGAAATACAG CCTGACGGTG
	1301		1350
dir	GCCGTGAAGA	CCTTGAAGGA	GGACACCATG GAGGTGGAAG AGTTCTTGAA
K19_K1-P1F	GCCGTGAAGA	CCTTGAAGGA	GGACACCATG GAGGTGGAAG AGTTCTTGAA
K21_K8-1-P	GCCGTGAAGA	CCTTGAAGGA	GGACACCATG GAGGTGGAAG AGTTCTTGAA
Consensus	GCCGTGAAGA	CCTTGAAGGA	GGACACCATG GAGGTGGAAG AGTTCTTGAA
	1351		1400
dir	AGAAGCTGCA	GTCATGAAAG	AGATCAAACA CCCTAACCTG GTGCAGCTCC
K19_K1-P1F	AGAAGCTGCA	GTCATGAAAG	AGATCAAACA CCCTAACCTG GTGCAGCTCC
K21_K8-1-P	AGAAGCTGCA	GTCATGAAAG	AGATCAAACA CCCTAACCTG GTGCAGCTCC
Consensus	AGAAGCTGCA	GTCATGAAAG	AGATCAAACA CCCTAACCTG GTGCAGCTCC
	1401		1450
dir	TTGGGGTCTG	CACCCGGGAG	CCCCCGTTCT ATATCATCAC TGAGTTCATG
K19_K1-P1F	TTGGGGTCTG	CACCCGGGAG	CCCCCGTTCT ATATCATCAC TGAGTTCATG
K21_K8-1-P	TTGGGGTCTG	CACCCGGGAG	CCCCCGTTCT ATATCATCAC TGAGTTCATG
Consensus	TTGGGGTCTG	CACCCGGGAG	CCCCCGTTCT ATATCATCAC TGAGTTCATG
	1451		1500
dir	ACCTACGGGA	ACCTCCTGGA	CTACCTGAGG GAGTGCAACC GGCAGGAGGT
K19_K1-P1F	ACCTACGGGA	ACCTCCTGGA	CTACCTGAGG GAGTGCAACC GGCAGGAGGT
K21_K8-1-P	ACCTACGGGA	ACCTCCTGGA	CTACCTGAGG GAGTGCAACC GGCAGGAGGT
Consensus	ACCTACGGGA	ACCTCCTGGA	CTACCTGAGG GAGTGCAACC GGCAGGAGGT
	1501		1550
dir	GAACGCCGTG	GTGCTGCTGT	ACATGGCCAC TCAGATCTCG TCAGCCATGG
K19_K1-P1F	GAACGCCGTG	GTGCTGCTGT	ACATGGCCAC TCAGATC... ..
K21_K8-1-P	GAACGCCGTG	GTGCTGCTGT	ACATGGCCAC TCAGATCA.. ..
Consensus	GAACGCCGTG	GTGCTGCTGT	ACATGGCCAC TCAGATC... ..

Şekil 27: Abl kinaz bölgesinin P1 parçasının kontrol grubu ve dirençli grupta sekans karşılaştırması. “Dir” olarak belirtilen dizi, gen bankasında belirtilen abl kinaz bölgesi sekansıdır. K1-P1F: K562 kontrol grubu sekansı, K8-1-P: K562-Ir deney grubu sekansını belirtmektedir.

	1651		1700
dir	CAGGTTGATG	ACAGGGGACA	CCTACACAGC
O19_K2-P2F	CAGGTTGATG	ACAGGGGACA	CCTACACAGC
O21_K8-2-P	CAGGTTGATG	ACAGGGGACA	CCTACACAGC
Consensus	CAGGTTGATG	ACAGGGGACA	CCTACACAGC
	1701		1750
dir	CCATCAAATG	GACTGCACCC	GAGAGCCTGG
O19_K2-P2F	CCATCAAATG	GACTGCACCC	GAGAGCCTGG
O21_K8-2-P	CCATCAAATG	GACTGCACCC	GAGAGCCTGG
Consensus	CCATCAAATG	GACTGCACCC	GAGAGCCTGG
	1751		1800
dir	AAGTCCGACG	TCTGGGCATT	TGGAGTATTG
O19_K2-P2F	AAGTCCGACG	TCTGGGCATT	TGGAGTATTG
O21_K8-2-P	AAGTCCGACG	TCTGGGCATT	TGGAGTATTG
Consensus	AAGTCCGACG	TCTGGGCATT	TGGAGTATTG
	1801		1850
dir	TGGCATGTCC	CCTTACCCGG	GAATTGACCT
O19_K2-P2F	TGGCATGTCC	CCTTACCCGG	GAATTGACCT
O21_K8-2-P	TGGCATGTCC	CCTTACCCGG	GAATTGACCT
Consensus	TGGCATGTCC	CCTTACCCGG	GAATTGACCT
	1851		1900
dir	TAGAGAAGGA	CTACCGCATG	GAGCGCCCAG
O19_K2-P2F	TAGAGAAGGA	CTACCGCATG	GAGCGCCCAG
O21_K8-2-P	TAGAGAAGGA	CTACCGCATG	GAGCGCCCAG
Consensus	TAGAGAAGGA	CTACCGCATG	GAGCGCCCAG
	1901		1950
dir	TATGAACTCA	TGCGAGCATG	TTGGCAGTGG
O19_K2-P2F	TATGAACTCA	TGCGAGCATG	TTGGCAGTGG
O21_K8-2-P	TATGAACTCA	TGCGAGCATG	TTGGCAGTGG
Consensus	TATGAACTCA	TGCGAGCATG	TTGGCAGTGG

Şekil 28: Abl kinaz bölgesi P2 parçasının kontrol ve dirençli grupta sekans karşılaştırması. “Dir” olarak belirtilen dizi, gen bankasında belirtilen abl kinaz bölgesi sekansıdır. K2-P2F: K562 kontrol grubu sekansı, K8-2-P: K562-İr deney grubu sekansını belirtmektedir.

	1401		1450
dir	TTGGGGTCTG CACCCGGGAG CCCCCGTTCT ATATCATCAC TGAGTTCATG		
C21_K3-P3F	TTGGGGTCTG CACCCGGGAG CCCCCGTTCT ATATCATCAC TGAGTTCATG		
C23_K8-3-P	TTGGGGTCTG CACCCGGGAG CCCCCGTTCT ATATCATCAC TGAGTTCATG		
Consensus	TTGGGGTCTG CACCCGGGAG CCCCCGTTCT ATATCATCAC TGAGTTCATG		
	1451		1500
dir	ACCTACGGGA ACCTCCTGGA CTACCTGAGG GAGTGCAACC GGCAGGAGGT		
C21_K3-P3F	ACCTACGGGA ACCTCCTGGA CTACCTGAGG GAGTGCAACC GGCAGGAGGT		
C23_K8-3-P	ACCTACGGGA ACCTCCTGGA CTACCTGAGG GAGTGCAACC GGCAGGAGGT		
Consensus	ACCTACGGGA ACCTCCTGGA CTACCTGAGG GAGTGCAACC GGCAGGAGGT		
	1501		1550
dir	GAACGCCGTG GTGCTGCTGT ACATGGCCAC TCAGATCTCG TCAGCCATGG		
C21_K3-P3F	GAACGCCGTG GTGCTGCTGT ACATGGCCAC TCAGATCTCG TCAGCCATGG		
C23_K8-3-P	GAACGCCGTG GTGCTGCTGT ACATGGCCAC TCAGATCTCG TCAGCCATGG		
Consensus	GAACGCCGTG GTGCTGCTGT ACATGGCCAC TCAGATCTCG TCAGCCATGG		
	1551		1600
dir	AGTACCTGGA GAAGAAAAAC TTCATCCACA GAGATCTTGC TGCCCGAAAC		
C21_K3-P3F	AGTACCTGGA GAAGAAAAAC TTCATCCACA GAGATCTTGC TGCCCGAAAC		
C23_K8-3-P	AGTACCTGGA GAAGAAAAAC TTCATCCACA GAGATCTTGC TGCCCGAAAC		
Consensus	AGTACCTGGA GAAGAAAAAC TTCATCCACA GAGATCTTGC TGCCCGAAAC		
	1601		1650
dir	TGCCTGGTAG GGGAGAACCA CTTGGTGAAG GTAGCTGATT TTGGCCTGAG		
C21_K3-P3F	TGCCTGGTAG GGGAGAACCA CTTGGTGAAG GTAGCTGATT TTGGCCTGAG		
C23_K8-3-P	TGCCTGGTAG GGGAGAACCA CTTGGTGAAG GTAGCTGATT TTGGCCTGAG		
Consensus	TGCCTGGTAG GGGAGAACCA CTTGGTGAAG GTAGCTGATT TTGGCCTGAG		
	1651		1700
dir	CAGGTTGATG ACAGGGGACA CCTACACAGC CCATGCTGGA GCCAAGTTCC		
C21_K3-P3F	CAGGTTGATG ACAGGGGACA CCTACACAGC CCATGCTGGA GCCAAGTTCC		
C23_K8-3-P	CAGGTTGATG ACAGGGGACA CCTACACAGC CCATGCTGGA GCCAAGTTCC		
Consensus	CAGGTTGATG ACAGGGGACA CCTACACAGC CCATGCTGGA GCCAAGTTCC		

Şekil 29: Abl kinaz bölgesi P3 parçasının kontrol ve dirençli grupta sekans karşılaştırması. “Dir” olarak belirtilen dizi, gen bankasında belirtilen abl kinaz bölgesi sekansıdır. K3-P3F: K562 kontrol grubu sekansı, K8-3-P: K562-Ir deney grubu sekansını belirtmektedir

	1801				1850
dir	TGGCATGTCC	CCTTACCCGG	GAATT.GACC	TGTCCCAGGT	GTATGAGCTG
G21_K4-P4F	NGN.NTGTCC	CCTTACCCGG	GAATTTGACC	TGTCCCAGGT	GTATGAGCTG
G23_K8-4-P	TNG.NTGTCC	CCTTACCCGG	GAATT.GACC	TGTCCCAGGT	GTATGAGCTG
Consensus	tgg.ntGTCC	CCTTACCCGG	GAATT.GACC	TGTCCCAGGT	GTATGAGCTG
	1851				1900
dir	CTAGAGAAGG	ACTACCGCAT	GGAGCGCCCA	GAAGGCTGCC	CAGAGAAGGT
G21_K4-P4F	CTAGAGAAGG	ACTACCGCAT	GGAGCGCCCA	GAAGGCTGCC	CAGAGAAGGT
G23_K8-4-P	CTAGAGAAGG	ACTACCGCAT	GGAGCGCCCA	GAAGGCTGCC	CAGAGAAGGT
Consensus	CTAGAGAAGG	ACTACCGCAT	GGAGCGCCCA	GAAGGCTGCC	CAGAGAAGGT
	1901				1950
dir	CTATGAACTC	ATGCGAGCAT	GTTGGCAGTG	GAATCCCTCT	GACCGGCCCT
G21_K4-P4F	CTATGAACTC	ATGCGAGCAT	GTTGGCAGTG	GAATCCCTCT	GACCGGCCCT
G23_K8-4-P	CTATGAACTC	ATGCGAGCAT	GTTGGCAGTG	GAATCCCTCT	GACCGGCCCT
Consensus	CTATGAACTC	ATGCGAGCAT	GTTGGCAGTG	GAATCCCTCT	GACCGGCCCT
	1951				2000
dir	CCTTTGCTGA	AATCCACCAA	GCCTTTGAAA	CAATGTTCCA	GGAATCCAGT
G21_K4-P4F	CCTTTGCTGA	AATCCACCAA	GCCTTTGAAA	CAATGTTCCA	GGAATCCAGT
G23_K8-4-P	CCTTTGCTGA	AATCCACCAA	GCCTTTGAAA	CAATGTTCCA	GGAATCCAGT
Consensus	CCTTTGCTGA	AATCCACCAA	GCCTTTGAAA	CAATGTTCCA	GGAATCCAGT
	2001				2050
dir	ATCTCAGACG	AAGTGGAAAA	GGAGCTGGGG	AAACAAGGCG	TCCGTGGGGC
G21_K4-P4F	ATCTCANACG	AAGTGGAAAA	GGAGCTGGGG	AAACAAGGCG	TCCGTGGGGC
G23_K8-4-P	ATCTCAGACG	AAGTGGAAAA	GGAGCTGGGG	AAACAAGGCG	TCCGTGGGGC
Consensus	ATCTCAGACG	AAGTGGAAAA	GGAGCTGGGG	AAACAAGGCG	TCCGTGGGGC
	2051				2100
dir	TGTGAGTACC	TTGCTGCAGG	CCCCAGAGCT	GCCCACCAAG	ACGAGGACCT
G21_K4-P4F	TGTGAGTACC	TTAA.....			
G23_K8-4-P	TGTGAGTACC	TTA.....			
Consensus	TGTGAGTACC	TTa.....			

Şekil 30: Abl kinaz bölgesi P4 parçasının kontrol ve dirençli grupta sekans karşılaştırması. “Dir” olarak belirtilen dizi, gen bankasında belirtilen abl kinaz bölgesi sekansıdır. K4-P4F: K562 kontrol grubu sekansı, K8-4-P: K562-İr deney grubu sekansını belirtmektedir

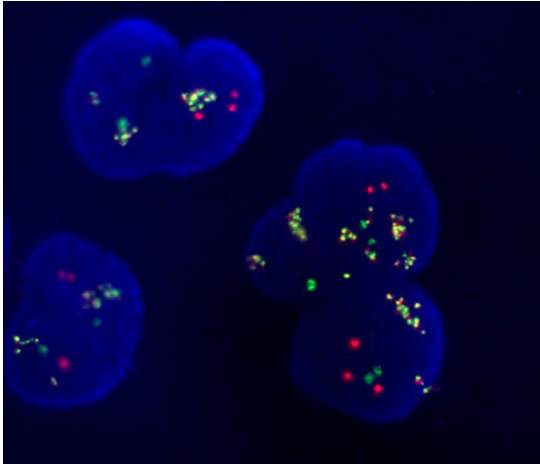
4.3 K562 ile K562-İr Hücrelerinde Bcr-Abl Gen Amplifikasyonu Açısından Farklılık Bulunmamaktadır

TKİ direnç oluşumunun bir diğer mekanizması, Bcr-ABL kimerik gen bölgesinin amplifikasyonudur. Bcr-Abl füzyon geninin olası amplifikasyonu, ortamda imatinib molekülünün bağlanabileceğinden çok daha fazla Bcr-Abl proteinin varlığına neden olabilir. Bu durumda imatinib hücrelerde Bcr-Abl sinyalini bloklamakta yetersiz kalır ve hücreler çoğalmaya devam ederler. Bcr-Abl gen amplifikasyonuna bağlı bir imatinibin direncinin gelişip gelişmediğinin anlaşılabilmesi için FISH ve Q-PCR yöntemleri kullanılmıştır.

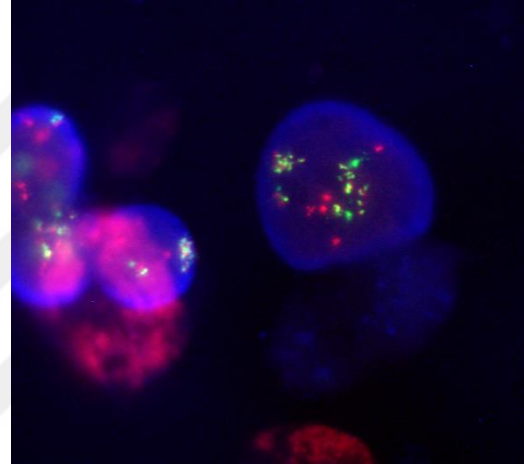
4.3.1 FISH Bulguları

Şekil 31’de örnek görüntüleri verilmiş, üç yüzer (300) K562 ve K562-Ir hücresi, füzyon sayısı (sarı), kırmızı sinyal (abl), yeşil sinyal (bcr) ve amplifikasyon şekline göre (dağılmış/dispers veya kümelenmiş/cluster) sayılmış ve nümerik olarak karşılaştırılmıştır. Bu kriterler doğrultusunda K562 ve K562-Ir grupları arasında Bcr-Abl amplifikasyonu açısından fark görülmemiştir. İki grupta da çok sayıda kümelenmiş füzyon (cluster) bölgeleri mevcuttur. İki grupta da Ph(-) hücrelere rastlandıysa da Ph(-) hücre oranı %7’yi geçmemektedir.

A. K562



B. K562-Ir



Şekil 31: FISH yöntemi uygulanmış atasal ve dirençli hücre fotoğraflarından seçilmiş örnekler. A. K562 hücreleri B. K562-Ir hücreleri

4.3.2 Q-PCR Bulguları

K562 ve K562-Ir hücrelerinden elde edilen cDNA’lar kullanılarak Bcr-Abl probu ile farklı zamanlarda üç kez üç tekrarlı kantitatif PCR yapılmıştır. Bcr-Abl test probu; Abl, internal kontrol probu olarak kullanılmıştır. Deneyler için kullandığımız Roche Light Cycler kantitatif kapiller PCR cihazı analiz programı Ct değerlerini karşılaştırmış, $\Delta\Delta Ct$ değerlerini Tablo 5’de verildiği gibi hesaplamıştır. Üç tekrarlı üç ayrı deneyin ortalaması alındığında K562-Ir’nin K562 hücreleri karşısındaki oranı 1,06’dır. Hesaplamalar doğrultusunda K562 ve K562-Ir hücreleri arasında Bcr-Abl gen ifadesi açısından fark yoktur.

Tablo 5: Farklı zamanlarda yapılmış üç-tekrarlı kantitatif PCR $\Delta\Delta C_t$ oranları

Deney Setleri	K562	K562-Ir
1. üç tekrarlı Q-PCR	1	0,65
2. üç tekrarlı Q-PCR	1	1,55
3 üç tekrarlı Q-PCR	1	0,99

Sonuç olarak atasal K652 hücreleriyle karşılaştırıldığında, K562-Ir hücrelerinde imatinib molekülünün bağlanabileceğinden daha fazla Bcr-Abl protein varlığına neden olabilecek gen amplifikasyonu olmadığı saptanmıştır. Buna ek olarak Bcr-Abl ekspresyonu açısından atasal K652 ve K562-Ir hücreleri arasında bir fark olmadığı gösterilmiştir.

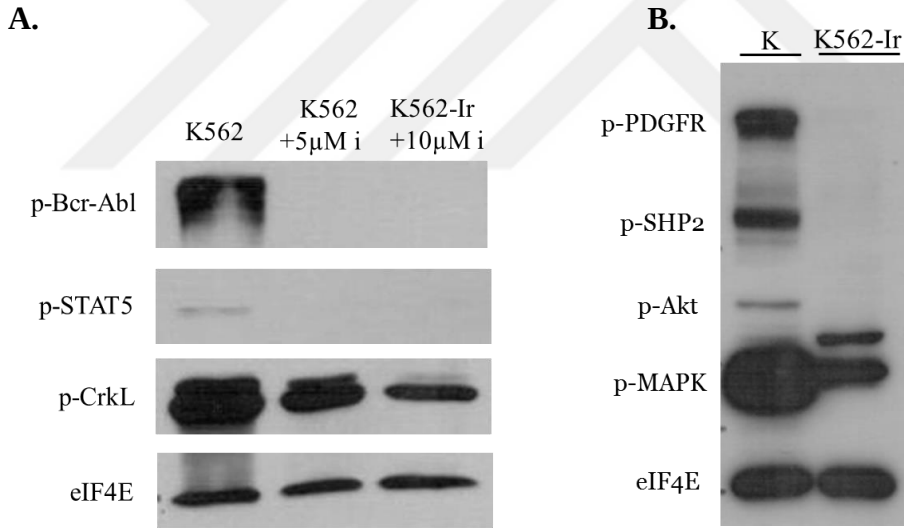
4.4 K562-Ir Hücrelerinde İmatinib Hücre İçine Alınıyor ve Atasal K562 Hücrelerinde Olduğu gibi Bcr-Abl Sinyal İleti Yolağını Baskılıyor

Literatürde anti-kanser ilaçlarının membran transport proteinleri ile dışarı atıldığını, bunun sonucu olarak ilaç etkisinin azaldığı ya da tamamen kaybolduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Genel bilgilerde de bahsedildiği gibi bu mekanizma KML'de TKİ direncinin gelişiminde de rol oynamaktadır. K-562Ir hücrelerinde izlediğimiz ilaç direncinin bu sebebe bağlı olup olmadığının anlaşılması ve kullandığımız imatinibin çalışıp çalışmadığının kontrolü için imatinibin etki ettiği (baskıladığı) yolaklarda yer alan proteinlerin fosforilasyonlarını Western-blot yöntemi ile inceledik. Şekil 32 A'da görülebileceği gibi, K562 hücrelerinde Bcr-Abl ve onun fosforilleştiği STAT-5 ve CrkL fosforillenmiş formlarında -aktif formlarında bulunurken, 24 saat 5 μ M imatinib verilmiş K562 hücrelerinde fosforillenmiş Bcr-Abl ve Stat5'in bulunmadığı, fosforillenmiş CrkL'nin fosforilasyonunun azaldığı görülmektedir. Bu beklediğimiz bir durumdur. İmatinib Bcr-Abl kinaz bölgesine bağlanmak için ATP ile yarıştığından Bcr-Abl otofosforilasyonu engellenmekte, bunun sonucunda aktifleşemeyen onkoprotein yolaktaki diğer molekülleri de fosforilleyememektedir. K562 hücreleri Bcr-Abl'den gelen yaşam sinyallerine bağımlı olduğundan, Bcr-Abl aktivitesinin baskılanması hücreleri ölüme götürmektedir.

Şekil 32 A incelendiğinde benzer şekilde 10 μ M imatinib varlığında yaşamlarını sürdüren K562-Ir hücrelerinde de Bcr-Abl yolağının baskılanmış olduğu açık şekilde

görülmektedir. (CrkL proteini farklı moleküller tarafından da fosforillenebildiği için halen p-CrkL bandı vardır ancak oldukça azalmıştır.) Ancak Bcr-Abl aktivitesinin baskılanmasına rağmen K562-Ir hücrelerinin sağlıklı bir şekilde çoğalmalarına devam etmektedirler. Bu durum bize imatinibin hücre içine girdiğini ve işlevsel olduğunu göstermektedir. Ancak atasal K562 hücrelerinden farklı olarak K562-Ir hücreleri için Bcr-Abl artık bir yaşam sinyali olmaktan çıktığı görülmektedir.

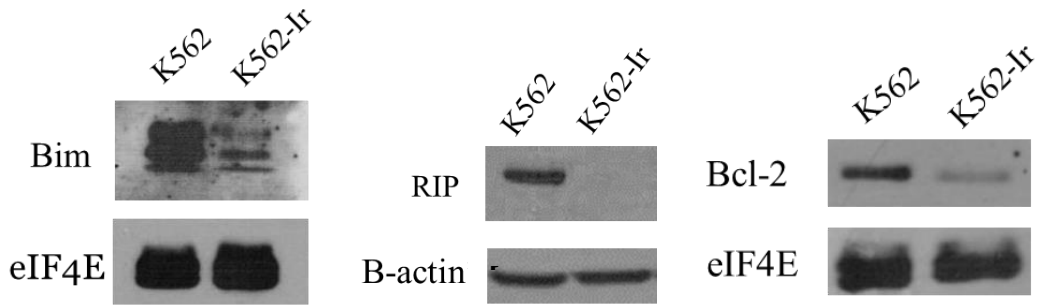
Şekil 32 B’de ise imatinibin baskıladığı PDGFR yolağı, atasal kontrol K562 hücrelerinde aktif iken 10µM imatinib eklenmiş ortamda üretilen K562-Ir hücrelerinde baskılanmış durumdadır. PDGFR’nin fosforilasyonunun baskılanması alt-akışındaki (downstream) SHP2, Akt ve MAP kinazın fosforillenmesini de etkilenmiştir. Bu veriler yine K562-Ir hücrelerinde imatinibin hücre içine alındığını ve beklenen işlevini yerine getirdiğini göstermektedir. K562-Ir hücrelerinde izlenen TKİ direncinin Bcr-Abl’in bir yaşam sinyali olmaktan çıkması nedeniyle geliştiğini desteklemektedir.



Şekil 32: Atasal ve dirençli hücrelerde Bcr-Abl ve alt-akış proteinlerinin Western blot görüntüsü. A. K562, 24 saat 5µM imatinibe maruz bırakılmış K562 ve 10µM imatinibli ortamda çoğaltılan K562-Ir hücrelerinin Bcr-Abl yolağı Western blot görüntüleri. B. K562 ve 10µM imatinibli ortamda çoğaltılan K562-Ir hücrelerinin p-PDGFR yolağı Western blot görüntüsü. eIF4E yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır.

4.5 K562-Ir Hücrelerinde Apoptoz ile İlişkilendirilmiş Bcl-2, Bim ve RIP1 protein Düzeyleri Azalmıştır

K562-Ir hücrelerinin hücre ölümüne gösterdiği direncin programlanmış ölüm proteinleriyle ilişkisini araştırmak için Bcl-2, Bim ve RIP1 antikorlarıyla Western blot analizleri yapıldı. Şekil 33’de de görülebileceği gibi K562’de her üç proteinin de ifadesi bulunurken; K562-Ir hücrelerinde bu proteinlerin ifadeleri çok azalmıştır. Bcl-2 mitokondri membranını koruyan dolayısıyla apoptoza bağlı ölüm yolağını baskılayarak hücrenin sağkalımı için çalışan anti-apoptotik bir moleküldür. Bim ise Bcl-2 ailesine ait pro-apoptotik bir proteindir. Ölüm sinyali varlığında ya da yaşam sinyalleri azlığında sitosolde aktive olan Bim, Bcl-2’ye bağlanarak bir diğer Bcl-2 ailesi pro-apoptotik protein olan Bax’ın serbestleşmesini sağlar ve sitokrom c salınımı tetiklenir. RIP (RIP1) proteini Toll-like reseptör ailesinin sinyal iletiminde görev alır ve kaspaz-8 aracılığıyla ekstrinsik apoptotik yolda işlev görür. Apoptoz kaskadının tetikleyicileri olan RIP ve Bim’in K562-Ir hücrelerindeki azalmış ekspresyonu, hücre ölümünün oldukça az olması nedeniyle anlamlıdır. Anti-apoptotik Bcl-2 ifadesinin ise azalmış değil artmış olması beklenir ancak sağ kalım ve apoptoz, pro-apoptotik ve anti-apoptotik birçok proteinin iş bölümü dengesine bağlıdır. Daha detaylı bilgi edinmek için Bid, Bax vb. diğer apoptotik proteinlerin ifadesine de bakmak gereklidir.



