T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİNE KARŞI DİRENÇ GELİŞİMİNDE ROL OYNAYAN miRNA'LARIN ARAŞTIRILMASI

MERVE SOĞANCI

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR

HAZİRAN 2021

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc.-2017970200

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİNE KARŞI DİRENÇ GELİŞİMİNDE ROL OYNAYAN miRNA'LARIN ARAŞTIRILMASI

MERVE SOĞANCI

MOLEKÜLER TIP ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Zeynep YÜCE

Bu araştırma DEU Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından 2020.KB.SAG.006 proje numarası ile desteklenmiştir.

İZMİR

HAZİRAN 2021

TEZ KABUL ONAYI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı/Moleküler Tıp Programı öğrencisi Merve Soğancı tarafından hazırlanan Tirozin Kinaz İnhibitörlerine Karşı Direnç Gelişiminde Rol Oynayan miRNA'ların Araştırılması başlıklı tez çalışması 30/06/2021 Günü 11.00-12.00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZİ olarak kabul/reddedilmiştir.

Tez hakkında alınan jüri kararı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim kurulu tarafından onaylanmıştır.

TEZ KABUL ONAYI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı/Moleküler Tıp Programı öğrencisi Merve Soğancı tarafından hazırlanan Tirozin Kinaz İnhibitörlerine Karşı Direnç Gelişiminde Rol Oynayan miRNA'ların Araştırılması başlıklı tez çalışması 30/06/2021 Günü 11.00-12.00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZİ olarak kabul/reddedilmiştir.

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

ETİK BEYANI

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırlayıp sunduğum ‘’ Tirozin Kinaz İnhibitörlerine Karşı Direnç Gelişiminde Rol Oynayan miRNA'ların Araştırılması’’ başlıklı Yüksek Lisans tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisansımın başlangıcından bugüne kadar her zaman yanımda olan, bana inanan ve mükemmel yol göstericiliği, bilgisi ve tecrübesi sayesinde akademik hayatımı en iyi şekilde yönetmemi sağlayan ve hayatıma ışık tutan sevgili danışmanım Doç.Dr. Zeynep YÜCE'ye çok teşekkür ederim. Tüm dünya için oldukça zor bir süreçten geçtiğimiz Covid-19'a İsveç'te denk gelmeme rağmen en verimli şekilde geçirmemi sağlayan, 5 aylık bir sürede birçok bilimsel araştırma yöntemini öğrenip uygulamamı sağlayan, laboratuvarının tüm imkanlarından yararlanmamı sağlayan, akademik kariyerim için desteklerini esirgemeyen ve hayatıma dokunan sevgili Doç.Dr. Evren ALİCİ'ye çok teşekkür ederim. İsveç'te bulunduğum süre boyunca bana kendimi hiçbir zaman yabancı hissettirmeyen, bilgi ve tecrübelerini paylaşan sevgili ALİCİ laboratuvarı ekibine çok teşekkür ederim. Ön lisans ve lisans eğitimimden beri tanıdığım ve akademik hayata katılmamı sağlayan başta Prof.Dr. Sefa Kızıldağ'a ve Prof.Dr. Ogün Sercan'a çok teşekkür ederim. Tezimin ilk başlangıcından sonuna kadar her zaman bana yardımcı olan, bilgisini ve tecrübelerini aktaran bir nevi ikinci danışmanım olan sevgili Dr. Seda Baykal KÖSE'ye çok teşekkür ederim. YÜCE laboratuvarı ekibinden desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen arkadaşlarıma çok teşekkür ederim. Moleküler Tıp ve Tıbbi Biyoloji bölümünden tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma çok teşekkür ederim. Ayrıca tez çalışmalarımın bir kısmını gerçekleştirdiğim Karolinska Enstitüsü'ne ve beni maddi olarak destekleyen EMBO'ya teşekkürlerimi sunarım. Tüm eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan, beni destekleyen ve inanan canım aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER……i

TABLOLAR DİZİNİ ..... İİİ
ŞEKİLLER DİZİNİ .....İV
GRAFİKLER DİZİNİ V
SİMGELER VE KISALTMALAR .....Vİ
ÖZET..... Vİİ
ABSTRACT ..... Vİİİ
1.GİRİŞ VE AMAÇ 1
1.1. PROBLEMİN TANIMI VE ÖNEMİ..... 1
1.2. ARAŞTIRMANIN AMACI 2
1.3. ARAŞTIRMANIN HİPOTEZLERİ 2
2. GENEL BİLGİLER..... 3
2.1.2. Kronik Myeloid Lösemi (KML)..... 5
2.1.2.1. Kronik Myeloid Löseminin Moleküler Patofizyolojisi 6
2.1.2.1.1. BCR-ABL1 Füzyon Proteini..... 8
2.1.2.1.2. BCR-ABL1 ile İlişkili Sinyal Yolakları..... 11
2.1.2.4. Kronik Myeloid Lösemi Tedavisi 13
2.2. TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİ..... 14
2.2.1. İmatinib 15
2.2.2. Kronik Myeloid Lösemi'de Tirozin Kinaz İnhibitör Direnci..... 16
2.2.3. Kronik Myeloid Lösemi'de Tirozin Kinaz İnhibitörlerine Karşı Direnç Mekanizmaları (Detaylandırılmış)..... 18
2.2.3.1. BCR-ABL Kinaz Domeynindeki Mutasyonlar..... 18
2.3. RNA 22
2.3.1. MikroRNA (miRNA) 22
2.3.1.1. MikroRNA'ların Moleküler Mekanizması..... 23
2.3.1.2. MikroRNA'ların Kronik Myeloid Lösemi ile İlişkisi..... 25
2.4.1. Doğal Öldürücü (NK) Hücreler 27
2.4.1.1. Doğal Öldürücü (NK) Hücre Fonksiyonları 28
2.4.1.2. Doğal Öldürücü Hücre Reseptörleri..... 30
2.4.1.3. Doğal Öldürücü Hücrelerin Kronik Myeloid Lösemi ile İlişkisi 31
3.GEREÇ VE YÖNTEM..... 33
3.1. ARAŞTIRMANIN TİPİ 33
3.2. ARAŞTIRMANIN YERİ VE ZAMANI 33
3.3. ARAŞTIRMANIN EVRENİ VE ÖRNEKLEMİ..... 33
3.4. ÇALIŞMA MATERYALİ 33
3.5. ARAŞTIRMANIN DEĞİŞKENLERİ 34
3.6. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI 34
3.6.1. BİYOİNFORMATİK ANALİZ..... 34

3.6.1.1. miRNA Mikrodizin Analizi **34**
3.6.2.HÜCRE HATTI VE HÜCRE KÜLTÜRÜ *35*
3.6.2.1. K562 Hücre hattı **35**
3.6.2.2. K-562-Ir Hücre hattı **36**
3.6.2.3. NK Hücre Hattı **38**
3.6.2.4. Hücre Sayımı **39**
3.6.3.miRNA EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ *40*
3.6.3.1. miRNA İzolasyonu **40**
3.6.3.2. RNA Miktar Tayini **42**
3.6.3.3. cDNA Eldesi **42**
3.6.3.4. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (QPCR) **44**
3.6.3.5. miRNA düzeyleri **46**
3.6.4.miRNA TRANSFEKSİYON DENEYLERİ *47*
3.6.4.1.miRNA Mimik Transfeksiyonları **47**
3.6.4.2. miRNA İnhibitör Transfeksiyonları **47**
3.6.5.MTT Deneyi *50*
3.6.6.Fenotipik Karakterizasyon Deneyi *52*
3.6.7.Degranülasyon Deneyleri *54*
3.6.8.Akış Sitometrisi *59*
3.6.9. Western Blot *60*
3.7. ARAŞTIRMA PLANI 66
3.8. VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ 66
3.9. ARAŞTIRMANIN KISITLILIKLARI 66
3.10. ETİK KURUL ONAYI 67
4.BULGULAR **67**
4.1. BİYOİNFORMATİK ANALİZ BULGULARI 67
4.2. MİRNA EKSPRESYON DÜZEYLERİNİ BELİRLEMEK İÇİN QPCR BULGULARI 70
4.3. NEON SİSTEM ELEKTROPORASYON İLE TRANSFEKSİYON BULGULARI 72
4.4. TRANSFEKTE EDİLEN MİMİK VE İNHİBİTÖR MİRNA'LARIN MTT CANLILIK TAYİNİ BULGULARI 72
4.5. MİMİK VE İNHİBİTÖRÜ TRANSFEKTE EDİLEN HSA-MİR-610'UN WESTERN BLOT BULGULARI 74
4.6. K562, K562-IR(+) VE K562-IR(-) HÜCRELERİNİN FENOTİPİK FARKLILIKLARININ GÖSTERİLMESİ 75
4.6.1.NK Hücreler ve Hematolojik Hücreler ile İlişkili Antikorların Değerlendirilmesi *75*
4.6.2.Transfekte Hücrelerde CD-45 ve HLA-DR Antikorlarının Değerlendirilmesi *77*
4.7. K562, K562-IR(+) VE K562-IR HÜCRELERİNİN NK-92 VE PRİMER NK HÜCRELERLE DEGRANÜLASYON SONUÇLARI 81
5. TARTIŞMA **84**
6.SONUÇ VE ÖNERİLER **90**
7.KAYNAKLAR **91**

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. KML'de onkojen ve tümör süpresör olarak bulunan bazı mikroRNA'lar . 26
Tablo 2. Araştırmanın değişkenleri 34
Tablo 3. miRNA ekspresyon analizi 35
Tablo 4. K562 hücre grupları 38
Tablo 5. Mikroarray datasına göre seçilen miRNA ekspresyon farklılıkları 47
Tablo 6. Mimik deney düzeneği 49
Tablo 7. İnhibitör deney düzeneği 50
Tablo 8. MTT deney düzeneği 52
Tablo 9. Fenotipik karakterizasyonda kullanılan antikorlar 53
Tablo 10. Degranülasyon'da kullanılan antikorlar 55
Tablo 11. Degranülasyon deney planı 56
Tablo 12. Degranülasyon deney çizelgesi 59
Tablo 13. Araştırma planı 66
Tablo 14. Mikrodizin analizine göre miRNA'ların listesi 67
Tablo 15. miRDB'ye göre 100-85 arası score aralıklarında çakışan genler 68
Tablo 16. Ekspresyonu artan miRNA'ların ekspresyonu azalan hedef genleri ve ekspresyonu azalan miRNA'ların ekspresyonu artan hedef genlerinin listelenmesi . 68
Tablo 17. Seçilen miRNA'ların tahmini hedef genlerinin biyolojik süreçlerdeki rolleri 69
Tablo 18. Excell üzerinde QPCR cihazından elde edilen ham datadan 'fold change' değerinin manuel olarak hesaplanması 70

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1 . Hematopoetik kök hücreler (6) 4
Şekil 2. BCR-ABL1 füzyon protein yapısı (9) 8
Şekil 3. BCR-ABL1 gen ve protein yapısı (3) 10
Şekil 4. BCR-ABL1 tarafından aktive edilen moleküler yolakların sistematik gösterimi (3) 11
Şekil 5. BCR-ABL'nin etki mekanizması ve imatinib tarafından engellenmesi (21) 15
Şekil 6. KML'de direnç mekanizmaları (26) 17
Şekil 7. BCR-ABL1'de sıklıkla görülen mutasyonlar (28) 18
Şekil 8. miRNA biyogenezi (38) 24
Şekil 9. NK hücre alt kümeleri (53) 29
Şekil 10. NK hücre aracılı öldürme şekilleri (54) 31
Şekil 11. K562 hücrelerinden klonal seçilim yoluyla imatinib-dirençli K562-Ir alt-klonunun elde edilmesi 37
Şekil 12. Sol taraftaki şekil 1000 V 40 Ms 4 Puls ile K562, Sağ taraftaki şekil 1200 V 10 Ms 4 Puls ile K562 Ir (+)'e GFP plazmidi transfeksiyonunun florensans mikroskobu görüntüsü (Rezolüsyon: 265um) 72
Şekil 13. K562/Negatif kontrol mimik, K562/miR-610 mimik, K562-Ir(+)/Negatif kontrol inhibitör ve K562-Ir(+)/miR-610 inhibitörün ACTB ve β-katenin western görüntüleri 75

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1. hsa-miR-376c-3p, hsa-miR-610, hsa-miR-495-3p, hsa-miR-202-3p, hsa-miR-1273h-3p ve hsa-miR-1273h-5p'nin 2^-ΔΔCt değerleri 71
Grafik 2. Kontrol K562, Kontrol K562-Ir (+), K562/negatif kontrol, K562/hsa-miR-610, K562/hsa-miR-495-3p, K562/ hsa-miR-610+ hsa-miR-495-3p, K562-Ir (+)/negatif kontrol, K562-Ir (+)/hsa-miR-1273h-3p mimiklerinin farklı saat (0.sa/24.sa/48.sa) ve dozlarda (imatinibsiz/5uM imatinib/10uM imatinib) MTT sonuçları 73
Grafik 3. Kontrol K562, Kontrol K562-Ir (+), K562-Ir(+)/negatif kontrol, K562-Ir(+)/hsa-miR-610, K562-ır(+)/hsa-miR-495-3p, K562-Ir(+)/ hsa-miR-610+ hsa-miR-495-3p, K562/negatif kontrol, K562/hsa-miR-1273h-3p inhibitörlerinin farklı saat (0.sa/24.sa/48.sa) ve dozlarda (imatinibsiz/5uM imatinib/10uM imatinib) MTT sonuçları 73
Grafik 4. K562-wt, K562-Ir(+) and K562-Ir(-) hücre gruplarının fenotipik karakterizasyonlarının karşılaştırılması 76
Grafik 5. Kontrol K562, Kontrol K562-Ir (+), K562/negatif kontrol, K562/hsa-miR-610, K562/hsa-miR-495-3p, K562/ hsa-miR-610+ hsa-miR-495-3p, K562-Ir (+)/negatif kontrol, K562-Ir (+)/hsa-miR-1273h-3p mimiklerinin CD45 ekspresyon grafikleri 78
Grafik 6. Kontrol K562, Kontrol K562-Ir (+), K562/negatif kontrol, K562/hsa-miR-610, K562/hsa-miR-495-3p, K562/ hsa-miR-610+ hsa-miR-495-3p, K562-Ir (+)/negatif kontrol, K562-Ir (+)/hsa-miR-1273h-3p mimiklerinin HLA-DR ekspresyon grafikleri 79
Grafik 7. Kontrol K562, Kontrol K562-Ir (+), K562/negatif kontrol, K562/hsa-miR-610, K562/hsa-miR-495-3p, K562/ hsa-miR-610+ hsa-miR-495-3p, K562-Ir (+)/negatif kontrol, K562-Ir (+)/hsa-miR-1273h-3p inhibitörlerinin CD45 ekspresyon grafikleri 80
Grafik 8. Kontrol K562, Kontrol K562-Ir (+), K562/negatif kontrol, K562/hsa-miR-610, K562/hsa-miR-495-3p, K562/ hsa-miR-610+ hsa-miR-495-3p, K562-Ir (+)/negatif kontrol, K562-Ir (+)/hsa-miR-1273h-3p inhibitörlerinin HLA-DR ekspresyon grafikleri 80
Grafik 9. NK92 hücrelerinin K562-WT, K562-Ir (+) ve K562-Ir (-) hücreleriyle stimülasyonu sonucu yüzeylerinde eksprese edilen CD107 ekspresyonları 81
Grafik 10. NK92 hücrelerinin K562-WT, K562-WT +1ul imatinib, K562-Ir (+), K562-Ir (+) x ima, K562-Ir (-) and K562-Ir (-) +10ul imatinib hücreleriyle stimülasyonu sonucu yüzeylerinde eksprese edilen CD107 ekspresyonları. 82
Grafik 11. 2 gün ardı ardına 3 donorden alınan NK primer hücrelerinin K562-WT, K562-WT +1ul imatinib, K562-Ir (+), K562-Ir (+) x ima, K562-Ir (-) and K562-Ir (-) +10ul imatinib hücreleriyle stimülasyonu sonucu yüzeylerinde eksprese edilen CD107 ekspresyonları. 83

SİMGELER VE KISALTMALAR

(IFN)-α	İnterferon alfa
ABL	Ableson Lösemi Virüs
ALL	Akut Lenfoid Lösemi
AML	Akut Myeloid Lösemi
AP / BP	Hızlandırılmış / Blast kriz fazı
ASCT	Allojenik Kök Hücre Transplantasyonu
ATP	Adenozin Trifosfatı
BCR	Breakpoint Cluster Region
CCyR	Tamamlanmış Sitogenetik Yanıt
CD107a/LAMP-1	Lizozomla ilişkili membran proteini-1
CHR	Tamamlanmış Hematolojik Yanıt
CP	Kronik Faz
DNA	Deoksiribonükleik Asit
ERK	Hücre Dışı Sinyalle Düzenlenen Kinaz
FDA	ABD Gıda ve İlaç İdaresi
G-CSF	Granülosit Koloni Uyarıcı Faktör
GAB2	GRB2 ile ilişkili bağlayıcı protein 2
GIST	Gastrointestinal Stroma Tümörleri
HKH	Hematopoetik Kök Hücre
IAP	Apoptoz proteinlerinin inhibitörleri
IFN-γ	İnterferon-γ
JAK-STAT	Janus Aktif Kinaz
KIR	İnhibitör Reseptör
KLL	Kronik Lenfoid Lösemi
KML	Kronik Miyeloid Lösemi
MAPK	Ras-Mitojen Aktif Protein Kinaz
MHC/HLA	Majör histo-uyumluluk kompleksi/insan lökosit antijen
miRNA	MikroRNA
MMR	Majör Moleküler Yanıt
NK	Doğal Öldürücü Hücre
OS	Genel Sağkalım
PBMNC	Periferal Kan Mononükleer Hücre
PH	Philadelphia Kromozomu
PI3K/AKT	Fosfoinositid (phosphoinositide) 3-kinase
PKB	Protein Kinaz B
PKC	Protein Kinaz C
QPCR	Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SH1/SH2	SRC homoloji domain
STAT	Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivasyonu
TKİ	Tirozin kinaz inhibitörleri
uM	Micromolar
VEGF	Anti-vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

TİROZİN KİNAZ İNHİBİTÖRLERİNE KARŞI DİRENÇ GELİŞİMİNDE ROL OYNAYAN miRNA'LARIN ARAŞTIRILMASI

Yüksek Lisans Tezi

Merve SOĞANCI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Moleküler Tıp Anabilim Dalı

ÖZET

Bu çalışma, kronik myeloid lösemi (KML) tedavisinde yaşanılan en büyük problemlerden tedavi direnci konusunda araştırma yapmak amacıyla gerçekleştirilmiş ve daha önceki çalışmalarımızda üretilen K562 dirençli alt kolon K562-Ir hücrelerinde elde ettiğimiz veriler ışığında sürdürülmüştür. Tezde de tartışılacağı gibi bu veriler göz önünde tutularak, kronik miyeloid lösemide gelişen tirozin kinaz inhibitör direncinde rol oynayabileceğini düşündüğümüz bazı miRNA'ların etkileri araştırılmıştır. mikroRNA'lar hücre proliferasyonundan ölümüne, farklılaşmadan, haberleşmeye kadar birçok süreçte yer almaktadır. Hücresel süreçlerde önemli yere sahip olan bu moleküller, organizmanın hayatını sağlıklı bir şekilde devam ettirmesi için son derece önemlidir. Bu sistemlerin başında bağışıklık sistemi gelmektedir. Buradan yola çıkarak çalışmamızda literatürden farklı olarak direnç konusunda mikroRNA (miRNA)'larla birlikte doğal öldürücü hücrelerin (NK) ilişkisi üzerinde durulmuştur.

KML'de özellikle primer ilaç direncinin gelişiminde miRNA'nın etkisinin araştırılması ile literatüre katılabilecek her türlü bilgi ve gözlem, KML tedavisinde terapötik bir hedef olma potansiyelindedir. Araştırma projemiz, primer direnç gibi KML tedavisinin önemli bir sorununa ışık tutabilecek bulgulara ulaştığı gibi genel hücre biyolojisi alanına da katkıda bulunacaktır.

Anahtar Sözcükler: Kronik myeloid lösemi, tirozin kinaz inhibitörü, mikroRNA, doğal öldürücü hücre

Tezin Sayfa Adedi: 112

Danışman: Doç.Dr. Zeynep YÜCE

INVESTIGATION OF miRNA THAT PLAYS A ROLE IN THE DEVELOPMENT OF RESISTANCE AGAINST TYROSINE KINASE INHIBITORS

Master Thesis

Merve SOGANCI

DOKUZ EYLUL UNIVERSITY HEALTH SCIENCE INSTITUTE

Department of Molecular Medicine

ABSTRACT

This study was conducted to investigate drug resistance, which is one of the biggest problems in the treatment of chronic myeloid leukemia (CML). The data we obtained in K562 resistant lower column K562-Ir cells produced in our previous studies is remarkable. As it is known, miRNAs are involved in many processes from cell proliferation to death, from differentiation to communication. These molecules, which have an important place in cellular processes, are extremely important for the organism to continue its life in a healthy way. The first of these systems is the immune system. From this point of view, in our study, unlike the literature, the relationship between microRNA (miRNA) and natural killer cells (NK) is emphasized.

All kinds of information and observations that can be added to the literature by investigating the effect of miRNA in the development of primary drug resistance in CML have the potential to be a therapeutic target in the treatment of CML. Our research project will contribute to the general field of cell biology as well as reaching findings that may shed light on an important problem in CML therapy, such as primary resistance.

Keywords: Chronic myeloid leukemia, tyrosine kinase inhibitor, microRNA, natural killer cell

Page number: 112

Advisor: Ass.Prof. Zeynep YUCE

1.GİRİŞ VE AMAÇ

1.1. Problemin Tanımı ve Önemi

Kronik Miyeloid Lösemi (KML), biyolojisi en fazla çalışılan neoplastik hastalıklardan biridir. Tedavide kullanılan imatinib, moleküler hedefe yönelik geliştirilmiş ilk ilaç olması nedeniyle kanser tedavisinde yeni bir dönem açmıştır. Tirozin kinaz inhibitörleri (TKİ) bugün KML'yi, pek çok hasta için kronik bir hastalığa dönüştürmüştür. Bu önemli başarılara rağmen ilaç direnci, bugün hala hastaların %30'unu etkileyen çok ciddi ve belki de en önemli sorundur. Sekonder direnç oluşumunda rol oynayan mekanizmaların çoğu bilinmesine rağmen hala tanımlanmamış mekanizmalar ve bazı hastalarda gelişen primer direncin altında yatan sebepler aydınlatılmamıştır. Yapılan çalışmalar, KML'de onkojenik progenitör hücrelerin lösemik kök hücrelere benzer şekilde kendini yenileme özelliği kazandıklarını ve Bcr-Abl onkoproteininden bağımsız olarak yaşamlarını sürdürebilir ve çoğalabilir olduklarını göstermiştir. TKİ'lere karşı dirençli kılan bu özelliklerin hangi biyolojik yolaklardan kaynaklandığı bugün için net değildir. Bu konu önü açık bir araştırma konusudur.

Son yıllarda yapılan çalışmalar, miRNA'ların hücrelerde çoğalma (proliferasyon), farklılaşma, stres cevabı, hücre ölümü gibi yaşamsal süreçlerde rol oynadığını göstermiştir. Belirtilen süreçlerdeki bozukluklar, kanser oluşumundaki temel mekanizmalarda iyi tanımlandığı için miRNA genlerindeki veya ifadelerindeki bozuklukların lösemiler dahil çok farklı kanser tiplerinde rolü olduğu öngörülmektedir. KML'de de pek çok miRNA çalışmaları bulunmaktadır. Ancak bu çalışmaların hiçbiri malin hücrelerde izlenen fenotipik plastisitenin neden olduğu TKI direncinin araştırılmasına yönelik değildir. Ek olarak fenotipik plastisite gösteren hücreler ile doğal bağışıklığın hücreleri olan NK hücrelerin etkileşimlerini gözlemlemek direnç konusunda farklı bir bakış açısı oluşmasına neden olacağı gibi literatüre de bu konuda yeni bilgiler kazandıracaktır.

1.2. Araştırmanın Amacı

Araştırmamızın amacı, sergiledikleri fenotipik plastisite nedeniyle TKI'lere dirençli olan K562 alt klonu K562-Ir hücrelerinde seçtiğimiz miRNA'ların izlenen dirençteki rolünü araştırmaktadır. K562-Ir, önceki çalışmalarımızda geliştirdiğimiz imatinib dirençli bir K562 alt klonudur ve bu hücreler Bcr-Abl'den bağımsız TKİ direnci göstermektedir. miRNA mikrodizin çalışmamız sonucunda K562 ve dirençli K562-Ir hücreleri arasında farklı olarak eksprese edilen miRNA'ları ortaya çıkardık. Dirençli hücrelerde izlemiş olduğumuz fenotipik değişikliklerde rolü olduğunu düşündüğümüz miRNA'ları, in silico çalışmamız sonucunda ekspresyon düzeylerindeki artış ve azalışları yüksek anlamlılık gösterenler arasından seçtik. Bu verilere dayanarak imatinib direncinde hücre morfolojisi ve farklılaşma ile ilişkilendirilen miRNA'ları seçerek gerçekleştirdiğimiz deneylerimizden elde ettiğimiz deneylerin literatüre katkı sağlayacağını öngörmekteyiz. KML'de TKI direncinin gelişiminde miRNA'nın etkisinin araştırılması ile literatüre katılabilecek her türlü bilgi ve gözlem, KML tedavisinde terapötik bir hedef olma potansiyelindedir. Çalışmalarımız temel araştırma niteliğindedir. TKI direnci gibi KML tedavisinin önemli bir sorununa ışık tutabilecek bulgulara ulaşabileceği gibi genel hücre biyolojisi alanına da katkıda bulunabileceğini inanıyoruz.

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Araştırmamızın hipotezi, miRNA gen ifadelerinde oluşan farklılıkların, TKİ'lere karşı direnç gelişimini destekleyen fenotipik değişikliklerde rol oynadığıdır. Araştırdığımız sorular:

1. Seçmiş olduğumuz miRNA'lar, mimik veya inhibitör ile muamele edildiğinde hücreler üzerindeki TKI etkisi değişir mi?

3. Bu miRNA'ların TKI direnç gelişiminde rolü varsa hangi yolaklar üzerinden etki etmektedir?

4. K562 ve K562-Ir hücrelerinin NK hücrelerle ilişkisi nedir?

5. Bu ilişkinin ilaç direnciyle bir bağlantısı olabilir mi?

6. İmmün sistemin lösemiye karşı cevabında miRNA'ların rolü var mıdır?

2. GENEL BİLGİLER

Lösemi, ilk olarak 1845 yılında sistemik bir hastalık olarak tanımlanmıştır. 1900'lü yıllara kadar lösemi, multifaktöriyel bir hastalık olarak bilinmekteydi. 100 yıldan uzun bir zaman sonra 1948 yılında, lösemi tedavisine yönelik ilk makale yayınlanmıştır (1). Lösemiler, hematopoetik hücrelerin kanserleridir. Tutulum gösteren kan hücresine ve klinik bulgulara göre pek çok farklı türleri bulunmaktadır. Genellikle kanser kemik iliğinde başlamaktadır ve kanda lösemik hücre sayılarının artışıyla karakterizedir. Bu hücreler sadece kemik iliğinde değil, aynı zamanda lenf nodları, karaciğer, dalak ve vücuttaki diğer dokulara da invaze olmaktadırlar (2). Lösemilerin sınıflandırılması periferdeki blast oranına (akut ve kronik), tutulan hücre tipine ve altta yatan/izlenen genetik mutasyonlara göre yapılmaktadır. Akut lösemilerde hastalık oldukça hızlı ilerlemekte ve periferde olgunlaşmamış hücre kompartımanı normal hücrelere oranla oldukça fazla izlenmektedir. Hastaların tedavi olmadan yaşamları aylarla sınırlıdır ve enfeksiyon belirtileri, yorgunluk, çürükler gibi tipik bulgularla ilk doktora başvurmaktadır. Kronik lösemilerde ise hastalığın seyri daha yavaş ilerlemektedir. Kronik lösemilerde hücrelerin hematopoezdeki olgunlaşma süreçleri kısmen tamamlanmış olsa da gerekli görevleri tam olarak yerine getirememektedirler. Hastalığın başlangıcında hastada hiçbir belirti gözlenmeyebilir. Fakat yüksek lökosit sayılarıyla (>10000/uL) karşılaşılmaktadır. Eğer tedavi edilmezse yaşam süreleri akut lösemiye göre daha uzundur. Akut ve kronik lösemiler, hematopoezde tutulan hücre tiplerine göre lenfoid (lenfosittik, lenfoblastik) ve myeloid (myelositik, myeloblastik) olarak iki gruba ayrılmaktadır. Böylelikle lösemileri basit bir sınıflandırma ile dört ana gruba ayırmak mümkündür (3);

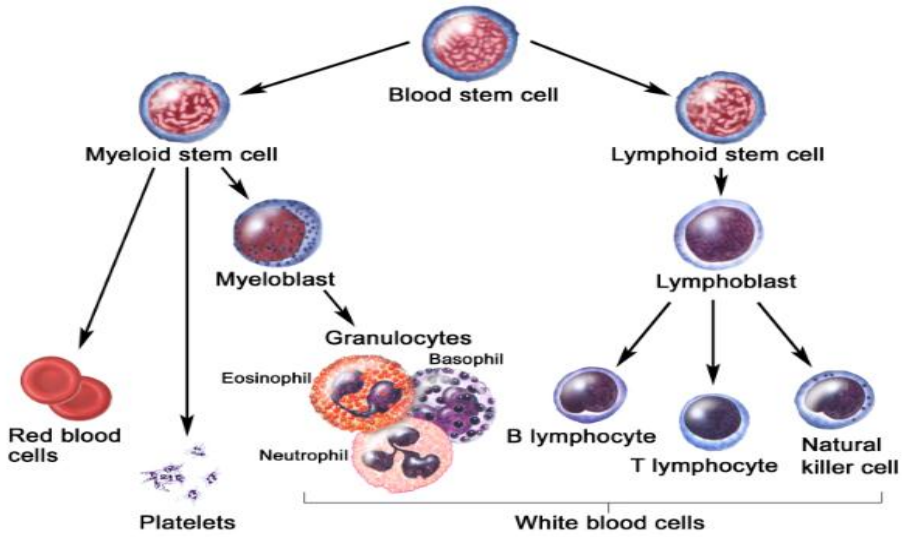
1. Akut Lenfoid Lösemi (ALL)
2. Kronik Lenfoid Lösemi (KLL)
3. Akut Myeloid Lösemi (AML)
4. Kronik Myeloid Lösemi (KML)

Kemik iliği, tüm kan hücrelerine farklılaşarak oluşturan hematopoetik kök hücreleri barındıran en önemli niştir. Çalışmamızın devamında bu konu ile ilgili

tartışmalar yer aldığından, kemik iliğinin yapısı ve hematopoetik kök hücre biyolojisinden bahsetmek gerekmektedir.

2.1. Hematopoetik Kök Hücre

Dinamik bir süreç olan hematopoez, kemik iliğindeki kök hücrelerin farklılaşması ve çoğalmasıyla birlikte hematopoetik hücrelerin meydana gelmesi olarak tanımlanır. Kan hücreleri, morfoloji ve işlevleri bakımından birbirlerinden oldukça farklı hücreler olmasına rağmen tek bir hematopoetik kök hücreden (HKH) farklılaşmaktadır. Hematopoetik kök hücreler**,** kendi kendini yenileme ve kan hücrelerinin tüm spektrumunda farklılaşabilme kabiliyetleriyle karakterize edilmektedir. Hematopoetik kök hücre, hormon, büyüme faktörleri, sitokin ve çevresel uyarılara yanıt olarak lenfoid ve myeloid öncül (progenitör) hücrelere farklılaşmaktadır. Bu hücreler, kendi serilerine ait alt hücre tiplerine farklılaşma yeteneklerine sahiptirler. Lenfoid progenitörler, B hücre, T hücre ve doğal öldürücü hücrelerine (NK) farklılaşırken, myeloid progenitörler ise eritrosit, monosit, granülosit ve megakaryositlere farklılaşmaktadır (Şekil 1). Bu farklılaşmanın kontrolü, hücre dışı matriks ve kemik iliğinde bulunan stromal hücrelerle gerçekleştirilmektedir (2,4,5).



Şekil 1 . Hematopoetik kök hücreler (6)

Kök hücre biyolojisi çalışmalarından elde edilen bilgiler, kanser çalışmalarında yeni bakış açılarının oluşmasını sağlamaktadır. Kök hücrelerinin ömür boyu kalıcı olması ve kendini yenileme kabiliyetleri nedeniyle, mutasyonları biriktirme olasılıkları yüksektir. Ayrıca kök hücreler ve malign hücreler kendi kendini yenileme yeteneği, migrasyon ve hücresel yaşlanmayı önleyen telomeraz ekspresyonları gibi çeşitli özellikleri paylaşmaktadır (7).

2.1.2. Kronik Myeloid Lösemi (KML)

KML**,** en iyi bilinen malign klonal hematopoetik kök hücre hastalığıdır. KML, tüm lösemilerin %15'ini oluşturmaktadır. 2019 yılında, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'ndeki KML verilerine baktığımızda yaklaşık 8,450 kişiye (4,970 erkek, 3,480 kadın) KML tanısı koyulmuştur. Yaş ortalaması 64'tür, hastaların %50'si 64 yaşından büyüktür ve nadiren çocuklarda da görülmektedir. 2007-2016 yıllarına göre günümüzde KML hasta sayısında %2 artış görülmektedir. Bu hastalıktan 2019 yılında 1,130 kişi (670 erkek, 460 kadın) ölmüştür. KML tanısında artış olmasına rağmen, ölüm oranında %1 oranında azalma görülmüştür. 2001 yılında imatinib tedavisine başlanılmasıyla KML mortalite oranları 1970 yıllarındaki %69'luk değerlerden, günümüzde son 5 yıla baktığımızda %22'ye gerilediği yaklaşık 3 kat arttığı görülmektedir. Ayrıca imatinib tedavisinden sonra hastaların ilk 5 yıl hayatta kalma oranları %90'lara ulaşmıştır (8).

Myeloid seri hücrelerinin aşırı çoğalması KML'nin tanısında önemlidir. Kemik iliğinde myeloid hiperplazi izlenir. Periferde sadece granülositlerin sayısı artmaz, eritrositlerin ve trombositlerin sayılarında da artış izlenir. Yaş ortalaması 53 olmasına rağmen nadiren çocuklarda da görülebilmektedir. KML'nin genel risk faktörleri; yaş, radyasyon maruziyeti ve cinsiyet (erkekler kadınlara göre daha fazla risk altındadır) olarak belirtilmiştir. Klinik şikayetler arasında yorgunluk, anoreksi, kilo kaybı görülür. Ancak hastaların %40'ı asemptomatiktir ve genelde başka bir nedenle yapılan hemogramlarda izlenen yüksek lökosit sayılarıyla yakalanırlar. Hastaların yarısında ise fiziksel anomali olarak dalak büyümesi görülmektedir. KML hastalığının

ilerleyişine baktığımızda ise kronik fazla başlayıp tedavisiz bırakıldığında yaklaşık 3-5 yıl arasında blastik faza geçiş yaptığını görmekteyiz. Blastik fazdan önce gelen kısa süreli bir akselere faz yer almaktadır. Kronik fazda olgun durumdaki KML hücrelerinin aksine, blastik krizde hücreler olgun değildir ve akut lösemideki gibi myeloblast veya lenfoblast özelliktedir (8). KML'nin klinik fazlarını detaylandıracak olursak (9):

1. Kronik faz: Birkaç yıl sürebilir, myeloid prekürsör hücrelerin kemik iliğinde, periferal kanda ve ekstramedüller bölgede birikmesiyle karakterizedir. Kan ve kemik iliğinde %10'dan az blast içermektedir. KML hastalarının %90'ı kronik fazdadır.

