

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BCR-ABL POZİTİF HÜCRELERDE TİROZİN
KİNAZ İNHİBİTÖRLERİNİN OTOFAJİK
HÜCRE ÖLÜMÜ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

SEDA BAYKAL

TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2010

(DEU.HSLMSc-2007970126)

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BCR-ABL POZİTİF HÜCRELERDE TİROZİN
KİNAZ İNHİBİTÖRLERİNİN OTOFAJİK
HÜCRE ÖLÜMÜ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ**

TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SEDA BAYKAL

Danışman Öğretim Üyesi: Yard. Doç. Dr. Zeynep Sercan

(DEU.HSI.MSc-2007970126)

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2009.KB.SAG.029 No'lu proje ile desteklenmiştir.

“BCR-ABL pozitif hücrelerde tirozin kinaz inhibitörlerinin otofajik hücre ölümü üzerindeki etkileri“ isimli bu tez 09.08.2010 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

Jüri Başkanı

Yard. Doç. Dr. Zeynep SERCAN
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji A.D.

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Ogün SERCAN
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji A.D.

Jüri Üyesi

Doç. Dr. Gülperi ÖKTEM
Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Histoloji-Embriyoloji A.D.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

Tablo Listesi.....	i
Şekil Listesi.....	ii
Resim Listesi.....	iii
Kısaltmalar.....	iv
Teşekkür.....	v
ÖZET	1
İNGİLİZCE ÖZET	2
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. LÖSEMİLER.....	4
2.1.1. Kronik Myeloid Lösemi: Tanım ve Klinik.....	5
2.1.2. Kronik Myeloid Lösemi: Sitogenetik.....	7
2.1.3. Kronik Myeloid Lösemi: Moleküler Biyolojisi.....	9
2.1.3.1 ABL.....	9
2.1.3.2. BCR.....	11
2.1.3.3. BCR-ABL.....	13
2.1.4. Kronik Myeloid Lösemi: Tedavi.....	16
2.1.4.1. Tirozin Kinaz İnhibitörleri ve İmatinib	17
2.1.4.2. İmatinib Direnci ve Direncin Moleküler Mekanizması.....	19
2.2 PROGRAMLI HÜCRE ÖLÜMÜ.....	22
2.2.1. Apoptoz (Tip I).....	23
2.2.1.1 Apoptozun Moleküler Mekanizması.....	24
2.2.2. OTOFAJİ (Tip II).....	29
2.2.2.1. Otofajinin moleküler mekanizması.....	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1. HÜCRE HATTI ve HÜCRE KÜLTÜRÜ.....	36
3.1.1. K-562 Hücre hattı.....	36
Besi Ortamı Hazırlanma.....	37
3.2. TRİPAN MAVİSİ CANLILIK TESTİ ve HÜCRE SAYIMI.....	37
3.3. İMATİNİB DİRENÇLİ K-562 HÜCRE HATTININ ELDE EDİLMESİ.....	39

3.4. DİRENÇLİ K-562 HÜCRE HATTINDA BECN GEN EKSPRESYONUNUN PROTEİN DÜZEYİNDE BELİRLENMESİ.....	44
3.4.1. Hücre Lizatının Hazırlanması.....	44
3.4.2. Protein Konsantrasyon Ölçümü.....	45
3.4.3. SDS-PAGE Jel Elektrofrezisi.....	46
3.4.4. Jelden Membrana Yarı-Kuru Yöntem ile Protein Transferi.....	47
3.4.5. Western Blot Yöntemi.....	47
3.4.6 Deteksiyon.....	49
3.5 FLUOROMETRİK CASPASE 3 ASSAY KİT İLE APOPTOTİK DAVRANIŞ ÖLÇÜMÜ.....	50
3.6 AKIŞ SİTOMETRİSİ İLE (FLOW CYTOMETRY) ANNEXİN-V APOPTOZ ANALİZİ.....	53
3.7 VEKTÖR TRANSFEKSİYONU YARDIMI İLE OTOFAJİK HÜCRE ÖLÜMÜ ANALİZİ.....	55
3.8 ABL PROTEİNİ KİNAZ BÖLGESİNDE MUTASYON TARAMASI.....	56
3.8.1 RNA İzolasyonu.....	56
3.8.1.1 RNA Miktarı Tayini.....	58
3.8.2 RNA'dan cDNA eldesi	58
3.8.3 POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR).....	59
4. BULGULAR.....	61
4.1 Hücre Hattı Bulguları.....	61
4.2 Western Blot Bulguları.....	67
4.3 FACS Bulguları.....	72
4.3.1 Annexin-V FACS bulguları.....	68
4.3.2 LC3B-RFP FACS bulguları	70
4.4 Kaspaz-3 Analizi Bulguları.....	73
4.5 PCR Bulguları.....	75
4.6 Sekans analizi bulguları.....	76
5. TARTIŞMA.....	81
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	84
7. KAYNAKLAR.....	85
8. EK	88

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1: AMC (7-Amino-4-Methylcoumarin) kalibrasyon grafiği hazırlanması.....	51
Tablo 2 : 96-well plate metoduyla apoptotik davranışın belirlenmesi.....	52
Tablo 3: Doz artırımı yapılmadan önce kontrol ve deney gruplarının karşılaştırılması...	62
Tablo 4: Doz artırımından sonra kontrol ve deney gruplarının karşılaştırılması.....	63
Tablo 5: K-562 deney grubunda direnç kazanma.....	64
Tablo 6: Farklı ilaç dozajlarında K562 hücrelerinde direnç kazanma.....	66
Tablo 7: Akış sitometrisinde optik okuyucudan geçen hücre grubunda ışığa veren hücrelerin yüzdesi.....	73
Tablo 8: Kontrol, kontrol + 1 µM İmatinib (72 saat) ve 8 µM dirençli K562 hücre grubu lizatlarında kaspaz-3 deneyi 360/460 floresans ışığa bulguları.....	74

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1: Hematopoetik kök hücreden hematolojik komponentin farklılaşması	5
Şekil 2: t(9;22)(q34;q11) resiprokal translokasyonunun şematik anlatımı	8
Şekil 3: Abl ve Arg kinazların yapısal domeynleri	10
Şekil 4: Bcr proteinin şematik gösterimi	12
Şekil 5: ABL ve BCR gen kırılma bölgeleri ve bazı farklı kırılma bölgelerinin kodladıkları olası Bcr-Abl füzyon proteinleri	14
Şekil 6: Bcr-Abl pozitif hücrelerde aktive olmuş sinyal yolakları	15
Şekil 7 : İmatinib'in işlev mekanizması	18
Şekil 8: İmatinib direncinin mekanizması	19
Şekil 9: Abl kinaz alanında rapor edilmiş nokta mutasyonlarının bölgelere göre dağılımı	21
Şekil 10: Apoptozda kaspaz silsilesi	25
Şekil 11: Ekstrinsik ve intrinsik apoptotik sinyal ileti yolakları şeması	28
Şekil 12: Otofaji yolağı ve hücre fonksiyonu	31
Şekil 13: Memeli hücrelerinde otofagozom oluşumu ve olgunlaşması	32
Şekil 14: Otofajinin moleküler yolağı	33
Şekil 15: Otofajik vesikül oluşumunda übikitin-benzeri konjügasyon sistemleri	34
Şekil 16: Otofaji yolağı	35
Şekil 17: Annexin-V apoptoz analizi için akış sitometri diyagramı.....	54
Şekil 18: K562 Annexin-V için kontrol grubu FACS analizi verisi	68
Şekil 19: K562 Kontrol grubuna 1 µM İmatinib eklendikten 72 saat sonra yapılan FACS analizi verisi	69
Şekil 20: 8 µM dirençli K562 hücre grubunda FACS analizi verileri	69
Şekil 21: Kontrol grubu LC3B ekspresyonu FACS analizi.....	70
Şekil 22: 24 saat 1µM imatinib'e maruz kalmış kontrol grubu hücrelerinde LC3B ekspresyonu FACS analizi.....	71
Şekil 23: 10µM imatinib dirençli K562 hücre grubunda LC3B ekspresyonu FACS analizi.....	72

RESİM LİSTESİ

Sayfa

Resim 1: KML tanısı almış bir olgunun kemik iliğinden G bantlama ile hazırlanmış karyotipi.....	7
Resim 2: Beclin-1 (BECN-1) proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü.....	67
Resim 3: Beclin-1 (BECN-1) proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü.....	68
Resim 4: HEK hücre hattı cDNA'sıda dört parça halinde çoğaltılmış abl kinaz bölgesinin agaroz jel görüntüsü.....	75
Resim 5: K562 kontrol grubu ve dirençli grup cDNA'sının Abl kinaz bölgesinin dört parça halinde çoğaltılmış agaroz jel görüntüsü.....	75
Resim 6: Abl kinaz bölgesinden bir kesit sekanslama örneği.....	76
Resim 7: Abl kinaz bölgesinin P1 parçasının kontrol grubu ve dirençli grupta sekans karşılaştırması.....	77
Resim 8: Abl kinaz bölgesi P2 parçasının kontrol ve 8µM dirençli grupta sekans karşılaştırması.....	78
Resim 9: Abl kinaz bölgesi P3 parçasının kontrol ve 8µM dirençli grupta sekans karşılaştırması.....	79
Resim 10: Abl kinaz bölgesi P4 parçasının kontrol ve 8µM dirençli grupta sekans karşılaştırması.....	80

KISALTMALAR

ALL: akut lenfositik lösemi

AML: akut myelositik lösemi

KLL: kronik lenfositik lösemi

KML: kronik myelositik lösemi

ABL: Abelson Protoonkogeni

BCR: Breakpoint cluster region

M-BCR: majör BCR

m-BCR: minör BCR

μ -BCR: mikro BCR

GEF: Guanine nucleotide exchange factor

GAP: GTPase aktivating protein

STAT: Signal Transducers and activators of transcription

ROS: Reactif Oxygen Species

INF- α : İnterferon-alfa

HDAC: Histone deacetylase

PI: Propidium iodide

TNF: Tumor necrosis factor

FADD: Fas-Associated protein with Death Domain

TRADD: Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein

IAP: İnhibitor of apoptosis

PARP: Poly (ADP-ribose) polymerase

RIP: Receptor interaction protein

LC3: Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3A

AIF: Apoptosis inducing factor

G (rcf): relative centrifugal force

PBS: Phospate Buffered Saline

SDS: Sodium dodesyl sulphate

BCA: Bi-cincronik acid

RPMI: Roswell Park Memorial İnstitute

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca bilgisini, desteğini ve güleryüzünü esirgemeyen danışmanım Sayın Yard. Doç. Dr. Zeynep SERCAN'a, yardımlarından dolayı Tıbbi Biyoloji A.D. öğretim üyesi Sayın Doç Dr. Ogün SERCAN'a, teknik desteklerinden dolayı Sayın Dr. Halil Ateş'e ve ARLAB çalışanlarına teşekkürü borç biliyorum.

ÖZET

BCR-ABL pozitif hücrelerde tirozin kinaz inhibitörlerinin otofajik hücre ölümü üzerindeki etkileri

Seda BAYKAL

D.E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı İnciraltı/İZMİR

seda.baykal@deu.edu.tr

Programlı hücre ölümünün mekanizmalarını iyi anlamak, bu mekanizmalardaki herhangi bir bozukluk sonucu oluşabilecek hastalıklara karşı geliştirilecek ilaçlar ve tedavi yaklaşımlarını belirlemede önem arz etmektedir. Günümüzde apoptozdan başka nekroptoz, otofaji gibi farklı programlı hücre ölüm tipleri tanımlanmıştır. Kronik myeloid lösemilerde (KML) bir tirozin kinaz olan BCR-ABL kimerik gen ürününün programlanmış hücre ölümüne karşı hücrelerde direnç oluşturduğu ilk 1990'lı yılların sonlarında ortaya konulmuş ve takip eden yıllarda yapılan çalışmalarda doğrulanmıştır. KML tedavisinde kullanılan İmatinib de dahil çoğu kanser ilacının moleküler etki mekanizmaları en çok bilinen programlı hücre ölümü olan apoptotik yolda çalışılmıştır. Bahsi geçen diğer programlı hücre ölüm tiplerindeki etkileşimler ise henüz açıklık kazanmamıştır. Genel olarak KML biyolojisi ve tirozin kinaz inhibitörleri ile tedavisinde diğer programlanmış hücre ölüm şekillerinin rolünü araştırmayı hedeflemektedir. Bu amaçla burada sunulan yüksek lisans tezi kapsamında dirençli bir kronik myeloid lösemi alt hücre hattının üretilmesi planlandı. İmatinib dirençli bir hücre hattı, KML ve tedavisi ile ilgili laboratuvar araştırmalarına büyük katkı sağlayacaktır. Ne yazık ki bu tür tanımlanmış direnç mutasyonlarını taşıyan bir hücre hattı bulunmamaktadır. Bu tür araştırmalar literatürde mutasyon içeren bir BCR-ABL klonunun daha çok fare hücre hatlarına transfeksiyonu ile yapılmaktadır. Tanımlanmış mutasyonlarla İmatinib'e direnç özelliği gösteren bir KML hücre hattı oluşturmanın büyük yararları olacağı görülmüştür. Tez çalışması kapsamında K-562 hücre hattı giderek artan ilaç dozlarına maruz bırakıldı. Bunun sonucunda ilaca direnç kazanan hücrelerin zaman içerisinde klonal seçim yoluyla hayatta kalıp üremesiyle K-562 İmatinib dirençli alt klonlar ürettildi. İmatinib direnci annexinV akım sitometrisi ve kaspaz-3 aktivasyon tayini ile doğrulandı. Dirençli ve kontrol hatlarında otofaji belirteçleri incelendi.

Anahtar kelimeler : KML, otofaji, İmatinib direnci

ABSTRACT

The affect of the tirosine kinase inhibitors on the autophagic cell death in the BCR-ABL positive cells

Seda BAYKAL

D.E.U. School of Medicine Dept. Of Medical Biology and Genetics İnciraltı/İZMİR

seda.baykal@deu.edu.tr

Better understanding of programmed cell death mechanisms is important for determining treatment strategies and designing drugs in which there is a disorder in the cell death mechanisms. Today different types of programmed cell death are identified. In chronic myelogenous leukemia (CML), the resistance toward programmed cell death caused by the BCR-ABL chimeric gene product which is a tyrosine kinase was revealed in the late 1990s and was confirmed in the following studies. Studies are done on the efficacy of drugs inducing apoptosis. Molecular mechanisms of many anticancer drugs are focused on apoptosis including İmatinib which is used in CML. Their efficacy on other types of programmed cell death are not yet determined. Our primary research goal is to investigate the role of other forms of cell death in CML biology and in resistance to therapy. This present study is the part of our preliminary work focusing on the development of a imatinib resistant K562 clon. We applied increasing doses of imatinib to the K-562 chronic myeloid leukemia cell line and we obtained imatinib-resistant subclons. İmatinib resistance was confirmed by annexin-V staining and caspase-3 activation analyses. Autophagic markers were analyzed in the resistant cell line as well as the sensitive control K562 cells.

Keywords: Autophagy, CML, İmatinib-resistance

1. GİRİŞ ve AMAÇ

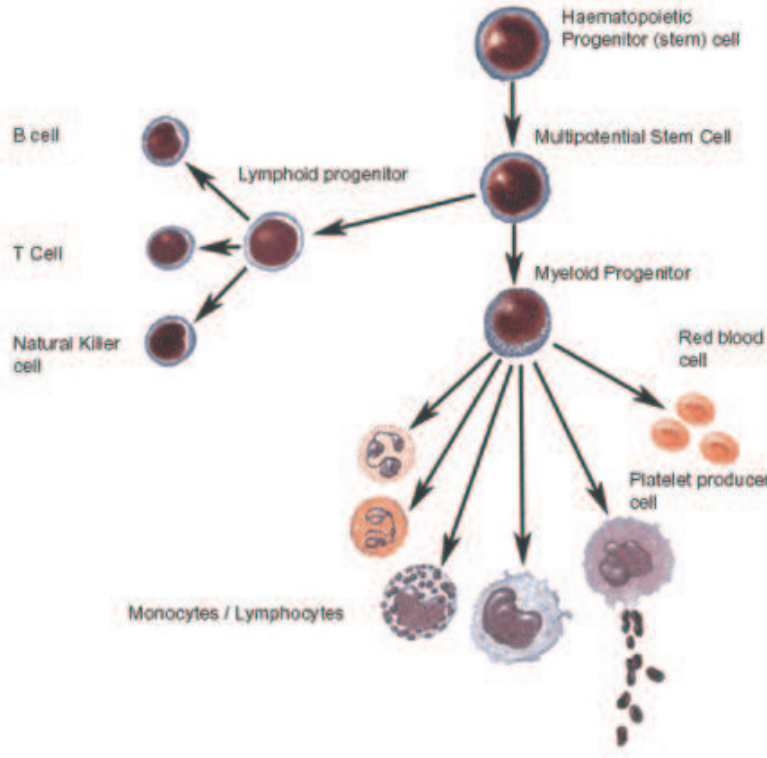
Kronik miyeloid lösemide (KML) olgularının % 90'dan fazlasında 9 ile 22 no'lu kromozomların uzun kolları arasındaki dengeli translokasyon sonucu oluşan Philadelphia kromozomu (Ph) izlenir. Bu translokasyon sonucunda 9q34'de yerleşik ABL geni ile 22q11'de yerleşik BCR genleri kimerik bir gen oluşturur (BCR/ABL). Gen ürünü Bcr-abl hücreye sürekli bir yaşam sinyali sağlarken; hücreleri apoptozdan korumaktadır. BCR-ABL pozitif hücrelerde gözlenen apoptoza direnç, KML'nin kronik fazında gözlenen miyeloid hücre kompartmanının aşırı genişlemesinden sorumlu mekanizmalardan biri olarak tarif edilmektedir. Son yıllarda KML tedavisinde kullanılan ve bir Bcr-Abl kinaz inhibitörü olan İmatinib mesylate BCR-ABL pozitif hücrelerde apoptozu tetikleyebilmektedir. BCR-ABL gen ürününün programlanmış hücre ölümüne karşı hücrelerde direnç oluşturduğu ilk 1990'lı yılların sonlarında ortaya konulmuş ve takip eden yıllarda yapılan çalışmalarda doğrulanmıştır. Ancak bu çalışmalar yapıldığı zaman moleküler mekanizmaları kısmen bilinen tek programlı hücre ölüm şekli apoptozdu. Günümüzde ise farklı programlanmış hücre ölüm tipleri tanımlanmıştır. Amacımız KML biyolojisi ve tirozin kinaz inhibitörleri ile tedavisinde bir başka programlanmış hücre ölüm şekli olan otofajinin rolünü araştırmaktır. Araştırma önerimiz BAP projesi kapsamında kabul görmüştür (Proje no: 2009.KB.SAG.029). Araştırma projemizde İmatinib'e duyarlı ve dirençli KML hücre hatları kullanılarak, İmatinib varlığında otofajik gen ifadelerindeki değişiklikleri gerek protein gerekse mRNA düzeyinde göstermek; buna ek olarak İmatinib sonucu gerçekleşen hücre ölümünün apoptotik ve otofajik fraksiyonlarını göreceli olarak mikroskopik yöntemlerle kantite etmeyi hedeflemekteyiz. Bu bağlamda bu yüksek lisans tezi dahilinde öncelikle kronik myeloid lösemi K-562 hücre hattından dirençli bir alt klon üretiminin ve karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. LÖSEMİLER

Lösemiler kemik iliğinin neoplastik hücrelerle diffüz replasmanı ile karakterize hematopoetik kök hücrelerin malign neoplazmlarıdır. Kanserin başlangıç bölgesi kemik iliğidir. Genellikle lösemik hücreler kana dökülür ve kanda yüksek sayılara ulaşırlar. Bu hücreler aynı zamanda karaciğer, dalak, lenf nodları ve vücuttaki diğer dokulara invaze olurlar. Geleneksel olarak lösemiler tutulan hücre tipi ve hücrelerin olgunluk derecesine göre sınıflandırılır. Buna göre *akut lösemiler* denilen grupta *blast* adı verilen olgunlaşmamış hücre kompartımanının aşırı çoğalması görülür. Kemik iliğini kaplayan ve sürekli çoğalan blastik hücreler olgunlaşmamaktadır. Sonuçta kırmızı hücreler, granülositler ve trombositler gibi olgun myeloid hücreler zamanla kaybolmaktadır ve tedavi edilmediği takdirde hastayı hızla ölüme götürmektedir. *Kronik lösemiler* grubunda ise hücreler farklılaşma kapasitesini taşımakta fakat bunu yetersiz ve düzensiz olarak yerine getirmektedir. Kemik iliği megakaryosit prekürsöleri, garip görünüşlü blastlar, granülsüz megakaryositler gibi anormal hücre popülasyonu ile kaplıdır ve hastalık oldukça yavaş bir seyir gösterir. Akut ve kronik lösemilerin lenfoid progenitörlerin tutulumuyla *lenfositik*, myeloid/eritroid progenitörlerin tutulumuyla *myeloid* (myelositik) olarak adlandırılan iki tipi vardır. Böylece basit bir sınıflandırmayla lösemilerde dört ayrı grup ortaya çıkmaktadır: akut lenfositik lösemi (ALL), kronik lenfositik lösemi (KLL), akut myelositik lösemi (AML), kronik myelositik lösemi (KML) (30).

Hematopoetik hücreler kemik iliğindeki kök hücrelerin farklılaşmasıyla meydana gelir. Bu farklılaşma ve hücre çoğalması kemik iliğindeki stromal hücreler ve hücre dışı matriks tarafından kontrol edilir. SCF, IL-3, IL-6, IL-2, eritropoetin gibi büyüme faktörleri yardımıyla hücreler giderek özelleşmiş karakter kazanırlar (Şekil 1).



Şekil 1: Hematopoetik kök hücreden hematolojik komponentin farklılaşması (Dr. Jeff Drew'un izniyle)

Kromozom sayısındaki artışlar veya kromozom kayıpları gibi anomalilerin yanı sıra özgül translokasyonlar dikkat çekicidir. Bu translokasyonlar iki sebeple kansere yol açar: proto-onkogen aktifleşmesi gerçekleşir veya iki gen transkripsiyon bölgelerinden birleşerek yeni bir füzyon proteini meydana getirirler ve bu protein tümör gelişiminde rol oynar. Genellikle çoğu kanserde olduğu gibi ilerleyen evrelerde genetik ve epigenetik anomaliler birikmeye devam eder (6).

Tezimizde model olarak kronik myeloid lösemi hücre hattı kullandığımızdan, moleküler mekanizmaları daha iyi anlayabilmek adına ilerleyen bölümlerde KML ile ilgili gerekli bilgiler verilmiştir.

2.1.1. Kronik Myeloid Lösemi (KML): Tanım ve Klinik

Kronik myeloid lösemi, olgunlaşmamış myeloid, megakaryosit ve eritroid hücrelerin aşırı çoğalmasıyla karakterize hematopoietik kök hücre hastalığıdır. Tüm lösemilerin %15

kadarını oluşturur ve yıllık insidansı 100.000/1-2 olarak izlenmektedir. Erkeklerde daha sık gözlenmekte olup; ortalama görülme yaşı 45-55'dir. KML insidansı yaşla birlikte artış gösterir. Hastaların %30'u 60 yaş üstündedir. KML vakaların çok az bir yüzdesi (yaklaşık %3 kadarı) çocukluk çağında gözlenir (1). Mutasyonlar germ hücre hattında olmadığından kalıtım riski sıfırdır.

KML klinik açıdan trifazik özellik gösteren bir hastalıktır. *Kronik faz* özellikle miyeloid kompartmanının kontrolsüz genişlemesiyle karakterizedir. Hücre olgunlaşması (matürasyon), duraklama (arrest) veya farklılaşma (diferansiyasyon) süreçleri atlanarak devam eder. Hastalık anemi, splenomegali, hepatomegali, terleme, kilo kaybı gibi sistemik bulgularla ortaya çıkar. Hastalık kemik iliğinin normal diploid elemanlarının yerine, aşamalı olarak kontrol mekanizmalarına duyarsız, olgun myeloid hücrelerin geçmesi ile karakterizedir. Tedavi edilmeyen olgularda zaman içerisinde progresyon gözlenir. Ek somatik mutasyonlarla hücreler farklılaşma yeteneklerini giderek kaybederler. Hastalık ilerledikçe, başlangıçta gözlenen lösemik hücre / normal hücre oranı, lösemik hücrelerin lehine artar. (8) Hastalığın *akselere fazı* ve akut lösemi tablosu gösteren *blastik fazı* izlenir. Akselere faz hastanın tedaviye yanıtında azalma, anemi ve bazofili ile karakterizedir. Bazı hastalarda kronik fazdan direk blastik faza geçiş görülebilir. Blastik fazda hücreler artık

kontrolsüz çoğalmakla birlikte hücre ölümüne direnç göstermektedir. Bcr-Abl aşırı üretimi, artmış EVII gen ürünü, RB1, CDNK2A, TP53, p16 gibi tümör baskılayıcı genlerde mutasyonlar ve kromozom instabilitesi gözlenir (6). Akut lösemilerde blast krizindeki hastada tüm hematopoetik serilerin tutulumu izlenebilmektedir. Tedavi edilmediği takdirde tüm organlarda blast birikimi gözlenebilir. Hasta enfeksiyon, hemoraji, akciğer veya beyin trombozu vb. nedenlerle 3-6 ay içerisinde kaybedilir (2). Hastalığın oluşumunda etkili olan birincil genetik değişiklikler hastalığı taşıyan tüm bireylerde benzer olmakla beraber, bireylerin farklı prognoz ve tedavi yanıtları ikincil mutasyonlara bağlıdır. Hastalığın ilerlemesinde sitogenetik değişiklikler gözlenmektedir. Prognozu daha iyi anlamak adına KML sitogenetiğine değinilecektir.

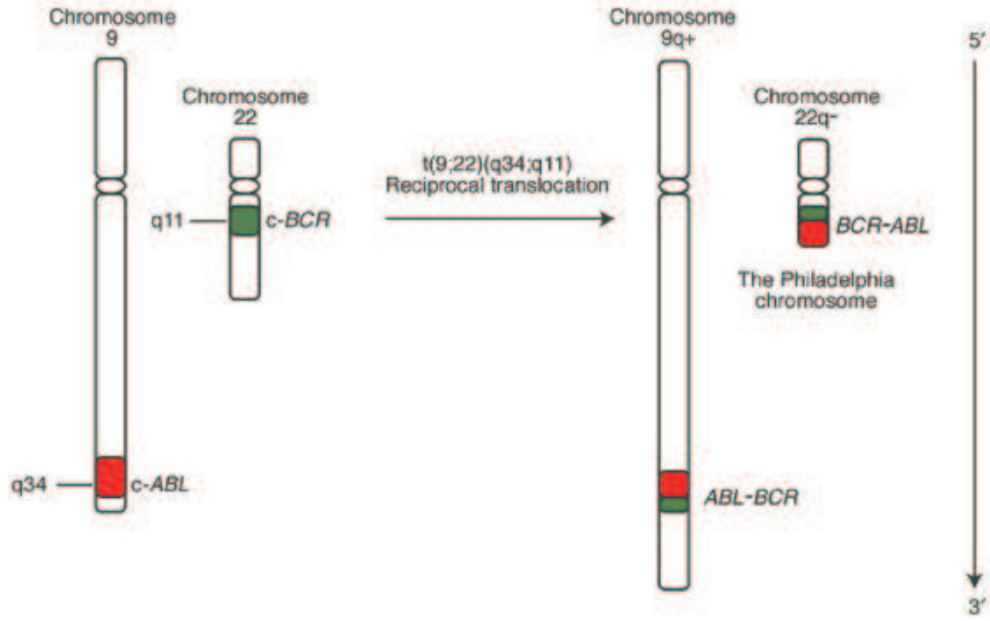
2.1.2. Kronik Myeloid Lösemi: Sitogenetik

1960 yılında Nowell ve Hungerford tarafından tanımlanan KML, insanlarda spesifik bir kromozom anomalisi ile ilişkisi tespit edilen ilk hastalıktır. İlk tanımlandığı şehrin ismini alan Philadelphia kromozomu (Ph) KML vakalarının % 90'dan fazlasında sitogenetik analiz ile tespit edilir (1). Bantlama tekniklerinin henüz gelişmediği bu dönemde Ph kromozomu kısaltılmış bir 21. kromozom olarak kabul görmekteyken, ilerleyen tekniklerle söz konusu derivasyonun bir delesyon değil 9. ve 22. kromozomlar arasında dengeli bir translokasyon olduğu anlaşılmıştır (9) (Resim 1). Bu translokasyon sonucunda 9. kromozomun q34.1 bandında yerleşik ABL proto-onkogeni ile 22. kromozomun q11.2 bandında yerleşik BCR geni 22. kromozomda lokalize BCR-ABL, 9. kromozomda ABL-BCR olmak üzere iki kimerik gen oluşturur (Şekil 2). 22. kromozomda oluşan BCR-ABL kimerik genin ürünü KML'de lösemik fenotipin gelişmesinden sorumludur. Bcr-Abl onkoproteini hücre çoğalmasını tetikleyen sinyal yollarını aktive eder, apoptozu durdurur, hücre adezyonunu azaltır, hücre olgunlaşmasını engeller ve olgunlaşmamış hücrelerin kana salınmasına neden olur (6). Ayrıntılı bilgi ileriki bölümlerde verilecektir.