Şekil 33: K562 ve K562-Ir hücrelerinin Bcl-2, Bim ve RIP ifadelerinin Western blot görüntüleri. eIF4E ve B-aktin yükleme kontrolüdür.

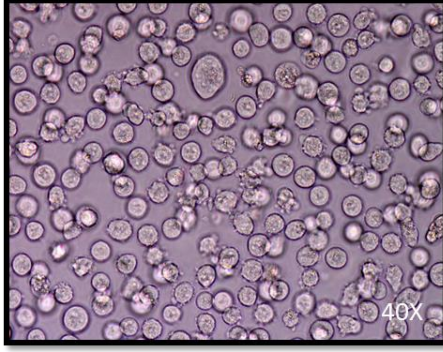
Bu sonuçlarımız daha önce sunmuş olduğumuz annexinV/MitotrackerRed sonuçlarımızı destekler niteliktedir.

4.6 İmatinib Baskısı Altında Çoğalan K562-Ir Hücreleri Morfolojik Plastisite Gösteriyorlar

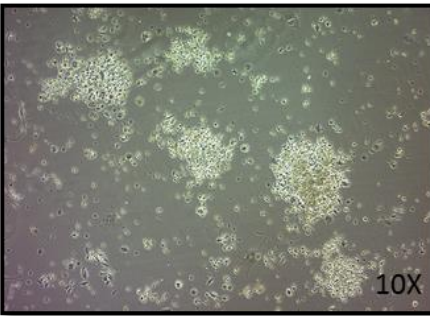
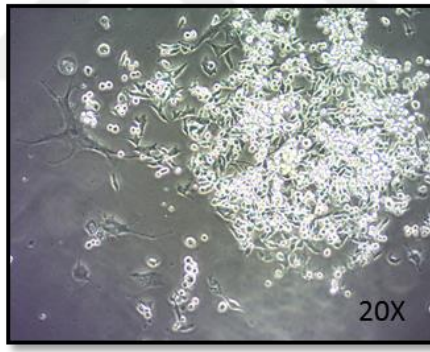
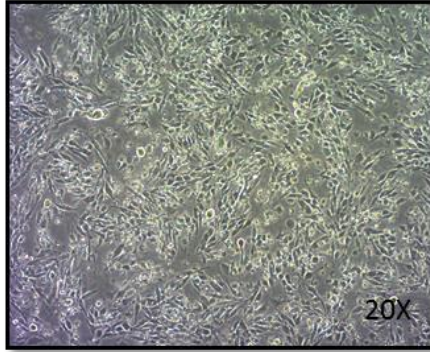
K562-Ir hücrelerinin imatinib baskısı altındaki klonal seçilimi sırasında 5µM imatinib dozundan itibaren, hücrelerde morfolojik farklılıklar gözlenmeye başlandı. Hücrelerin belirli bir yüzdesinin yüzeye yapıştığı ve mekik formu aldıkları izlendi. Üst faz sürekli atılıp yeni ortam ekleyerek sadece bu yapışan hücreler üretilmeye çalışıldığında hücrelerin koloniler oluşturduğu ve flask yüzeyini kapladığı gözlemlendi. Ayrıca, yapışan ve yüzen hücrelerin karışık olduğu bir flaskta, sadece yüzen hücreler ortamla birlikte yeni bir flaska aktarıldığında yine belirli bir yüzdede hücrenin yere yapıştığı gözlenmiştir.

Şekil 34A'da K562 atasal hücrelerinin 40X ve 10X büyütülmüş fotoğrafları, Şekil 34 B'de ise K562-Ir hücrelerinden farklı zamanlarda çekilmiş 10X, 20X ve 40X görüntüleri izlenmektedir. Şekil 34B'de örnekleri gösterildiği şekilde, farklı morfolojilerdeki K562-Ir hücrelerinin yüzen ve yapışanlarının birarada çoğaldığı flasklar olduğu gibi, yüzeyi tamamen kaplayan veya koloniler şeklinde çoğalan yüzeye tutunan hücre grupları da mevcuttur.

A. K562



B. K562-Ir

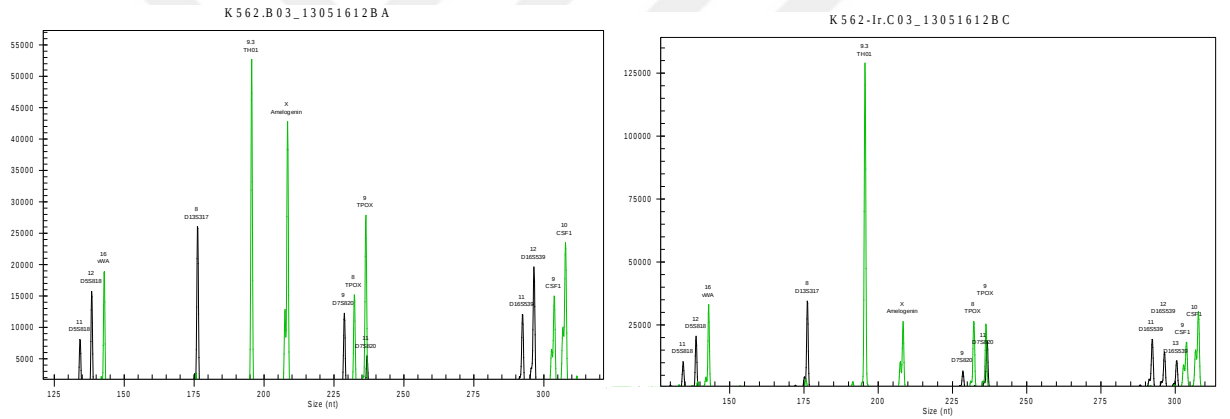


Şekil 34: (A)K562 ve (B)K562-Ir hücrelerinin kameralı inverted mikroskop kullanılarak çekilmiş görüntüleri

4.6.1 Hücrelerin K562 Kökenli Olduklarının Gösterilmesi

K562-Ir flasklarında morfolojik farklılıkların görülmesinden sonra hücrelerimizin K562 kökenli olduklarını ispat etmek üzere Almanya DSMZ Leibniz Enstitüsün'den DNA profillemesi için hizmet alımı gerçekleştirdik. Gönderdiğimiz her iki örnek, 8 farklı yüksek polimorfik kısa tekrarlı dizi lokusları (STR lokusları) açısından analiz edilip karşılaştırılmıştır. Şekil 35'de firmanın tarafımıza gönderdiği sonuç raporuna göre kullandığımız her iki hücre hattı da tam eşleşmeyle K562 kökenlidir.

#	sample	parental/reference	match/comment
1	K562	K-562 (DSMZ ACC 010)	full-matching STR profile, authentic*
2	K562-Ir	K-562 (DSMZ ACC 010)	full-matching STR profile, authentic



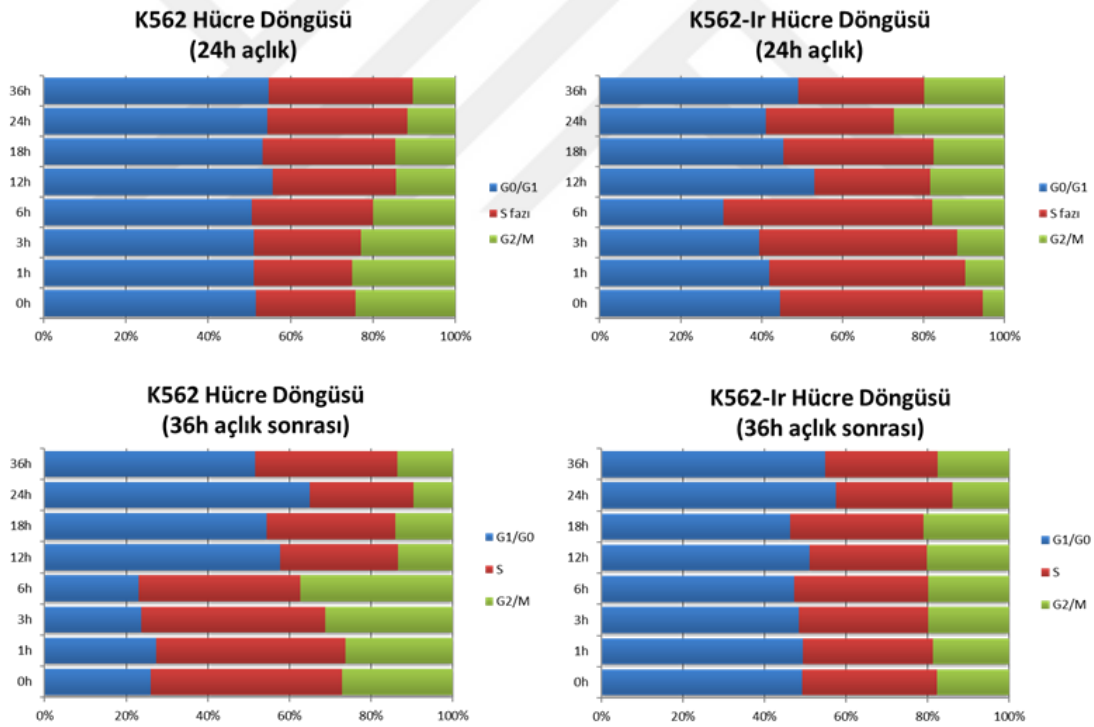
Şekil 35: Atasal ve dirençli hücrelerin köken analizi

4.7 Dirençli K562-Ir Hücrelerinin Proliferasyon Hızı K562 Hücrelerinden Dört Kat Daha Yavaştır

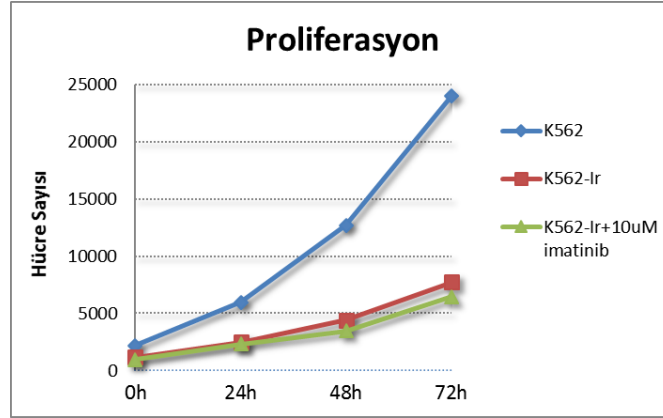
Hücre kültürü idamesi sırasında K562-Ir hücrelerinin K562 hücrelerine göre daha yavaş çoğaldıkları görüldü ve hücre döngü ile proliferasyon hız farklarının araştırılmasına karara verildi. Hücre döngüleri arasındaki farkları incelemek için hücreleri senkronize etmek üzere öncelikle 24 ve 36 saat starvasyon (açlık) uygulandı. Starvasyondan sonra yapılan 0. saat ölçümlerinde senkronizasyonun gerçekleşmediği görüldüğünden (Şekil 36), her iki hücre grubu için de açlık süreleri yetersiz bulundu. Dış kimyasal madde eklemekten sadece starvasyonla

hücreleri senkronize etmeyi başaramadığımızdan hücre döngüsü deneyleri tekrar edilmemiştir. Hücre kültür pasajlarında gözleendiği gibi K562-Ir hücrelerinin daha yavaş çoğalıp çoğalmadıklarının araştırılması için proliferasyon hızlarının ölçümüne karar verilmiştir.

72 saat WST-8 ölçümü ile yapılan deneylerde K562-Ir hücreleri imatinibin varlığında veya yokluğunda (imatinibden bağımsız olarak) K562 atasal hücrelerden 4 kat daha yavaş çoğaldığı görüldü (Şekil 37). Kanseri popülasyonundaki yavaş çoğalan hücreler literatürde kanser kök hücreleriyle ilişkilendirilmekte; solid tümörlerde metastaz, ilaç direnci, relaps gibi kötü prognoz göstergelerinin sorumlusu olarak gösterilmektedir. Hatta bu nedenle hızlı çoğalan hücrelere etkiyen güncel kanser tedavilerinin yeterince etkin olamadıkları tartışılmaktadır^{80,89-91}. Bu bağlamda imatinib dirençli hücrelerimizin yavaş üreme karakteri göstermesi atasal hücrelerden çok farklı biyolojik özelliklere sahip dirençli bir klonun ortaya çıktığını düşündürmektedir.



Şekil 36: K562 ve K562-Ir hücrelerinde hücre döngüsü deney bulguları. 24 ve 36 saat içerisinde görülen faz farkları hücrelerin G1 fazında senkronize olmadığını göstermektedir.

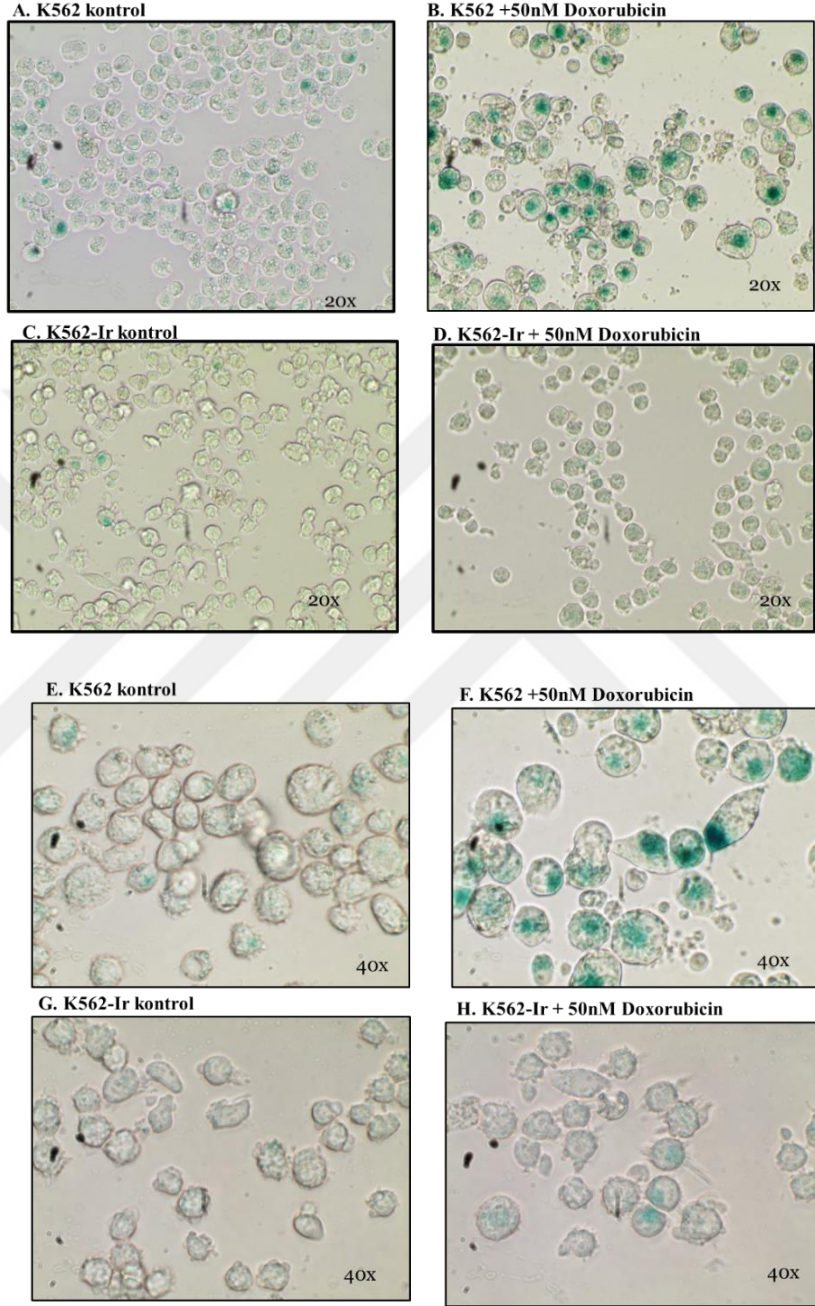


Şekil 37: K562, imatinibsiz ortamda K562-Ir ve 10µM imatinib varlığında çoğalan K562-Ir hücrelerinin 72 saatlik proliferasyon grafiği.

4.8 K562-Ir Hücreleri Doksorubisinle İndüklenmiş Senesense Dirençlidir

Hücre yaşlanması olarak da nitelendirilen senesens, hücrelerin geri-dönüşümsüz olarak bölünmeyi durdurdukları, ancak hücre ölümüne gitmeden G1 fazında (büyüme fazı) kaldıkları hücre olayıdır. K562-Ir hücrelerinde gözlediğimiz yavaş proliferasyon bize imatinibin hücrelerde senesensi tetikleyebileceği ihtimalini düşündürdü. Bu olasılığı araştırmak amacıyla B-galaktosidaz ölçüm deneyi gerçekleştirdik. Pozitif kontrol olarak literatürde K562 hücrelerini senesense soktuğu gösterilmiş doksorubisin (doxorubicin, adriamycin) kullandık^{92,93}. Şekil 38 A ve B’de görülebileceği gibi K562 ve 10µM imatinibli ortamda büyüyen K562-Ir flasklarında senesent hücreye rastlanmamıştır. Bu bize imatinibin hücreleri senesens yönünden etkilemediğini göstermektedir. Bununla birlikte Şekil 38 B ve D’de doksorubisin ile muamele edilmiş pozitif kontrol flasklarında K562 hücreleri senesense girmişken K562-Ir hücreleri doksorubisinden etkilenmemiştir. Doksorubisinin bilinen etki mekanizması iki şekildedir. (i) DNA ile interkalasyon yolu ile etkileşip topoizomerez enziminin ilerlemesini engelleyerek DNA tamiri ve replikasyonuna engel olur. (ii) Okside kararsız bir ara forma dönüşüm ve geri-dönüşümü sırasında açığa çıkan reaktif oksijen radikalleri membran hasarı, DNA hasarı, oksidatif stres ve hücre ölümü ve/veya senesense yol açar^{94,95}. K562-Ir hücrelerinin DNA-hasarına bağlı senesense dirençli olması, hayatta kalma mekanizmaları yönünden K562 hücrelerinden üstün olduğunu göstermektedir. Şekil 38 E, F, G, H aynı flasklardan 40X

büyütme ile alınmış görüntülerdir. Deneyler 50nM için 2 kez, 100nM için 1 kez tekrar edilmiştir. Sonuçların benzer olduğu gözlenmiştir.



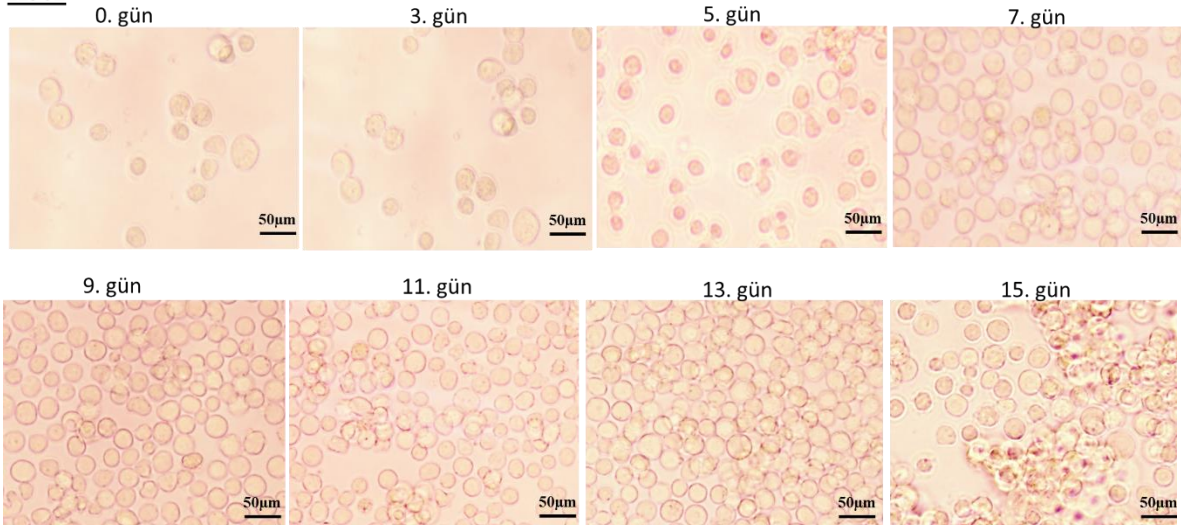
Şekil 38: Senesens deneyi yapılmış hücrelerin ters bakışlı (inverted) ışık mikroskobu altındaki görüntüleri. A,C, E ve G sırasıyla K562 ve K562-Ir kontrol kuyularının 20X ve 40X alan görüntüleridir. B, D, F ve H sırasıyla K562 ve K562-Ir kuyularının 50nM doksorubisin 20X ve 40X alan görüntüleridir.

4.9 K562-İr hücreleri Yarı-katı Ortamda Tümör Sferoidi Oluşturmaktadır

K562-İr hücrelerinin solid doku hücreleri gibi yüzeye yapışma yeteneği göstermesi hücre biyolojilerinin atasal hücrelerden farklı olduğunu göstermektedir. Lökosit kökenli K562 hücrelerinin sıvı kültür içinde süspansiyon halde çoğalmaları hücrelerin doğası gereği beklenen bir durumdur. Bunun yanında, sıvı ortamda hücrelerin hücre-hücre ve hücre-ekstrasellüler matriks bağlantı potansiyelleri hakkında bilgi edinmek güçtür. Sferoid kültür sistemleri solid tümörlerin in vivo mikroçevre karakteristiklerini taklid edebilmektedir. K562 ve K562-İr hücrelerinin üç-boyutlu ortamdaki davranışlarını görmek amacıyla sferoid kültür koşulları sağlanmıştır. Hücrelerinin üç-boyutlu kültür ortamındaki 15 günlük izlemleri sonucu K562 hücrelerinde bir değişim izlenmezken K562-İr hücrelerinde düzgün çeperli sferoid oluşumlarının olduğu gözlenmiştir. Şekil 39'de iki günde bir gerçekleştirilen çekimlerden görüntüler izlenmektedir. Şekil 39 A'da K562 hücreleri 15 gün boyunca tek tek çoğalmalarını sürdürürken Şekil 39 B'de K562-İr hücreleri 3. günden itibaren öbekler oluşturmaya başlamış ve bu öbekler 15 gün boyunca büyümesine devam etmiştir. Çap ölçümleri Şekil 40'de verilmiştir. Yarı-katı besi ortamında üretilen K562-İr hücrelerinin normal K562 hücrelerinin aksine giderek büyüyen, düzgün çeperli sferoidler oluşturmaları, farklı biyolojik süreçlerin egemen olduğu düşüncemizi desteklemektedir. Literatürde sferoidlerin kanser kök hücrelerince zengin veya kanser kök hücrelerinin özelliklerine benzer özellikler taşıyan hücrelerden oluştuğunu söyleyen yayınlar mevcuttur⁹⁶⁻⁹⁸. Bu verilerimiz ileriki bölümde daha geniş tartışılacaktır.

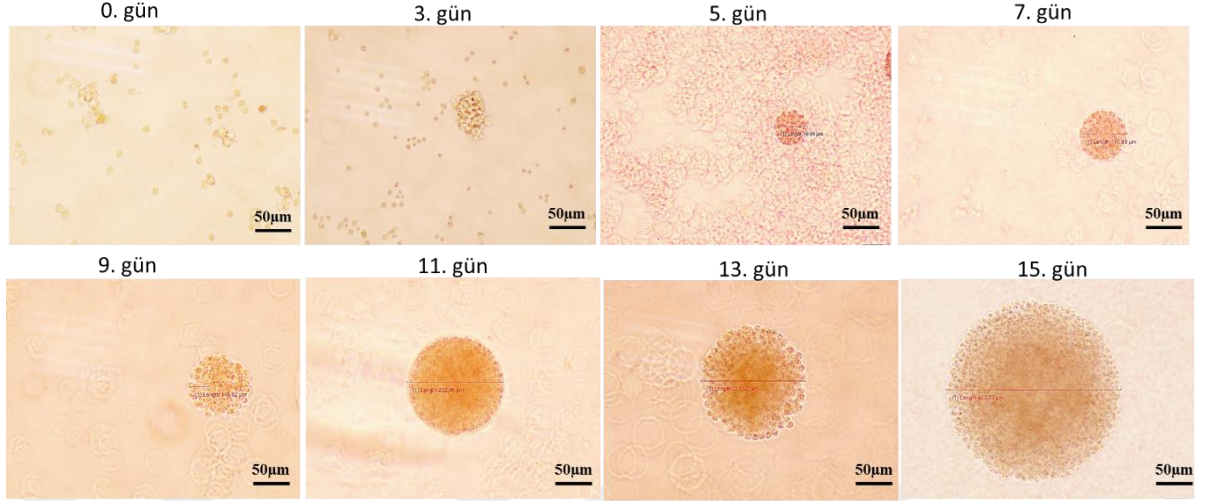
A.

K562

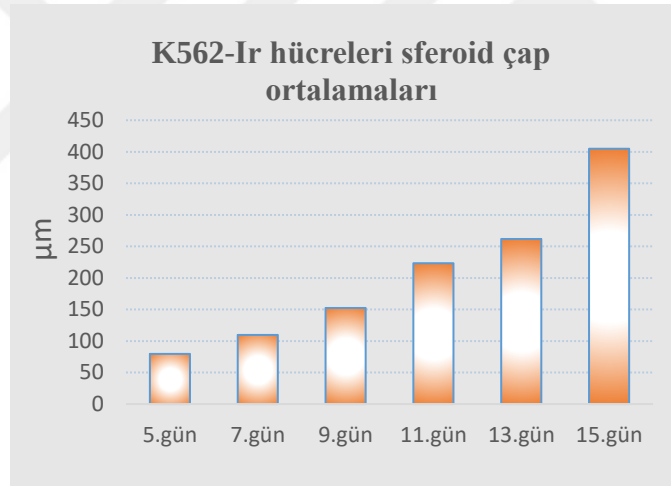


B.