2. Akselere (Hızlanmış) faz: Yaklaşık 4-6 ay arası sürer, farklılaşmış hücrelerden çok progenitör/prekürsör hücrelerin artışı hastalık yükünü arttırmaktadır (11). Bu faz için tek tanım yeterli değildir. Akselere fazdaki KML hastaları kan ve kemik iliğinde %10-19 blast hücresi içermekte ve bu hücrelerde Philadelphia kromozumu dışında KML hücrelerindeki DNA hasarı ve mutasyonlardan dolayı yeni sitogenetik değişiklikler görülmektedir.

3. Blastik (blastik kriz) faz: Yalnızca birkaç ay sürer, myeloid veya lenfoid hücrelerin farklılaşmasındaki arrest sonucu blast hücre popülasyonlarının hızlı genişlemesiyle karakterizedir. Kan ve kemik iliğinde %20'den fazla blast hücresi görülür. KML hücrelerinin çoğunda Philadelphia kromozomuna ek genetik değişiklikler görülmektedir. Klinik olarak ALL veya AML'ye eş değerdir.

2.1.2.1. Kronik Myeloid Löseminin Moleküler Patofizyolojisi

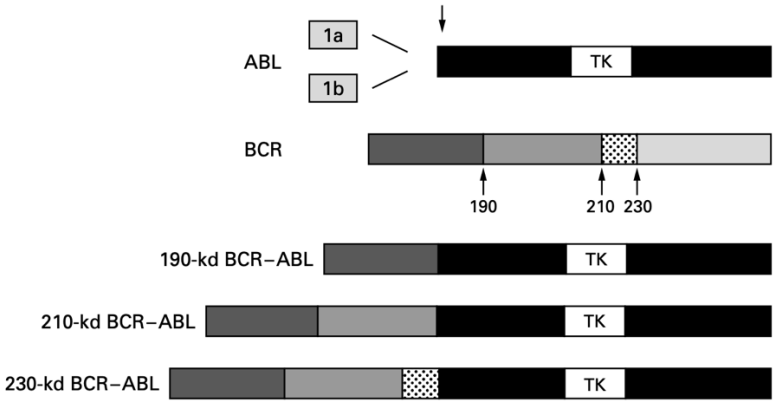
KML'nin tanısında Philadelphia (Ph) kromozomunun varlığı ayırt edici bir özelliktir. Ph kromozomu 9. ve 22. kromozomlardaki resiprokal translokasyon sonucu oluşmaktadır. Bu translokasyon sonucu artmış tirozin kinaz aktivitesine sahip BCR-ABL1 füzyon proteini meydana gelir. KML'de izlenen bu genetik mutasyon, önce 1960 (10) yılında derive ve kısalmış bir 22. kromozom, daha sonra 1973 (11) yılında 9. ve 22. kromozomun translokasyonu olarak tanımlanmıştır. Hastaların %95'inde bu

translokasyonla karşılaşılmaktadır. Ancak diğer %5'lik hasta popülasyonunda da farklı kompleks translokasyonlar sonucu 22. kromozomda BCR (breakpoint cluster region) ve 9. kromozomda ABL (Ableson leukemia virus) adı verilen BCR-ABL1 füzyon geninin oluştuğu gösterilmiştir. Ph kromozomu, myeloid, eritroit, megakaryositik ve B lenfoid hücrelerinde yani her iki hematopoetik seri hücrelerinde izlenir. Bu nedenle KML bir hematopoetik kök hücre hastalığı olarak kabul edilir. Hastalığın progresyonunda ek olarak rastgele olmayan ikincil kromozomal değişiklikler de gözlenir. Bunlardan en sık gözlenenler Ph kromozom duplikasyonu, trisomi 8 ve izokromozom 17'dir. Ayrıca tümör supresör genlerinden p16 ve p53 genlerinde mutasyonlar ve delesyonlar tespit edilmekte ve muhtemelen malign fenotipe katkıda bulunmaktadır.

Ph kromozomunun ilk oluşma mekanizması ve KML hastalığına ilerlemesi için gerekli süre bilinmemektedir. Radyasyon, bazı durumlarda rol oynayabilir. Yüksek dozda radyasyona maruz kalan kişilerde lösemi riski önemli ölçüde artış göstermektedir. İn-vitro çalışmalarda miyeloid hücre hatları yüksek dozda radyasyona maruz bırakıldığında, karakterize KML'den ayırt edilemeyen BCR-ABL1 transkript ekspresyonlarıyla karşılaşılmaktadır. Aynı zamanda, hematopoetik hücrelerdeki BCR ve ABL genlerinin yakınlığının iki gen arasındaki translokasyonu destekleyebileceği öne sürülmüştür.

t(9;22) translokasyonu sonucu oluşan BCR-ABL1 gen ürünü, artmış ve regüle edilemeyen bir tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. Bu sayede diğer sitoplazmik tirozin kinazları da aktive etmektedir. BCR-ABL1 gen ürünleri 185-230 kd arası farklı büyüklüklerde olabilir. Bu kimerik proteinlerden her biri ABL1 tirozin kinaz bölgesini aynı parçasından kodlamaktadır. Fakat N-terminal bölgesindeki BCR dizisinin uzunluğu farklılık göstermektedir (Şekil 2). Kronik faz KML hastalarının neredeyse tamamı, BCR-ABL1 proteinini 210 kd olarak eksprese etmektedir. Ph-pozitif akut lenfoblastik lösemi hastalarında 190 kd büyüklüğündeki kimerik protein görülmekte; buna bazen 210kd'lük protein de eşlik edebilmektedir. Kronik nötrofilik lösemi hastalarında 230 kd büyüklüğündeki kimerik BCR-ABL1 füzyon proteini saptanmaktadır. Bu hastaların lökosit sayıları diğer hastalardan daha düşüktür ve

hastalık progresyonu oldukça yavaştır. Farklı boyutlardaki füzyon proteinlerinin farklı klinik tablolarla korele edilebilmesi, bu proteinlerin biyolojik aktiviteleri ile ilgili araştırmalara yol açmıştır. Sonuç olarak 190-kd BCR-ABL1 proteininin tirozin kinaz aktivitesinin en yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu durum, tirozin kinaz aktivitesinin yüksekliği ile hastalığın kliniği arasında bir korelasyon olduğunu düşündürmektedir (9).



Şekil 2. BCR-ABL1 füzyon protein yapısı (9)

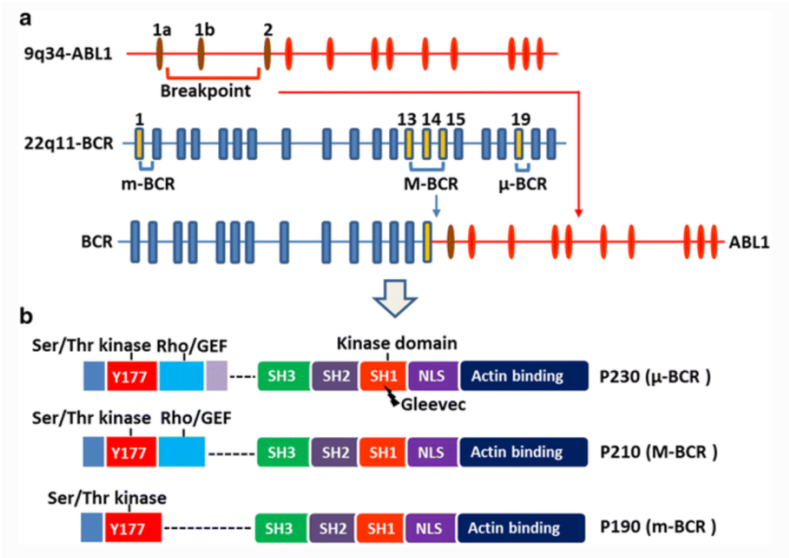
Yabanıl tip BCR-ABL1 proteinlerinin yapısı, kırılma noktaları oklarla işaretlenmiştir. Füzyon proteinlerinin boyutları, BCR dizisine göre değişiklik göstermektedir. ABL dizisinin uzunluğu her durumda aynıdır. ABL'nin 1a ve 1b olarak iki alternatif birinci ekzonu vardır. TK'lar tirozin kinaz bölgelerini göstermektedir.

2.1.2.1.1. BCR-ABL1 Füzyon Proteini

KML'de 22. kromozomun uzun kolundaki BCR geni ile 9. kromozomun uzun kolundaki ABL1 geninin, nükleer üç boyutlu yapı içerisinde birbirlerine yakın bulunmaları sonucu translokasyonun ve BCR-ABL füzyon geninin oluştuğu kabul edilmektedir (12). BCR ve ABL1 genlerindeki genomik kırılma noktaları yüksek değişkenliğe sahiptir. Ancak rekombinasyon genellikle ABL1 intron 1, BCR intron 13/14 füzyonu veya BCR ekzon 19 ile 140kb ABL1 bölgesinde ekzon 1 ve 2 arasında gerçekleşmektedir (Şekil 3a) (3). $p210^{BCR\text{-}ABL1}$ da füzyon, BCR ekzon 13 ile ABL ekzon 2 (e13a2) veya e14a2 (b2a2 ve b3a2 olarak adlandırılırlar) arasında oluşur ve majör BCR-ABL1 transcripti (M-BCR) adını alır. Her iki transcript (b2a2 ve b3a2) de

210 kDa'luk kimerik proteini eksprese eder. $p210^{BCR-ABL1}$ proteini KML'de ve bazen de ALL veya AML'de saptanır. $p190^{BCR-ABL1}$ (e1a2 transkripti) minör BCR-ABL1 transcripti (m-BCR) olarak adlandırılır ve 190 kDa'luk füzyon proteinini eksprese eder. $p190^{BCR-ABL}$ B hücre ALL (B-ALL)'de ve bazen de AML'de saptanır. Temel olarak bir akut lösemi tablosu olan blastik fazda KML'de de saptanabilmektedir. $p230^{BCR-ABL1}$ (e19a2 transkripti), mikro BCR-ABL1 (µ-BCR) transcripti olarak adlandırılır ve 230 kDa'luk füzyon proteinini kodlar. $p230^{BCR-ABL1}$ BCR geninin tamamını içerir ve kronik nötrofilik lösemi (KNL) için diagnostik olduğu düşünülmektedir.

BCR-ABL1 onkoproteini hem BCR'dan hem de ABL1'den domeynler içerir. BCR domainleri, N-terminal çift kıvrımlı domeyn (coiled coil, CC; 1-63 amino asitler), adaptör protein büyüme faktör reseptörü-bağlanma proteini 2 (GRB2) (24,25) için Ser/Thr kinaz kenetlenme bölgesi (docking site) (fosforile tirozin 177, Y177) ve Ras homoloji gen ailesi/guanin nükleotid değişim faktörleri (ras homolog gene family/Guanine nucleotide exchange factors) (Rho/GEF) kinase domeyni (298-413 aminoasitler) içermektedir. ABL1 ise, SRC homoloji domeyn (SH1/SH2), prolinden zengin domeyn, DNA ve aktin bağlama domeynlerini içermektedir. Farklı transkriptler farklı proteinler kodlamasına rağmen hibrit proteinlerin (p210/190/230) ortak özellikleri protein kinaz aktivitelerinin, yabanıl tip ABL1 ile karşılaştırıldığında artmış ve kontrollerden bağımsız olmalarıdır (Şekil 3b) (3).



Şekil 3. BCR-ABL1 gen ve protein yapısı (3)

a.BCR-ABL1 füzyon geni, 5' sonlanma ucunda BCR geni 22q11 bölgesinde ve ABL1 geni ise 3'sonlanma ucunda 9q34 bölgesinde bulunmaktadır. Kırılma noktasındaki translokasyon genellikle BCR 13 veya 14. intron bölgesinde ise majör kırılma noktası (major breakpoint, M-BCR), BCR 1. İntron bölgesinde ise minör kırılma noktası (minör breakpoint, m-BCR9) ve BCR 19.ekzonda ise µ kırılma noktası (µ-BCR) adını alır. ABL1'in kırılma noktası ise her zaman ekzon 1b ve 2b arasındadır. **b.**BCR-ABL1 proteini, Ser/Thr kinaz domaini, BCR Rho/GEF domaini ve SRC homoloji(SH) domainleri, nüklear lokalizasyon sinyali (nuclear localization signal, NLS) ve ABL1'den aktin bağlanma domaini içermektedir. SH1 kinaz domaini imatinibi hedefler. Farklı kırılma noktaları p230, p210 ve p190 isoformlarından oluşturularak gösterilmiştir.

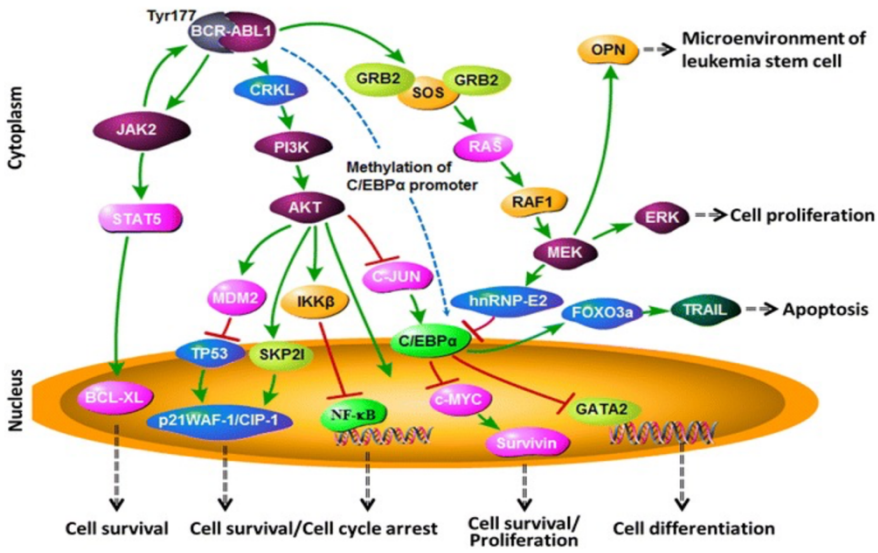
N-terminal CC domeyn ve BCR Y177, ABL1 kinase aktivasyonu için önemlidir. CC domeyni küçük moleküllerle hedeflendiğinde BCR-ABL1 tetramerizasyonunun bozulduğu, kinaz aktivitesinin düştüğü ve TKI imatinib mesilat arttığı gösterilmiştir. Böylece tetramerizasyon inhibisyonunun indüklenmesi, imatinib direncinin üstesinden gelinmesine katkıda bulunabilir. Onkoproteindeki tirozin 177 (Y177), KML'de lösemik hücre progenitörlerin genişlemesinde, çoğalmasında ve hayatta kalmasında kritik rol oynamaktadır. Bu nedenle imatinib direncinin üstesinden gelmek için potansiyel bir hedef olarak çalışılabilir.

ABL1 proteini, hematopoetik gelişim ve myeloid olgunlaşma boyunca düşüşe geçen sitoplasmik bir tirozin kinazdır. Aktivasyon ilmeklerindeki SH1 domeyninde yer alan otofosforilasyon bölgesinde, adenozin trifosfatın (ATP) konjuge olmasıyla inaktif ve aktif kinaz konformasyonu arasında bir geçiş oluşturur. İmatinib ve diğer kinaz inhibitörleri otofosforilasyon bölgesine bağlanmak için ATP'le yarışır. 'Kapalı' konformasyonda, SH2 domeyni ABL1 aktivasyonunu inhibe eder, 'açık' konformasyonda ise SH1 domeyni C-terminal bağlanma bölgesi boyunca ABL1 aktivasyonunu destekler. Daha önemlisi, ABL1'in SH3 domeynindeki N terminal miristoil modifikasyonu, SH1 domeynine (kinaz domaini) bağlanır ve SH2 ve SH3 alanlarının ona kenetlenmesine izin veren konformasyonel değişiklikleri indükler. ABL1'in (ekson 1b) miristat bağlanma bölgesi bloke edilmiş mutant formu, güçlü bir şekilde TK aktivitesini baskılar. Ayrıca, miristat bağlanma bölgesinin bloke edilmesi, farelerde lökemogenezi tamamen ortadan kaldırmış ve imatinib-dirençli BCR-ABL1 taşıyan mutantların TKI inhibisyonuna duyarlılığını arttırmıştır. Bu bulgular, ABL1'in

SH3 domaininin miristat bağlanma bölgesinin, farmakolojik müdahale için potansiyel yeni bir allosterik hedef olduğunu göstermektedir (11,13,14).

2.1.2.1.2. BCR-ABL1 ile İlişkili Sinyal Yolakları

BCR-ABL1 onkoproteini normal p145 c-Abl' e göre artmış ve deregüle tirozin kinaz aktivitesine sahiptir ve sitoplazmada baskın şekilde lokalize olmaktadır. Bu onkoproteinin ekspresyonu, hematopoetik hücre hatlarının lösemik transformasyonu ile sonuçlanmaktadır. Büyüme faktörlerine bağımlı hematopoetik hücrelerde BCR-ABL1'nin anormal ekspresyonu, büyüme faktörü bağımsızlığından sorumlu çok sayıda sinyal transdüksiyon yolunu aktive etmekte ve bu hücrelerin apoptozuna karşı duyarlılığı azalmaktadır (Şekil 4) (3).



Şekil 4. BCR-ABL1 tarafından aktive edilen moleküler yolakların sistematik gösterimi (3)

BCR-ABL1 ile ilişkili hücre yaşam sinyalleri, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması, apoptoz ve lösemik kök hücre mikroçevresi tarafından düzenlenir. *Koyu mor şekiller* kinazı; *pembe şekiller* bilinen onkoproteinleri; *mavi şekiller* bilinen tümör supressör proteinleri ve *diğer renkler* normal hücrelerden çıkan proteinleri göstermektedir. *Kırmızı çizgiler* inhibisyonu, *yeşil çizgiler* aktivasyonu göstermektedir. *Mavi kesik çizgiler*, sonuçların doğrulamalara ihtiyaç olduğunu göstermektedir. *Siyah kesik çizgiler*, sinyal yolağıyla ilişkili fonksiyonları göstermektedir. *JAK2*; janus kinaz 2, *STAT5*; sinyal dönüştürücüler ve transkripsiyon 5 aktivatörler, *BCR-XL*; B hücre lenfoma ekstra büyük, *CRKL;* Crk benzeri protein, *PI3K*; fosfotidlinositol 3-kinaz, *AKT*; protein kinaz B, *MDM2*; mouse double minute 2 homolog, *TP53*; tumor protein p53, *p21WAF-1/CIP-1*; sitosolik siklin bağımlı kinaz inhibitör p21, *SKP21;* S faz kinaz-ilişkili protein 2 inhibitör, *NF-* κB; nüklear faktör kappa-açık zincir çoğaltıcı aktive B hücreler (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), IKKβ*; Ikβ kinaz,* C/EBPα; CCAAT/ çoğaltıcı bağlanma proteini α, GATA2; GATA bağlanma proteini 2, GRB2; adaptör protein

büyüme faktör reseptörü-bağlı protein 2, SOS; son of sevenless, MEK; mitojen aktive protein kinaz, ERK; ekstrasellüler sinyal düzenleyici kinaz, hnRNP-E2; poly(rC)-bağlama protein E2, FOXO3α; forkhead box, O3, TRAIL; TNF-ilişkili apoptoz işaretleyici ligand

ABL1 proteini, nukleus ile sitoplazma arasında gedip gelir. Ancak BCR ile kimerik bir protein oluşturduğunda, sitoplazma içerisinde tutulmaktadır. BCR-ABL1'in diğer sitoplazmik moleküllerle arasındaki anormal etkileşimler, temel hücresel süreçlerin bozulmasına neden olmaktadır. Örneğin, MAPK aktivasyonu proliferasyonun artmasına yol açar, Janus aktif kinaz (JAK)-STAT yolağının aktivasyonu pek çok gen ile ilişkili transkripsiyonel aktivitenin bozulmasına neden olur ve PI3K/AKT yolağının aktivasyonu apoptozu baskılar.

BCR-ABL1'in BCR'dan gelen aminoterminal dizileri, adaptör protein GRB2'nin bağlandığı SH2 domeynini içermektedir. Bu bölgenin BCR/ABL aracılı lökomogenez için gerekli olduğu ve mutasyonun GRB2 bağlanmasını büyük ölçüde ortadan kaldırdığı ve BCR/ABL yoluyla indüklenen Ras aktivasyonunu azalttığı ortaya koyulmuştur (3). BCR-ABL1'in diğer sitoplazmik proteinleri ile etkileşimi sonucu, multiprotein sinyal kompleksleri ortaya çıkarmaktadır. Sonuç olarak bu komplekslerin oluşumu kontrolsüz hücre proliferasyonuna yol açmaktadır.

Ek olarak BCR-ABL1, hücre ölümü ile ilgili önemli hücresel süreçleri bloke etmektedir. BCR-ABL1, PI3K'yi aktive eder. PI3K aktive edildikten sonra apoptotik süreci düzenleyen aşağı yol substratların fosforilasyonu yoluyla birçok hücresel etkiye neden olur ve sonuç olarak bir yaşam faktörü olarak kabul edilen AKT kinazı etkinleştiir. Bütün bu etkileşimler sonucunda anormal klonun genişlediği ve uzun süreli hayatta kaldığı görülmektedir (11).

BCR-ABL1 sinyal yolağının hematopoetik sistem içim önemli pek çok transkripsiyon faktörünü de etkinleştirdiği gösterilmiştir. Bunlar arasında, STAT1, STAT5 ve c-Myc'de bulunmaktadır (11,14). Tüm çalışmalarda, aktive edilmiş sinyal yolakları benzersiz bir terminal noktasında birleşir. Bunlar, proliferasyon kontrolünün kaybolması ve lösemik klonun genişlemesidir. BCR-ABL1 tarafından aktive edilen yolakların listesinin sürekli genişlemesi ve bu yolaklarda ortaya çıkan karmaşıklığa

rağmen BCR-ABL1'in tüm transforme fonksiyonlarının tirozin kinaz aktivitesine bağlı olduğu görülmektedir (15).

2.1.2.4. Kronik Myeloid Lösemi Tedavisi

Kronik miyeloid lösemi, bugüne kadar kritik olarak tek bir genetik mutasyona bağlı olduğu gösterilen sınırlı sayıda kanserlerden biridir. Ph kromozomu, t (9; 22), BCR'nin düzenleyici domainleri ile ABL1'in enzimatik domainlerinin birleşmesi sonucunda anormal aktiviteye sahip bir tirozin kinaz olan BCR-ABL1 meydana getirmektedir. Bu onkoprotein, azalan apoptoz ve artan proliferasyon ile bir genomik kararsızlığa yol açmaktadır. Genomik kararsızlık, KML'nin temel özelliklerinden biridir ve TKI'lerin klinik kullanıma girmesinden önce zaman içinde oluşan ek genetik lezyonlar tedavi direnci ve hastalığın ilerlemesi ile ilişkilendirilmiştir (16). İmatinib'den önce KML'nin standart tedavisi interferon-α veya cytarabine (ara-C) ile kombinasyonu olarak yapılmaktaydı ve hastaların çoğunda hematolojik remisyon elde edilebiliyordu. Fakat major sitogenetik yanıt (< % 35 Ph+ metafaz) sadece hastaların % 6-25'inde görülüyordu. KML'nin tek tam kürü, HLA uyumlu bir donörden allojenik kök hücre naklidir. Ancak bu hastaların sadece bir kısmı için morbidite/mortalite oranları yüksek bir seçenek olabilmektedir. 90'lı yıllarda, tirozin kinazların üzerinde etkili bileşikler hakkında ilk veriler yayınlanmıştır. Tirfostin ve diğer benzer bileşiklerin, mikromolar (uM) konsantrasyonlarda ABL'yi ve ayrıca BCR-ABL tirozin kinazı inhibe ettiği, ancak sınırlı özgüllüğe sahip olduğu gösterilmiştir. Bu, daha sonra STI571 veya imatinib mesilat olarak adlandırılan bir 2-fenilaminopirimidinin ve ABL tirozin kinazına karşı seçici aktiviteye sahip daha fazla TKI'nin rasyonel tasarımına yol açmıştır.

İlk kez 2000 yılında imatinib, BCR-ABL1 tirozin kinaz inhibitörü olarak klinikte rutin olarak kullanılmaya başlanmıştır. İmatinib, akselere faz veya blastik krizde ilerleme insidansını %5-10'a düşürmüştür. Imatinib, KML'den kaynaklı ölüm riskini büyük ölçüde ortadan kaldırmıştır (17). İmatinib alan hastaların çoğunda, tam sitogenetik yanıtlar elde edilmektedir ve daha derin yanıt düzeylerini ölçmek için gerçek zamanlı kantitatif ters transkriptaz PCR (qRT-PCR) ile daha hassas izleme gerekmektedir. Tipik BCR – ABL1 transkriptleri (e13a2 ve e14a2), KML hastalarının

yaklaşık %98'inde bulunur ve bu hastalar BCR–ABL1 Uluslararası Ölçeğe göre izlenebilmektedir.

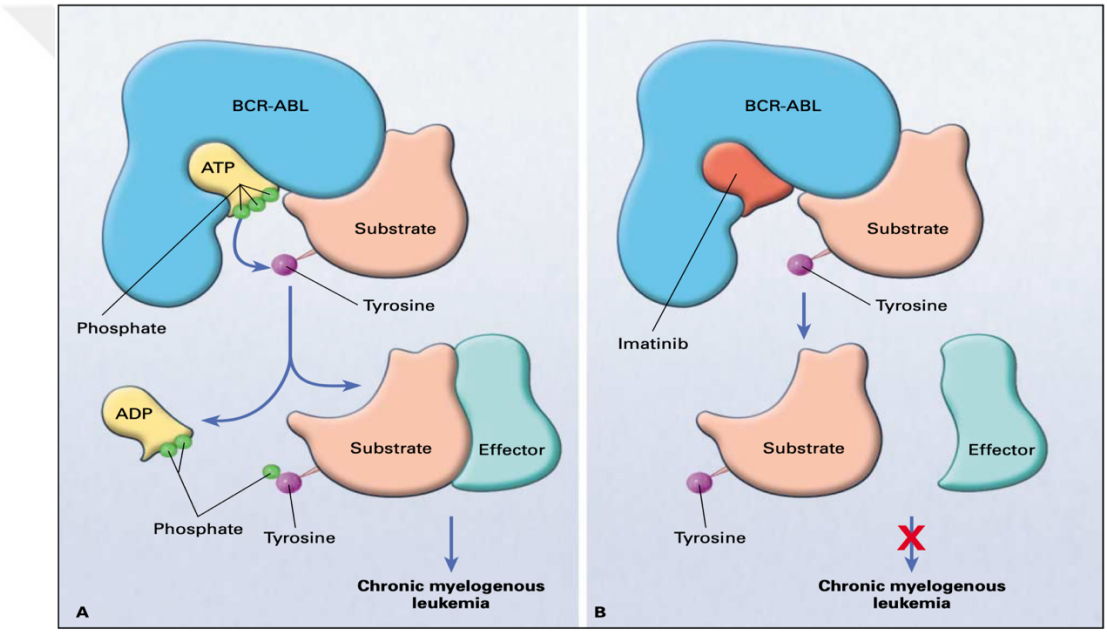
Tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib mesilatın piyasaya sürülmesiyle KML hastalarının iyileşme süreçlerinde önemli gelişmeler kaydedilmiştir. IRIS çalışmalarında (kronik fazda yeni tanı konulmuş hastalar) imatinib sayesinde yüksek oranlarda tamamlanmış hematolojik yanıt (CHR), tamamlanmış sitogenetik yanıt (CCyR) ve majör moleküler yanıt (MMR) olarak progresyonsuz sağkalım (PFS) ve toplam sağkalımda (OS; geçmiş verilerle karşılaştırma) önemli ilerlemeler görülmüştür. İmatinibden sonra, ikinci ve üçüncü nesil TKI'ler olarak dasatinib ve nilotinib geliştirilmiştir. Şu anda birçok ülkede, faz III randomize deneyler ENESTnd (nilotinibe karşı imatinib) ve DASISION (dasatinib'e karşı imatinib) sonuçlarına göre bu TKI'ler kronik faz (CP) KML'nin ilk basamak tedavisi için de onay almıştır. İkinci basamak tedavi için dasatinib ve nilotinib'e ek olarak onaylanan TKI'ler ise bosutinib ve ponatinibdir (15).

2.2. Tirozin Kinaz İnhibitörleri

Amerika'da 30'dan fazla kinaz inhibitörü kanser tedavilerinde kullanılmakta ve geliştirilmeye devam edilmektedir. 2014 yılında mevcut 16 kinaz inhibitörüne ilave olarak FDA tarafından kanser tedavileri için 2015-2019 yılları arasında 52 yeni ilaç daha onaylanmıştır. Bu alandaki çalışmalar, medikal kimya araştırmalarının en aktif alanlardan birisidir. Protein tirozin kinazlar, adenozin trifosfatı (ATP) bağlayan ve bir protein üzerindeki tirozin kalıntısının hidroksi grubuna γ-fosfatın transferini katalize eden enzim ailesinin parçasıdır. Kinaz inhibitörlerinin çoğu tirozin kinazlar (tirozin amino asidini fosforilleyen enzimler) üzerinde etkilidir. Tirozin kinaz enzimleri, gama fosfat grubunun, ATP'den protein üzerindeki tirozin artıklarına transferini desteklemektedir. Bu kimyasal reaksiyon, bir sinyal iletim mekanizması olarak işlev görmektedir. Diğer kinazlar serin veya treonin artıkları üzerinde çalışmaktadır. Onkoloji ilaçları olarak kinaz inhibitörleri, modern genetik ve hücre biyolojisinin anlaşılması sonucu geliştirilmiştir. Böylece, sağlıklı hücrelere zarar verme riskini azaltan ve tedavi başarısını artıran, spesifik kanserlerin hedefe yönelik tedavisine izin vermektedir (19,20).

2.2.1. İmatinib

İmatinib mesilat, kimyasal olarak 4- [(4-metil-1-piperazinil) metil] - N- [4-metil-3 - [[4- (3-piridinil) -2-pirimidinil] aminofenil] benzamid metansülfonat olarak tanımlanır. Moleküler formülü C29H31N7O.CH4SO3 ve bağıl moleküler kütlesi 589.7'dir. İmatinib, ATP'nin spesifik bir rekabetçi inhibitörü olarak işlev görmektedir. İmatinib, BCR-ABL kinaz domeynin inaktif formundaki ATP bağlanma bölgesine yüksek afinite ile bağlanır. ATP bağlanmasını bloke eder ve böylece fosfatın ATP'den substrat proteinleri üzerindeki tirozin kalıntılarının transferini kesintiye uğratarak kinaz aktivitesini inhibe eder (Şekil 5) (21).



Şekil 5. BCR-ABL'nin etki mekanizması ve imatinib tarafından engellenmesi (21)

Şekil A, kinaz cebinde bir adenozin trifosfat (ATP) molekülü ile BCR-ABL onkoproteinini göstermektedir. Substrat, tirozin kalıntılarından birinin fosforilasyonu ile aktive edilir. Daha sonra diğer aşağı yolak efektör moleküllerini aktive edebilir. İmatinib, kinaz cebini işgal ettiğinde (Şekil B), substratın fosforilasyonunu önleyerek BCR-ABL'in etkisini inhibe eder. ADP, adenozin difosfatı ifade etmektedir.

İmatinib, seçici olarak tüm ABL tirozin kinazları inhibe etmektedir. Bunlar; BCR-ABL, Abelson murin lösemi viral onkojen ürününün hücresel homologu (c-ABL), v-ABL, TEL-ABL ve ARG'dır. Ek olarak, trombositten türetilen büyüme faktörü

reseptörlerinin (PDGF-R) ve kök hücre faktörü reseptörünün (c-KIT; CD117) tirozin kinaz aktivitesini güçlü bir şekilde inhibe ettiği bulunmuştur (26).

IRIS çalışmalarında 5 yılı takiben, imatinib kullanan KML hastalarının yaklaşık %17'sinde direnç gelişmektedir. Kritik gözlemlerden biri dirençli hastalardan alınan örneklerde BCR-ABL1 tirozin kinaz aktivitesinin, sıklıkla geri kazanıldığının görülmesidir. Bu durum imatinibin artık hedefini engelleyemediğini ortaya çıkarmıştır (22). Daha sonraki çalışmalar, hem BCR-ABL1 kinaza bağımlı hem de bağımsız direnç mekanizmalarının meydana geldiğini göstermiş ve birincil dirençli hastalar (optimal yanıtın elde edilememesi) ile bir yanıt elde edildikten sonra nükseden hastalar arasında farklılıkların olduğu gözlemlenmiştir. İlkinde, BCR-ABL1 kinazdan bağımsız mekanizmalar baskınken, ikincisinde en az %60'ında BCR-ABL1 kinaz domeyn mutasyonları izlenmiştir (23).

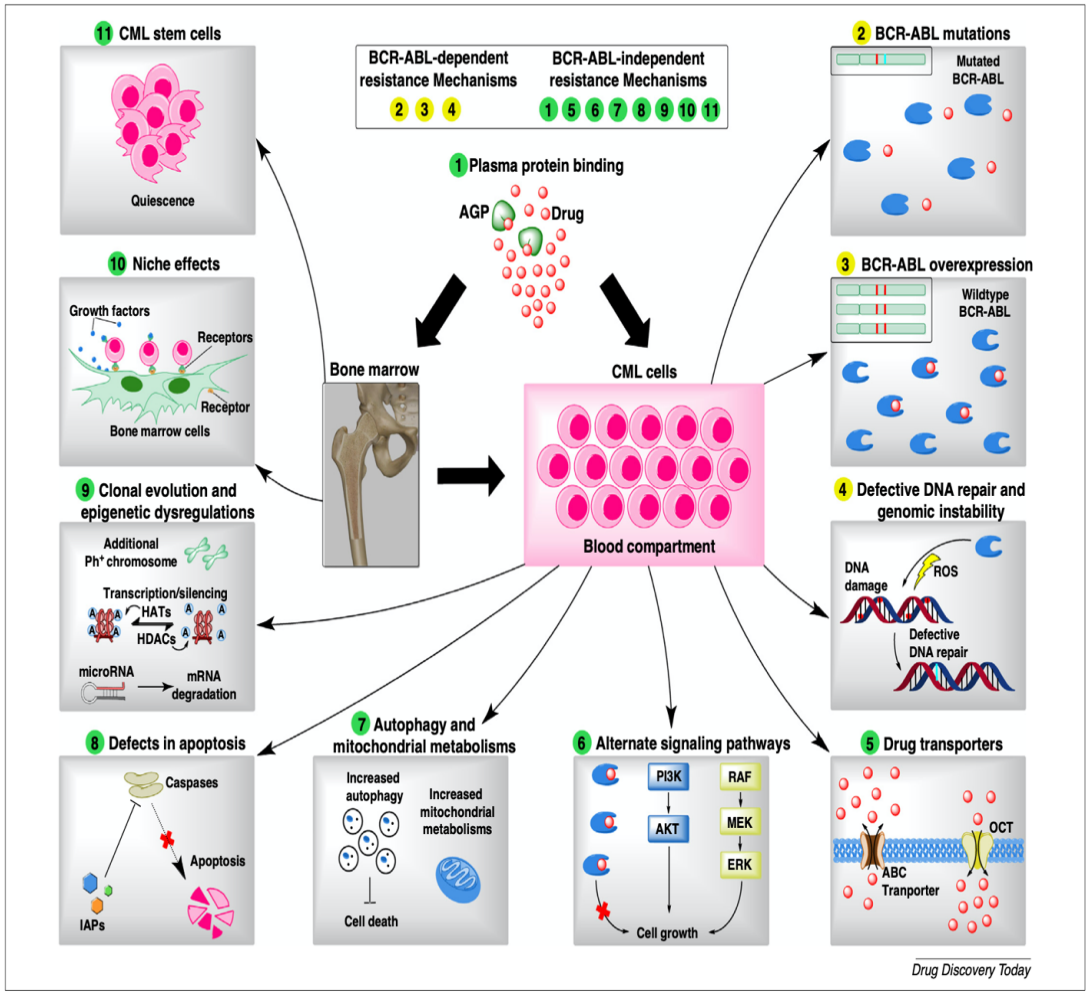
2.2.2. Kronik Myeloid Lösemi'de Tirozin Kinaz İnhibitör Direnci

Bir ilaca karşı "direnç" terimi, ilacın farmakolojik hedefine ulaşamaması nedeniyle (azalmış biyoyararlanım, in vivo inaktivasyon, diğer maddelerle olumsuz etkileşim) veya hedefin değiştirilmesine bağlı olarak kullanılmaktadır. Son birkaç yılda, 'TKİ direnci' literatürde büyük ölçüde vurgulanmış olsa da, terim daha çok klinik sonuçlara göre tedavi başarısızlıklarını vurgulamak için kullanılmaktadır. TKI direncinin kabul edilen tanımı, tedavi başarısızlığı (birincil –primer- direnç) veya elde edilen yanıtın kaybolmasıdır (edinilmiş veya ikincil –sekonder- direnç). Birincil direnç, hastaların % 2-4'ünde ortaya çıkan birincil hematolojik direnç ve hastaların % 15-25'inde ortaya çıkan sitogenetik direnç olarak alt gruplara ayrılmaktadır (24).