Resim 1: KML tanısı almış bir olgunun kemik iliğinden G bantlama ile hazırlanmış karyotipi. Derive 9 ve 22. kromozomlar ok ile gösterilmiştir.

(<http://www.roswellpark.org/specialized-services/pathology/cytogenetics>)



Şekil 2: $t(9;22)(q34;q11)$ resiprokal translokasyonunun şematik anlatımı (Expert Reviews in Molecular Medicine, 2003, Cambridge University Press)

Klasik Ph(+) KML olarak tanımlanan kronik fazda karşılaşılan tek kromozomal anomali $t(9;22)$ 'dir. Vakaların %5-10'unda moleküler olarak Bcr-Abl onkoproteinini taşırlar ve varyant translokasyonlar gözlenmiştir (10,11) .

Kronik fazdaki hastaların hemen hepsi $t(9;22)(q34;q11)$ translokasyonunu taşıırken blast krizdeki hastaların %60-80'i ikincil genetik anomali taşımaktadır. Bu anomaliler rastlantısal değildir. Özellikle +8 (vakaların %34'ünde), +Ph (%30), $i(17q)$ (%20), +19 (%13), -Y (erkeklerin %8'i), +21 (%7), +17 (%5), ve - 7 (%5) en sık görülen anomalilerdir. Blast krizindeki Ph pozitif hastaların yaklaşık %71'i +8, +Ph, $i(17q)$ ve +19 anomalilerinin en az birini taşımaktadırlar. KML'nin karyotipik evrimindeki bu değişimlere majör yol denilmektedir. $1p36$, $3p21$, $5q13$, $6p21$, $9q22$, $11q13$, $12p13$, $17p13$, $17q21$, $17q25$, $19q13$, $21q22$, $22q12$, ve $22q13$ gibi rastlantısal olmayan varyant translokasyonlar da gözlenmektedir. Hemen her kromozomun katıldığı anomaliler KML'nin karyotipik evriminde minör yol olarak adlandırılmaktadır. Fakat özellikle +17, -17, -Y, +21 minör yolda dikkat çekicidir. Ayrıca hastanın gördüğü tedavi süreci ve kullanılan ilaçlar ikincil anomalilerin oluşum sürecinde etkili olduğu gözlenmiştir (11,12).

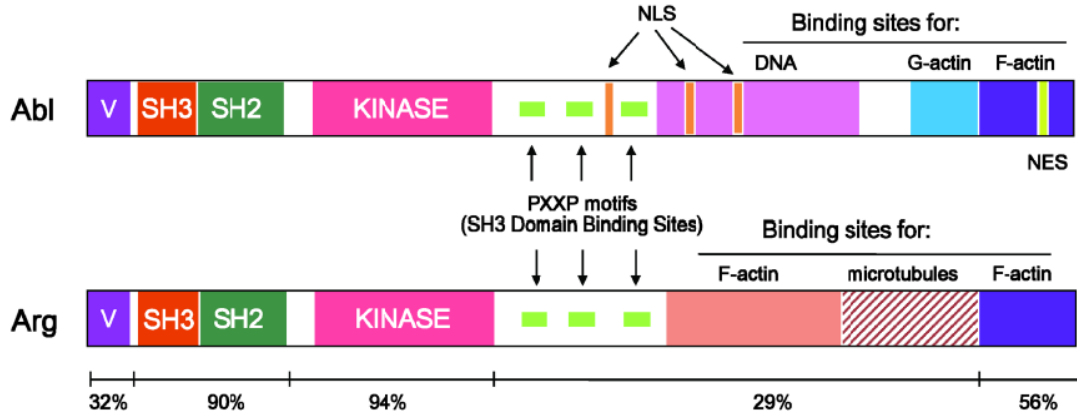
2.1.3. Kronik Myeloid Lösemi: Moleküler Biyolojisi

Reseptör olmayan bir tirozin kinazı kodlayan Abelson protoonkogeni (ABL) 9q34'te, bir fosfoproteini kodlayan "breakpoint cluster region" geni (BCR) 22q11'de yerleşiktir. Philadelphia kromozomunun oluşumu sırasında ABL geni intron 1'den kırılmıştır. BCR geninde ise kırılma noktaları üç bölgede kümelenmiştir (2). Kromozom üzerindeki bu kırılmalar ABL geninde Ib ekzonu öncesi ve Ia ekzonu sonrasında herhangi bir bölgede veya daha sıklıkla bu iki ekzonun arasında gerçekleşir. Bunun tersine adından da anlaşıldığı gibi BCR genindeki kırılmalar genellikle üç bölgeyle sınırlıdır (Şekil 1) (3). Detaylı bilgi ileriki bölümlerde verilecektir.

2.1.3.1 ABL

Bugüne kadar Abl ve Bcr proteinlerinin fizyolojik işlevleri giderek açıklık kazansa da tam olarak tanımlanamamıştır. İnsanda c-Abl protoonkogeni Abelson fare lösemi virüsünde (Abelson Murine Leukemia Virus) bulunan v-ABL'nin homoloğu olarak bulunmuştur. 9 nolu kromozomun q34 bandında, 230 kb uzunlukta olup, 11 tane ekzon içermektedir. Hem sitoplazma hem de nukleusta saptanan ama daha çok nukleusa lokalize olan 145kDa bir reseptör olmayan kinaz proteini kodlar. Gen tüm normal insan hücresinde ifade bulur. Abl proteininin hücre döngüsü, DNA onarımı, stres yanıtları, integrin sinyali iletimi, nöral gelişim ve apoptoz süreçlerinde hücre içi ve hücre dışı sinyallerin düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir.

Ekzon 1, 1a ve 1b olarak adlandırılan iki alternatif form barındırır. Bu ekzonları farklı promotör bölgeleri yönetir. Hangi ekzonun ifade edileceğine bağlı olarak 6kb ve 7kb olmak üzere iki farklı transkripsiyon ürünü vardır. Bu iki mRNA farklı N-terminallere sahip proteinler kodlar. Bu izoformlar Abl (Abl1) ve Arg (Abl2) olarak adlandırılırlar. N-terminalinde Src kinaz homoloji (SH) alanları oldukça korunmuştur. Buna karşılık C-terminalde farklılıklar gösterilmiştir (Şekil 3). Abl'nin C-terminalinde nükleer lokalizasyon sinyali (NLS), nükleer çıkış sinyali (NES) ve DNA bağlanma bölgesinin varlığına karşın Arg'de bu motiflerin yokluğu, Abl'nin hem nükleus hem sitoplazmada barınırken Arg'nin yalnız sitoplazmada barındığını göstermektedir (3,13,14).



Şekil 3: Abl ve Arg kinazların yapısal alanları (Ref. 13)

Proteinin SH1 alanı tirozin kinaz aktivitesi barındırırken, SH2 ve SH3 alanları diğer proteinlerle ilişki kurar. Aktin bağlanma bölgeleri hücre-hücre etkileşimlerinde ve hücre iskeletinden nükleusa sinyal iletiminde rol oynar. Abl'nin DNA'ya bağlanma yeteneği cdc-2 fosforilasyonu ile düzenlenir. DNA'ya bağlandıktan sonra kinaz alanı (domain) (SH1) ile yakında bulunan diğer proteinleri fosforilleyerek transkripsiyonu uyarır. Abl'nin aktivasyonu hücreiçi ve hücre dışı uyaranlarla kontrol edilir. Aktif veya inaktif formunu alması diğer moleküllerle olan etkileşimlerine bağlıdır. Aktif form SH3-SH2 alanlarındaki tirozin rezidülerinin fosforilasyonu ile sağlanır. Bu proses otofosforilasyon veya CDC ailesi gibi fosfatazlarla gerçekleşebilir. Molekülün inaktif edilmesi de yine protein-protein etkileşimlerine bağlıdır. Abi-1 ve Abi-2 (Abl interaction protein 1 ve 2) SH3 alanlarının inhibisyonundan sorumludur. Abl aktifken Abi -1 ve Abi-2 proteozom yıkımına uğramaktadır (3,13).

c-abl hücre döngüsünde önemli bir rol oynar. Cdc-2 tarafından fosforillenmesi, gerek siklin D1 gerek RB1 proteiniyle olan etkileşimi bu görüşü desteklemektedir. c-Abl'nin kinaz aktivitesinin düzenlenmesi, baskılayıcı proteinlere bağlanmak suretiyle gerçekleşir. c-Abl'nin aşırı ifadesi hücre döngüsünün G1 evresinde durmasına neden olur. c-Abl hücre çoğalmasında negatif düzenleyici bir role sahiptir. Brc proteini ile füzyonu sonucunda pozitif etkili bir düzenleyiciye dönüşmektedir (15).

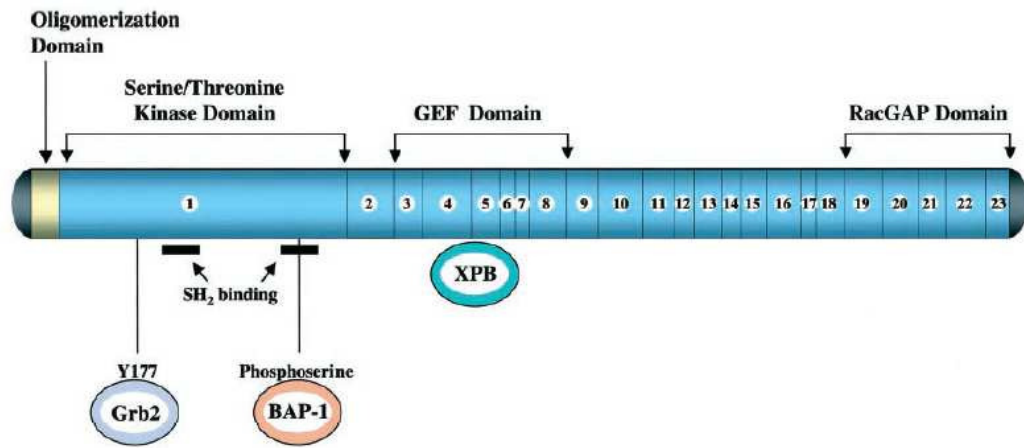
2.1.3.2. BCR

İlk yıllarda Ph(+) hastalarda yapılan araştırmalarda 22. kromozomun q11 bölgesindeki kırıkların 5.8 kb'lık bir alanla sınırlı olduğu gösterilmiştir. Kırıklar intron diziler içerisindedir. Bu bölge çok sayıda kırılma içerdiğinden “breakpoint cluster region” (bcr) adını almıştır. Daha sonraki çalışmalar bu 5.8 kb'lık alanın bir genin (BCR) orta bölgesinde barındığını göstermiştir. BCR 5'-3' yönünde, 5' ucu sentromere yakın yerleşiktir. 130 kb alan kaplayan, 23 ekzon barındıran bir gendir. İlk tanımlanan kırılma bölgesi majör-BCR (M-BCR), ikinci tanımlanan gen bölgesi ise minör BCR (m-BCR) olarak adlandırılır. Daha sonraları mikro BCR (μ -BCR) denilen işlevi henüz tam olarak anlaşılamamış bir bölge daha tanımlanmıştır. G-C açısından zengin 5' ucundaki “untranslated” bölge Ph kromozomunun oluşumu için önemlidir. Çünkü bu prosesi BCR geninin promotor bölgesi regüle eder. Transkripsiyonun başlangıç noktasından 1 kb yukarı yönde CAAT ve TATA kutularının (transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgeleri) işlev gördüğu promotor bölgesi tanımlanmıştır.

Yapılan ilk çalışmalarda ortaya konan ekzon 1, ekzon 2 ve onları ayıran 68kb'lık intron bölgesinin, alternatif ekzon 1 ve alternatif ekzon 2 olacak şekilde düzenlenmiş olduğu ortaya konmuştur. Dolayısıyla 4.5 kb ve 7.0 kb uzunluğunda iki m-RNA transkripti bulunur. 165kDa 'luk aynı stoplazmik proteini kodlarlar. Bcr proteini tüm hücrelerde ifade bulmakla birlikte insan ve fare dokularında yapılan çalışmalarda en çok beyin ve hematopoeik hücrelerde ifade edildiği gösterilmiştir. Bcr proteini öncelikli olarak myeloid farklılaşmasının ilk evrelerinde yoğun bi şekilde ifade bulurken farklılaşmanın ilerleyen basamaklarında ifadesi azalır. Bcr-Abl proteini sürekli yoğun ifade edildiğinden myeloid kompartımının farklılaşma basamaklarında sorun oluşur. Bcr proteininin sitoplazmik yerleşimi olduğu bilinmektedir. Fakat son zamanlarda yapılan çalışmalarda mitotik DNA'ya, özellikle yoğun heterokromatine bağlandığı gösterilmiştir. Bununla birlikte XBP gibi DNA tamirinde görevli proteinlerle ilişkide olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (3,16).

Proteinin ilk ekzonu, bilinen tüm Bcr-Abl füzyon proteinlerinde mevcuttur. Bu bölge serin/treonin kinaz alanı, iki adet SH2 bölgesi ve oligomerizasyon alanı barındırır. Ayrıca bu bölgenin serin/treonin rezidülerinden fosforillenmiş olduğu gözlenir. Bcr-abl füzyon proteininin otofosforilasyonu da gerçekte Bcr üzerindedir. Hidrofobik rezidüler barındıran oligomerizasyon alanı proteinin diğer proteinlerde bağlanmasında işlev görür.

Bu bölgedeki mutasyonlar Bcr'nin Bcr-Abl ile olan bağlantısını zayıflattığı gibi tirozin aktivitesini de düşürür. Bcr, Bcr-Abl'nin F-aktin'e bağlanma kapasitesini arttırırken bölgedeki delesyon Bcr-Abl'nin actin'e bağlanmasını engeller. Bu nedenle Bcr-Abl'in lokalizasyonunda bu bölge kritiktir. Proteinin merkez bölgesi, sinyal iletimi, sitoskelet organizasyonu, hücre büyümesinde rolü olan G proteinlerinin negatif regülatörü olan GEF proteinleriyle homoloji gösterir. C-terminalinde Rac ve Rho GTPazlarını düzenlemekte görevli guanozin-trifosfat aktive edici alanı (GAP) , Ras ailesi üyelerinin düzenlenmesinde rol oynayan bir GDP-GTP değişim alanı ve diğer proteinlerle etkileşimlerinde rol oynayan “coiled-coil” motifi bulunur (Şekil 4). Bu bilgiler ışığında GTP-bağlama özelliği ve fosforilasyon aktivitesi Bcr'nin sinyal ileti yollarında işlevi olduğunu göstermektedir (2,16).



Şekil 4: Bcr proteinin şematik gösterimi. İşlevsel bölge, ekzon 1 karşılığı ona serin/treonin kinaz alanı, GEF alanı ve karboksil ucundaki GAP alanını içerir. SH2 bağlanma bölgeleri ayrıca ekzon 1 içinde gösterilmiştir. Grb2 117. pozisyondaki fosfoprotein ile, BAP1 fosfoserin ile SH2 alanına bağlanır. GEF alanı DNA onarım proteini olan XPB ile etkileşime girer.

2.1.3.3. BCR-ABL:

KML, 22. kromozomda BCR-ABL füzyon geninin oluşumu ile sonuçlanan 9. ve 22. kromozomlar arası resiprokal translokasyon ile karakterizedir. ALL ve AML hastalarında da %5 oranında bu translokasyonun görüldüğü bilinmektedir.

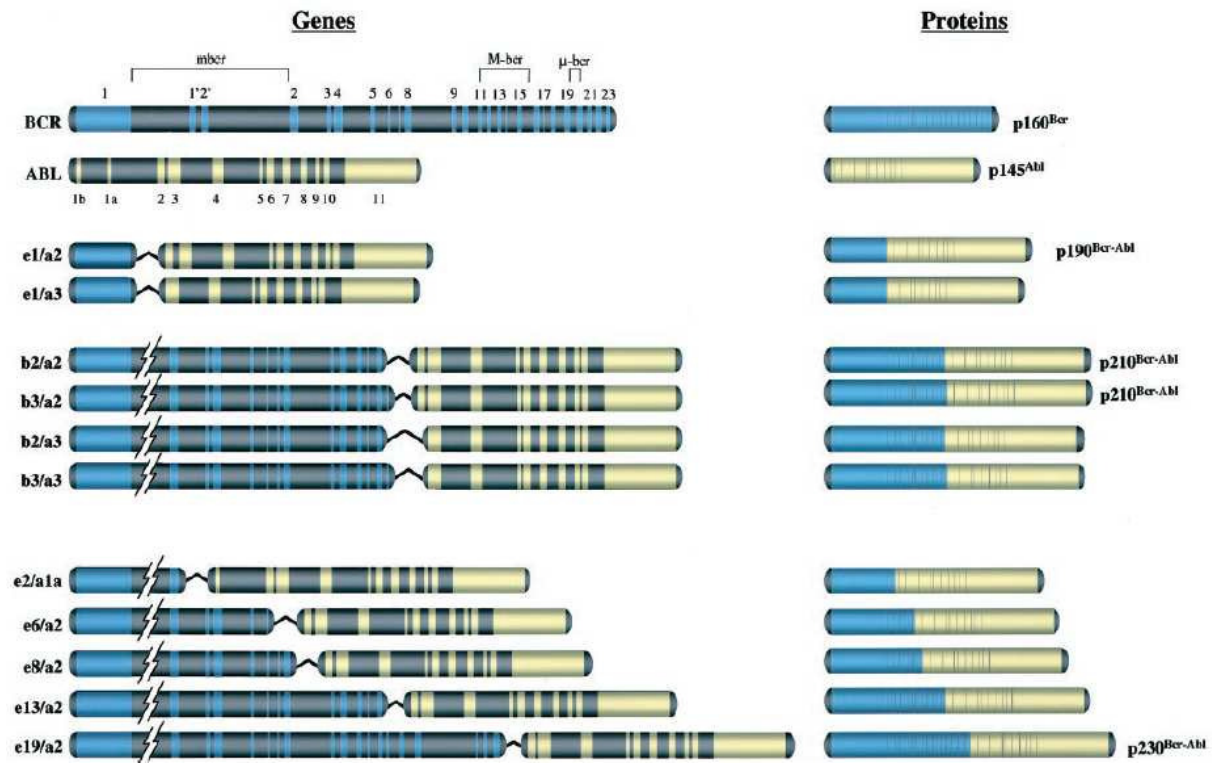
Füzyon sırasında ABL'in 3' ucu BCR'in 5' ucuna eklenir. Bu konfigürasyon füzyon genini BCR promotorunun kontrolüne sokmaktadır. BCR ve ABL genlerinin her ikisi de Alu sekansları içerir. Genler arasındaki bu yeniden düzenlenmeler sırasında çerçeve mutasyonu gözlenmez. "Open reading frame" korunmaktadır (20).

9. kromozomda ABL genindeki kırık 200kb'lık oldukça büyük bir alanda gerçekleşir. ABL genindeki kırık bazı hastalarda 5' uçta iki alternatif ekzon (1a-1b) arasında bazı hastalarda ilk intronun içinde gerçekleşir. 22. kromozomdaki kırılma bölgesi M-bcr'de e12-16'yı (b1-b5) barındıran 5.8 kb'lık bölgedir. Kırık BCR'in ilk intronundan olduğunda (m-bcr) transkript (e1a2) 7.0 kb, M-bcr bölgesinde olduğunda transkript 8.5 kb boyutundadır. M-bcr bölgesinde ABL geninin 2 ekzonuyla birleşerek iki farklı kimerik ürün veren özellikle iki kırılmaya rastlanır. Bu kırılmalar e13-e14 veya e14-e15 arasında gerçekleşir. b2a2 (e13a2) ve b3a2 (e14a2) BCR-ABL transkriptleri oluşur. b2a2, b3a2 transkriptinden 75kb (22 aminoasit) daha büyüktür. Her iki transkript de 210kDa'luk aktif protein kinazı kodlar. ABL'nin 2. ekzonu tüm BCR-ABL transkriplerinde barınmaktadır (16,17). BCR geni içerisinde μ -bcr bölgesindeki kırık e19-e20 arasında gerçekleşir. BCR ABL'e 1a ve a2 intronlarından füzyon yapar, e19a1 ve e19a2 transkriptleri oluşur. 230kDa'luk proteini kodlar (Şekil 6). Bu kırılma KML hastalarında çok nadir olarak gerçekleşir (tespit edilmiş 15 hasta) (21).

BCR-ABL transkripti her ne kadar lösemilere has görünse de t(9;22) translokasyonunun sağlıklı insanlarda da gerçekleştiği ileri PCR teknikleriyle gösterilmiştir. Bu durum hücre döngüsü sırasında iki kromozomun çok yaklaştığı S fazından G2 fazına geçerken gerçekleştiği ve hatanın immün sistem tarafından algılandığı düşünülmektedir (17).

9. ve 22. kromozomlar arasındaki resiprokal translokasyon sonucu derivate 9'da bulunan ABL-BCR geninin son yıllara kadar KML patogenezinde rolü olmadığı ileri sürülmüştür.

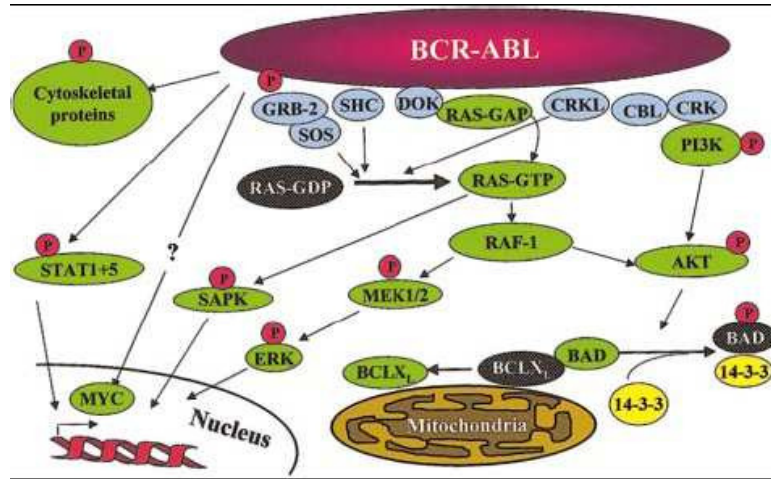
ABL-BCR geninden transkribe olan ürünlerin (a1bb3- p40 ve a1bb4-p96) KML'deki rolü henüz tam olarak açığa kavuşmamıştır. Fakat yeni yapılan in vitro çalışmalarda p210 Bcr-abl gibi lökemojenik olduğu, p210 un aksine hematopoeik kök hücrelerin çoğalmasında etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca a1bb3 ve a1bb4 transkriptlerinin CD4+ ve CD8+ T lenfositlerinde HLA-A2 tarafından sunulduğunu gösteren çalışmalar vardır (18,19).



Şekil 5: ABL ve BCR gen kırılma bölgeleri ve bazı farklı kırılma bölgelerinin kodladıkları olası Bcr-Abl füzyon proteinleri. BCR geninde ekzon 1' ve 2' ilk intron içinde alternatif ekzonlardır. ABL geninin sırasıyla 1b ve 1a olarak iki alternatif ilk ekzonu vardır. Tanımlanmış füzyon transkriptlerinden kodlanan çeşitli proteinler gösterilmiştir. (Boyutları verilmemiş olan proteinler henüz jel üzerinde gösterilememiştir.) (Ref. 17)

Bcr-abl kimerik proteini proteini 210 kDa boyutundadır (μ-bcr bölgesi barındıran transkript 230kDa'dur). Abl kısmında SH1, SH2 protein interaksyon bölgesi, aktin

bağlanma bölgesi ve Bcr kısmında fosfoserintreonin sekansları ve tirozin barındırdan coiled-coil motifi proteinin işlevinde önemlidir. Yapısal tirozin kinaz aktivitesi çok artmıştır. Abl'in aksine sitoplazmada lokalizedir. Bcr-abl bir çok sitoplazmik substratı fosforile eder, büyüme ve farklılaşmayı ve muhtemelen hematopoetik hücrelerin adezyonunu kontrol eden sinyal yollarını aktive eder. STAT (signal transducers and activators of transcription) moleküllerini; GRB-2 ve Crkl gibi Ras aktive edici adaptör moleküller aracılığıyla da mitojenik sinyal yollarını aktive ederek, hücre proliferasyonunu artırır ve kontrolsüz büyümeye neden olur. Ayrıca aktin moleküllerine bağlanarak paxillin, talin gibi sitoskelet düzenleyicilerini, FAK gibi fokal adezyon komplekslerini fosforilleyerek hücre adezyonunu değiştirir. Bcr-abl hücreye sürekli bir yaşam sinyali sağlarken; STAT/Akt/PI3K molekülleri üzerindeki etkisiyle mitokondri üzerinden hücrelere anti-apoptotik özellik kazandırır ve proliferasyon artar. (Şekil 6) (3, 4,6).



Şekil 6: Bcr-Abl pozitif hücrelerde aktive olmuş sinyal yolları (Ref.3)

Bcr-Abl endojen oksijen reaktiflerinin (ROS) salınımını artırarak hücre döngüsünün S ve G1/M fazlarında kronik oksidatif DNA hasarına, çift iplik kırıklarına dolayısıyla mutajenezeye yol açar. Birçok genin kodlanan bölgelerinde (BCR-ABL de dahil olmak üzere) tranzisyon ve transversiyonları indükler. ROS salınımı ve daha önce bahsedilen DNA onarımı proteinleriyle olan ilişkisiyle KML'de genomik instabilite ile sonuçlanan mutator fenotip ve sitogenetik anomalilerin sorumlusudur. Tümör süpresör

genlerindeki mutasyonlar ve bu genlerin ürünleriyle olan ilişkisi hastalığın patogeneğinde önemlidir. P16 ve p14 gibi tümör süpresör genlerindeki mutasyon/delesyonlar p53'ün ifadesinde azalmaya ve G1/S fazı siklin D-cdk4/cdk6'nın inhibisyonuna yol açar. P16 homozigot delesyonu ve p53 mutasyonları çoğu blastik krizdeki hastada gözlenmektedir (22).

Tezimizde KML tedavisinde kullanılan İmatinib mesilat ile çalıştık. KML'nin geçmişten günümüze tedavi yöntemlerine göz atalım.