K562- Ir



Şekil 39: A. K562 ve B. K562-Ir hücrelerinin 3-boyutlu kültür ortamında 2 günde 1 çekilen seçilmiş görüntüleri

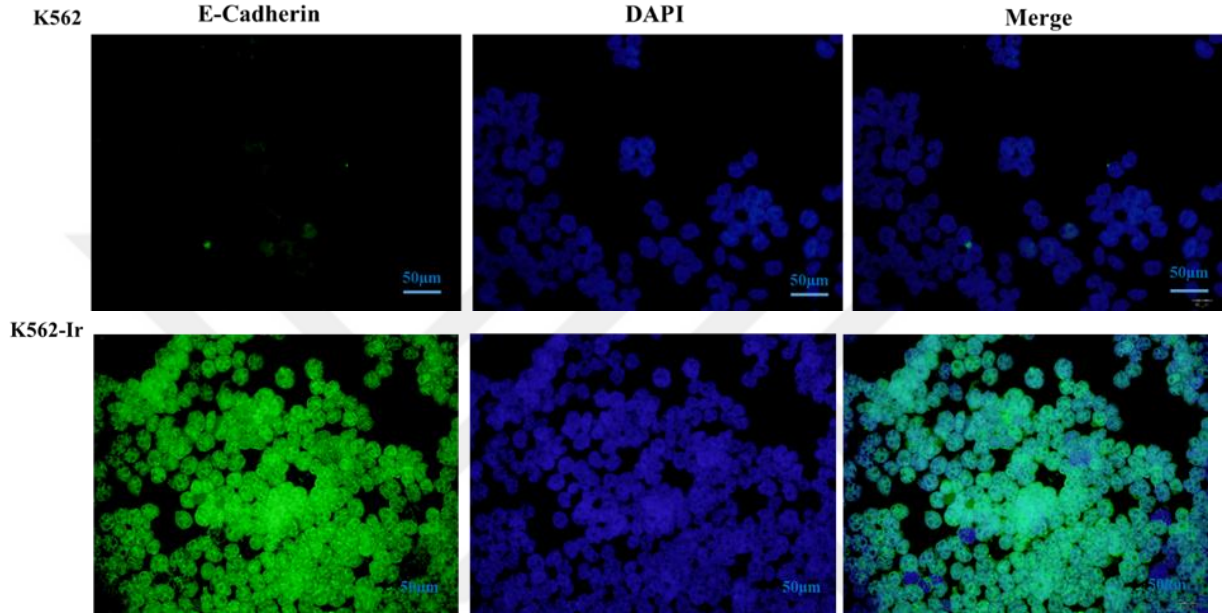


Şekil 40: K562-Ir hücrelerinin 3-boyutlu kültür ortamındaki sferoid oluşumlarının çap ortalamaları grafiği. K562 hücrelerinde sferoid oluşumu gözlenmediğinden grafikte yer verilmemiştir.

4.10 K562-Ir Hücrelerinde E-kaderin Gen İfadesi Artmıştır

Literatürde sferoid oluşumunun E-kaderin ifadesi ile ilişkilendirildiği yayınlar mevcuttur⁹⁹. E-kaderin, kaderin süperailisinin *epitelial kökenli* yüzey bağlantı moleküllerindendir. Solid tümörlerde e-kaderin ifadesinin azalması tümör motalitesini ve

metazotazı arttırmaktadır¹⁰⁰⁻¹⁰². K562-Ir hücrelerinin mekik-şekli yapışan hücre morfolojisi ve düzgün çeperli sferoidler oluşturabilme kapasitesi bize sferoid oluşumunda belirteç olan e-kaderin ekspresyonunun olabileceğini düşündürmüştür. Yapılan immünfluoresans deneylerinde K562-Ir hücrelerinde e-kaderin ifadesinin K562 karşısında oldukça yüksek olduğu gösterilmiştir (Şekil 41)



Şekil 41: K562 ve K562-Ir hücrelerinde e-kaderin immünfluoresan görüntüleri

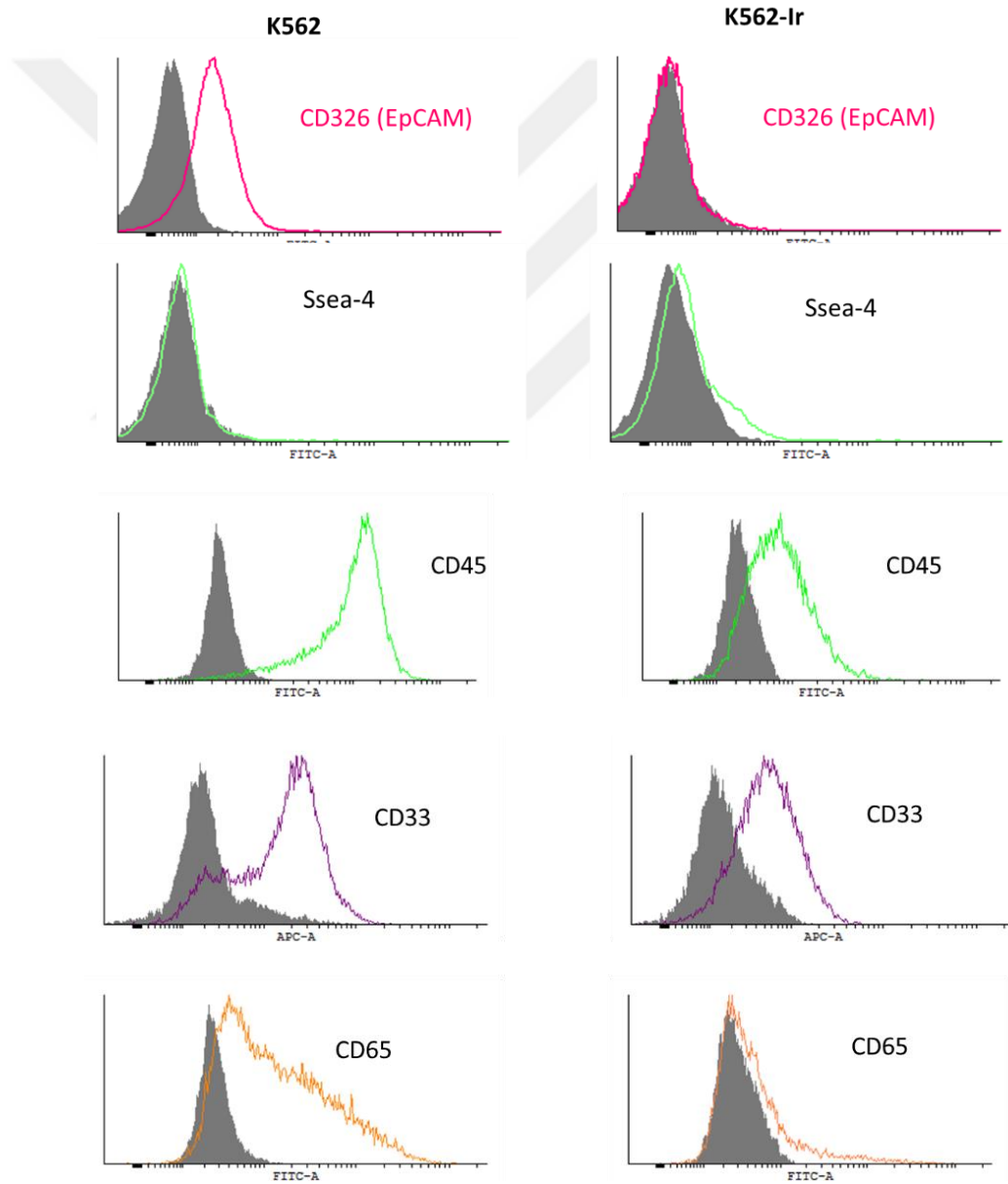
4.11 K562-Ir Hücrelerinin Yüzey Belirteçlerinin Analizi Hematopoetik Hücre Özelliklerini Kaybettiklerini Göstermektedir

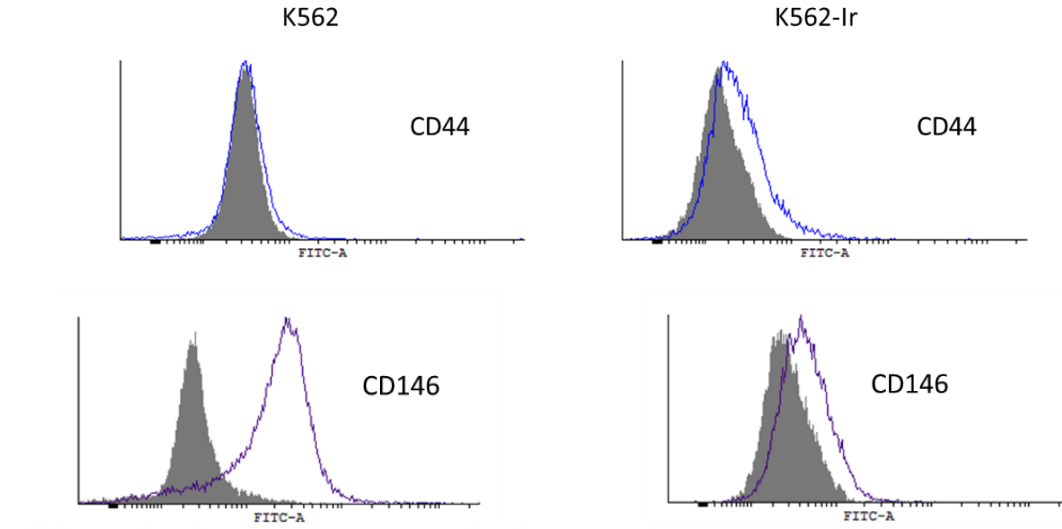
CD (Cluster Differentiation) yüzey proteinleri hücre tiplendirilmesinde kullanılan belirteçlerdir. Biz de bu belirteçlerle K652-Ir hücrelerinin köken aldıkları eritroid seriye ne kadar yakın ya da uzak olduklarını ve bazı önemli kök hücre belirteçlerini barındırıp barındırmadığını anlamaya yönelik çalışmalar gerçekleştirdik. K562-Ir hücreleri atasal K562 hücreleri ile karşılaştırmalı olarak CD3, CD10, CD13, CD15, CD19, CD22, CD24, CD33, CD34, CD38, CD44, CD45, CD62E, CD65, CD90, CD105, CD106, CD117, CD123, CD146, CD166, CD326, tra-1-60, tra-1-81, SSEA4 yüzey antikorları kullanılmış ve akım sitometrisi ile değerlendirilmiştir. CD13, CD15, CD62E, CD64, tra-1-60, tra-1-81 yüzey proteinleri her iki hücre grubunda da pozitiflik göstermekle birlikte iki grup arasında ekspresyon farkı

gözlenmemiştir. CD3, CD10, CD19, CD22, CD24, CD33, CD90, CD105, CD106, CD117, CD123, CD166 yüzey proteinleri her iki hücre grubunda da negatif olarak gözlenmiştir. Kök hücre belirteçleri olan CD34 ve CD38 her iki hücre hattında ekspresyonları çok düşük ve eşittir. Kullanılan belirteçlerin açıklamaları Yöntem bölümü 3.6.11’de verilmiştir.

Şekil 42’de yalnızca iki hücre grubu arasında “fark gözlenen” yüzey belirteçlerinin primer kullanılmayan (background) sinyalle karşılaştırma (overlay) grafikleri gösterilmiştir.

Akım sitometrisi analizine göre K562-İr hücrelerinde CD44 ve SSEA4 yüzey proteinlerinde hafif artış gözlenirken, CD45, CD33, CD65, CD146, CD326 yüzey proteinlerinde azalma gözlenmiştir.





Şekil 42: Atasal ve dirençli hücrelerin yüzey belirteçleri akım sitometri sinyallerinin karşılaştırma grafikleri. Grafikler “Cyflogic” akım sitometri veri analiz programı ile elde edilmiştir. Grafiklerin x aksları o antikorun floresan şiddetini gösterir. Gri alanlar, yalnız işaretli primerin kullanıldığı direkt yöntemde izotip kontrol, primer ve işaretli sekonder antikorun kullanıldığı indirek yöntemde yalnız sekonder antikor konulmuş kontrol tüplerinden gelen sinyali göstermektedir. Primer antikorlardan gelen sinyal negatif kontroller üzerine çakıştırılmıştır (overlay).

4.12 Mikrodizin (microarray) mRNA Ekspresyon Analizi Sonucu Fenotipik Plastisiteyi Desteklemektedir

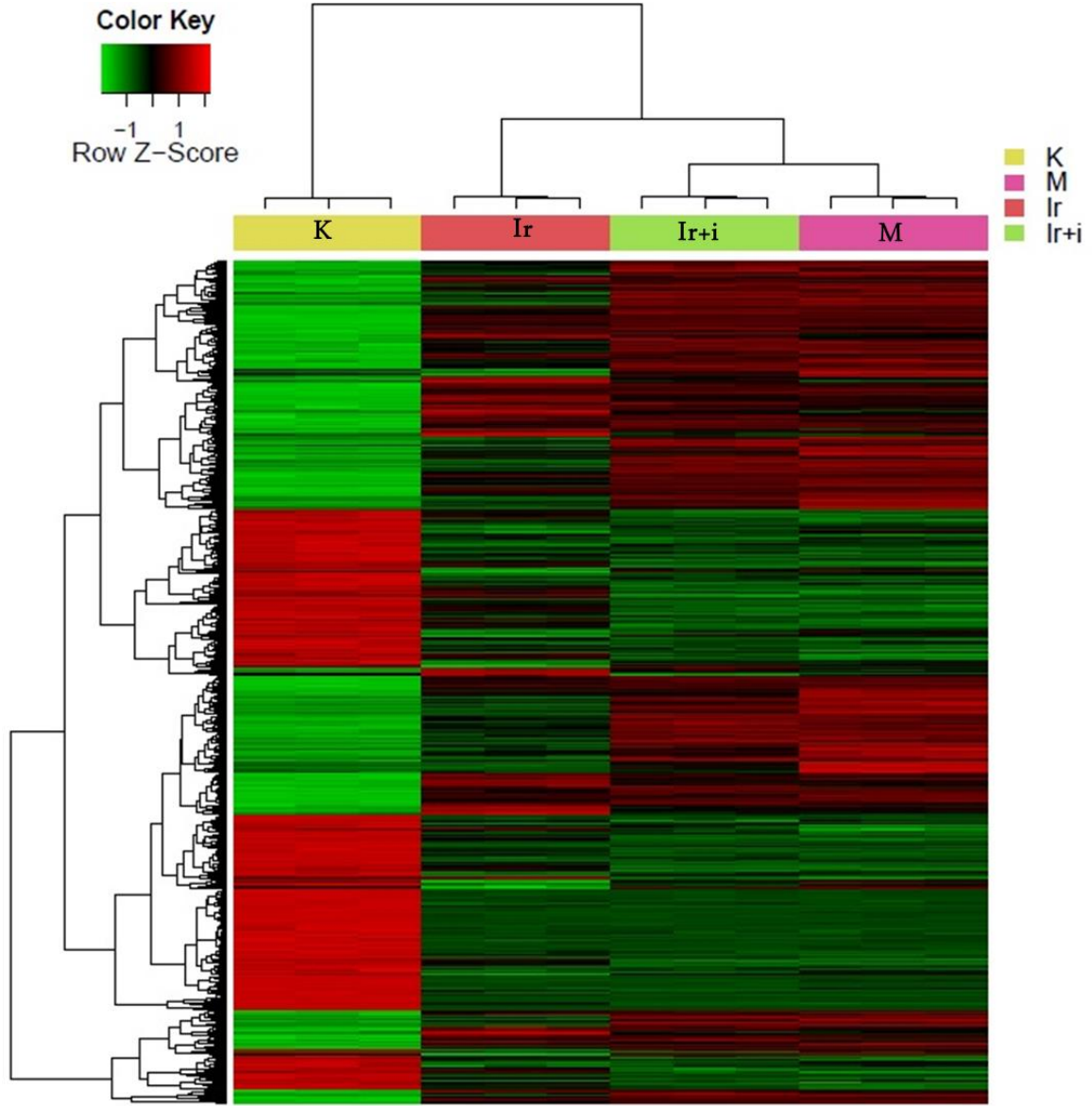
K562 ve K562-Ir hücreleri arasında gözlenen metabolik ve fenotipik farklılıklara yol açan gen ekspresyon değişikliklerini belirleyebilmek amacıyla AROS firmasına (Danimarka) tüm genom mRNA ekspresyon analizi yaptırıldı. Atasal K562 hücreleri ile üç dirençli K562-Ir hücre grubu (yüzen/süspanse K562-Ir hücreler, flaska yapışarak üreyen mekik şeklindeki K562-Ir hücreleri ve normal RPMI’ya alınıp dört hafta imatinibsiz ortamda inkübe edilen K562-Ir hücreleri) üçer kez analiz edildi. Aynı flaskta yere yapışan ve yüzen hücreler arasındaki gen ekspresyonu farklılıklarını ve imatinibe bağlı olan ekspresyon farklılıklarını saptamak hedeflendi. Çalışılan örneklerin kısaltmaları ve açıklamaları Tablo 6’da özetlenmiştir.

Tablo 6: Mikrodizaynleme için gönderilen grupların kısaltmaları ve açıklamaları

Grup Kısaltmaları	Açıklama
K	Atasal K562
Ir	İmatinibsiz K562-Ir
Ir+i	10µM imatinibli ortamda K562-Ir <i>yüzen</i> hücreler
M	10µM imatinibli ortamda K562-Ir <i>yapışan/mekik</i> hücreler

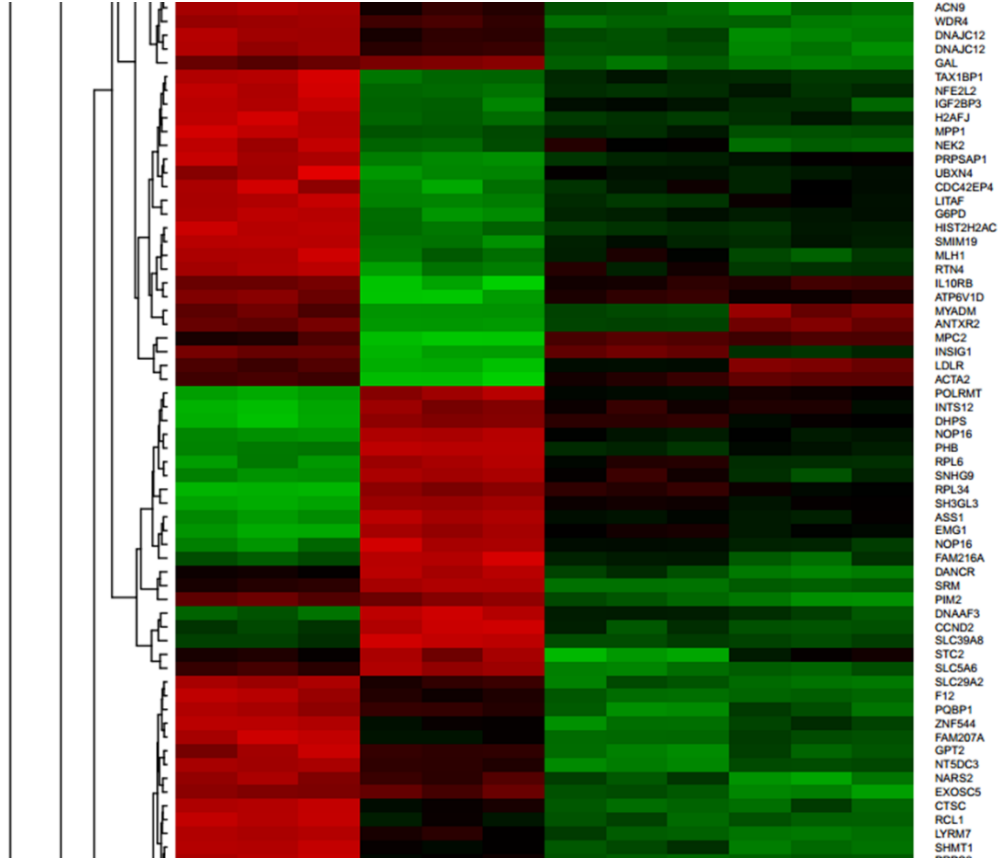
4.12.1 Heatmap (Isı haritası) Analizi

Mikrodizaynde ısı haritası, karşılaştırması yapılan 4 gruptaki her bir genden gelen sinyal şiddetlerinin kıyaslandığı şemadır. Şekil 43’de gösterilen ısı haritası, karşılaştırmalı sinyal şiddetinin -1, 0, +1 (Z score) aralığına indirgenmiş şeklidir. Eksi bir (-1) değerdeki yeşil renkli bölgeler ekspresyonu düşük genleri; artı bir (+1) değerdeki kırmızı renkli bölgeler ekspresyonu yüksek genleri gösterir. Üstteki dendrogram (gruplar arası dallanma) sinyal şiddeti uzaklıklarına göre grupların birbiriyle ilişkisini ifade eder. Dallanmalar yukarıdan aşağıya doğru yorumlandığında, iki ana grup hücre olduğu ilk bakışta göze çarpmaktadır. Bunlar atasal K562 (K) ve dirençli K562-Ir gruplarıdır (Ir, Ir+i, M). İkinci basamak dallanmalar incelendiğinde dirençli hücrelerin iki farklı gruba ayrıldığı görülmektedir, bunlar ilaç uygulanmış (Ir+i, M) ve ilaç uygulanmamış (Ir) dirençli gruplardır. Bu son dallanma imatinib varlığının neden olduğu ekspresyon farklılıklarından kaynaklanmaktadır. Üçüncü ve son basamak dallanma imatinibli ortamda üretilen K562-Ir hücrelerinin ekspresyon paterni açısından iki farklı gruba ayrıldığını işaret eder: yüzen (Ir+i) ve yapışan (M) hücre grupları. Bu dallanma paterni laboratuvarımızda dirençli hücrelerin klonal seçilimle elde edildiğini de göstermektedir.



Şekil 43: K, Ir, Ir+i ve M gruplarının ısı haritası (heatmap). K562 (K), imatinibsiz ortamda inkübe edilen K562-Ir (Ir), 10µM imatinibli ortamda çoğalan süspanse K562-Ir (Ir+i), 10µM imatinibli ortamda yapışarak çoğalan mekik şeklindeki K562-Ir hücrelerinden (M) üç tekrarlı mikrodizinlemeden çıkan verilerden elde edilmiş heatmap analizi görüntüsüdür. -1 değerdeki yeşil bölgeler ekspresyonu düşük genleri, +1 değerdeki kırmızı bölgeler ekspresyonu yüksek genleri göstermektedir.

Aşağıda yakınlaştırılmış ısı haritası görüntüsü verilmiştir (Şekil 44). Her satır, tek bir genin gruplar arasındaki ekspresyon düzeyini ifade eden sinyalleri karşılaştırır.



Şekil 44: Rasgele yakınlaştırılmış ısı haritası görüntüsü. Her bir satır bir genin dört grup arasındaki sinyal karşılaştırmasını gösterir. Gruplar soldan sağa K562, imatinibsiz K562-Ir, imatinibli K562-Ir, K562-Ir “mekik” hücreler

4.12.2 Grupların Gen İfadesi Açısından Karşılaştırmaları

Atasal K562 ile dirençli üç grup hücre gen ekspresyonları açısından karşılaştırılmış, K562’ye göre daha az ve/veya daha fazla ifadesi olan genler listelenmiştir. Gen listeleri ekspresyon farkı en az iki kat olacak şekilde sınırlandırılmıştır. Yazım kolaylığı açısından bu listeler metin içerisinde zaman zaman FEG (Farklı Eksprese olan Genler – DEG- Differentially Expressed Genes) listeleri olarak da geçecektir. K562 (K) ve imatinibli süspanse K562-Ir hücreleri (Ir+i) arasında 1640 genin ekspresyonunun değiştiği görülmüştür. K562 (K) ve

imatinibsiz ortamda inkübe edilen K562-Ir hücreler (Ir) arasında 1346 gen farklı eksprese olmaktadır. İmatinibli (Ir+i) ve imatinibsiz (Ir) süspanse K562-Ir hücreleri arasında ekspresyonu değişmiş 249 gen bulunmaktadır. Bu son karşılaştırma bize dirençli hücrelerde imatinibin uzaklaştırılmasıyla ortaya çıkan FEG listesidir. K562 (K) ve yapışan/mekik K562-Ir hücrelerinin (M) FEG listesinde 1776 gen bulunmaktadır. Her ikisi de imatinibli ortamda üreyen süspanse K562-Ir hücreler (Ir+i) ve yapışan/mekik K562-Ir hücreleri (M) arasında ekspresyonu farklı yalnızca 56 gen listelenmiştir. Karşılaştırılan bu son gruptaki genlerin çoğu yüzeye yapışma ve adezyonla ilgili yüzey molekülü genleridir. Bu bulgu bize yüzen ve yapışan hücrelerin adezyon özellikleri haricinde temel olarak aynı biyolojik özelliklere sahip olduklarını göstermektedir. Yapılan karşılaştırma grupları Tablo 7’de verilmiştir. Şekil 45’de ise grup karşılaştırmalarından birinin (K ile Ir+i) FEG listesinden bir kesit, ekran görüntüsü olarak gösterilmiştir. Listeler biyoinformatik işlemler sonrası ekspresyon kat farkına göre, ifadesi artan genlerden ifadesi azalan genlere doğru sıralanmıştır.