İmatinib, sadece inaktif durumda ABL1'e bağlanır ve ATP'ler için rekabetçi bir inhibitör görevi görür. ATP bağlanma cebine yakın konumlanan katalitik alana bağlanır, ATP'lerin yerini alır ve inaktif ATP-bağlanmayan yapıda BCR-ABL1 kinazı dondurur. Bu etkileşim, tirozin kinaz aktivitesini bloke eder ve BCR-ABL1 aracılı otofosforilasyonunu ve dolayısıyla substrat fosforilasyonunu önler (Şekil 5). Böylece aşağı sinyal yolaklarını kapatır. Klinik sonuçlara dayalı TKI'lere direnç (hastaların ~%

13'ü), hem genomik mekanizmalarla hem de BCR-ABL1'den bağımsız mekanizmalarla açıklanmaktadır. Şekil 6'da TKI direncinin olası mekanizmaları gösterilmektedir.

KML'de TKI direnci, tedavinin en önemli problemidir. Klinik tabloya baktığımızda bazı hastalarda, tedaviye yanıtsızlık veya hastalığın progresyonu görülmektedir. Bu yüzden direnç mekanizmalarının aydınlatılması son derece önemlidir.



Şekil 6. KML'de direnç mekanizmaları (26)

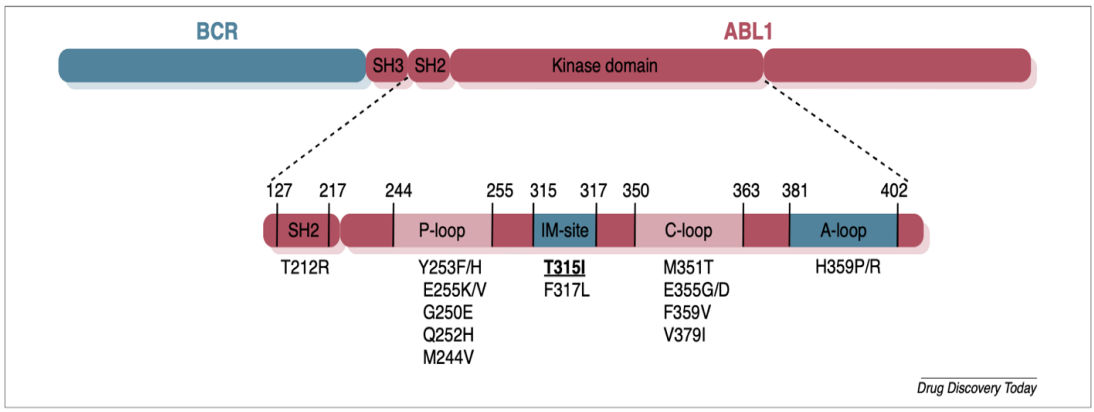
BCR-ABL bağımlı mekanizmalar sarı dairelerle gösterilmektedir: BCR-ABL mutasyonları (2), BCR-ABL aşırı ekspresyonu (3) ve kusurlu DNA onarımı ve genomik kararsızlık (4). BCR-ABL bağımsız mekanizmalar yeşil dairelerle gösterilmektedir: plazma bağlanma proteini (AGP, α1-glikoprotein) (1), ilaç taşınımı (5), alternatif sinyal yolakları (6), otofaji ve mitokondrial metabolizma (7), apoptozdaki kusurlar (apoptoz proteinlerinin inhibitörleri, IAP'ler) (8), klonal evrim ve epigenetik düzensizlik (9), niş etkileri (10) ve KML kök hücreler (11)

2.2.3. Kronik Myeloid Lösemi'de Tirozin Kinaz İnhibitörlerine Karşı Direnç Mekanizmaları (Detaylandırılmış)

BCR-ABL bağımlı mekanizmalar, BCR-ABL kinaz domeyn mutasyonları; BCR-ABL kinaz domeyni dışındaki mutasyonlar, kompleks mutasyonlar, kusurlu DNA onarım mekanizmaları ve BCR-ABL'nin amplifikasyonu ve/veya aşırı ekspresyonundan kaynaklanabilir (26,28).

2.2.3.1. BCR-ABL Kinaz Domeynindeki Mutasyonlar

ABL kinaz domeynindeki ve diğer domeynlerde kinaz yapısını kontrol eden mutasyonlar, BCR-ABL yapısını değiştirerek veya bağlanmayı tamamen engelleyerek dirence yol açar. Günümüze kadar tanımlanan 100'den fazla kinaz domeyn mutasyonu bilinen en yaygın direnç mekanizmasıdır. Bu mutasyonlar kinaz domeyninin çeşitli yapısal alt birimlerinde gözlemlenir (Şekil 7) (28).



Şekil 7. BCR-ABL1'de sıklıkla görülen mutasyonlar (28)

Şekil, her bölgede kaydedilen en yaygın mutasyonları ve yüksek dirençli T315I mutasyonu (kalın ve altı çizili) ile belirli alanları, konumlarını (amino asit) göstermektedir. SH3, SH2 (Src homoloji domainleri), P-loop (ATP-bağlama domaini), imatinib mesilat (IM) bölgesi (IM doğrudan bağlama bölgesi), C-loop (katalitik döngü) ve A-loop (aktivasyon döngüsü) gösterilmektedir.

Hastalık ilerledikçe sıklıkları artmaktadır; KML hastalarında kinaz domeyninde kronik fazda %27, akselere fazda %52 ve blastik fazda %75 oranında mutasyonlar saptanmaktadır. Ayrıca sekonder dirençte primer dirençten daha yaygın olarak

görülmektedir. Bu mutasyonlar, aşağıdaki mekanizmalar aracılığıyla TKI direncine katkıda bulunur (25):

1. TKI bağlanma bölgesinin üç boyutlu yapısını değiştirerek TKI bağlanmasına müdahale (T315I mutasyonu) etmek. Bu mutasyon imatinib, nilotinib, dasatinib ve bosutinib'e karşı oldukça dirençlidir, ancak ponatinib etkili olmaya devam etmektedir.
2. BCR-ABL1'in imatinib bağlanması için gerekli olan inaktif konformasyonu dönüşümünü önlemek veya BCR-ABL1'in aktif konformasyonunu stabilize etmek.
3. İntramoleküler etkileşimleri dengesizleştirerek konformasyonu değiştirmek.

-BCR-ABL'nin aşırı ekspresyonu: TKI dirençli KML hastalarında, BCR-ABL geninin genomik amplifikasyonu ve BCR-ABL transkriptlerinin aşırı ekspresyonu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda, IM ile tedavi edilen hastaların, BCR-ABL kopya sayısında artış ve sonucunda direnç jelişimi gösterilmiştir

-Kusurlu DNA onarım mekanizmaları ve genomik dengesizlik: DNA onarımının gerçekleştiği baz eksizyon tamiri (BER) yolu ile nokta mutasyonlarının birikiminin önlenmesinde oldukça önemlidir. KML hücrelerinde, BCR-ABL kinazın, BER yolağındaki glikosilazlardan biri olan urasil DNA glikozilaz (UNG2) aktivitesini inhibe ederek, nokta mutasyonlarının birikmesine ve ilaç direncinin kolaylaşmasına neden olduğu gösterilmiştir (27).

2.2.3.2. BCR-ABL Kinaz Alanı Dışındaki Mutasyonlar ve Diğer Direnç Mekanizmaları

İmatinib tedavisine yanıtın azalması, farmakokinetik değişkenlikle de ilişkili olabilir. Yetersiz hasta uyumu, metabolizmada görevli enzimlerin aktivitesindeki varyasyonlar (en önemlisi CYP3A4) ve ilaç-ilaç etkileşimleri de birer etkendir. BCR-ABL bağımlı TKI direnç mekanizmaları yaygın bilinmekle BCR-ABL'dan bağımsız direnç mekanizmaları da tanımlanmıştır (27) ;

-Plazma proteinlerine bağlanmadaki değişiklikler ve ilaç taşıyıcıları: Hücrenin içindeki ilacın konsantrasyonu klinik bir sonuca ulaşmak için çok önemlidir. IM alımı için gerekli bir anahtar taşıyıcı olan insan organik katyon taşıyıcı 1 (hOCT1) gibi membran giriş pompaları ve anahtar çıkış pompalarını kodlayan ATP bağlayıcı kaset (ABC) üyeleri önemli rollere sahiptir. Düşük OCT1 seviyeleri suboptimal yanıt ile ilişkilendirilmiştir. Benzer şekilde, ABC dışa aktarım taşıyıcısı P-glikoprotein (P-gp veya MDR1 proteini), aşırı ifade edildiğinde hücre içi IM seviyelerini azaltabilir ve terapötik etkinliğini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Diğer ABC taşıyıcıları (ABCA3, ABCC2 ve ABCG2) da TKI direncine katkıda bulunabilmektedir.

-Alternatif Sinyal Yolakları: KML hastalarının çoğunda CD34+ lösemik kök hücresi, interlökin-3 (IL-3) ve granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) salgılar ve bu da STAT5 fosforilasyonunun artışı ile sonuçlanır. Artan GM-CSF seviyeleri JAK2/STAT5 yolunun aktivasyonu nedeniyle KML hücrelerini imatinibe karşı korumaktadır. Herhangi bir BCR-ABL mutasyonundan bağımsız olarak IM direnci sergileyen KML hastalarında GM-CSF seviyeleri yükselmiştir. Ek olarak PI3K/Akt/mTor sinyal yolağının, SRC ailesi kinazların ve Wnt/β-katenin yolağının aşırı aktivasyonları da direnç oluşumuna katkıda bulunabilir.

- Hücre Ölümünün Baskılanması: Apoptoz proteinlerinin inhibitörleri (IAP'ler) TKI'lere bağlı gelişen apoptozu inhibe edebilmektedir. TKI'ye dirençli KML hücre hatlarında IAP'lerin down regülasyonu belgelenmiştir.

-Klonal evrim ve epigenetik düzensizlik: Ph + hücrelerindeki ek kromozomal anormallikler genellikle akselere fazdaki hastaların %30'unda ve blastik krizdeki hastaların %80'inde tespit edilmektedir. Sık bildirilen klonal anomaliler: ikinci bir Ph kromozomu, trizomi 8 ve kromozom 17 anomalileridir. Bu anomaliler imatinibin etkisini azaltmaya katkıda bulunmaktadır.

-Epigenetik mekanizmalar: DNA metilasyonu, histon modifikasyonları ve kodlamayan (nc) RNA'lar gibi epigenetik modifikasyonlarla düzenlenen gen ekspresyonundaki değişiklikler de KML'de ilaç direncine katkıda bulunabilir. Proliferasyonu, farklılaşmayı, hücre döngüsü regülasyonunu, DNA onarımını ve apoptoz indüksiyonunu etkileyen çok sayıda genin hiper ve hipometilasyonu rapor edilmiştir.

-Niş etkisi: Stromal hücreler tarafından salgılanan sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri ile birlikte kemik iliği stromasındaki çeşitli reseptörlerin aracılık ettiği hücre-hücre teması da ilaç direncine katkıda bulunabilir.

-Kronik myeloid lösemi kök hücreleri: KML lösemik kök hücreleri (LSC'ler), TKI'lere doğası gereği dirençli olduğu saptanan nadir bir popülasyondur. Hastalığın nüksetmesini ve ilerlemesine neden olan anahtar bir popülasyondur. Güçlü kanıtlar, LSC'lerin, hayatta kalmak için BCR-ABL kinaz aktivitesine bağımlı olmamaları, ve yüksek derecede genetik kararsızlık dahil olmak üzere TKI direncini temelini oluşturan pek çok özelliğe sahip olduğunu göstermektedir (26,28).

Bcr-Abl bağımsız yolaklar aslında tüm kanser çeşitlerinde direnç gelişiminde rol oynamaktadır. Bir diğer direnç oluşum mekanizması da fenotipik esneklik (plastisite) dir. Önceki çalışmamızda, geliştirmiş olduğumuz dirençli K562 alt klonu K562-Ir, imatinib dirençli K562 alt klonudur ve hücreler BCR-ABL'den bağımsız TKİ direnci göstermektedir. K562-Ir hücreleri, atasal K562 hücrelerinden daha yavaş prolifere olmaktadır. Ayrıca bu hücrelerin imatinib'e olduğu kadar 2. ve 3. nesil TKİ'lere de dirençli olduklarını ve hücre/doku/organ diferansiyasyonunda görevli bazı gen ekspresyonlarının yeniden düzenlendiğini gösterdik (29). Atasal K562 hücrelerinin uzun süre imatinib baskısı sonucunda elde edilen alt klonda, gen ekspresyon paterni değişmiş ve köken aldıkları süspanse atasal hücrelerden morfolojik olarak farklılaşmıştır. Dirençli K562-Ir hücreleri adheren özellik göstermekte ve köken aldıkları atasal hücrelerden farklı olarak monolayer halinde üreyebilmektedir (29). Çalışmamızda seçmiş olduğumuz miRNA'lar, bu K562 ve K562-Ir hücre hatlarından elde edilen mikroarray verisinden yola çıkarak özellikle imatinib direncinde hücre morfolojisi ve farklılaşma ile ilişkilendirilen miRNA'lardır.

2.3. RNA

Ribonükleik asit (RNA), fosfat gruplarının bağlandığı riboz şeker halkalarından oluşmuş doğrusal bir nükleik asit polimeridir. Her şeker, yan grup olarak kendisine bağlı dört "baz" adenin, sitozin, guanin ve urasilden (A, C, G ve U) birinden oluşmaktadır. Fosfat grupları, bir ribozun 5' karbon ucuna diğeri 3' karbon ucuna bağlanır. Bu durum, omurganın tek yönlü olmasını sağlar. RNA (ribonükleik asit) ve DNA (deoksiribonükleik asit) arasında küçük kimyasal farklılıklar bulunmaktadır. Ribozda bulunan OH gruplarından biri, deoksiribozda bulunan H ile yer değiştirir. Böylece DNA, urasil (U) yerine timin (T) bazları içermektedir. Fakat RNA'nın yapısı DNA'dan oldukça farklıdır. Bazı RNA'lar ise iyi tanımlanmış üçüncül yapılardan oluşmaktadır. Eskiden RNA'nın sadece DNA ve proteinler arasında aracılık görevi yaptığı kabul görmüştür. Ancak günümüzde çok farklı RNA molekülleri çok sayıda işleve sahiptir ve çok yönlü bir molekül olarak kabul görmektedir (30).

2.3.1. MikroRNA (miRNA)

Biyoloji biliminde son yirmi yılda elde edilen en önemli başarılardan biri, RNA interferansın (RNAi) keşfidir. RNA interferans hücrelerde transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunu düzenleyen bir süreçtir. 2006 yılında Dr. Andrew Fire ve Dr. Craig C. Mello, RNAi interferansı konusundaki çalışmaları sayesinde Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülü'nü almıştır (31).

MikroRNA (miRNA)'ların, 1993 yılında Lee ve arkadaşları tarafından nematod olan *Caenorhabditis elegans*'da keşfedilmesiyle küçük RNA biyolojisindeki gelişmeler, genetik düzenlenme süreçlerinin yeniden yorumlanmasına neden olmuştur (32). Bu organizmalarda LIN-14 proteininin downregülasyonunun, birinci larva aşaması L1'den L2'ye geçebilmesi için gerekli olduğu vebunun da lin-4 adı verilen ikinci bir genin transkripsiyonuna bağlı olduğu bulunmuştur. Burada dikkat çeken, lin-4 geninin bir proteine çevrilmemesi. Lin-4, 21 ve 61 nükleotid uzunluğunda 2 küçük RNA molekülü kodlamaktadır. Bu kısa RNA moleküllerinin LIN-14 geninin 3'UTR'de komplementer olduğu çok sayıda bölgeler keşfedilmiştir. Bu bölgelere bağlanma, LIN-14 mRNA seviyelerini önemli derecede değişikliğe uğratmadan lin-14 protein ekspresyonunu azaltmıştır (33). Bu kısa RNA'lar lin'14 proteininin

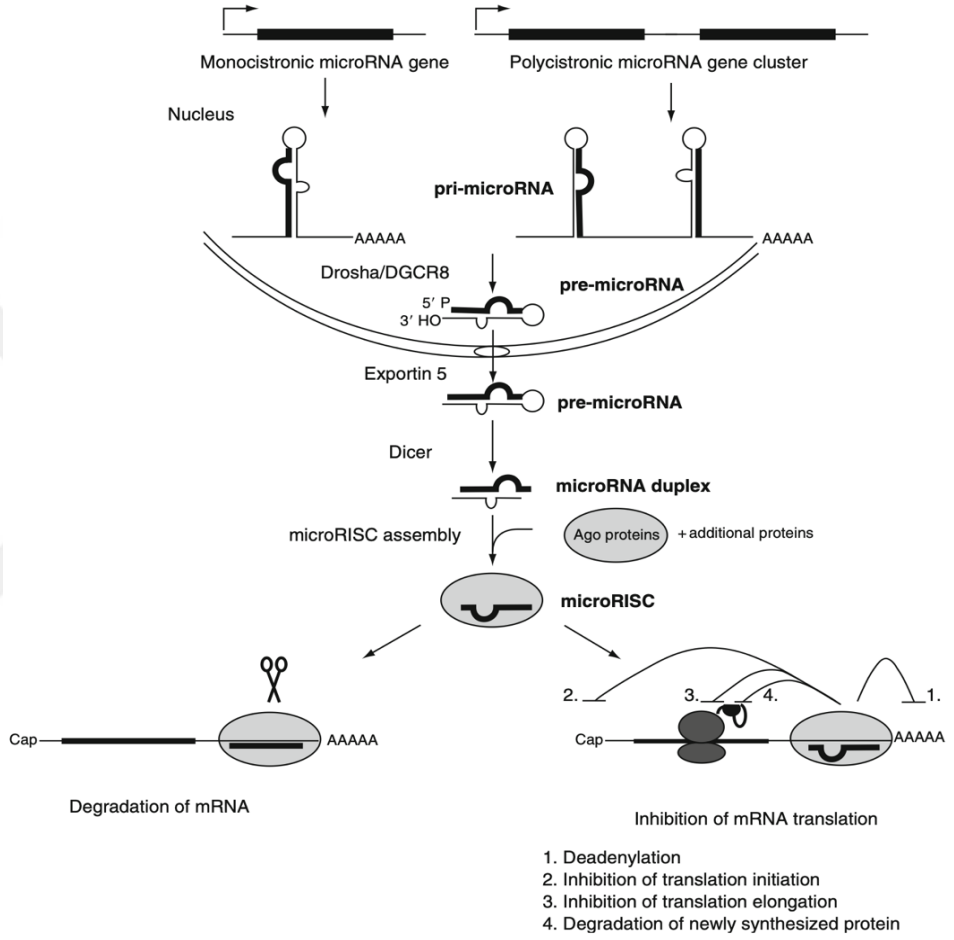
translasyonel baskılanmasına ve *C.elegans*'ın gelişimi sırasında L1'den L2'ye geçmesine neden olmuştur (34). Bu durumun sadece *C.elegans*'a özgü olduğu düşünülürken, 2000 yılında küçük bir RNA olan let-7'nin, *C.elegans*'ın larva evresinden yetişkinliğe geçebilmesi için gerekli olduğu keşfedilmiş ve bu genin homologları, insan dahil diğer organizmalarda da bulunmuştur (31). MikroRNA'lar adı verilen bu küçük protein kodlamayan RNA'lar, 19-24 nükleotid uzunluğunda, stem-loop veya geri katlamalı yapıya sahip daha uzun bir öncüden türetilen yapılardır (34,35). Birçoğu, türler arası evrimsel olarak korunmuş olup, hücre tipine özgül eksprese olmaktadır.

MikroRNA'lar (miRNA), tüm insan genomonun %3'ünü oluşturmaktadır. Genellikle ekprese olan mRNA^ların 3'UTR bölgelerine baz eşleştirmesi yoluyla bağlanarak gen ekspresyonunu negatif olarak düzenlemektedir (36). Bir miRNA'nın hedef mRNA'ya bağlanması tipik olarak translasyonel baskılamaya yol açmaktadır. miRNA'ların, proliferasyon, farklılaşma, hayatta kalma ve apoptozda temel rollere sahip olması, tümörogenezde oldukça önemli olabileceklerini düşündürmüştür. Yapılan çalışmalarda, miRNA profillerinin birçok kanserde değişiklik gösterdiği ve bazı miRNA'ların aşırı ekspresyonunun tümörlere yol açabileceği gösterilmiştir (37).

2.3.1.1. MikroRNA'ların Moleküler Mekanizması

miRNA biyogenezi Şekil 8'de verilmiştir. Memeli mikroRNA'ları monosistronik veya polisistronik transkripsiyon birimleri olarak kodlanmaktadır (38). RNA Polimeraz II tarafından uzun birincil transkriptler (pri-mikroRNA'lar) olarak kopyalanmaktadırlar. miRNA'ların birincil transkriptleri, saç tokası yapısı ve üç spiral dönüşlü bir şekle sahiptir. DGCR8 ve RNase III Drosha tarafından (mikroprekürsör kompleks) kesilmeleriyle 60 nükleotidlik pre-mikroRNA hairpin yapıları oluşur. Pre-miRNA hairpin yapıları, exportin 5 aracılığıyla çekirdekten sitoplazmaya geçer. Sitoplazmaya geçen pre-miRNA'lar RNase III enzim Dicer tarafından işlenir. Dicer tarafından kesim işlemi gerçekleşerek, 22nt uzunluğunda olgun miRNA'lar oluşur. Kılavuz mikroRNA (kalın gösterilmiştir), Argonaute (AGO) ve ek proteinler içeren bir mikro RISC kompleksinde bir araya getirilir. Transkripsiyonun baskılanması miRNA'nın hedef mRNA'ya bağlanarak, mRNA'nın yıkımına yol açmasıyla

gerçekleşir. Ya da mRNA'yla tam bir baz eşleşmesi gerçekleşmezse, en az dört mekanizma ile translasyonun inhibisyonuna neden olur. Bu mekanizmalar; deadenilasyon, translasyonun başlaması aşamasında baskılama, translasyonun uzaması aşamasında baskılama ve yeni sentez edilen proteinin degrede olmasıdır (38). MikroRNA'ların ekspresyonunu düzenleyen faktörler, hala araştırılmaktadır (39).



Şekil 8. miRNA biyogenezi (38)

miRNA'ların sıklıkla insan solid ve hematolojik kanserlerinde deregüle oldukları gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda bazı miRNA'ların normal insan hematopoezinde rol oynadığı gösterilmiş; bu miRNA'lar, hematopoetik farklılaşmanın 'ince ayarlayıcıları' olarak nitelendirilmiştir (40). Bu tezde, yaptığımız biyoinformatik profilleme sonucunda seçmiş olduğumuz miRNA'ların hematopoetik hücrelerdeki rolü araştırılmıştır.

2.3.1.2. MikroRNA’ların Kronik Myeloid Lösemi ile İlişkisi

miRNA’ların ekspresyon paterni dokulara, hücre tiplerine ve gelişim aşamalarına göre farklılık göstermektedir. Kanser hücrelerini destekleyen süreçleri teşvik edenler oncomiR'ler olarak; onkojenlerin ekspresyonunu baskılayanlar tümör baskılayıcı miR'ler olarak adlandırılır (41). miRNA'ların anormal ekspresyonu, diğer tümörlerde olduğu gibi KML’de de bildirilmiştir. miRNA'lar potansiyel düzenleyiciler oldukları için, sadece BCR-ABL1 sinyal yolağında değil, aynı zamanda ilaç direncinin kazanılmasında da rol oynayabilmektedir. Ek olarak, ilaç taşınmasında yer alan genlerin ekspresyonunu ve temel sinyal yolaklarının aktivasyonunu da modüle ettiği bildirilmiştir (42). Ayrıca miRNA ekspresyonu, yalnızca neoplazi gelişimi sırasında değil, aynı zamanda hastalığın ilerlemesinde veya tedaviye yanıtta hücresel düzeydeki değişiklikleri yansıtan dinamik bir süreçtir (42). Literatürde KML’de miRNA ile ilişkili birçok çalışma bulunmaktadır. Aşağıdaki Tablo 1’de KML’de onkojen ve tümör süpresör olarak bulunan bazı mikroRNA’lara yer verilmiştir (43).

Tabloda da görülebileceği gibi miRNA’lar hücre proliferasyonundan hücre ölümüne farklılaşmadan haberleşmeye tüm hücresel süreçlerin regülasyonunda rol oynamaktadır. Hücresel süreçlerin kontrolünde yer alan bu moleküller organizmanın çevresiyle uyum içerisinde yaşamını sürdürecek sistemleri sağlıklı çalışmasında önemli rol oynar. Bu tür sistemlerin başında bağışıklık sistemi gelir.

Tablo 1. KML'de onkojen ve tümör süpresör olarak bulunan bazı mikroRNA'lar

Onkogen miRNA	Hedef Gen	Mekanizmalar
miR-17–92	A20 (TNFAIP3)	CML hücrelerinde NF - κB sinyal yolağının düzenlenmesi.
miR-301a	TIMP2	Proliferasyonu teşvik etmesi ve apoptozu inhibe etmesi.
miR-362–5p	GADD45α	Proliferasyon ve hücre apoptozunu inhibe etmesi.
miR-424	BCR–ABL	Proliferasyon ve hücre apoptozunu inhibe etmesi.
miR-99a	CTDSPL and TRIB2	Proliferasyon ve hücre apoptozunu inhibe etmesi.
Tümör Süpresör miRNA		
miR-7	ABL1, PI3K, and AKT	Apoptoz.
miR-570	IRS1, IRS2	Hücre proliferasyonunun baskılanması, artan apoptozis ve azalmış glukoz metabolizması.
miR-186	ROCK1	Hücre proliferasyonu, EMT, göç.
miR-15a-5p	CXCL10	Hücre proliferasyonunun inhibe edilmesi, metastaz ve KML hücrelerinin apoptozunun teşvik edilmesi.
miR-150	EIF4B, FOXO4B, PRKCA, TET3	Küçük molekül metabolizması, transkripsiyonel düzenleme, RNA metabolizması, kanserde proteoglikan sentezi, mTOR sinyal yolağı veya Wnt sinyal yolağı.
miR-139-5p	Brg1	Proliferasyonun ve farklılaşma faaliyetlerinin düzenlenmesi.
miR-143	BCR-ABL	BCR-ABL'yi downregüle ederek K562 hücre apoptozunu indüklenmesi.
miR-219	XIAP	MiR-219'un downregülasyonu, XIAP'nin upregülasyonuyla sonuçlanmasıyla lösemi hücrelerinin hayatta kalmasının desteklenmesi.
miR-130a	RECK	Hücre apoptozundaki artış, RECK'in downregülasyonuna ve kaspaz-3'ün aktivasyonuna neden olması.
miR-130a	BCL-2, MCL-1, XIAP	Apoptoz
miR-708	IKKβ	NF - κB sinyalini baskılaması.
miR-186	DDX43	Hücresel proliferasyonun inhibe edilmesi ve artan apoptoz.
miR-29a and miR-29b	Bcl-2, Mcl-1	Antiapoptoz.
miR-23a	BCR/ABL	Hedef sinyal yolağı olarak; BCR / ABL / PI3K / Akt / MMP - 9.
miR-143	DNMT3A	Hücre proliferasyonunun inhibe edilmesi ve apoptozun indüklenmesi.
miR-30a	BCR-ABL1, ABL1	Proliferasyonun azalması ve hücre döngüsü sürecinde G1 ile S fazları arasında durdurulması.
miR-181a	RalA	Büyüme inhibisyonu ve apoptoz.

2.4. Bağışıklık Sistemi

Bağışıklık sistemi, enfeksiyon ajanlarına karşı vücudu savunmada özel rollere sahip hücre ve moleküllerden oluşan bir organizasyon olarak tanımlanmaktadır. Temelde iki farklı savunma şekli vardır; doğal bağışıklık ve edinilmiş (uyarlanabilir) bağışıklık. Doğal bağışıklık yanıt, fagositik hücreler (nötrofiller, monositler ve makrofajlar), serbest kalan enflamatuar mediatörler (bazofiller, mast hücreleri ve eozinofiller) ve doğal öldürücü hücreler aracılığıyla oluşmaktadır. Edinilmiş bağışıklık, T lenfositleri ve B lenfositleri aracılığıyla antijene özgü reaksiyonlardan oluşur. Doğal bağışık yanıt hızlıdır, ancak bazen özgüllük eksikliği nedeniyle normal dokulara zarar verebilir. Edinilmiş yanıt özgüldür, ancak gelişmesi birkaç gün veya hafta sürebilir. Edinilmiş bağışık yanıtın hafızası vardır. Bu nedenle aynı antijene tekrar maruz kalındığında daha güçlü ve hızlı bir yanıt gerçekleşir. Doğal ve edinilen bağışıklığın, genellikle patojenleri ortadan kaldırmak için birlikte çalışırlar (44,45).

2.4.1. Doğal Öldürücü (NK) Hücreler

Doğal öldürücü hücreler, ilk kez 1975 yılında tanımlanan doğal bağışık yanıtın bir parçası olan lenfosit kökenli hücrelerdir ve periferik kan mononükleer hücrelerin yaklaşık %10-20'sini oluşturur. Diğer somatik hücrelerin yüzeylerindeki MHC sınıf I moleküllerinin ve hücre stres belirteçlerinin anormal ekspresyonunu izleyerek mikroorganizmalara ve tümör hücrelerine karşı immün yanıt oluştururlar. NK hücrelerinin çoğu periferik kanda, lenf düğümlerinde, dalakta ve kemik iliğinde yerleşim gösterir fakat farklı kemoatraktanlar tarafından enfeksiyon bölgelerine doğru göç edebilmektedirler. NK hücreleri, herhangi bir aktivasyona ihtiyaç duymadan hedef hücreleri lizis ile öldürebilmektedir (46,47).

NK hücrelerinin, T hücreleriyle birlikte geliştiği kabul edilmektedir. Çünkü bu lenfositlerin her ikisinin işlevi de konvansiyonel ve konvansiyonel olmayan MHC moleküllerinin tanınmasına odaklanmaktadır. Bu bağlamda NK hücreleri, kendilerini fagositlerden (makrofaj ve granülosit) ayırmaktadır. Fonksiyonel MHC molekülleri,

kıkırdaklı balıklarda bulunur, ancak daha ilkel türlerde bulunmamaktadır. Aynı şekilde, NK hücreleri balıktan daha ilkel türlerde tanımlanmamıştır. Bu nedenle NK hücreleri, nesil ilişkilerine, reseptör repertuarına ve efektör işlevlerine dayanarak doğal ve edinsel bağışıklık sistemlerini köprüleyen bir geçiş hücre tipi gibi kabul edilir (48).

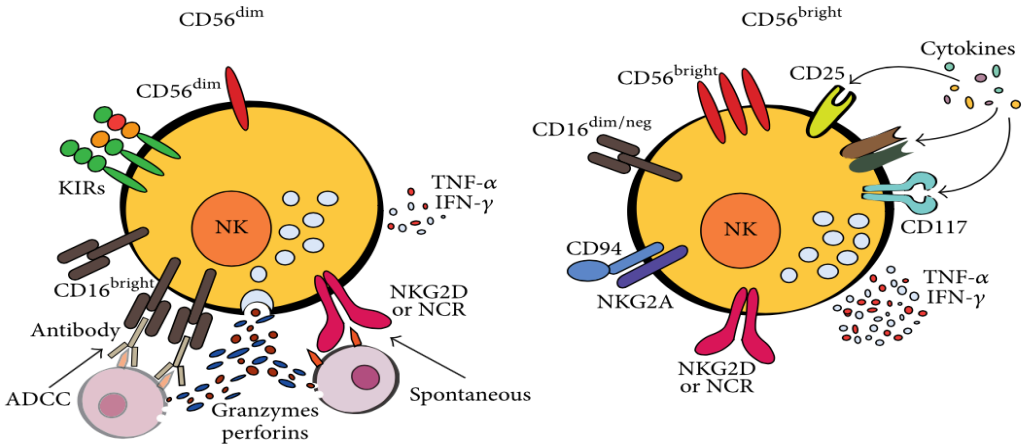
T hücrelerinin aksine NK hücreleri, hücrelerden gelen aktive edici ve inhibe edici sinyallere hızlı tepki verebilmektedir. Hücre yüzey reseptörleri, NK hücrelerin aktivasyonunu, proliferasyonunu ve efektör fonksiyonlarını kontrol etmektedir. (55,56). Yapılan birçok çalışma NK hücrelerinin KML, AML ve MDS'de güçlü anti-tümör aktivite sergileyebileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, lösemik hücrelerdeki bazı mekanizmalar NK hücrelerin işlevlerini baskılayarak hastalığın ilerlemesine yol açabilir (32,49).

NK hücrelerin hedef hücreyi tanıması, NK hücre yüzey reseptörleri aracılığıyla gerçekleşir (50). Olgun NK hücreleri hızlı yanıt verebilme yönleriyle de naif T hücrelerinden farklıdır. NK hücrelerini "kullanıma hazır" olarak nitelendirebiliriz. Granzim ve perforin eksprese ederler. Litik tepkileri, transkripsiyon, translasyon veya hücre proliferasyonu gerektirmeden dakikalar içinde tetiklenebilir. NK hücrelerinin aktivasyonuyla birlikte ilk olarak hızlı bir şekilde IFN-γ üretimi başlamaktadır (58). Özetle, NK hücrelerinin, naif T hücrelerindeki gibi proliferasyona, sitokin genlerinin kromatin yeniden düzenlenmesine, granzim ve perforinin de novo transkripsiyonuna veya translasyonuna ihtiyaçları yoktur. Bu bağlamda, 'dinlenme' halindeki NK hücrelerin fenotipi, hücre yüzeyi reseptörleri ve efektör moleküllerinin ekspresyonu açısından bir efektör CD8+ T hücresine benzer. Aslında birçok NK reseptörü, CD8+ T hücrelerinde (ve bazı CD4+ T hücrelerinde) yalnızca efektör veya bellek hücrelerine dönüştürüldüklerinde eksprese edilir (51).