2.1.4. Kronik Myeloid Lösemi: Tedavi

Uzun yıllardan beri BCR-ABL kimerik gen ürününün, hematopoetik hücreleri apoptotik uyarılara karşı koruduğu bilinmektedir. BCR-ABL pozitif hücrelerde gözlenen apoptoza direnç, KML'nin kronik fazında gözlenen miyeloid hücre kompartmanının aşırı genişlemesinden sorumlu mekanizmalardan biri olarak tarif edilmektedir. BCR-ABL pozitif hücreler, sağlıklı hücrelerde hücre ölümünü tetikleyen pek çok kimyasal ve radyasyon dozundan etkilenmemektedir. Uygulanan tedavi türü ne olursa olsun yanıt hematolojik yanıt (remisyon) ve sitogenetik yanıt olmak üzere başlıca iki kriter ile değerlendirilir. Hematolojik yanıtta dalak büyüklüğünün, akyuvar ve trombosit sayısının normale dönmesi esas alınmaktadır. Sitogenetik yanıtta ise kemik iliğindeki Ph(+) hücre sayısının düşmesi yani Ph kromozomu taşıyan hücre klonunda azalma beklenir. KML'de tedavi yöntemlerinden birisi de allojenik kök hücre naklidir. Fakat morbidite ve mortalitenin yüksek olması, uygun donör bulmadaki sıkıntılar, verimlilik ve dayanırlılık gibi faktörler uygulama alanını daraltmaktadır. Kemik iliği nakli tam tedavi yöntemi olarak gösterilse de yaş faktörü, uygun donör bulunmasındaki güçlükler ve yine morbidite ve mortalitenin yüksekliği nedeniyle yaygın bir tedavi yöntemi olamamıştır. Ağızdan alınan busulfan ve hidroksiüre gibi kemoterapötik ajanlar uzun yıllar tedavide kullanılmıştır. Konvansiyonel tedavi anlayışı ile birçok ajanın kombinasyonu denenmiş, bazılarında %70'lere varan remisyon gözlenmiştir. Fakat bu remisyonun 6-8 ay gibi kısa süre olduğu gözlenmiştir. Ayrıca morbiditenin yüksek olması sebebiyle bu yöntemlere ilgi zamanla azalmıştır. Konvansiyonel yöntemde kullanılan bir diğer ilaç lenfositlerden salgılanan sitokin ailesi üyesi interferon-alfa (INF- α)'dır. INF- α 'nın işlevi tam olarak kesinlik kazanmış olmasa da antilösemik bağışıklık cevabını arttırdığı düşünülmektedir.

Biyolojik bir ajanın bir kanser türünü regüle edebileceğinin ilk göstergesi olması açısından önemlidir. İnterferon alfa uygulanan kronik fazdaki hastalarda %70-%80 oranında tam hematolojik, %5-%15 oranında sitogenetik yanıt gözlenmiştir ve 1990'ların sonuna kadar standart tedavi yöntemi olarak kabul görmüştür.

1998 yılında spesifik bir bcr/abl tirozin kinaz inhibitörü olan İmatinib mesilat (Gleevec, Glivec, STI571, Novartis Pharmaceuticals, Basel, İsviçre) bir ilaç olarak klinik uygulamaya girdikten sonra interferon-alfa tedavisinden daha etkili olduğu gösterilmiş, (kronik fazda %98 tam hematolojik %58 sitogenetik yanıt) 2002 yılında FDA (Food and Drug Administration, USA) onayıyla KML tedavisinde “İmatinib Dönemi” başlamıştır (24).

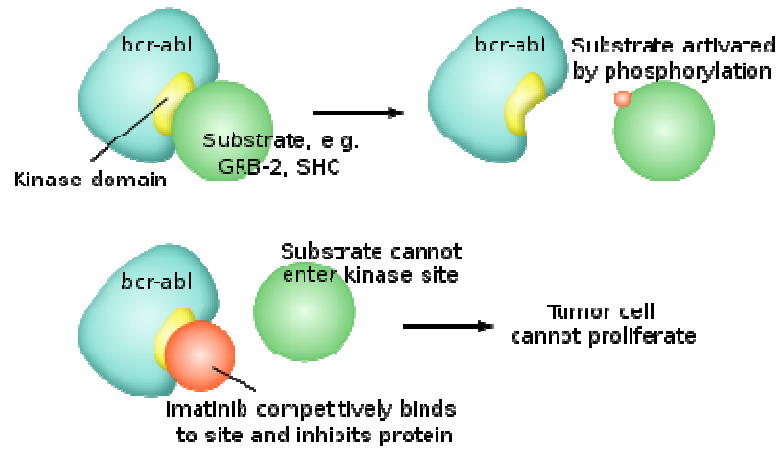
2.1.4.1. Tirozin Kinaz İnhibitörleri ve İmatinib

Protein kinazlar sübstrat özgünlüğüne göre serin/treonin kinazlar ve tirozin kinazlar olarak ikiye ayrılır. Tirozin kinazlar ATP'den aldığı fosfat grubunu sübstrat proteinin tirozin rezidüsüne bağlarlar. Serin/treonin kinazlar ise sübstrattaki serin veya treoninin hidroksil grubunu fosforiller. Abl proteininde tirozin kinaz alanı, Bcr proteininde ise serin/treonin alanı bulunmaktadır. Abl proteini reseptör olmayan tirozin kinaz ailesine ait bir enzimdir ve Bcr-Abl onkoproteininde tirozin kinaz aktivitesinde gözlenen artış hücrede aşırı proliferasyona yol açar. O nedenle bu aktiviteyi düşürecek, proteine spesifik inhibitörlere ihtiyaç vardır (23). Son 20 yıldır, hücre biyolojisi ve moleküler biyoloji alanında yapılan çalışmalar bunu mümkün kılmıştır.

1998 yılında İmatinib; Abl tirozin kinazın ATP-yarışmalı inhibitörü olarak geliştirilmiştir. 2-[phenylaminopyrimidine](#) türevidir. Hücre içinde cKit, PDGF-R (platelet-derived growth factor receptor) ve ARG kinazları da inhibe ettiği bilinmektedir (24). İmatinib tüm hücrelerdeki serbest c-abl üzerinde inhibisyona yol açar. Ancak sağlıklı hücreler sinyal ileti yolları ağının diğer bileşenleriyle hayatta kalmaya devam eder. Tümör hücreleri ise Bcr-abl' e bağımlıdır. Bcr-Abl kinaz aktivitesinin durdurulması hücre döngüsünün düzenlenmesini, hücre adezyonunu, hücre iskelet organizasyonunu ve apoptotik süreci tetikleyecek genlerin transkripsiyonel düzenlenmesiyle sonuçlanır ve normal hücrelerin proliferasyonuna fırsat verir (5,25).

İmatinib genellikle iyi tolere edilir. Oral şekilde 400mg ilaç alındığında yarılanma ömrü 18 saattir. En yüksek plazma konsantrasyonu 5.4µM, en düşük plazma konsantrasyonu 1.43µM olarak ölçülmüştür (25).

Tirozin kinazların bağlanma bölgelerinin boyutu ve şekli bağlanacak olan ligand, ATP, ve inhibitörün seçiciliğini etkiler. Kinazların aktivasyon halkasının N-terminali katalitik aktiviteyi sağlarken C-terminali substratın bağlanması için zemin hazırlar. İmatinib, abl'ye aktivasyon halkasının N-terminali ATP-bağlanma bölgesinin içine katlanıp inaktif formunu aldığında bağlanabilmektedir. Bu bağlanma hidrojen ve Van der Waals bağları ile gerçekleşir. İmatinib ve Abl kompleksinin sıkı moleküler yapısı, proteinin bağlanma bölgesindeki herhangi bir değişikliğin bu yapıyı bozmasıyla özellikle sekonder anomaliler barındıran blast krizdeki hastalarda ilaca direnç gelişmesine neden olur (26).

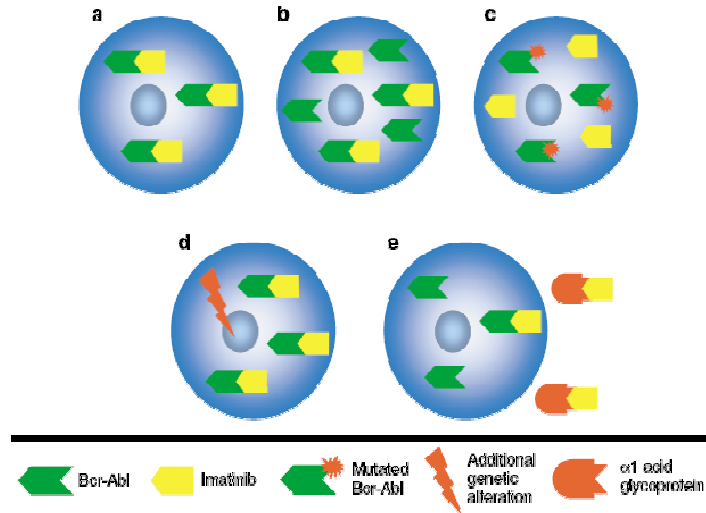


Şekil 7 : İmatinib'in işlev mekanizması. Üst panel bcr-abl kinaz alanına substrat proteinin bağlandığını gösterir. Kinazın enzimatik aktivitesi ile protein fosfatlanır. Alt panelde İmatinib kinaz alanına bağlanmak için substratla yarışır. İmatinib kinaz alanına bağlandığında substrat protein fosforillenemez ve tümör hücresi çoğalma sinyallerini alamaz. (Loab D., Targeted therapies for sarcomas: The next generation of treatments, ESUN, 2007)

2.1.4.2. İmatinib Direnci ve Direncin Moleküler Mekanizması

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

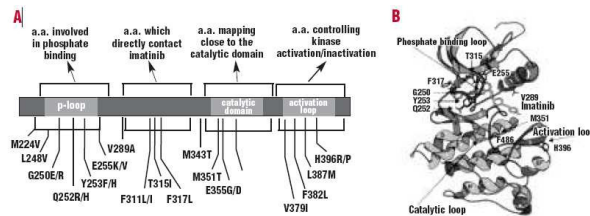
Mutasyonlar genellikle İmatinib'in bağladığı proteinin inaktif konformasyonunun aktif konformasyona dönüşmesi ile sonuçlanır. Bazen de Bcr-Abl onkoproteininden bağımsız olarak nükleus içindeki farklı genetik değişiklikler hücre proliferasyonunu artırıyor olabilir. 8. kromozomun trizomisi nedeniyle veya blast krizindeki gen amplifikasyonu MYC geninin ifadesinde de artış söz konusudur. Ayrıca albumin, alfa-1 asit glikoprotein (AGP) gibi plazma proteinlerinin hücre içindeki serbest İmatinibe bağlanabildikleri gösterilmiştir. Bu proteinlerin miktarlarındaki artış ilacın inhibisyonuna neden olabilmektedir (Şekil 8) (6,7). Fakat in vitro yapılan çalışmalarda AGP'den arındırılmış hücrelerde İmatinib işlevini yerine getirememektedir. Dolayısıyla plazma proteinleri ve İmatinib arasındaki ilişki tartışmalı olmakla birlikte dirençlilikte rolü olduğu düşünülmektedir (7).



Şekil 8: İmatinib direncinin mekanizması. (a) İmatinib hücredeki tüm Bcr-Abl proteinini bloklamada yeterlidir. (b) Bcr-Abl'nin aşırı ifadesi lösemik hücrelerin İmatinibin varlığına rağmen bazal düzeyde hayatta kalmasını sağlar. (c) Abl kinaz alanındaki spesifik mutasyonlar İmatinib'e bağlanmayı engeller fakat ATP bağlanması engellenmediğinden Bcr-Abl işlevine devam etmektedir. (d) genetik instabilite ikincil

mutasyonlarla lösemik hücrelerin bcr-abl den bağımsız çoğalmasını ve hayatta kalmasını sağlayabilir. (e) alfa-1 asit glikoproteinindeki artış Bcr-Abl' e bağlanacak olan serbest İmatinib miktarını düşürebilir. (Ref. 7)

Dirençli hasta gruplarında ve dirençli hücre hatlarında yapılan çalışmalarda Bcr-Abl proteininde yaklaşık 18 farklı pozisyonda nokta mutasyonlarına rastlanmıştır. Yapılan çalışmalarda ikincil mutasyonların dört ana bölgede toplandığı görülmektedir. Bir grup mutasyon (G250E, Q252R, Y253F/H, E255K/V) ATP'nin bağlandığı fosfat-bağlanma bölgesindedir (P-loop). İkinci grup mutasyonlar (V289A, F311L, T315I, F317L) Van der Waals ve hidrojen bağlarının gerçekleştiği İmatinib bağlanma bölgesindedir. Üçüncü grup (M351T, E355G) katalitik bölgeye yakın mutasyonları içerir. Dördürüncü grup mutasyonlarda (H396R/P) ise kinazın aktive/inaktive durumunu kontrol eden aktivasyon bölgesinde olduğu bulunmuştur (27) (Şekil 9). Bunların arasında abl T315I mutasyonu, çoğu dirençli klonda görüldüğünden dikkat çekicidir. Proteinin 315inci pozisyonundaki treoninin izolösine dönüşmesi İmatinibe bağlanmada anahtar rol oynar. Bu değişim proteinin yan zincirinde hidrojen bağı yerine fazladan bir hidrokarbon grubunun eklenmesine neden olur. Böylece İmatinib ile protein arasında kimyasal bir uyumsuzluk meydana gelir. Bu bağlamda normal Bcr-Abl'in otofosforilasyonunu engelleyecek konsantrasyondaki İmatinib, mutant Bcr-Abl'in fosforillenmesini engelleyememektedir. T315I, ATP afinitesini iki kat arttırmaktadır. Bu durum Abl'nin ATP bağlanma bölgesindeki mutasyonlara direnç kazanmasına katkıda bulunur. F317, F359 pozisyonlarındaki mutasyonların dirençlilik sağlamadaki rolleri T315'e benzerdir. Yapılan çalışmalar diğer mutasyonların proteinin tamamının veya aktif bölgesinin konformasyonunu değiştirerek ilacın bağlanmasını engellediklerini göstermektedir (7).



Şekil 9: A. Abl kinaz alanında rapor edilmiş nokta mutasyonlarının bölgelere göre dağılımı. B. Abl ve İmatinib kompleksinin üç boyutlu gösterimi. (Ref. 7)

Epigenetik modifikasyonların da sürece katkıda bulunduğunu gösteren yeni çalışmalar mevcuttur. Histon olmayan proteinlerin asetilasyon paternlerindeki değişiklikler, lösemi gelişiminde etkili olan hücresel proliferasyonu ve apoptoz direncini kontrol etmektedir. İmatinib rezistansında, sınıf I ve III deasetilazları (HDAC)'nın aşırı ifade edilmesinin ve bazı histon asetiltransferazların ifadelerindeki azalmanın etkisi olduğu gösterilmiştir. KML hücrelerine HDCA inhibitörü SAHA uygulandığında birçok proteinin asetilasyon paterninin ve apoptotik yolağın düzenini sağladığı gösterilmiştir (28). Ancak henüz klinik olarak uygulamaya geçilmemiştir.

İmatinib dozajını arttırmanın bazı dirençli hastalarda işe yaradığı gözlenmiştir. İnterferon-alfa ve İmatinibin beraber kullanılmasının yalnız İmatinib verilen hastalara oranla tedaviye yanıt verme hızında avantaj sağladığını ayrıca ilk 6 ayda sitogenetik ilk 18 ayda moleküler yanıtın sadece İmatinib kullanan hastalara göre daha iyi olduğunu gösteren çalışmalar da mevcuttur (29).

İmatinib direncinin görülmesinden sonra ikinci nesil tirozin kinaz inhibitörleri dizayn edilmiştir. En sık kullanılanları Dasatinib (Bristol-Myers, New York, Amerika) ve Nilotinib (Novartis, Basel, İsviçre)'dir. Her iki molekül de İmatinib direnci gösteren Ph pozitif hücrelerde remisyon sağladığı gösterilmiştir. Dasatinib, İmatinib den farklı olarak proteinin aktif konformasyonuna da bağlanabilmektedir. Nilotinib ise İmatinib'e göre proteine 30 kat daha selektif olarak bağlanır.

İmatinib dirençli bir hücre hattı KML ve tedavisi ile ilgili laboratuvar araştırmalarına büyük katkı sağlayacaktır. Ne yazık ki bu tür tanımlanmış direnç mutasyonlarını taşıyan bir hücre hattı bulunmamaktadır. Bu tür araştırmalar literatürde mutasyon içeren bir BCR-ABL klonunun daha çok fare hücre hatlarına transfeksiyonu ile yapılmaktadır. Araştırma, projemizde tanımlanmış mutasyonlarla direnç özelliği gösteren bir KML hücre hattı ile çalışmanın büyük yararları olacağı görülmüş ve böyle bir hücre hattının oluşturulmasına burada sunulan yüksek lisans tezi kapsamında karar verilmiştir. İmatinib dirençli hattın oluşturulması basamaklarına geçmeden önce araştırmamızın teşkil eden devamını hücre ölüm mekanizmalarının incelenmesine temel oluşturan bilgiler aşağıda verilmiştir.

2.2 PROGRAMLI HÜCRE ÖLÜMÜ

Temel biyolojik bir olgu olan programlı hücre ölümü embriyonik dönemden itibaren tüm yaşam süresince gözlenmektedir. Programlı hücre ölümü, hücre sayısını kontrol etmede, yanlış yerleşim gösteren, hasarlı, anormal hücrelerin ortadan kaldırılmasında işlev görür. Olgun organizmalarda doku homeostazisi hücre bölünmesi ve programlı hücre ölümü arasındaki dengeye bağlıdır. Hücrelerin ölüm/yaşam dengesindeki bozukluklar önemli patolojik sonuçlar doğurabilmektedir. Hücre ölümünün olmaması gerekirken gerçekleşmesi, hücre ölümünün hızlanması ya da hücre ölümünün yavaşlaması organizmanın sağlığı açısından tehlikelidir. Programlı hücre ölümündeki yetersizlik, genellikle erken evre kanserlerde ve kanser tedavilerine dirençte karşımıza çıkar. Kanser hücreleri, kendilerini programlı hücre ölüm mekanizmalarına dirençli hale getirecek mutasyonlar barındırır. Klinikte kanser ilaçlarının çoğu kanserli hücrelerde bir veya birkaç hücre ölüm yolağını tetiklemek üzere kullanılmaktadır. Ayrıca kanserden farklı olarak, iskemi/reperfüzyon hasarları veya septik şoklarda, aynı zamanda kronik nörodejeneratif veya nöromusküler hastalıklarda akut hücre kayıplarıyla sonuçlanan hücre ölümleri de gözlenebilmektedir. Tüm bunlar gösteriyor ki programlı hücre ölümünün mekanizmalarını iyi anlamak bu mekanizmalardaki herhangi bir bozukluk sonucu oluşabilecek hastalıklara karşı geliştirilecek ilaçlar ve tedavi yaklaşımlarını belirlemede önem arz etmektedir (30,31).

Hücre Ölümü İsimlendirme Komitesi (Nomenclature Committee on Cell Death-NCCD) aşağıda belirtilen morfolojik veya moleküler kriterlerin en az birinin gerçekleşmesi durumunda hücrenin ölü kabul edilmesini önermektedir: (a) hücrenin plazma membran bütünlüğünü kaybetmesi (in vitro koşullarda PI gibi vital boyalar ile gösterilir); (b) hücrenin, nükleusu da dahil birçok küçük parçaya ayrılması (c) ve/veya komşu hücreler tarafından yutulması. Dolayısıyla hücre döngüsünün herhangi bir basamağında durmuş hücreler ve ölmekte olan hücreler (süreç için gerekli biyokimyasal basamakları tamamlanmamış hücreler) ölü kabul edilmezler (32).

Hücre ölümü morfolojik özelliklerine göre başlıca apoptotik, nekrotik, otofajik ve ayrıca mitotik katastrof olarak tiplendirilmiştir. Hücre içi yolaklar göze alındığında kaspaz-bağımlı ve kaspaz-bağımsız olarak sınıflandırmalar da gösterilmektedir. Kaspaz-bağımlı “klasik” apoptoz olarak tanımlanırken, kaspaz yolaklarını kullanmadan hücre ölümünün gerçekleştiği otofaji, epitelde görülen kornifikasyon, mitotik katastrof,

paraptoz, programlı nekroz (nekroptoz) kaspaz-bağımsız olarak tanımlanmıştır. Bu ölüm tiplerinin hepsi ciddi şekilde hücre içi yolaklar tarafından regüle edilmektedir ve klasik nekrozla sonuçlanan tesadüfi hücre ölümünden ayrılırlar. Bazı kaynaklarda üç büyük morfolojik farka göre tip I (klasik apoptoz), tip II (otofajik hücre ölümü), tip III (programlı nekroz) olarak sınıflandırmalar da gösterilmektedir (32). İsimlendirmeler konusunda gerekli detaylar alt bölümler içerisinde verilecektir. Tezimizde odaklandığımız başlıca programlı hücre ölüm tiplerini inceleyelim.

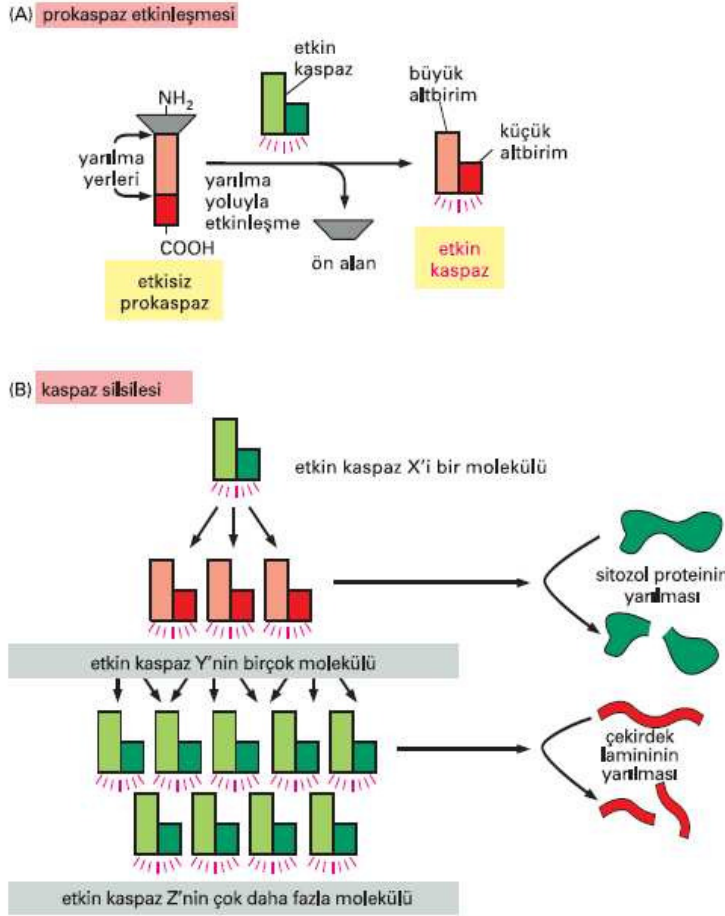
2.2.1. Apoptoz (Tip I)

Apoptoz (apoptosis) terimi Kerr. ve ark. tarafından ilk kez 1972’de kullanılmış ve o günden bu yana en çok çalışılmış ve yolakları en iyi karakterize edilmiş hücre ölüm tipidir.

Apoptoz yaşlanmış, fonksiyonunu yitirmiş, fazla üretilmiş, virüsle enfekte, düzensiz gelişmiş veya genetik olarak hasarlı hücrelerin, organizma için güvenli bir şekilde yok edilmesini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilebilen programlı bir hücre ölümüdür. Morfolojik olarak hücrenin yuvarlaklaşması ve büzülmesi, “membran blebbing” ve kromatin yoğunlaşmasıyla (piknoz) ve parçalanması (kriyohexis) karakterizedir. Sürecin başlaması, hücrenin apoptotik cisimlere ayrılıp çevre hücreler ve fagositler tarafından yutulmasıyla sonuçlanır. Bcl-2 protein ailesi üyeleri evrimsel olarak iyi korunmuştur. Apoptozun meydana gelmesi için gerekli “kaspaz”ları (sisteinil aspartat-özgü proteazlar) ve mitokondri bütünlüğünü kontrol ederek önemli rol üstlenmişlerdir (33). Apoptoz kaspaz inhibitörlerinin varlığında baskılandığı gösterildikten sonra “kaspaz-bağımlı hücre ölümü” olarak da adlandırılmıştır. Kaspaz inhibitörleri her ne kadar çoğu kaspaz molekülünü baskılasa da hücredeki tüm kaspaz moleküllerine eşit oranda etki etmemektedir. Kaspaz inhibitörleri apoptozu baskılasa da hücrede bir başka programlı hücre ölümü gerçekleşebilir. Bunun nedeni hücre ölüm yolaklarındaki çoğu molekülün birbiri ile bağlantılı olmasıdır. O nedenle kaspaz bağımlı hücre ölümü tanımı günümüzde artık çok kabul görmemektedir (32). Konuyla ilgili detaylı bilgi ileriki bölümlerde verilecektir.

2.2.1.1 Apoptozun Moleküler Mekanizması

Apoptozdan sorumlu hücre içi mekanizmanın tüm hayvan hücrelerinde benzer olduğu görülmektedir. Bu mekanizma, etkin yerinde sistein olan ve hedef proteini belirli aspartik asitlerden kesen bir proteazlar ailesine dayanır. Bunlara “kaspaz” denilmektedir. Bugüne kadar on kaspaz proteini tanımlanmış ve üç sınıfa ayrılmıştır: Başlatıcı kaspazlar (kaspaz-2, -8, -9, -10), etkili kaspazlar (kaspaz-3, -6, -7) ve yangı kaspazları (kaspaz-1, -4, -5). Bunların dışında septik şok sırasında apoptozu düzenleyen ve sitokin olgunlaşmasını sağlayan kaspaz-11, endoplazmik retikuluma bağlı apoptozda işlev gören kaspaz-12, sığırda tanımlanmış kaspaz-13 (insandaki ortoloğu kaspaz-4) ve embriyonik dokularda bulunup olgun dokularda raslanmayan kaspaz-14 tanımlanmıştır (34). Kaspazlar hücre içinde inaktif proenzim formunda ifade edilirler. Bir kez aktive olduktan sonra diğer ön-kaspazları (pro-caspases) aspartik asitlerden keserek aktive ederler ve proteoliz silsilesinin ilerlemesi sağlarlar (Şekil 10). Aktif kaspazlar özgül sitoplazma proteinleriyle, çekirdek laminlerini de içeren çok sayıda anahtar proteinin dönüşümsüz yıkımını sağlarlar. Ayrıca, normalde DNA yıkıcı enzimi (DNaz) etkisiz konumda tutan bir proteini keserek DNaz'ın serbest kalmasına ve çekirdek içinde DNA'nın parçalanmasına neden olur. Sonuç olarak hücre büzülür ve yoğunlaşır. Hücre iskeleti yıkılır, çekirdek zarfı dağılır ve çekirdek DNA'sı parçalara ayrılır. Hücre yüzeyi değişerek, komşuları veya makrofajlar tarafından hızla fagosite edilebileceği özellikler gösterir. Böylece hem hücre içeriğinin dışarı boşalması sonucu hasara yol açacak yangısal yanıt engellenir hem de organik bileşiklerin sindiren hücre tarafından yeniden kullanılması sağlanır (35). Bu süreci yakından inceleyelim.