Tablo 7: Gen ifadesi karşılaştırma kategorileri

Karşılaştırmalar	Karşılaştırma Kısaltmaları
K562 ile K562-Ir (ilaçlı)	K ile Ir+i
K562 ile K562-Ir (ilaçsız)	K ile Ir
K562 ile K562-Ir mekik	K ile M
K562-Ir (ilaçlı) ile K562-Ir (ilaçsız)	Ir+i ile. Ir
K562-Ir ilaçlı ile K562-Ir mekik	Ir+i ile M

ID	geneSymbol	geneName	logFC	FoldChange	P.Value	adj P.Val	B	AveExpr	t
T4Ue8_8f	CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	5.44805	43.65425798	1.69E-32	6.80E-29	64.30015	12.185399	127.548
0iS9nXV4	S100A10	S100 calcium binding protein A10	5.360559	41.0855463	1.43E-31	2.10E-28	62.32406	11.9355092	115.4854
ceSnuwk7	DPYSL2	dihydropyrimidinase-like 2	5.118282	34.73412596	5.90E-32	1.35E-28	63.15109	12.2661024	120.3555
E6RYXTc	PRSS2	protease, serine, 2 (trypsin 2)	4.839565	28.63217241	2.01E-30	1.79E-27	59.82639	11.9739934	102.1478
ZeEuC6e	CPVL	carboxypeptidase, vitellogenic-like	4.794458	27.75080956	4.04E-30	3.17E-27	59.15479	10.8631081	98.87623
K4n_ueHf	PRSS3	protease, serine, 3	4.780989	27.49293918	2.19E-29	9.78E-27	57.51801	11.8318266	91.39584
oLN7F5V	SNCA	synuclein, alpha (non A4 component of amyloid)	4.729632	26.53145733	2.67E-31	3.58E-28	61.73953	11.8247194	112.1868
Ew_ik7U	AIF1	allograft inflammatory factor 1	4.665929	25.38542955	1.66E-28	5.33E-26	55.53449	10.9587976	83.17515
WpIDiS9n	S100A10	S100 calcium binding protein A10	4.60652	24.36131697	1.25E-29	6.61E-27	58.06638	11.632975	93.82751
uq4nkXjy	PTGS1	prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (pro)	4.497053	22.58124241	4.43E-30	3.24E-27	59.06547	10.7194387	98.45035
IHLVW11Y	ABCC3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/M)	4.418281	21.38135413	1.68E-30	1.58E-27	59.9988	10.1430626	103.0079
rpw5Xp0C	HBD	hemoglobin, delta	4.247244	18.99100505	3.47E-29	1.47E-26	57.06887	11.2621735	89.45734
9V4f795A	HLA-A	major histocompatibility complex, class I, A	4.18276	18.16084721	1.20E-29	6.61E-27	58.09947	10.6454819	93.97655
WnqLjwql	CRYM	crystallin, mu	4.15986	17.87486268	1.08E-29	6.61E-27	58.20427	10.2660039	94.45049
3gr_1Sht0	RGS18	regulator of G-protein signaling 18	4.136417	17.5867453	5.69E-30	3.98E-27	58.82482	10.1751854	97.31336
3nivFvk5	C1orf116	chromosome 1 open reading frame 116	4.113347	17.30776371	5.25E-29	2.11E-26	56.66485	10.8704028	87.75314
QBhFJQF	CD52	CD52 molecule	4.0753	16.85728538	1.42E-29	7.03E-27	57.93889	10.8589356	93.25566
Ke07d0S	HLA-B	major histocompatibility complex, class I, B	4.029344	16.32876938	1.23E-27	2.96E-25	53.54694	10.1203234	75.75289
9GoohS1	CD7	CD7 molecule	4.003462	16.03843988	4.63E-29	1.91E-26	56.78723	10.2676168	88.26547
6V5R169	TMEM163	transmembrane protein 163	3.995463	15.94976379	2.47E-29	1.07E-26	57.40274	10.4268896	90.89381
lcqie_Jfs7	MEG3	maternally expressed 3 (non-protein coding)	3.982114	15.80286056	9.70E-30	6.23E-27	58.30968	10.1372141	94.9299
EttXrXutX	TSPAN32	tetraspanin 32	3.947497	15.42819427	6.52E-28	1.75E-25	54.18102	11.3423199	78.0386
cdjfqToeg	CPVL	carboxypeptidase, vitellogenic-like	3.917023	15.10571752	1.44E-29	7.03E-27	57.92334	10.2030809	93.18616
HCIVRKC	SNCA	synuclein, alpha (non A4 component of amyloid)	3.797591	13.90556633	5.69E-28	1.55E-25	54.31613	10.1758124	78.53533
oiM6uV.7	WDR72	WD repeat domain 72	3.793219	13.86349274	7.37E-30	4.94E-27	58.57439	10.12434	96.14622
fprgRN4Jf	NKD2	naked cuticle homolog 2 (Drosophila)	3.750227	13.45645548	2.27E-28	7.02E-26	55.22527	11.3403569	81.96956
uw_7gu7e	VGF	VGF nerve growth factor inducible	3.676276	12.78407565	6.91E-27	1.27E-24	51.82596	11.4191118	69.90779
oEYU8kn	KIF14	kinacin family member 14	3.680038	12.72000504	2.28E-27	4.96E-25	52.9342	10.9612004	73.61327

Şekil 45: K ve Ir+i grubunun FEG listesinden bir kesitin ekran görüntüsü. Sarı kolon gen sembollerini gösterir. Yanındaki kolon genlerin kısaltmalarının açılımının yazılı olduğu kolondur. Yeşil kolon sinyal farklarının $-\log_2$ düzeyinde gösterilen kat farklarıdır. Pembe kolon ‘adjacent’ p-value göstermektedir. Liste, + kat farkından – kat farkına doğru sıralanmıştır.

4.12.3 İnternet Tabanlı Biyoinformatik Araçların Kullanımıyla Mikrodizin Analizi

Dirençli ve atasal K562 hücre gruplarında, FEG listelerinin WebGestalt, DAVID, Panther ve GOrilla online fonksiyonel anotasyon araçlarında, ilişkilendirme (enrichment) analizleri yapılmıştır. Şekil 46’da GOrilla platformunda K562 (K) ve imatinibli süspanse K562-Ir (Ir+i) hücre grubu arasındaki 1640 genin analiz sonuçlarından bir kesit örnek olarak verilmiştir.

Process	Function	Component	Back to GOrilla
---------	----------	-----------	-----------------

GO term	Description	P-value	FDR q-value	Enrichment (N, B, n, b)	Gen
GO:0032502	developmental process	1.83E-7	1.35E-3	1.24 (1285,386,650,242)	[+] Show genes
GO:0044767	single-organism developmental process	1.91E-7	7.02E-4	1.25 (1285,364,650,230)	[+] Show genes
GO:0048856	anatomical structure development	2.69E-7	6.61E-4	1.39 (1285,255,525,145)	[+] Show genes
GO:0030154	cell differentiation	2.72E-5	5.01E-2	1.37 (1285,149,650,103)	[+] Show genes
GO:0046903	secretion	3.29E-5	4.85E-2	1.28 (1285,112,881,98)	[+] Show genes
GO:0040011	locomotion	5.24E-5	6.43E-2	1.59 (1285,87,530,57)	[+] Show genes
GO:0032940	secretion by cell	6.13E-5	6.46E-2	1.28 (1285,105,881,92)	[+] Show genes
GO:0006928	movement of cell or subcellular component	7.46E-5	6.87E-2	1.67 (1285,102,407,54)	[+] Show genes
GO:0034341	response to interferon-gamma	8.74E-5	7.15E-2	10.80 (1285,7,85,5)	[+] Show genes
GO:0048771	tissue remodeling	8.75E-5	6.45E-2	3.89 (1285,10,297,9)	[+] Show genes
GO:0048513	animal organ development	1.15E-4	7.69E-2	1.67 (1285,117,362,55)	[+] Show genes
GO:0048870	cell motility	1.43E-4	8.78E-2	1.75 (1285,75,422,43)	[+] Show genes
GO:0002009	morphogenesis of an epithelium	1.52E-4	8.61E-2	2.17 (1285,25,474,20)	[+] Show genes
GO:0048729	tissue morphogenesis	1.56E-4	8.23E-2	1.89 (1285,37,515,28)	[+] Show genes
GO:0006887	exocytosis	1.68E-4	8.26E-2	1.29 (1285,87,881,77)	[+] Show genes
GO:0045055	regulated exocytosis	1.78E-4	8.18E-2	1.30 (1285,82,881,73)	[+] Show genes
GO:0023056	positive regulation of signaling	2.05E-4	8.87E-2	1.36 (1285,129,652,89)	[+] Show genes
GO:0007166	cell surface receptor signaling pathway	2.13E-4	8.72E-2	1.28 (1285,180,692,124)	[+] Show genes
GO:0032501	multicellular organismal process	2.15E-4	8.32E-2	1.32 (1285,248,499,127)	[+] Show genes
GO:0009653	anatomical structure morphogenesis	2.17E-4	8.01E-2	1.48 (1285,109,532,67)	[+] Show genes
GO:0009967	positive regulation of signal transduction	2.2E-4	7.73E-2	1.37 (1285,119,652,83)	[+] Show genes
GO:0040012	regulation of locomotion	2.67E-4	8.95E-2	1.60 (1285,74,520,48)	[+] Show genes
GO:0016477	cell migration	2.9E-4	9.3E-2	1.73 (1285,72,422,41)	[+] Show genes
GO:0007275	multicellular organism development	2.98E-4	9.14E-2	1.53 (1285,58,650,45)	[+] Show genes
GO:0010647	positive regulation of cell communication	3.34E-4	9.84E-2	1.35 (1285,130,652,89)	[+] Show genes
GO:0050877	neurological system process	3.49E-4	9.9E-2	1.30 (1285,53,952,51)	[+] Show genes
GO:0048869	cellular developmental process	3.71E-4	1.01E-1	1.26 (1285,211,650,135)	[+] Show genes

Şekil 46: GOrilla online sayfasında K ve Ir+i arasında FEG listesinde yer alan genlerin Biological Process Gene Ontology Enrichment analizinden ekran görüntü kesiti.

Şekil 46'daki ekran görüntüsünde en yüksek ilişki anlamlılığına sahip biyolojik süreç gruplandırmasında gelişimsel süreç genleri, anatomik yapı gelişimi genleri, hücre farklılaşması genleri, hücre hareketi/migrasyon genleri, doku yeniden düzenlenmesi genleri, epitel doku düzenleme genleri, morfogeneze genleri, migrasyon genleri vb. olduğu görülmektedir. Bu analiz sonuçları, K562-Ir hücreleri ile atasal K562 hücreleri arasında farklılaşma/özgüllleşme açısından bir ayrışma olduğu görüşümüzü desteklemektedir. K ile Ir+i FEG listesi dört ayrı çevrimiçi araçta da incelendiğinde Tablo 8'de görüldüğü gibi benzer sonuçlar elde edilmiştir

Tablo 8: K562 ve imatinibli ortamdaki K562-Ir arasında (K ile Ir+i) farklı ifade olan 1640 genin dört ayrı çevrimiçi platformda ilişkilendirme analizi karşılaştırması (en yüksek anlamlılıktaki ontolojiler listelenmiştir)

Webgestalt	GOrilla	PANTHER	DAVID
Positive regulation of hemopoiesis	Anatomical structure development	Cell differentiation	Negative regulation of myeloid leukocyte differentiation

Response to inorganics	Developmental process	Cell death	Negative regulation of growth
Regulation of adhesion	Cell differentiation	Anatomical structure	Positive regulation of epithelial cell proliferation
Regulation of immune system	Tissue morphogenesis	Cell adhesion	
	Morphogenesis of an epithelium		
	Cell migration		
	Tissue remodeling		
	Cell motility		
	locomotion		

K562 ve *imatinib*siz ortamdaki K562-Ir arasında (K ile Ir) farklı ifade olan 1346 genin ontolojileri Tablo 9’de verilmiştir. Gen ontolojilerinin Ir+i grubundan farklı olmadığı görülmektedir.

Tablo 9: K562 ve *imatinib*siz ortamdaki K562-Ir arasında (K ile Ir) farklı ifade olan 1346 genin dört ayrı çevrimiçi platformda ilişkilendirme analizi karşılaştırması (en yüksek anlamlılıktaki ontolojiler listelenmiştir)

Webgestalt	GORilla	PANTHER	DAVID
Regulation of adhesion	Anatomical structure	Cell proliferation	Neg. Regulation of cell growth
Regulation of cell death	Animal organ developement	Cell adhesion	Endothelial cell migration
	Cell differentiation	Cell recognition	
	Myeloid cell differentiation	Cell cycle	
	Developmental process		
	digestion		
	Brain development		

İmatinibli ortamdaki dirençli hücrelerde yüzen ve yapışan/mekik hücreler arasında (Ir+i ile M) ekspresyonu farklı yalnız 56 gen vardır. Bu genlerin ilişkilendirme (enrichment) analizleri Tablo 10’da verilmiştir. Yüzen ve yapışan hücreler arasındaki farklılığın ekstraselüler matriks-hücre ilişkisi, hücre migrasyonu, adhezyon ile ilişkili genler olduğu görülmektedir. Mekik hücrelerin morfolojisi ve davranışı göz önüne alındığında bu gen gruplarında farklılık gözlenmesi olağandır.

Tablo 10: İmatinibli ortamdaki yüzen ve yapışan hücreler arasında (Ir+i ile M) farklı ifade olan 56 genin dört ayrı çevrimiçi platformda ilişkilendirme analizi karşılaştırması (en yüksek anlamlılıktaki ontolojiler listelenmiştir)

Webgestalt	GOrilla	PANTHER	DAVID
Cell migration	Regulation of smooth muscle-cell-matrix adhesion	Biological adhesion	Extracellular matrix
Cell proliferation	Response to steroid hormone	Cellular component organisation	Cell adhesion
Regulation of cellular component movement	Regulation of locomotion	Developement	Regulation of cell growth
Response to steroids	Regulation of cell motality	Localization	Serine-type endopeptidase activity
	Tissue developpement		Extracellular space
	Cell migration		

İmatinibli ve imatinibsiz ortamlarda inkübe edilen dirençli hücreler (Ir ile Ir+i) arasında ekspresyonu değişmiş 249 gen vardır. Bu genlerin ilişkilendirme analizi Tablo 11’de verilmiştir.

Tablo 11: İmatinibli ve imatinibsiz ortamdaki dirençli hücreler arasında (Ir ile Ir+i) farklı ifade olan 259 genin dört ayrı çevrimiçi platformda ilişkilendirme analizi karşılaştırması (en yüksek anlamlılıktaki ontolojiler listelenmiştir)

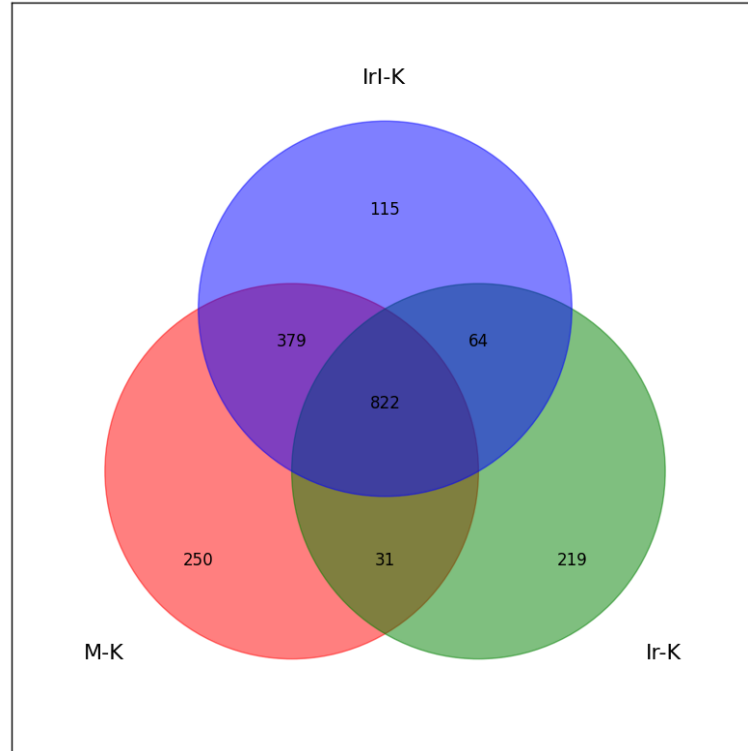
Webgestalt	GORilla	PANTHER	DAVID
Blood vessel morphogenesis	<i>No GO terms with and enrichment p-value</i>	Biological adhesion	Type1 interferon signaling pathway
Leukocyte migration		Cellular component organization	Antigen processing and signaling pathway
Response to transforming growth factor beta		Developmental process	Antigen processing and presentation
İntegrin-mediated signaling pathway		localization	İnterferon-gamma mediated signaling pathway
Membrane raft organization		locomotion	Regulation of immune response
Membrane invagination		Response to stimulus	
Negative regulation of hydrolase activity			

GORilla platformu bu gen listesi için anlamlı ilişkilendirme yapamamıştır. Diğer platformlardaki gen ontolojilerinin de birbirleriyle uyumlu olmadığı görülmektedir. 249 gen içeren FEG listesi için görülen bu “uyumsuz” tablo, FEG listesi içindeki genlerin biyolojik süreçlerdeki ilişkilerinin yakınlığı-uzaklığı ile ilgilidir. Örneğin yukarıda verildiği gibi Ir+i ile M FEG listesindeki genler sayıca çok daha az olmasına rağmen gen ontoloji analizlerinin oldukça uyumlu olması, listedeki genlerin çoğunluğunun adhezyon molekülleri ile ilişkili olmasından kaynaklanmaktadır.

Atasal hücreler ve imatinibli ortamda yere yapışan hücreler arasında (K ile M) FEG listesi karşılaştırması Ir+i ve M hücre gruplarının aynı hücreler olması sebebiyle burada verilmemiştir.

4.12.4 Venn Diyagramları

Dört grup arası FEG listelerinde ortak ve farklı olan genleri ayırt etmek için Venn diyagramları kullanıldı. Şekil 42’de dirençli üç hücre grubunun K562 ile karşılaştırıldığı Venn diyagramı verilmiştir. Daire olarak gösterilen her bir küme, K562 atasal hücreleriyle bir dirençli hücre grubunun karşılaştırılması sonucunda, ekspresyonu farklı olan (artmış veya azalmış) genleri içerir. Kesişim bölgeleri, karşılaştırılan gruplarda ortak olarak ekspresyonu artmış veya azalmış genleri temsil eder. Venn diyagramının her bir bölmesinde sayıyla belirtilen genlerin listeleri çıkartılmış ve ayrı ayrı incelenmiştir. Dirençli hücrelerin atasal hücrelerden temel farkını, üç kümenin kesişim bölgesi temsil etmektedir. Bu kesişim kümesinde, dirençli üç hücre grubunun (Ir, Ir+i, M) atasal K562 hücrelerinden farklı eksprese ettiği 822 gen bulunmaktadır.



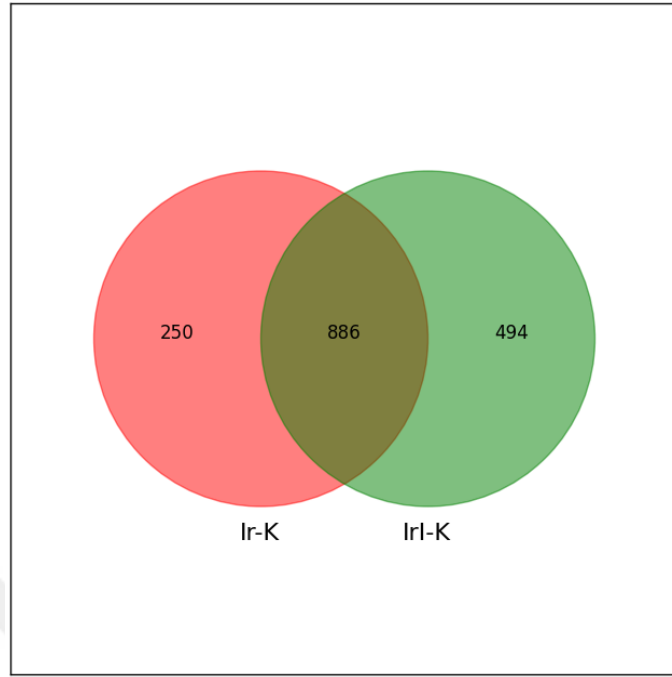
Şekil 47: M, Ir+i ve Ir hücrelerinin atasal K562 hücrelerinden farklı olarak eksprese ettiği genleri temsil eden üç kümeli Venn diyagramı

İlgili 822 gen, dört farklı çevrimiçi araçla “Biological Process” başlığı altında analiz edildi. Gen ontoloji gruplandırmaları, dirençli hücre gruplarının atasal K562 hücrelerinden farklı olarak, myeloid hücre farklılaşması, adezyon, proliferatif özellikler, gelişim, hücre hareketi ve genel hücre farklılaşması gibi süreçlerde değişime uğradığını göstermektedir. Hematopoezi de etkileyen genlerin de değişime uğramış olması dikkat çekicidir (Tablo 12).

Tablo 12: Üç kümeli Venn diyagramının kesişim kümesindeki genler için dört ayrı çevrimiçi araçla yapılan Biological Process gen ontoloji karşılaştırma tablosu (en yüksek anlamlılıktaki ontolojiler listelenmiştir)

Webgestalt	GOrilla	PANTHER	DAVID
Regulation of cell adhesion	Regulation of myeloid cell differentiation	Biological adhesion	Cell-cell-adhesion
Regulation of hemopoiesis	Regulation of developmental process	Developmental process	Oxidation-reduction process
Response to inorganic substance	Positive regulation of cell differentiation	Localization	Negative regulation of growth
	Regulation of adhesion	Locomotion	Cadmium zinc/copper
	Anatomical structure developement	Multicellular organismal process	

Dirençli üç hücre grubunun (Ir, Ir+i, M) atasal hücrelerden ekspresyon düzeyindeki temel farklarını temsil eden kesişim bölgesi dışında kalan bölgeler; atasal hücrelerle karşılaştırıldığında her bir karşılaştırma grubunun birbirlerinden farklarını temsil eder. Bu bölgeler kendi aralarında değişik şekillerde karşılaştırılıp, yorumlanabilir. Örneğin yukarıdaki 3'lü Venn diagramından (Şekil 47) “M ile K” FEG kümesini çıkarttığımızda aşağıdaki imatinibli ve imatinibsiz ortamlarda dirençli hücrelerin atasal hücrelerden ekspresyon farklılıklarını gösteren ikili Venn diagramı elde edilir (Şekil 48).



Şekil 48: Ir+i ve Ir hücrelerinin atasal K562 hücrelerinden farklı olarak eksprese ettiği genleri temsil eden iki kümeli Venn diyagramı

Kesişim kümesindeki 886 gen, iki hücre grubunun (Ir ile Ir+i) K562’den farklı eksprese edilen ortak genlerini verir. Bu küme imatinibden bağımsız biyolojik farklılıklarını temsil eder. Bu 886 gen için dört farklı çevrimiçi araçta yapılan gen antolojisi analiz sonucu Tablo 13’de gösterilmiştir. Yine adezyon, farklılaşma ve gelişim gen ontolojilerindeki örtüşme izlenmektedir.

Tablo 13: İkili Venn diyagramının (K ile Ir/ Kile Ir+i) kesişim kümesindeki genlerin dört ayrı çevrimiçi araçla yapılan Biological Process gen ontoloji karşılaştırma tablosu (en yüksek anlamlılıktaki ontolojiler listelenmiş)

Webgestalt	GOrilla	PANTHER	DAVID
Regulation of cell adhesion	Regulation of myeloid cell differentiation	Biological adhesion	Cadmium/zinc/metal ion
Regulation of hemopoiesis	Regulation of developmental process	Developmental process	Cell death regulation

Response to inorganic substance	Positive regulation of cell differentiation	Multicellular organismal process	Wnt signaling
	Regulation of adhesion	Locomotion	
	Anatomical structure developement	Localisation	

Kesişim kümesi dışında kalan bölgeler ise dirençli hücrelerde imatinibe bağlı olarak değişen gen ekspresyonun, atasal hücrelerden farkını gösterir. İmatinib varlığında 494 genin, imatinib ortamdan uzaklaştırıldığında 250 genin –toplamda 744 genin- ifadesi değişime uğramaktadır. Bu genler karşılaştırılan hücrelerdeki kalıcı biyolojik farklılıklardan değil, imatinib varlığı/yokluğunun yol açtığı geçici ekspresyon değişikliklerini temsil etmektedir. Tablo 14’de imatinibin varlığı/yokluğunda değişen genlerin toplamı için dört ayrı çevrimiçi araçta karşılaştırmalı analizi gösterilmektedir.

Tablo 14: İkili Venn diyagramının (K ile Ir/ Kile Ir+i) kesişim kümesi dışında kalan genlerin dört ayrı çevrimiçi araçla yapılan Biological Process gen ontoloji karşılaştırma tablosu (en en yüksek anlamlılıktaki ontolojiler listelenmiştir)

Webgestalt	GORilla	PANTHER	DAVID
Positive regulation of molecular function	Amide biosynthetic process	Metabolic process	RNA processing
Positive regulation of catalytic activity	Protein targeting to ER	Sensory perception of chemical stimulus	Translation
Regulation of hydrolase activity	Protein localization to endoplasmic reticulum		Protein targeting to membrane
Cell death	Intracellular protein transport		Cytoplasmic translation
Regulation of apoptotic process	Protein targeting		Cell-cell adhesion

	Co-translational protein targeting		
	mRNA catabolic process		

Tablo 14’de imatinibin etkilediği genlerin fonksiyonlarına baktığımızda çoğunlukla protein translasyonu ve taşınımı ile ilgili olduğu görmekteyiz. Kesişim kümesindeki gibi, hücre farklılaşması ve gelişim ile ilgili gen gruplarını etkilenmemesi dikkat çekicidir.

4.13 Mikrodizin Analizi Sonuçları Rasgele Seçilmiş Genlerde Yapılan Q-PCR Analizi ile Doğrulandı

Mikrodizin verilerinin doğrulanması için K ve Ir+i karşılaştırma listesinin ilk ve son sırasında yer alan (en çok ve en az ifadesi olan) genlerden rasgele seçilenler, K562 ve K562-Ir hücrelerinde kantitatif PCR ile ekspresyon düzeyleri ölçüldü. Mikrodizin verisine göre en çok eksprese olan genlerden PBX1, BTG2, S100A10, BMP6, IGFBP5 ve EMP1’in K562-Ir hücrelerinde arttığı doğrulandı. Benzer şekilde mikrodizin verisine göre ifadesi en azalmış genlerden PIM1 ve SRGN ekspresyonlarının K562-Ir hücrelerinde azaldığı doğrulandı. Yine rastgele seçilmiş olan VCX, PTGS1, DPYSL2, HOXA10 ve HOOK1 genlerine ait primerler optimize edilemediğinden Q-PCR ile değerlendirilememiştir. Mikrodizin verisine göre ifadesi en çok artan gen CD44’dür. Q-PCR sonuçları CD44’ün atasal ve dirençli hücrelerde ekspresyonunun eşit olduğunu göstermiştir; ancak protein düzeyinde, hem Western blot hem de immunfluoresan blotlama yöntemleriyle CD44’ün yüksek düzeydeki ifadesi gösterilmiştir (Şekil 50, Şekil 51). Q-PCR’da alınan sonucun CD44’ün çok varyantlı bir gen olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. ALDH1A2 ekspresyonu ise mikrodizin verisinde K562-Ir’de azalmış olarak görülürken Q-PCR sonuçlarına göre artmış çıkmıştır. Rastgele seçilen genler arasında, Q-PCR sonucu mikrodizin verileriyle örtüşmeyen tek gendir. Bunlar ve mikrodizin sonuçlarında çıkan diğer bazı genlerin direnç oluşumdaki olası rollerini için orta vadede çalışmalar planlanmaktadır. Kantitatif PCR sonuçları Şekil 49’da özetlenmiştir.