2.4.1.1. Doğal Öldürücü (NK) Hücre Fonksiyonları

İnsan NK hücreler, $CD3^{-}CD56^{+}$ fenotipine sahip lenfositlerdir. CD16 ve CD56 ekspresyonlarının farklı düzeylerde eksprese edilmesiyle ($CD56^{dim}CD16^{bright}$ ve $CD56^{bright}CD16^{dim/neg}$) iki ana alt kümeye ayrılmaktadırlar. Her iki NK popülasyonu

hem sitotoksiteye aracılık etmekte hem de sitokin salgılamaktadırlar. NK hücreler, periferik kanda %90 oranında $CD56^{dim}CD16^{bright}$ fenotipinde bulunur. $CD56^{bright}$ NK hücrelerde, CD56 ve CD94/NKG2A antijenleri yüksek düzeyde eksprese edilmektedir. İşlevsel olarak yüksek oranda sitokinler, interferon-γ (IFN-γ) ve tümör nekroz faktör-α (TNF-α) salgılarlar (52,53). $CD56^{dim}CD16^{bright}$ ve $CD56^{bright}CD16^{dim/neg}$ NK hücrelerinin inhibe edici ve aktive edici NK hücre reseptörleri birbirinden farklıdır (Şekil 9) (53). Hedef hücreyi tanıma bu NK hücreler üzerindeki inhibitör ve aktivatör reseptörlerle kontrol edilmektedir. İnhibitör reseptörler olan KIR ve CD94/NKG2A, klasik ve klasik olmayan MHC sınıf I molekülleri aracılığıyla tetiklenir ve hedef hücre ölümünü önleyen negatif sinyaller iletir. Buna karşın CD16 (FcgRIII), NK hücre proteini 30 (NKp30), NKp44, NKp46, DNAM-1 ve NKG2D gibi aktive edici reseptörler, NK hücrelerini aktive edici sinyaller vermektedir (53).



Şekil 9. NK hücre alt kümeleri (53)

İnsan NK hücrelerinin çoğu, periferal kanda $CD56^{dim}CD16^{bright}$ alt grubuna aittir. 'Sitokin üreticileri' olan $CD56^{bright}$ NK hücreleri ise ikincil lenfoid dokularda bol miktarda bulunmaktadır. Reseptör ekspresyonunda ve uyaranlara yanıtta bazı farklılıklar dikkat çekmektedir. Özellikle, CD16 ekspresyon seviyesi, antikora bağımlı hücre sitotoksik (ADCC) mekanizması farklılıklar gösterir.

NK hücreleri, bazı mekanizmalarla hedef tümör hücrelerini doğrudan öldürmektedir. Birincisi, perforin ve granzimler içeren sitoplazmik granülleri serbest bırakarak, kaspaz bağımlı ve bağımsız yollarla tümör-hücre apoptozuna neden olurlar. İkincisi, ölüm reseptörü aracılı apoptoz ile gerçekleşmektedir. Bazı NK hücreleri, FasL

veya TNF ile ilişkili apoptoz indükleyen ligand (TRAIL) gibi TNF ailesi üyelerini eksprese etmektedir. Aktive olan NK hücreleri tarafından üretilen TNF-α aynı zamanda tümör hücre apoptozunu da indükler. Üçüncüsü, IFN-γ gibi çeşitli efektör molekülleri salgılarlar. Dördüncüsü de CD16 eksprese ederek ADCC yoluyla tümör hücrelerini yok etmektedir. NK hücrelerinin antitümör aktivitesi, IL-2, IL-12, IL-18, IL-15 gibi sitokin stimülasyonu ile daha da artırılabilir (54).

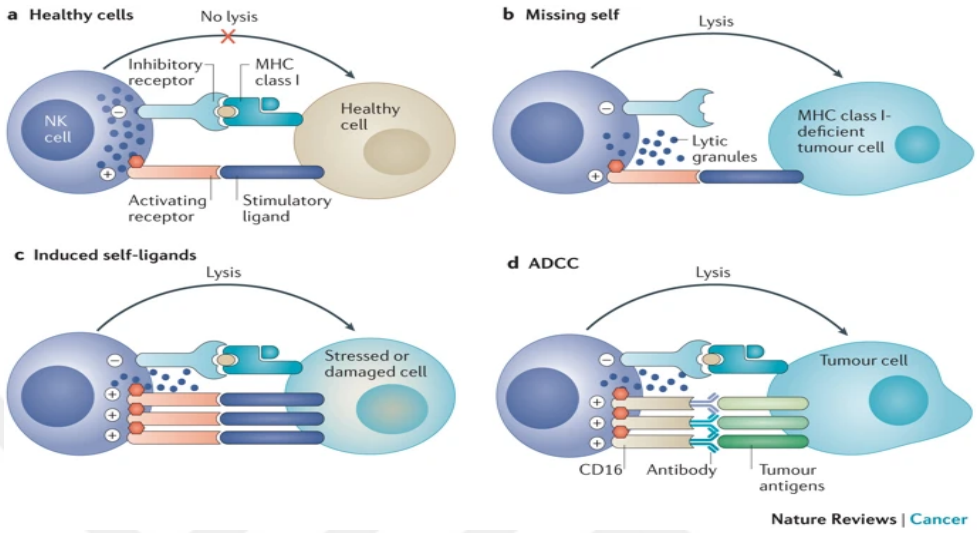
2.4.1.2. Doğal Öldürücü Hücre Reseptörleri

Aktive edici reseptörler arasında doğal sitotoksisite reseptörleri (NCR'ler); NKp46, NKp30 ve NKp44, C tipi lektin reseptörlerinden CD94/NKG2C, NKG2D, NKG2E/H ve NKG2F ve KIR reseptörlerinden KIR-2DS ve KIR-3DS bulunmaktadır. İnhibitör reseptörlere ise yine C tipi lektin reseptörlerinden CD94/NKG2A/B ve KIR reseptörlerinden KIR-2DL ve KIR-3DL örnek verilebilir (55)

NK hücreleri, B ve T hücrelerine göre daha kompleks bir yapıya sahiptir. NK hücrelerinin işlevleri herhangi bir reseptör tarafından düzenlenmek yerine, T hücrelerinde "adhezyon molekülleri" veya "kostimülatör reseptörler" olarak adlandırılan reseptörlerden gelen çok sayıda sinyalin entegrasyonu ile regüle edilir. Ayrıca NK hücrelerin aktivasyonu, sağlıklı hücrelere zarar vermeyecek şekilde inhibitör reseptörler tarafından kontrol edilmektedir (53).

Hemen hemen tüm hücre tiplerinde bulunan çeşitli MHC-I moleküllerine bağlanan inhibitör reseptörler (KIR'ler ve CD94/NKG2A/B) sağlıklı hücrelere karşı gelişebilecek NK hücre aktivasyonunu inhibe etmektedir (Şekil 10a) (48,54-56). NK hücreleri, sağlıklı hücrelerin öldürülmesini önlemek için inhibitör reseptörleri kullanırken, enfekte olmuş veya tümör hücrelerine karşı bağışıklık tepkisi başlatmak için güçlü aktive edici sinyallere ihtiyaç duyar. Bunun için NK hücreleri efektör fonksiyonlarını tetikleyebilen çok sayıda reseptöre sahiptir. NKG2D (CD314/KLRK1), NCR'ler, DNAM1 (CD226) ve CD16, kansere karşı immün yanıtlarda rol oynayan en iyi karakterize edilmiş NK hücre reseptörleridir. Stres koşulları altındaki hücreler MHCI ekspresyonunu düşürerek NK hücrelerinin NK

hücrelerinin aktivatör reseptörleri organizmaya yabancı olan molekülleri tanımaktadırlar (48,53,56)



Şekil 10. NK hücre aracılı öldürme şekilleri (54)

2.4.1.3. Doğal Öldürücü Hücrelerin Kronik Myeloid Lösemi ile İlişkisi

NK hücreleri, lösemilerde tümör hücrelerine ve malign hücrelere karşı sitotoksik aktivite göstermektedir. KML hastalarında NK hücrelerinin sayısının ve işlevinin kronik fazdan blast krizine ilerlemesi sırasında kademeli olarak azaldığı bildirilmiştir. Blastik faz KML hastalarından yeni izole edilmiş NK hücreleri azalmış sitotoksisiteye sahiptir. NK hücrelerinin anti-lösemik etkisi, KML hastalarında nispeten düşük düzeyde bulunmuştur (53,56).

NK hücre reseptörü NKG2D, malign hücreler üzerindeki ligandları tanımasının ardından NK hücrelerinin sitotoksisitesini uyarmaktadır. Ancak lösemi hücrelerinde bir klasik olmayan bir MHC1 molekülü olan MICA eksprese edilir. MICA ligandı, tüm lösemi hücrelerinde eksprese edilir. Bu ligand, bağışıklık yanıt ve anti-tümör aktivitesi ile bağlantılıdır. NKG2D'nin negatif modülasyonunu indükler ve tümör hücresinin NK hücre ölümünden kaçmasını kolaylaştırır. Azalan NKG2D

ekspresyonu KML hastalarında tanımlanmıştır (57,58). NK hücreleri, tümör hücrelerini doğrudan parçalama ve sonraki adaptif bağışıklık yanıtlarını şekillendiren IFN- γ gibi sitokinler üretme yeteneklerinden dolayı malignitelerin immun sürveyansında önemli bir rol oynamaktadır (59, 60). Hem doğal bağışıklık hem de edinilmiş bağışıklık hücreleri, immun sürveyans adı verilen süreçte neoplastik gelişimi aktif olarak engellemektedir. Bağışıklık sisteminin gücünden yararlanarak malignitelere karşı güçlü bir aktif veya pasif antitümör yanıtı indüklemek için tasarlanmış tedaviler günümüzde geliştirilmektedir. NK hücre biyolojisi alanındaki ilerlemeler ve NK işlevinin anlaşılmasıyla birlikte, NK hücreleri güçlü bir kanser immünoterapi aracı umut vaat etmektedir (54,61)

Tezimde immün sistemin lösemiye karşı cevabında miRNA'ların rolü olup olmadığı ve fenotipik plastisite nedeniyle direnç oluşturan hücrelerin miRNA ve doğal bağışıklık hücreleriyle ilişkisi üzerine yaptığım çalışmalar aşağıda sunulmuştur.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırmamızın tipi deneysel çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma, literatür taraması ile 15 Temmuz 2018 tarihinde başlamış olup; 30 Haziran 2021 tarihinde tez savunması ile sonlanmıştır. İn-silico çalışma, miRNA'ların konfirmasyonu ve transfeksiyon deneyleri Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Doç.Dr. Zeynep Yüce'nin laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Fenotipik karakterizasyon ve degranülasyon deneyleri, İsveç Karolinska Enstitüsü Hematoloji ve Rejeneratif Tıp Merkezi (HERM) Hücre ve Gen Terapi Grubu Doç.Dr.Evren Alici'nin laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Araştırmamız K562 hücre hatları (Atasal K562, K562-Ir(+) ve K562-Ir(-)) ve NK hücre hatlarında (NK-92 ve primer NK hücre) gerçekleştirilmiştir.

3.4. Çalışma Materyali

Araştırmada kullanılan hücre hatları; K562, ticari olarak satılan insan kronik myeloid lösemi hücre hattı ve NK-92, ticari olarak satılan insan doğal öldürücü hücre hattıdır**.** Araştırmada K562 hücre hattı, bu hücre hattından imatinib baskısı altında klonal seçilimle elde edilmiş K562-Ir hücre hattı, NK-92 hücre hattı ve sağlıklı insandan izole edilen primer NK hücreler kullanılmıştır. miRNA ekspresyon düzeyleri, miRNA mimik ve inhibitör deneyleri K562 hücre gruplarında incelenmiştir. Degranülasyon deneyleri ise K562 hücre grupları ile NK-92 / primer NK arasında gerçekleştirilmiştir.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmada kullanılan kontrol grupları ve degişkenler Tablo 2'de gösterilmektedir.

Tablo 2. Araştırmanın değişkenleri

Kontrol Grupları	Deneysel Gruplar	Değişkenler
K562	-K562/K562-Ir(+) -K562/K562-Ir(-)	var/yok imatinib
K562/miRNA ekspresyonu	-K562/miRNA mimik ekspresyonu -K562/miRNA inhibitör ekspresyonu	miRNA primer kontrolleri
K562-Ir(+)/miRNA ekspresyonu	-K562-Ir(+)/miRNA mimik ekspresyonu -K562-Ir(+)/miRNA inhibitör ekspresyonu	-Mimik negatif kontrol -İnhibitör negatif kontrol -Transfeksiyon sonrası inkübasyon süreleri
Negatif Kontrol: Unstimuled	-NK hücre/K562 -NK hücre/K562-Ir(+) -NK hücre/K562-Ir(-)	Fluorescence minus one (FMO)kontroller
Pozitif Kontrol: PMA/İonomycin	-NK hücre/K562 -NK hücre/K562-Ir(+) -NK hücre/K562-Ir(-)	Fluorescence minus one (FMO)kontroller

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. BİYOİNFORMATİK ANALİZ

3.6.1.1. miRNA Mikrodizin Analizi

miRNA 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 edilmiştir. 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 gerçekleştirilmiştir. Bu ön işlemden sonra algılama filtresinden (p değeri <0.01) geçen problar değerlendirilmeye alınmıştır. Prob anotasyonları lumi tarafından nuID kullanılarak dönüştürülmüştür. Gruplar arasında farklı eksprese edilen genler, LIMMA (Mikroarray Verileri İçin Lineer Modeller) kullanılarak tanımlanmıştır. Bir

gen, FDR ile ayarlanmış p-değeri 0.05'ten düşük olduğunda, LIMMA tarafından "farklı eksprese olan" olarak ifade edilmektedir. Farklı olarak eksprese edilen genler kat-farkı (fold change) ile tekrar filtrelenmiştir (Tablo 3).



Tablo 3. miRNA ekspresyon analizi

K562 ve K562-Ir hücrelerinin fold change değerleri karşılaştırılarak tablolar oluşturulmuş ve farklı veri tabanları kullanılarak miRNA'lar seçilmiştir. Bulgular kısmında yapmış olduğumuz in-silico çalışmanın sonuçlarına yer verilmiştir.

3.6.2.HÜCRE HATTI VE HÜCRE KÜLTÜRÜ

3.6.2.1. K562 Hücre hattı

K562, 1970 yılında KML blastik döneminde olan 53 yaşındaki bir kadın hastanın plevral sıvısından elde edilmiş ilk ölümsüz daimî myelositik hücre hattıdır. Hücreler, yuvarlak, düzgün yüzeyli, 20um çapında ve süspanse (yüzeye tutunmayan) özelliktedir. Lenfositik belirteçlere sahip değillerdir. Differansiye olmamış eritrosit ve

granülositlerle proteomik benzerlik göstermektedirler. Hücrelerin erken evrede granülosit, eritrosit ve monositlere dönüşme yetenekleri vardır. İkilenme süresi yaklaşık olarak 12-24 saattir.

Gereçler :

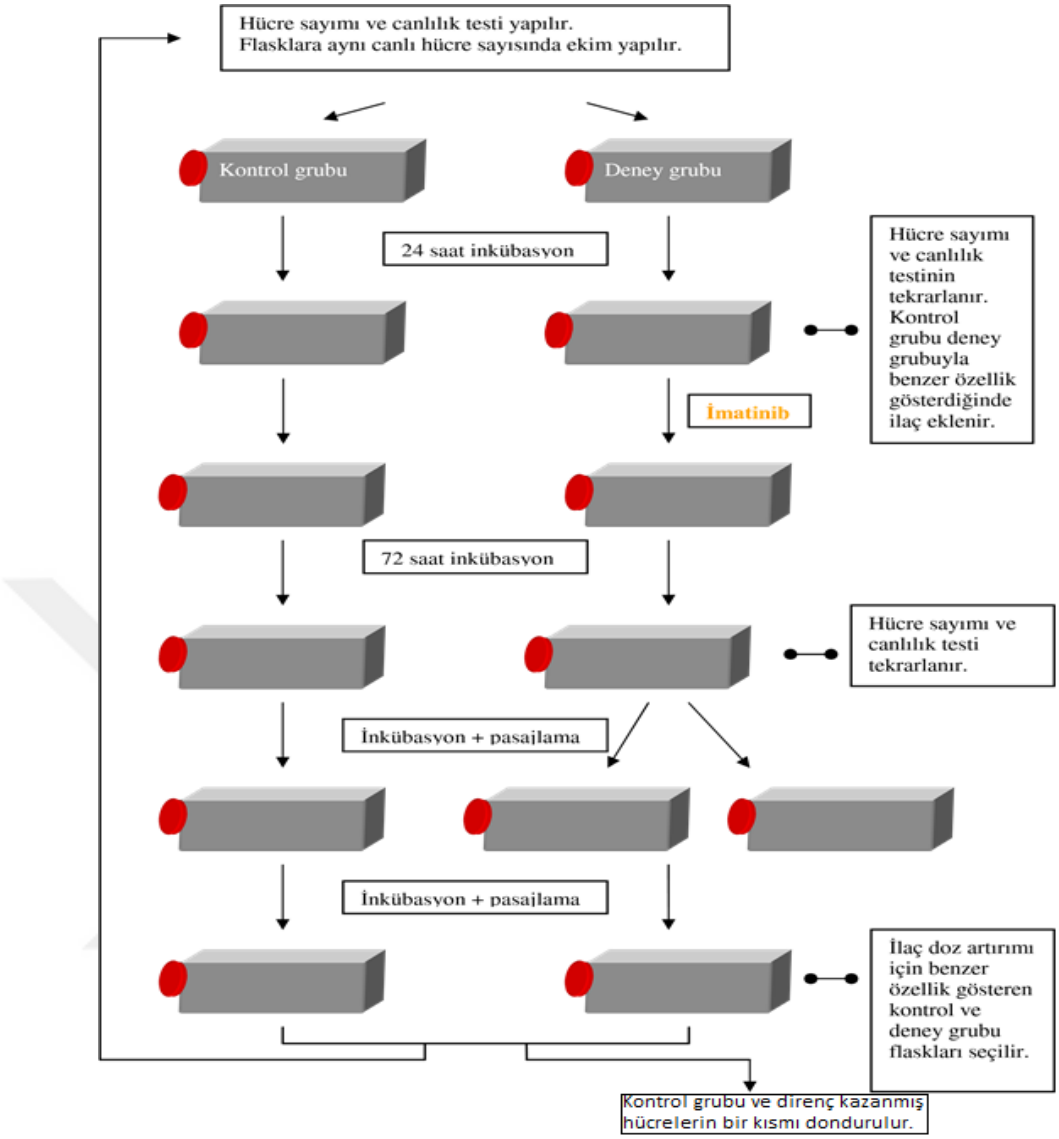
1. Pipet pompası (Greiner Labortechnik 000424NS – 9)
2. İnverted faz kontrast ışık mikroskobu (Nikon – Diaphot 200)
3. 10 ml'lik ve 5 ml'lik steril pipetler
4. 25 cm2' lik filtreli flasklar
5. CO2' li inkübatör
6. RPMI 1640 besi ortamı (Biochrom).
7. L-glutamin
8. FBS (Fetal bovine serum)
9. Penisilin/streptomisin

Besi Ortamı Hazırlanması : 1X 500 ml.' RPMI besi ortamı içerisine %10 oranında 50ul FBS ve %1 oranında 5ul penisilin/streptomisin eklendi. Gerektiğinde kullanmak üzere +4 Cº de saklandı.

Hücreler 37Cº CO2'li inkübatörde inkübe edildi. 2-3 günde bir hücre yoğunluğuna göre 1/2 veya 1/3 oranında pasajlama yapıldı.

3.6.2.2. K-562-Ir Hücre hattı

K562-Ir hücre hattı, Dr.Seda Baykal Köse'nin doktora tezinde ürettiği hücrelerden elde edilmiştir. K562 hücre hattını, artan mikromolar(µM) dozlarda imatinibe maruz bırakarak hücrelerin direnç kazanmasını sağlamıştır (Şekil 11) ((29). Sırasıyla 0,1 µM – 0,2 µM – 0,4 µM – 0,8 µM – 1,2 µM - 2 µM - 4µM – 8 µM doz uygulanmıştır. K562-Ir hücrelerinin idamesi 10µM imatinib içeren RPMI tam ortam ile yapılmıştır.



Şekil 11. K562 hücrelerinden klonal seçilim yoluyla imatinib-dirençli K562-Ir alt-klonunun elde edilmesi

2 yıl boyunca imatinib baskısı altında direnç geliştiren bu hücrelerin, atasal K562 hücrelerinden oldukça farklı fenotipik özellikler sergiledikleri, hücre ekspresyon paternlerinin değiştiği ve imatinibten bağımsız olarak in vitro tümör oluşturma kapasitesi ve lösemik kök hücre özellikleri taşıdıkları saptanmıştır. Dirençli K562-Ir hücreleri adheren özellik göstermekte ve köken aldıkları atasal hücrelerden farklı olarak monolayer halinde üreyebilmektedir. Bu alt klonun tümör oluşturma potansiyelini değerlendirme amacıyla üç boyutlu hücre kültüründe tümör sferoid oluşturma potansiyelleri incelenerek, atasal K562 hücrelerinin aksine K562-Ir hücrelerinin imatinib varlığı/yokluğundan bağımsız olarak sferoid oluşturabildiği

gösterilmiştir. Deneylerde K562-Ir (-) olarak geçen hücreler ise dirençli fakat imatinibli ortamda büyütülmeyen hücrelerdir. K562-Ir (+) hücrelerinin 1 ay boyunca imatinibsiz bırakılmasıyla elde edilmiştir.

Besi Ortamı Hazırlanması: 1X 500 ml.' RPMI 1640 besi ortamı içerisine %10 oranında 50ul FBS ve %1 oranında 5ul penisilin/streptomisin eklendi. Gerektiğinde kullanmak üzere +4 Cº de saklandı. Tezimizde, miRNA'ların artan ve azalan ekspresyon farklılıklarını değerlendirmek amacıyla K562, K562-Ir(+) ve K562-Ir(-) hücre hattında 3 farklı grup oluşturuldu (Tablo 4). K562 hücreleri için 2-3 günde bir hücre yoğunluğuna göre 1/2 veya 1/3 oranında pasajlama yapıldı. K562-Ir(+) hücreleri için ortama 10µM son konsantrasyonunda imatinib eklendi. K562-Ir(-) hücrelerine imatinib eklenmedi, sadece ortam yoğunluğuna göre pasajlama yapıldı. Hücreler 37Cº CO2'li inkübatörde inkübe edildi.

Tablo 4. K562 hücre grupları

Atasal	**RC (Continuous exposure) Devamlı**	**RD (Discontinuous exposure) Aralıklı**
K562	K562-Ir (+ ima)	K562-Ir (- ima)

3.6.2.3. NK Hücre Hattı

NK-92 hücreleri, hızla ilerleyen Hodgkin olmayan lenfomalı 50 yaşındaki bir erkek hastadan alınan periferal kan mononükleer hücrelerinden türetilen, interlökin-2 (IL-2) bağımlı bir NK hücre hattıdır. Parental hücreler, partikül aracılı gen transferi aracılığıyla retroviral MFG-hIL-2 vektörü, insan IL-2 cDNA ile transfekte edilmiştir. Transfeksiyon stabildir. Süspanse hücrelerdir. Primer NK hücreleri, sağlıklı donörlerden periferal kan mononükleer hücrelerinden (PBMNC) elde edilmiştir. 3 donörün birincil NK hücreleri, iki gün üst üste toplanmıştır.

Besi Ortamı Hazırlanması : 1X 500 ml.'GMP Kök Hücre Büyüme Ortamı (SCGM) içerisine %20 oranında 100ul NHI-FBS (ısıyla inaktivasyonlu fetal sığır serumu) ve 500µ/ml oranında IL-2 eklendi. Gerektiğinde kullanmak üzere +4 Cº de saklandı.

Hücreler 37Cº CO2'li inkübatörde inkübe edildi. 2-3 günde bir hücre yoğunluğuna göre 1/2 veya 1/3 oranında pasajlama yapıldı.

3.6.2.4. Hücre Sayımı

Hücre hatlarının pasajlanması, miRNA izolasyonu ve degranülasyon deneylerini gerçekleştirebilmek için hücrelerin belirli sayı aralığında olması gerekmektedir. Bu yüzden hücre süspansiyonu tripan mavisi ile karıştırılır ve mikroskopta boyayı alıp almama durumuna göre değerlendirilmektedir. Canlı hücrelerin membran bütünlüğüne sahip olması nedeniyle tripan mavisini hücre içine almazlar fakat ölü hücrelerin membran bütünlüğü bozulduğu için hücreler boyayı geçirmektedir. Canlı hücreler parlak ve temiz bir sitoplazmaya sahipken, ölü hücreler maviye boyanarak mavi sitoplazmalı olarak görülmektedir.

Hücre kültürü çalışmalarında tripan mavisi ile boyama ve hemositometre (Neubeur ya da Thoma lamı), altın standart olarak kabul edilmektedir. Lamların üzerinde sayım yapılan 9 adet büyük kare içerisindeki hücreler tek tek sayılarak ortalaması alınıp formül yardımıyla da 1 ml'deki hücre sayıları hesaplanmaktadır.

Gereçler :

1. 100ul hücre süspansiyonu
2. 100ul tripan mavisi %0,5 (Biological Industries – Lot 420488)
3. Neubauer lamı (Marienfeld – Ref 0610110, Lot 409104)
4. 20'lik ve 1000'lik pipet (eppendorf 273747, 1854995) ve pipet ucu (Greiner bio –
   one FT 20 E, G)
5. Mikrosantrifüj tüpü
6. İnverted faz kontrast ışık mikroskobu (Nikon – Diaphot 200)

Yöntem :

1. Hücre kültürü yapılan hücre gruplarından 100ul örnek alındı.
2. Örnek 100ul (1:1 oranında) tripan mavisi ile karıştırıldı.
3. Neubauer lamının kenarlarına 1'er damla su damlatılıp üzerine lamel kapatıldı.

4. Lamel ile lam arasındaki boşluktan 10µl tripan mavisi hücre karışımından eklendi.
5. İnverted ışık mikroskobunda 4X'te ayarlanıp 10X objektifte sayım yapıldı.
6. Canlı hücreler mavi boyayı almamış, boyayı alanlar ise ölü olarak değerlendirildi.
7. **''Hücre Sayısı** = ortalama hücre sayısı X seyreltme faktörü X 10^4'' olarak hesaplandı ve seyreltme faktörü 2 alındı.
8. Canlı hücre sayısının toplam hücre sayısına oranı hesaplanarak canlılık yüzdesi hesaplandı.

3.6.3.miRNA EKSPRESYON DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

3.6.3.1. miRNA İzolasyonu

QIAGEN miRNeasy Mini Kit (50) (Lot No. 433157649) kullanarak ve kitin önerdiği protokol takip edilerek miRNA'ların izolasyonunu sağlayan total RNA ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Gereçler :

- QIAGEN miRNeasy Mini Kit

-Buffer RWT
-Buffer RPE
-Nuclease free water
-Toplama tüpleri

- Ependorf
- Trizol
- Kloroform
- %100 etanol
- Santrifüj
- Vorteks
- Çeker ocak

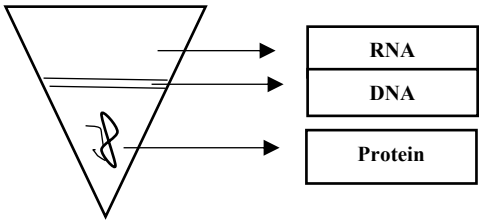
- Thermo Fischer/Multiskan spektrofotometre cihazı
- K562, K562-Ir(+) ve K562-Ir(-) hücreler

Yöntem :

1. K562, K562-Ir(+) ve K562-Ir(-) hücre hatlarından $6x10^6$ hücre sayılıp, falkonlara koyuldu.
2. 300g'de 5dk santrifüj edildi.
3. Supernatant atıldı.
4. Peletin üzerine 700ul TRİZOL eklendi.
5. 1dk vortekslendi ve insülin iğnesiyle al-ver yapıldı.
6. 5dk oda sıcaklığında bekletildi.
7. Üzerine 140ul Kloroform eklendi ve 15sn kuvvetli bir şekilde çalkalandı (Faz ayrımı gözlendi.).
8. Oda sıcaklığında 2-3dk bekletildi.

*Bu aşamaya kadar tüm basamaklar çeker ocakta yapıldı.

9. 4ºC 12,000g'de 15dk santifüj edildi.



10. Üst faz (450ul) RNA toplama tüpüne aktarıldı.
11. Üzerine 1,5 kat hacim (675ul) %100 etanol eklendi ve hafifçe pipetaj yapıldı (Santrifüj yapılmaz !).
12. RNA + %100 etanol = 1125ul, kolondan max 700ul geçtiği için önce 700ul eklenip 14000 rpm 20sn santrifüj edildi ve alt tüp atıldı.
13. Filtrenin altına yeni tüp koyulup kalan 425ul eklenip 8000g'de 20sn santrifüj edildi ve alt tüp atıldı.

14. Filtrenin altına yeni tüp koyulup 700ul Buf RWT eklenip 8000g'de 20sn santrifüj edildi ve alt tüp atıldı.

    *Buf RWT ve RPE kullanılmadan önce protokole uygun olarak %100 etanol eklendi.

15. Filtrenin altına yeni tüp koyulup 500ul Buf RPE eklenip 8000g'de 20sn santrifüj edildi ve alt tüp atıldı.

16. Filtrenin altına yeni tüp koyulup 500ul Buf RPE eklenip 8000g'de 2dk santrifüj edildi ve alt tüp atıldı.

17. Filtrenin altına yeni tüp koyulup 8000g'de 1dk santrifüj edildi ve alt tüp atıldı (Filtrede arta kalanlar temizlenmiş oldu.).

18. Filtrenin altına yeni tüp koyulup 40ul nuclease free water eklendi (Pipet membrana değmeden dikkatli bir şekilde membranın tam ortasına damla damla bırakıldı.).

19. 8000g'de 1dk santrifüj edildi. Böylece alt tüpte toplanan sıvıda miRNA elde edildi.

20. Konsantrasyon ve saflık tayini için Thermo Fischer/Multiskan spektrofotometre cihazında ölçüm yapıldı.

3.6.3.2. RNA Miktar Tayini

Thermo Fischer/Multiskan spektrofotometre cihazı ile RNA miktarı ve kalitesi belirlendi. İzole edilen RNA'ların spektrofotometre ile 260 ve 280 nm de absorbansları ölçüldü. A260 x dilüsyon faktörü x 40 µg/ml formülü ile RNA konsantrasyonları hesaplandı. A260 / A280 oranı hesaplanarak RNA'ların saflık dereceleri belirlendi. (En iyi saflık için A260 / A280 oranının 1,8 ile 2,0 arasında olması beklenmektedir.)

3.6.3.3. cDNA Eldesi

miRNA'ya özgü cDNA elde edildi.

Gereçler:

- miRCURY LNA RT Kit LOT : 7630542

-5x miRCURY RT Buf

-10x miRCURY RT Buf

-Synthetic RNA spike-ins (UniSp6 RNA)

-RNase-free water

- Template RNA
- Thermo Fischer/Multiskan spektrofotometre cihazı

Yöntem :

1. Protokole göre template RNA, 5ng/ul konsantrasyonda 2ul kullanılacağı için konsantrasyon hesaplaması yapıldı.

   Konsantrasyon hesaplama formülü = C1 X V1 = C2 X V2

2. 5x miRCURY RT Buf buz üzerinde, Rnase-free water oda sıcaklığında çözdürüldü. 10 miRCURY RT Buf (enzim) reaksiyona eklenmeden hemen önce çıkarıldı. UniSp6 RNA'nın üzerine 80ul nuclease-free water eklendi (protokole göre).
3. Malzemelerin hepsi vortekslendi.
4. Aşağıdaki tablodaki şekilde mix hazırlandı.

*Enzim en son eklendi.

*Tüm basamaklar buz üzerinde gerçekleştirildi.

Component	miRNA PCR Assay
5x miRCURY RT Buf	2ul
RNase-free water	4.5ul
10x miRCURY RT Buf	1ul
Synthetic RNA spike-ins	0.5ul
Template RNA	2ul
Total =	10ul

5. PCR için cihaz aşağıdaki tablodaki şekilde ayarlandı.

Temperature	Time	Step
42ºC	60dk	Reverse transcription step
95ºC	5dk	Inactivation of reaction
4ºC	∞	Storage

6. QPCR için kullanılmak üzere -20ºC'ye kaldırıldı.

3.6.3.4. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (QPCR)

Mikrodizin verilerinin analizi sonucu anlamlı ekspresyon değişimini veren genlerin ekspresyon analizleri gerçekleştirildi. Gerçek zamanlı PCR için SYBR green mix kullanıldı.

Gereçler :

- miRCURY LNA miRNA PCR Assays and PCR Panels

-2x miRCURY SYBR Green Master Mix
-ROX Reference Dye
-PCR primer mix
-cDNA template
-Rnase-free water

- Roche LightCycler 2.0
- miRNA Primerler
  - hsa-miR-376c-3p Lot : 201705050069-1
  - hsa-miR-610 Lot : 201709110344-1
  - hsa-miR-202-3p Lot : 201706010559-1
  - hsa-miR-495-3p Lot : 201709110165-1

- hsa-miR-1273h-5p Lot : 201906200004-1
- hsa-miR-1273h-3p Lot : 201808150374-1

- miRNA Kontrol Primerler
  - SNORD48 (hsa) Lot : 201803080071-5
  - 5S rRNA (hsa) Lot : 201906130015-1
  - U6 snRNA (hsa,mmu) Lot : 201905210092-2

Yöntem :

*Primerlere protokole uygun şekilde 220ul nuclease free water eklendi.

*cDNA'lere protokole uygun şekilde 10ul alınıp üzerine 590ul nuclease free water eklendi (60x dilue edilmiş oldu.)

1. Aşağıdaki komponentlerden mix hazırlandı.

Component	**miRCURY LNA miRNA PCR Assay**
2x miRCURY SYBR Green Master Mix	5ul
ROX Reference Dye	0.5ul-0.05ul
PCR primer mix	1ul
cDNA template	3ul (60x diluted)
Rnase-free water	1ul
Total =	10ul

2. Kapiller tüplere yüklendi.

3. Tüpler cihaza verilmeden önce mix'in uç kısımda toplanması için 1500rpm 30sn santrifüj edildi.

4. Cihaz aşağıdaki protokole uygun şekilde ayarlanıp yüklendi.

Step	Time	Temperature	Ramp rate
PCR initial heat activation	2min	95ºC	Maximal/fast mode
2-step cycling			
Denaturation	10s	95ºC	Maximal/fast mode
Combined annealing/extension	60s	56ºC	Maximal/fast mode
Number of cycles	40		
Melting curve analysis	60-95ºC		

5. Örnekler cihazdan çıktıktan sonra, ependorf tüplerinin içine kapiller tüpler ters çevrilerek örnekler boşaltıldı ve saklanmak üzere -20'ye kaldırıldı.

*Cihazda aynı anda 32 örnek çalışılabildiği için farklı lizatlarla, farklı zamanlarda ve farklı kombinasyonlarla tüm örnekler 3'er tekrarlı çalışıldı.
*Cihaz her bir örneği tek tek çalıştığı için elde edilen sonuçlar excell'de hesaplandı.

3.6.3.5. miRNA düzeyleri

Seçilen miRNA'ların atasal K562 hücreleri ile dirençli K562-Ir hücrelerdeki artan/azalan ekspresyon farklılıkları QPCR yöntemiyle değerlendirildi. Ek olarak ekspresyonu artmış hsa-miR-495-3p, hsa-miR-610 ve hsa-miR-1290 miRNA'larının hedef genlerinin ekspresyonunun azalması, ekspresyonu azalmış hsa-miR-202-3p, hsa-miR-1273h-3p ve hsa-miR-1273h-5p miRNA'larının hedef genlerinin artması beklenmektedir.

Tablo 5. Mikroarray datasına göre seçilen miRNA ekspresyon farklılıkları

miRNA	P-değeri ≤ 0,05	Fold change	Ekspresyon durumu
1.hsa-miR-202-3p	0,030	4,077	Ekspresyon↓ hedef gen↑
2.hsa-miR-495-3p	0,002	-3,140	Ekspresyon↑ hedef gen↓
3.hsa-miR-610	0,029	-2,363	Ekspresyon↑ hedef gen↓
4.hsa-miR-1273h-3p	0,022	4,640	Ekspresyon↓ hedef gen↑
5.hsa-miR-376c-3p	0,338	-4,013	Ekspresyon↑ hedef gen↓
6.hsa-miR-1273h-5p	0,000124	3,894	Ekspresyon↓ hedef gen↑

3.6.4.miRNA TRANSFEKSİYON DENEYLERİ

miRNA mimik ve inhibitör transfeksiyonunu yapmadan önce hücreler için uygun voltaj değerini belirlemek için GFP plazmidi (Lego V2) ile denemeler yapıldı ve K562 ve K562-Ir (+) için en uygun voltaj/width/pulse değerleri belirlendi. Daha sonra GFP için kullanılan aynı voltaj width/pulse değerleri hücreye göre mimik/inhibitör transfeksiyonunda kullanıldı.