Şekil 10: Apoptozda kaspaz silsilesi (A) etkin olmayan kaspazlar hücrede sıklıkla kaspaz ailesinin bir diğer üyesi tarafından proteolizle kesilme yoluyla etkinleştirilen etkisiz bir proenzim (prokaspaz) olarak bulunurlar. (B) etkinleşen her kaspaz molekülü birçok prokaspazı keserek etkinleştirebilir ve bunlar daha sonra çok daha fazla prokaspaz molekülünü etkinleştirirler. Başlangıçta az sayıdaki prokaspaz molekülleri (başlatıcı kaspazlar) etkinleşerek zincirleme büyüyen bir tepkimeye (silsileye) neden olurlar. Bundan sonra etkinleşen kaspazlardan bazıları (etken kaspazlar) özgül stoplazma proteinleri, çekirdek laminleri gibi hücresel proteinleri keserek hücrenin denetimli ölümüne yol açarlar. (Ref.35)

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda apoptoz mekanizmasında son derece karışık ve birbirinden bağımsız iki ana yolak tanımlanmıştır (Şekil 11). Bunlar ekstrinsik (veya ölüm reseptörü yolağı) ve intrinsik (veya mitokondri yolağı) olarak adlandırılır (35). Apoptozda mitokondri yolağının yanı sıra Bcl-2 ailesi üyelerinin, kaspaz-12 ve kaspaz-4'ün

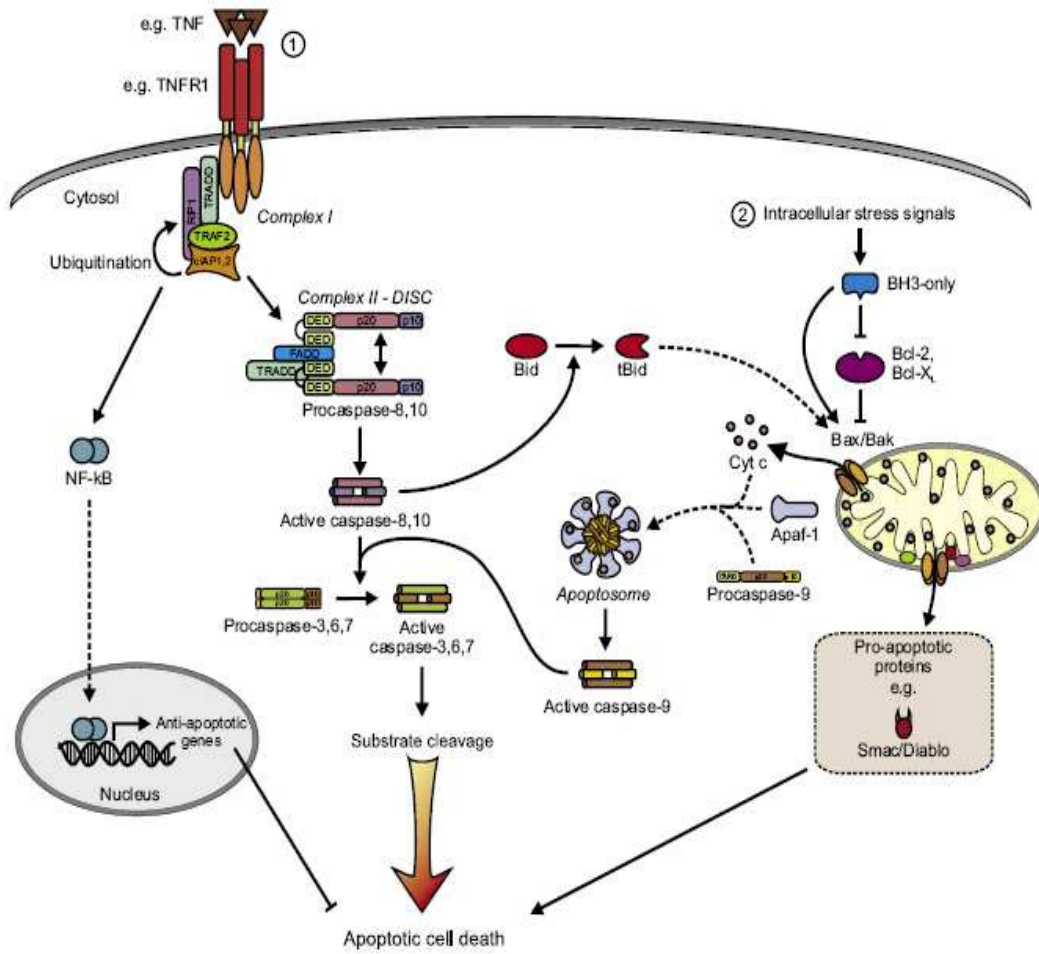
endoplazmik retikulum (ER) stresine bağılı apoptotik yolakta rolü olduğu gösterilmiştir. Ca^{+2} 'a bağılı ER ve mitokondri ilişkisi apoptozda mitokondri dinamiklerini etkilediği gibi otofajik yolakta da rolü olduğu bilinmektedir (35a). Bahsi geçen yolaklara ek olarak apoptozda özellikle sitotoksik T-hücrelerinin aktive ettiği perforin/giranzim yolağının varlığı gösterilmiştir. Ekstrinsik, intrinsik ve giranzim yolakları en son yıkım yolağına birleşirler ve hücrede ölüm gerçekleşmiş olur.

Ekstrinsik yolakta hücre ölümü membran reseptörlerinin etkileşmeleri sonucu gerçekleşir. Bu reseptörler tümör nekroz faktör (TNF) süper ailesine ait ölüm reseptörleridir. TNF reseptör ailesi yeleri sisteince zengin hücre dışı alanı (domain) ve 80 aminoasitlik “lm alanı” denilen hücre içi bölgeden oluşur. Bu lm alanı ölüm sinyalinin hücre dışından hücre içi yolaklara iletmede kritik rol oynar. Bugüne kadar FasL/FasR, $TNF\alpha$ /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 (TRAIL/TRAIL-1) ve Apo2L/DR5 (TRAIL/TRAIL-2) reseptörleri tanımlanmıştır. Ekstrinsik yolağın en iyi modellenmesi FasL/FasR ve $TNF\alpha$ /TNFR1 üzerinde gösterilmiştir. Reseptör ligand etkileşimi gerçekleştikten sonra hücre içi adaptör moleküllerle trimer oluşumu gerçekleşir. Fas ligandın Fas reseptörüne bağlanması adaptör protein FADD'ın bağlanmasıyla, TNF ligandının TNF reseptörüne bağlanması FADD ve RIP varlığında adaptör protein TRADD'ın bağlanmasıyla sonuçlanır. Fas-ilişkili yolakta FADD daha sonra n-kaspaz-8 ve/veya kaspaz-10'un ölüm alanı ile dimer oluşturur. Bu birleşme nkaspaz-8 ve/veya nkaspaz-10'un otokatalitik aktivitesini başlatır. Kaspaz-8 aktive olması apoptozun yıkım (execution) evresini başlatır. TNF-ilişkili yolakta daha karmaşık iki kompleks oluşur. Plazma membranında kompleks-1, TNFR1, TRADD, TRAF2, RIP1, cIAP1 ve cIAP2 proteinlerinin birleşmesiyle meydana gelir. TNFR1'in endositozunu kompleks-2'nin oluşması takip eder. Kompleks-2 daha önce Fas yolağında belirtilen kaspaz-8/-10 'un otokatalitik aktivitesiyle sonuçlanan süreçle analogtur. Kaspaz-8/-10 aktivasyonu, nkaspaz-3, -6, -7'nin aktive edilmesiyle sonuçlanır, substrat yıkımları başlar ve hücre apoptotik lme gider. RIP1 proteinin kompleks-1 de aktif veya inaktif olmasının programlı hücre ölümlerinin regülasyonunda önemli rol oynadığını gösteren çalışmalar vardır (şekil 11) (33, 34).

Intrinsik yolak DNA hasarı, sitotoksik artıklar gibi çeşitli hücre içi uyarılarla aktive olur Memeli hücrelerinde, hücre içi proteinlerinden Bcl-2 ailesi yeleri mitokondride görev yapar ve n kaspazların etkileşmesinin düzenlenmesinde etkilidirler. Mitokondri bütünlüğünde ve bir elektron taşıyıcı protein olan sitokrom c salınımında düzenleyici rol

oyunlar. Bax ve Bak gibi apoptotik üyeler hücre stres altındayken mitokondriden sitokrom c 'nin salınımını tetiklerken, Bcl-2 ve Bcl-XL gibi anti-apoptotik üyeler sitokrom c salınımını kısmen durdurarak apoptozu engellerler. Hücresel stres sırasında, Bcl-2 homolog 3 (BH-3) proteini aktive durumdadır ve anti-apoptotik üyeleri baskırlar. Sitokrom c 'nin apoptozdaki görevi; önkaspazları etkinleştiren Apaf-1 molekülünün aktive olmasını sağlamaktır. Sitosolde sitokrom c, Apaf-1'e bağlanır ve apoptozom denilen, çok alt üniteli Apaf-1/Kaspaz-9 kompleksinin oluşumunu tetikler ve kaspaz-9 aktive edilir. Kaspaz-9 aşağı yöndeki kaspaz-3, -6, -7 efektör kaspazlarını keser ve aktive eder. Böylelikle Apaf-1, daha önceden de bahsedildiği gibi önkaspazların aktive olmasına ve geri dönüşümsüz olarak bir kaspaz kaskadının başlamasına ve dolayısıyla hücre ölümünün gerçekleşmesine neden olur (Şekil 11) (33,35). Ayrıca ekstrinsik yolda sözü geçen kaspaz-8'in, inaktif BH-3 proteinini keserek mitokondriden sitokrom c salınımında görevli Bid proteini üzerinden reseptör-ilişkili apoptotik ölümünü intrinsik yolla ile desteklediği gösterilmiştir (33).

Hücre içi apoptoz düzenleyicilerin bir diğeri ailesi IAP (İnhibitor of Apoptosis) ailesidir. Bunlar apoptozu engelleyici proteinlerdir. Bunu bazı önkaspazlara ve bazı kaspazlara bağlanıp etkileşimlerini engelleyerek gerçekleştirirler. Mitokondriler Apaf-1'i etkinleştirmek için sitokrom c'yi salırlarken, Smac/Diablo gibi IAP'leri engelleyen pro-apoptotik proteinleri de salırlar ve bu yolla ölümün gerçekleşme verimini önemli ölçüde artırırlar. Bcl-2 ailesi üyeleri ve IAP'ler memeli hücrelerinin sağ kalımını kontrol eden sinyal ileti yollarının kritik hedefleridir (35, 33).



Şekil 11: Ekstrinsik ve intrinsik apoptotik sinyal ileti yolları şeması. (Ref. 33)

Ekstrinsik ve intrinsik yollar apoptozun son evresi olan yıkım yolağıyla sonuçlanır. Yıkım kaspazları nükleer materyali yıkan sitoplazmik endonükleazları ve nükleer ve hücre iskelet proteinlerini yıkan proteazları aktive eder. Yıkım kaspazlarından kaspaz-3, -6, ve -7 substrat olarak sitokeratin, PARP, plazma membran sitoskelet protein alfa fodrin, nükleer protein NuMA ve diğer proteinlerine bağlanıp keserek apoptotik hücrelerdeki morfolojik olaylara sebep olurlar. Kaspaz-3 en önemli yıkım kaspazı olarak kabul edilir ve başlatıcı kaspaz-8, -9, -10 tarafından aktive edilir. Kaspaz-3 kromozomal degradasyona ve kromatin yoğunlaşmasına neden olan CAD endonükleazının aktivasyonundan sorumludur. Aynı zamanda aktin-bağlayan proteinler de kaspaz-3'ün substratıdır (34). Aktin polimerizasyonundan sorumlu gelsolin gibi proteinleri keserek hücre iskeletinin yıkımına, hücre içi transport, hücre bölünmesi, sinyal iletiminin bozulmasına neden olur. Hücre membran kesecikleri halinde parçalara ayrılır. Fosfatidilserin molekülünün membran yüzeyine çıkması bu evre için belirteçtir.

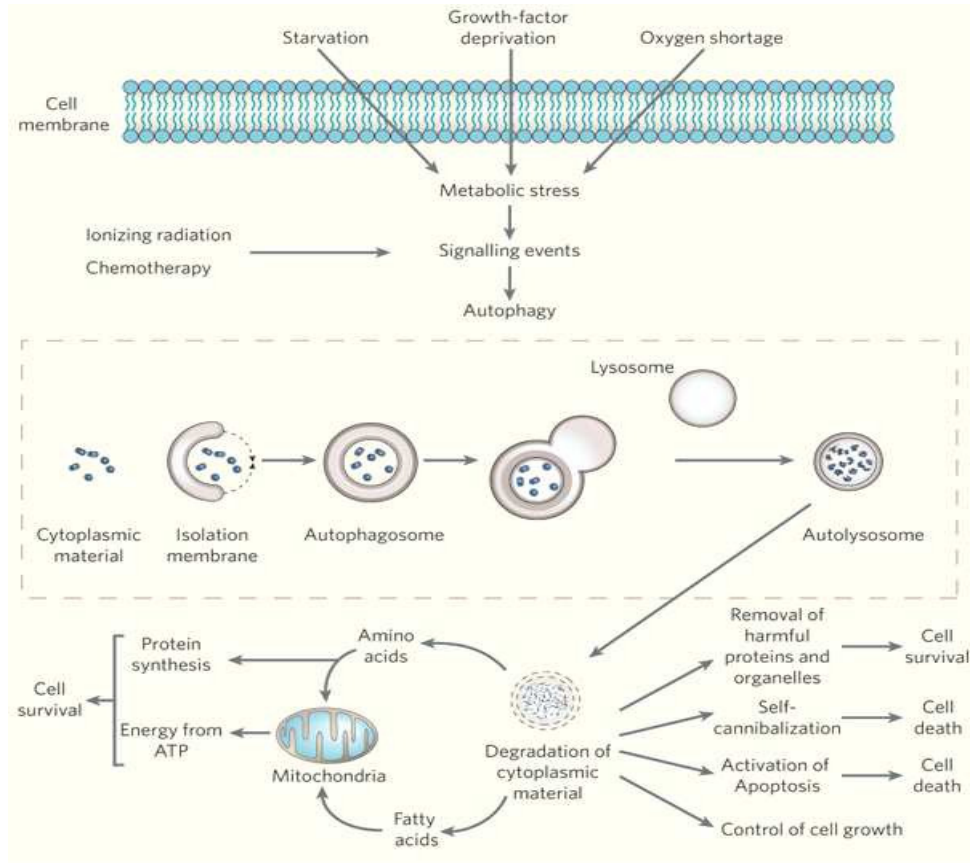
Fosfatidilserinin membran yüzeyine yerleşmesi yangısal olmayan fagositozu kolaylaştırmaktadır. Yıkım evresi sonucu oluşan apoptotik kesecikler hücre içi materyelin korunmasıyla yangısal yanıtı neden olmamaktadır.

Çoğu hücrede apoptozun baskılanması, salgılanan faktörlerden veya hücre-hücre temasından gelen sağ kalım sinyallerine bağımlıdır. Hedef hücrelerinden yeterli miktarda sağ kalım sinyali alan hücre sağ kalır. Yüksek ökaryotlardaki çoğu hücre, hücre ölümü diğer hücrelerden gelen sağkalım sinyalleri ile aktif olarak engellenmezse, apoptoza girmeye programlanmıştır. PI3-kinaz/Akt yolağı hücre sağkalımını uyarmaktan sorumlu ana sinyal iletimi yolağıdır. Büyüme faktörleri reseptör protein-tirozin kinazları aktive ederek PI3 kinaz aktivasyonuna ve Akt'ın fosforillenmesi sonucunda aktive edileceğı yer olan plazma zarına yerleşimini sağlar. Böylece Akt hücre sağ kalımına katkıda bulunan birçok proteini fosforiller. Akt'ın hedefleri apoptoz baskılayıcılarıdır (35). Hücrenin apoptoza girip girmemesi ölüm sinyalleri ve sağ kalım sinyalleri arasındaki dengeye bağılıdır. Dolayısıyla apoptotik regülasyonun iyi düzenlenmesi, yolaklardaki herhangi bir aksaklığın hücreyi/organizmayı patolojik bir duruma sokması açısından önem teşkil etmektedir (34).

2.2.2. OTOFAJİ (Tip II)

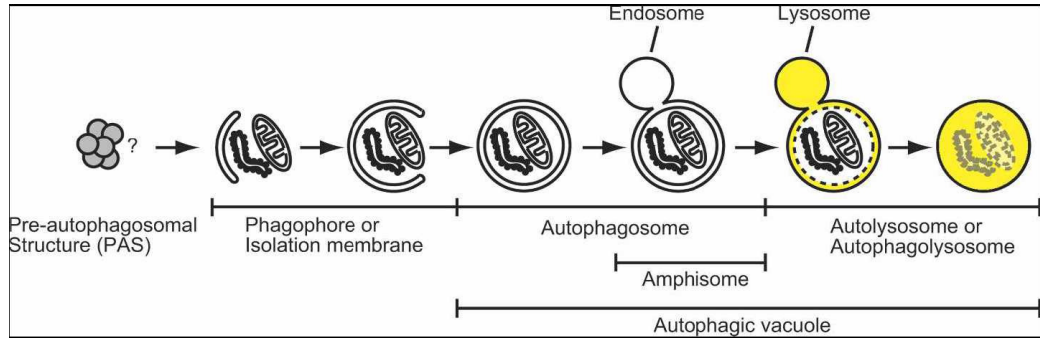
Hücre biyolojisinde otofaji belirli çevresel uyarılar doğrultusunda hücre bileşenlerinin lizozomal yoldan yıkıldığı, hücre homeostazisi için gerekli fizyolojik bir süreçtir. Evrim süresince mayalardan memelilere kadar tüm ökaryotik canlılarda iyi korunmuştur. Otofajiden sorumlu genler ilk olarak mayalarda bulunsa da günümüzde ökaryotlardaki tüm homologları gösterilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar otofajinin, başta açlık olmak üzere çeşitli stres koşulları, uzun ömürlü zararlı proteinlerin ve organellerin yıkımı, gelişim ve farklılaşma süreçlerinde hücresel düzenlemeleri, tümör baskılayıcı mekanizmalar ve antijen sunumu gibi birçok fizyolojik ve metabolik süreçte etkin rollü olduğunu göstermektedir. Aynı zamanda bazı bakteri, virüs ve protozoon gibi patojenlerin uzaklaştırılması, bazı kanser tiplerinde, yaşlanma, kas sistemi bozuklukları, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodegeneratif hastalıklarda da etkili olduğu gösterilmiştir (36, 37).

Normal hücre büyümesi ve gelişmesinde protein sentezi ve yıkımı arasında bir denge vardır. Ökaryotik hücrelerde yıkım işlemi proteozom ve otofaji sayesinde gerçekleşir. Otofaji uzun ömürlü protein yıkımından sorumluyken, übikitin-proteozom sistemi kısa ömürlü proteinlerin yıkımından sorumludur. Otofajiyi diğer yıkım sistemlerinden ayıran en önemli morfolojik fark, sitoplazmik içeriğin *otofagozom* denilen çift zarlı vesiküllere alınmasıdır. Schweichel ve Merker'in 1972'de öne sürdüğü, 1990 yılında Clarke tarafından tekrar düzenlenen ve kabul gören programlanmış dört hücre ölüm şekline Tip II sınıfına dâhildir. Tip II hücre ölümü veya otofajik hücre ölümü; mitokondri ve endoplazmik retikulum gibi hücre içi organellerin ve/veya sitoplazma yığınının iki veya daha fazla membrana sahip veziküllerin içine çekilmesiyle karakterizedir. Otofajik veziküller ve içerikleri aynı hücrenin lizozomal sistemi tarafından sindirildiğinden, kendini yeme (self-eating) olarak da tanımlanır (37). Sitoplazmik materyalin sindirimi, yağ asidi ve aminoasitlerin tekrar kullanıma sokulması sonucu açlık veya hipoksi durumlarında hücreye enerji ve besin kaynağı sağladığı gibi kimi durumlarda hücrenin ölümüyle de sonuçlanabilir (Şekil 12). Nitekim yakın zamanda yapılan çoğu araştırma otofajik hücre ölümü üzerinde durmaktadır. Örneğin; DNA hasarı ve ER stresindeki Bax/Bak "double knockout" MEF hücrelerinde Beclin-1 ve Atg5'in varlığıyla otofajik hücre ölümü gözlenmiştir. FADD ve kaspaz-8 hasarlı T hücrelerinin otofaji ve RIP-1 bağımlı nekrotik hücre ölümüne maruz kaldığını gösteren çalışmalar da mevcuttur (33). Otofajinin apoptoz ve nekroptoz gibi programlı hücre ölümleriyle ilişkisi araştırmacıların dikkatini çekmektedir.



Şekil 12: Otofaji yolağı ve hücresel fonksiyonu (B. Levine, Cell Biology: autophagy and cancer, Nature, 2007)

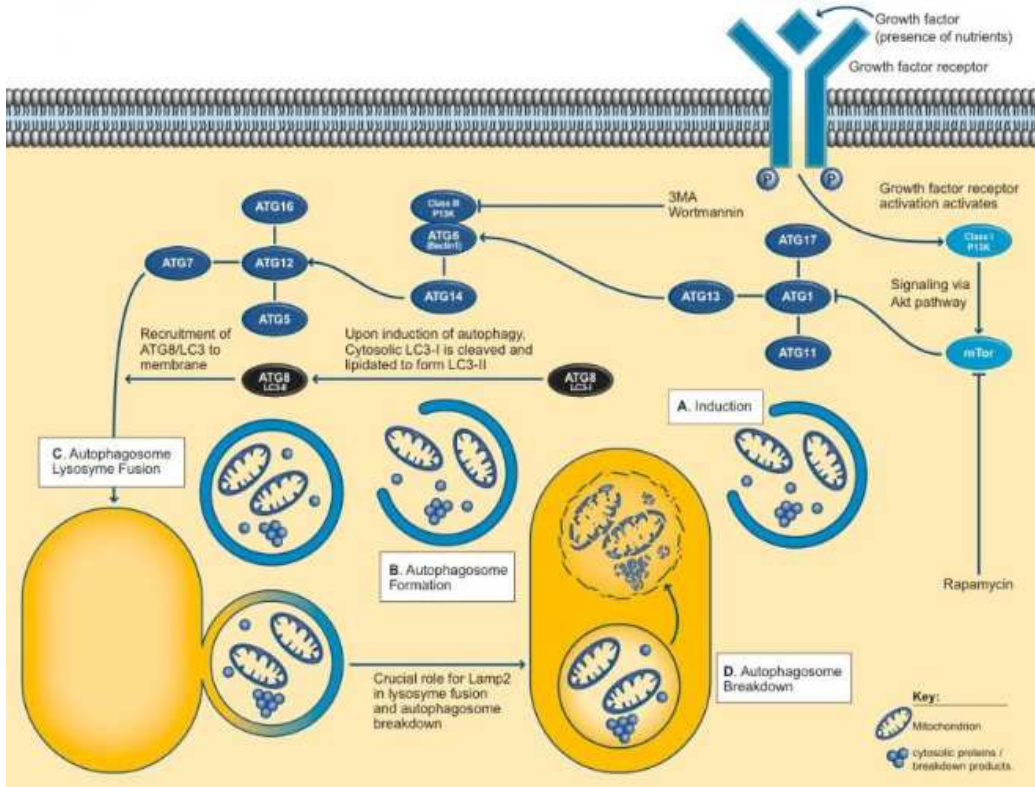
Otofajinin çeşitli faktörlerle tetiklenmesiyle sitoplazmada ilk olarak *izolasyon membranı* veya *phagophore* denilen zarsı yapılar oluşur. Bu yapılar gelişip kendi etrafında kıvrılarak otofagozomun çift lipid tabakalı yapısını meydana getirir. İlk oluşan zarsı yapıların organellerden köken almadığını ortaya koyan çalışmalar olsa da vezikül oluşumu hala araştırma konusudur (37). Tamamlanan çift zarlı yapı ve içeriği autophagosome olarak adlandırılır. Otofagozom endozomal ve lizozomal vesiküllerle birleşerek (amphisome) olgunlaşır ve *autolysosome* adını alır. Lizozomal enzimler ve asidik ortam otofagozomdaki bileşenlerin sindirilmesini sağlar ve sindirilen ürünler sitoplazmaya dağılır (Şekil 13) (38).



Şekil 13: Memeli hücrelerinde otofagozom oluşumu ve olgunlaşması (Ref. 36)

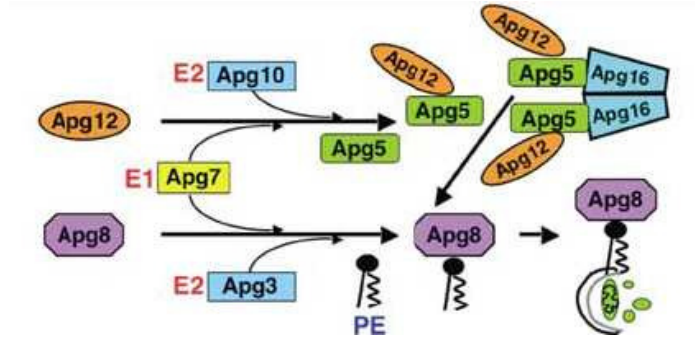
2.2.2.1. Otofajinin moleküler mekanizması

Mayalarda yapılan çalışmalarda genel adı Atg (autophagy-related) olan 31 farklı otofaji geni bulunmuş ve Atg proteinlerinin hemen hepsi floresan mikroskopisinde gösterilmiştir (36). Mayalarda ve memelilerde yapılan çalışmalarda serum ihtiyacı ve bazı aminoasitlerin (lösin, fenilalanin, tirozin, glutamin ve alanin) yoksunluğunda oluşan otofaji indüksiyonunda, mTOR serin/treonin protein kinazın önemli rolü olduğu gösterilmiştir. Yeterli amino asit ve ATP varlığında, AKT yolağında görevli Sınıf I-P13K(Vps34) proteinleri büyüme faktörleri tarafından etkinleştirilir ve bu proteinler mTOR'un aktif kalmasını sağlar. mTOR kinazın aktif kalması, bir otofaji indükleyicisi olan Atg1'in baskılanmasını sağlamaktadır. Besin yetersizliğinde veya rapamycin gibi mTOR inhibitörlerinin varlığında Atg1 aktive olur ve otofaji indüksiyonunu başlatacak olan Atg11, Atg13 ve Atg17 ile kompleks oluşturur. Böylece otofagozom oluşumu bir Atg kaskadı ile başlar, lizozomal vesikülle, otofagozomun birleşmesinde LAMP2 (veya memelide Rab GTPase Rab7) proteininin rol oynamasıyla biter. Bu kaskaddaki moleküller otofaji belirteci olarak kullanılırlar (Şekil 14-16) (38).