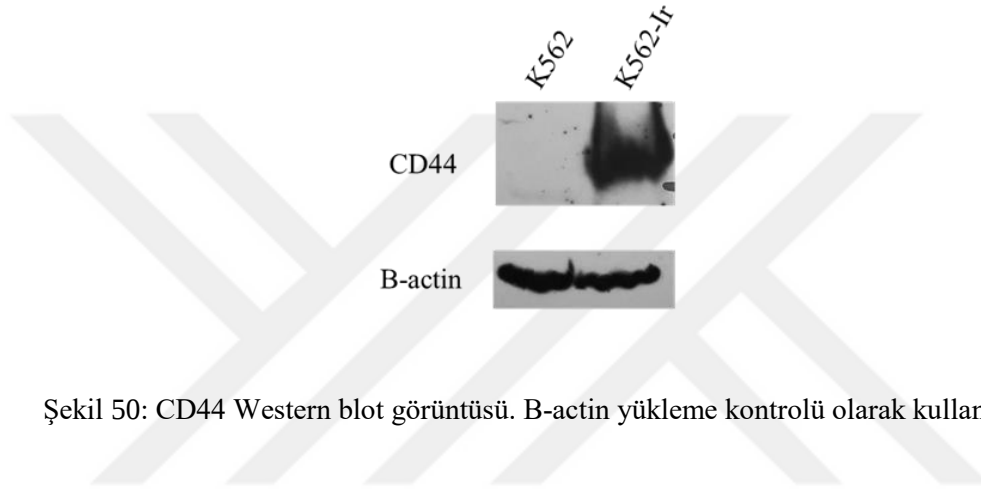
GEN	MİCROARRAY	REAL-TİME
PBX1	↑	↑
BTG2	↑	↑
S100A10	↑	↑
BMP6	↑	↑
IGFBP5	↑	↑
EMP1	↑	↑
CD44	↑	↔*
PTGS1	↑	—
DPYSL2	↑	—
HOXA10	↑	—
HOOK1	↑	—
PIM1	↓	↓
SRGN	↓	↓
ALDH1A2	↓	↑
VCX	↓	—
EPCAM	↓	(Protein düzeyinde doğrulandı)

Şekil 49: Mikrodizileme sonuçlarından rasgele seçilmiş genlerin Q-PCR doğrulama sonuçları. EpCAM ekspresyonunun azaldığı Q-PCR 'la değil, akım sitometrisi yöntemiyle protein düzeyinde doğrulanmıştır. Hem Western blot hem de immunfluoresan yöntemiyle K562-İr deki yüksek CD44 ifadesi protein düzeyinde gösterilmiştir. (Q-PCR sonuçlarına göre CD44 ekspresyonu K562 ve K562-İr arasında eşit gözükmemektedir(*) ancak bu durumun çok varyantlı bir gen olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.)

4.14 K562-İr Hücrelerinde CD44 Proteini Yüksek Düzeyde İfade Edilmektedir

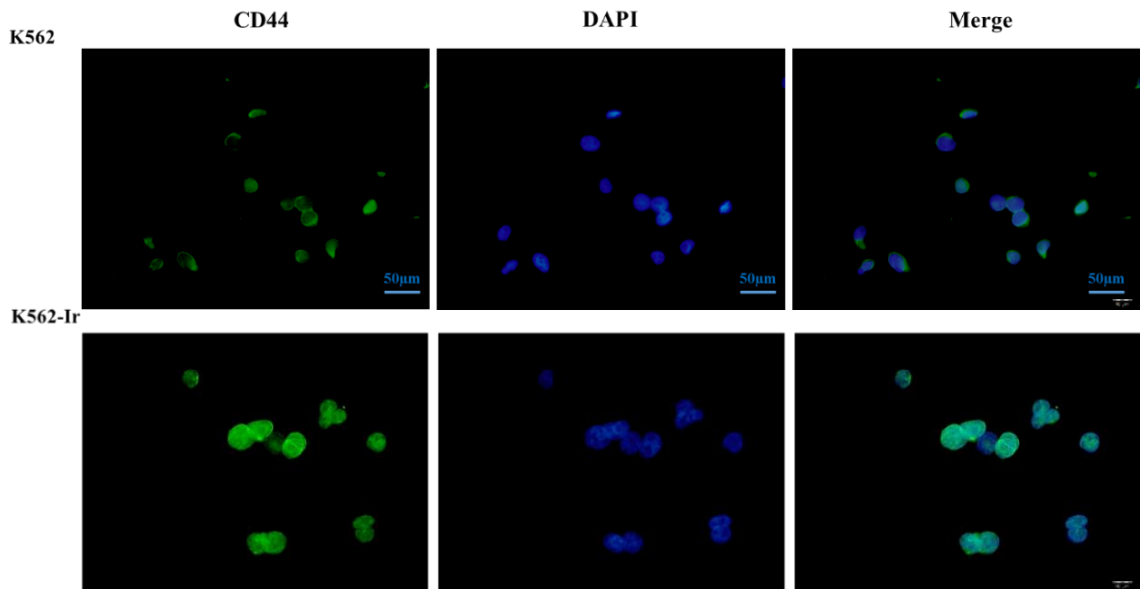
Mikrodizin sonuçlarımızın FEG listelerinde dirençli hücrelerde ifadesi en çok artmış gen CD44'tür. Literatür araştırmalarımızda bir membran proteini olan CD44'ün ekstraselüler matriksle olan ilişkisi ve bir sinyal iletim platformu olarak anılmasına ek olarak, bir kanser kök hücre belirteci olduğuna yönelik fazla sayıda yayınlara karşılaştık¹⁰³⁻¹⁰⁶. CD44'ün normal hematopoetik kök hücrelerde değil, lösemik kök hücrelerin yerleşiminde rol oynadığı; baskılanmasının lösemik kök hücrelerin ortadan kalkmalarıyla (eliminasyon) sonuçlandığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır¹⁰⁷⁻¹¹⁰. K562-İr hücrelerinin fenotipik plastisitesi göz önüne

alındığında bu tür belirteçlerin pozitifliğini vurgulamak önem kazanmaktadır. Akım sitometrisi ile yaptığımız deneylerimizde K562-Ir hücrelerinde CD44'ün artmış ifadesini gösterildi. Akım sitometrisinde kullanılan antikor Western-blot yönteminde tekrar kullanıldı. Şekil 50'de görüldüğü gibi K562-Ir hücrelerinde CD44 ifadesi oldukça artmıştır. Ek olarak Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji AD. Prof.Dr.Gülperi Öktem'in laboratuvarında yapılan CD44 immünfluoresan boyama sonuçları da (Şekil 51 A) K562-Ir hücrelerinde CD44'ün artmış olduğu gösterilmektedir. Şekil 51 B'de immünfluoresan sinyal şiddetinin nümerik analizi verilmiştir.

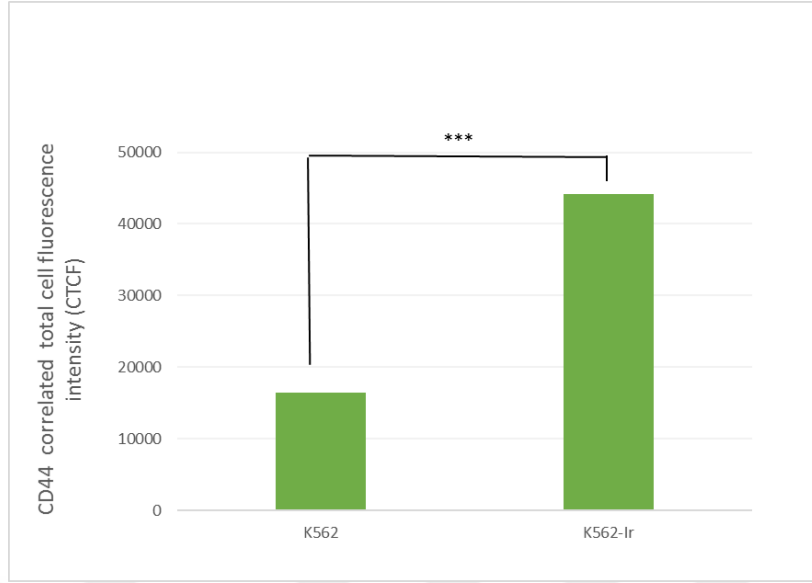


Şekil 50: CD44 Western blot görüntüsü. B-actin yükleme kontrolü olarak kullanılmıştır

A.



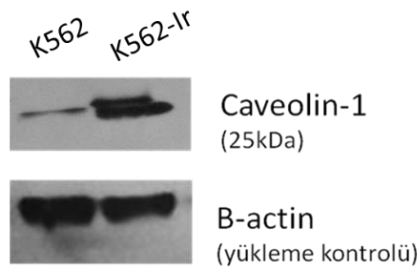
B.



Şekil 51: K562 ve K562-Ir hücreleri arasındaki CD44 ekspresyon farkı. A. K562 ve K562-Ir hücrelerinde CD44 immünfluoresan boyama görüntüleri B. K562 ve K562-Ir hücreleri arasında CD44 immünfluoresan sinyal şiddetinin dijital analiz (CTCF analizi) grafiği.

4.15 K562-Ir Hücrelerinde Caveolin-1 Proteini Yüksek Düzeyde İfade Edilmektedir

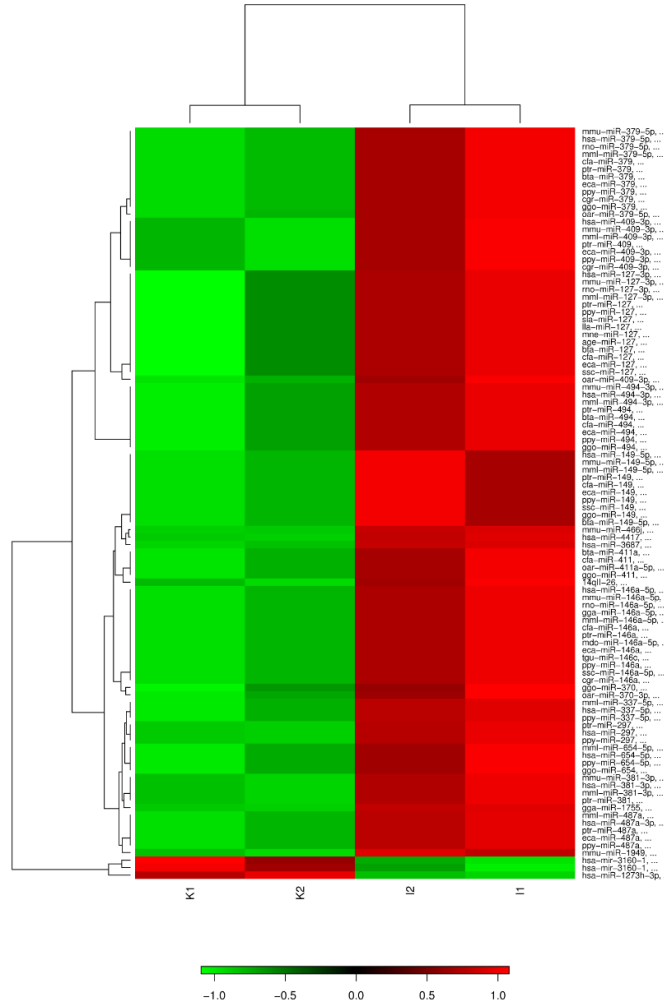
Bir kök hücre belirteci olarak kabul CD44 düzeyinin yüksekliğini saptadıktan sonra bir diğer kök hücre belirteci olarak kabul edilen ve mikrodizin analizlerinde ifadesi yüksek çıkan caveolin-1'i de protein düzeyinde inceledik. Caveolin-1 proteininin kanser kök hücrelerinde yüksek ifadesi, ilaç direncindeki ve hücre trans-diferansiyasyonundaki rolleri ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır¹¹¹⁻¹¹⁵. Şekil 52'de gösterildiği gibi Western-blot sonuçları, atasal K562 hücreleriyle karşılaştırıldığında dirençli K562-Ir hücrelerinde caveolin-1 proteininin daha yüksek düzeyde ifade edildiğini göstermektedir.



Şekil 52: Caveolin-1 ekspresyonunun karşılaştırmalı Western blot görüntüsü.

4.15 miRNA Mikrodizin Analizi Sonuçları

miRNA'lar (mikroRNA'lar) genetik ifadenin önemli düzenleyicileridir. K562-İr hücrelerinin gösterdiği fenotipik plastisite ve ilaç direncinin miRNA ifade değişiklikleriyle ilişkili olup olmadığını araştırmak amacıyla, K562 ve K562-İr hücrelerinden izole edilen RNA örnekleri ATLAS Biolab (Almanya) firmasına gönderilerek miRNA tam genom analizi yaptırıldı. Analiz sonucunda literatürde ilaç direnciyle ilişkilendirilen miR-127, miR-134, miR-487, miR-379, miR-337 mikroRNA'larının; farklılaşmayı baskıladığı bildirilen miR-433 mikroRNA'sının; hücre çoğalması ve apoptoz direnciyle ilişkili miR-149, miR-134, miR-494 ve miR-654 mikroRNalarının primer K562-İr hücrelerinde ekspresyonlarının arttığı görülmüştür. Şekil 53'de ifadesi artan ve azalan ilk yüz miRNA geni için yapılmış ısı haritası verilmiştir. Belirtilen miRNA ile ilgili daha detaylı çalışmalar orta vadede planlanmıştır.



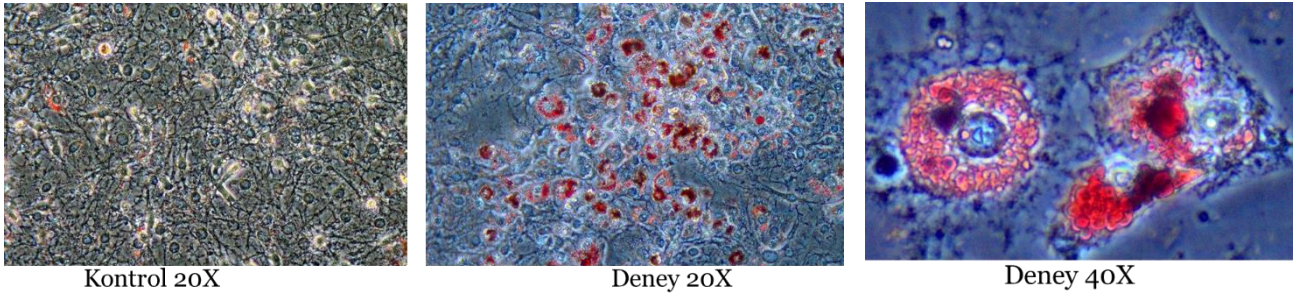
Şekil 53: K562 ve K562-İr örneklerinin miRNA mikrodizin iki tekrarlı ısı haritası (heatmap). (ilk 100 gen için) kırmızı renkli bölgeler artan genler yeşil renkli bölgeler azalan genleri belirtmektedir.

4.16 K562-Ir Hücrelerini Farklılaştırma Deneyleri

Mikrodizin analizinde dirençli hücrelerinin, atasal hücrelerden farklı olan hücre ve doku gelişim genlerinin ekspresyon değişiklikleri, bu hücrelerin başka hücre serilerine farklılaşma potansiyellerinin olabileceğini düşündürdü. Bunu araştırmak amacıyla atasal K562 ile imatinibsiz ve 10 μ M imatinibli ortamlarda çoğaltılan K562-Ir hücreleri, adiposit ve osteosit dönüşümü için gereken ortamlara farklı süreler için alınmışlardır. Farklılaştırma deneyleri birçok kez tekrar edilmesine rağmen K562-Ir hücrelerinde izlenen adiposit veya osteosit spesifik bulgular anlamlılık göstermedi.

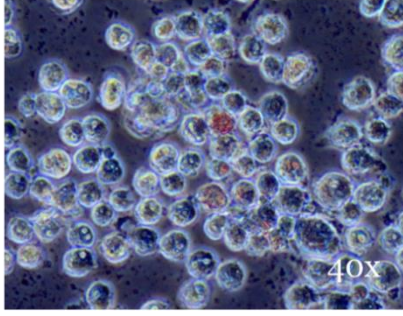
Adiposit farklılaştırma deneylerinde deney kontrolü olarak adiposit dokuya kolayca dönüştüğü bilinen 3T3L1 fare embriyonik fibroblast hücrelerini kullanıldı. 15 günün sonunda Şekil 54’de gösterildiği gibi hücreler büyük yuvarlak şekil almış ve içlerinde kırmızı boyanmış yağ damlacıkları görüntülenmiştir. Aynı deney K562, imatinibsiz K562-Ir ve 10 μ M imatinibli K562-Ir hücrelerinde yapılmıştır (Şekil 54). Normal ortamda büyütülen K562 kontrol flaskında beklenmedik şekilde yağ damlaları gözlenmiş olması deneyimizi sekteye uğratmıştır (Şekil 55 b). Adiposit farklılaştırma ortamında bekletilen K562-Ir hücrelerinde ise kalıntı olduğunu düşündüğümüz kırmızı lokuslar gözlense de belirgin yağ damlacıklarına rastlanamamıştır (Şekil 55 a).

Adiposit deney sonuçları

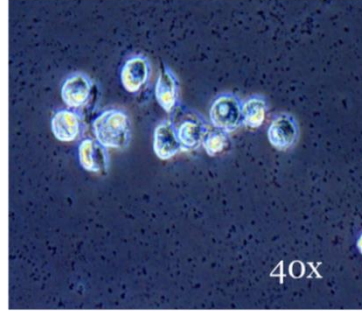


Şekil 54: 3T3L1 hücrelerinin adiposit farklılaştırması kontrol deneyi

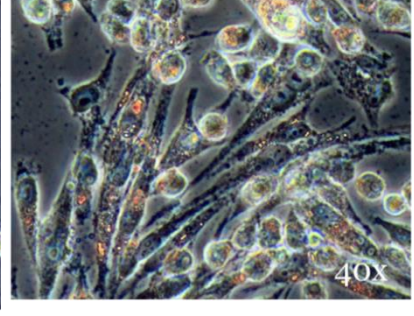
a.



K562

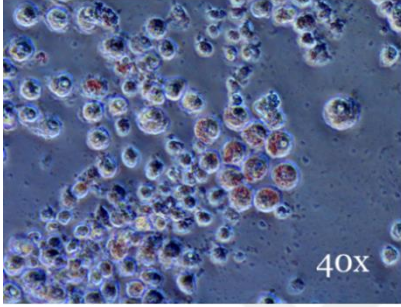


K562-Ir

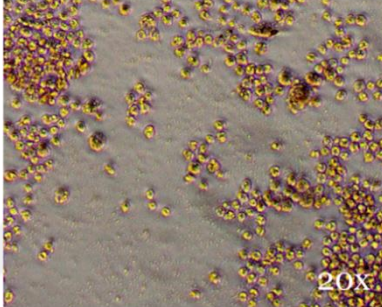


K562-Ir+10uM imatinib

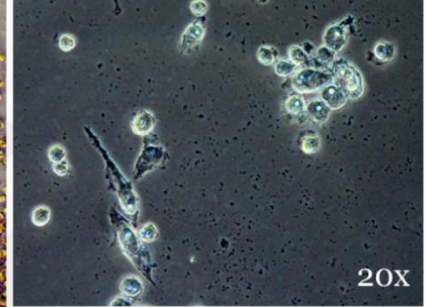
b.



K562
Kontrol



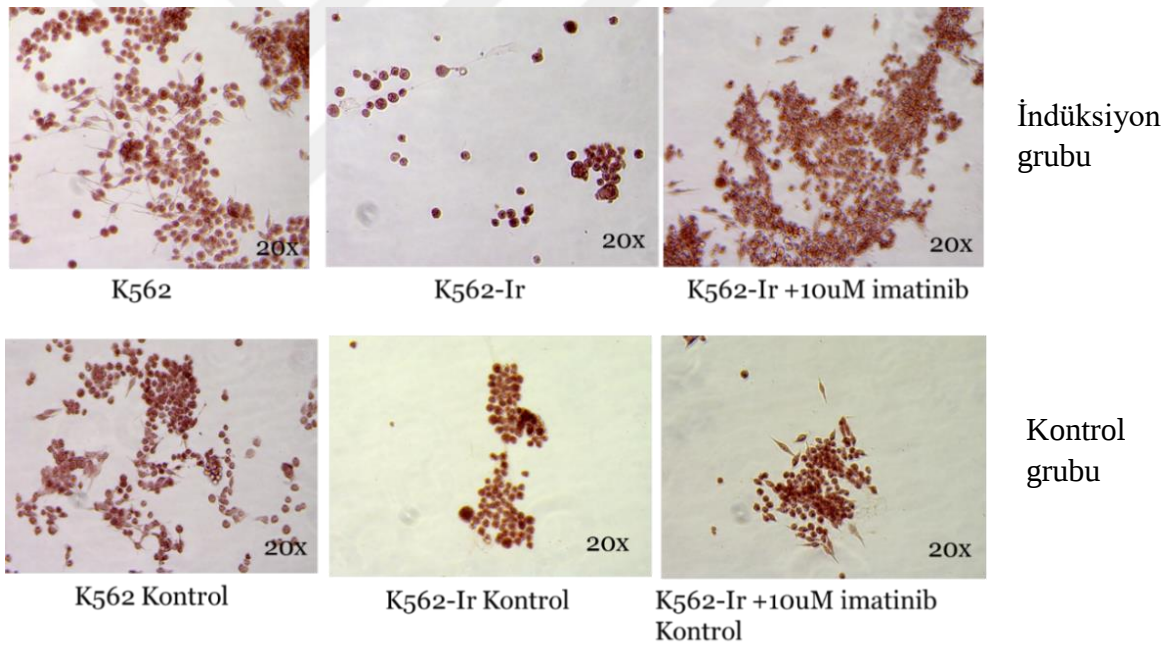
K562-Ir
Kontrol



K562-Ir+10uM imatinib
Kontrol

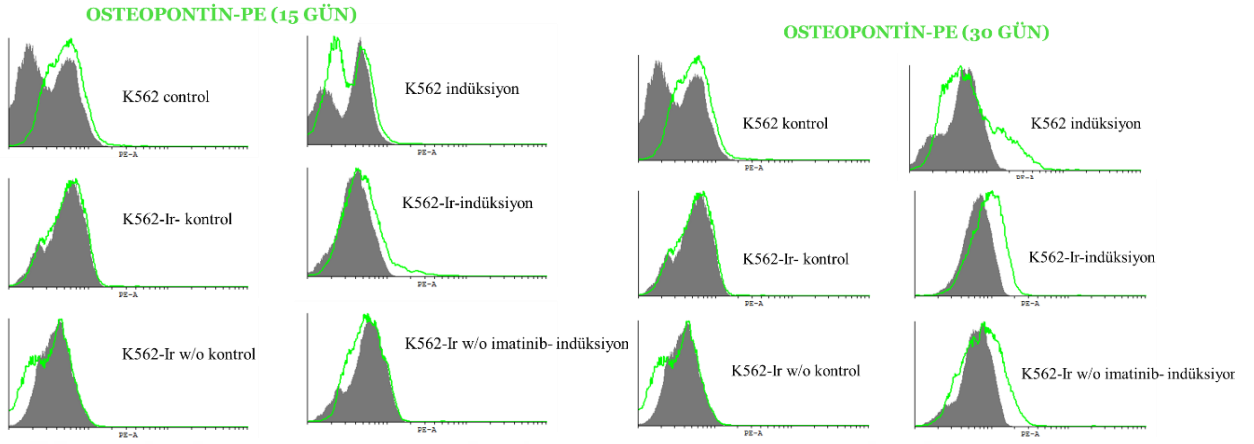
Şekil 55: Atasal ve dirençli hücrelerde adiposit farklılaştırma deneyi a. K562 hücreleri deney grubu, b. kontrol grubu fotoğraflarıdır. Özellikle K562 kontrol gruplarında yağ damlaları gözlenmiş olması deney sonuçlarının değerlendirilmesine engel olmuştur.

Osteogenez farklılaştırma deneylerinin sonuçlarını değerlendirmek için Alizarin Red boyaması yapıldı. Alizarin red boyama ile yalnız kalsiyum depolayan hücrelerin boyanması gerekirken, kontrol ve deney gruplarının hepsi boyanmıştır (Şekil 56) Bu nedenle osteogenik farklılaşmayı doğrulamak için başka bir yöntem kullanıldı. Osteosit hücrelerine özgü anti-osteokalsin ve anti-osteopontin antikorları kullanılarak bu belirteçlerin varlığı araştırıldı. Akım sitometrisi sonuçlarına göre K562 ve K562-Ir arasında osteokalsin ve osteopontin ekspresyonu açısından da fark görülmemiştir. Şekil 56'da osteosit farklılaştırma protokolünden sonra uygulanan Alizarin kırmızısı boyaması sonrasında çekilen kontrol ve deney gruplarından fotoğrafları verilmiştir. Görüldüğü gibi tüm hücreler kırmızı boyanmıştır. Şekil 57'de ise 15 gün ve 30 gün uygulanan farklılaştırma deneyleri sonrası anti-osteopontin ve anti-osteokalsinle işaretlenen hücrelerin akım sitometrisi sonuçları verilmiştir. Gri alanlar background sinyaldir. Üç grup arasında fark görülmemiştir.

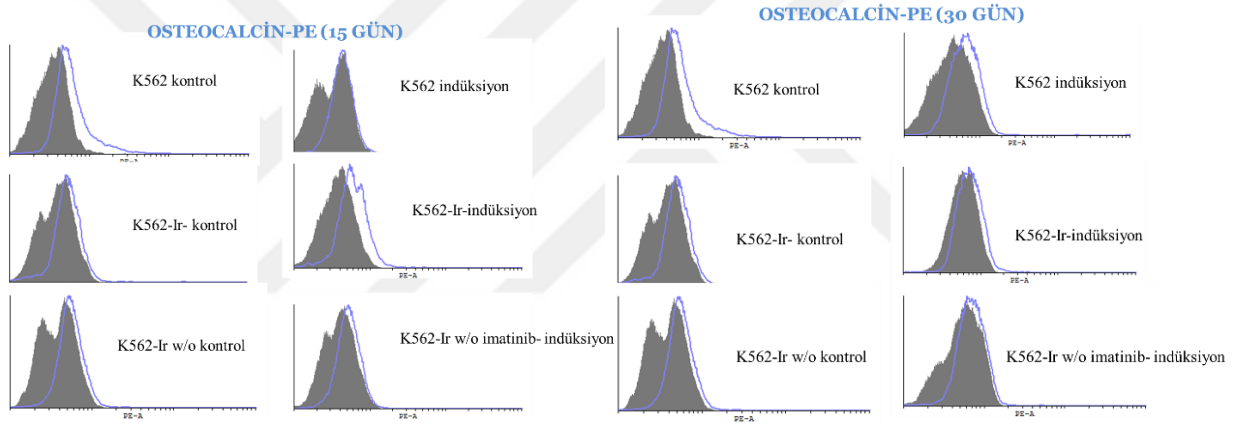


Şekil 56: Atasal ve dirençli hücrelerde osteost farklılaştırma deneyleri Alizarin red boyama sonuçları. İlk sıra indüksiyon yapılmış hücrelerin, ikinci sıra kontrol grubu hücrelerinin fotoğraflarıdır.