3.6.4.1.miRNA Mimik Transfeksiyonları

Mikrodizin analizi sonucunda belirlenmiş olan miRNA genlerine karşı geliştirilen mimik RNA'larla K562-Ir (+) dirençli hücre hattında ilgili miRNA ifadesi baskılanarak hücrelerin TKI'lere duyarlı hale gelip gelmediği araştırıldı.

3.6.4.2. miRNA İnhibitör Transfeksiyonları

Mikrodizin analizi sonucunda dirençli hücrelerde ifadelerinin artmış olduğu belirlenmiş olan miRNA genleri, TKI duyarlı atasal K562 hücrelerine transfekte edilerek hücrelerin TKI'lere dirençli hale gelip gelmediği araştırıldı.

Gereçler:

- Neon System Transfeksiyon Kiti 10 µL, Cat No: MPK5000

  -R Buffer

  -E Buffer

  -Neon Tipler

  -Neon Tüpler
- İnvitrogen Neon Sistem Transfeksiyon Cihazı
- K562/K562-Ir (+) hücreler
- miRNA Mimikler
  - hsa-miR-610 Cat No : 339173 YM00472118-ADA
  - hsa-miR-495-3p Cat No : 339173 YM00472039-ADA
  - hsa-miR-1273h-5p Cat No : 339173 YM00472804-ADA
- miRNA Mimik Negatif Kontrol Cat No : 339173 YM00479902-ADA
- miRNA İnhibitörler
  - hsa-miR-610 Cat No : 339121 YI04100979-ADA
  - hsa-miR-495-3p Cat No : 339121 YI04101229-ADA
  - hsa-miR-1273h-5p Cat No : 339121 YI04103988-ADA
- miRNA İnhibitör Negatif Kontrol Cat No : 339126 YI00199006-ADA

Yöntem :

*****Mimik ve inhibitör transfeksiyonundan önce GFP plazmidi ile deneye uygun olacak şekilde hücre sayısı ve voltaj belirlendi. Belirlenen değerler mimik ve inhibitör için birebir uygulandı.

1. Kuyucuk başına $1x10^6$ hücre sayıldı.
2. 300g'de 5dk santrifüj edildi.
3. Hücreler PBS ile yıkandı.

4. 300g'de 5dk santrifüj edildi.
5. Supernatant atıldı, pellet 7,5µL R Buffer ile resüspanse edildi.
6. Üzerine 2,5µL mimik/inhibitör eklendi.
7. Neon pipet istasyonunun içerisine her örnek için ayrı ayrı tüp ve pipet tipleri kullanıldı ve 3ml E Buffer eklendi.
8. 10 µL (örn+mimik/inhibitör) cihazın kendi pipetiyle çekilerek Neon pipet istasyonuna yerleştirildi.
9. K562 = 1000 V 40 Ms 4 Puls

   K562 Ir (+) = 1200 V 10 Ms 4 Puls
   uygulandı (Baloncuk olmamasına dikkat edilmeli.).
10. 12'li well plate kuyucuk başına 1ml RPMI 1640 eklendi ve üzerine transfeksiyon sonrası hücreler ekildi.
11. 37°C'de 48 saat inkübe edildi.

*Her örnek tek tek negatif kontrolle birlikte çalışılmıştır.
*Deney düzeneği miRNA'ların ekspresyonlarına göre hazırlanmıştır (hsa-miR-610, hsa-miR-495-3p ekspresyonu artmaktadır. hsa-miR-1273h-5p ekspresyonu azalmaktadır.).

Tablo 6. Mimik deney düzeneği

K562	**K562-Ir (+)**
1.Kontrol K562	1.Kontrol K562-Ir (+)
2.K562/Mimik negatif kontrol	2.K562-Ir (+)/Mimik negatif kontrol
3.K562/hsa-miR-610 mimik	3.Kontrol K562-Ir (+)/hsa-miR-1273h-5p mimik
4.K562/hsa-miR-495-3p mimik	
5.K562/hsa-miR 610 mimik + hsa-miR-495-3p mimik	

Tablo 7. İnhibitör deney düzeneği

K562	K562-Ir (+)
1.Kontrol K562	1.Kontrol K562-Ir (+)
2.K562/İnhibitör negatif kontrol	2.K562-Ir (+)/İnhibitör negatif kontrol
3.Kontrol K562/hsa-miR-1273h-5p inhibitör	3.K562/hsa-miR-610 inhibitör
	4.K562/hsa-miR-495-3p inhibitör
	5.K562/hsa-miR 610 inhibitör + hsa-miR-495-3p inhibitör

3.6.5.MTT Deneyi

K562 ve K562-Ir (+) hücre hatlarında farklı teröpatik dozlar (5µ ve 10µm imatinib) kullanılarak hücrelerdeki oksidatif metabolizmanın ölçülmesi amacıyla hücre canlılığının belirlenmesini sağlayan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) canlılık tayini yöntemi kullanılmıştır.

Gereçler:

Thermo Fisher Scientific Invitrogen MTT Lot No :1911730

-MTT solüsyonu (toz halinde)

-SDS/HCI

- 96'lı well plate
- Mimik/İnhibitör Transfekte Hücreler
- 5µ ve 10µm imatinib
- Thermo Fischer/Multiskan spektrofotometre cihazı

Yöntem:

1.MTT solüsyonu ve SDS/HCI hazırlandı.

MTT: 1 ml PBS içerisinde 0.5mg MTT powder çözdürüldü.

%10 SDS/ 0.01M HCI: 0.01M HCI hazırlanarak içerisinde 1g SDS çözdürüldü.

2.Kontrol grupları için hem K562 hem K562-Ir (+)'den $1x10^6$ hücre hazırlandı ve 3 ayrı (0.sa, 24.sa ve 48.sa) 96'lık well için her kuyuda 100ul hücre olacak şekilde ekildi (Hücre pelleti 2700 µL medium ile resüspanse edildi).

Transfekte hücreler 1000 µL medium içerisinde olduğu için üzerine 1700 µL medium eklenerek 3 ayrı (0.sa, 24.sa ve 48.sa) 96'lık well için her kuyuda 100ul hücre olacak şekilde ekildi (Transfeksiyonda ve santrifüjde hücre kaybı fazla olduğu için tekrar hücre yıkama ve santrifüj yapılmadı.).

*Fenol red'siz RPMI 1640 besi ortamı kullanıldı.

1. 3 ayrı 96'lık well ve 3 ayrı grup oluşturuldu (ilaçsız, 5µm imatinib ve 10µm imatinib) (Tablo 8).
2. İlgili kuyulara ilaçlar eklendi ve 0.sa, 24.sa ve 48.sa göre MTT deneyi uygulandı.
3. Hazırlanan MTT solüsyondan her kuyuya 10µL eklendi.
4. 4 saat inkübe edildi.
5. Hazırlanan %10 SDS/ 0.01M HCI'den her kuyuya 100 µL eklendi.
6. Overnight inkübe edildi.
7. Sonuçlar Thermo Fischer/Multiskan spektrofotometre cihazında ölçüldü.

Tablo 8. MTT deney düzeneği

mediu m	mediu m	mediu m									
K562	K562	K562	K562+5µ m imatinib	K562+5µ m imatinib	K562+5µ m imatinib	K562+10µ m imatinib	K562+10µ m imatinib	K562+10µ m imatinib			
K562-Ir(+)	K562-Ir(+)	K562-Ir(+)	K562-Ir(+) +5µm ima	K562-Ir(+) +5µm ima	K562-Ir(+) +5µm ima	K562-Ir(+) +10µm ima	K562-Ir(+) +10µm ima	K562-Ir(+) +10µm ima			
K562/ K562-Ir(+) Mimik kontrol	K562/ K562-Ir(+) Mimik kontrol	K562/ K562-Ir(+) Mimik kontrol	K562/ K562-Ir(+) Mimik kontrol +5µm ima	K562/ K562-Ir(+) Mimik kontrol +5µm ima	K562/ K562-Ir(+) Mimik kontrol +5µm ima	K562/ K562-Ir(+) Mimik kontrol +10µm ima	K562/ K562-Ir(+) Mimik kontrol +10µm ima	K562/ K562-Ir(+) Mimik kontrol +10µm ima			
K562/ **Mimik miR-610**	K562/ **Mimik miR-610**	K562/ **Mimik miR-610**	K562/ **Mimik miR-610** +5µm ima	K562/ **Mimik miR-610** +5µm ima	K562/ **Mimik miR-610** +5µm ima	K562/ **Mimik miR-610** +10µm ima	K562/ **Mimik miR-610** +10µm ima	K562/ **Mimik miR-610** +10µm ima			
K562/ **Mimik miR-495**	K562/ **Mimik miR-495**	K562/ **Mimik miR-495**	K562/ **Mimik miR-495** +5µm ima	K562/ **Mimik miR-495** +5µm ima	K562/ **Mimik miR-495** +5µm ima	K562/ **Mimik miR-495** +10µm ima	K562/ **Mimik miR-495** +10µm ima	K562/ **Mimik miR-495** +10µm ima			
K562/ **Mimik miR-610 miR-495**	K562/ **Mimik miR-610 miR-495**	K562/ **Mimik miR-610 miR-495**	K562/ **Mimik miR-610 miR-495** +5µm ima	K562/ **Mimik miR-610 miR-495** +5µm ima	K562/ **Mimik miR-610 miR-495** +5µm ima	K562/ **Mimik miR-610 miR-495** +10µm ima	K562/ **Mimik miR-610 miR-495** +10µm ima	K562/ **Mimik miR-610 miR-495** +10µm ima			
K562-Ir(+) Mimik **miR-1273h**	K562-Ir(+) Mimik **miR-1273h**	K562-Ir(+) Mimik **miR-1273h**	K562-Ir(+) Mimik **miR-1273h** +5µm ima	K562-Ir(+) Mimik **miR-1273h** +5µm ima	K562-Ir(+) Mimik **miR-1273h** +5µm ima	K562-Ir(+) Mimik **miR-1273h** +10µm ima	K562-Ir(+) Mimik **miR-1273h** +10µm ima	K562-Ir(+) Mimik **miR-1273h** +10µm ima			

3.6.6.Fenotipik Karakterizasyon Deneyi

Fenotipik karakterizasyon deneyleri, gözlemlenebilir farklılıklara dayanarak farklı türler içindeki ve arasındaki çeşitliliği tanımlamak amacıyla yapılmaktadır. Hücreler içindeki genetik çeşitliliğin ölçülmesi ve hücreler arasındaki genetik ilişkilerin tanımlanması moleküler karakterizasyon ile gerçekleşmektedir.

Gereçler:

- V bottom 96'lık well-plate
- Antikorlar (Tablo 9)
- PBS

- PFA (paraformaldehit)

FACs buffer (PBS + %2 FBS)

- Santrifüj cihazı
- Beckman Coulter-Cytoflex S Akış Sitometrisi

Tablo 9. Fenotipik karakterizasyonda kullanılan antikorlar

Antikor	Marka	Florofor	Antikor	Marka	Florofor
HLA-A/B/C	BD Bioscience	APC-Cy7	CD7	BD Bioscience	FITC
HLA-C	BD Bioscience	PE	CD33	BD Bioscience	PE
HLA-DR	Beckman Coulter	APC	CD34	BD Bioscience	FITC
MIC-A/B	BD Bioscience	Alexa Flour 488	CD38	BD Bioscience	BV421
PCNA	BD Bioscience	Alexa Flour 647	CD44	BD Bioscience	APC-H7
CD155	BD Bioscience	PerCp/Cy 5.5	CD45	Beckman Coulter	KO
E-cadherin	BD Bioscience	FITC	CD45	BD Bioscience	APC
N-cadherin	BD Bioscience	APC	CD146	BD Bioscience	AP-Cy 5.5
CD112	BD Bioscience	Pe-Cy7			

Yöntem:

1. Hücre sayımı ve konsantrasyon hesaplaması yapıldı. K562, K562-Ir(+), K562-Ir(-) ve NK-92 hücre hatlarından $0,5x10^6$ hücre sayılıp, falkonlara koyuldu.

   *Transfekte hücreler için de aynı basamaklar uygulandı.
2. 300 x g (~1200 rpm)'de 5dk santrifüj edildi. Supernatant atıldı.
3. Örnekler 150µl PBS ile yıkama yapıldı.
4. 4°C 400 x g'de 3dk santrifüj edildi. Supernatant atıldı.
5. Antikorlar ilgili kuyucuklara 50µl (PBS içerisinde 1:100 oranında dilue edildi.) eklendi.
6. 20dk buzdolabında inkübe edildi.

7. Örnekler tekrar 150µl PBS ile yıkama yapıldı.
8. 4°C 400 x g'de 3dk santrifüj edildi. Supernatant atıldı.
9. %2 PFA ile fikse edildi.
10. Oda sıcaklığında 8dk inkübe edildi.
11. Tüm kuyucuklara 180µl FACs buffer eklendi.
12. Akış sitometri cihazında sonuçların ölçümü yapılana kadar buzdolabında +4'te bekletildi (max 3gün).

* CD-45(KO) ve HLA-DR Dokuz Eylül Üniversitesi Hematoloji Anabilim dalı Prof.Dr. Güner Hayri Özsan ve Onkoloji Anabilim Dalı Dr.Halil Ateş'ten temin edilmiş ve Dokuz Eylül Üniversitesi Hematoloji bölümündeki Beckman Coulter-Cytoflex S Akış Sitometrisi'nde çalışılmıştır. Bu 2 antikor dışındaki diğer antikorlar İsveç Karolinska Enstitüsü Hematoloji ve Rejeneratif Tıp Merkezi(HERM) Hücre ve Gen Terapi Grubu Doç.Dr.Evren Alici'nin laboratuvarından temin edilmiş ve çalışılmıştır.

3.6.7.Degranülasyon Deneyleri

NK hücre degranülasyonu, K562 hücreleri ile uyarılarak tetiklenen lizozomal protein CD107α'nın hücre yüzey ekspresyonunun multiparametrik akış sitometrik analizi ile değerlendirilmesidir.

Gereçler :

- U ve V bottom 96'lık well-plate
- RPMI medium
- PMA/İonomycin
- Golgistop (Gs)
- Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi (PBS)

- Cytofix / Cytoperm
- Permwash
- ddH20
- Antikorlar (Tablo 10)
- Santrifüj cihazı
- Beckman Coulter-Cytoflex S Akış Sitometrisi

Tablo 10. Degranülasyon'da kullanılan antikorlar

Antikor	Oran	Marka	Florofor
Live/dead	1:1000	Invitrogen	Acqua (Vivid)
CD56	1:100	BD Bioscience	APC-Cy7
CD107a	1:200	BioLegend	PE-Cy7
IFN-γ	1:400	BD Bioscience	APC

Yöntem:

1. Deneye başlamadan önce hücreler ve kullanılacak süspansiyonların konsantrasyonları ve miktarları ayarlandı.

Tablo 11. Degranülasyon deney planı

Deneyden 48 saat önce	PBS ile K562-Ir (+) x3 yıkama, +/- imatinib
Deneyden 24 saat önce	K562-wt +/- 1ul imatinib (Ic50 rate)
Deney günü	PBS ile tüm hücreleri x3 yıkama
	1.K562wt X imatinib **2.**K562wt + 1ul imatinib **3.**K562Ir (+) + 10ul imatinib **4.**K562Ir (+) X imatinib **5.**K562Ir (-) + 10ul imatinib **6.**K562Ir (-) X imatinib

-Hücre sayımı ve konsantrasyon hesaplaması yapıldı.

-Pozitif kontol ve FMO (Fluorescence Minus One) kontrolü için PMA/ionomycin için ortam hazırlandı.

→ RPMI+%10 HI-FBS 0.1µl PMA/0.1µl iono/50ul/well

-CD107-PE-Cy7 süspansiyonu hazırlandı.

→ RPMI+%10 HI-FBS 1ul/50ul her örnek için 1:200 final dilüsyon

2. İlk aşama hücre kültürü kabininde yapıldı ve U bottom well-plate kullanıldı.

3. İlgili kuyucuklara 50µl hedef hücre süspansiyonu eklendi. Unstimule örneklere 50µl ortam (RPMI kullanıldı) eklendi.

4. 50µl PMA/ionomycin, PMA/iono ve FMO kuyucuklarına eklendi.

5. 100µl NK-92/primer NK hücre süspansiyonu ilgili kuyucuklara eklendi.

6. 50µl CD107-PECy7 süspansiyonu, -CD107 dışındaki tüm kuyulara eklendi.

7. 24°C 1dk 50g'de santrifüj edildi.

8. 37°C'de 1 saat inkübe edildi.

9. Golgistop hazırlandı.

(10µl/well___ 0.7µl golgistop + 9.3µl ortam her örnek için)

10. 1 saatlik inkübasyondan sonra 10µl golgistop örneklere eklendi ve resüspanse edildi.

11. 24°C 1dk 50g'de santrifüj edildi.

12. 37°C'de 3 saat inkübe edildi.

13. Bu aşamadan sonra çalışmaya moleküler laboratuvarında devam edildi. Örnekler V bottom well-plate aktarıldı.

14. 24°C 3dk 400g'de santrifüj edildi. Supernatant atıldı.

15. 150µl PBS ile yıkama yapıldı. 24°C 3dk 400g'de santrifüj edildi. Supernatant atıldı. 'Yüzey belirteçleri' aşamasına geçildi.

16. Peletin üzerine 50µl Acqua LD eklendi ve 20dk inkübe edildi (antikor eklenirken ışıklar kapatılmalı.).

(Her örnek için 1:1000 oranında PBS içerisinde seyreltilmiştir.)

17. 150µl FACs buffer ile x1 yıkama yapıldı. 24°C 3dk 400g'de santrifüj edildi. Supernatant atıldı.

(FACs Buffer = PBS + %2 FBS)

18. Mastermix (CD56) tüm örneklere 50µl eklendi ve 25dk buzdolabında inkübe edildi (antikor eklenirken ışıklar kapatılmalı.) (FMO ve comp. hariç).

(1: 100 oranında FACS tamponunda seyreltilmiştir.)

19. 150µl FACs buffer ile x2 yıkama yapıldı. 24°C 3dk 400g'de santrifüj edildi. Supernatant atıldı. 'Hücrelerarası belirteçleri' aşamasına geçildi.

20. Hücre içi boyama için, Cytofix / Cytoperm well başına 70ul eklendi ve hücre agregasyonunu önlemek için dikkatlice süspanse edildi. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.

21. 24°C 3dk 400g'de santrifüj edildi. Supernatant atıldı.

22. 10X perm wash ddH20 içerisinde dilue edildi (taze olmalı.).

23. . İnterferon-gama (IFN- γ) (1: 400 seyreltilmiş) 50µl) ilave edildi (FMOs-INF-γ hariç.). 25dk oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edildi.

(1: 400 oranında perm yıkama tamponunda seyreltilmiştir.)

24. 24°C 3dk 400g'de santrifüj edildi. Supernatant atıldı.

25. 150µl perm-wash buffer ile x1 yıkama yapıldı. 24°C 3dk 400g'de santrifüj edildi. Supernatant atıldı.

26. 150µl PBS buffer ile x1 yıkama yapıldı. 24°C 3dk 400g'de santrifüj edildi. Supernatant atıldı.

27. 180µl FACs buffer ile resüspanse edildi.

28. Akış sitometri cihazında sonuçların ölçümü yapılana kadar buzdolabında +4'te bekletildi (max 3gün).

Tablo 12. Degranülasyon deney çizelgesi

K562wt	50u/tumor 100ul/NK 50ul/CD107 10ul Gs	50u/tumor 100ul/NK 50ul/CD107 10ul Gs	50u/tumor 100ul/NK 50ul/CD107 10ul Gs									
K562wt +1u/ima	50u/tumor 100ul/NK 50ul/CD107 10ul Gs	50u/tumor 100ul/NK 50ul/CD107 10ul Gs	50u/tumor 100ul/NK 50ul/CD107 10ul Gs									
K562Ir(+) +10u/ima	50u/tumor 100ul/NK 50ul/CD107 10ul Gs	50u/tumor 100ul/NK 50ul/CD107 10ul Gs	50u/tumor 100ul/NK 50ul/CD107 10ul Gs									
K562Ir(+) X	50u/tumor 100ul/NK 50ul/CD107 10ul Gs	50u/tumor 100ul/NK 50ul/CD107 10ul Gs	50u/tumor 100ul/NK 50ul/CD107 10ul Gs									
K562Ir(-) +10u/ima	50u/tumor 100ul/NK 50ul/CD107 10ul Gs	50u/tumor 100ul/NK 50ul/CD107 10ul Gs	50u/tumor 100ul/NK 50ul/CD107 10ul Gs									
K562Ir(-) X	50u/tumor 100ul/NK 50ul/CD107 10ul Gs	50u/tumor 100ul/NK 50ul/CD107 10ul Gs	50u/tumor 100ul/NK 50ul/CD107 10ul Gs					**us**	**+CD107**	**+IFNg**	**+CD56**	**+LD**
neg	50u/medium 100ul/NK 50ul/CD107 10ul Gs	50u/medium 100ul/NK 50ul/CD107 10ul Gs	50u/medium 100ul/NK 50ul/CD107 10ul Gs				**comp cont**	50u/medi um 50ul/P-i 100ul/NK 10ul Gs 50ul PBS 50ul FACs 50ul perm	50ul/CD1 07 50ul/P-i 100ul/NK 10ul Gs 50ul PBS 50ul FACs 50ul perm	50u/medi um 50ul/P-i 100ul/NK 10ul Gs 50ul PBS 50ul FACs 50ul IFNg	50u/medi um 50ul/P-i 100ul/NK 10ul Gs 50ul PBS 50ul CD56 50ul perm	50u/medi um 50ul/P-i 100ul/NK 10ul Gs 50ul LD 50ul FACs 50ul perm
pos	50u/P-İ 100ul/NK 50ul/CD107 10ul Gs	50u/P-İ 100ul/NK 50ul/CD107 10ul Gs	50u/P-İ 100ul/NK 50ul/CD107 10ul Gs				**FMO s**	50u/P-İ 100ul/NK 50ul/CD1 07 10ul Gs 50ul LD 50ul CD56 50ul IFNg	50u/P-İ 100ul/NK 50u/medi um 10ul Gs 50ul LD 50ul CD56 50ul IFNg	50u/P-İ 100ul/NK 50ul/CD1 07 10ul Gs 50ul LD 50ul CD56 50ul perm	50u/P-İ 100ul/NK 50ul/CD1 07 10ul Gs 50ul LD 50ul FACs 50ul IFNg	50u/P-İ 100ul/NK 50ul/CD1 07 10ul Gs 50ul PBS 50ul CD56 50ul IFNg

3.6.8.Akış Sitometrisi

Akan bir sıvının içerisinde hücrelerin veya biyolojik partiküllerin fiziksel ya da kimyasal karakterlerinin ölçülmesi akım sitometrisi olarak tanımlanmaktadır. Fenotipik Karakterizasyon ve Degranülasyon deneylerinde yapmış olduğumuz immünfenotipleme yöntemiyle floresan boyalarla görünür hale gelen hücre yüzeyi ve hücre içi belirteçleri saptanmıştır. Özgül antikorlarla saptanmak istenen antijenik yapıların varlığı veya yokluğu belirlenmiştir. Fenotipik Karakterizasyon ve Degranülasyon deneyleri için Beckman Coulter-Cytoflex S Akış Sitometrisi cihazı kullanılmıştır. Bu cihaz 2 panelden oluşmaktadır. Antikorların florofor özelliklerine

göre panel seçim yapılıp, cihazda gerekli ayarlamalar yapılarak ölçümler yapılmıştır. Cihazdan elde edilen ham datalar ise GraphPad Prism, FCSalyzer ve FCS Express gibi programlarda işlenmiştir.

3.6.9. Western Blot

Hücrelerden total protein lizatının elde edilmesinden sonra aranan proteinin olup olmamadığını belirlemek, eğer varsa da miktarının (o genin ekspresyonun düzeyi) spesifik antikorlar yardımıyla belirlendiği bir yöntemdir. İlk olarak, hücreler lize edilerek proteinler izole edilmektedir. Lizatlar ayrıştırma jeline eşit miktarda yüklenerek elektriksel akım yardımıyla yürütülmektedir. Daha sonra jel, membrana transfer edilir ve o genin ekspresyon düzeyini belirlemek için proteine özgü antikorla muamele edilerek X-ray filmde görüntülenmektedir. K562/Negatif kontrol mimik, K562/miR-610 mimik, K562-Ir(+)/Negatif kontrol inhibitör ve K562-Ir(+)/miR-610 inhibitör transfeksiyonundan sonra kontrol olarak β-actin ve WNT yolağının markeri olan β-katenin proteini gösterilmiştir.

Gereçler:

- Lizis Tamponu RIPA
- Proteaz ve fosfataz inhibitörleri
- Pierce BCA Protein Assay Kit
- Plate okuyucu (BioTek Synergy HT)
- Buz
- PBS
- Santrifüj tüpü
- Mikrosantrifüj tüpü
- Soğutmalı mikrosantrifüj (Eppendorf centrifuge 5417 R)
- Mini-Protean 3 Cell cihazı (katalog numarası: 165-3301)
- Elektroforez tankı
- Güç kaynağı
- %10'luk ayrıştırıcı jel ve %5'lik yükleme jeli
- 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)
- Thermo Scientific Vep-2 wet transfer system
- 0.45µM PVDF membran
- Transfer tamponu (%20 metanol)
- Wattman ince blot kağıdı
- Transferi yapılmış membran
- Çalkalayıcı
- Süt tozu
- TBS-T (%0.01 Tween-20)
- Kemilüminesans substrat (ECL) kiti (Cell Signaling, 6883P3)
- Primer antikorlar

  -Anti ACTB antikoru (Cell Signaling/4970S)

  -Anti β-katenin antikoru (BD Mouse/610153)
- Sekonderantikorlar

  -Anti-rabbit HRP bağlı Sekonder antikor (β-actin: Jackson Immuno Research/111-035-045)

  -Anti-mouse HRP bağlı Sekonder antikor (β-katenin)

Yöntem:

1. **Solüsyonların Hazırlanması**

   Running Buffer (10X Tris-Glycine-SDS)

   (Deneyde 1X kullanılıyor.)

   Tris Base = 30.2g

   Glycine = 188g

   %10 SDS = 100ml

   1L'ye tamamlanır.

   TBS (10X)

   H2O = 800ml

   Tris = 30g

   NaCI = 88g

   1L'ye tamamlanır. pH 8'e ayarlanır.

TBS-T

10X TBS = 100ml

H2O = 900ml

Tween-20 = 1000ul

Buzdolabında +4°C'de saklanır.

Transfer Buffer (1X)

10X Tris = 80ml

H20 = 720ml

Metanol = 200ml

%10 SDS

10g SDS 100ml H2O içerisinde çözdürülür.

Süt Tozu

5g süt tozu 100ml TBS-T içerisinde çözdürülür.

Balık yardımıyla karıştırılır. +4°C'de yaklaşık 1 hafta bekletilebilir.

%10 APS

0,1g APS 1ml'de çözdürüldü.

10X Phosphatase İnhibitör

1 tablet üzerine 1ml otoklavlanmış dH2O eklenir, vortekslenir.

10X Protease İnhibitör

1 tablet üzerine 1ml otoklavlanmış dH2O eklenir, vortekslenir.

Lizis Buffer

10X Phosphatase İnhibitör = 50ul

10X Protease İnhibitör = 50ul

RIPA Buffer = 400ul

2. **Hücre Lizatının Hazırlanması:** Kontrol grubu ve transfekte K562/Negatif kontrol mimik, K562/miR-610 mimik, K562-Ir(+)/Negatif kontrol inhibitör ve K562-Ir(+)/miR-610 hücre kuyucuklarından hücre lizatı elde edildi.
   - Öncelikle K562, K562-Ir (+), mimik negatif kontrol, mimik/miR-610, inhibitör negatif kontrol, inhibitör/miR-610 hücreleri hazırlandı.
   - Hücreler 1200 rpm 5dk santrifüj edildi.

- Süpernatant atıldı, PBS ile yıkama yapıldı ve tekrar 1200 rpm 5dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı ve ve tüpte damla kalmamasına özen gösterildi. Hücreler -80°C'ye kaldırıldı.
- Örneklere 50ul Lizis buffer eklendi ve vorteklendi. Tekrar 80°C'ye kaldırıldı ve sümüksü yapı giderilene kadar yaklaşık 5 kere aynı işlem uygulandı.
- +4°C 14000rpm 30dk santrifüj edildi.
- Buz üzerinde supernatant yeni tüpe aktarıldı. Örnekler protein tayinine hazır hale geldi.

3. **Protein Konsantrasyonunun Ölçülmesi:** Pierce BCA Protein Assay kullanılarak elde edilen lizatların protein konsantrasyonları ölçüldü.
   - Örnekler ve ayarlı protein standartları 96'lık well plate yüklendi. 3 tekrarlı çalışıldı.
   - Ayarlı çözeltiler = 25ul (Örnekler = 5ul lizat + 20ul dH2O)
     Kör = 25ul dH2O veya Lizis Buffer
     Hesaplama yapıldıktan sonra 50:1 oranında Reaktif A ve Reaktif B eklendi. Her kuyuya 200ul BCA (çalışma reaktifi) eklendi.
   - 37°C'de 30 dk inkübe edildi.
   - Oda sıcaklığında bir süre beklenildikten sonra spektrofotometrede 562nm'de ölçüldü. Elde edilen verilerden standart grafik çizilerek örneklerdeki protein miktarı belirlendi.

4. **SDS-PAGE Jel Elektroforezi:** Mini-PROTEAN 3 Cell cihazı kullanılarak SDS-PAGE jel elektroforezi yapıldı.
   - Çalışılan proteinlerin moleküler ağırlıklarına (β-actin: 45 kDA β-catenin: 95 kDA) göre ayrım (seperating) jelinin yüzdesi %10 paketleme (stacking) jel yüzdesi ise %4 olarak seçildi.
   - Ayrım jeli için; 7.275 mL distile su, 3.75 mL 1.5 M Tris Tamponu (pH: 8.8), 75 µl %20'lik SDS, 3.75 mL %40'lık akrilamid/bisakrilamid karıştırıldı ve jeli dökmeden hemen önce 150 µl %10'luk APS ve 15 µl TEMED eklendi. Daha sonra 1.0 mm'lik camlar arasına 5 mL bu karışım

dökülerek üstü izopropanol ile kapatılmıştır. Jel donduktan sonra izopropanol dökülerek uzaklaştırılmıştır.

- Paketleme jeli için; 3.20 mL distile su, 1.25 mL 0.5 M Tris Tamponu (pH: 8.8), 25 µl %20'lik SDS, 470 µl %40'lık akrilamid/bisakrilamid karıştırıldı ve jeli dökmeden hemen önce 150 µl %10'luk APS ve 15 µl TEMED eklendi. Daha sonra 1.0 mm'lik camlar arasına 5 mL bu karışım dökülerek üzerine 10'lu taraklar yerleştirildi.
- Protein miktarı belirlenmiş olan örnekler 50 µg olacak şekilde 4X Yükleme Tamponu (SDS, Gliserol, Bromfenol mavisi ve Tris) ile 4:1 oranında karıştırılarak içerisine son hacimde %5 olacak şekilde β-merkaptoetanol eklendi.
- Yürütme tankının çizgisine kadar 1X yürütme tamponu eklendi. Dikey bir aparat içerisine jeller yerleştirildi ve aradaki boşlukta yürütme tamponu ile doldurulduu. Taraklar çıkarılarak örnek yüklemeye hazır hale getirildi. İlk kuyuya bilinen protein markerı, diğer kuyulara ise örnekler yüklendi. Sabit voltaj ayarı seçilerek ilk 30 dakika 70 V, sonrasında 100 V'ta yürütme gerçekleştirildi. Ayrım gözlendikten sonra jelller dikey aparattan çıkarıldı ve 1X transfer tampon içerisine alındı.

5. **Jelden Membrana Islak Yöntem ile Protein Transferi (Wet Transfer) :**
   Biorad Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell cihazı kullanılarak yarı kuru SDS-PAGE jelinde PVDF membranına proteinler transfer edildi.

   - Poliviniliden florür (PVDF) membran,önce metanol ile ıslatıldı ve 5 dakika derin kap içerisinde 1X transfer tamponu içerisinde aktive edildi.
   - Jel, 2 cam arasından çıkarıldı ve blotlama kağıtları ve süngerler transfer tamponu içerisinde ıslatıldıktan transfer için hazır hale getirildi.
   - Transfer paketleri; gözenekli kaset içerisinde, siyah tarafından başlanarak sırası ile sünger, blotlama kağıdı, jel, PVDF membran, blotlama kağıdı ve sünger olacak şekilde hava kabarcıklarına dikkat edilerek paketlendi. Kaset, kapatılarak dikey tutucuya yerleştirildi.
   - Yürütme tankının içerisine soğuk 1X transfer tamponu ve buz aküleri yerleştirildi. Güç kaynağından sabit akımla 250 mA'de 2 saat transfer işlemi

soğuk odada gerçekleştirildi. Transfer işlemi tamamlandıktan sonra membranların kurumamasına dikkat edilerek hızlıca bloklamaya geçildi. - Membranın üzeri %5'lik yağsız süt tozuyla kaplandı. 1saat bozdolabında çalkalayıcıda inkübe edildi.

6. **Blotlama Yöntemi:** Primer antikor (β-aktin ve β-katenin) ile membran inkübe edildi.
   - Süt tozu döküldü. İlgili primer antikor, süt tozunun içerisinde uygun oranda karıştırılarak gece boyu soğuk odada inkübe edildi.
   - İnkübasyondan sonra primer antikorlar toplandı ve membran 1X TBST ile 3 kez 5dk yıkandı.
   - Membranın üzerine HRP-bağlı sekonder antikorun süt tozundaki dilüe çözeltisi eklenerek 2 saat inkübe edildi.

7. **Deteksiyon Yöntemi:** Kemilüminesans substrat (ECL) kiti ile deteksiyon yapıldı.

   - Membrandan görüntü almak için cihaza yerleştirilmeden önce iki kit reaktifi 1:1 oranında karıştırılarak membranların üzerine damlatılmıştır. Bantların en uygun ve net görüntüleri otomatik ve manuel olarak alındı ve bant yoğunluğu analizleri (Biorad, Image Lab) yapıldı.

3.7. Araştırma Planı

Araştırma planı ve takvimine Tablo 13'te yer verilmiştir.

Tablo 13. Araştırma planı

Temmuz-Ağustos 2018	İn-silico çalışma (miRNA'ların seçilmesi)
Temmuz-Eylül 2019	miRNA'ların konfirme edilmesi
Şubat-Haziran 2020	Degranülasyon ve Fenotipik Karakterizasyon deneyleri
Şubat-Mayıs 2021	Transfeksiyon deneyleri
Nisan-Mayıs 2021	FACs deneyleri
Mayıs-2021	Western Blotting deneyleri
Ocak-Haziran 2021	Verilerin değerlendirilmesi ve tez yazımı
Haziran 2021	Tez sunumu

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Tezimizde kullanılan miRNA'ların seçilmesi için Diana Tools-MirPath, miRDB ve WebGestalt programları kullanılmıştır. Hücre kültürü çalışmaları kalitatif olarak değerlendirilmiştir. İn-silico çalışma sonucundaki miRNA'ların doğrulanması ve transfeksiyon deneyleri sonucu elde edilen verilerin ekspresyonunun belirlenmesi için QPCR, Roche Light Cycler cihazıyla gerçekleştirilmiştir. Ct değerlerinin belirlenmesi Excell üzerinde formüller kullanılarak yapılmıştır. Grafikler GraphPad Prism programı one-way ANOVA ile yapılmıştır. Degranülasyon ve fenotipik karakterizasyon deneylerinin sonucunu değerlendirmek için kullanılan Beckman Coulter-Cytoflex S Akış Sitometrisi'nden elde edilen verilerle yapılan grafikler için GraphPad Prism, FCSalyzer ve FCS Express programları kullanılmıştır.