Şekil 14: Otofajinin moleküler yolağı (Sapphyre Bioscience Wall Chart)

Otofajik vesiküllerin biogeneğinde iki übikitin-benzeri konjugasyon sistemi bulunmaktadır. İlki Atg12 molekülünün Atg5 molekülüyle birleşmesini kapsar. Tüm hücrelerde bu iki molekül kompleks halinde bulunur ve Apg12/Atg5 konjugasyonu otofajitetik uyaranlara bağımlı değildir (konstitütiftir). Apg12/Atg5 kompleksi, Apg16 (memelide Apg16L) molekülüyle kovalent olmayan bir bağ yaparak daha büyük bir protein kompleksi oluşturur. Bu kompleks öncül membranın oluşmasında iş görür ve membranın dışına yerleşir (Şekil 15-16) (36)



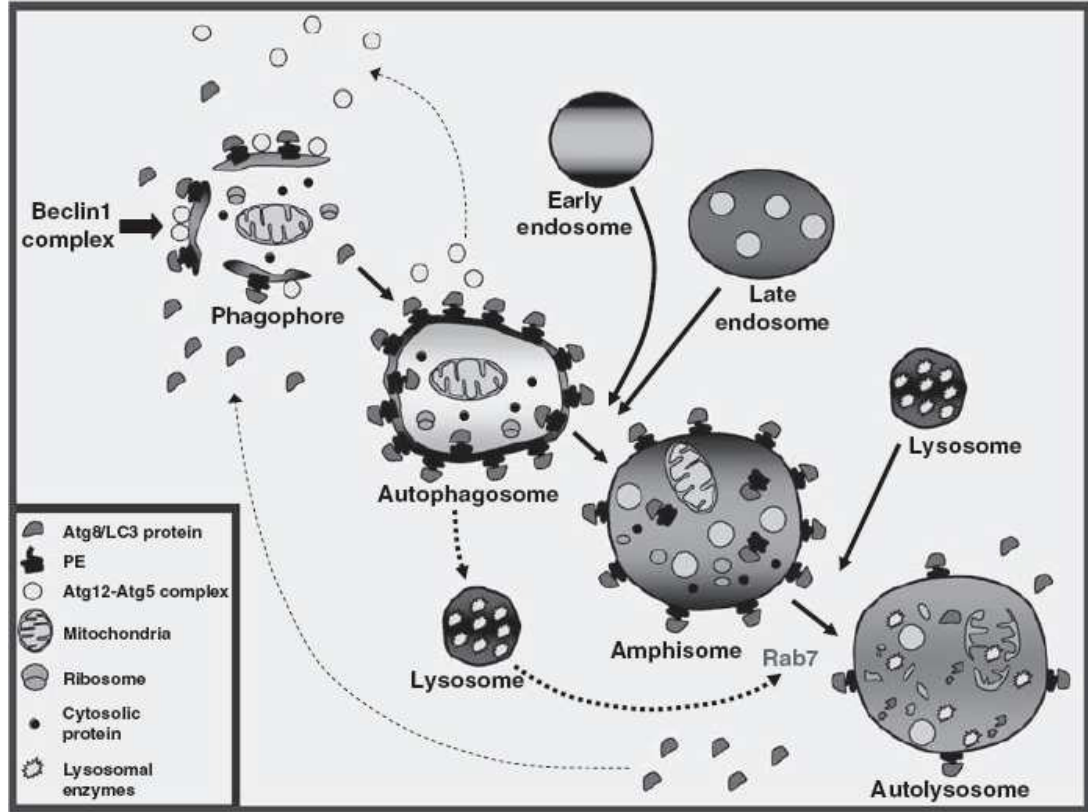
Şekil 15: Otofajik vesikül oluşumunda übikitin-benzeri konjügasyon sistemleri (ref. 38)

İkinci sistem Apg8 (memelide MAP-LC3) ve bir lipid molekülü olan PE'i (fosfatidiletanolamini) kapsar. Apg8, karboksil ucundan Apg4 tarafından kesime uğrar. Hem Apg8'in hem de Apg12'nin aktivasyonundan sorumlu Apg7, kesilmiş olan Apg8'i aktive eder. Sonunda Apg8 molekülü PE molekülüyle kompleks oluşturur ve iç otofajik membrana bağlanır (Şekil 14-16). Aynı şekilde memelideki LC3 proteini bir sistein proteaz tarafından kesilir ve karboksil ucunda glisin rezidüsü taşıyan sitosolik form LC3-I oluşur. Bu form PE molekülüyle birleşerek LC3-II adını alır ve bu iki molekül iç otofagozomal membrana yerleşir. Bu konjügasyon Apg3 ve Apg7 yardımıyla gerçekleşir. Otofagozom lizozomla birleşmeden önce membranındaki Apg proteinleri sitosole geri dönerken LC3-II membranda kalır (Şekil 15). LC3, hücre içi lokalizasyonu ve otofajik membrandaki elektroforetik mobilite özellikleri moleküler otofajik deteksiyonda marker olarak kullanılmasını sağlamaktadır (38).

Beclin 1 (mayalardaki Atg6/Vps30'un memelilerdeki homoloğu) hücrelerde otofaji yolağı ve apoptoz arasında geçiş molekülü ve otofajinin önemli bir düzenleyicisidir. Beclin1, PI3kinaz/Vsp34 ile kompleks oluşturur. Bu ilişkinin evrimsel süreçte iyi korunduğu gözlenmiştir. Bu kompleks protofagozomal yapıda Apg proteinlerinin işlevi ve aynı zamanda PI3P molekülünün üretimi için önemlidir. Beclin 1'in nakavt edilmesiyle yapılan çalışmalarda LC3 sürecinin bozulduğu ve hücre içi vesikül oluşumunda değişiklikler olduğu gösterilmiştir.

Otofagozomun hücre içi vesiküllerle birleşmesi belli bir olgunlaşma sürecine bağlıdır. Bazı otofagozomların vesiküllerle direkt olarak birleştiğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. Yapılan araştırmalarda kalsiyumun, otofagozomların endosom ve

lizozomlarla birleşmesinde önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Kalsiyum homeostazisi ve iletiminin Bcl-2 üzerinden yapıldığı düşünülmektedir (39).



Şekil 16: Otofaji yolağı. (Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners)

Ayrıca Okada ve ark. 2004 yılındaki çalışmalarında BCR-ABL pozitif lösemik hücrelerin Abl kinaz inhibitörü İmatinib (Gleevec)'e cevaben kaspaz-bağımsız hücre ölümünü sergileyebildiğini göstermiştir. İmatinib tarafından indüklenen hücre ölümünde apoptoz ve nekroz arasındaki denge sadece tümör hücrelerini öldürmekle kalmaz aynı zamanda hastanın immün sistemini regüle etmektedir. Hastadaki immün cevabın Gleevec tedavisini desteklediği düşünülmektedir.

Görüldüğü üzere programlı hücre ölüm tipleri her ne kadar ayrı ayrı tanımlansa da birbiriyle ilintili ve son derece karmaşık yollardan oluşmaktadır. Bu yolların daha iyi

tanınması hastalıkların moleküler mekanizmalarını anlamada son derece önem kazanmaktadır.

Yukarıda da bahsettiğimiz gibi araştırmamızda hedefimiz kontrol KML hücre hattıyla karşılaştırabileceğimiz bir İmatinib dirençli hücre hattı oluşturduktan sonra, bu hatlarda hücre ölüm mekanizmalarının moleküler düzeyde incelenmesidir. Tüm araştırmanın temeli dirençli bir hattın oluşturulmasına dayanmaktadır. Burada sunulan yüksek lisans tezi kapsamında gerçekleştirilmiş olan bu hedefe, 2 yıl süren altklonlamalardan sonra ulaşılmıştır. İlgili süreç aşağıda anlatılmıştır.

3. GEREÇLER VE YÖNTEM

3.1. HÜCRE HATTI ve HÜCRE KÜLTÜRÜ

3.1.1. K-562 Hücre hattı

İnsandan elde edilmiş ilk ölümsüz daimi myelositik lösemi hücre hattıdır. 1970 yılında 53 yaşında KML blastik kriz döneminde olan kadın hastanın plevral sıvısından elde edilmiştir. Hücreler 20 µm çapında, düzgün yüzeyle, yuvarlak, ve yüzeye tutunmaz (süspanse) özelliktedir. Lenfositik belirteçleri içermezler. Diferansiye olmamış granülosit ve eritrosit hücreleriyle proteomik benzerlik gösterirler. Hücreler erken-evre granülosit, eritrosit ve monositlere dönüşebilirler. Epstein-Bar virüs ve benzeri diğer herpesvirüsleri barındırmadıkları gösterilmiştir. İkenme zamanı yaklaşık 12 saattir.

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

Gereçler:

1. Pipet pompası (Greiner Labortechnik 000424NS – 9)
2. İverted 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 2 mM konsantrasyonda L glutamin, 1µg/ml konsantrasyonda penisilin/streptomisin ve % 15 oranında FBS eklenmiştir. Gerektiğinde kullanmak üzere +4 C° de saklanmıştır.

Hücreler 37C° CO2'li inkübatörde inkübe edilmiştir. 2-3 günde bir hücre yoğunluğuna göre 1/2 veya 1/3 oranında pasajlama yapılmıştır.

Hücre Dondurma Ortamı ve Dondurma Yöntemi:

%50 RPMI 1640, %40 FBS, %10 DMSO oranında olacak şekilde dondurma ortamı hazırlandı. Gerektiğinde kullanmak üzere +4 C 'de saklandı.

Yöntem:

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

3.2. TRİPAN MAVİSİ CANLILIK TESTİ ve HÜCRE SAYIMI

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

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

Gereçler:

1. Tripan mavisi %0,5 (Biological Industries – Lot 420488)
2. 0,5 ml hücre süspansiyonu
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. İverted faz kontrast ışık mikroskobu (Nikon – Diaphot 200)

Yöntem:

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

3.3. İMATİNİB DİRENÇLİ K-562 HÜCRE HATTININ ELDE EDİLMESİ

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

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

Gereçler:

- İmatinib (Gleevec- Novartis Company (Basel, Switzerland) :
Doç. Dr. Ogün SERCAN'dan alınan 2mg İmatinib serumsuz RMPI ortamında çözdürülerek 2 mM ana stok elde edilmiştir. 2 mM ana stoktan ara stoklar elde edilmiş, $+4\text{C}^{\circ}$ de saklanmıştır. Ana stok gerektiğinde kullanmak üzere -20C° ye kaldırılmıştır.
- Yöntem sırasında daha önce belirtilen hücre kültürü için gerekli görülen tüm sarflar kullanılmıştır.

Yöntem:

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

1. Hücreler canlılık testi yapılarak canlılıklarını geri kazandıkları gözlemlendikten sonra (~ %95 canlı hücre) 1,000,000 canlı hücre sayılarak iki ayrı flaska ekildi. Flasklardan biri kontrol diğeri deney flaskı olarak belirlendi. İlk deneme ilaç dozu 0,5µM İmatinib olarak düşünüldü.
2. Flasktaki son molarite 0,5 olacak şekilde 2mM stok İmatinib'den 1,25 µl alınarak 5ml lik kültür ortamına eklendi. Hücreler 72 saat inkübasyona bırakıldı. 72 saat sonunda hücre sayımı ve canlılık testi sonucu %10 dan daha az canlılık gözlemlendiğinden daha düşük bir ilaç dozunda başlanmasına karar verildi.
3. Aynı deney 0,1µM imatinib ile tekrarlandı. Stok çözeltinin molaritesi yüksek olduğundan çok küçük miktarlarda sıvı çekmenin zorluğundan dolayı ilk olarak 5µM'lık ara stok hazırlandı. Bundan sonraki deneylerde farklı molaritelerde ara stoklar kullanıldı.
4. 0,1µM imatinibli ortam için 5 µM ara stoktan 100µl İmatinib deney flaskına eklendi. 72 saat inkübasyona bırakıldı. 72 saat sonunda kontrol grubuyla yapılan karşılıklı canlılık testinde iki grupta da yaklaşık %92 civarında canlılık gözlemlendi.
5. Aynı deney grubundaki hücreler sayılarak 1'er milyon hücre tekrar ekilip deney flaskına 0,2 µM İmatinib olacak şekilde ara stoktan ilaç eklendi. Tekrar 72 saat inkübe edildi. 72 saat sonunda deney hücre grubunda belirgin hücre ölümü gözlemlendi (kontrol grubu: %95, deney grubu: %40 canlılık). İlaçlı ortamda hayatta kalan hücrelerin çoğalmasında adına kültür ortamı üç ayrı flaska bölündü. İnkübasyona bırakıldı.
6. 7 gün sonra ilaçlı ortamdaki canlı hücre sayısında artış gözlemlendiğinden hücreler pasajlandı. (Süre zarfında kontrol grubu ve deney grubundaki hücreler gözlemlenip gerektiği zamanlarda pasajları devam ettirilmiştir.)
7. Yaklaşık 3 hafta sonra deney grubu kontrol grubuyla benzer davranışta olduğu gözlemlendi. Yukarıda anlatıldığı gibi gerekli sayımlar yapılarak hücreler ekildi. 0,2 µM den 0,4µM'e çıkmak için aradaki molaritenin farkı alınıp gerekli miktar deney flaskına eklendi. 72 saat inkübasyona bırakıldı.

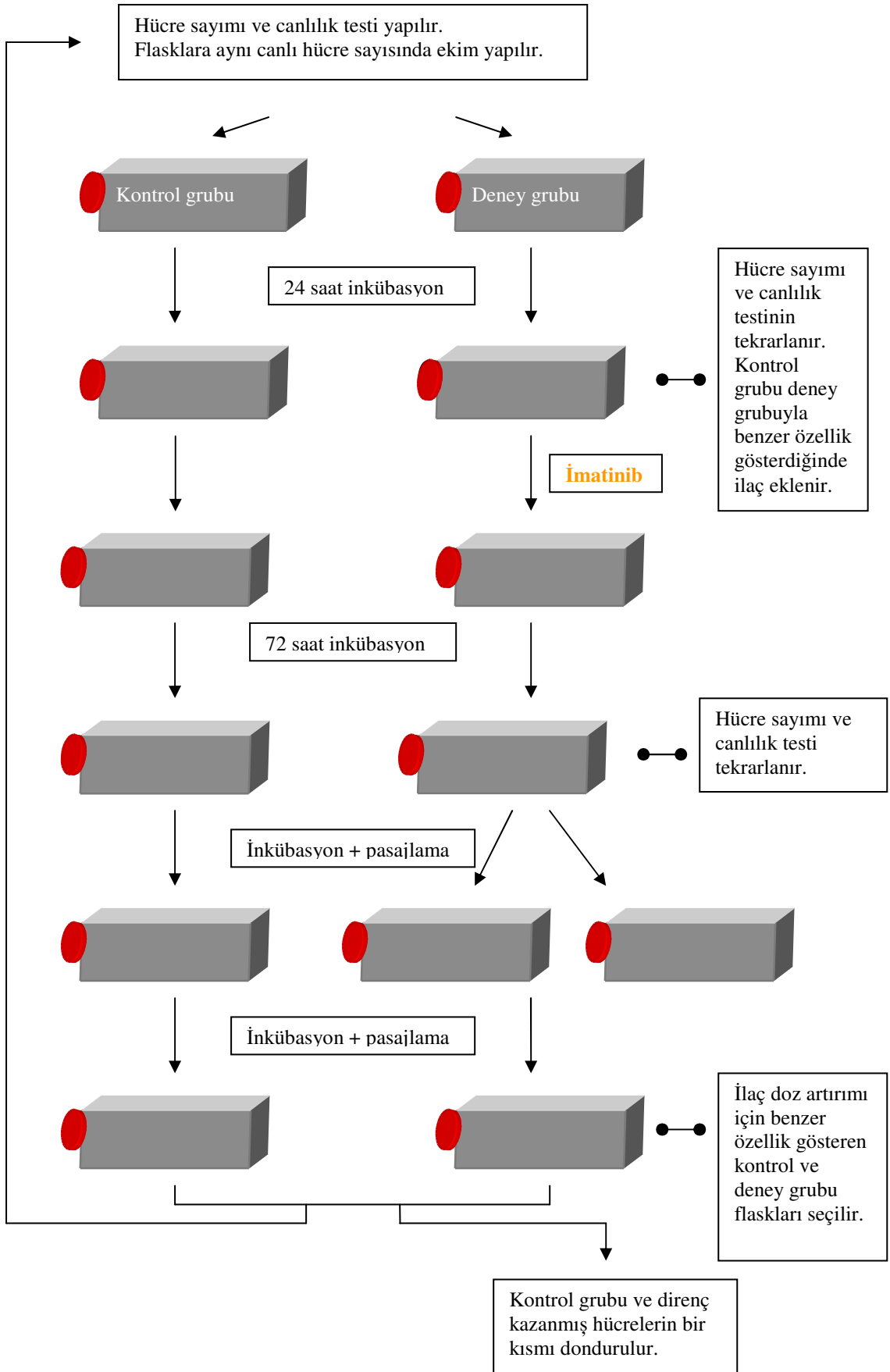
$$5\mu\text{M}(\text{ara stok}) \cdot X = 0,2\mu\text{M} \cdot 5\text{ml}(\text{ortam})$$

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

8. 72 saat sonunda canlılık testi yapıldı. Canlılık yüzdesi kontrol grubunda ortalama %87 iken deney grubunda ortalama %42 olduğu belirlendi. Hücreler inkübasyona bırakıldı.
9. 20 gün sonunda 0,4µM imatinibli ortamdaki hücreler kontrol grubuyla benzer özellik gösterdiği gözlemlendi. Canlılık testi yapıldı. (Kontrol grubu %91, deney grubu %89 canlı). Kontrolle eşit sayıda hücre ekilip, ertesi gün deney flaskı üzerine 0,8µM olacak şekilde ilaç eklendi. 72 saat inkübasyona bırakıldı.
10. 72 saat sonunda yapılan canlılık testinde kontrol grubunda %93, deney grubunda %49 canlı hücre olduğu hesaplandı. Hücreler farklı flasklara pasajlanarak inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sırasında kullanılan besi ortamına 0,8µM olacak şekilde İmatinib eklendi.
11. Yaklaşık 1,5 ay sonunda kontrol grubunda %91 canlılık, 0,8µM dirençli grupta % 86 canlılık hesaplanmıştır. Kontrol ile eş miktarda hücre ekilip ertesi gün canlılıklarının ve çoğalma hızlarının benzerliği doğrulandı. Deney grubuna toplam molarite 1,2µM olacak şekilde hesaplanıp ara stoktan 40µl ilaç eklendi. 72 saat inkübasyona bırakıldı.
12. 72 saat sonunda kontrol grubundaki canlılık %96, deney grubundaki canlılık %38 olarak hesaplandı. Hücreler farklı flasklara bölünerek 1,2µM imatinibli ortamda inkübasyona bırakıldı.
13. Yaklaşık 1 ay sonunda benzer özellik gösteren kontrol ve deney grubunda canlılık testi ve hücre sayımı yapıldı. Her iki grupta canlılık %91 olarak hesaplandı. 1,2 µM dirençli hücrelere 2µM olacak şekilde ara stoktan 72µl ilaç eklendi. 72 saat inkübasyona bırakıldı.
14. 72 saat sonunda kontrol grubundaki canlılık %95, deney grubundaki canlılık %79 olarak hesaplandı. Deney grubundaki hücreler farklı flasklara bölünüp inkübasyona bırakıldı. Kullanılan besi ortamının ilaç molaritesi 2µM'e yükseltildi.

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

Anlatılan yöntemin şematik özeti ileriki sayfada gösterilmiştir.



3.4. DİRENÇLİ K-562 HÜCRE HATTINDA BECN GEN EKSPRESYONUNUN PROTEİN DÜZEYİNDE BELİRLENMESİ

Hazırladığımız dirençli K-562 hücre hattında otofaji markeri olan BECN gen ürünü Beclin-1 proteini Western Blot yöntemi kullanılarak gösterilmek üzere öncelikle pozitif kontrol olarak belirtilen HeLA ve MECF-7 hücre hatlarında optimizasyonu yapılmıştır. Yöntem için uygulanan işlemler aşağıda belirtilen sırada yapılmıştır. Gerekli detaylar ilerleyen bölümlerde verilecektir.

- Kontrol grubu ve belirlenen dirençli K-562 hücre flasklarından hücre lizatı elde edilmiştir.
- Pierce BCA Protein Assay kullanılarak lizatların protein konsantrasyonları ölçülmüştür.
- Mini-PROTEAN 3 Cell cihazı kullanılarak SDS-PAGE jel elektroforezi yapılmıştır.
- Biorad Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell cihazı kullanılarak yarı kuru SDS-PAGE jelinde PVDF membranına proteinler transfer edilmiştir.
- Beclin-1 antikoru ile membran inkübe edilmiştir.
- Pierce Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrat kiti ile deteksiyon yapılmıştır.

3.4.1. Hücre Lizatının Hazırlanması

Gereçler :

- Lizis Tamponu (içerik için bkz. Ek1)
- İnsülin şırıngası
- PBS
- Santrifüj tüpü
- Mikrosantrifüj tüpü
- Soğutmalı mikrosantrifüj (Eppendorf centrifuge 5417 R)

Yöntem :

1. Süspanse hücreler 15 ml santrifüj tüpüne alınıp 600 G hızda 5 dk santrifüj edilir.
2. Üst faz atıldıktan sonra pellet PBS ile resüspanse edilerek tekrar santrifüj işlemi yapılır.
3. Pelletin üç katı hacimde lizis tamponu eklenir.
4. 10 dakika buz üzerinde inkübe edilir.
5. Karışım insülin şırıngası ile üç kez çekilip bırakılır.
6. 10 dakika daha buz üzerinde inkübe edilir.
7. 40 dakika en yüksek hızda (15000 G) 4 C’de santrifüjlenir.
8. Üst fazdaki lizat başka bir santrifüj tüpüne aktarılıp kullanılana kadar -80 C’de saklanır.

3.4.2. Protein Konsantrasyon Ölçümü

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

Gereçler:

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

Yöntem:

1. 50 kat hacimde A solüsyonu, 1 kat hacimde B solüsyonu karıştırılarak reaksiyon karışımı hazırlandı.
2. 96 well plate’in belirlenen gözlerine 200’er µl reaksiyon karışımı eklendi.
3. 8000, 6000, 4000, 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250 ve 125’er µg/ml konsantrasyonlardaki standartlardan 10’ar µl reaksiyon karışımlarının bulunduğu kuyulara eklenmiştir. Bir adet kuyu “blank” olarak bırakılmıştır. Konsantrasyonu

belirlenmek istenen lizattan 10µl alınarak reaksiyon karışımının bulunduğu bir başka kuyuya eklenmiştir.

4. 30 dakika 37 C° de inkübe edilmiştir.
5. Plate okuyucuda 562nm dalga boyunda karşılaştırmalı absorbanlar ölçülmüştür. Konsantrasyonlar µg/ml cinsinden belirlenmiştir.

3.4.3. SDS-PAGE Jel Elektroforezi

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

Gereçler:

- Mini-Protean 3 Cell cihazı (katalog numarası: 165-3301)
- Elektroferez tankı
- Güç kaynağı
- %10'luk ayrıştırıcı jel ve %5lik yükleme jeli (bkz. Ek 1)
- Yürütme tamponu
- 4X ya da 2X RG yükleme boyası (bkz. Ek 1)
- 50ml'lik ve 15ml'lik tüp
- Protein markeri (İnvitrogen-SeeBlue Pre-Stained Standart, katalog numarası: LC5625)

Yöntem:

1. %10'luk ayrıştırıcı jel iki cam arasına (1mm) döküldü. Jel yüzeyinin düzgün donması için üzeri izopropanolle kaplandı. 15 dakika jelin polimerleşmesi beklendi.
2. İzopropanol döküldü. 5 dk alkolün buharlaşması beklendi. Üzerine %5'lik yükleme jeli döküldü. Yükleme kuyuları oluşturmak üzere tarak yerleştirildi. 15 dakika jelin polimerleşmesi beklendi.
3. Protein konsantrasyonları belirlenen hücre lizatlarından gerekli miktarda (20-40µg olacak şekilde) örnek mikrosantrifüj tüplerine alındı. 1:1 oranın 2X RG veya 1:3 oranında 4X RG lizatla karıştırıldı. 100 C° 'de 5 dakika inkübe edilerek proteinler denatüre edildi.

4. Lizatlar ve 5-10µl protein markeri belirlenen kuyulara eklendi.
5. Elektroforez tankı yürütme tamponu ile dolduruldu.
6. 70V'da 30 dakika, 110V'da 1,5 saat elektrik akımı uygulandı.

3.4.4. Jelden Membrana Yarı-Kuru Yöntem ile Protein Transferi

Jel üzerinde ağırlıklarına göre sıralanan lizatlardaki tüm hücrel proteinlerin elektrik akımı yardımıyla -daha sonra istenen proteinin varlığını gösterebilmek adına-nitroselüloz membrana geçirilmesidir.

Gereçler:

- Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell cihazı (Biorad- katalog numarası: 170-3940)
- Nitroselüloz membran (Applichem- Pure Nitrocellulose Unsupported 0,45µm transfer membrane – A5239, 30E20R)
- Transfer tamponu (bkz. Ek 1)
- Wattman blot kağıdı

Yöntem:

1. Jel büyüklüğünde nitroselüloz membran kağıdı kesildi.
2. Jel, membran ve Wattman kağıtları transfer tamponu ile ıslatıldı.
3. Cihazın transfer yüzeyi üzerine sırasıyla; Wattman kağıdı, membran, jel ve tekrar Wattman kağıdı yerleştirildi.
4. Oluşabilecek hava kabarcıklarını yok etmek adına katlı yapının üzerine cam pipet yardımıyla birkaç kez bası uygulandı.
5. 15V'da 45 dakika transfer işlemi yapıldı.

3.4.5. Western Blot Yöntemi

Membran üzerinde (lizattaki proteinler dahilinde) aranan proteinin olup olmadığını ve varsa ne kadar olduğunu spesifik antikorlar yardımıyla gösteren bir yöntemdir.

Gereçler:

- Transferi yapılmış membran
- Shaker
- Süt tozu
- TBS
- TBS-T (bkz. Ek 1)
- Primer antikor: BECN1 (Santa Cruz D-018 sc-10086) keçide üretilmiş poliklonal antikordur.
- Sekonder antikor: Donkey anti-goat IgG-HRP (Santa Cruz sc-2002) Eşekte keçi antikorlarına karşı üretilmiş ikincil antikordur. Kullanılan primer antikora özgüdür.

Yöntem:

1. Membran blotlama kasetine yerleştirildi.
2. %5 süt tozu barındıran 20 ml TBS-T hazırlanıp membran üzerine döküldü. Kaset shaker'a yerleştirilip +4 C 'de 1 saat blotlama yapıldı (inkübasyon).
3. 15ml TBS-T ile %5'lik süt tozu hazırlandı. İçerisine 1:500 oranında primer antikor eklendi.
4. Membrana eklenen blotlama solüsyonu antikor barındıran solüsyonla değiştirildi. Bir gece (overnight) inkübasyona bırakıldı.
5. Membran kaseti shaker'a yerleştirilip 10'ar dakika iki kez TBS-T bir kez TBS ile yıkama işlemi yapıldı.
6. 15 ml %1 süt tozu barındıran TBS-T hazırlandı. İçerisine 1:5000 oranında sekonder antikor eklendi.
7. Hazırlanan sekonder antikor solüsyonu membran üzerine eklendi. Kaset shaker'a yerleştirilip +4C 'de 1,5 saat, oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildi.
8. 10'ar dakika üç kez TBS-T bir kez TBS ile yıkama yapıldı.

3.4.6 Deteksiyon

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

Gereçler:

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

Yöntem:

1. SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate kitinin peroksit ve enhancer solüsyonları 1:1 oranında karıştırıldı.
2. Membran kasetine karışım eklenip 5 dakika inkübe edildi.
3. Membran süzdürülüp aynı boyutlarda kesilmiş poşet dosya içerisine yerleştirildi ve film kasetine konuldu.
4. Karanlık odada fotoğraf filmi kasete yerleştirildi. 20-60 saniye film kaset içerisinde bekletildi.
5. Film kasetten çıkartılıp 45 saniye developer solüsyonundan 30 saniye fixer solüsyonundabekletilip son olarak deterjanlı sudan geçirildi.

3.5 FLUOROMETRİK CASPASE 3 ASSAY KİT İLE APOPTOTİK DAVRANIŞ ÖLÇÜMÜ:

Kaspaz 3 Florometrik assay peptit substrat aacetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylcoumarin (Ac-DEVD-AMC)' nin kaspaz 3 ile hidrolizine dayanır. Hidroliz sonucunda florescent 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) salınır.



AMC' nin eksitasyon ve emisyon dalga boyları 360 ve 460 nm.' dir. Salınan AMC konsantrasyonu ve dolayısıyla kaspaz 3 miktarı, konsantrasyonları bilinen AMC solüsyonlarından elde edilen kalibrasyon eğrisinden yararlanılarak belirlenebilmektedir.