A.



B.



Şekil 57: Atasal ve dirençli hücrelerde osteost farklılaştırma deneyleri akım sitometri sonuçları. A. 15. ve 30. günlerdeki osteopontin antikoru akım sitometrisi sonuçları. B. 15. ve 30. günlerdeki osteokalsin antikoru akım sitometrisi sonuçları. K562-Ir w/o: imatinibsiz ortamda inkübe edilen K562-Ir hücreleri.

5.TARTIŞMA

KML patogenezinin temelinde, hematopoetik kök hücresinde gerçekleşen t(9;22)(q34;q11) translokasyonu ve bunun sonucu oluşan BCR-ABL kimerik geni yer alır. Hastalık, Bcr-Abl onko-proteininin sorumlu olduğu kontrolsüz bir myeloproliferasyon ile karakterizedir. Tüm lösemilerin %15 kadarını oluşturur ve yıllık insidansı 100.000/1-2 ‘dir¹⁴. Tedavi edilmeyen olgularda zaman içerisinde progresyon gözlenir. Ek somatik mutasyonlarla hücreler farklılaşma yeteneklerini giderek kaybederler. Hastalık ilerledikçe, başlangıçta gözlenen lösemik hücre/normal hücre oranı, lösemik hücrelerin lehine artar. Hastalığın ilerleme mekanizması oldukça karmaşıktır ve hastalığın davranışı her hasta için farklı seyretmektedir. Tedavi gören bazı hastalar, kronik fazda 20 yıla kadar yaşayabilmekteyken; bazı hastalarda KML tablosu tedaviye rağmen birkaç ay içinde ilerleyebilmektedir. Genel olarak bakıldığında hastalar arasındaki bu heterojen tablo, BCR-ABL+ klonun translokasyondan önce veya sonra edindiği genetik anomalilere, gen ifadesi paternleri arasındaki kişisel farklılıklara, DNA hasarı, epigenetik değişimler gibi yaşla birlikte gelişen hematopoezi etkileyebilecek birçok faktöre bağlıdır. Bugün altın standart olarak kabul edilen tedavi yöntemi, 2000’li yıllarda keşfedilen başta imatinib olmak üzere tirozin kinaz inhibitörlerinin kullanımıdır. Her ne kadar imatinib Bcr-Abl onkoproteinini inhibe etmesiyle hedefli tedavi yöntemlerinde çığır açmış olsa da bazı hastalarda görülen ilaç direnci bugün önemli bir sorundur. Bu nedenle direnç mekanizmalarının ve onların altında yatan sebeplerin daha iyi anlaşılması önemlidir.

5.1 BULGU TARTIŞMASI

Bcr-Abl, KML hücreleri için yaşam sinyalıdır. Kanser tedavisinde sitotoksik ajanların kullanıldığı kemoterapi yaklaşımlarından farklı olarak KML tedavisinde tirozin kinaz inhibitörlerinin başarısı, KML hücreleri için yaşam sinyali olan Bcr-Abl proteinini işlevsiz kılarak, hücre ölümünü tetiklemesinde yatmaktadır. KML’de TKİ tedavisine yanıtızsızlık, ilaç direnci olarak adlandırılır. İmatinib baskısı altında klonal seçimle oluşturduğumuz K562-Ir hücre hattı, ilk başta imatinib tedavisine yanıt veren ancak zaman içinde direnç geliştiren hastaları (sekonder direnç/ edinsel direnç) modellemektedir. İmatinib yanında klinikte kullanılan diğer ilaçlara yanıtını incelemek üzere yaptığımız deneyler bize bu hücrelerin dasatinib, nilotinib, bosutinib ve ponatinibin klinik dozlarına (C_{max}) da dirençli olduğunu

gösterdi. Yüksek doz (10µM) uygulamalarında K562-Ir hücreleri imatinibe olduğu gibi dasatinib ve nilotinibe de yanısızlık göstermiştir. Ponatinib ve bosutinibin 10µM dozu hücrelerin çoğunluğunu öldürmüştür ancak bu dozlar klinikte kullanılan dozların sırasıyla yaklaşık 80 ve 30 katıdır. TKİ'lerin hastalarda gözlenen yan etkileri göz önüne alındığında bu dirençli hücreleri öldürebilen dozların klinikte kullanılabilirliği bulunmamaktadır. Sonuç olarak TKİ deneylerinde aldığımız sonuçlar bize K562-Ir hücrelerinin yalnız imatinibe değil ikinci nesil TKİ'lere de dirençli olduğunu göstermektedir.

KML'de en çok vurgulanan 2 ana ilaç direnci mekanizması, TKİ'lerin proteine bağlanmasını engelleyen Bcr-Abl kinaz domeyni mutasyonları ve TKİ etkinliğini düşüren Bcr-Abl gen amplifikasyonlarıdır. Dirençli ve atasal K562 hücrelerinin BCR-ABL gen bölgesi için yaptığımız sekans analizi karşılaştırmalarında herhangi bir baz değişimine raslamadık ve benzer şekilde BCR-ABL gen amplifikasyonu açısından dirençli ve duyarlı hücreler arasında bir fark olmadığını gösterdik.

Direnç oluşumu ile ilgili olarak literatürde üzerinde durulan bir diğer mekanizma da ilaçların hücre içinde etkili olabilecekleri terapötik konsantrasyonlara ulaşamamalarıdır. Bu duruma neden olabilecek iki ana yol bulunmaktadır: 1) İlaçların membran transport proteinleri ile dışarı atılması, böylelikle ilaçların etkisinin azalması veya tamamen kaybolması; 2) İlacın plazma proteinlerine bağlanarak hücre içine girişinin engellenmesi⁴². Her iki mekanizma imatinibin hücre içi etkinliğini düşürmektedir. K562-Ir hücrelerinde izlenen TKİ direncinin bu yollarla imatinib etkinliğinin azalıp azalmadığı test edildi. Bunun için imatinibin Abl kinaz domeynine bağlanmasıyla baskılanan yolaklarda yer alan proteinlerin fosforilasyonları, western-blot yöntemi ile incelendi. İmatinibe maruz bırakılan atasal K562 hücrelerinde beklendiği gibi Bcr-Abl ve yolağın aşağısında kalan diğer proteinlerin fosforilasyonlarının azaldığını görüldü. İmatinib Bcr-Abl kinaz bölgesine bağlanmak için ATP ile yarıştığından Bcr-Abl otofosforilasyonunu engeller. Aktifleşemeyen onkoprotein sonuç olarak yolaktaki diğer molekülleri de fosforilleyemez. K562 hücreleri Bcr-Abl'den gelen yaşam sinyallerine bağımlı olduğundan, Bcr-Abl aktivitesinin baskılanması hücreleri ölüme götürmektedir. Öte yandan dirençli K562-Ir hücrelerinde de Bcr-Abl yolağının baskılanmış olduğu açık bir şekilde görülmektedir. Bu bulgu bize hücre kültür ortamındaki imatinibin, serum proteinlerine bağlanması ya da membran taşıma proteinleriyle hücre dışına atılması sonucu hücre içi etkinliğinin değişmediğini göstermektedir. İmatinibin hücre içinde gösterilmiş olan etkinliğine rağmen hücreler sağlıklı bir şekilde çoğalmalarına devam etmişlerdir. Bu durum imatinibin

hücre içine girdiğini ve işlevsel olduğunu ancak Bcr-Abl kinaz aktivitesinin K562-Ir hücreleri için artık yaşam sinyali olmadığına işaret etmektedir. Mikrodizin analizlerinde, MDR (multidrug resistance) genlerinden ABC ailesine ait genlerin ekspresyonunun dirençli hücrelerde arttığı görülmüştür. Ortamda herhangi bir kimyasal stres faktörünün varlığında hücrelerin, membran transportunda görevli ABC genlerinin ekspresyonlarını arttırmaları olağandır. Stres faktörü olan imatinibin ortamda bulunmadığı FEG listesinde (K ile Ir), ABC gen ifadelerinin beklenildiği gibi göreceli azaldığı izlenmiştir (örneğin K ile Ir+i FEG listesinde ABCB1 ekspresyonu 10 kat artmışken; K ile Ir FEG listesinde bu ifade artışı 4'e düşmüştür). Ancak Bcr-Abl alt-akış (downstream) protein fosforilasyon verilerimiz, ilaç direncinin ABC gen ifade artışıyla ilişkili olmadığını göstermiştir.

Tüm bu bulgular K562-Ir hücrelerinin, Bcr-Abl-bağımsız/TKİ dirençli bir *in vitro* KML modeli olduğunu desteklemektedir.

Tez çalışmalarımız sırasındaki en önemli gözlemimiz K562-Ir hücrelerinde gelişen morfolojik değişimdir. K562 hücreleri hematopoetik kökenli olup yuvarlak şekilli, ortama asılı (süspanse) hücrelerdir. İmatinib baskısı altındaki klonal seçim sürecinde ise kültür kaplarında yüzen hücrelerle birlikte yere yapışan iç-şekilli hücreler izlenmeye başlanmıştır. İlk olarak bu hücrelerin K562 kökenli olup olmadıklarının kontrol edilmesi amacıyla bağımsız bir laboratuvara, kör çalışma yapılması için işaretli/ön bilgisiz örnekler göndererek DNA profili ve buna dayanarak hücre tanımlanmasının yapılmasını istedik. Monolayer halinde yapışarak üreyen hücrelerin, K562 hücrelerinden köken aldıkları bağımsız bir laboratuvar tarafından doğrulandı. Kültür kabında yüzen hücreler sık aralıklarla uzaklaştırıldığında yapışan hücrelerin koloniler oluşturduğu, flask yüzeyini tamamen kapladığı izlendi. Uzaklaştırılan yüzen hücreler yeni bir flaska aktarıldığında ise hücrelerin belirli bir yüzdesinin yine flask tabanına yapıştığı gözlemlendi. Ayrıca imatinib ortamdan çekildiğinde hücreler yüzeyden kalkıp tekrar yuvarlak morfolojilerine geri dönmektedir. Tüm bu gözlemler bir arada değerlendirildiğinde dirençli hücrelerin morfoloji değiştirme kapasitesine sahip olduğu ve bu kapasitenin statik değil dinamik bir olgu olduğu sonucuna varıldı.

K562-Ir hücrelerinin yavaş proliferasyon olmaları dikkat çekmiştir. K562-Ir hücrelerinde gözlediğimiz yavaş proliferasyon bize imatinibin hücreleri senesense sokabileceği olasılığını düşündürmüştür. Senesens hücre yaşlanması olarak da nitelendirilen, hücrelerin geri-dönüşümsüz olarak bölünmeyi durdurdıkları ancak hücre ölümüne gitmeden G0/G1 fazında

(büyüme fazı) kaldıkları hücresel süreçtir. İmatinibin hücreleri senesense sokması durumunda ortamda bölünmeyen hücre popülasyonu, toplamda yavaş proliferasyon gözlemine neden olabilir. Bu olasılığı test etmek amacıyla yaptığımız deneylerde, atasal ve dirençli hücre flasklarında (imatinib varlığında veya yokluğunda) senesent hücreye rastlanmamıştır. Öte yandan pozitif kontrol flasklarında doksorubisinle K562 hücreleri senesense girerken, dirençli hücreler doksorubisinden etkilenmemiştir. Doksorubisinin bilinen etki mekanizması iki şekildedir: 1) DNA ile interkalasyon yolu ile etkileşip topoizomeraaz enziminin ilerlemesini engelleyerek DNA tamiri ve replikasyonuna engel olur 2) Okside kararsız bir ara forma dönüşüm ve geri-dönüşümü sırasında açığa çıkan reaktif oksijen radikallerin yol açtığı membran hasarı, DNA hasarı, oksidatif stres sonucu hücre ölümü ve/veya senesense neden olur⁹²⁻⁹⁵. Senesens deneyleri, K562-Ir hücrelerinin konvansiyonel bir terapötik olan doksorubisine de dirençli olduklarını göstermiştir. Bulgularımız K562-Ir hücrelerinin DNA tamir mekanizmaları ve/veya DNA hasar toleransının köken aldıkları K562 hücrelerinden farklı olduklarını desteklemektedir. Literatürde imatinib-dirençli K562 alt-klonlarının DNA hasarına dirençli olduğunu doğrulayan çalışmalar vardır¹¹⁶.

Proliferasyon hızını ölçen deneylerimiz bize K562-Ir hücrelerinin, imatinibden bağımsız olarak, köken aldıkları atasal hücrelerden dört kat daha yavaş çoğaldıklarını göstermiştir. Proliferasyondaki bu yavaşlık ilgi çekicidir. Kanseri popülasyonundaki yavaş çoğalan hücreler literatürde kanser kök hücreleriyle ilişkilendirilmekte, solid tümörlerde metastaz, ilaç direnci, relaps gibi kötü prognoz sorumlu olarak gösterilmektedir. Son yıllarda hücrelerdeki tümör başlatma potansiyelini, kanser kök hücresi-benzeri özelliklerini ve ilaçların tümör hücreleri üzerindeki etkilerini inceleyebilmek için in vivo koşullara daha yakın olan üç-boyutlu kültür ortamları kullanılmaktadır. Dirençli hücrelerin yavaş proliferasyonu ve adheziv karakteri, üç-boyutlu kültür ortamında atasal hücrelerden farklı davranış sergileyebileceklerini düşündürmüştür. Gerçekten de hücre davranışı yarı-katı besi ortamında izlendiğinde dirençli hücreler, atasal hücrelerin aksine, düzgün çeperli tümör sferoidleri meydana getirmiştir. Yarı-katı kültür ortamları solid tümörlerin in-vivo mikroçevre karakteristiklerini taklit edebilmektedir. Literatürde sferoid oluşturma, ortamda tümör-başlatıcı (tumor-initiating) hücreler olarak da anılan kanser kök hücrelerin veya kanser kök hücresi-benzeri özellik gösteren hücrelerin varlığına işaret etmektedir⁹⁶. Dirençli K562-Ir hücreleri belirgin sferoid oluştururken, atasal K562 hücrelerinde sferoid oluşumu izlenmemiştir. Burada ilginç olan bir nokta da sferoid oluşturmayan atasal K562 hücrelerinin nude farelerde subkutan

tümör oluşturabildiğidir. Dirençli hücrelerin sferoid oluşturmaları, membran protein profilinin atasal K562 hücrelerinden farklı olmasını gerektirir. Literatürde sferoid oluşumunun E-kaderin ifadesi ile ilişkilendirildiği çok sayıda yayın mevcuttur¹⁰⁰⁻¹⁰². E-kaderin, kaderin süperailinin epitel kökenli yüzey bağlantı moleküllerindendir. Solid tümörlerin metastazında özellikle EMT ve MET mekanizmalarında E-kaderinin önemli rolü bulunmaktadır^{67,117-119}. İmmünfluoresans deney sonuçlarımız sferoid oluşumunu destekleyecek şekilde E-kaderin ifadesinin dirençli hücrelerinde yüksek olduğunu göstermektedir. K562 hücreleri, epitel kökenli olmamaları nedeniyle e-kaderin ifade etmezler (Bkz. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000039068-CDH11/cell>). Myeloid kökenli olan K562 hücrelerinden türeyen K562-Ir hücrelerinin epitel belirteçlerinden birini sentezliyor olması, stres koşulları (yaşam sinyalinin baskılayan imatinib varlığı) altında populasyon içerisinde bir grup hücrenin epigenetik değişiklikler geçirmiş olabileceğini düşündürmektedir.

Dirençli hücreleri tanımlayabilmek amacıyla, hücre tiplendirmesinde kullanılan Cluster Differentiation (CD) yüzey belirteçleri için antikorlar kullanılarak akım sitometrisi çalışmaları yapıldı. Dirençli hücrelerde görülen iğ-şekilli değişken morfolojinin mezenkimal kök hücrelerle benzer özellikler taşıyabileceğini düşünerek, öncelikle plüripotensi ve mezenkimal kök hücre belirteçleri incelendi. Pluripotensi belirteçlerinden Tra-1-60 ve Tra-1-81 yüzey proteinleri hem atasal hem de dirençli hücre gruplarında pozitif bulundu ve iki grup arasında ekspresyon farkı gözlenmedi. Tra-1-60 ve tra-1-81 farklılaşmamış insan embriyonik kök hücre, embriyonik karsinoma, embriyonik germ hücrelerinde ifade edilmektedir. Erken embriyonik dönemde ve plüripotent hücrelerde sentezlenen bir diğer molekül SSEA-4 ise atasal K562 hücrelerinde negatif iken K562-Ir hücrelerinde düşük düzeyde pozitiflik gözlemlendi.

Mezenkimal kök hücre belirteçlerinin incelenmesine yönelik kullandığımız antikor paneli (Human Mesenchymal Stem Cell Marker Antibody Panel R&D #SC017) CD19, CD44, CD45 CD90, CD105, CD106, CD146, CD166 ve Stro-1'den oluşmaktadır. CD19 ve CD45'in ikisi de hematolojik belirteçler olduğundan negatif kontroldür. Kullanılan paneldeki mezenkimal kök hücre belirteçleri sağlıklı solid dokularda tanımlanmıştır^{120,121}. Bu nedenle hematopoetik kanserlerde bu belirteçlerin özelliklerinin değişkenlik gösterebileceği göz önünde tutulmalıdır. Atasal K562 hücrelerinin hematolojik kökenli olduğunu gösteren en önemli belirteç olan CD45'in (leukocyte common antigen, LCA) ekspresyonu, dirençli hücrelerde önemli ölçüde azalmıştır. Bu bulgu bize dirençli hücrelerin hematolojik morfoloji/biyolojiden uzaklaştığını göstermektedir. CD44 ekspresyonu ise atasal K562 hücrelerinde izlenmezken,

dirençli hücrelerde eksprese edilmektedir. Önemli mezenkimal ve kanser kök hücre belirteçlerinden biri olarak kabul CD44 ile ilgili bulgularımız ileride tartışılacaktır. Ayrıca K562 ve myeloid hücrelerde eksprese olduğu bilinen CD146 belirtecinin dirençli hücrelerde azaldığı izlenmiştir. Bu bulguların mezenkimal kök hücre (MKH) özelliklerinin temsili açısından yorumlanması zordur. Öncelikle literatürde MKH belirteçleri konusunda tam bir konsensus bulunmamaktadır. Hematolojik yüzey belirteçlerini incelediğimizde ise (CD3, CD10, CD13, CD15, CD19, CD22, CD24, CD33, CD34, CD38, CD62E, CD65, CD117, CD123), monositler, aktive T-hücreleri, myeloid progenitörler ve mast hücrelerinde ifade edilen CD33 ile myeloid hücrelerinde ifade edilen E-selektin ligandı CD65 ekspresyonu atasal hücrelerde yüksek iken; dirençli hücrelerde azalmıştır. Bu bulgular da dirençli hücrelerin köken aldıkları hematopoetik seri özelliklerinden uzaklaştığını desteklemektedir. Hematopoetik kök hücre belirteci olan CD34 ise her iki grubunda çok düşük düzeyde eksprese edilmektedir.

Akım sitometrisi ile araştırılan bir diğer yüzey molekülü CD326'nın (EpCAM-Epithelial Cell Adhesion Molecule) ekspresyon düzeyi dirençli hücrelerde oldukça azalmıştır. EpCAM proteini özellikle epitel kökenli hücrelerin hücre-hücre bağlantılarında rol oynayan bir molekül olmasına rağmen K562 hücrelerinde de bulunabileceğini gösteren çalışmalar vardır¹²². Frenke ve Rickelt çalışmalarında K562 hücrelerinin herhangi bir tetiklemeye gerek duymadan epitel yüzey belirteç moleküllerini sentezleyebildiği söylemektedir. Dirençli hücrelerde izlenen morfolojik değişiklikler ve sferoid oluşturma, EpCAM, CD44 ve E-kaderin gibi yüzey moleküllerinde gözlenen değişiklikler ile birlikte yorumlandığında, dirençli hücrelerin köken aldıkları atasal hücrelerden biyolojik özellikler açısından uzaklaştığı desteklenmektedir.

K562-Ir hücrelerinin fenotipik özellikleri ve ilaç direncinin, miRNA ifade bozukluklarıyla ilişkili olup olmadığını anlamak üzere yaptığımız miRNA tam genom analizi sonuçlarına göre; literatürde ilaç direnciyle ilişkilendirilen miR-127, miR-134, miR-487, miR-379, miR-337 mikroRNA'larının, farklılaşma baskılayıcı miR-433 mikroRNA'sının, hücre çoğalması ve apoptoz direnciyle ilişkili miR-149, miR-134, miR-494, miR-654 mikroRNAlarının dirençli hücrelerde ekspresyonunun arttığı görülmüştür. K562-Ir hücrelerinin ilaç direncinde rol oynayabilecek bu miRNA'ların ortaya çıkarılması önemlidir. Ancak bilindiği gibi bir miRNA molekülünün yüze yakın hedef molekülü olabilmektedir. Projemiz kapsamında bahsi geçen miRNA'ların doğrulanması ve çalışılması mümkün olmamıştır.

K562-Ir hücrelerinde göstermiş olduğumuz farklılıklara yol açan gen ekspresyon değişikliklerini tanımlamak için yapılan tüm-genom mRNA ekspresyon analizinde önemli bulgular elde edildi. İmatinib varlığının ya da yokluğunun yüzen (süspanse) dirençli hücreler arasında ne kadar fark yarattığını, yüzen ve yere yapışan (iğ/mekik şekilli) dirençli hücreler arasında fark olup olmadığını ve tüm bu dirençli K562-Ir gruplarının atasal K562 hücrelerinden farklarını inceledik. Şekil 43'te gösterilen ısı şeması incelendiğinde üç grup dirençli hücrenin (M, Ir+i, Ir) gen ekspresyon profillerinin birbirlerine yakinken atasal grubun (K) gen ekspresyon profilinin diğer gruplardan çok farklı olduğu görülmektedir*. Üç dirençli grup arasında birbirine en yakın profile sahip iki grup Ir+i ve M gruplarıdır. Bu bulgu yüzen dirençli hücrelerin yere mekik hücrelerden temel olarak farklı olmadığını göstermektedir. Öte yandan Ir grubu gen profili, hem Ir+i ve M grubundan hem de K grubundan farklıdır. Dört hafta boyunca imatinibli ortam yerine normal RPMI ortamında inkübe edilen dirençli hücrelerin gen ekspresyon profilinin, atasal hücrelerin gen ekspresyon profiline geri dönmediği görülmektedir. Bununla beraber imatinibin çekilmesi sonucu Ir grubu, Ir+i ve M gruplarından da farklı bir ekspresyon profiline sahip olduğu gözlemlendi. Bu gözlemin, imatinib yokluğunda dahi kısa/orta vadede geri dönmeyen transkripsiyonel değişikliklere bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Isı haritasından da görülebileceği gibi bu durumun tek veya birkaç protein yolağı aktivasyonu veya inhibisyonu ile açıklanması çok güçtür. Nitekim atasal hücreler ve dirençli hücreler arasında ifadesi değişmiş olan 1500'ün üzerinde gen vardır. Bu genlerin işlevlerini anlamlandırmak için üç dirençli hücre grubunun gen ifade analizleri atasal hücrelerinki ile karşılaştırıldı ve dört farklı çevrimiçi araç kullanarak gen ontoloji analizleri yapıldı. Kullandığımız çevrimiçi "enrichment" araçları (Webgestalt, GOrilla, Panther ve DAVID) her biri kendi içinde algoritması olan ve güncellenen programlardır. Aynı analizin ayrı web sitelerinde elde ettiğimiz sonuçları birbirinden farklı olmakla birlikte, her araçta ortak ontolojiler ortaya çıkmıştır. Anotasyon araçlarında dirençli hücrelerde ekspresyonu değişen gen gruplarının ortak ontolojileri gelişim, farklılaşma, doku yeniden düzenlenme (tissue remodelling), adezyon, proliferasyon ve migrasyon genleri ile ilişkilidir. Yere yapışan ve yüzen hücreler arasındaki gen ifadesi farkının yalnız 56 gen ile sınırlı olması ve bu genlerin çoğunun hücre adezyonu ile ilişkili olması bu iki hücre grubunun temelde aynı oldukları ve birbirlerine rahatça dönüşebildikleri görüşümüzü

*: Atasal K562 hücreleri "K" grubu,
Mekik/iğ şekilli imatinibli dirençli hücreler "M" grubu,
Yüzen imatinibli dirençli hücreler "Ir+i" grubu,
Yüzen imatinibsiz dirençli hücreler "Ir" grubu olarak adlandırılmıştır.

Mikrodizin analizine göre ifadesi en çok artmış olan gen CD44'tür. CD44, ilk olarak 1982 yılında lenfosit yuvalanma (homing) reseptörü olarak tanımlanmıştır. Hematopoetik hücrelerden başka pek çok hücre tiplerinde de ifade edilen CD44, hiyalüronan reseptörü olan bir transmembran glikoproteindir. Ekstraselüler ve sitoplazmik domeynleri birçok protein ile etkileşim halindedir. Alternatif splicing (kırılma) ile ortaya çıkan ve farklı hücrelerde farklı ekspresyonları olan birçok varyant izoformu bulunur. CD44-hiyalüronan ilişkisi hematopoetik kök hücrelerin adhezyon ve niş yuvalanmasında önemlidir. Ayrıca CD44'ün özellikle meme ve kolorektal kanserlerde tümörogenezi tetiklediği, metastatik yollarda etkin olduğu belirtilmektedir. Bununla birlikte birçok yayında CD44, erişkin kök hücre yüzey belirteci olarak kabul edildiği gibi, kanser kök hücresi yüzey belirteci olarak da anılmaktadır. Bazı yayınlarda CD44⁺/CD24^{-düşük} hücreler, meme kanseri kanser kök hücresi olarak tanımlanmıştır. Hematopoezde progenitör hücrelerin kemik iliği nişlerine yerleşiminde ve bölgesel sitokin salınımını kontrol ederek hücre çoğalması ve farklılaşmasında CD44'ün önemi vurgulanmaktadır. Hematolojik malinitelerde ise CD44'ün özellikle lösemi başlatıcı hücrelerin (LIC-leukemia initiating cells) periferik kana mobilizasyonunda rol oynayarak neoplazilerin oluşumu ve gelişimine katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür^{104-106,108,110,123-126}. Bunlarla birlikte CD44'ün KML biyolojisindeki rolü tam olarak bilinmemektedir.