3.9. Araştırmanın Kısıtlılıkları

Araştırmamız, tüm dünyanın etkilenmiş olduğu Covid-19 pandemisine denk gelmesi nedeniyle özellikle bütçe ve malzemelerin ulaşımı konusunda aksaklıklar ve sıkıntılar yaşanmıştır. Bu nedenle planlamış olduğumuz 6 miRNA yerine 3 miRNA üzerinde çalışma yapılmıştır. Ayrıca, Transfeksiyon deneyleri sonucunda Western-blot yöntemiyle incelemek istediğimiz olası sinyal yolakları ne yazık ki tez savunmamıza yetişmemiştir. Ancak

çalışmalarımız devam edecektir. Elde ettiğimiz bu verilerle birlikte planladığımız çalışmaları da tamamladıktan sonra verilerimizi makale olarak sunmayı planlamaktayız.

3.10. Etik Kurul Onayı

Projemiz 13.02.2019 tarihinde 2019/03-65 karar numarasıyla Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurulu tarafından etik açıdan uygun görülmüştür (Ek 1).

4.BULGULAR

4.1. Biyoinformatik Analiz Bulguları

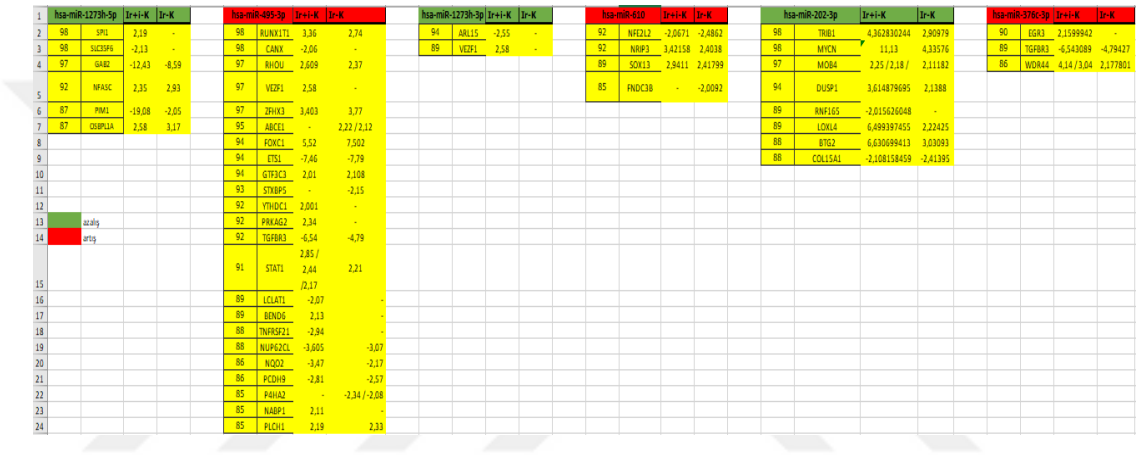
Tezimizde kullanmak için, KML'de atasal hücre dizisi K562 ile imatinibe dirençli K562-Ir hücreleri ile gerçekleştirilen mikrodizin çalışması sonucunda farklı ekprese edilen 196 insan miRNA (hsa-miR) saptandı. Mikrodizin çalışmasından elde edilen miRNA ekspresyon verileri 'p value değeri' 0,05 ayarlanarak 32 hsa-miR şeklinde filtrelendi (Tablo 13).

Tablo 14. Mikrodizin analizine göre miRNA'ların listesi

	Probe Id	p-Value	log(fold_c	fold_chan	l1_log2_S	l2_log2_S	K1_log2_	K2_log2_	Transcript ID(Array Design), Probe Set Name
2	20529132	0,00012	3,89457	14,8724	3,54164	3,52261	7,4425	7,41088	hsa-miR-1273h-5p, MIMAT0030415_st
3	20517948	0,00132	-4,75645	-27,0293	6,14228	5,95014	1,17037	1,40915	hsa-miR-3687, MIMAT0018115_st
4	20501240	0,00229	-3,10177	-8,58468	4,10454	4,09899	0,63398	0,66681	hsa-miR-377-5p, MIMAT0004689_st
5	20503805	0,00288	-3,14016	-8,81619	4,09663	4,18368	0,63398	0,66607	hsa-miR-495-3p, MIMAT0002817_st
6	20503108	0,00515	-4,18935	-18,244	5,7182	5,32357	1,11203	1,55104	hsa-miR-487a-3p, MIMAT0002178_st
7	20504549	0,00538	-2,45718	-5,4914	3,31563	3,59872	0,60964	0,83131	hsa-miR-758-5p, MIMAT0022929_st
8	20517701	0,00663	-2,09984	-4,2866	3,19319	3,00648	0,51381	0,77848	hsa-miR-4322, MIMAT0016873_st
9	20534822	0,00708	-3,67655	-12,7776	4,7093	4,64179	0,76813	0,95602	hsa-mir-299, MI0000744_st
10	20501281	0,01241	-4,25199	-19,0536	5,55097	5,16416	0,5905	1,21115	hsa-miR-337-5p, MIMAT0004695_st
11	20500778	0,01744	-6,07432	-67,3831	7,78973	6,75167	0,76165	1,39277	hsa-miR-146a-5p, MIMAT0000449_st
12	20518426	0,01799	-2,61074	-6,10815	3,32702	3,89445	0,51744	0,96578	hsa-miR-3907, MIMAT0018179_st
13	20536264	0,01827	5,99643	63,8416	0,68673	1,80622	8,01576	6,78331	hsa-mir-3160-1, MI0014189_x_st
14	20503803	0,01849	-4,83162	-28,4748	9,15326	8,52872	3,55311	4,46564	hsa-miR-494-3p, MIMAT0002816_st
15	20504420	0,02072	-4,09323	-17,068	5,57613	4,66644	0,39978	1,05612	hsa-miR-654-5p, MIMAT0003330_st
16	20529133	0,02259	4,64063	24,9442	2,61637	2,85515	7,06838	7,6844	hsa-miR-1273h-3p, MIMAT0030416_st
17	20518785	0,02314	-5,07554	-33,7202	6,49221	6,09634	1,24089	1,19658	hsa-miR-4417, MIMAT0018929_st
18	20504419	0,02413	-2,87185	-7,32003	4,18021	3,57299	1,0095	0,25538	hsa-miR-411-3p, MIMAT0004813_st
19	20525659	0,02677	-2,72589	-6,61568	5,23211	4,72118	2,37837	2,12314	hsa-miR-6849-5p, MIMAT0027598_st
20	20505798	0,02756	-2,42635	-5,3753	3,14408	3,70861	0,65799	0,37117	hsa-miR-543, MIMAT0004954_st
21	20500780	0,0282	-5,05859	-33,3263	5,71068	6,70149	0,80652	1,29499	hsa-miR-149-5p, MIMAT0000450_st
22	20501249	0,02827	-4,07925	-16,9035	5,39554	4,76296	0,69949	0,48877	hsa-miR-381-3p, MIMAT0000736_st
23	20529136	0,02861	-3,12577	-8,72869	4,48036	4,13776	1,21791	1,14868	hsa-miR-7844-5p, MIMAT0030419_st
24	20525673	0,02876	-2,45499	-5,48309	3,39642	4,02021	1,01208	1,49457	hsa-miR-6856-5p, MIMAT0027612_st
25	20504301	0,02978	-2,30337	-5,14071	3,3009	3,40078	0,78383	1,04564	hsa-miR-010, MIMAT0003278_st
26	20503796	0,03037	4,07759	16,884	1,61211	1,18484	5,50524	5,44688	hsa-miR-202-3p, MIMAT0002811_st
27	20502456	0,03055	-7,0028	-128,248	9,16078	7,74702	1,79683	1,10538	hsa-miR-409-3p, MIMAT0001639_st
28	20501224	0,03389	-4,01388	-16,1547	5,48362	5,35508	1,67825	1,13267	hsa-miR-376c-3p, MIMAT0000720_st
29	20501244	0,03674	-7,38432	-167,071	9,30814	7,91658	0,94094	1,45608	hsa-miR-379-5p, MIMAT0000733_st
30	20506022	0,04025	-4,30787	-19,8061	5,5932	5,02254	0,94094	0,89744	hsa-miR-297, MIMAT0004450_st
31	20500771	0,04305	-7,4687	-177,134	9,98809	8,74551	0,62532	2,7962	hsa-miR-127-3p, MIMAT0000446_st
32	20518892	0,04662	-3,0847	-8,48371	12,9743	12,3246	9,45892	9,67063	hsa-miR-4497, MIMAT0019032_st
33	20506818	0,04894	-3,12891	-8,74771	4,46288	3,79493	0,572	0,4277	hsa-miR-1290, MIMAT0005880_st

miRNA tahmini hedef genlerin belirlenmesi miRDB (http://mirdb.org/miRDB/, Release: 03 Nisan 2012) algoritmasını kullanarak 'target score''ları 100-85 arası hedef genler belirlendi. Bu hedef genler Ir-K ve Ir+i-K hücrelerinin karşılaştırmalı mRNA transkriptom listesiyle karşılaştırıldı. Eşleşen genler listelendi. Hedef genlerin ekspresyon kat farkları (fold change) listelendi. 32 adet hsa-miR ekspresyonlarındaki artma/azalma durumlarına göre karşılaştırılarak değerlendirilmeye alındı. Aşağıdaki Tablo 14 ve 15'de seçilen miRNA'ların target score'ları ve hedef genleri listelendi.

Tablo 15. miRDB'ye göre 100-85 arası score aralıklarında çakışan genler



hsa-miR-1273h-5p	Ir+i-K	Ir-K
98 SPI1	2,19	-
98 SLC35F6	-2,13	-
97 GAB2	-12,43	-8,59
92 NFASC	2,35	2,93
87 PIM1	-19,08	-2,05
87 OSBPL1A	2,58	3,17
azalış		
artış		

hsa-miR-495-3p	Ir+i-K	Ir-K
98 RUNX1T1	3,36	2,74
98 CANX	-2,06	-
97 RHOU	2,609	2,37
97 VEZF1	2,58	-
97 ZFHX3	3,403	3,77
95 ABCE1	-	2,22 / 2,12
94 FOXC1	5,52	7,502
94 ETS1	-7,46	-7,79
94 GTF3C3	2,01	2,108
93 STXBP5	-	-2,15
92 YTHDC1	2,001	-
92 PRKAG2	2,34	-
92 TGFBR3	-6,54	-4,79
91 STAT1	2,85 / 2,44 /2,17	2,21
89 LCLAT1	-2,07	-
89 BEND6	2,13	-
88 TNFRSF21	-2,94	-
88 NUP62CL	-3,605	-3,07
86 NQO2	-3,47	-2,17
86 PCDH9	-2,81	-2,57
85 P4HA2	-	-2,34 / -2,08
85 NABP1	2,11	-
85 PLCH1	2,19	2,33

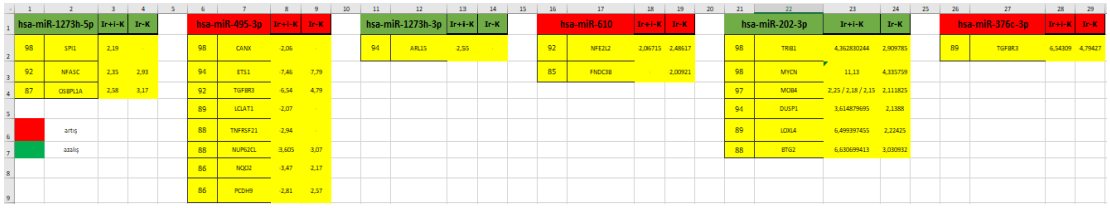
hsa-miR-1273h-3p	Ir+i-K	Ir-K
94 ARL15	-2,55	-
89 VEZF1	2,58	-

hsa-miR-610	Ir+i-K	Ir-K
92 NFE2L2	-2,0671	-2,4862
92 NRIP3	3,42158	2,4038
89 SOX13	2,9411	2,41799
85 FNDC3B	-	-2,0092

hsa-miR-202-3p	Ir+i-K	Ir-K
98 TRIB1	4,362830244	2,909793
98 MYCN	11,13	4,335759
97 MOB4	2,25 / 2,18 /	2,111823
94 DUSP1	3,614879695	2,1388
89 RNF165	-2,015626048	-
89 LOXL4	6,499397455	2,22425
88 BTG2	6,630699413	3,03093
88 COL15A1	-2,108158459	-2,41395

hsa-miR-376c-3p	Ir+i-K	Ir-K
90 EGR3	2,1599942	-
89 TGFBR3	-6,543089	-4,79427
86 WDR44	-4,14 / 3,04	2,177801

Tablo 16. Ekspresyonu artan miRNA'ların ekspresyonu azalan hedef genleri ve ekspresyonu azalan miRNA'ların ekspresyonu artan hedef genlerinin listelenmesi



hsa-miR-1273h-5p	Ir+i-K	Ir-K
98 SPI1	2,19	
92 NFASC	2,35	2,93
87 OSBPL1A	2,58	3,17
artış		
azalış		

hsa-miR-495-3p	Ir+i-K	Ir-K
98 CANX	-2,06	
94 ETS1	-7,46	-7,79
92 TGFBR3	-6,54	-4,79
89 LCLAT1	-2,07	
88 TNFRSF21	-2,94	
88 NUP62CL	-3,605	-3,07
86 NQO2	-3,47	-2,17
86 PCDH9	-2,81	-2,57

hsa-miR-1273h-3p	Ir+i-K	Ir-K
94 ARL15	-2,55	

hsa-miR-610	Ir+i-K	Ir-K
92 NFE2L2	-2,06715	-2,48617
85 FNDC3B		-2,00921

hsa-miR-202-3p	Ir+i-K	Ir-K
98 TRIB1	4,362830244	2,909793
98 MYCN	11,13	4,335759
97 MOB4	2,25 / 2,18 / 2,15	2,111823
94 DUSP1	3,614879695	2,1388
89 LOXL4	6,499397455	2,22425
88 BTG2	6,630699413	3,030932

hsa-miR-376c-3p	Ir+i-K	Ir-K
89 TGFBR3	-6,54309	-4,79427

Aşağıda listelenen veritabanları kullanılarak miRNA tahmini hedef genlerin kodladığı proteinlerin biyolojik fonksiyonları araştırıldı ve tablo haline getirildi.

I.NCBI-Gene (National Center for Biotechnology Information) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene),

II. NCBI-Pubmed (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/),

III.DIANA TOOLS-MirPath v.3, (http://diana.imis.athena-innovation.gr)

microt-CDS-tarbase-targetscan

-Heatmap/Dendrogram

IV.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

WebGestalt algoritmasından yararlanılarak miRNA tahmini hedef genleri, biyolojik süreçlerdeki rollerine göre kategorize edildi. Özellikle farklılaşma ile ilişkili 6 hsa-miR seçildi. Ekspresyonu artan miRNA'lar kırmızı, ekspresyonu azalan miRNA'lar yeşil renkle işaretlenmiştir (Tablo 17).

Tablo 17. Seçilen miRNA'ların tahmini hedef genlerinin biyolojik süreçlerdeki rolleri

hsa-miR-1273h-5p	hsa-miR-495-3p	hsa-miR-1273h-3p	hsa-miR-610	hsa-miR-202-3p	hsa-miR-376c-3p
Kan damarı morfogenezinde yer alan apoptotik süreç	Kan damarı morfogenezi	Endotel hücre gelişimi	Gama-delta T hücre farklılaşmasının düzenlenmesi	Hücre morfogenezi	Hücresel bileşen morfogenezi
	Ventriküler kalp kası dokusu morfogenezi	Endotel hücre farklılaşması	Hematopoietik progenitör hücre farklılaşmasının negatif düzenlenmesi	Hücresel bileşen morfogenezi	Hücre parçası morfogenezi
	Mezenkimal hücre farklılaşması	Endotel gelişimi	Hematopoietik kök hücre farklılaşmasının düzenlenmesi	Uzantı morfogenezi	Hücre morfogenezi
	Eritrosit farklılaşması	Epitel hücre gelişimi	Gamma-delta T hücre farklılaşması	Uzuv morfogenezi	Endotel hücre proliferasyonunun pozitif düzenlenmesi
	Belirgin eritrosit farklılaşması	Kan damarı morfogenezi	Hematopoietik progenitör hücre farklılaşmasının negatif düzenlenmesi		Epitel hücre proliferasyonunun düzenlenmesi
	Hücre proliferasyonunun negatif düzenlenmesi	Epitel hücre farklılaşması	Hematopoietik kök hücre farklılaşmasının düzenlenmesi		Epitel hücre proliferasyonu
	Kas septum morfogenezi	Kan damarı gelişimi			Gama-delta T hücre farklılaşmasının düzenlenmesi
					Belirgin eritrosit farklılaşması
					Ventriküler kompakt miyokard morfogenezi
					Kan damarı morfogenezi

4.2. miRNA Ekspresyon Düzeylerini Belirlemek için QPCR Bulguları

K562, K562-Ir(+) ve K562-Ir(-) hücrelerinden elde edilen cDNA'lar 3 farklı miRNA kontrol grubu (5S rRNA, SNORD48 ve U6 snRNA) ile üç tekrarlı olarak kantitatif PCR yapılmıştır. Çalışmamız için cihazda K562 hücreler hedef, K562-Ir grup hücreler bilinmeyen olarak tanımlanmıştır. Roche Light Cycler kantitatif kapiller PCR cihazı aracılığıyla Ct değerleri elde edilmiş, ΔΔCt değerleri Excell'de uygun formüllerle hesaplanmıştır (Tablo 18).

Tablo 18. Excell üzerinde QPCR cihazından elde edilen ham datadan 'fold change' değerinin manuel olarak hesaplanması

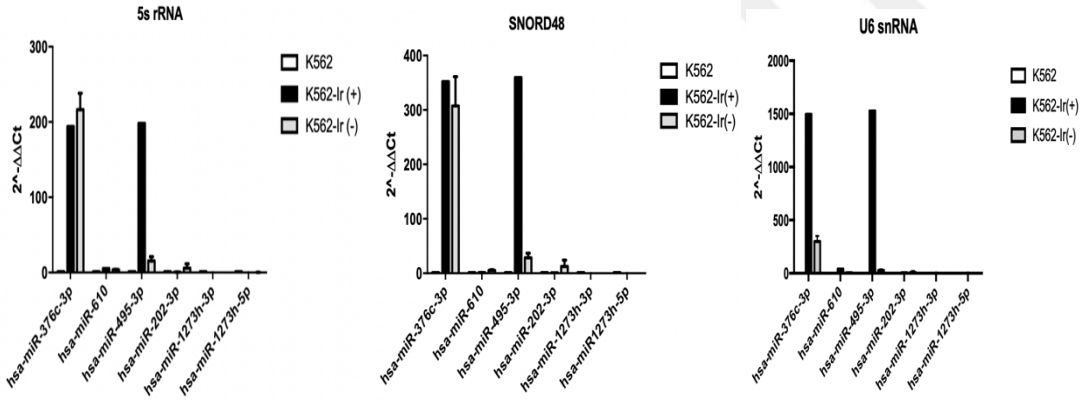
1.Cihazdan elde edilen ham verilerin (CT değeri) aritmetik ortalaması alındı (iki veya üç tekrarlı çalışıldığı için).
2. ΔCt değeri için miRNA kontrol CT değerinden hedef hücre miRNA CT değeri çıkartıldı.
3. ΔΔCt değeri için deney kontrol (K562) ΔCt değerinden hedef hücre miRNA ΔCt çıkartıldı.
4. 2^-ΔΔCt değeri (fold change) için =POWER(2; hedef hücre miRNA ΔCt) formülü kullanıldı.

ΔCt hesaplamaları, 5S rRNA, SNORD48, U6 snRNA kontrol gruplarına göre ayrı ayrı hesaplanmıştır. ΔΔCt değeri için kontrol grubu K562 seçilmiştir. K562-Ir(+) ve K562-Ir(-) değerleri, K562 ΔCt ile karşılaştırılarak hesaplanmıştır. Microarray datasında görüldüğü gibi 3 miRNA'nın ekspresyonu artarken(kırmızı) hedef gen ekspresyonu (fold change) azalmakta, diğer 3 miRNA'nın ekspresyonu azalırken(yeşil) hedef gen ekspresyonu (fold change) artmaktadır (Tablo 19).

Tablo 19 : Seçilen miRNA'ların Microarray datasına göre 'fold change'değerleri

p-Value	log(fold_change)	Transcript ID(Array Design), Probe Set Name
0,0338874	-4,01388	hsa-miR-376c-3p, MIMAT0000720_st
0,0297801	-2,36337	hsa-miR-610, MIMAT0003278_st
0,0028752	-3,140155	hsa-miR-495-3p, MIMAT0002817_st
0,0303694	4,077585	hsa-miR-202-3p, MIMAT0002811_st
0,0225929	4,64063	hsa-miR-1273h-3p, MIMAT0030416_st
0,0001244	3,894565	hsa-miR-1273h-5p, MIMAT0030415_st

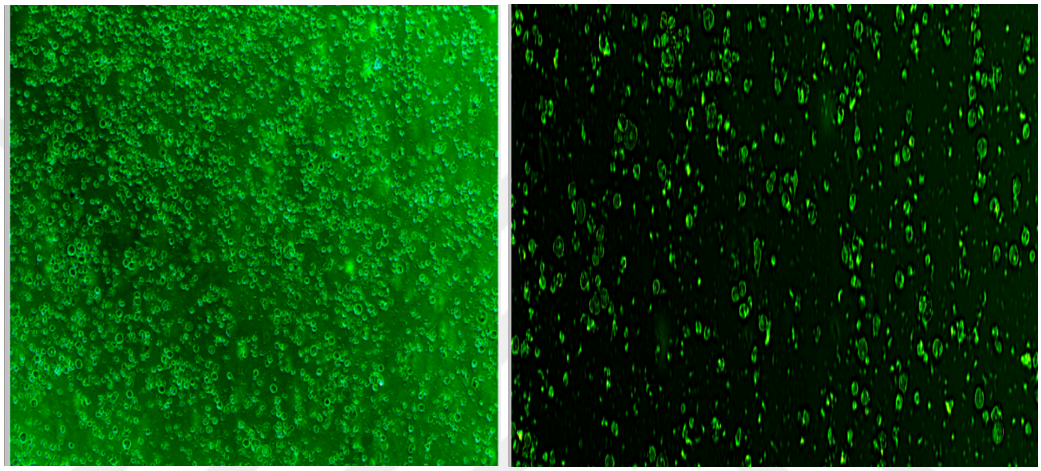
Aşağıdaki QPCR sonuçlarımıza göre oluşturulan grafiklerde hsa-miR-376c-3p, hsa-miR-610 (düşük miktarda), hsa-miR-495-3p'nin ekspresyonu artmakta, diğer hsa-miR-202-3p, hsa-miR-1273h-3p ve hsa-miR-1273h-5p'nin ekspresyonu azalmaktadır (Grafik 1).



Grafik 1. hsa-miR-376c-3p, hsa-miR-610, hsa-miR-495-3p, hsa-miR-202-3p, hsa-miR-1273h-3p ve hsa-miR-1273h-5p'nin 2^-ΔΔCt değerleri

4.3. Neon Sistem Elektroporasyon ile Transfeksiyon Bulguları

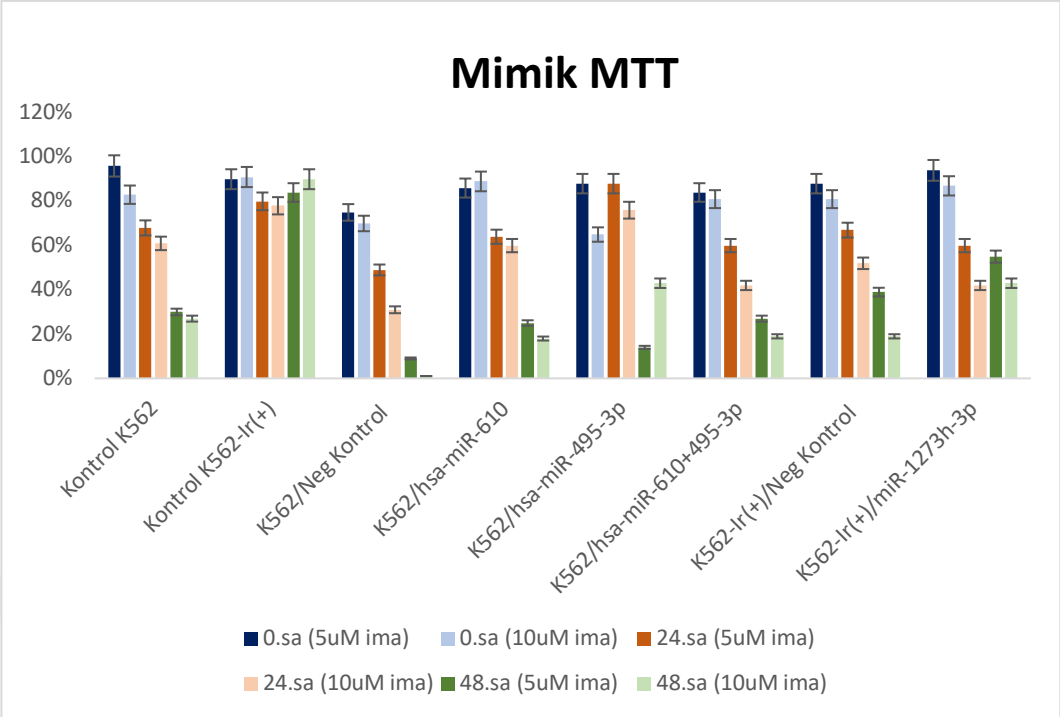
miRNA mimik ve inhibitör transfeksiyonunu yapmadan önce GFP plazmidi (Lego V2) ile yapmış olduğumuz denemeler sonucunda K562 ve K562-Ir (+) hücrelerinin Floresans mikroskobundan elde edilen görüntüleri aşağıdaki gibidir (Şekil 10,11).Yapmış olduğumuz denemeler sonucunda en iyi sonuçlar K562 için 1000 V 40 Ms 4 Puls, K562 Ir (+) için 1200 V 10 Ms 4 Puls olarak belirlenmiştir (Şekil 12). Yapmış olduğumuz transfeksiyon deneylerinde bu koşullar uygulanmıştır.



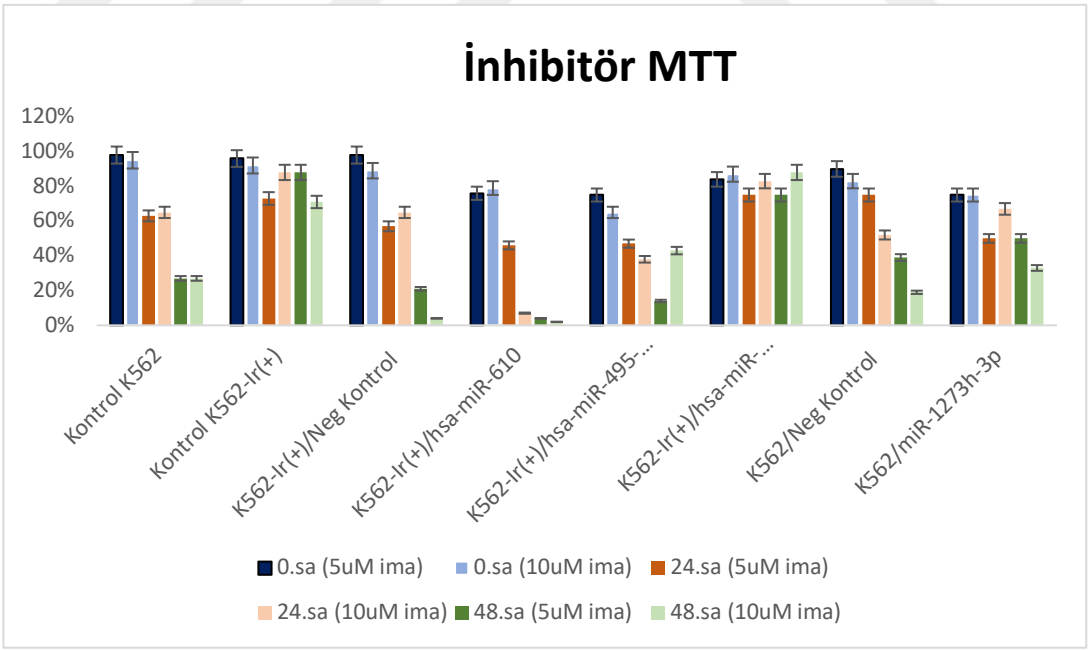
Şekil 12. Sol taraftaki şekil 1000 V 40 Ms 4 Puls ile K562, Sağ taraftaki şekil 1200 V 10 Ms 4 Puls ile K562 Ir (+)'e GFP plazmidi transfeksiyonunun florensans mikroskobu görüntüsü (Rezolüsyon: 265um)

4.4. Transfekte edilen Mimik ve İnhibitör miRNA'ların MTT Canlılık Tayini Bulguları

Dirençli K562-Ir hattında ekspreyonu artmış olan miRNA'lar, imatinib duyarlı atasal K562 hücrelerine mimik olarak transfekte edilmiş ve imatinib duyarlılığında bir değişikliğin olup olmadığına bakılmıştır. Benzer şekilde K-562-Ir hücrelerine inhibitör transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Mimik ve inhibitör transfeksiyonundan sonra yapmış olduğumuz MTT deneyleri sonucunda elde ettiğimiz veriler GraphPad programıyla grafiklendirilmiştir (Grafik 2 ve 3). Görülebileceği gibi hsa-miR-610 ve hsa-miR-495-3p K562 hücrelerinin imatinib duyarlılığını azaltmış kısmen dirençli hale getirmiştir. İnhibitör deneylerinde ise imatinib dirençli K562-Ir hücrelerinde özellikle hsa-miR-610 inhibisyonu, imatinib direncini düşürmektedir.



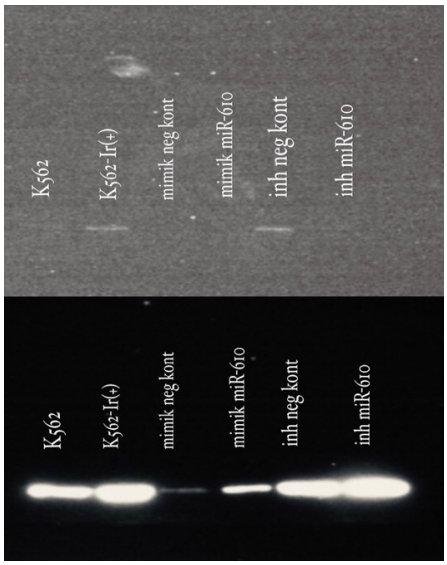
Grafik 2. Kontrol K562, Kontrol K562-Ir (+), K562/negatif kontrol, K562/hsa-miR-610, K562/hsa-miR-495-3p, K562/ hsa-miR-610+ hsa-miR-495-3p, K562-Ir (+)/negatif kontrol, K562-Ir (+)/hsa-miR-1273h-3p mimiklerinin farklı saat (0.sa/24.sa/48.sa) ve dozlarda (imatinibsiz/5uM imatinib/10uM imatinib) MTT sonuçları



Grafik 3. Kontrol K562, Kontrol K562-Ir (+), K562-Ir(+)/negatif kontrol, K562-Ir(+)/hsa-miR-610, K562-ır(+)/hsa-miR-495-3p, K562-Ir(+)/ hsa-miR-610+ hsa-miR-495-3p, K562/negatif kontrol, K562/hsa-miR-1273h-3p inhibitörlerinin farklı saat (0.sa/24.sa/48.sa) ve dozlarda (imatinibsiz/5uM imatinib/10uM imatinib) MTT sonuçları

4.5. Mimik ve İnhibitörü Transfekte edilen hsa-miR-610'un Western Blot Bulguları

hsa-miR-610'ın imatinib direnci üzerindeki etkisi nedeniyle bu miRNA'yı daha yakından incelemek istedik. Ancak literatürde bu miRNA ile ilgili çalışma sayısının çok az olması etkilediği sinyal ileti yolakları hakkında bilgi edinmemizi engelledi. Tek bir çalışmada hsa-miR-610'un WNT yolağında etkili olmasının gösterilmesi üzerine bizim hücrelerimizde de etkili olup olmadığını göstermek amacıyla K562/Negatif kontrol mimik, K562/miR-610 mimik, K562-Ir(+)/Negatif kontrol inhibitör ve K562-Ir(+)/miR-610 inhibitör transfeksiyonundan sonra Western Blot yöntemi ile β-katenin protein miktarının artışına baktık. Wnt yolak aktivasyonunda hücre içi β-katenin miktarlarında artış izlenmektedir. Multifonksiyonel bir protein olan β-katenin, intrasellüler bağlantılarda ve WNT büyüme faktörü sinyal yolağında yer alan önemli bir transkripsiyonel faktördür. Normalde β-katenin düzeyleri sitoplazmada fosforilasyon kaynaklı proteozom aracılı degredasyondan dolayı düşük tutulmaktadır. Wnt sinyalinin aktivasyonu üzerine, glikojen sentez kinaz-3β fosforile edilir ve inhibitör kompleksin ayrışması gerçekleşir. Böylece, β-katenin yıkımının engellenmesiyle sitoplazmada β-katenin seviyeleri artar ve sitoplazmadan çekirdeğe yer değiştirir. β-katenin, transkripsiyon faktörü ve T-hücre faktörü/lenfoid güçlendirici bağlayıcı faktör ile etkileşime girmesi sonucunda hücrenin hayatta kalması, çoğalması, metastazı ve EMT ile ilişkili çeşitli hedef genlerin transkripsiyonunun düzenlenmesini sağlar. Mimiklerin çok etkili olmadığı izlenmesine rağmen K562-Ir hücrelerindeki β-katenin protein düzeyinin, miR-610 inhibitörü eklenmesiyle azaldığı izlenmektedir.



Beta catenin

Aktin

Şekil 13. K562/Negatif kontrol mimik, K562/miR-610 mimik, K562-Ir(+)/Negatif kontrol inhibitör ve K562-Ir(+)/miR-610 inhibitörün ACTB ve β-katenin western görüntüleri

4.6. K562, K562-Ir(+) ve K562-Ir(-) Hücrelerinin Fenotipik Farklılıklarının Gösterilmesi

K562, K562-Ir(+) ve K562-Ir(-) hücreleri arasındaki genetik veya çevresel etkenlerden kaynaklı dış görünüşlerindeki farklılıkları ortaya koymak için bazı immün yüzey belirteçleri belirlendi.

4.6.1.NK Hücreler ve Hematolojik Hücreler ile İlişkili Antikorların Değerlendirilmesi

Özellikle NK hücreler ve hematolojik hücreler için ortak değerlendirebileceğimiz antikorlar seçilmiştir (Grafik 4). Bu antikorların oynadığı rollere kısaca bakacak olursak;

HLA A/B/C : İnsan lökosit antijeni ve β2-microglobulin ile ilişkili MHC sınıf I olarak tanımlanmaktadır. Tüm çekirdekli insan hücrelerinde eksprese edilmektedir.

HLA C : Benzer transkripsiyon ve translasyon seviyelerine rağmen HLA A ve B ye göre daha düşük eksprese edilmektedir. HLA-C alelleri, farklı hücre tiplerinde veya biyolojik koşullarda çeşitli derecelerde etkilenmektedir.

MIC A/B : MHC sınıf I ilişkili protein A ve B olarak tanımlanmaktadır. NK hücreler, sitotoksite ile daha fazla tümör hücresini yok etmek için bu spesifik ligandlarla tümör hücresini tanımaktadır.

PCNA : Çoğalan hücre nükleer antijeni, hücre bölünmesi geçirdiği için hücre döngüsü regülasyonunda ve/veya DNA replikasyonunda yer almaktadır.