Gereçler:

Sigma Caspase-3 Assay Kit, Fluorimetric (katalog no: CASP3F)

- **5X Lizis tamponu** (Ürün kodu L 2912): Çift distile su ile 1X halinde dilüe edilir. - 20 °C' de saklanır.
- **10X Reaksiyon Tamponu** (Ürün kodu A 0219): Çift distile su ile 1X halinde dilüe edilir. - 20 °C' de saklanır.
- **Kaspaz 3** (Ürün kodu C 5974): 50 µl çift distile su ile 5µg liyofilize toz sulandırılarak 100 µg/µl konsantrasyonda solüsyonu hazırlanır. Alikatlanıp, -80 °C' de saklanır.
- **Ac-DEVD-AMC Substratı** (Ürün kodu A 1086): Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylcoumarin. 2,5 mg İçerik 370 µl DMSO (Dimetil sülfoksit) içerisinde çözülerek 10mM' lık solüsyon hazırlanır. - 20 °C' de saklanır.
- **Ac-DEVD-CHO İnhibitörü** (Ürün kodu A 0835): Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-al. 0,5mg içerik 500 µl DMSO içerisinde çözülerek 20 mM.' lık solüsyon hazırlanır. - 20 °C' de saklanır. Kullanılmadan önce 1X "assay tampon" ile 100 kat, 200 µM.' a dilüe edilir.
- **7-Amino-4-methylcoumarin Standard** (Ürün kodu A 9891): 1 mg içerik 570 µl DMSO' da çözülür. Kalibrasyon eğrisinde standart olarak kullanılır. - 20 °C' de saklanır. AMC kalibrasyon eğrisi hazırlamak için 1X assay tampon ile 1000 kat dilüe edilerek, konsantrasyonu 10 µM' a getirilir.

- 96 well plate (CELLSTAR, Flat bottom No:655180)
- Apoptotik ajan İmatinib ile indüklenen hücreler
- Plate okuyucu (BioTek Synergy HT)

Yöntem:

AMC Kalibrasyon Grafiği Hazırlanması:

1. 96 well plate microassay metodu için Tablo 1 deki standart solüsyonlar hazırlanır:

AMC Standard	200 µl Hacim içerisindeki AMC miktarı (nm)	10 µM AMC Solüsyonu miktarı	1X Assay Tampon Miktarı
6 µM	1,2 nmol	180 µl	120 µl
4 µM	0,8 nmol	120 µl	180 µl
2 µM	0,4 nmol	60 µl	240 µl
1 µM	0,2 nmol	30 µl	270 µl
500 nM	0,1 nmol	15 µl	285 µl
100 nM	0,02 nmol	3 µl	297 µl

Tablo 1: AMC (7-Amino-4-Methylcoumarin) kalibrasyon grafiği hazırlanması

2. Her solüsyondan 200' er µl 96 well plate gözlerine eklenir.
3. Referans için bir göze 200 µl 1X assay tampon eklenir.
4. Flüoretrenin eksitasyonu 360 nm, emisyonu 460 nm' ye ayarlanır.
5. Solüsyonların flüoresans değerleri ölçülür.
6. Flüoresans yoğunluğuna karşı AMC konsantrasyonu grafiği çizilir.

Hücre lizati Hazırlanması:

1. Apoptoz indüklenen hücreler inkübasyon süresi sonunda 600g' de 5 dak. + 4 °C' de santrifüjlenerek çöktürülür.
2. Bir kez PBS ile resüspanse edilerek tekrar santrifügasyon yapılır .
3. 250000 hücre başına 40 µl 1 X lizis tampon eklenir. Vorteksle süspanse edilir.

4. Buzda 15 – 20 dak. İnkübe edilir.
5. Lizis edilen hücreler 14000 g' de 10 -15 dak. 4 °C' de santrifüjlenir.
6. Süpernatantlar yeni tüplere aktarılır.
7. Lizatlar hemen analiz edilir ya da alikatlanarak – 80 °C' de saklanır.

96 Well Plate Microassay Metodu ile Apoptotik davranışın Belirlenmesi:

1. Her 3 ml 1X Assay Tampon başına 5 µl 10 mM Ac-DEVD-AMC eklenerek reaksiyon karışımı hazırlanır. 96 Gözlu plate' lerin her gözüne 200' er µl reaksiyon karışımı eklenir.
- 2.Tablo 2 de anlatıldığı gibi 96 gözlu plate hazırlanır.

	1X Assay Tampon	Kaspaz 3 (0,5 µg/µl)	Hücre Lizatı	Kaspaz 3 İnhibitörü Ac- DEVD-CHO	Reaksiyon Karışımı
Blank	5 µl	–	–	–	200 µl
Kaspaz 3 pozitif kontrol	–	5 µl	–	–	200 µl
Kaspaz 3 pozitif kontrol + İnhibitör	–	5 µl	–	2 µl	200 µl
Apoptoz İndüklenmeyen hücre lizatı	–	–	5 µl	–	200 µl
Apoptoz İndüklenmeyen hücre lizatı + İnhibitör	–	–	5 µl	2 µl	200 µl
Apoptoz İndüklenen hücre lizatı	–	–	5 µl	–	200 µl
Apoptoz İndüklenen hücre lizatı + İnhibitör	–	–	5 µl	2 µl	200 µl

Tablo 2 : 96-well plate metoduyla apoptotik davranışın belirlenmesi

3. Plate' in kapağı kapatılıp karanlıkta oda sıcaklığında 1 – 1,5 saat inkübe edilir.
4. Eksitasyon 360 nm, emisyon 460 nm' de plate flüöremetre' de okutulur.
5. Kalibrasyon grafiğine göre AMC konsantrasyonları hesaplanır.

3.6 AKIŞ SİTOMETRİSİ İLE (FLOW CYTOMETRY) ANNEXİN-V APOPTOZ ANALİZİ

Akış sitometrik yöntemler kantitatif apoptoz tayininde kullanılmaktadır. Çalışmamızda kullanılan Annexin-V apoptoz analizi hücrelerde tetiklenen apoptozun kantitatif tayini amacıyla gerçekleştirilecektir.

Annexin-V apoptoz analizinde kullanılan FITC ile konjüge Annexin-V lektini, apoptotik hücrelerin hücre membranının dış yüzeyinde bulunan fosfatidil serin fosfolipidine bağlanır. FITC, Annexin-V bağlanan hücrelerin floresan (FL1 detektörü; ekzitasyon= 488nm, emisyon=535nm) ışımaya neden olmaktadır. Hücrelerdeki bu floresan ışıma akış sitometrideki FL1 dedektörü ile belirlenebilir. Işımanın şiddetine göre hücreler sınıflandırılır ve bir diyagrama yerleştirilir. Nekrotik hücreler ise nükleik asitlere bağlanabilen floresan PI (FL2 detektörü, ekzitasyon= 488nm, emisyon=562-588nm) boyası ile belirlenir. PI nekrotik hücrelerin zarar görmüş hücre membranından geçerek DNA'larını boyar. DNA'ları boyanan hücrelerdeki floresan ışıma akış sitometrideki FL2 dedektörü ile belirlenir. Işımanın şiddetine göre hücreler sınıflandırılır ve bir diyagrama yerleştirilir (bakınız hesaplama).

Gereçler:

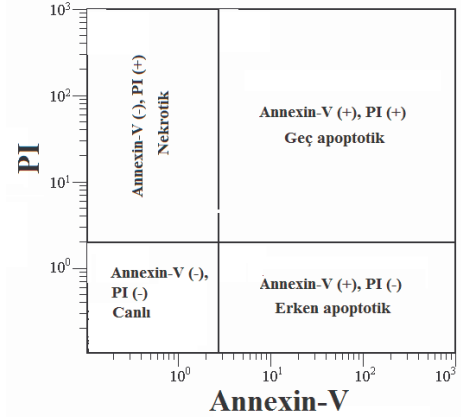
- FITC ile konjüge Annexin-V
- 50µg/mL PI, PBS içerisinde
- Bağlama tamponu
- Floresan Reaktif: 100µL bağlama tamponu, 5µL Annexin-V, 10µL PI
- Hücre kültürü cihazları
- Akış Sitometre (Beckman Coulter –epics XL.MCL).

Yöntem:

1. 25cm² flasklarda çoğaltılan hücreler Neubauer lamında sayılır
2. Hazırlanan 1x10⁵ hücre/mL süspansiyonundan 2şer' ml 6'lı plak kuyucuklarına ekilir. Böylece her bir kuyucuğa 2x10⁵ hücre ekilmiş olur.
3. Hücrelerin yapışması için plaklar 24 saat boyunca inkübatörde bekletilir.
4. Kuyucuklardaki hücreler üzerinde istenen deneme gerçekleştirilir.
5. 6'lı plak kuyucuklarının içerikleri ayrı ayrı tüplere aktarılır (2mL).
6. Kuyucukların içerisindeki hücreler scraper ile 1'er ml PBS içerisinde kaldırılır ve kendi tüplerine aktarılır (3mL).
7. Kuyucuklar 1'er ml PBS ile yıkanır ve kendi tüplerine aktarılır (4mL).
8. Hücre süspansiyonu oda sıcaklığında 1300rpmde 5 dakika santrifüj edilir.
9. Süpernatant atılır ve her bir pellet 115uL floresan reaktifi ile süspanse edilir.
10. Tüpler karanlıkta 15 dakika inkübe edilir.
11. Her bir tüpe 400'er µL PBS ilave edilir ve akış sitometrede FL1 ve FL2 filtreleri kullanılarak okuma gerçekleştirilir.

Hesaplama

Hücreler, her bir hücrenin Annexin-V ve PI ışımaya miktarına göre diyagrama yerleştirilir (Şekil 1). Annexin-V ve PI sinyalinin algılanmadığı hücreler canlı, sadece PI sinyalinin algılandığı hücreler nekrotik, sadece Annexin-V sinyalinin algılandığı hücreler apoptotik ve hem Annexin-V hem de PI sinyalinin algılandığı hücreler geç apoptotik olarak değerlendirilir. Diyagramdaki her bir bölgeye düşen hücre sayısının (Hücre sayısı bölge) sayılan toplam hücre sayısına oranından yüzde değerler hesaplanır.



Şekil 17: Annexin-V apoptoz analizi için akış sitometri diyagramı. Hücreler ışımaya şiddetlerine göre diyagrama yerleştirilir. Her bir alana düşen hücre sayısının toplam okunan hücre sayısına oranından hücre yüzdeleri belirlenir.

$$\text{Yüzde Hücre} = (\text{Hücre sayısı bölge} / \text{Toplam Hücre sayısı}) \times 100$$

Bu formüle göre hesaplanan yüzde değerlerinin her bir örnek için ortalamaları alınır. Elde edilen ortalama hücre yüzdeleri grafiğe geçirilerek veriler değerlendirilir. Veriler grafiğe geçirilirken tüm Annexin-V pozitif alanlara düşen hücreler bir arada apoptotik olarak değerlendirilmiştir. Bunun için Annexin-V (+) / PI (-) (erken apoptotik) ve Annexin-V (+) / PI (+) (geç apoptotik) alanlarına düşen hücre yüzdeleri toplanmış ve elde edilen toplam değerler kullanılmıştır.

3.7 VEKTÖR TRANSFEKSİYONU YARDIMI İLE OTOFAJİK HÜCRE ÖLÜMÜ ANALİZİ

Analizi yapılacak hücre grubu LC3B-RFP (red floresence protein) eksprese eden Bac vektörü ile transfekte edilir. Transfeksiyondan sonra otofajik marker olan LC3B proteini floresans ışımaya sayesinde akış sitometrisi ile ölçülür.

Gereçler:

- İnvitrogen Premo Autophagy Sencors (LC3B-FP) BacMam 2.0 Kit (# P36236)
- Hücre kültürü ekipmanları
- Akış Sitometre (Beckman Coulter –epics XL.MCL).

Yöntem:

1. Kontrol grubundan iki, 10 µM dirençli hücre grubundan bir flask olacak şekilde her gruptan eşit miktarda hücre sayılarak üç ayrı flaska ekildi. (~ 200,000 hücre)

2.
$$\text{mL of LC3B-FP or LC3B(G120A)-FP} = \frac{(\text{number of cells}) (\text{MOI})}{(1 \times 10^8)}$$
 formülü

kullanılarak:

$(200000 \times 30) / 1 \times 10^8 = 60 \mu\text{l}$ vektör preparatı her 3 flaska eklendi. LC3 ekspresyonu için 18 saat inkübasyona bırakıldı.

3. Kontrol grubu flasklarından birine 1µM İmatinib eklendi. 24 saat inkübasyona devam edildi.
4. Akış sitometrisinde analiz edildi.

3.8 ABL PROTEİNİ KİNAZ BÖLGESİNDE MUTASYON TARAMASI

İmatinib'e direnç gösteren KML hastalarında yapılan araştırmalarda bcr-abl proteininin abl kinaz bölgesinde tespit edilen L248V, G250E, Q252H, Y253F, E255K, E255V, D276G, E279K, V299L, T315I, F317L, M351T, F359V, L384M, H396P, H396R, G398R, F486S ikincil mutasyonlarının (40), oluşturduğumuz dirençli K562 subklonlarında varlığının araştırması planlanmıştır. Bu bağlamda abl eksprese ettiği bilinen HEK 293 hücre hattı üzerinde RNA izolasyonu ve cDNA eldesinden sonra PCR metodu için dizayn edilen primerlerin optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. K-562 kontrol grubu ve K-562 dirençli deney grubunda tekrarlanan bu deneyler sonucu elde edilen PCR ürünleri Kore'ye gönderilerek sekans analizleri yapılmıştır.

3.8.1 RNA İzolasyonu

Gereçler:

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

Kit içeriği :

- Liziz tamponu RA1
- Yıkama tamponu RA2
- Yıkama tamponu RA3 (konsantre)
- Membran tamponu MDB
- rDNase reaksiyon tamponu
- rDNase

- Filtreli tüpler
- Toplama tüpleri

Yöntem :

Çalışma solüsyonlarının hazırlanması

rDNase 540 µl RNase-free suda seyreltildi. Alikatlanarak - 20°C 'ye kaldırıldı.

Yıkama tamponu RA3'e 50 ml %96'lık etanol eklendi.

1. Yüze yapışan hücreler tripsinizasyon ile resüspanse edilip 600 x g'de 5 dk çöktürülür. 1 kez PBS ile yıkanarak tekrar pellet elde edilir.
2. 350 µl RA1 tamponu 3.5µl β-merkaptöetanol ile karıştırıldıktan sonra hücrelerin üzerine eklendi ve vortekslendi.
3. Lizat mor filtreli tüplere aktarıldıktan sonra toplama tüpü yerleştirilip 1 dk 11,000 x g de santrifüjlendi.
4. Filtreli tüp atıldı. Toplama kabına 350 µl %70'lik etanol eklendi ve pipetaj yapıldı.
5. Örnek mavi filtreli RNA bağlama tüplerine aktarıldı. Toplama tüpü yerleştirildikten sonra 30 sn 11,000 x g 'de santrifüjlendi.
6. 350 µl MBD tamponu eklendi. 1 dk 11,000 g 'de santrifüjlendi. Toplama kabında biriken süpernatant atıldı.
7. 90 µl rDNase reaksiyon tamponu ile 10 µl rDNase karıştırıldı. Karışımın 95 µl'si filtrenin ortasına damlatıldı. 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
8. 200 µl yıkama tamponu RA2 eklendi. 30 sn 11,000 x g 'de santrifüjlendi.
9. 600 µl yıkama tamponu RA3 eklendi. 30 sn 11,000 x g 'de santrifüjlendi.
10. 250 µl yıkama tamponu RA3 ile 2dk 11,000 x g 'de tekrar santrifüjlendi.
11. Filtre santrifüj tüpüne aktarıldı. 60-40 µl RNase'dan arındırılmış su eklendi. 1 dk 11,000 x g'de santrifüjlendi.
12. RNA örnekleri konsantrasyon ölçümü için kullanıldıktan sonra -80 °C 'ye kaldırıldı.

3.8.1.1 RNA Miktarı Tayini

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

$A_{260} \times$ dilüsyon faktörü $\times 40 \mu\text{g/ml}$ formülü ile RNA konsantrasyonları hesaplandı. A_{260} / A_{280} oranı hesaplanarak RNA'ların saflık dereceleri belirlendi. (En iyi saflık için A_{260} / A_{280} oranınının 1,8 ile 2,0 arasında olması beklenir.)

3.8.2 RNA'dan cDNA eldesi

Gereçler:

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

Yöntem:

1. Kalıp cDNA'dan yaklaşık $1 \mu\text{g}$ olacak şekilde örnek alındı. $1 \mu\text{l}$ oligo dT primer, $3 \mu\text{l}$ dNTP ile karıştırıldı toplamda $20 \mu\text{l}$ olacak şekilde üzeri DEPC'li su ile tamamlanarak 1. karışım elde edildi.
2. 1. karışım 70°C 'de 5 dk inkübe edildi. Buz üzerine alındı.
3. 5X reaksiyon tamponundan $8 \mu\text{l}$, RNase inhibitörden $2 \mu\text{l}$, DEPC'li sudan $8 \mu\text{l}$, mMLV Reverse transcriptase enzimden $2 \mu\text{l}$ alınarak toplamda $20 \mu\text{l}$ 'lik ikinci karışım elde edildi. 37°C 'de 5dk inkübe edildi.
4. 1. ve 2. karışımlar birleştirildi. Termal cyclers aletinde;
 37°C 'de 1h

70 °C’de 10 dk inkübe edildi.

5. Elde edilen HEK cDNA örnekleri -20 °C ‘ye kaldırıldı.

3.8.3 POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)

K562 dirençli hastalarda daha önce bahsi geçen mutasyonların barındığı yaklaşık 1600 bç uzunluğundaki abl mRNA kinaz bölgesini çoğaltmak için bu bölge, birbiriyle örtüşen dört ayrı parçaya bölünmüş (P1, P2, P3, P4) bu parçalara özgü primer çiftleri dizayn edilmiştir. Primer çiftlerinin sekansları aşağıdaki gibidir:

P1. F= 5’ACAAGCCCACTGTCTATGGTGTGT 3’
R= 5’AGATCTGAGTGGCCATGTACAGCA 3’

P2. F= 5’ ACAGAGATCTTGCTGCCCGAAACT 3’
R= 5’ TCAGAGGGATTCCACTGCCAACAT 3’

P3. F= 5’ TGAAGACCTTGAAGGAGGACACCA 3’
R= 5’ AGCAATACTCCAAATGCCCAGACG 3’

P4. F= 5’ ACGTCTGGGCATTTGGAGTATTGC 3’
R= 5’ CAAGGTACTCACAGCCCCACGGAC 3’

Gereçler:

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

- etidyum bromür
- Fermentas 6X Orange yükleme boyası #R0631

Yöntem :

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

Termal döngü:

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

95°C 5`
 95°C 30``
 58°C 30`` X 33
 72°C 45``
 72°C 7`
 (+4 °C)

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

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

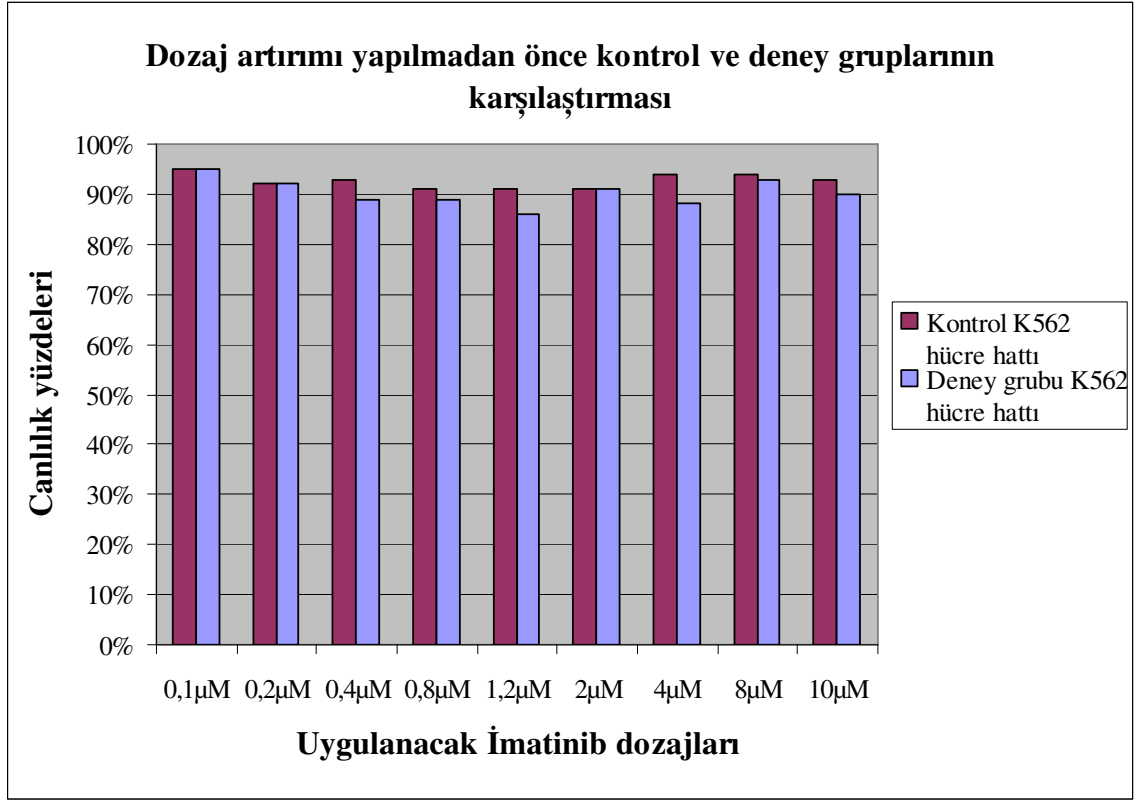
3. Jelin ilk kuyusuna Roche 100bp marker yüklenmiştir. Her bir 5µl'lik PCR ürünü, 1 µl 6X yükleme boyasıyla karıştırılarak jelin kuyularına sırasıyla yüklenmiştir. 50V da elektroforez uygulanıp görüntülenmiştir.

Etik Kurul Onayı: Etik kurulun 5 Şubat 2009 tarih ve 18/03/2009 no.lu toplantısında 46/2009 Protokol numarası ile onaylanmıştır.

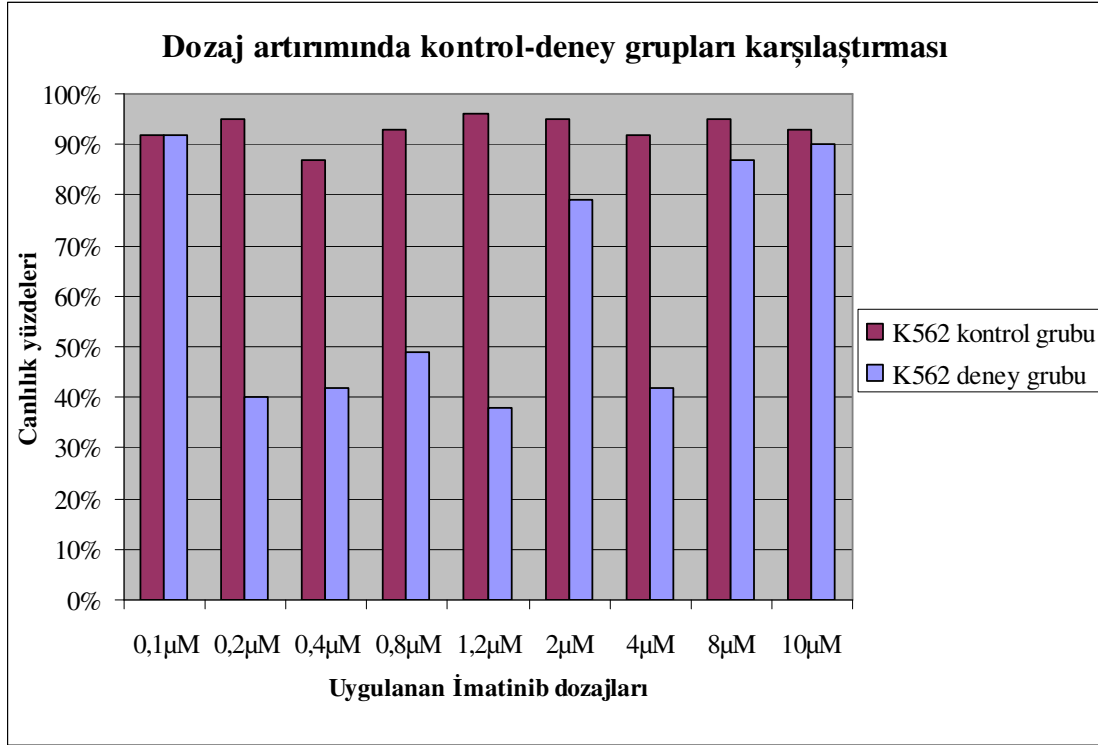
4. BULGULAR

4.1 Hücre Hattı Bulguları:

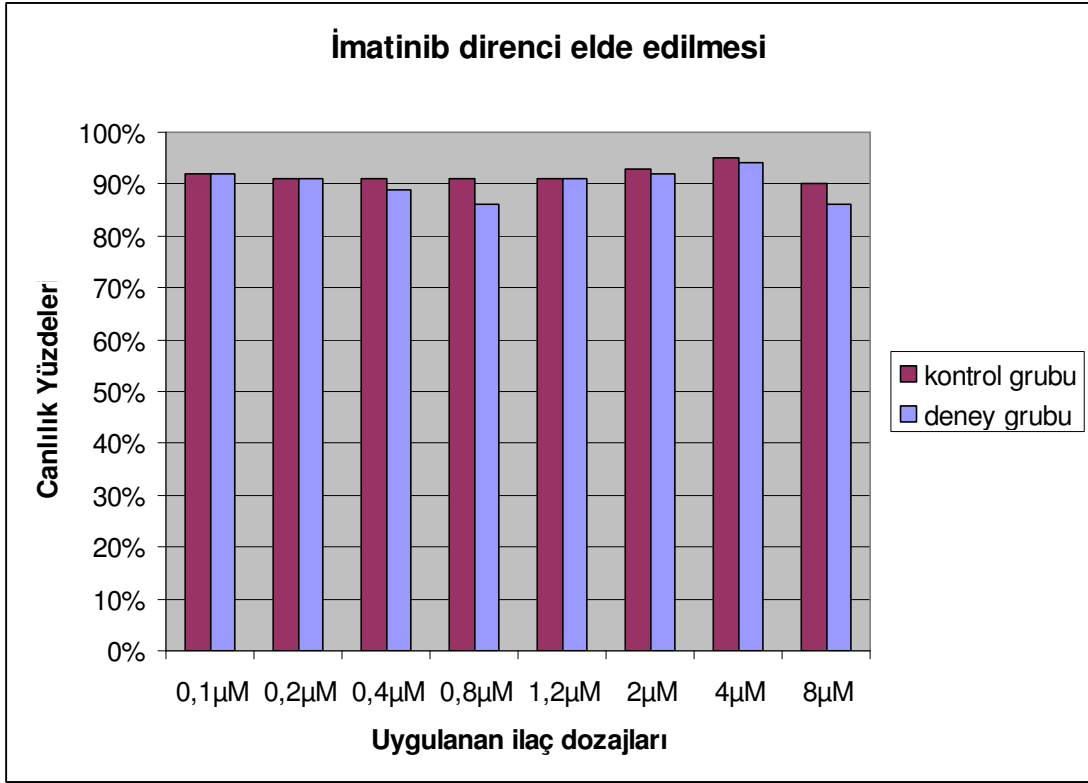
K562 hücre hattını artan İmatinib dozlarına maruz bırakarak hücrelerin direnç kazanmasını sağlamak üzere artan mikromolar dozlar belirlenmiştir. İlk deneme dozu 0,5 μM 'dür. Beklenenden fazla miktarda ölüm gerçekleştiğinden 0,1 μM ile deneye başlanılmasına karar verilmiştir. Her doz artırımından önce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



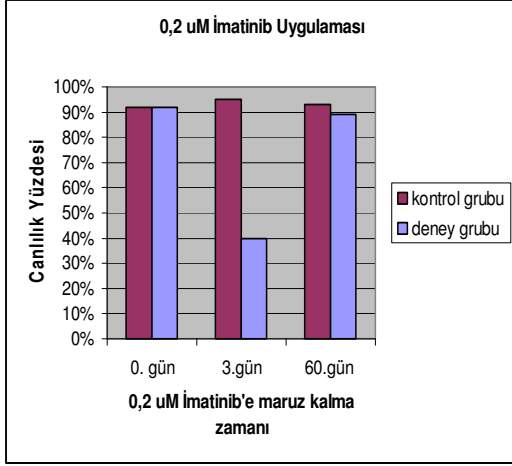
Tablo 3: Grafikte deney düzeneğinin başlangıç aşamasından itibaren doz artırımını yapılmadan önce dirençli hat ile kontrol grubunun canlılık yüzdeleri karşılaştırılmıştır. Dozaj artırımını yapılmadan 24 saat önce grafikte görüldüğü gibi her iki grupta da %90 civarında canlılık gözlenmektedir. Her doz artırımından önce deney ve kontrol grubundaki canlılık yüzdelerinin %90 ve üzeri olmasına dikkat edilmiştir.