5.2 LİTERATÜR TARTIŞMASI

Kanser kök hücresi (KKH) alt-popülasyonunun varlığı bugün birçok kanser türünde gösterilmiştir. Ancak kanser kök hücresi için evrensel fenotipik belirteçler konusunda henüz anlaşmaya varılamamıştır⁷⁷. Bilindiği gibi kanser kök hücresi işlevsel olarak ilk kez AML'de, bağışıklığı baskılanmış farelere transplante edilen lösemik hücrelerin yalnızca bir kısmının hastalık yapıcı özellikte olduğunun gösterilmesiyle ortaya konmuştur. KML, AML ve T-hücresi ALL'ye özgü kanser kök hücre belirteci CD34 pozitifliği olarak kabul edilmektedir¹²⁷. CD34 molekülünün normal hematopoetik kök hücreler için de belirteç olduğunu söylemek gerekir. Ph⁺lin⁻CD34⁺CD38⁻ hücreler KML'de kanser kök hücresi (lösemik kök hücre/KML kök hücresi) olarak anılmaktadır⁷⁷. KKH'leri hedefleyecek tedavilerin uygulanabilmesi için araştırmaların çoğu belirteç bulmaya ya da belirli belirteçler ile ayrıştırılmış hücreler üzerinde

yapılan çalışmalara yoğunlaşmaktadır. Ancak KKH kavramı fenotipik özelliklerden çok işlevsel özellikler ile tanımlanır.

KML'de Ph^+CD34^+ lösemik kök hücre (LKH) kompartımanının TKİ'lere yanıtızsız kaldığı son yıllarda dikkat çekmiştir¹²⁸. LKH'lerin neden ve nasıl onkogen-bağımsız (Bcr-abl-bağımsız) oldukları henüz bilinmemektedir ve hedefli tedavi stratejilerini sekteye uğrattığından en önemli araştırma konularındandır¹²⁹. K562-Ir hücreleri de LKH'lere benzer şekilde onkogen-bağımsızdır ancak CD34 pozitifliği izlenmemektedir. KKH'lerin ve LKH'lerin sessiz (quiescent) / durağan (dormant) oldukları bilinmektedir. Bu olgu hücrelerin hücre döngüsünün G0 fazında -bölünmeden- uzun süre kalabilmeleri anlamına gelir. K562-Ir hücreleri (özellikle yere yapışarak çoğalan mekik hücreler) atasal hücrelerden oldukça yavaş prolifer olmaktadır. Hücreler quiescent veya dormant değildir ancak G0/G1 faz değişimlerinde yavaşlamaya yönelik önemli bir fark olduğu görülmektedir. Solid tümörlerde kanser kök hücre belirteci olarak kabul edilen, hücre-ECM yüzey bağlantı molekülü CD44 ekspresyonu K562-Ir hücrelerinde oldukça fazladır. Hücrelerin kolaylıkla çok düzgün çeperli giderek büyüyen sferoidler meydana getirmiş olması CD44 gibi yüzey moleküllerinin önemli ölçüde değiştiğini göstermiştir. Veriler bir arada değerlendirildiğinde dirençli K562-Ir hücreleri kanser kök hücrelerinin biyolojik özelliklerini göstermekte ancak literatürde tanımlanan KML lösemik kök hücre prototipine fenotipik belirteçler açısından uymamaktadır.

Literatürde fenotipik plastisiteyle ilgili gözlemlerimizi destekleyen iki farklı çalışma bulunmuştur. Puissant A. ve arkadaşlarının 2012 yılında Journal of Molecular Cell Biology dergisinde yayınladıkları "*Imatinib triggers mesenchymal-like conversion of CML cells associated with increased aggressiveness*" isimli makalede çalışmalarımızı destekleyecek bulgulara yer verilmiştir. Makalede, düşük dozlardan yüksek dozlara (10 μ M) doğru imatinib varlığında klonal seçilimle elde edilen K562 hücrelerinde yere yapışma gözlediklerinden, flask yüzeyinin %80 doluluğa ulaştığından (confluency), aynı durumun hasta örneklerinde de geçerli olduğundan bahsetmişlerdir. Yere yapışan hücrelerin farede tümör oluşturma kapasitelerinin daha fazla olduğunu, hücrelerin $CD44^{yüksek}/CD24^{düşük}$ özellikle olduğunu ve imatinibin bu hücre grubuna çoğalma avantajı sağladığını vurgulamışlardır¹³⁰. Daha önce bahsettiğimiz gibi dirençli hücrelerimizde CD44 ekspresyon yüksekliği birçok yöntemle gösterilmiştir. CD24 yüzey molekülünün ekspresyon düşüklüğü ise mikrodizin analizi sonuçlarında görülmüştür. Benzer şekilde Chorzalska A. ve arkadaşlarının 2016 yılında Stem Cells and Development dergisinde yayınladıkları "*Long-Term Exposure to Imatinib Mesylate Downregulates Hippo*

Pathway and Activates YAP in a Model of Chronic Myelogenous Leukemia” makalesinde de, K562 hücrelerinin uzun süre giderek artan dozlarda imatinibe maruz bırakılmasıyla elde edilen dirençli hücrelerde yere yapışma gözlediklerinden ve flask yüzeyinin %70 doluluğa (confluency) ulaşabildiğinden söz etmişlerdir. Dirençli hücrelerde adhezyon molekülleri CD44 ve VLA-4’ün gen ifadesinin arttığını fakat CXCR4, NOTCH1 ve özellikle CD24 gen ifadesinin azaldığını, pluripotensi belirteçlerinden SOX2’nin artarken NANOG ve DNMT3’ün azaldığını, hematopoetik kök hücre belirteçlerinden SALL4 gen ifadesinin artarken CITED2 ve TAL1 genlerinin ifadesinde azalma olduğunu belirtmişlerdir. Uzun süre imatinib maruziyetinin kök hücre veya kanser kök hücresi fenotipi edinmeyle sonuçlandığını iddia etmektedirler¹³¹. Chorzalska ve ekibinin bulgularını kendi bulgularımızla karşılaştırdığımızda, kültür kaplarındaki gözlemlerimiz aynı olsa da belirtilen genler için ifadelerin farklı olduğunu gördük. K562-Ir hücrelerimizdeki CD44 artışı (upregulation) CD24 azalışının (downregulation) yanında bu bulgulara ters olarak DNMT3 ve CITED2 genlerinin ifadesi atasal hücreyle oranla artmıştır, diğer bahsi geçen gen ifadeleri ise iki grupta eşittir. Ayrıca dirençli hücrelerimizin mezenkimal kök hücre-benzeri morfolojisi ve kök hücre belirteçleri varlığından yola çıkarak yaptığımız uzun süreli osteojenik ve adipojenik farklılaştırma deneylerinde atasal hücrelere kıyasla fark göremedik. Her iki makalenin çıktılarında bulgularımızla örtüşen noktalar olsa da, iki araştırma grubu da hücre fenotip değişikliğini moleküler bir yolağa bağlamaya çalışmış, hücreleri belirli belirteçlerle tiplendirmeye yönelik çalışmalar yapmıştır. Ancak görüldüğü üzere deneysel gözlemlerin aynı olduğu hücre gruplarının moleküler içeriği birebir örtüşmemektedir. Bu indirgeyici yaklaşımdan daha geniş açılı bir perspektife yönelmek bize KML biyolojisinde yeni önermelere kapı aralayabilir.

K562-Ir hücrelerindeki elde ettiğimiz bulgular Bcr-Abl-bağımsızlığının önemli bir direnç mekanizması olduğunu desteklemektedir. Bu popülasyonun ortaya çıkış mekanizması ile ilgili değişik modeller ileri sürülebilir. İlk akla gelen mekanizma, KML hücre popülasyonu içerisinde zaten var olan, belli sayıdaki Bcr-Abl-bağımsız hücrelerin seçilimidir. Klinikte Bcr-Abl kinaz domeyn mutasyonu ve/veya onkogen amplifikasyonu olmamasına rağmen TKİ tedavisine cevap vermeyen bir KML hasta grubu vardır (primer direnç). Mevcut Bcr-Abl-bağımsız hücrelerin seçiliminin karşılığı TKİ’lere primer direnç gösteren bu hasta grubu içerisinde gösterilebilir. Bu doğal seçim ortamı öngörülenden daha karmaşık olabilir. Örneğin lösemik hücreler, normal hematopoetik kök hücrenin BCR-ABL translokasyonundan daha önce edindiği bir dizi değişiklik nedeniyle tanımlananın dışında bir genotip/fenotipe sahip olabilirler.

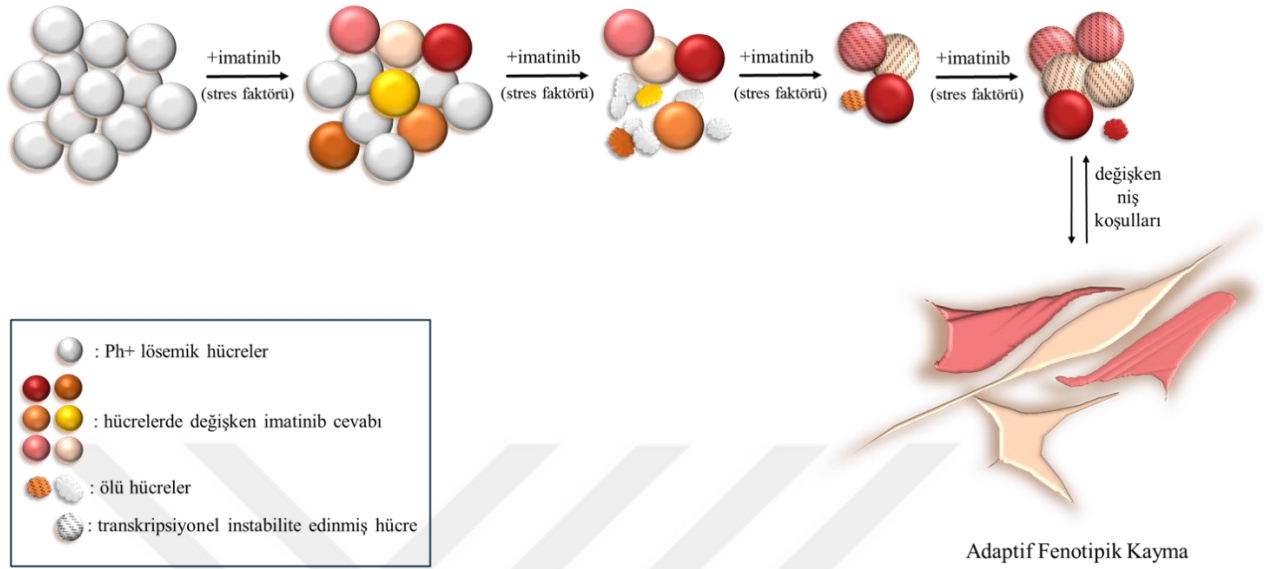
Translokasyon öncesi oluşmuş veya zaten var olan genetik/epigenetik farklılıklar, Bcr-Abl onkoproteininin de katılımıyla hücrelere proliferatif bir avantaj sağlamış ancak hücre için yaşam sinyali olacak kadar önem kazanmamış olabilir. Böyle bir durumda Bcr-Abl'den bağımsız olan hücreler TKİ direnci tablosuna yol açacaktır. KML'nin köken hücresinin hematopoietik kök hücre (HKH) olduğu genel kabul görse de, bazı çalışmalarda KML hastalarının periferik kan ve kemik iliğindeki endotel hücrelerinde BCR-ABL füzyonunun gösterilmiş olması, t(9;22) translokasyonunun hemanjioblastlarda gerçekleşebileceğini de düşündürmektedir⁸¹. Hemanjioblastlar HKH-öncülü hücrelerdir ve hematopoietik hücre hatlarının yanı sıra endotel hücrelerinin de öncüsüdür. HKH-öncülü olan bir basamakta t(9;22) translokasyonunun gerçekleşmiş olması, hücrenin farklı transkripsiyonel alt yapısına bağlı olarak, onkogen-bağımlılığı (oncogene-addiction) ile sonuçlanmayabilir. KML hücre biyolojisini yalnız Bcr-Abl odaklı olmaktan çıkarıp farklı özellikteki hücresel ağların etkili olabileceğini değerlendirmek KML'deki ilaç direnci probleminin aşılması için yenilikçi bakış açılarının önünü açabilir.

Genel bilgilerde de anlatıldığı gibi evrimsel perspektif açısından adaptif esneklik, mevcut veya oluşan genetik varyasyonlar sayesinde genotipe çoklu çevresel değişimlere karşı uyum avantajı getirmektedir. Nişte oluşan yeni koşullara uyum hızı, yeni ortama uygun optimum fenotipe erişme esnekliğine sahip olma derecesine göre değişmektedir. Bu evrimsel mantık hücresel düzeyde de geçerliliğini korur. Örneğin ortamda enerji kaynağı olarak glikozun bulunmadığı durumlarda laktoz ya da farklı enerji kaynaklarını da kullanabilen, metabolizmasını buna göre değiştirebilen bakteriler, yeni ortam koşullarında seçilecektir. Benzer şekilde uygun olmayan niş koşullarında spor oluşturabilen bakterilerin, türünü devam ettirebilme şansı daha yüksektir. Bu verilen örneklerde izlenen fenotipik esneklik genotipte var olan ancak kullanılmayan özelliklerin kullanıma sokulmalarıyla gerçekleşir. Diğer bir ifadeyle transkriptomal regülasyonla gerekli genlerin açılarak ifade olmaları, transkriptomu değiştirmeleriyle mümkündür. Bu genel kabul gören paradigmaya ek olarak son 20 yılda özellikle bakteri ve mayalarda gösterilmiş olan “adaptif mutasyon” kavramı da ortaya konmuştur¹³²⁻¹³⁵. Adaptif mutasyon bakterilerin türün devamı adına, DNA hasarına karşı gösterdikleri SOS yanıtına benzer şekilde hızlandırılmış mutasyon hızı sonucu yeni koşullara uyum sağlayabilecek bir mutasyon ortaya çıkarabilme sürecini kapsar. Bu süreçte pek çok bakteri ölecektir ancak evrimsel süreçler organizma değil türün yararına çalıştığından, popülasyondaki bir hücrede ortaya çıkacak faydalı bir mutasyon, türü kurtarabilecektir.

Ökaryotik ve özellikle memeli hücreler bu açıdan daha şanslıdır. Benzer bir adaptasyon hedefine süreci DNA dizisini değiştirecek mekanizmalara gerek duymadan epigenetik zemini değiştirerek ulaşabilirler. Waddington'ın hücre farklılaşmasının basamaklarını şematize ettiği “vadi” modelinin zemini temelde gen ifadeleri bütünüdür (Bkz. Şekil 9). Ancak bu zeminin durağan değil hareketli bir yapı olduğu, transkripsiyonel altyapının değişken (instabil) olabileceği de düşünülmelidir.

Yukarıda bakteriler için anlatılan uyum süreci imatinib dirençliliğine uyarlandığında farklı bir direnç modeli karşımıza çıkmaktadır. İmatinib duyarlılığı her hücrede aynı değildir: kimi hücre hemen ölürken, bir diğeri öncelikle hücre döngüsünü durdurur, kimisi ilacı hücre dışına pompalamaya çalışır vb. Bu olgu ile bakteriyel enfeksiyonda antibiyotik kullanımı arasında bir analogi kurulabilir. Bakteriler antibiyotiğe duyarlı dahi olsa, bu duyarlılığın dereceleri olacağından antibiyotiğin ilk dozları tüm bakterileri ortadan kaldırmayacaktır. O nedenle ilacın verilen doz ve süre boyunca kullanımı çok önemlidir. Benzer şekilde imatinib-duyarlı hücrelerde de duyarlılık dereceleri farklıdır. Bu farklılık her hücreye özgü biyolojik değişkenlerden kaynaklanabileceği gibi, TKİ tedavisinde imatinibin her hücreye aynı konsantrasyonda ulaşmamasından da kaynaklanabilir. Nitekim ilacın plazma konsantrasyonları hastalarda günlük hatta saatlik olarak değişkenlik gösterebilir. İmatinib tedavisinde klinik yanıt kısa süre içinde gözlenirken, sitogenetik ve moleküler yanıtta Ph⁺ hücrelerin aylar içerisinde kademeli olarak azaldığı izlenir. İşte bu süreçte bir veya birkaç hücre transkriptomal instabilite sonucu epigenetik zeminini değiştirebilir ve kazanılan esneklik ile de Bcr-Abl bağımsız bir fenotip edinebilirse, imatinib baskısı bu hücrelerin seçilimi ile sonuçlanacaktır. Bcr-Abl yaşam sinyali bağımlılığından kurtulmanın temel unsuru farklı yaşam sinyalleri edinmekten geçer. Ekstrasellüler matriks ile ilişkide adheran bir fenotip ve komşu hücrelerden süregelen sinyal alabilmek bunun bir yoludur. Stres altında transkripsiyonel olarak instabil duruma geçebilen hücrelerin fenotip değiştirerek ortama adapte olması durumunu “Adaptif Fenotipik Kayma-AFK” olarak adlandırdık (Şekil 58). Bu şekilde fenotipik kayma gösteren hücreler imatinib baskısı sürdükçe kemik iliği nişinde sessiz (dormant) halde saklanabilir, baskı ortadan kalktığında ya da ek mutasyonların birikimiyle tekrar agresif formlarına dönebilirler. Solid tümörlerde mikroçevrede bulunan endotel, fibroblast ve MKH gibi hücrelerin de tümördeki genetik anomalileri taşıdığının gösterilmesi, bu hücrelerin de tümörden türemiş olabileceğini düşündürmektedir^{136-138,118}. Benzer şekilde KML hücrelerinin de stromal myofibroblastlara

dönüştürdüğü NOD/SCID farelerde gösterilmiş olması bulgu ve hipotezimizi desteklemektedir¹³⁹.



Şekil 58’de sunduğumuz adaptif fenotipik kayma modeli, yalnız yeni bir terapötik direnç mekanizması sunmakla kalmayıp, sadece KML değil pek çok solid kanserde yıllar sonra nükse neden olan dormant hücreleri de açıklayacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmalarımız sonucunda, lösemik popülasyondaki bazı hücrelerin imatinib yanıtının transkripsiyonel instabilite ile sonuçlanmasıyla fenotipik adaptasyon gösteren, Bcr-Abl-bağımsız, agresif bir popülasyonun ortaya çıktığını ileri süren yeni bir TKİ direnç modeli sunulmuştur. Ortaya koyduğumuz “adaptif fenotipik kayma” modelinin KML biyolojisinde ilaç direnci ve nüks problemlerinin daha iyi anlaşılmasına ve yeni tedavi yaklaşımlarının ortaya çıkmasına katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

Tez çalışmamın devamında kısa-orta vadede aşağıda listelenen çalışma başlıklarının yapılması planlanmaktadır:

- 1) Dirençli hücrelerimizin hayvan modeli üzerinde tümörojenite ve yuvalanma (homing) potansiyelleri inceleyeceğimiz 216S727 numaralı TUBİTAK 1002 projemiz kabul edilmiş olup çok yakın zamanda çalışmalara başlanacaktır.
- 2) Dirençli hücrelerin epigenetik zemindeki değişikliklerinin araştırılması
- 3) Myeloid hücrelerinde sekonder mutasyon olmayan dirençli hasta örneklerinin fenotipik esneklik açısından çalışılması
- 4) mRNA mikrodizin çalışmalarında farklı eksprese olan genlerin arasından literatürde az çalışılmış, işlevi bilinmeyen genlerin fenotipik esneklikteki rollerinin araştırılması
- 5) Mikrodizin sonucunda elde ettiğimiz mikroRNA gen ekspresyon profillerinin detaylı olarak çalışılması

7. KAYNAKLAR

1. Jagannathan-Bogdan, M. & Zon, L. I. Hematopoiesis. *Development* 140, 2463–7 (2013).
2. Hauke, R. J. & Tarantolo, S. R. Hematopoietic Growth Factors. *Lab. Med.* 31, 613–615 (2000).
3. Orkin, S. H. & Zon, L. I. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132, 631–44 (2008).
4. Zon, L. Developmental biology of hematopoiesis. *Blood* 86, (1995).
5. Cancer Institute, N. What You Need To Know About Leukemia. at <<https://www.cancer.gov/publications/patient-education/leukemia.pdf>>
6. Survivor, C. M. L. Understanding Leukemia. (2012).
7. Qayyum, S. & Choi, J. K. Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. *Arch Pathol Lab Med* 1385858, (2014).
8. About Myelodysplastic Syndromes Overview and Types. at <<https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8743.00.pdf>>
9. Ranjan, A. *et al.* Chronic Neutrophilic Leukemia: A Rare Chronic Myeloproliferative Disorder. doi:10.4999/uhod.14248
10. Fletcher, S. & Bain, B. Eosinophilic leukaemia. doi:10.1093/bmb/ldm008
11. Kratz, C. P. & Niemeyer, C. M. Juvenile myelomonocytic leukemia. doi:10.1080/10245330512331390078
12. Padron, E., Komrokji, R. & List, A. F. The Clinical Management of Chronic Myelomonocytic Leukemia. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* 12, (2014).
13. Damasio, E. E., Lamparelli, T. & Chimirri, F. [Hairy-cell leukemia]. *Recent. Prog Med* 84, 369–388 (1993).
14. Hanlon, K. Chronic myeloid leukaemia Key points. *Medicine (Baltimore)*. 1–5 (2017). doi:10.1016/j.mpmed.2017.02.004

15. Arber, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. doi:10.1182/blood-2016-03-643544
16. Schultz, W. A. *Molecular biology of human cancers : an advanced student's textbook.* (Springer Science, 2005).
17. Quinta, A. & Cortes, J. Molecular biology of bcr-abl1 – positive chronic myeloid leukemia. *Blood* 113, 1619–1630 (2009).
18. Deininger, M. W. N. *et al.* The molecular biology of chronic myeloid leukemia Review article The molecular biology of chronic myeloid leukemia. 96, 3343–3356 (2000).
19. Bernard, A., Rubin, C. M., Westbrook, C. A., Paskind, M. & Baltimore, D. 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.* 7, 3231–6 (1987).
20. Gu, J. J., Ryu, J. R. & Pendergast, A. M. Abl tyrosine kinases in T-cell signaling. *Immunol. Rev.* 228, 170–183 (2009).
21. Chisoe, S. L. *et al.* Sequence and analysis of the human ABL gene, the BCR gene, and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation. *Genomics* 27, 67–82 (1995).
22. Chasseriau, J. *et al.* Characterization of the different BCR-ABL transcripts with a single multiplex RT-PCR. *J. Mol. Diagn.* 6, 343–7 (2004).
23. Heisterkamp, N. & Groffen, J. Molecular insights into the Philadelphia translocation. *Hematol. Pathol.* 5, 1–10 (1991).
24. Goldman, J. M. & Melo, J. V. BCR-ABL in chronic myelogenous leukemia - How does it work? *Acta Haematol.* 119, 212–217 (2008).
25. Lucas, C. M. *et al.* Chronic myeloid leukemia patients with the e13a2 BCR-ABL fusion transcript have inferior responses to imatinib compared to patients with the e14a2 transcript. *Haematologica* 94, 1362–7 (2009).
26. Laurent, E., Talpaz, M., Kantarjian, H. & Kurzrock, R. The BCR gene and philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer Res.* 61, 2343–55 (2001).
27. Ohsaka, A., Hoshino, S., Kobayashi, M., Kudo, H. & Kawaguchi, R. Blast crisis of

- Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukaemia carrying micro-bcr breakpoint (e19a2 and e191a). *Br. J. Haematol.* 118, 251–254 (2002).
28. Quintás-Cardama, A. & Cortes, J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood* 113, 1619–30 (2009).
 29. Wagner, W. M., Ouyang, Q. & Pawelec, G. The abl/bcr gene product as a novel leukemia-specific antigen: peptides spanning the fusion region of abl/bcr can be recognized by both CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes. *Cancer Immunol. Immunother.* 52, 89–96 (2003).
 30. Zheng, X., Oancea, C., Henschler, R., Moore, M. A. S. & Ruthardt, M. Reciprocal t(9;22) ABL/BCR Fusion Proteins: Leukemogenic Potential and Effects on B Cell Commitment. *PLoS One* 4, e7661 (2009).
 31. von Bubnoff, N. & Duyster, J. Chronic myelogenous leukemia: treatment and monitoring. *Dtsch. Arztebl. Int.* 107, 114–21 (2010).
 32. Bolin, R. W., Robinson, W. A., Sutherland, J. & Hamman, R. F. Busulfan versus hydroxyurea in long-term therapy of chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 50, 1683–6 (1982).
 33. Thiele, J. *et al.* Effects of Chemotherapy (Busulfan-Hydroxyurea) and Interferon-Alfa on Bone Marrow Morphologic Features in Chronic Myelogenous Leukemia: Histochemical and Morphometric Study on Sequential Trephine Biopsy Specimens With Special Emphasis on Dynamic Feat. *Am. J. Clin. Pathol.* 114, 57–65 (2000).
 34. Cortes-Franco, J. *et al.* Safety and Efficacy of Subcutaneous-Administered Omacetaxine Mepesuccinate in Chronic Myeloid Leukemia (CML) Patients Who Are Resistant or Intolerant to Two or More Tyrosine Kinase Inhibitors – Results of A Multicenter Phase 2/3 Study. *Blood* 114, (2009).
 35. Jabbour, E. & Kantarjian, H. Chronic myeloid leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy, and monitoring. *Am. J. Hematol.* 91, 252–265 (2016).
 36. Haznedaroglu, I. C. Monitoring the Response to Tyrosine Kinase Inhibitor (TKI) Treatment in Chronic Myeloid Leukemia (CML). *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 6, e2014009 (2014).

37. Oyekunle, A. *et al.* Challenges for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in chronic myeloid leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitors. *Acta Haematol.* 126, 30–9 (2011).
38. Afreen, S. & Safran, Z. Al. Allogeneic Stem Cell Transplantation for Chronic Myeloid Leukemia in the Era of Tyrosine Kinase Inhibitors- What are the Limitations? *J. Carcinog. Mutagen.* S14, (2013).
39. Hanks, S. K., Quinn, A. M. & Hunter, T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241, 42–52 (1988).
40. Deininger, M. W. N. & Druker, B. J. Specific Targeted Therapy of Chronic Myelogenous Leukemia with Imatinib. *Pharmacol. Rev.* 55, 401–423 (2003).
41. Manley, P. W. *et al.* Imatinib: a selective tyrosine kinase inhibitor. *Eur. J. Cancer* 38 Suppl 5, S19-27 (2002).
42. Bubnoff, N. von, Peschel, C. & Duyster, J. Resistance of Philadelphia-chromosome positive leukemia towards the kinase inhibitor imatinib (STI571, Glivec): a targeted oncoprotein strikes back. *Leukemia* 17, 829–838 (2003).
43. Martinelli, G., Soverini, S., Rosti, G., Cilloni, D. & Baccarani, M. New tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 90, 534–41 (2005).
44. Bixby, D. & Talpaz, M. Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and recent therapeutic strategies to overcome resistance. *Hematology* 2009, 461–476 (2009).
45. Jabbour, E., Kantarjian, H. & Cortes, J. Use of second- and third-generation tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid leukemia: An evolving treatment paradigm. *Clin. Lymphoma, Myeloma Leuk.* 15, 323–334 (2015).
46. Keating, G. M. Dasatinib: A Review in Chronic Myeloid Leukaemia and Ph⁺ Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Drugs* 77, 85–96 (2017).
47. Okabe, S., Tauchi, T., Tanaka, Y. & Ohyashiki, K. Dasatinib preferentially induces apoptosis by inhibiting Lyn kinase in nilotinib-resistant chronic myeloid leukemia cell line. *J. Hematol. Oncol.* 4, 32 (2011).