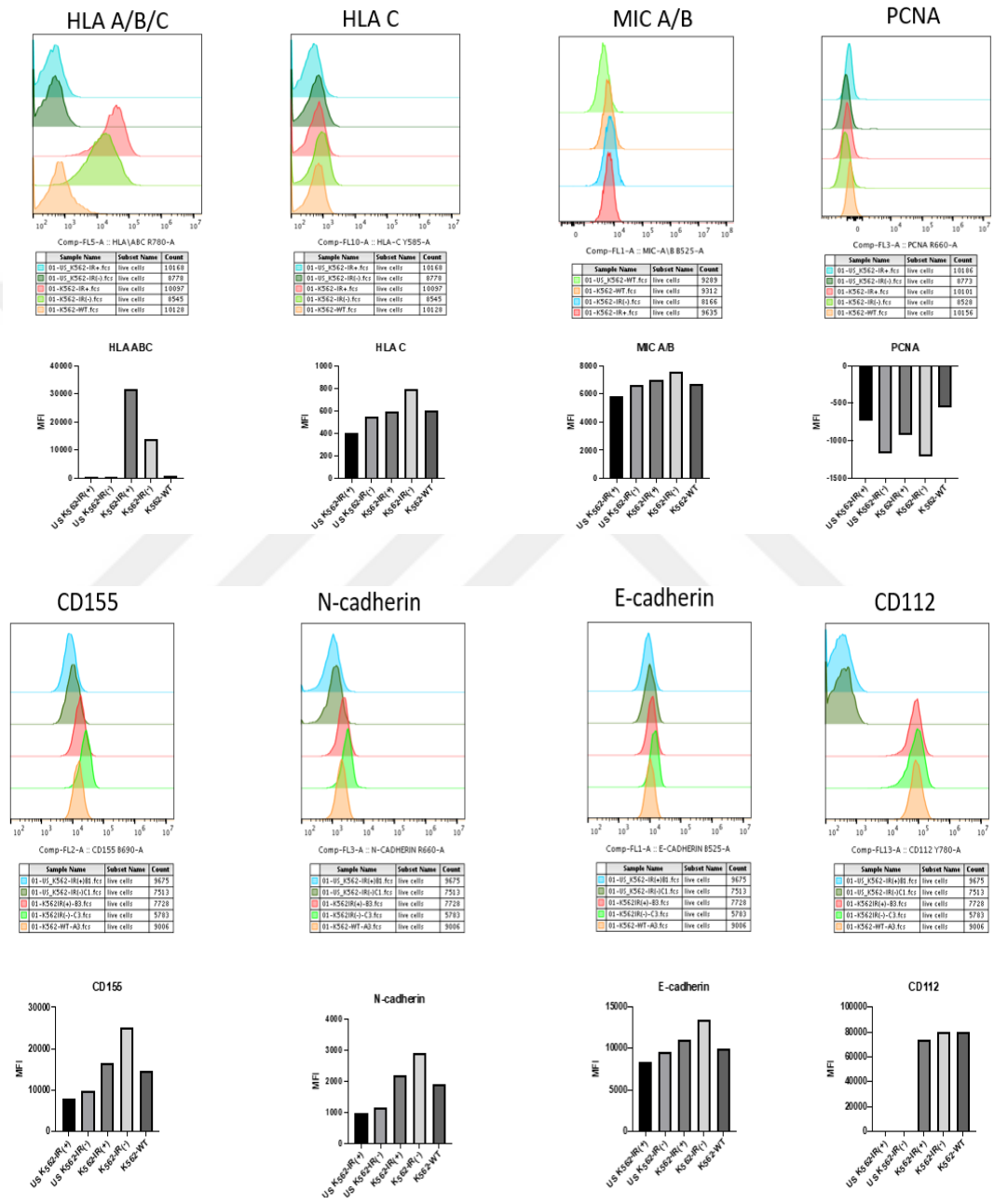
CD155 : İnsanlarda PVR geni tarafından kodlanan poliovirus reseptörü olarak bilinen bir proteindir. Normal hücre ekspresyonlarında adhezyon molekülü olarak işlev görmektedir ve NK hücreler için tanıma molekülüdür.

N-kaderin : Nöral kaderin Ca^{2+} bağımlı hücre-hücre adhezyon molekülüdür ve fonksiyonel olarak lenfoma hücreleri üzerinde aktiftir.

E-kaderin : Epitel hücrelerde eksprese edilir ve hücre-hücre bağlantılarına katkıda bulunan Ca^{2+} bağımlı homofilik etkileşimler sergilemektedir.

CD112 : Nektin 2 olarak isimlendirilen Ig süper ailesine ait adhezyon proteinlerdir. Bağışıklık reseptörleri ile etkileşime girebilmeleri sayesinde bağışıklık yanıtları düzenlemektedir.

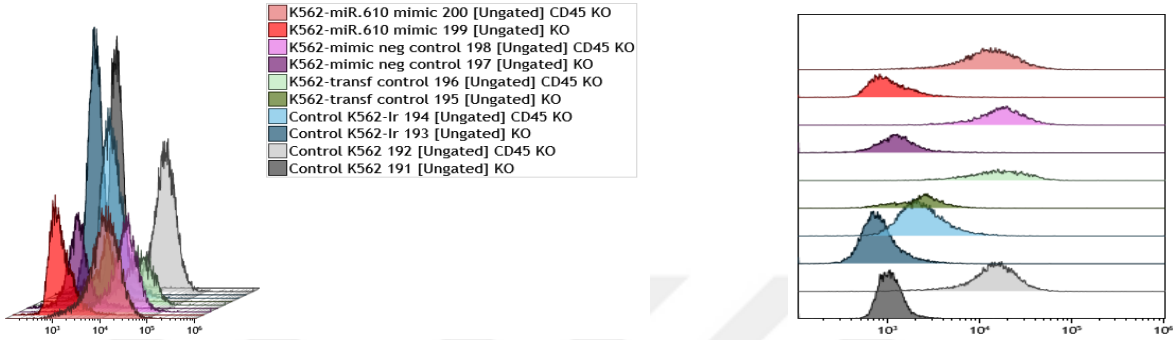
Hücre yüzey belirteçlerine bakıldığında, K562 hücrelerinin MHC sınıf I moleküllerini (HLA-A,B) ekprese etmediği; buna karşın dirençli K562-IR hücrelerinde MHC sınıf I ekpresyonunun bulunduğu görülmektedir. Bu durum özellikle bu hücrelerin NK hücreleri tarafından tanınması açısından önemlidir.

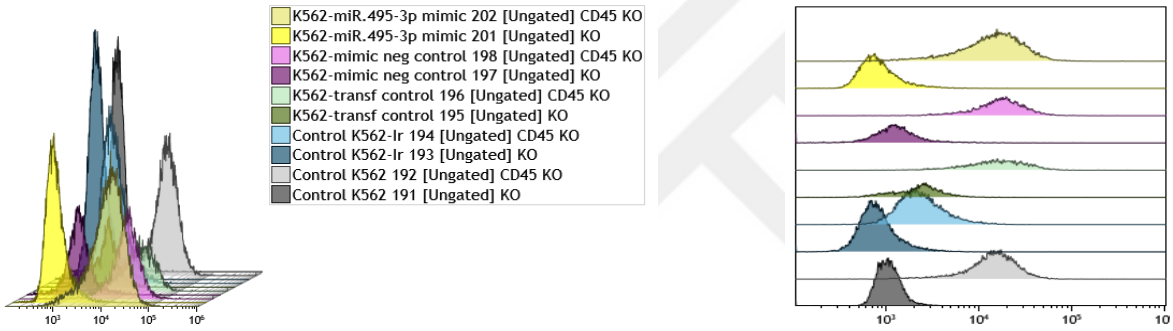


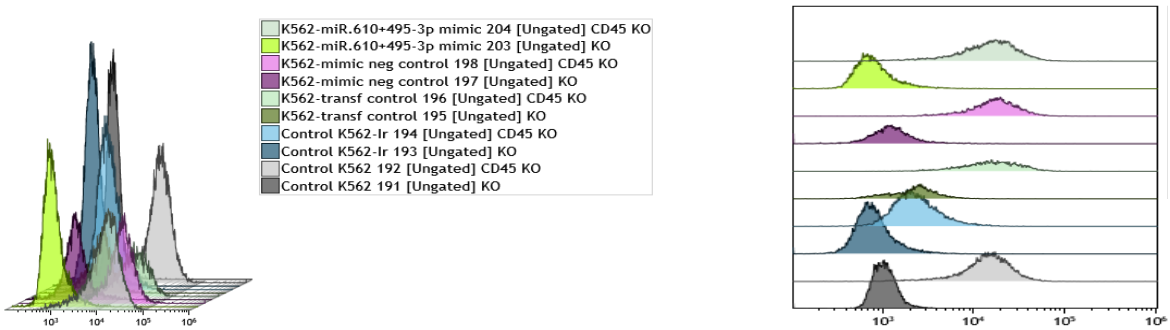
Grafik 4. K562-wt, K562-Ir(+) and K562-Ir(-) hücre gruplarının fenotipik karakterizasyonlarının karşılaştırılması

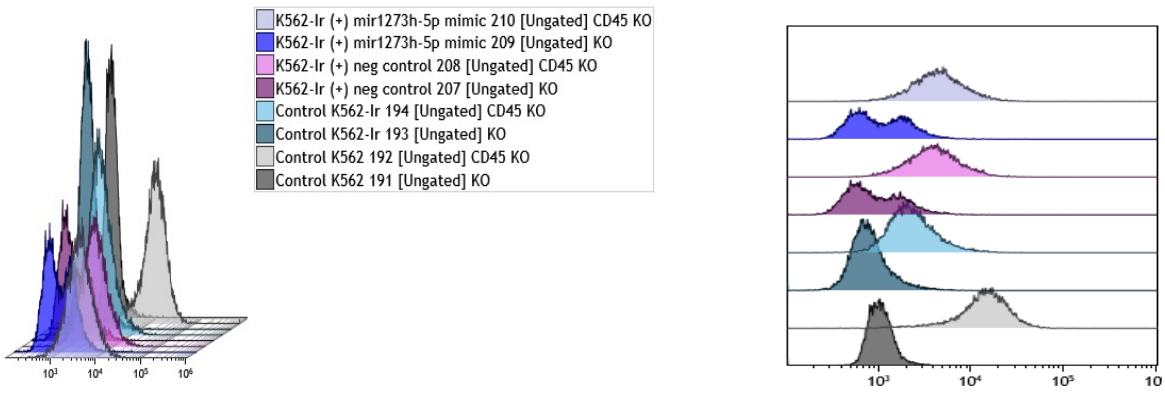
4.6.2.Transfekte Hücrelerde CD-45 ve HLA-DR Antikorlarının Değerlendirilmesi

K562 ve K562-Ir(+) hücrelerine transfekte ettiğimiz mimik ve inhibitör miRNA'ların özellikle hematolojik belirteçlerden CD-45 ve MHC-II reseptörüyle ilişkili HLA-DR antikorlarının grafiklerine aşağıda yer verilmiştir (Grafik 5,6,7,8). Mimic ve inhibitörlerin bakılan belirteç profillerini anlamlı düzeyde değiştirmediği görülmektedir.

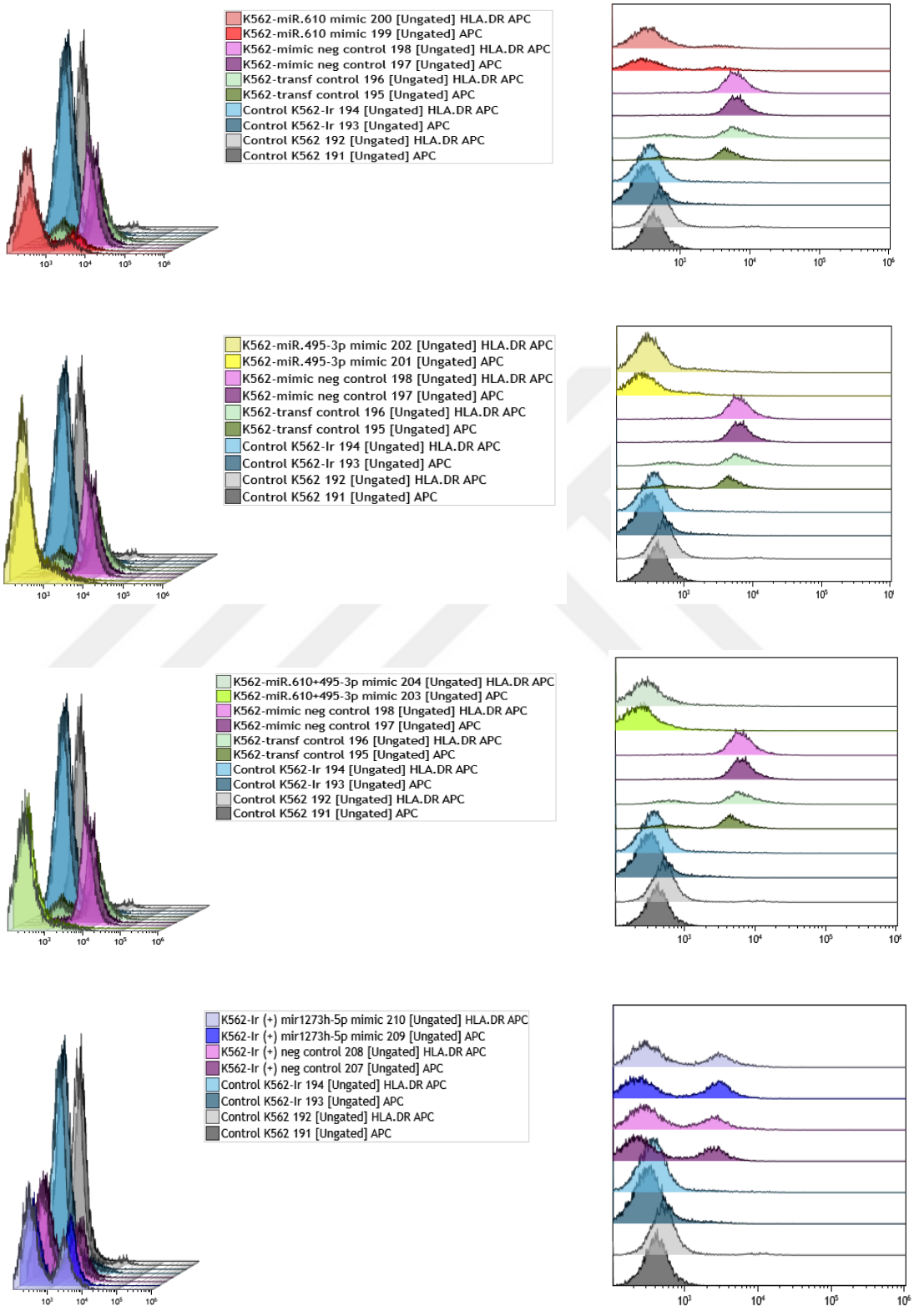




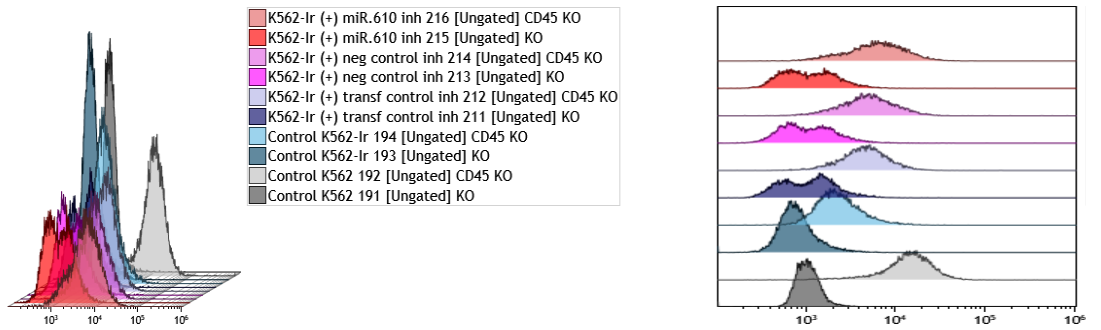


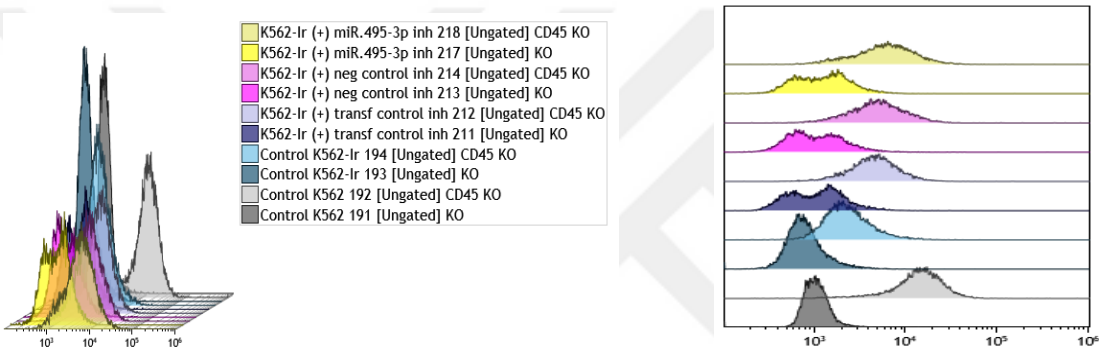


Grafik 5. Kontrol K562, Kontrol K562-Ir (+), K562/negatif kontrol, K562/hsa-miR-610, K562/hsa-miR-495-3p, K562/ hsa-miR-610+ hsa-miR-495-3p, K562-Ir (+)/negatif kontrol, K562-Ir (+)/hsa-miR-1273h-5p mimiklerinin CD45 ekspresyon grafikleri

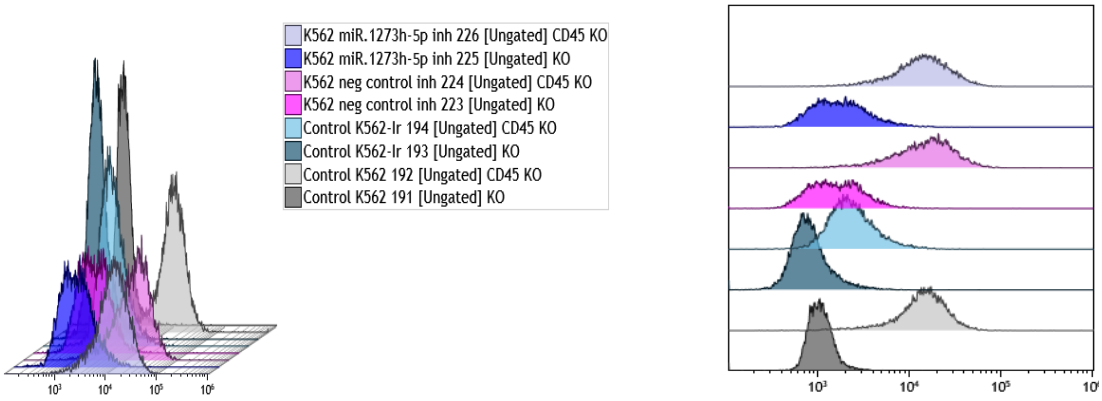


Grafik 6. Kontrol K562, Kontrol K562-Ir (+), K562/negatif kontrol, K562/hsa-miR-610, K562/hsa-miR-495-3p, K562/ hsa-miR-610+ hsa-miR-495-3p, K562-Ir (+)/negatif kontrol, K562-Ir (+)/hsa-miR-1273h-5p mimiklerinin HLA-DR ekspresyon grafikleri

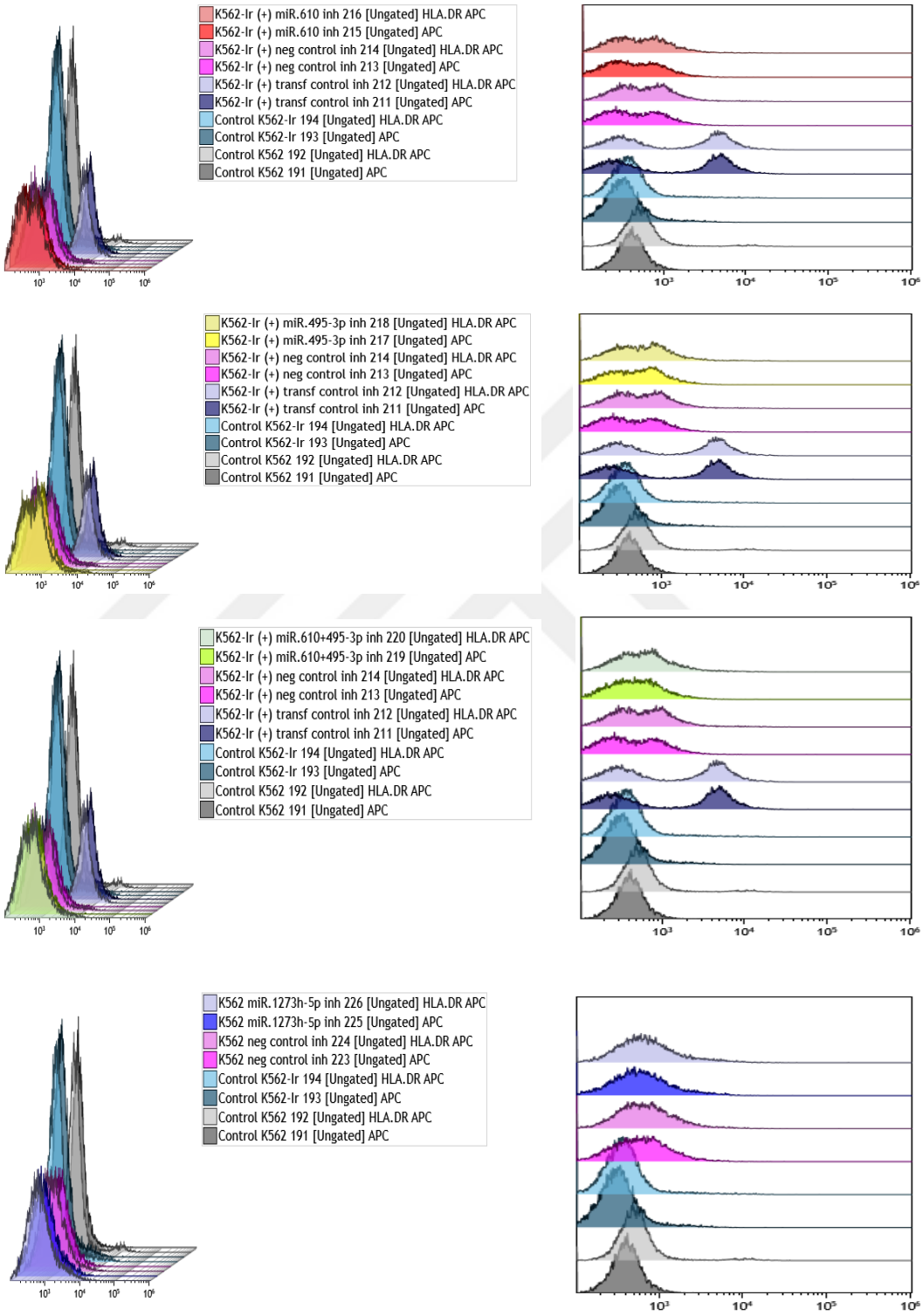








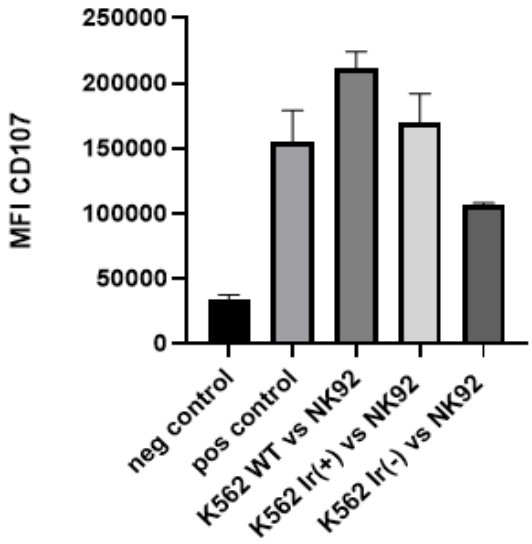
Grafik 7. Kontrol K562, Kontrol K562-Ir (+), K562/negatif kontrol, K562-Ir(+)/hsa-miR-610, K562-Ir(+)/hsa-miR-495-3p, K562-Ir(+)/hsa-miR-610+ hsa-miR-495-3p, K562/negatif kontrol, K562/hsa-miR-1273h-5p inhibitörlerinin CD45 ekspresyon grafikleri



Grafik 8. Kontrol K562, Kontrol K562-Ir (+), K562/negatif kontrol, K562-Ir(+)/hsa-miR-610, K562-Ir(+)/hsa-miR-495-3p, K562-Ir(+)/ hsa-miR-610+ hsa-miR-495-3p, K562-Ir/negatif kontrol, K562-Ir/hsa-miR-1273h-5p inhibitörlerinin HLA-DR ekspresyon grafikleri

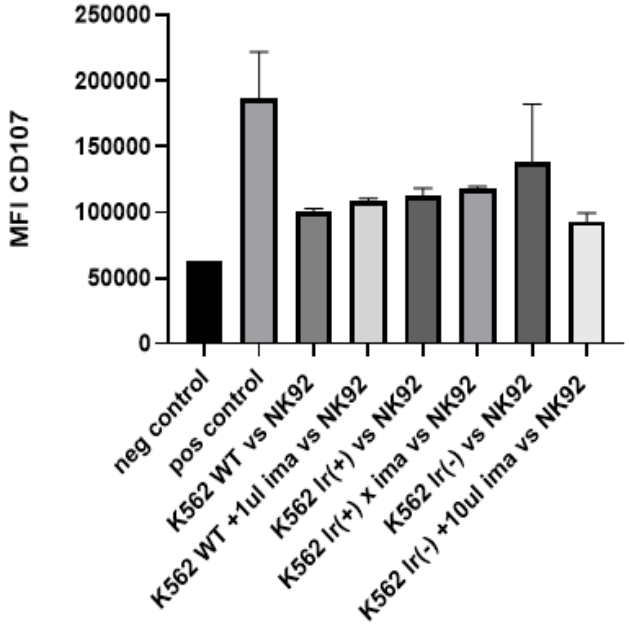
4.7. K562, K562-Ir(+) ve K562-Ir Hücrelerinin NK-92 ve Primer NK Hücrelerle Degranülasyon Sonuçları

Aktive olan NK hücreler, salgıladıkları litik granüller yoluyla hücresel sitotoksisite göstermektedir. Bu granüller, granzim B ve perforin adı verilen efektör moleküller içermektedir. Degranülasyon deneyleri NK hücrelerin sitotoksik fonksiyonlarını ölçmek için kullanılan bi methoddur. Lizozomla ilişkili membran proteini-1 (CD107a veya LAMP-1), lizozomlarda bulunan yüksek oranda glikosile edilmiş bir transmembran proteindir. CD107a, NK hücrelerin ve sitotoksik T hücrelerin litik granüllerinde en bol bulunan proteinlerden biridir. Akış sitometrisi analizi ile değerlendirilen CD107a yüzey ekspresyonu ile NK hücre sitotoksik aktivitesi ve sitokin sekresyonu arasında doğrudan bir korelasyon bulunmaktadır. Bu durum, tümör hücreleri dahil çeşitli uyaranlara karşı immün hücre sitotoksik yanıtların aktivasyonunun değerlendirilmesinde degranülasyonu güvenilir bir test haline getirmiştir. Çalışmamızda 3 farklı gruplama ile degranülasyon deneyi kurduk. İlk degranülasyon deneyimizde K562, K562-Ir(+) ve K562-Ir hücrelerinin CD107 ekspresyon farklılıklarını değerlendirdik (Grafik 9).



Grafik 9. NK92 hücrelerinin K562-WT, K562-Ir (+) ve K562-Ir (-) hücreleriyle stimülasyonu sonucu yüzeylerinde eksprese edilen CD107 ekspresyonları
*Çubuk grafikler hücrelerin ekspresyonlarının ortalama ve standart sapmasına göre düzenlenmiştir.

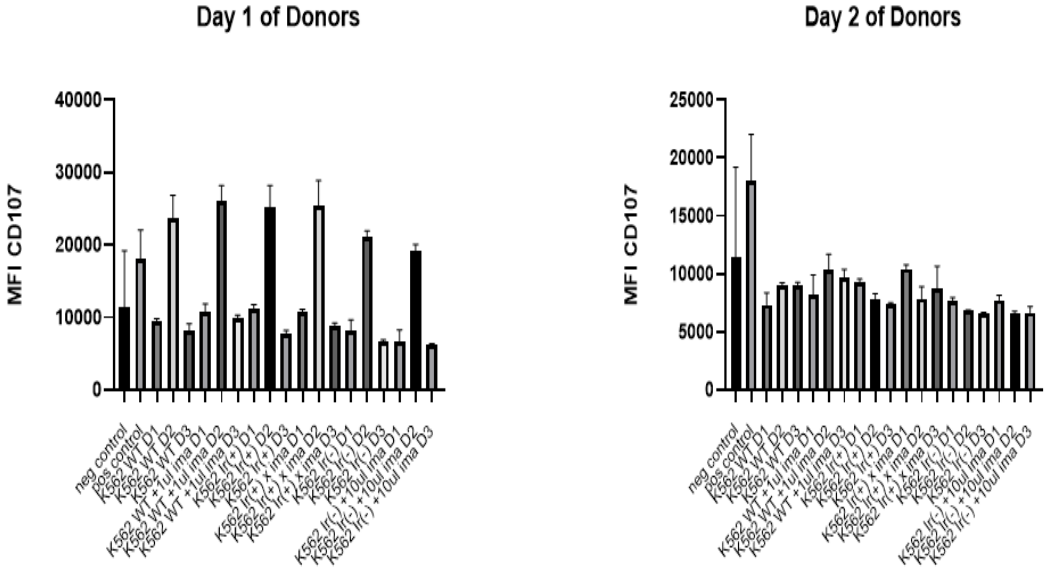
Fenotipik karakterizasyon ve degranülasyon deneylerimiz İsveç Karolinska Enstitüsü'nde gerçekleştirildiği için dirençli hücrelerimiz Dokuz Eylül Üniversitesi'nden kargoyla gönderilmiştir. Hücreler 1 haftada oraya ulaştığı için PBS ile yapılan yıkamalar sonrasında işleme alınmıştır. Deney düzeneği materyal methodda detaylandırılmıştır. İmatinibli/imatinibsiz olarak farklı kombinasyonlarla oluşturduğumuz gruplar deneyimize eklenmiştir. Aşağıdaki grafikte bu hücre gruplarımıza yer verilmiştir (Grafik 10).



Grafik 10. NK92 hücrelerinin K562-WT, K562-WT +1ul imatinib, K562-Ir (+), K562-Ir (+) x ima, K562-Ir (-) and K562-Ir (-) +10ul imatinib hücreleriyle stimülasyonu sonucu yüzeylerinde eksprese edilen CD107 ekspresyonları.
*Çubuk grafikler hücrelerin ekspresyonlarının ortalama ve standart sapmasına göre düzenlenmiştir.

Degranülasyon deney sonuçlarımız, NK hücrelerinin sitotoksik etkilerinin dirençli K562-Ir hücrelerinde –atasal K562'lere oranla- daha düşük olduğunu göstermektedir. Ek olarak imatinib varlığının degranülasyonu arttıran kısmi bir etkisi olduğu da izlenmektedir.

Son degranülasyon deneyimiz, donor NK hücrelerden ardı ardına 2 gün elde edilen primer NK hücrelerle gerçekleştirilmiştir. 3 donorun NK hücreleri kullanılmıştır. Hücrelerin CD107 ekspresyonlarını gösteren grafik aşağıdadır (Grafik 11).



Grafik 11. 2 gün ardı ardına 3 donorden alınan NK primer hücrelerinin K562-WT, K562-WT +1ul imatinib, K562-Ir (+), K562-Ir (+) x ima, K562-Ir (-) and K562-Ir (-) +10ul imatinib hücreleriyle stimülasyonu sonucu yüzeylerinde eksprese edilen CD107 ekspresyonları.
*Çubuk grafikler hücrelerin ekspresyonlarının ortalama ve standart sapmasına göre düzenlenmiştir.
*D1 1.donor, D2 2.donor, D3 3.donor anlamına gelmektedir.

Donör NK hücreleriyle yapılan deney sonuçlarımız daha çok varyasyon göstermekle beraber yine yukarıda elde etmiş olduğumuz, NK hücrelerinin sitotoksik etkilerinin dirençli K562-Ir hücrelerinde –atasal K562'lere oranla- daha düşük olduğu ve nu imatinib varlığının degranülasyonu arttıran bir etkisi olabileceğini destekler niteliktedir.

5. TARTIŞMA

Kronik myeloid lösemi, Philadelphia kromozomu ve onkojenik BCR-ABL füzyon proteinini taşıyan hematopoietik kök hücrelerin miyeloproliferatif bir hastalığıdır. miRNA'lar, hematopoez transkripsiyon regülatörlerinin üyesidir ve düzensiz ekspresyonları KML patogenezi ile ilişkilendirilmektedir. KML hastalarında özellikle primer ilaç direncinin altında yatan sebepleri açıklamak amacıyla yapılan çalışmalar henüz istenilen düzeyde değildir. Literatüre baktığımızda Pubmed'de 'primer TKI resistance in CML' ile arama yaptığımızda 45 makale bulunmaktadır (Haziran, 2021). Bu makalelerden sadece 3 tanesi miRNA'larla ilişkilidir. Bunlardan ilk makalede, dasatinib tedavisinden sonra STAT5A ve 5B sinyal yolaklarını hedefleyen hsa-miR-518a-5p, hsa-miR-527, ve hsa-miR-940 ekspresyonlarının değiştiği gösterilmiştir (62). İkinci makalede, KML'nin imatinib direncinde Circ_0009910 ve ULK1 artarken miR-34a-5p azaldığı gösterilmiştir (63) Üçüncü makalede, K562 hücrelerinin homoharringtonine (HHT)'ye duyarlaştırılmış miR-370 ektopik ekspresyonu ve apoptozu indüklereyerek kısmen FoxM1 hedeflemesi üzerinde çalışıldığı gösterilmiştir (64). Yapılan üç çalışmada da bizim üzerinde çalıştığımız miRNA'lar kullanılmamıştır. Günümüzde, 2.000'den fazla miRNA'nın, insan genomunda bulunan genlerin yaklaşık üçte birinin ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir (65). Bu miRNA'lar arasından yapılacak çalışmaya özgü miRNA seçmek zorlu bir süreçtir. Bu aşamada in-silico çalışmalar, hem çalışılan konuya spesifik miRNA'ları seçmede yardımcı olurken hem de zaman kaybının önüne geçilmesini sağlamaktadır. Biz de yapmış olduğumuz in-silico çalışma sonucunda microarray verimizden seçmiş olduğumuz hsa-miR-376c-3p, hsa-miR-610, hsa-miR-495-3p hsa-miR-202-3p, hsa-miR-1273h-3p ve hsa-miR-1273h-5p üzerinde çalışarak, literatürde özellikle az çalışılmış olan miRNA'ları araştırdık. Özellikle ekspresyonu artan miRNA'nın hedef geninin ekspresyonunun azaldığını, ekspresyonu azalan miRNA'nın ise hedef genin ekspresyonunun arttığını var sayarrak alarak tablolarımızı oluşturduk (66). miRNA veri tabanları sayesinde yapmış olduğumuz kategorizasyonlar sonucunda seçtiğimiz miRNA'ları konfirme ettiğimizde, beklediğimiz gibi 3 miRNA'nın (hsa-miR-202-3p, hsa-miR-1273h-3p, hsa-miR-1273h-5p) ekspresyonunun azaldığını 3 miRNA'nın (hsa-miR-376c-3p, hsa-miR-610, hsa-miR-495-3p) ekspresyonunun arttığını doğruladık. Bu sonuçlar mikrodizin verimizle tamamen uyuşmaktadır. Bu miRNA'ları Pubmed'de taradığımızda, hsa-miR-376c-3p ile ilgili 2 makale, miR-610 ile ilgili 9 makale, hsa-miR-495-3p ile ilgili 5 makale, hsa-miR-202-3p ile ilgili 5

makale, hsa-miR-1273h-3p ve hsa-miR-1273h-5p ile ilgili hiç makale bulunmamaktadır (Haziran, 2021). Çalışmamıza dahil ettiğimiz 3 miRNA'nın literatür taramasına yakından baktığımızda karşımıza çıkan çalışmaları kısaca özetleyecek olursak:

- Li ve ark. (2019) **miR-495-3p**'in, insan karaciğer dokularında SULT2A1'in 3′-UTR'sine doğrudan bağlanarak mRNA degredasyonuna neden olduğunu ve böylece SULT2A1'in baskılandığını göstermişlerdir (67).
- Ni ve ark. (2020) ankilozan spondilit'de potansiyel bir biyobelirteç olduğu savunulan **miR-495'in**, tespit edilen her türlü dokuda yüksek duyarlılık ancak düşük özgüllüğe sahip olduğunu göstermişlerdir (68).
- Lin ve ark. (2021) lncRNA (Uzun Kodlanmayan RNA) GATA3-AS1/**miR-495-3p**/CENPU (Sentromer Protein U) ekseni ile meme kanseri prognozu arasındaki bağlantıyı göstermişlerdir (69).
- Chen ve ark. (2016) plazmadaki **hsa-miR-495-3p'in**, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hastalarında radyosensitivite indikatörleri olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir (70)
- Mastropasqua ve ark. (2021), diyabet hastalarında **hsa-miR-495-3p** ile yaptıkları çalışmada, hsa-miR-495-3p'nin damar densitesi ile güçlü ve anlamlı bir pozitif korelasyona sahip olduğunu gösterilmişlerdir (71).
- **hsa-miR-610'a baktığımızda ise**; Yao ve ark. (2019) miR-610'un aşırı ekspresyonunun, oral skuamöz hücreli karsinom (OSCC)'da açil gliserol kinazı hedefleyerek hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu desteklediğini göstermişlerdir (72).
- Jin ve ark. (2014) ise **miR-610'un**, GJA3 ekspresyonunu hedefleyerek akciğer kanseri hücre proliferasyonunu ve invazyonunu baskıladığını göstermişlerdir (73).
- Miao ve ark. (2018) **hsa-miR-610'un**, kronik tromboembolik pulmoner hipertansiyon (KTEPH) gelişimi için önemli miRNA'lardan biri olduğunu göstermişlerdir (63).
- Mo ve ark. (2016) glioblastomalı(GBM) hastaların tedavi sonucunu tahmin etmek için biyolojik bir belirteç olarak **miR-610'un** kullanılabileceğini göstermişlerdir (73).