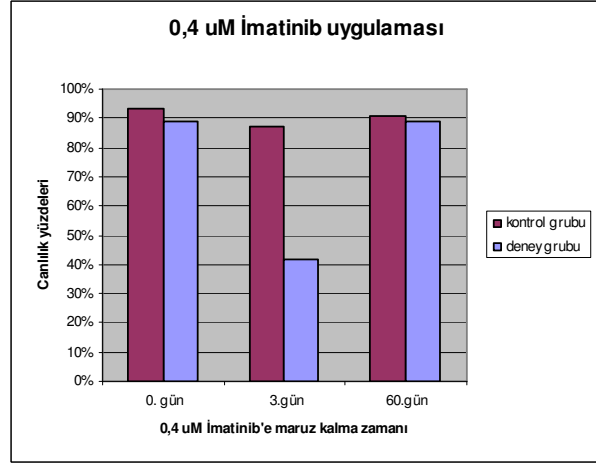
Tablo 4: Grafikte doz artırımını yapıldıktan 72 saat sonra hesaplanan canlılık oranları kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak gösterilmektedir. Hücreler her doz artırımından sonra üreme hızları ve canlılık yüzdeleri Şekil 1'deki gibi kontrol grubuyla eşitlenene kadar belirtilen dozajlarda İmatinib'li ortamda üremeye bırakılmıştır.



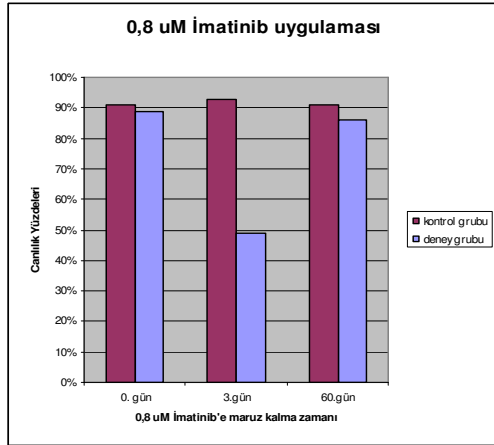
Tablo 5: Grafikte K-562 dirençli deney grubunun dozaj artırımdan önceki canlılık yüzdelerinin kontrol grubuyla karşılaştırılması gösterilmiştir.



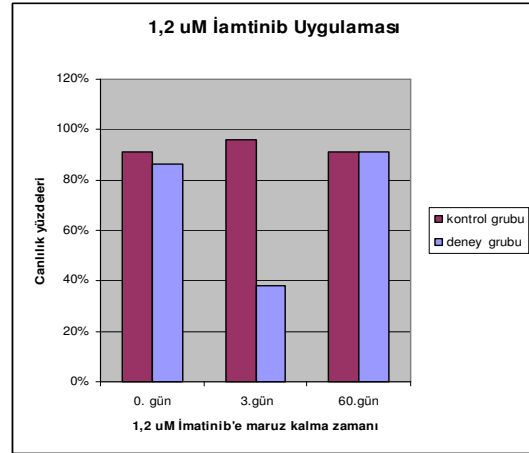
A.



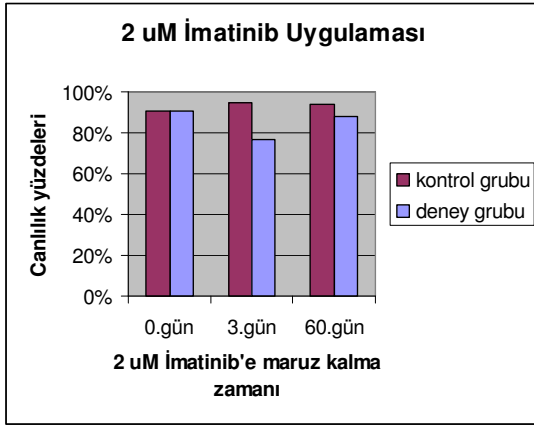
B.



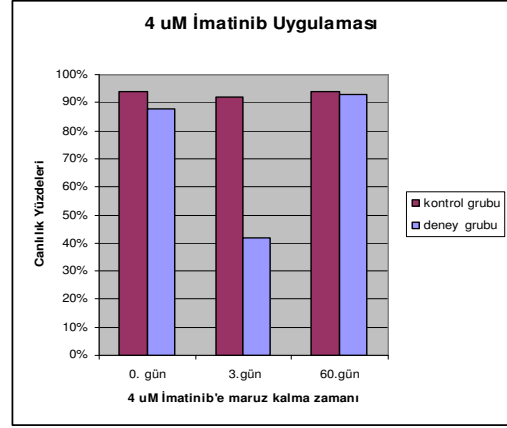
C.



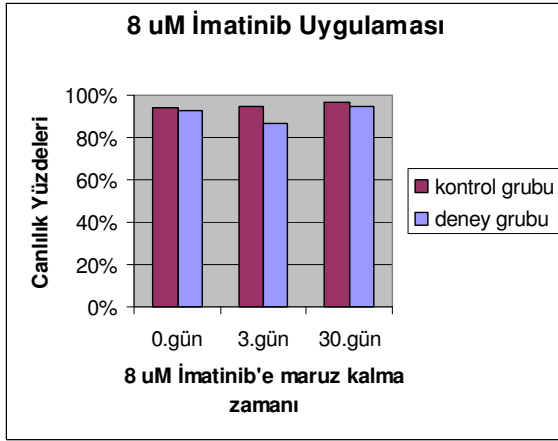
D.



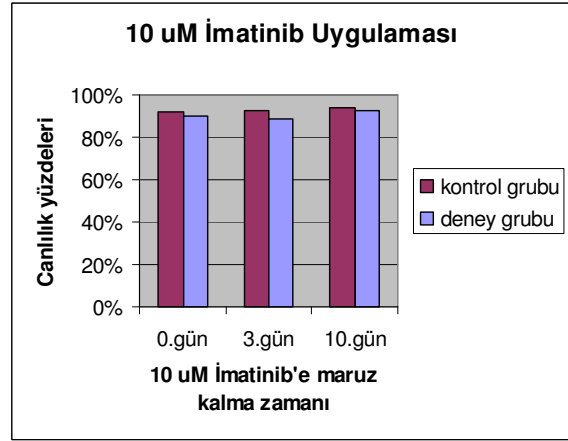
E.



F.



G.



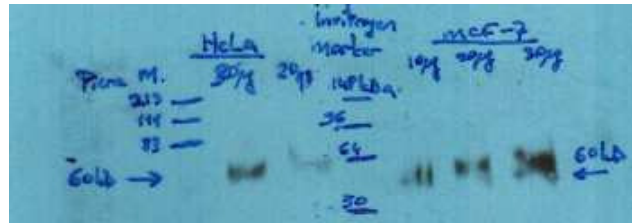
H.

Tablo 6: Farklı İlaç dozajlarında K562 hücrelerinde direnç kazanma. Yukarıda verilen grafikler dizisinde A.'dan itibaren deney grubu flasklarındaki hücrelerin sırasıyla 0,2 - 0,4 - 0,8 - 1,2 - 2 - 4 - 8 -10 μM İmatinib'li ortamda inkübasyonu sırasındaki canlılık oranlarındaki değişimler verilmiştir. **A.** 0,2 μM ilaç uygulandıktan sonra canlılık oranı %40'a düşmüş ve yaklaşık 2 ay süresince yapılan pasajlamalarla tekrar kontrol grubuyla benzer ikilenme zamanı ve canlılık yüzdesine erişilmiştir. **B.** İlaç dozajı 0,4 μM 'a yükseltilmiş canlılık oranı %42'ye düşmüş iki ay sonunda tekrar kontrol grubuyla benzer özelliğe erişmiştir. **C.** İlaç dozajı 0,8 μM 'a çıkartılmış canlılık oranı %47'e düşmüş ve iki ay sonunda kontrol grubuyla benzer özelliğe erişmiştir. **D.** İlaç dozajı 1,2 μM ' a çıkartılmış canlılık oranı %38'e düşmüş 2 ay sonunda kontrol grubuyla benzer özelliğe erişmiştir. **E.** İlaç dozajı 2 μM ' a çıkartılmış canlılık oranı %87'e düşmüş tekrar

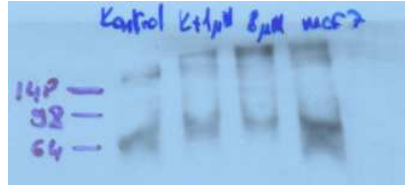
kontrol grubuyla benzer özelliğe erişmiştir. **F.** İlaç dozajı 4 μM 'a yükseltilmiş canlılık oranı %42'e düşmüş iki ay sonunda tekrar kontrol grubuyla benzer özelliğe erişmiştir. **G.** İlaç dozajı 8 μM 'a yükseltilmiş canlılık oranı %87'e düşmüş 1 ay sonunda tekrar kontrol grubuyla benzer özelliğe erişmiştir. **H.** İlaç dozajı 10 μM 'a yükseltilmiş canlılık oranında hemen hemen değişim olmamıştır.

4.2 Western-Blot Bulguları:

Hazırladığımız dirençli K-562 hücre hattında otofaji markeri olan BECN gen ürünü Beclin-1 proteini Western Blot yöntemi kullanılarak gösterilmek üzere öncelikle pozitif kontrol olarak belirtilen HeLa ve MCF-7 hücre hatlarında optimizasyonu yapılmıştır. Daha sonra kontrol K562 grubu 72 saat öldürücü doz 1 μM İmatinib'e maruz bırakılmıştır. İmatinib eklenen K562 kontrol flaskı, normal kontrol K562 ve 8 μM İmatinib dirençli hatla Beclin-1 ekspresyonları açısından karşılaştırılmıştır. Bu deneyin optimizasyonu devam etmektedir.



Resim 2: Beclin-1 (BECN-1) proteininin SDS-PAGE jel görüntüsü. Pozitif kontrol olarak HeLa ve MCF-7 hücre hattı kullanılmıştır. HeLa lizattan 20 ve 30 μg MCF-7 lizatından 10, 20, 30 μg örnek yüklenmiştir. Pierce ve İnvitrogen marker'ları kullanılmıştır. Bantlar transfer probleminden dolayı düzgün görüntülenememiştir.

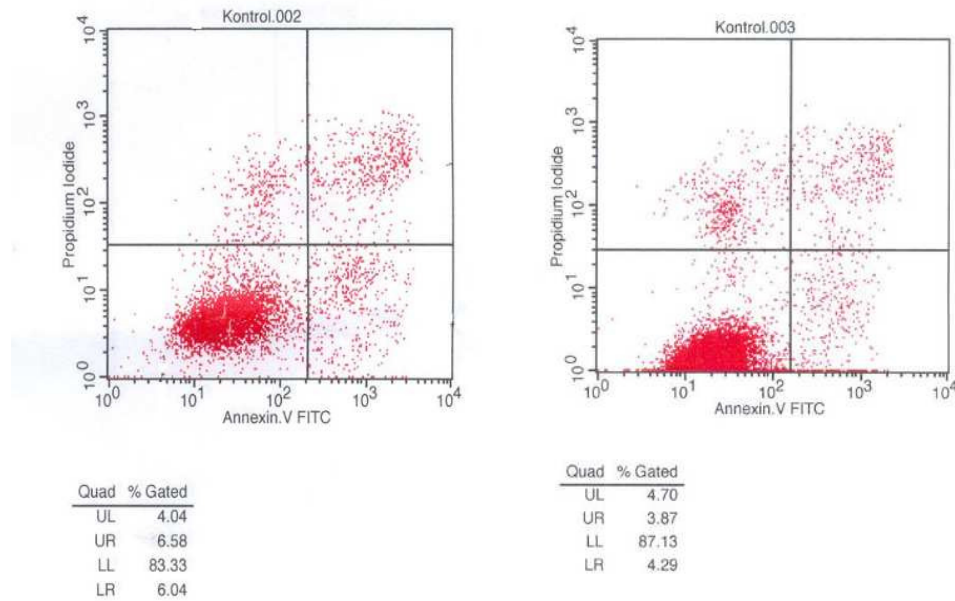


Resim 3: Beclin-1 proteini SDS-PAGE jel görüntüsü. İnvitrogen See Plus2 protein marker (LC5925) kullanılmıştır. Kontrol K562, Kontrol+1 μM (48 saat) İmatinib deney grubu, 8 μM dirençli deney grubu ve pozitif kontrol MCF-7 lizatları kullanılmıştır.

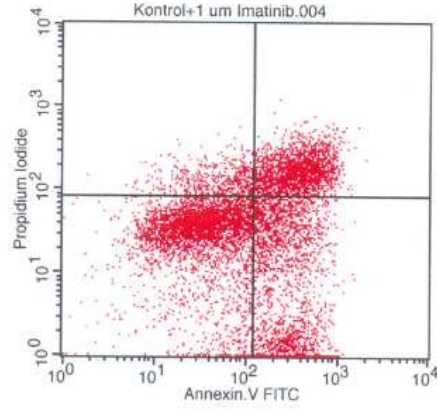
4.3 FACS bulguları:

4.3.1 Annexin-V FACS bulguları

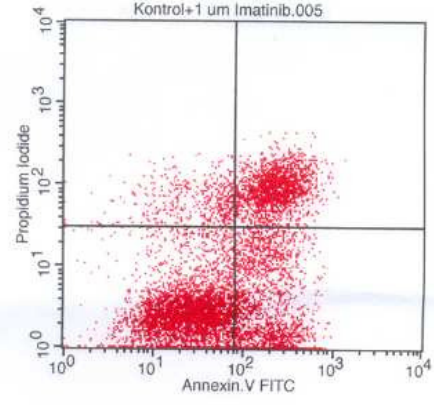
Kontrol K562 grubu 72 saat süresince öldürücü doz 1 μM İmatinib'e maruz bırakılmıştır. İmatinib eklenen K562 kontrol flaskı, normal kontrol K562 ve 8 μM İmatinib dirençli hücre grubunun apoptotik davranışı FACS yöntemiyle karşılaştırılmıştır.



Şekil 18: K562 annexinV için kontrol grubu FACS analizi verisi (ikili çalışma)

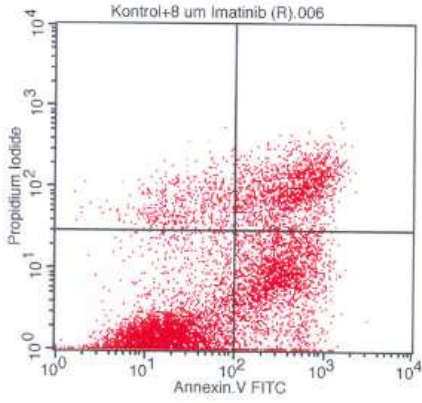


Quad	% Gated
UL	5.84
UR	23.18
LL	44.25
LR	26.72

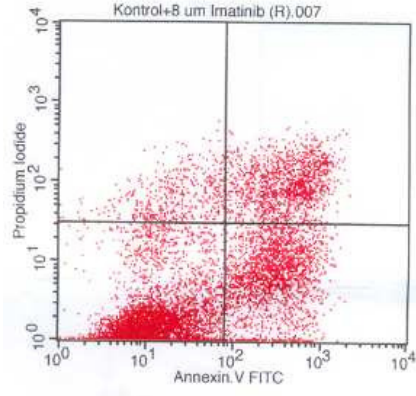


Quad	% Gated
UL	5.24
UR	20.43
LL	48.97
LR	25.37

Şekil 19: K562 hücrelerine 1 µM İmatinib eklendikten 72 saat sonra yapılan annexinV FACS analizi verisi (ikili çalışma)



Quad	% Gated
UL	5.42
UR	16.43
LL	54.83
LR	23.31

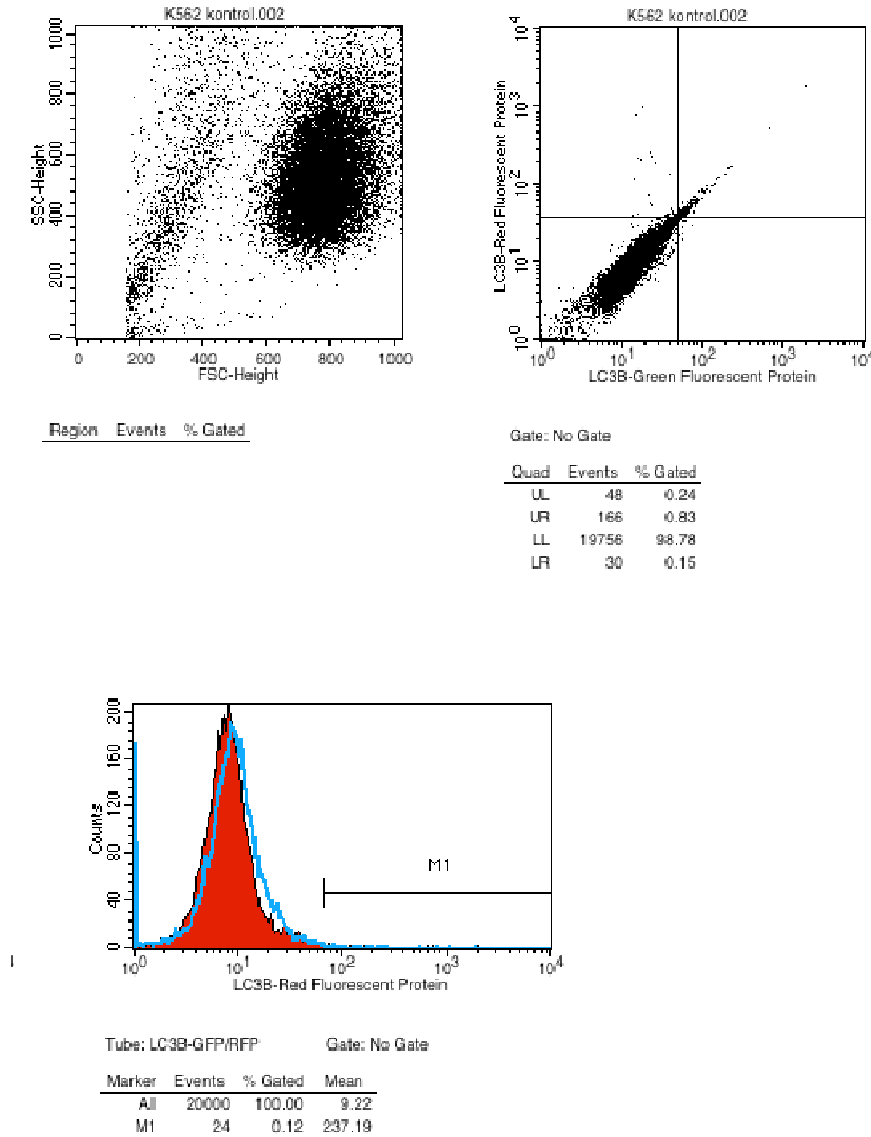


Quad	% Gated
UL	5.26
UR	15.02
LL	55.66
LR	24.06

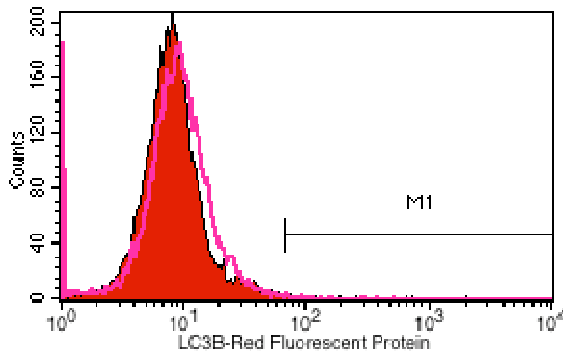
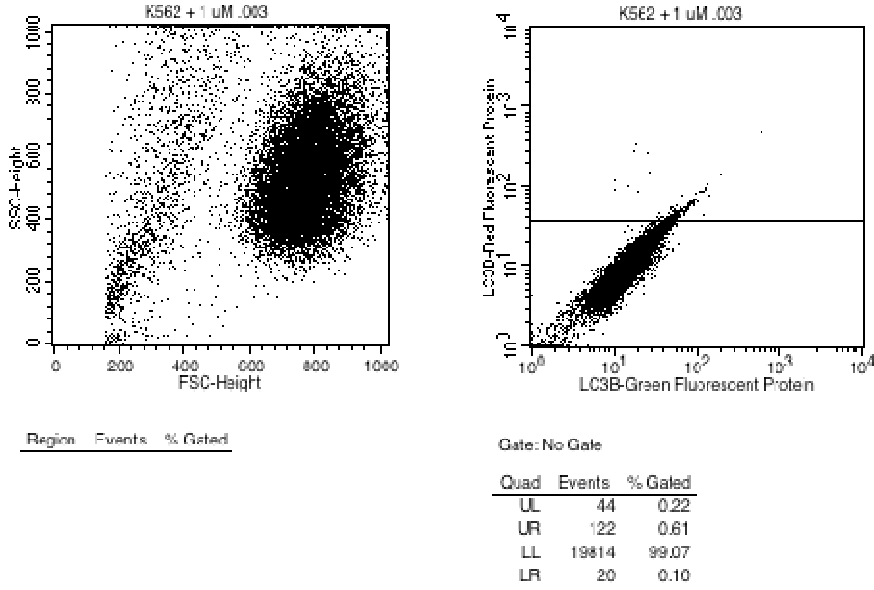
Şekil 20: 8 µM dirençli K562 hücre grubunda annexinV FACS analizi verileri (ikili çalışma)

Akım sitometrisi çalışması sonucunda 1 μ M İmatinib uygulanan kontrol grubunda yoğun olarak hücre ölümü izlenirken, 8 μ M imatinib dirençli hücrelerde hücre ölümünün az olduğu izlenmektedir.

4.3.2 LC3B-RFP FACS bulguları:



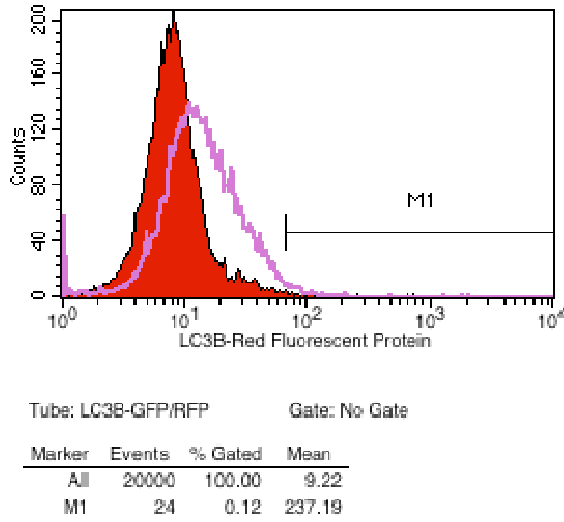
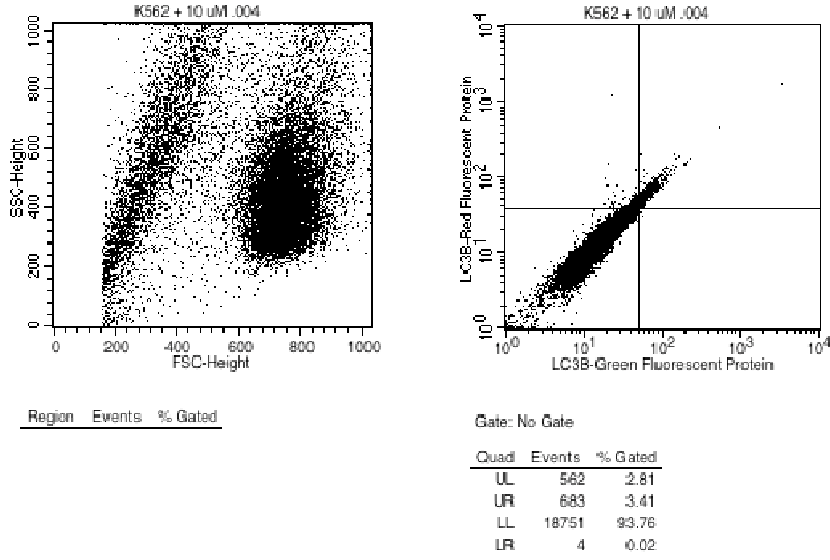
Şekil 21: Kontrol grubu LC3B ekspresyonu FACS analizi. Kırmızı renkte belirtilen bölge transfeksiyon yapılmamış hücre grubunu temsil etmektedir. Mavi çizgi ile belirtilmiş diagram transfekte edilmiş kontrol grubu K562 LC3B-RFP ışınmasını temsil etmektedir.



Tube: LC3B-GFP/RFP Gate: No Gate

Marker	Events	% Gated	Mean
All	20000	100.00	9.22
M1	24	0.12	237.19

Şekil 22: 24 saat 1 μ M imatinib'e maruz kalmış kontrol grubu hücrelerinde LC3B ekspresyonu FACS analizi. Kırmızı renkte belirtilen bölge transfeksiyon yapılmamış hücre grubunu temsil etmektedir. Pembe çizgi ile belirtilmiş diagram transfekte edilmiş ve 1 μ M İmatinib eklenmiş kontrol grubu K562 LC3B-RFP ışınmasını temsil etmektedir. Kontrol grubundan farklı görünmemektedir.



Şekil 23: 10µM imatinib dirençli K562 hücre grubunda LC3B ekspresyonu FACS analizi. Kırmızı renkte belirtilen bölge transfeksiyon yapılmamış hücre grubunu temsil etmektedir. Mor çizgi ile belirtilmiş diagram transfekte edilmiş 10 µM imatinib dirençli K562 LC3B-RFP ışınmasını temsil etmektedir.

	Okuma yapılan hücre popülasyonunda RFP oranı (transfeksiyon verimliliği)
Transfekte edilmemiş kontrol grubu K562	% 0.33
LC3-RFP Transfekte kontrol grubu	% 1.15
LC3-RFP Transfekte kontrol grubu +1µM imatinib	% 1.73
LC3-RFP Transfekte 10 µM imatinib dirençli grup	% 9.63

Tablo 7: Akış sitometrisinde optik okuyucudan geçen hücre grubunda ışığa veren hücrelerin yüzdesi.

FACS verilerine dayanılarak hesaplanan transfeksiyon verimliliğinin genel olarak düşük olduğu izlenmektedir. Genel verimlilik yaklaşık %5-10 civarındadır. Ancak dirençli 10 mikromolar imatinib’de üretilmiş olan hücrelerin transfeksiyon verimliliklerinin kontrol hücrelerinden daha yüksek olduğu izlenmektedir. Dolayısıyla diagramlara bakılarak otofajide artış olarak yorumlanabilecek LC3B ışımasındaki artışın transfeksiyon verimliliğinin daha yüksek olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Sonuç olarak duyarlı ve dirençli hatlar arasında otofajik aktivite açısından bir fark bulunmamaktadır.