48. Valent, P. *et al.* Nilotinib as frontline and second-line therapy in chronic myeloid leukemia: Open questions. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 82, 370–377 (2012).
49. Eiring, A. M., Khorashad, J. S., Morley, K. & Deininger, M. W. Advances in the treatment of chronic myeloid leukemia. *BMC Med.* 9, 99 (2011).
50. Boschelli, F., Arndt, K. & Gambacorti-Passerini, C. Bosutinib: A review of preclinical studies in chronic myelogenous leukaemia. *Eur. J. Cancer* 46, 1781–1789 (2010).
51. Ibrahim, A. R. *et al.* Second-generation tyrosine kinase inhibitors improve the survival of patients with chronic myeloid leukemia in whom imatinib therapy has failed. *Haematologica* 96, 1779–82 (2011).
52. Jabbour, E. J., Cortes, J. E. & Kantarjian, H. M. Resistance to tyrosine kinase inhibition therapy for chronic myelogenous leukemia: a clinical perspective and emerging treatment options. *Clin. Lymphoma. Myeloma Leuk.* 13, 515–29 (2013).
53. Zhou, T. *et al.* Structural Mechanism of the Pan-BCR-ABL Inhibitor Ponatinib (AP24534): Lessons for Overcoming Kinase Inhibitor Resistance. *Chem. Biol. Drug Des.* 77, 1–11 (2011).
54. Pigliucci, M. Evolution of phenotypic plasticity : where are we going now ? 20, (2005).
55. Hochedlinger, K. & Plath, K. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. 523, 509–523 (2009).
56. Nachtomy, O., Shavit, A. & Yakhini, Z. Gene expression and the concept of the phenotype. 38, 238–254 (2007).
57. Chevin, L. & Hoffmann, A. A. Evolution of phenotypic plasticity in extreme environments. (2017).
58. Bindu A, H. & B, S. Potency of Various Types of Stem Cells and their Transplantation. *J. Stem Cell Res. Ther.* 1, (2011).
59. Mitalipov, S. & Wolf, D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 114, 185–99 (2009).
60. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676 (2006).

61. Institutes of Health, N. Stem Cell Basics. at
<<https://stemcells.nih.gov/sites/default/files/SCprimer2009.pdf>>
62. WADDINGTON, C. H. The strategy of the genes. A discussion of some aspects of theoretical biology. With an appendix by H. Kacser. *Strateg. genes. A Discuss. some Asp. Theor. Biol. With an Append. by H. Kacser.* (1957). at
<<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19580101706>>
63. Takahashi, K. Cellular reprogramming – lowering gravity on Waddington ’ s epigenetic landscape. 1, (2012).
64. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induced pluripotent stem cells in medicine and biology. 2461, 2457–2461 (2013).
65. Vierbuchen, T. *et al.* Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463, 1035–1041 (2010).
66. Kalluri, R. & Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 119, 1420–8 (2009).
67. Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J. & Nieto, M. A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871–90 (2009).
68. Lamouille, S., Xu, J. & Derynck, R. Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 178–196 (2014).
69. Garg, M. Epithelial , mesenchymal and hybrid epithelial / mesenchymal phenotypes and their clinical relevance in cancer metastasis. 19, 1–13 (2017).
70. Pluijm, G. Van Der. Epithelial plasticity , cancer stem cells and bone metastasis formation. *Bone* 48, 37–43 (2011).
71. Brabletz, T. Previews EMT and MET in Metastasis : Where Are the Cancer Stem Cells ? *CCELL* 22, 699–701 (2012).
72. Forte, E. *et al.* EMT / MET at the Crossroad of Stemness , Regeneration and Oncogenesis : The Ying-Yang Equilibrium Recapitulated in Cell Spheroids. 1–15 doi:10.3390/cancers9080098
73. Aguilar-Gallardo, C. & Simón, C. Cells, Stem Cells, and Cancer Stem Cells. *Semin.*

- Reprod. Med.* 31, 005–013 (2013).
74. Scheel, C. & Weinberg, R. A. cancer and normal stem cells ? 2314, 2310–2314 (2011).
 75. Cabrera, M. C. *et al.* Cancer stem cell plasticity and tumor hierarchy. 7, 27–36 (2015).
 76. Bonnet, D. & Dick, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 3, 730–737 (1997).
 77. Rice, K. N. & Jamieson, C. H. M. Molecular pathways to CML stem cells. *Int. J. Hematol.* 91, 748–752 (2010).
 78. Visvader, J. E. & Lindeman, G. J. Cancer stem cells: Current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell* 10, 717–728 (2012).
 79. Jamieson, C. H. M. *et al.* Granulocyte–Macrophage Progenitors as Candidate Leukemic Stem Cells in Blast-Crisis CML. *N. Engl. J. Med.* 351, 657–667 (2004).
 80. Sloma, I., Jiang, X., Eaves, A. C. & Eaves, C. J. Insights into the stem cells of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 24, 1823–1833 (2010).
 81. Holyoake, T. L. & Vetrie, D. The chronic myeloid leukemia stem cell : stemming the tide of persistence. 129, 1595–1607 (2017).
 82. Dingli, D., Traulsen, A., Lenaerts, T. & Pacheco, J. M. Evolutionary dynamics of chronic myeloid leukemia. *Genes Cancer* 1, 309–15 (2010).
 83. Deininger, M. W. Nilotinib. *Clin. Cancer Res.* 14, 4027–4031 (2008).
 84. Takahashi, N., Miura, M., Scott, S. A., Niioka, T. & Sawada, K. Pharmacokinetics of dasatinib for Philadelphia-positive acute lymphocytic leukemia with acquired T315I mutation. *J. Hematol. Oncol.* 5, 23 (2012).
 85. Abbas, R. *et al.* A phase I ascending single-dose study of the safety, tolerability, and pharmacokinetics of bosutinib (SKI-606) in healthy adult subjects. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 69, 221–227 (2012).
 86. Deininger, M. W. N. & Druker, B. J. Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib. *Pharmacol. Rev.* 55, 401–23 (2003).
 87. HIGHLIGHTS OF PRESCRIBING INFORMATION. at <<http://www.iclusig.com/pi>>

88. GNF-2 | Bcr-Abl inhibitor | Read Reviews & Product Use Citations. at <http://www.selleckchem.com/products/gnf-2.html>
89. Anjomshoaa, A. *et al.* Slow proliferation as a biological feature of colorectal cancer metastasis. *Br. J. Cancer* 101, 822–8 (2009).
90. Blagosklonny, M. V. Target for cancer therapy: proliferating cells or stem cells. *Leukemia* 20, 385–391 (2006).
91. Kondoh, E. *et al.* Targeting slow-proliferating ovarian cancer cells. *Int. J. Cancer* 126, NA-NA (2009).
92. Thorn, C. F. *et al.* Doxorubicin pathways: pharmacodynamics and adverse effects. *Pharmacogenet. Genomics* 21, 440–6 (2011).
93. Tacar, O., Sriamornsak, P. & Dass, C. R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. *J. Pharm. Pharmacol.* 65, 157–170 (2013).
94. Yang, M. Y. *et al.* Induction of cellular senescence by doxorubicin is associated with upregulated miR-375 and induction of autophagy in K562 cells. *PLoS One* 7, (2012).
95. Yang, F., Teves, S. S., Kemp, C. J. & Henikoff, S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. *Biochim. Biophys. Acta* 1845, 84–9 (2014).
96. Ishiguro, T. *et al.* Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Sci.* 108, 283–289 (2017).
97. Friedrich, J., Seidel, C., Ebner, R. & Kunz-Schughart, L. A. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat. Protoc.* 4, 309–24 (2009).
98. Ma, H. L. *et al.* Multicellular tumor spheroids as an in vivo-like tumor model for three-dimensional imaging of chemotherapeutic and nano material cellular penetration. *Mol. Imaging* 11, 487–498 (2012).
99. Beavon, I. R. The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation. *Eur. J. Cancer* 36, 1607–20 (2000).
100. Takei, R. *et al.* Role of E-cadherin Molecules in Spheroid Formation of Hepatocytes Adhered on Galactose-Carrying Polymer as an Artificial Asialoglycoprotein Model.

- Biotechnol. Lett.* 27, 1149–1156 (2005).
101. Xu, S. *et al.* Construction and characteristics of an E-cadherin-related three-dimensional suspension growth model of ovarian cancer. *Sci. Rep.* 4, 5646 (2015).
 102. Manuel Iglesias, J. *et al.* Mammosphere Formation in Breast Carcinoma Cell Lines Depends upon Expression of E-cadherin. *PLoS One* 8, e77281 (2013).
 103. Morath, I., Hartmann, T. N. & Orian-Rousseau, V. CD44: More than a mere stem cell marker. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 81, 166–173 (2016).
 104. Zöller, M. CD44: Can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat. Rev. Cancer* 11, 254–267 (2011).
 105. Jaggupilli, A. & Elkord, E. Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: An enduring ambiguity. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, (2012).
 106. Williams, K., Motiani, K., Giridhar, P. V. & Kasper, S. CD44 integrates signaling in normal stem cell, cancer stem cell and (pre)metastatic niches. *Exp. Biol. Med.* 238, 324–338 (2013).
 107. Seton-Rogers, S. Leukaemia Stem Cells: Homing in on CD44. *Nat. Rev. Cancer* 6, 832–832 (2006).
 108. Jin, L., Hope, K. J., Zhai, Q., Smadja-Joffe, F. & Dick, J. E. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat. Med.* 12, 1167–1174 (2006).
 109. Hertweck, M. K. *et al.* CD44 in hematological neoplasias To cite this version : HAL Id : hal-00610424 CD44 in hematological neoplasias. 90, 493–508 (2011).
 110. Krause, D. S., Lazarides, K., Von Andrian, U. H. & Van Etten, R. A. Requirement for CD44 in homing and engraftment of BCR-ABL-expressing leukemic stem cells. *Nat. Med.* 12, 1175–1180 (2006).
 111. Wang, Z. *et al.* Caveolin-1, a stress-related oncotarget, in drug resistance. *Oncotarget* 6, 37135–37150 (2015).
 112. Baker, N., Zhang, G., You, Y. & Tuan, R. S. Caveolin-1 regulates proliferation and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.* 113, 3773–3787 (2012).

113. Luanpitpong, S. *et al.* Caveolin-1 regulates lung cancer stem-like cell induction and p53 inactivation in carbon nanotube-driven tumorigenesis. *Oncotarget* 5, 3541–3554 (2014).
114. Wang, Z. *et al.* Caveolin-1 mediates chemoresistance in breast cancer stem cells via β -catenin/ABCG2 signaling pathway. *Carcinogenesis* 35, 2346–2356 (2014).
115. Baker, N. & Tuan, R. S. The less-often-traveled surface of stem cells: caveolin-1 and caveolae in stem cells, tissue repair and regeneration. *Stem Cell Res. Ther.* 4, 90 (2013).
116. Dinis, J. *et al.* DNA damage response in imatinib resistant chronic myeloid leukemia K562 cells. *Leuk. Lymphoma* 53, 2004–2014 (2012).
117. Li, J. & Radice, G. L. A new perspective on intercalated disc organization: Implications for heart disease. *Dermatol. Res. Pract.* 2010, (2010).
118. Spaeth, E. L. *et al.* Mesenchymal Stem Cell Transition to Tumor-Associated Fibroblasts Contributes to Fibrovascular Network Expansion and Tumor Progression. *PLoS One* 4, e4992 (2009).
119. Forte, E. *et al.* EMT/MET at the Crossroad of Stemness, Regeneration and Oncogenesis: The Ying-Yang Equilibrium Recapitulated in Cell Spheroids. *Cancers (Basel)*. 9, (2017).
120. Keating, A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell* 10, 709–16 (2012).
121. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317 (2006).
122. Franke, W. W. & Rickelt, S. Mesenchymal-epithelial transitions: Spontaneous and cumulative syntheses of epithelial marker molecules and their assemblies to novel cell junctions connecting human hematopoietic tumor cells to carcinomatoid tissue structures. *Int. J. Cancer* 129, 2588–2599 (2011).
123. Thapa, R. & Wilson, G. D. The Importance of CD44 as a Stem Cell Biomarker and Therapeutic Target in Cancer. *Stem Cells Int.* 2016, 1–15 (2016).
124. Zöller, M. CD44, hyaluronan, the hematopoietic stem cell, and leukemia-initiating cells. *Front. Immunol.* 6, 1–23 (2015).

125. Ohata, H. *et al.* Induction of the stem-like cell regulator CD44 by Rho kinase inhibition contributes to the maintenance of colon cancer-initiating cells. *Cancer Res.* 72, 5101–5110 (2012).
126. Nagata, T. *et al.* Expression of cancer stem cell markers CD133 and CD44 in locoregional recurrence of rectal cancer. *Anticancer Res.* 31, 495–500 (2011).
127. Jiang, X. *et al.* Stem cell biomarkers in chronic myeloid leukemia. *Dis. Markers* 24, 201–216 (2008).
128. Graham, S. M. *et al.* Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* 99, 319–325 (2002).
129. Zhang, H. & Li, S. Molecular mechanisms for survival regulation of chronic myeloid leukemia stem cells. *Protein Cell* 4, 186–196 (2013).
130. Puissant, A. *et al.* Imatinib triggers mesenchymal-like conversion of CML cells associated with increased aggressiveness. *J. Mol. Cell Biol.* 4, 207–220 (2012).
131. Chorzalska, A. *et al.* Long-Term Exposure to Imatinib Mesylate Downregulates Hippo Pathway and Activates YAP in a Model of Chronic Myelogenous Leukemia. *Stem Cells Dev.* 26, 656–677 (2017).
132. Maisnier-Patin, S. & Roth, J. R. The Origin of Mutants Under Selection: How Natural Selection Mimics Mutagenesis (Adaptive Mutation). *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a018176 (2015).
133. Spiers, A. J. A mechanistic explanation linking adaptive mutation, niche change, and fitness advantage for the wrinkly spreader. *Int. J. Evol. Biol.* 2014, 675432 (2014).
134. Heidenreich, E. Adaptive Mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 42, 285–311 (2007).
135. Foster, P. L. Stress-Induced Mutagenesis in Bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 42, 373–397 (2007).
136. Hida, K. & Klagsbrun, M. A new perspective on tumor endothelial cells: Unexpected chromosome and centrosome abnormalities. *Cancer Res.* 65, 2507–2510 (2005).

137. Carson-Walter, E. B. *et al.* Cell surface tumor endothelial markers are conserved in mice and humans. *Cancer Res.* 61, 6649–55 (2001).
138. Streubel, B. *et al.* Lymphoma-Specific Genetic Aberrations in Microvascular Endothelial Cells in B-Cell Lymphomas. *n engl j med* 3513351, 250–9 (2004).
139. Shirasaki, R. *et al.* Chronic Myelogenous Leukemia Cells Contribute to the Stromal Myofibroblasts in Leukemic NOD/SCID Mouse *In Vivo*. *J. Oncol.* 2012, 1–8 (2012).



KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2011/20-03	Tarih:16.06.2011
	Yard.Doç.Dr.Zeynep SERCAN 'ın sorumlusu Dok.Öğr.Seda BAYKAL'ın proje yürütücüsü olduğu "Kronik Myeloid Lösemi Hücre Hattında Tirozin Kinaz İnhibitörlerine Karşı Direnç Mekanizmalarının Araştırılması (DEU.HSL.PhD.2010970090)" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI Dokuz Eylül Üniversitesi Etik Kurullar Yönetmeliği , İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	İmza
Prof.Ph.D.Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	Besti
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Adıgöz
Prof.Dr.Mehtap MALKOÇ	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	Malkoç
Prof.Ph.D.Zuhal BAHAR	Ph.D. Yüksek Hemşire, Halk Sağlığında doktora	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	Bahar
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Katılacak
Prof.Dr.Ömer Selahattin TOPALAK	İç Hastalıkları (Gastroenteroloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Katılacak
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Böber
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	Katılacak
Prof.Dr.Servet AKAR	İç Hastalıkları (Romatoloji)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Akar
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	M. Güneli
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Katılacak
Doç.Dr.İşıl TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Tekmek
Prof.Ph.D.Meltem Kutlu GÜRSEL	Hukuk	D.E.Ü Hukuk Fakültesi İdare Hukuku Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	Gürsel
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐	H ☒	Çelikdemir



SEDA BAYKAL KÖSE

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Kimlik Numarası	20039230100
Doğum Tarihi	18/02/1984
İletişim Adresi	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ TIBBİ
Telefon	(232) 412 46 25 (538) 499 31 30
E-posta	seda.baykal@deu.edu.tr seda.baykal@yahoo.com
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri

01 Eylül 2010 - 01 Şubat 2018 (7 yıl 6 ay) Doktora, Doktora, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK (DR) Tez Başlığı: Kronik Myeloid Lösemi Hücre Hattında Tirozin Kinaz Inhibitörlerine Karşı Direnç Mekanizmalarının Araştırılması Tez Konusu: Kronik Myeloid Lösemide İlaç Direnci Mekanizmalarının Aydınlatılması Tarih: 16 Haziran 2011 Tez Danışmanı: ZEYNEP YÜCE	
01 Eylül 2007 - 01 Eylül 2010 (3 yıl 1 ay) Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK (YL) (TEZLİ) Tez Başlığı: Bcr-abl Pozitif Hücrelerde Tirozin Kinaz Inhibitörlerinin Otofajik Hücre Ölümü Üzerindeki Etkileri Tez Konusu: Kronik Myeloid Lösemide Otofajik Yolakların İncelenmesi Tarih: 10 Eylül 2010 Tez Danışmanı: ZEYNEP YÜCE	
22 Haziran 2003 - 22 Haziran 2007 (4 yıl 1 ay) Lisans, Anadal/Normal Öğrenim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE FEN FAKÜLTESİ, BİYOLOJİ BÖLÜMÜ	

Deneyim / İşyeri Bilgileri

01 Nisan 2017 - 01 Kasım 2017 (8 ay) (Tam Zamanlı) ARGE PERSONEL, UNIVERSITE PARIS SUD	
01 Ocak 2009 - 01 Haziran 2017 (8 yıl 6 ay) (Tam Zamanlı) ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, ARAŞTIRMA GÖREVLİSİ, DİĞER (Dokuz Eylül Üniversitesi)	

Yabancı Dil Bilgileri

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)
FRANSIZCA (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

Bildiriler

S. BAYKAL KÖSE, Z. YÜCE, H. EFE, Ö. GÖNÜL GEYİK & H. ATEŞ, Bcr-abl Pozitif Hücrelerde İzlenen Imatinib Direncinde Otofajik Hücre Ölüm Yolağı Baskılanmaktadır, Poster Sunumu, 43. Hematoloji Kongresi, 01 Kasım 2017, 05 Kasım 2017.

S. BAYKAL KÖSE, M. VOLDOIRE & C. DETERKE, The Cell Surface Nadh Oxidase Enox2 Is Highly Expressed In Chronic Myeloid Leukemia (cml): A Redox Protein As A Secreted Surrogate Biomarker And Druggable Target, Poster Sunumu, American Society Of Hematology 58th Congress, 04 Aralık 2016, 04 Aralık 2016.

S. BAYKAL KÖSE, H. ATEŞ, A. S. YAVUZ, O. U. SEZERMAN, E. AÇIKGÖZ, G. ÖKTEM & Z. YÜCE, Leukemic Cell Plasticity As A Resistance Mechanism Towards Tyrosine Kinase Inhibitors., Poster Sunumu, 41th Febs Congress, 03 Eylül 2016, 08 Eylül 2016.

S. BAYKAL KÖSE, ARYL HYDROCARBON RECEPTOR (AHR) PATHWAY DIRECTLY CONTROLS HEMATOPOIETIC PROLIFERATION IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA (CML) AND ITS INHIBITION ALLOWS MASSIVE EXPANSION OF LEUKEMIC PROGENITORS AND STEM CELLS , Poster Sunumu, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY 57TH CONGRESS, 07 Aralık 2015, 07 Aralık 2015.

S. BAYKAL KÖSE, TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİNE DİRENÇLİ K562-IR ALT KLONUNUN TANIMLANMASI, Poster Sunumu, I. HEMATOLOJİK GENETİK SEMPOZYUMU, 02 Aralık 2013, 02 Aralık 2013, 1, 1, 38 - 38.

S. BAYKAL KÖSE, NÖROBLASTOMA HÜCRE HATTINDA KEMOTÖROPATİK AJANLARA YANITTA KANONİKAL VE NON-KANONİKAL WNT YOLAĞI GENLERİNİN ROLÜNÜN ARAŞTIRILMASI, Poster Sunumu, XIII. ULUSAL TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK KONGRESİ, 28 Ekim 2013, 28 Ekim 2013.

S. BAYKAL KÖSE, TAF7NİN CİTA İLE ETKİLEŞİMİNİN APOPTOTİK YOLAKTAKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI, Poster Sunumu, XII.ULUSAL TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK KONGRESİ, 28 Ekim 2013, 28 Ekim 2013, 30, 6, 76 - 76.

S. BAYKAL KÖSE, İMATİNİB DİRENÇLİ K562 ALT KLONUNDA YENİ NESİL TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİNİN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI, Poster Sunumu, XII. ULUSAL TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK KONGRESİ, 28 Ekim 2011, 28 Ekim 2011, 30, 6, 105 - 105.

S. BAYKAL KÖSE, TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİNE DUYARLI KRONİK MYELOİD LÖSEMİ HÜCRE HATTI K562'DEN DİRENÇLİ ALT KLONLARIN OLUŞTURULMASI VE KARAKTERİZASYONU, Poster Sunumu, 36. ULUSAL HEMATOLOJİ KONGRESİ, 02 Kasım 2010, 02 Kasım 2010.

Projeler

BAP, ARAŞTIRMACI, Tirozin Kinaz Inhibitörlerine Karşı Birincil (primer) Dirençte Rolü Olan Mikrornaların In-vitro Hücre Kültür Modelinde Tanımlanması, Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Yurt İçi) , 01 Nisan 2014, 01 Ekim 2016.

DİĞER, ARAŞTIRMACI, THE ROLE OF IFI16 GENE ON CHRONIC MYELOID LEUKEMIA, Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Yurt İçi) , 10 Nisan 2015, 04 Kasım 2015.

BAP, ARAŞTIRMACI, KRONİK MYELOİD LÖSEMİ HÜCRE HATLARINDA TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİNE KARŞI DİRENÇ MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI, Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Yurt İçi) , 05 Eylül 2012, 05 Mart 2015.

1001 - ARAŞTIRMA, BURSİYER, PROGRAMLANMIŞ HÜCRE ÖLÜMÜ SÜRECİNDE CIITA PROTEİNİNİN TAF7 VE HIV-TAT MOLEKÜLLERİYLE ETKİLEŞİMLERİNİN KARAKTERİZASYONU, Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: , 15 Nisan 2010, 15 Nisan 2012.

DİĞER, BURSİYER, PROGRAMLANMIŞ HÜCRE ÖLÜMÜ SÜRECİNDE CIITA PROTEİNİNİN TAF7 VE HIV-TAT MOLEKÜLLERİYLE ETKİLEŞİMLERİNİN KARAKTERİZASYONU, Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Yurt İçi) , 01 Aralık 2009, 01 Aralık 2011.

BAP, ARAŞTIRMACI, BCR-ABL POZİTİF HÜCRELERDE TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİNİN OTFAJİK HÜCRE ÖLÜMÜ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ, Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: DİĞER (Yurt İçi) , 12 Aralık 2009, 12 Eylül 2011.

1002 - HIZLI DESTEK, BURSİYER, TAF7 PROTEİNİNİN TUBULİN POLİMERİZASYONUNDAKİ ROLÜNÜN ELEKTRON MİKROSKOPİSİ VE IN-VİTRO POLİMERİZASYON DENEYİ İLE ARAŞTIRILMASI, Yürütülen Kuruluş: KURULUŞ GÜNCELLENMESİ GEREKİYOR, Destek Alınan Kuruluş: , 01 Kasım 2008, 01 Kasım 2009.

Yayımlar

6. ORFEUS DOKTORA EĞİTİMİ KONGRESİ , DÜZENLENEN ÇALIŞTAY, Uluslararası, 27 Nisan 2011 - 30 Nisan 2011.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Proje Bilgileri

108T609, Taf7 Proteininin Tubulin Polimerizasyonundaki Rolünün Elektron Mikroskopisi Ve In-Vitro Polimerizasyon Deneyi Ile Araştırılması, 1002 - Hızlı Destek, Burslu, Sonuçlandı, KBAG - Ki?mya Bi?yoloji? Araştırma Destek Grubu, ARDEB, 02.06.2008, 01.03.2009 - Still continues, 01.11.2008 - 01.11.2009. 109T937, Programlanmış Hücre Ölümü Sürecinde CIITA Proteininin TAF7 ve HIV-Tat Molekülleriyle Etkileşimlerinin Karakterizasyonu, 1001 - Araştırma, Burslu, Sonuçlandı, KBAG - Ki?mya Bi?yoloji? Araştırma Destek Grubu, ARDEB, 15.09.2009, 20.04.2010 - Still continues, 15.04.2010 - 15.04.2012.

BİDEB Destekleri

SEDA BAYKAL KÖSE, Araştırma Burs ve Destekleri Müdürlüğü, 2214-A Yurt Dışı Araştırma Burs Programı (Doktora öğrencileri için), Başvurusu Reddedildi, 2014 - 1, 25.09.2014 - 25.03.2015. SEDA BAYKAL KÖSE, Araştırma Burs ve Destekleri Müdürlüğü, 2214-A Yurt Dışı Araştırma Burs Programı (Doktora öğrencileri için), Türkiye'ye Döndü, 2014 - 2, 01.03.2015 - 01.09.2015.

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0