- Yan ve ark. (2016) miR-610'un, doğrudan Glioma hücrelerinde MDM2'yi doğrudan hedefleyerek hücre proliferasyonunu, migrasyonunu ve invazyonunu desteklediği ve **miR-610'un** bir hedef geninin tanımlanmasıyla, gliomanın kanserojenik mekanizmalarının anlaşılmasını sağlayabildiği gibi teşhis markırı olarak önemli olabileceği ve glioma tedavisi için kullanılabileceğini göstermişlerdir (74).
- Li ve ark. (2018), FEZF1-AS1'in multiple myelom (MM) onkogenezinde FEZF1-AS1/**miR-610**/Akt3 eksenini düzenleyerek bir tümör onkojenik lncRNA olarak hizmet ettiğini göstermişlerdir (75).
- Chickooree ve ark. (2016), **miR-610'un** oral submukoz fibroz (OSF)'da down regüle edildiğini ve hedef genleri MMP 1 ve TIMP-1 olmasından dolayı OSF'nin kolajen defektinde bir rolü olabileceğini göstermişlerdir (76).
- Wang ve ark. (2012), mide kanserinde **miR-610** ekspresyonunun azaldığını ve doğrudan vazodilatör ile uyarılan fosfoproteini (VASP) hedefleyerek ekspresyonunu baskıladığını ve böylece VASP aracılı hücre migrasyonunun inhibisyonuna ve mide kanserinde invazyona yol açtığını göstermişlerdir (77).
- Zeng ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada, hepatosellüler karsinomada **miR-610'un**, LRP6 ve TBL1X'i doğrudan baskılamasıyla, WNT/β-katenin sinyallemesinin aktivasyonuna yol açmıştır. Böylelikle miR-610'un HCC tanı ve tedavisi için potansiyel bir hedef olabileceği gösterilmiştir (78).

Görülebileceği gibi çalışmaların hiçbiri KML, hematopoetik hücre veya farklılaşmayla ilişkili değildir.

miRNA'ları konfirme etmek için en çok tercih edilen 3 farklı (5S rRNA, SNORD48 ve U6 snRNA) endojen kontrol kullandık. Çünkü MiRNA'lar ve mRNA'lar arasındaki uzunluk farklılıkları izolasyon verimini, revers transkripsiyonu ve amplifikasyon verimliliklerini etkilerken, bu değerler endojen kontroller ve çalışılan transkriptler için benzer olmalıdır. Küçük nükleer RNA (snRNA) ve küçük nükleolar RNA (snoRNA) gibi diğer küçük RNA'lar, miRNA çalışmalarında sıklıkla endojen kontroller olarak kullanılmıştır. Fakat yine de bu küçük RNA'ların uzunlukları, miRNA'lar için yapısal farklılıklar oluşturmaktadır.

miRNA’lar küçük RNA’ların aksine 5’uçlarında fosfotaz, 3’uçlarında ise hidroksil gruplarına sahiptir (79). Bu sebeplerden dolayı, endojen kontroller kararlı bir şekilde eksprese edilmeli ve aynı zamanda hedef miRNA'larla aynı teknik varyasyona sahip olmalıdır (80). Bu yüzden kullandığımız 3 farklı kontrol grubuyla (5S rRNA, SNORD48, U6 snRNA) karşılaştırarak elde ettiğimiz QPCR sonuçlarına göre, hsa-miR-376c-3p, hsa-miR-495-3p ve hsa-miR-610 dirençli hücre gruplarında yüksek eksprese edilirken, hsa-miR-495-3p, hsa-miR-1273h-3p ve hsa-miR-1273h-5p’de düşük eksprese edildiklerini doğruladık. miRNA validasyonunu başarılı bir şekilde tamamladıktan sonra planladığımız gibi transfeksiyon deneyleriyle devam ettik. Ancak pandemiden kaynaklı problemlerden dolayı ancak 3 miRNA (hsa-miR-610, hsa-miR-495-3p, hsa-miR-1273h-5p) üzerinde çalışabildik. Dirençli K562-Ir hücrelerinde ifadesi atmış olan hsa-miR-495-3p ve hsa-miR-610’e ait mimik’leri imatinibe duyarlı atasal K562 hücrelerine transfekte ettik ve imatinib ile muamele ettik. Özellikle hsa-miR-610’in atasal K562 hücrelerine kısmi bir direnç kazandırdığını gösterdik. Benzer şekilde bu miRNA’ları K562-Ir hücrelerinde baskıladığımızda, var olan imatinib direncinin azaldığını gözlemledik.

Tezimde ek olarak bu miRNA’ların lösemi hücrelerine karşı NK hücre yanıtını nasıl etkilediğini incelemeyi amaçladık. NK hücreler, tümör hücrelerine veya virüsle enfekte hücrelere karşı savaşan doğal bağışıklıkta rol oynayan sitotoksik hücrelerdir. Bu hücreler tümörü veya enfekte hücreyi reseptörleri aracılığıyla tanıdığı için öldürme işlemini bu reseptörler aracılığıyla sağlamaktadır. K562 hücrelerinde MHC sınıf I ekspresyonu az veya hiç eksprese edilmemektedir (81). NK hücresinin inhibitör reseptörüne karşılık gelen MHC sınıf I molekülü K562 hücrelerinde ekprese edilmediği için NK hücreleri K562 hücrelerini kolaylıkla öldürebilmektedir. Bu nedenle pek çok çalışmada K562 hücreleri, NK sitotoksisitesi için kontrol olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda dikkat çekici bir sonuç da beklenildiği gibi K562 hücrelerinde MHC sınıf I (HLA-A/B/C) eksprese olmamasına rağmen, K562-Ir(+) ve K562-Ir(-) hücrelerinde eksprese olmasıdır. Bu durum, NK hücrelerinin öldürme mekanizmalarından “missing-self” ve “induced-self” mekanizmasıyla açıklanabilir. K562 hücreleri missing-self mekanizmasını kullanırken, dirençli hücreler K562-Ir(+) ve K562-Ir(-) induced-self mekanizmasını kullandığını söyleyebiliriz (82). Ancak burada önemli olan bu hücreler köken olarak birebir aynı olmasına rağmen MHC sınıf I reseptörlerinin dirençli hücrelerde gözle görülür şekilde artmış olmasıdır. HLA-A ve HLA-B moleküllerinin bağışıklıktaki rolü hakkında çok şey bilinmesine rağmen, HLA-C hakkında nispeten az şey

bilinmektedir. HLA-C daha düşük hücre yüzeyi seviyelerinde ifade edilir, daha az polimorfiktir ve KIR'larla daha kapsamlı etkileşimlere sahip olacak şekilde gelişmiştir, bu nedenle NK hücre yanıtlarının düzenlenmesinde anahtar bir rol oynamaktadır (83). HLA-C, lösemik hücrelerde downregüle edilmektedir (84). HLA-A/B/C transkripsiyon ve translasyonda aynı seviyelerde eksprese edilmelerine rağmen HLA-C, HLA-A ve HLA-B'ye göre daha düşük eksprese edilmektedir. Bunun nedeninin transkripsiyon, transkripsiyon sonrası ve translasyon sonrası düzenlemelerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Düşük HLA-C ekspresyonundan sorumlu mekanizmaların fazla olması nedeniyle, farklı HLA-C alelleri, farklı hücre tiplerinde veya biyolojik koşullarda yine farklı derecelerde etkilenebilir (84).

PCNA ekspresyonu, birçok malign ve malign olmayan hücre tipinin proliferatif aktivitesi ile ilişkilidir. Yüksek PCNA seviyelerinin sadece artan hücre proliferatif aktivitesiyle değil, aynı zamanda DNA onarımıyla ve dolayısıyla kemoterapiye dirençle de ilişkili olduğu bilinmektedir (85). PCNA, Okazaki fragman işleme, DNA onarımı, DNA sentezi, DNA metilasyonu, kromatin yeniden modellemesi ve hücre döngüsü regülasyonu dahil olmak üzere çeşitli süreçlerde yer almaktadır. Akut lösemide immünokimyasal proliferasyon belirtecidir ve KML blastik fazda blast hücrelerinin saptanmasında kullanılmaktadır. PCNA, KML'de aşırı eksprese edilmektedir (86). Bizim sonuçlarımıza göre PCNA'in, dirençli hücrelerde K562'ye göre daha fazla eksprese edildiği görülmektedir. Oysa bu hücrelerin atasal K562 hücrelerinden 4 kat daha yavaş prolifere olduğu bulgulanmıştır (29).

NK için aktivatör reseptör olan DNAM-1'in, CD155 (poliovirüs reseptörü) ve CD112 (Nectin -2) ligandları tarafından uyarılması, NK hücre aktivasyonuna ve hedef hücre lizizine yol açmaktadır. DNAM-1 ligandları, lösemi, miyelom, ovaryum karsinomu ve melanom dahil olmak üzere farklı tümör türlerinde eksprese edilmektedir. Lösemik blast hücrelerinde DNAM-1'in ekspresyonu azalırken, ligandları CD115 ve CD112'nin ekspresyonu artmaktadır (87). CD155, nektin/nektin benzeri aileye ait olan bir adhezyon molekülüdür. Genellikle tümör hücrelerinde aşırı eksprese edilir ve bu durum tümörün çoğalmasına ve immün sistemden kaçışına neden olmaktadır (86). Bizim sonucumuza göre CD155, K562 ve K562-Ir(+) hücrelerinde eksprese edilmekle beraber, özellikle K562-Ir(-) hücrelerinde bu ekspresyon yükselmiş görünmektedir. CD112 ekspresyonları ise, 3 grupta da birbirine yakın eksprese edilmektedir. N-kaderinin yüksek veya de-novo ekspresyonu, metastaz ile ilişkili

kanser nüksü ve progresyonda önemli negatif etkiye sahipolduğu ileri sürülmektedir. N-kaderin, AML ve KML'de lösemik hücrelerin alt popülasyonlarında eksprese edilmektedir ve lösemik kök hücrelerde de marker olarak görev yapmaktadır (87). K562 hücreleriyle karşılaştırdığımızda dirençli hücrelerin daha fazla eksprese olduğu hatta K562-Ir(-) hücrelerinin daha fazla eksprese olduğunu söyleyebiliriz. E-kaderin, embriyonik epitelin oluşumu ve sürdürülmesi, yetişkin organizmalarda ise epitel dokuların homeostazının ve yapısının korunması için son derece önemli bir hücre-hücre adezyon molekülüdür ((88). N-kaderin'de olduğu gibi K562 hücreleriyle karşılaştırdığımızda dirençli hücrelerin daha fazla eksprese olduğu hatta K562-Ir(-) hücrelerinin daha fazla eksprese olduğunu söyleyebiliriz.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

İn-silico çalışmamız sonucunda seçmiş olduğumuz miRNA'ların, doğru seçimler olduğu deneylerimizin tamamlanmasıyla ortaya çıkmıştır. Beklenildiği gibi mikrodizin verisinde ekspresyonu artan miRNA'ların ekspresyonlarının arttığını, ekspresyonu azalan miRNA'ların ekspresyonlarının azaldığı doğrulanmıştır. Mimik ve inhibitör transfeksiyon deneylerimiz sonucunda gerçekleştirdiğimiz MTT deneylerimiz beklenildiği gibi mimik yapılan grupta ilaca direnç gelişirken, inhibe edilen gruptan ilaç direncine karşı duyarlılık görülmüştür. Bu gözlemler özellikle miR-610 için geçerlidir. Fenotipik karakterizasyon deneylerinde K562-Ir hücrelerinde özellikle HLA sonuçları dikkat çekicidir. Yine WNT yolağının miR-610 ile bağlantılı olabileceğini destekleyen verilerimiz bulunmaktadır. Degranülasyon deney sonuçlarımızla NK hücrelerinin de ilaç direnç gelişiminin aydınlatılmasında rolü olabileceği düşünülmektedir. Çalışmalarımız farklı miRNA'ların ilaç direncinde rolünün aydınlatılmasıyla devam edecektir. Bu bağlamda NK hücrelere ağırlık verilerek çalışmanın genişletilmesi planlanmaktadır.

7.KAYNAKLAR

1. Mehranfar S, Zeinali S, Hosseini R, Mohammadian M, Akbarzadeh A, Hosein A, et al. History of Leukemia: Diagnosis and Treatment from Beginning to Now [Internet]. Vol. 6. 2017. Available from: www.gmj.ir
2. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology.
3. Kang ZJ, Liu YF, Xu LZ, Long ZJ, Huang D, Yang Y, et al. The philadelphia chromosome in leukemogenesis. Vol. 35, Chinese Journal of Cancer. BioMed Central Ltd.; 2016.
4. Sieff CA. Perspectives Hematopoietic Growth Factors.
5. Zon LI. Developmental Biology of Hematopoiesis.
6. Khatib S el, Omar M. Nutritional Considerations in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. Cancer and Oncology Research. 2020 Jan;6(1):11–25.
7. Kronenwett R, Butterweck U, Steidl U, Kliszewski S, Neumann F, Bork S, et al. Distinct molecular phenotype of malignant CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells in chronic myelogenous leukemia. Oncogene. 2005 Aug 11;24(34):5313–24.
8. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2020 Jan;70(1):7–30.
9. Chronic Myeloid Leukemia. New England Journal of Medicine [Internet]. 1999 Sep 2;341(10):765. Available from: https://doi.org/10.1056/NEJM199909023411016243290a0.930.full.
12. Hanlon K. Chronic myeloid leukaemia.
13. Alexandrides K, Bessis M, Betke K, Bock HE, Btingeler W, Burchenal JH, et al. ZEITSCHRIFT FOR BLUTFORSCHUNG The miI~:te Chromosome (Ph 1) in chronic granulocytic Leukemia*.
14. Deininger MWN, Goldman JM, Melo J v. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. 2000. nihms-1646224. s41571-020-0367-1.
17. Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J, et al. Chronic myeloid leukemia: An update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet. Vol. 27, Journal of Clinical Oncology. 2009. p. 6041–51.
18. 2013_Book_NeoplasticDiseasesOfTheBlood.
19. Manley PW, Cowan-Jacob SW, Buchdunger E, Fabbro D, Fendrich G, Furet P, et al. Imatinib: a selective tyrosine kinase inhibitor [Internet]. Vol. 38, European Journal of Cancer. 2002. Available from: www.ejconline.com
20. Druker BJ. Imatinib and chronic myeloid leukemia: validating the promise of molecularly targeted therapy [Internet]. Vol. 38, European Journal of Cancer. 2002. Available from: www.ejconline.com
21. Avid D, Avage GS, Aren K, Ntman ha. ımatınıb mesylate-a new oral targeted therapy [Internet]. Vol. 346, drug therapy n Engl J Med. 2002. Available from: www.nejm.org

22. Thomas X. Philadelphia chromosome-positive leukemia stem cells in acute lymphoblastic leukemia and tyrosine kinase inhibitor therapy. World Journal of Stem Cells. 2012;4(6):44.
23. Roumiantsev S, Shah NP, Gorre ME, Nicoll J, Brasher BB, Sawyers CL, et al. Clinical resistance to the kinase inhibitor STI-571 in chronic myeloid leukemia by mutation of Tyr-253 in the Abl kinase domain P-loop [Internet]. Available from: www.pnas.orgcgidoi10.1073pnas.162140299
24. Shah NP, Branford S, Radich JP. Medical Management of CML Chronic Myeloid Leukemia [Internet]. Hematology. 2007. Available from: http://ashpublications.org/hematology/articlepdf/2007/1/371/646294/371_375ash.pdfijms-2006141.2211536611201010001.
27. Jabbour EJ, Cortes JE, Kantarjian HM. Resistance to tyrosine kinase inhibition therapy for chronic myelogenous leukemia: A clinical perspective and emerging treatment options. Vol. 13, Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia. 2013. p. 515–29.
28. Meenakshi Sundaram DN, Jiang X, Brandwein JM, Valencia-Serna J, Remant KC, Uludağ H. Current outlook on drug resistance in chronic myeloid leukemia (CML) and potential therapeutic options. Vol. 24, Drug Discovery Today. Elsevier Ltd; 2019. p. 1355–69.
29. Baykal-Köse S, Acikgoz E, Yavuz AS, Geyik ÖG, Ateş H, Sezerman OU, et al. Adaptive phenotypic modulations lead to therapy resistance in chronic myeloid leukemia cells. PLoS ONE. 2020;15(2).
30. Higgs PG. RNA secondary structure: physical and computational aspects. Vol. 33, Quarterly Reviews of Biophysics. 2000.
31. 35002607.
32. Lee RC, Feinbaum RL, Ambrost V. The C. elegans Heterochronic Gene lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to &II-14. Vol. 75, Cell. 1993.
33. Wightman B, Ha L, Ruvkun G. Posttranscriptional Regulation of the Heterochronic Gene lin-14 by W-4 Mediates Temporal Pattern Formation in C. elegans. Vol. 75. 1993.
34. Bhaskaran M, Mohan M. MicroRNAs: History, Biogenesis, and Their Evolving Role in Animal Development and Disease. Veterinary Pathology. 2014 Jul 1;51(4):759–74.
35. Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V, Robert Horvitz H, Ruvkun G, et al. The lin-14 gene regulates cell fate decisions during Massachusetts General Hospital the early larval stages by generating a temporal gradient of LIN-14 protein during the L1 stage (Ruvkun and Gi-(Reinhart et al., 2000) and the larval lethal phenotypes The suppression of a lethal 6 Present address: Department of Cell Biology and Molecular Genet-phenotype provides a powerful selection for new hetero-We performed F1 and F2 screens for mutations that. Vol. 5, Molecular Cell. 2000.
36. Pillai RS. MicroRNA function: Multiple mechanisms for a tiny RNA? Vol. 11, RNA. 2005. p. 1753–61.
37. di Leva G, Croce CM. MiRNA profiling of cancer. Vol. 23, Current Opinion in Genetics and Development. 2013. p. 3–11.

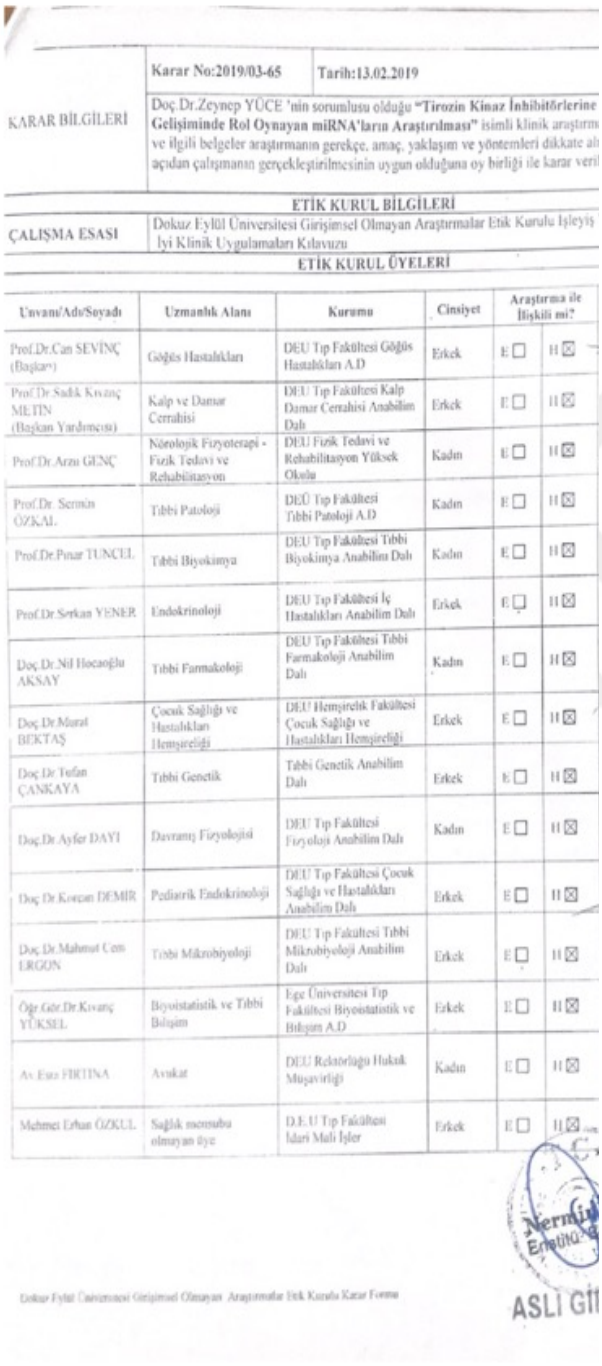
38. Pager CT, Wehner KA, Fuchs G, Sarnow P. Chapter 5 MicroRNA-Mediated Gene Silencing. Vol. 90, Progress in Molecular Biology and Translational Science. 2009. p. 187–210.
39. Gulyaeva LF, Kushlinskiy NE. Regulatory mechanisms of microRNA expression. Vol. 14, Journal of Translational Medicine. BioMed Central Ltd.; 2016.
40. Fabbri M, Croce C, Calin G. MicroRNAs in the ontogeny of leukemias and lymphomas. Vol. 50, Leukemia and Lymphoma. 2009. p. 160–70.
41. Giovannetti E, Erozenci A, Smit J, Danesi R, Peters GJ. Molecular mechanisms underlying the role of microRNAs (miRNAs) in anticancer drug resistance and implications for clinical practice. Vol. 81, Critical Reviews in Oncology/Hematology. 2012. p. 103–22.
42. 41598_2019_Article_46132.
43. Mardani R, Jafari Najaf Abadi MH, Motieian M, Taghizadeh-Boroujeni S, Bayat A, Farsinezhad A, et al. MicroRNA in leukemia: Tumor suppressors and oncogenes with prognostic potential. Vol. 234, Journal of Cellular Physiology. Wiley-Liss Inc.; 2019. p. 8465–86. the ımmune system.
45. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. Vol. 357, Lancet. Elsevier B.V.; 2001. p. 1777–89.
46. Waldhauer I, Steinle A. NK cells and cancer immunosurveillance. Vol. 27, Oncogene. 2008. p. 5932–43.
47. 4951.full.
48. Morvan MG, Lanier LL. NK cells and cancer: You can teach innate cells new tricks. Vol. 16, Nature Reviews Cancer. Nature Publishing Group; 2016. p. 7–19. fimmu-10-02357. nihms110049.
51. Stetson DB, Mohrs M, Reinhardt RL, Baron JL, Wang ZE, Gapin L, et al. Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function. Journal of Experimental Medicine. 2003 Oct 6;198(7):1069–76. JIR2016-1376595. 09_35_lunemann.
54. Cheng M, Chen Y, Xiao W, Sun R, Tian Z. NK cell-based immunotherapy for malignant diseases. Vol. 10, Cellular and Molecular Immunology. 2013. p. 230–52.
55. Ay Od. Trend Semptember 2002. Vol. 163, J. Immunol. 2000.
56. Pegram HJ, Andrews DM, Smyth MJ, Darcy PK, Kershaw MH. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. Vol. 89, Immunology and Cell Biology. 2011. p. 216–24.
57. Hughes A, Yong ASM. Immune effector recovery in chronic myeloid leukemia and treatment-free remission. Vol. 8, Frontiers in Immunology. Frontiers Research Foundation; 2017.
58. Pierson BA, Miller JS. The role of autologous natural killer cells in chronic myelogenous leukemia. Vol. 27, Leukemia and Lymphoma. Informa Healthcare; 1997. p. 387–99.
59. Krusch M, Salih HR. Effects of BCR-ABL Inhibitors on Anti-Tumor Immunity. Vol. 18, Current Medicinal Chemistry. 2011.
60. Wittnebel S, Bourhis JH, Caignard A. Chronic myeloid leukemia and allogeneic natural killer cells: A surprising dialogue. Vol. 2, Expert Review of Clinical Immunology. 2006. p. 627–37.

61. Farnault L, Sanchez C, Baier C, le Treut T, Costello RT. Hematological malignancies escape from NK cell innate immune surveillance: Mechanisms and therapeutic implications. Vol. 2012, Clinical and Developmental Immunology. 2012.
62. Yilmaz AF, Kaymaz B, Aktan Ç, Soyer N, Kosova B, Güneş A, et al. Determining expression of miRNAs that potentially regulate STAT5A and 5B in dasatinib-sensitive K562 cells. Turkish Journal of Biology. 2017;41(6):926–34.
63. Cao H xia, Miao C feng, Sang L na, Huang Y min, Zhang R, Sun L, et al. Circ_0009910 promotes imatinib resistance through ULK1-induced autophagy by sponging miR-34a-5p in chronic myeloid leukemia. Life Sciences. 2020 Feb 15;243.
64. Zhou MR, Zeng JP, Wang XM, Guo Q, Huang T, Shen HY, et al. MiR-370 sensitizes chronic myeloid leukemia K562 cells to homoharringtonine by targeting Forkhead box M1. Journal of Translational Medicine. 2013 Oct 23;11(1).
65. He B, Zhao Z, Cai Q, Zhang Y, Zhang P, Shi S, et al. Mirna-based biomarkers, therapies, and resistance in cancer. Vol. 16, International Journal of Biological Sciences. Ivyspring International Publisher; 2020. p. 2628–47.
66. Li Z, Wang L, Xu J, Yang Z. MiRNA expression profile and miRNA–mRNA integrated analysis (MMIA) during podocyte differentiation. Molecular Genetics and Genomics. 2015 Jun 23;290(3):863–75.
67. Li D, Knox B, Chen S, Wu L, Tolleson WH, Liu Z, et al. MicroRNAs hsa-miR-495-3p and hsa-miR-486-5p suppress basal and rifampicin-induced expression of human sulfotransferase 2A1 (SULT2A1) by facilitating mRNA degradation. Biochemical Pharmacology. 2019 Nov 1;169.
68. Ni WJ, Leng XM. Down-regulated miR-495 can target programmed cell death 10 in ankylosing spondylitis. Molecular Medicine. 2020 May 25;26(1). aging-v13i10-202909.
70. Chen X, Xu Y, Liao X, Liao R, Zhang L, Niu K, et al. Plasma miRNAs in predicting radiosensitivity in non-small cell lung cancer. Tumor Biology. 2016 Sep 1;37(9):11927–36.
71. Mastropasqua R, D'Aloisio R, Costantini E, Porreca A, Ferro G, Libertini D, et al. Serum microRNA Levels in Diabetes Mellitus. Diagnostics. 2021 Feb 1;11(2).
72. Yao L-X, Liu J, Xu L. miR-610 targeting AGK in OSCC.
73. Mo X, Cao Q, Liang H, Liu J, Li H, Liu F. MicroRNA-610 suppresses the proliferation of human glioblastoma cells by repressing CCND2 and AKT3. Molecular Medicine Reports. 2016 Mar 1;13(3):1961–6.
74. Yan Y, Peng Y, Ou Y, Jiang Y. MicroRNA-610 is downregulated in glioma cells, and inhibits proliferation and motility by directly targeting MDM2. Molecular Medicine Reports. 2016 Sep 1;14(3):2657–64.
75. Li Q yu, Chen L, Hu N, Zhao H. Long non-coding RNA FEZF1-AS1 promotes cell growth in multiple myeloma via miR-610/Akt3 axis. Biomedicine and Pharmacotherapy. 2018 Jul 1;103:1727–32.
76. Chickooree D, Zhu K, Ram V, Wu HJ, He ZJ, Zhang S. A preliminary microarray assay of the miRNA expression signatures in buccal mucosa of oral

submucous fibrosis patients. Journal of Oral Pathology and Medicine. 2016 Oct 1;45(9):691–7.
77. Wang J, Zhang J, Wu J, Luo D, Su K, Shi W, et al. MicroRNA-610 inhibits the migration and invasion of gastric cancer cells by suppressing the expression of vasodilator-stimulated phosphoprotein. European Journal of Cancer. 2012 Aug;48(12):1904–13.
78. Zeng XC, Liu FQ, Yan R, Yi HM, Zhang T, Wang GY, et al. Downregulation of miR-610 promotes proliferation and tumorigenicity and activates Wnt/β-catenin signaling in human hepatocellular carcinoma. Molecular Cancer. 2014 Dec 10;13(1).
79. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. Vol. 331, Science. 2011. p. 44–9.
80. Morvan MG, Lanier LL. NK cells and cancer: You can teach innate cells new tricks. Vol. 16, Nature Reviews Cancer. Nature Publishing Group; 2016. p. 7–19.
81. Kaur G, Gras S, Mobbs JI, Vivian JP, Cortes A, Barber T, et al. Structural and regulatory diversity shape HLA-C protein expression levels. Nature Communications. 2017 Jun 26;8.
82. Zipeto D, Beretta A. HLA-C and HIV-1: friends or foes? [Internet]. 2012. Available from: http://www.retrovirology.com/content/9/1/39
83. Giglio A del, O'brien S, Ford RJ, Manning J, Saya H, Keating M, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression in chronic lymphocytic leukemia (CLL). Leukemia and Lymphoma. 1993;10(4–5):265–71.
84. Merkerova M, Bruchova H, Brdicka R. Expression analysis of PCNA gene in chronic myelogenous leukemia-Combined application of siRNA silencing and expression arrays. Leukemia Research. 2007 May;31(5):661–72.
85. Sanchez-Correa B, Gayoso I, Bergua JM, Casado JG, Morgado S, Solana R, et al. Decreased expression of DNAM-1 on NK cells from acute myeloid leukemia patients. Immunology and Cell Biology. 2012 Jan;90(1):109–15.
86. Molfetta R, Zitti B, Lecce M, Milito ND, Stabile H, Fionda C, et al. Cd155: A multi-functional molecule in tumor progression. Vol. 21, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2020.
87. Mrozik KM, Blaschuk OW, Cheong CM, Zannettino ACW, Vandyke K. N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer 11 Medical and Health Sciences 1112 Oncology and Carcinogenesis 06 Biological Sciences 0601 Biochemistry and Cell Biology. Vol. 18, BMC Cancer. BioMed Central Ltd.; 2018. ktib-02-e969112.

8. EKLER

Ek 1. 13 Şubat 2019 toplantı tarihli ve 2019/03-65 karar numaralı Etik Kurul Kararı



KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2019/03-65	Tarih:13.02.2019
	Doç.Dr.Zeynep YÜCE 'nin sorumlusu olduğu **"Tirozin Kinaz İnhibitörlerine Gelişiminde Rol Oynayan miRNA'ların Araştırılması"** isimli klinik araştırm ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate al açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar veril	

ETİK KURUL BİLGİLERİ

ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu

ETİK KURUL ÜYELERİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile İlişkili mi?	
Prof.Dr.Can SEVİNÇ (Başkan)	Göğüs Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları A.D	Erkek	E☐	H☒
Prof.Dr.Sadık Kvanç METİN (Başkan Yardımcısı)	Kalp ve Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E☐	H☒
Prof.Dr.Arzu GENÇ	Nörolojik Fizyoterapi - Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E☐	H☒
Prof.Dr. Sermin ÖZKAL	Tıbbi Patoloji	DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D	Kadın	E☐	H☒
Prof.Dr.Pınar TUNCEL	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E☐	H☒
Prof.Dr.Serkan YENER	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E☐	H☒
Doç.Dr.Nil Hocaoğlu AKSAY	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E☐	H☒
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E☐	H☒
Doç.Dr.Tufan ÇANKAYA	Tıbbi Genetik	Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	Erkek	E☐	H☒
Doç.Dr.Ayfer DAYI	Davranış Fizyolojisi	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E☐	H☒
Doç.Dr.Korcan DEMİR	Pediatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E☐	H☒
Doç.Dr.Mahmut Cem ERGÖN	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E☐	H☒
Öğr.Gör.Dr.Kıvanç YÜKSEL	Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Bilişim A.D	Erkek	E☐	H☒
Av.Esra FIRTINA	Avukat	DEU Rektörlüğü Hukuk Müşavirliği	Kadın	E☐	H☒
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.Ü Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E☐	H☒

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

ASLI GİT

Ek 2. Özgeçmiş

Öğrenim Bilgileri

31 Ocak 2018 - Şu Anda (3 yıl 5 ay)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, MOLEKÜLER TIP (YL) (TEZLİ)
Diploma Numarası: -
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 3.24 / 4.0

01 Eylül 2012 - 01 Ocak 2017 (4 yıl 5 ay)
Lisans, Anadal/Normal Öğretim, EGE ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN FAKÜLTESİ, BİYOLOJİ BÖLÜMÜ

01 Eylül 2010 - 01 Haziran 2012 (1 yıl 10 ay)
Ön Lisans, Anadal/Normal Öğretim, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK HİZMETLERİ MESLEK YÜKSEKOKULU, SAĞLIK PROGRAMLARI BÖLÜMÜ

01 Eylül 2006 - 01 Haziran 2010 (3 yıl 10 ay)
AFYONKARAHİSAR ATATÜRK SAĞLIK MESLEK LİSESİ, TÜRKİYE

Ar-Ge Yetkinlik

Bildiriler

M. SOĞANCI, S. BAYKAL KÖSE & Z. YÜCE, KRONİK MYELOİD LÖSEMİ?DE PRİMER DİRENÇTE ROL OYNAYAN MİRNA?LARIN BELİRLENMESİ AMACIYLA YAPILMIŞ İN-SİLİCO ÇALIŞMA, Poster Sunumu, Uluslararası Katılımlı 13. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, 07 Kasım 2018, 11 Kasım 2018.

Yönetilen Tezler

M. SOĞANCI (Tez Yazarı) , Z. YÜCE (Tez Danışmanı) , Tirozin Kinaz İnhibitörlerine Karşı Direnç Gelişiminde Rol Oynayan miRNA?ların Araştırılması, MOLEKÜLER TIP (YL) (TEZLİ), SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE, 2019.

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Hakemlik/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