4.5 Kaspaz-3 Analizi Bulguları:

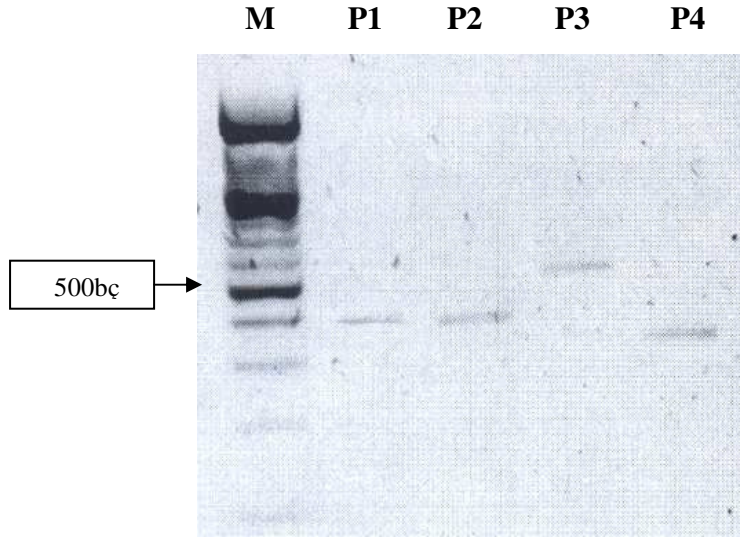
Kontrol K562 grubu 72 saat süresince öldürücü doz 1 µM İmatinib’e maruz bırakılmıştır. İmatinib eklenen K562 kontrol flaskı, normal kontrol K562 ve 8µM İmatinib dirençli hücre grubunda kaspaz-3 analizi yapılmıştır.

	1	2	3	4	5	6	7	
A	0.000	11993.000	92.000					360/460 Corr.
B	566.000	5815.000	679.000		371.000	5105.000	597.000	
C	-13.000	-7.000	-		-	-99.000	-	
D			162.000		128.000		156.000	
E								
F								
G								
H								

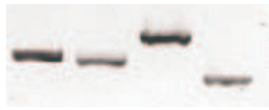
Tablo 8: Kontrol, kontrol + 1 μ M İmatinib (72 saat) ve 8 μ M dirençli K562 hücre grubu lizatlarında kaspaz-3 deneyi 360/460 fluoresans ışımaya bulguları (ikili çalışma). Tablo blank verisi sıfırlanarak elde edilen sonuçları göstermektedir. (**A1:** Blank; **A2:** kaspaz-3 pozitif kontrol; **A3:** kaspaz-3 + inhibitör; **B1-B5:** Kontrol K562; **B2-B6:** kontrol + 1 μ M imatinib; **B3-B7:** 8 μ M dirençli K562; **C1-C5:** Kontrol K562 + inhibitör; **C2-C6:** kontrol K562+1 μ M imatinib+ inhibitör; **C3-C6:** 8 μ M dirençli K562 + inhibitör)

Kaspaz-3 analiz bulgularımız akım sitometrisi ile elde etmiş olduğumuz verileri desteklemektedir. Kaspaz-3 ölçümleri sonucunda 1 μ M İmatinib uygulanan K562 hücrelerinde yoğun olarak kaspaz-3 aktivasyonu saptanırken; 8 μ M imatinib dirençli hücrelerde kaspaz-3 aktivasyonunun İmatinib uygulanmayan kontrol hücreleriyle eş değer olduğu izlenmektedir.

4.5 PCR Bulguları:



Resim 4: HEK hücre hattı cDNA'sı Abl kinaz bölgesinin dört parça halinde çoğaltılmış agaroz jel görüntüsü. **M:** Roche DNA Molecular Weight Marker XIV (100 bp ladder) (katalog no : 11721933001); **P1:** 381bç 'lik bölgeyi temsil etmektedir; **P2:** 364 bç'lik bölgeyi temsil etmektedir, **P3:** 478 bç'lik bölgeyi temsil etmektedir; **P4:** 305 bç'lik bölgeyi temsil etmektedir.



A.

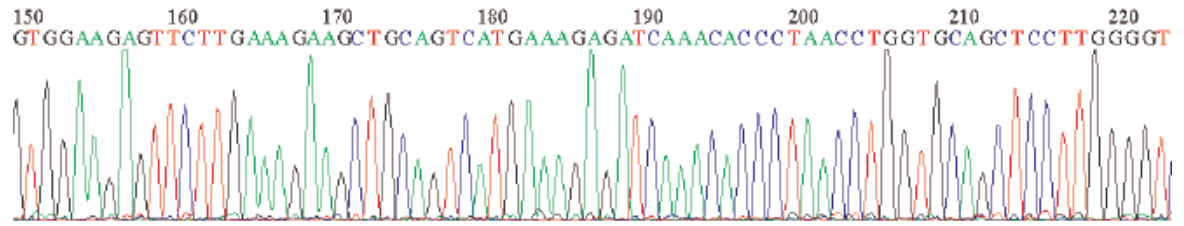


B.

Resim 5: **A.** K562 kontrol grubu cDNA'sının Abl kinaz bölgesinin dört parça halinde çoğaltılmış agaroz jel görüntüsü. **B.** K562 dirençli grup cDNA'sının Abl kinaz bölgesinin dört parça halinde çoğaltılmış agaroz jel görüntüsü

4.6 Sekans analizi bulguları:

Aşağıda verilmiş olan ABL kinaz domeyninin DNA dizi analiz sonuçları bu bölgede dirençli hattımızda mutasyon olmadığını; atasal K562 hücreleri ile karşılaştırıldığında bu bölgedeki dizide herhangi bir fark bulunmadığını göstermektedir.



Resim 6: Abl kinaz bölgesinden bir kesit sekanslama örneği. (Veri yorumlanmaya uygundur.)

```

1251                                     1300
dir AGTACGGGGA GGTGTACGAG GCGTGTGGA AGAAATACAG CCTGACGGTG
K19_K1-P1F AGTACGGGGA GGTGTACGAG GCGTGTGGA AGAAATACAG CCTGACGGTG
K21_K8-1-P AGTACGGGGA GGTGTACGAG GCGTGTGGA AGAAATACAG CCTGACGGTG
Consensus AGTACGGGGA GGTGTACGAG GCGTGTGGA AGAAATACAG CCTGACGGTG

1301                                     1350
dir GCCGTGAAGA CCTTGAAGGA GGACACCATG GAGGTGGAAG AGTTCTTGAA
K19_K1-P1F GCCGTGAAGA CCTTGAAGGA GGACACCATG GAGGTGGAAG AGTTCTTGAA
K21_K8-1-P GCCGTGAAGA CCTTGAAGGA GGACACCATG GAGGTGGAAG AGTTCTTGAA
Consensus GCCGTGAAGA CCTTGAAGGA GGACACCATG GAGGTGGAAG AGTTCTTGAA

1351                                     1400
dir AGAAGCTGCA GTCATGAAAG AGATCAAACA CCCTAACCTG GTGCAGCTCC
K19_K1-P1F AGAAGCTGCA GTCATGAAAG AGATCAAACA CCCTAACCTG GTGCAGCTCC
K21_K8-1-P AGAAGCTGCA GTCATGAAAG AGATCAAACA CCCTAACCTG GTGCAGCTCC
Consensus AGAAGCTGCA GTCATGAAAG AGATCAAACA CCCTAACCTG GTGCAGCTCC

1401                                     1450
dir TTGGGGTCTG CACCCGGGAG CCCCCGTTCT ATATCATCAC TGAGTTCATG
K19_K1-P1F TTGGGGTCTG CACCCGGGAG CCCCCGTTCT ATATCATCAC TGAGTTCATG
K21_K8-1-P TTGGGGTCTG CACCCGGGAG CCCCCGTTCT ATATCATCAC TGAGTTCATG
Consensus TTGGGGTCTG CACCCGGGAG CCCCCGTTCT ATATCATCAC TGAGTTCATG

1451                                     1500
dir ACCTACGGGA ACCTCCTGGA CTACCTGAGG GAGTGCAACC GGCAGGAGGT
K19_K1-P1F ACCTACGGGA ACCTCCTGGA CTACCTGAGG GAGTGCAACC GGCAGGAGGT
K21_K8-1-P ACCTACGGGA ACCTCCTGGA CTACCTGAGG GAGTGCAACC GGCAGGAGGT
Consensus ACCTACGGGA ACCTCCTGGA CTACCTGAGG GAGTGCAACC GGCAGGAGGT

1501                                     1550
dir GAACGCCGTG GTGCTGCTGT ACATGGCCAC TCAGATCTCG TCAGCCATGG
K19_K1-P1F GAACGCCGTG GTGCTGCTGT ACATGGCCAC TCAGATC... ..
K21_K8-1-P GAACGCCGTG GTGCTGCTGT ACATGGCCAC TCAGATCA... ..
Consensus GAACGCCGTG GTGCTGCTGT ACATGGCCAC TCAGATC... ..

```

Resim 7: Abl kinaz bölgesinin P1 parçasının kontrol grubu ve dirençli grupta sekans karşılaştırması. “Dir” olarak belirtilen dizi, gen bankasında belirtilen abl kinaz bölgesi sekansıdır. K1-P1F: kontrol grubu sekansı, K8-1-P: 8 µM dirençli deney grubu sekansını belirtmektedir.

```

1651                                     1700
dir   CAGGTTGATG ACAGGGGACA CCTACACAGC CCATGCTGGA GCCAAGTTCC
O19_K2-P2F CAGGTTGATG ACAGGGGACA CCTACACAGC CCATGCTGGA GCCAAGTTCC
O21_K8-2-P CAGGTTGATG ACAGGGGACA CCTACACAGC CCATGCTGGA GCCAAGTTCC
Consensus CAGGTTGATG ACAGGGGACA CCTACACAGC CCATGCTGGA GCCAAGTTCC

1701                                     1750
dir   CCATCAAATG GACTGCACCC GAGAGCCTGG CCTACAACAA GTTCTCCATC
O19_K2-P2F CCATCAAATG GACTGCACCC GAGAGCCTGG CCTACAACAA GTTCTCCATC
O21_K8-2-P CCATCAAATG GACTGCACCC GAGAGCCTGG CCTACAACAA GTTCTCCATC
Consensus CCATCAAATG GACTGCACCC GAGAGCCTGG CCTACAACAA GTTCTCCATC

1751                                     1800
dir   AAGTCCGACG TCTGGGCATT TGGAGTATTG CTTTGGGAAA TTGCTACCTA
O19_K2-P2F AAGTCCGACG TCTGGGCATT TGGAGTATTG CTTTGGGAAA TTGCTACCTA
O21_K8-2-P AAGTCCGACG TCTGGGCATT TGGAGTATTG CTTTGGGAAA TTGCTACCTA
Consensus AAGTCCGACG TCTGGGCATT TGGAGTATTG CTTTGGGAAA TTGCTACCTA

1801                                     1850
dir   TGGCATGTCC CTTTACCCGG GAATTGACCT GTCCCAGGTG TATGAGCTGC
O19_K2-P2F TGGCATGTCC CTTTACCCGG GAATTGACCT GTCCCAGGTG TATGAGCTGC
O21_K8-2-P TGGCATGTCC CTTTACCCGG GAATTGACCT GTCCCAGGTG TATGAGCTGC
Consensus TGGCATGTCC CTTTACCCGG GAATTGACCT GTCCCAGGTG TATGAGCTGC

1851                                     1900
dir   TAGAGAAGGA CTACCGCATG GAGCGCCAG AAGGCTGCCC AGAGAAGGTC
O19_K2-P2F TAGAGAAGGA CTACCGCATG GAGCGCCAG AAGGCTGCCC AGAGAAGGTC
O21_K8-2-P TAGAGAAGGA CTACCGCATG GAGCGCCAG AAGGCTGCCC AGAGAAGGTC
Consensus TAGAGAAGGA CTACCGCATG GAGCGCCAG AAGGCTGCCC AGAGAAGGTC

1901                                     1950
dir   TATGAACTCA TGCGAGCATG TTGGCAGTGG AA.TCCCTCT GACCGGCCCT
O19_K2-P2F TATGAACTCA TGCGAGCATG TTGGCAGTGG AT.NCCCTCT NAA.....
O21_K8-2-P TATGAACTCA TGCGAGCATG TTGGCAGTGG ATTNCCCTCT GAA.....
Consensus TATGAACTCA TGCGAGCATG TTGGCAGTGG At.nCCCTCT gAa.....

```

Resim 8: Abl kinaz bölgesi P2 parçasının kontrol ve 8µM dirençli grupta sekans karşılaştırması. “Dir” olarak belirtilen dizi, gen bankasında belirtilen abl kinaz bölgesi sekansıdır. K2-P2F: kontrol grubu sekansı, K8-2-P: 8 µM dirençli deney grubu sekansını belirtmektedir.


```

1401                                     1450
dir TTGGGGTCTG CACCCGGGAG CCCCCGTTCT ATATCATCAC TGAGTTCATG
C21_K3-P3F TTGGGGTCTG CACCCGGGAG CCCCCGTTCT ATATCATCAC TGAGTTCATG
C23_K8-3-P TTGGGGTCTG CACCCGGGAG CCCCCGTTCT ATATCATCAC TGAGTTCATG
Consensus TTGGGGTCTG CACCCGGGAG CCCCCGTTCT ATATCATCAC TGAGTTCATG

1451                                     1500
dir ACCTACGGGA ACCTCCTGGA CTACCTGAGG GAGTGCAACC GGCAGGAGGT
C21_K3-P3F ACCTACGGGA ACCTCCTGGA CTACCTGAGG GAGTGCAACC GGCAGGAGGT
C23_K8-3-P ACCTACGGGA ACCTCCTGGA CTACCTGAGG GAGTGCAACC GGCAGGAGGT
Consensus ACCTACGGGA ACCTCCTGGA CTACCTGAGG GAGTGCAACC GGCAGGAGGT

1501                                     1550
dir GAACGCCGTG GTGCTGCTGT ACATGGCCAC TCAGATCTCG TCAGCCATGG
C21_K3-P3F GAACGCCGTG GTGCTGCTGT ACATGGCCAC TCAGATCTCG TCAGCCATGG
C23_K8-3-P GAACGCCGTG GTGCTGCTGT ACATGGCCAC TCAGATCTCG TCAGCCATGG
Consensus GAACGCCGTG GTGCTGCTGT ACATGGCCAC TCAGATCTCG TCAGCCATGG

1551                                     1600
dir AGTACCTGGA GAAGAAAAAC TTCATCCACA GAGATCTTGC TGCCCGAAAC
C21_K3-P3F AGTACCTGGA GAAGAAAAAC TTCATCCACA GAGATCTTGC TGCCCGAAAC
C23_K8-3-P AGTACCTGGA GAAGAAAAAC TTCATCCACA GAGATCTTGC TGCCCGAAAC
Consensus AGTACCTGGA GAAGAAAAAC TTCATCCACA GAGATCTTGC TGCCCGAAAC

1601                                     1650
dir TGCCTGGTAG GGGAGAACCA CTTGGTGAAG GTAGCTGATT TTGGCCTGAG
C21_K3-P3F TGCCTGGTAG GGGAGAACCA CTTGGTGAAG GTAGCTGATT TTGGCCTGAG
C23_K8-3-P TGCCTGGTAG GGGAGAACCA CTTGGTGAAG GTAGCTGATT TTGGCCTGAG
Consensus TGCCTGGTAG GGGAGAACCA CTTGGTGAAG GTAGCTGATT TTGGCCTGAG

1651                                     1700
dir CAGGTTGATG ACAGGGGACA CCTACACAGC CCATGCTGGA GCCAAGTTCC
C21_K3-P3F CAGGTTGATG ACAGGGGACA CCTACACAGC CCATGCTGGA GCCAAGTTCC
C23_K8-3-P CAGGTTGATG ACAGGGGACA CCTACACAGC CCATGCTGGA GCCAAGTTCC
Consensus CAGGTTGATG ACAGGGGACA CCTACACAGC CCATGCTGGA GCCAAGTTCC

```

Resim 9: Abl kinaz bölgesi P3 parçasının kontrol ve 8µM dirençli grupta sekans karşılaştırması. “Dir” olarak belirtilen dizi, gen bankasında belirtilen abl kinaz bölgesi sekansıdır. K3-P3F: kontrol grubu sekansı, K8-3-P: 8 µM dirençli deney grubu sekansını belirtmektedir.

```

1801                                     1850
dir   TGGCATGTCC CCTTACCCGG GAATT.GACC TGTCCCAGGT GTATGAGCTG
G21_K4-P4F NGN.NTGTCC CCTTACCCGG GAATTTGACC TGTCCCAGGT GTATGAGCTG
G23_K8-4-P TNG.NTGTCC CCTTACCCGG GAATT.GACC TGTCCCAGGT GTATGAGCTG
Consensus tgg.nTGTCC CCTTACCCGG GAATT.GACC TGTCCCAGGT GTATGAGCTG

1851                                     1900
dir   CTAGAGAAGG ACTACCGCAT GGAGCGCCCA GAAGGCTGCC CAGAGAAGGT
G21_K4-P4F CTAGAGAAGG ACTACCGCAT GGAGCGCCCA GAAGGCTGCC CAGAGAAGGT
G23_K8-4-P CTAGAGAAGG ACTACCGCAT GGAGCGCCCA GAAGGCTGCC CAGAGAAGGT
Consensus CTAGAGAAGG ACTACCGCAT GGAGCGCCCA GAAGGCTGCC CAGAGAAGGT

1901                                     1950
dir   CTATGAACTC ATGCGAGCAT GTTGGCAGTG GAATCCCTCT GACCGGCCCT
G21_K4-P4F CTATGAACTC ATGCGAGCAT GTTGGCAGTG GAATCCCTCT GACCGGCCCT
G23_K8-4-P CTATGAACTC ATGCGAGCAT GTTGGCAGTG GAATCCCTCT GACCGGCCCT
Consensus CTATGAACTC ATGCGAGCAT GTTGGCAGTG GAATCCCTCT GACCGGCCCT

1951                                     2000
dir   CCTTTGCTGA AATCCACCAA GCCTTTGAAA CAATGTTCCA GGAATCCAGT
G21_K4-P4F CCTTTGCTGA AATCCACCAA GCCTTTGAAA CAATGTTCCA GGAATCCAGT
G23_K8-4-P CCTTTGCTGA AATCCACCAA GCCTTTGAAA CAATGTTCCA GGAATCCAGT
Consensus CCTTTGCTGA AATCCACCAA GCCTTTGAAA CAATGTTCCA GGAATCCAGT

2001                                     2050
dir   ATCTCAGACG AAGTGGAAAA GGAGCTGGGG AAACAAGGCG TCCGTGGGGC
G21_K4-P4F ATCTCANACG AAGTGGAAAA GGAGCTGGGG AAACAAGGCG TCCGTGGGGC
G23_K8-4-P ATCTCAGACG AAGTGGAAAA GGAGCTGGGG AAACAAGGCG TCCGTGGGGC
Consensus ATCTCagACG AAGTGGAAAA GGAGCTGGGG AAACAAGGCG TCCGTGGGGC

2051                                     2100
dir   TGTGAGTACC TTGCTGCAGG CCCCAGAGCT GCCCACC AAG ACGAGGACCT
G21_K4-P4F TGTGAGTACC TTAA..... ..
G23_K8-4-P TGTGAGTACC TTA..... ..
Consensus TGTGAGTACC TTA..... ..

```

Resim 10: Abl kinaz bölgesi P4 parçasının kontrol ve 8µM dirençli grupta sekans karşılaştırması. “Dir” olarak belirtilen dizi, gen bankasında belirtilen abl kinaz bölgesi sekansıdır. K4-P4F: kontrol grubu sekansı, K8-4-P: 8 µM dirençli deney grubu sekansını belirtmektedir.

Sekans karşılaştırmalarında internet tabanlı MultAlin programı kullanılmıştır. Kontrol grubu ve 8µM dirençli K562 hücreleri Abl kinaz bölgesinin her dört parçası ayrı ayrı ana sekansla karşılaştırmalı olarak analiz edildiğinde kontrol ve dirençli hücrelerde mutasyona rastlanmamıştır.

5. TARTIŞMA

Kronik miyeloid lösemide (KML) olgularının % 90'dan fazlasında 9 ile 22 no'lu kromozomların uzun kolları arasındaki dengeli translokasyon sonucu oluşan Philadelphia kromozomu (Ph) izlenir. Bu translokasyon sonucunda 9q34'de yerleşik ABL geni ile 22q11'de yerleşik BCR genleri kimerik bir gen oluşturur (BCR/ABL) (1). Gen ürünü Bcr-abl hücreye sürekli bir yaşam sinyali sağlarken; hücreleri apoptozdan korumaktadır. BCR-ABL pozitif hücrelerde gözlenen apoptoza direnç, KML'nin kronik fazında gözlenen miyeloid hücre kompartmanının aşırı genişlemesinden sorumlu mekanizmalardan biri olarak tarif edilmektedir (3). Son yıllarda KML tedavisinde kullanılan ve bir Bcr-Abl kinaz inhibitörü olan İmatinib mesylate BCR-ABL pozitif hücrelerde apoptozu tetikleyebilmektedir (24). BCR-ABL gen ürününün programlanmış hücre ölümüne karşı hücrelerde direnç oluşturduğu ilk 1990'lı yılların sonlarında ortaya konulmuş ve takip eden yıllarda yapılan çalışmalarda doğrulanmıştır (7). Ancak bu çalışmalar yapıldığı zaman moleküler mekanizmaları kısmen bilinen tek programlı hücre ölüm şekli apoptozdu.

Günümüzde nekroptoz, otofaji gibi farklı hücre ölüm tipleri tanımlanmıştır. Temel biyolojik bir olgu olan programlı hücre ölümü embriyonik dönemden itibaren tüm yaşam süresince gözlenmektedir. Programlı hücre ölümü, hücre sayısını kontrol etmede, yanlış yerleşim gösteren, hasarlı, anormal hücrelerin ortadan kaldırılmasında işlev görür. Olgun organizmalarda doku homeostazisi hücre bölünmesi ve programlı hücre ölümü arasındaki dengeye bağlıdır. Hücrelerin ölüm/yaşam dengesindeki bozukluklar önemli patolojik sonuçlar doğurabilmektedir. Hücre ölümünün olmaması gerekirken gerçekleşmesi, hücre ölümünün hızlanması ya da hücre ölümünün yavaşlaması organizmanın sağlığı açısından

tehlikelidir. Programlı hücre ölümündeki yetersizlik, genellikle erken evre kanserlerde ve kanser tedavilerine dirençte karşımıza çıkar (33, 34). Kanser hücreleri, kendilerini programlı hücre ölüm mekanizmalarına dirençli hale getirecek mutasyonlar barındırır. Klinikte kanser ilaçlarının çoğu kanserli hücrelerde bir veya birkaç hücre ölüm yolağını tetiklemek üzere kullanılmaktadır. Ayrıca kanserden farklı olarak, iskemi/reperfüzyon hasarları veya septik şoklarda, aynı zamanda kronik nörodejeneratif veya nöromusküler hastalıklarda akut hücre kayıplarıyla sonuçlanan hücre ölümleri de gözlenebilmektedir. Programlı hücre ölümünün mekanizmalarını iyi anlamak bu mekanizmalardaki herhangi bir bozukluk sonucu oluşabilecek hastalıklara karşı geliştirilecek ilaçlar ve tedavi yaklaşımlarını belirlemede önem arz etmektedir. Tezimizde odaklandığımız otofajik hücre ölümü belirli çevresel uyarılar doğrultusunda hücre bileşenlerinin lizozomal yoldan yıkıldığı, hücre homeostazisi için gerekli fizyolojik bir süreçtir. Evrim süresince mayalardan memelilere kadar tüm ökaryotik canlılarda iyi korunmuştur. Otofajiden sorumlu genler ilk olarak mayalarda bulunsa da günümüzde ökaryotlardaki tüm homologları gösterilmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar otofajinin, başta açlık olmak üzere çeşitli stres koşulları, uzun ömürlü zararlı proteinlerin ve organellerin yıkımı, gelişim ve farklılaşma süreçlerinde hücresel düzenlemeleri, tümör baskılayıcı mekanizmalar ve antijen sunumu gibi birçok fizyolojik ve metabolik süreçte etkin rolü olduğunu göstermektedir (36, 37).

Araştırmamız KML biyolojisi ve tirozin kinaz inhibitörleri ile tedavisinde diğer programlanmış hücre ölüm şekillerinin rolünü araştırmayı hedeflemektedir. Bu amaçla burada sunulan yüksek lisans tezi kapsamında dirençli bir kronik myeoid lösemi alt hücre hattının üretilmesi planlandı. Bugüne kadar yaptığımız çalışmalarımızda 10 μ M İmatinib mesilat'a dirençli K-562 kronik myeloid lösemi hücre hattı elde ettik.. 10 μ M dirençli hat elde ettikten sonra kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak cDNA üzerinden PCR

yöntemleriyle mutasyon taraması yapıldı. Abl proteininin ikincil mutasyonlarının barındığı bölgeye özgü dizayn ettiğimiz PCR primerlerinin düzgün çalıştığını HEK hücre hattı üzerinden yapılan PCR çalışmalarıyla gösterdik. İlaça direnç gösteren hasta gruplarıyla yapılan çalışmalarda Bcr-Abl'in özellikle tirozin kinaz alanındaki dirençliliğe neden olduğu belirtilen mutasyonların elde ettiğimiz dirençli hatta olup olmadığını araştırdık. ABL kinaz domeyninin DNA dizi analiz sonuçları bu bölgede dirençli hattımızda mutasyon olmadığını; atasal K562 hücreleri ile karşılaştırıldığında bu bölgedeki dizide herhangi bir fark bulunmadığını göstermektedir.

Oluşturmuş olduğumuz hattın karakterizasyon çalışmaları sürmektedir. Karakterizasyon amacıyla ilaca bağlı oluşan ikincil kromozomal anomalilerin tespiti için sitogenetik analizlerden faydalanılacaktır. Kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak yüzey markerleri FACS yöntemiyle belirlenecektir.

Karakterizasyon süreci devam ederken yapmış olduğumuz hücre ölümü incelemelerinde imatinib dirençli hattımızın kaspaz 3 ve hücre yüzey annexin ifadesi ile ölçülmüş apoptoza gerçekten de kontrol hattına göre derecede dirençli olduğunu gösterdik. Bunun yanında otofajik ölümü Beclin-1 ekspresyonunu western blot yöntemiyle bakarak ve LC3B ekspresyonunu FACS ile ölçerek değerlendirdik. Özellikle LC3B düzeyinin dirençli hattımızda anlamlı düzeyde artmış olduğunu gösterdik. Ancak FACS verilerine dayanılarak hesaplanan transfeksiyon verimliliğinin genel olarak düşük olduğu izlenmektedir. Genel verimlilik yaklaşık %5-10 civarındadır. Ancak dirençli 10 mikromolar İmatinib'de üretilmiş olan hücrelerin transfeksiyon verimliliklerinin kontrol hücrelerinden daha yüksek olduğu izlenmektedir. Dolayısıyla otofajide artış olarak yorumlanabilecek LC3B ışımadaki artışın transfeksiyon verimliliğinin daha yüksek olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Sonuç olarak duyarlı ve dirençli hatlar arasında otofajik aktivite açısından bir fark bulunmadığını düşünmekteyiz. Bu da direnç

hattımızın otofajik mekanizmaları kullanma açısından atasal K562 hücrelerinden çok da farklı olamığını, direnç mekanizmasının büyük olasılıkla otofajik hücre ölüm mekanizmalarıyla ilintili olmadığını düşündürmektedir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Dirençli hat eldesi deneylerinde her ilaç dozu uygulandığında hücrelerin yaklaşık %50-%60'ının öldüğü gözlenmiştir. Fakat doz artırımında hayatta kalan hücreler ilaçlı ortamda inkübe edilmelerine rağmen zaman içinde tekrar %90'lara yakın canlılığa ulaştıkları gözlenmiştir. İlaçlı ortamda hücrelerin üremeye devam etmesi ve her doz artırımında ortamda ölü hücrelerin yanı sıra canlı hücrelerin de bulunması, hücrelerin klonal seçimle üremeye devam ettiklerini ve uygulanan dozlardaki İmatinib'e direnç kazandığını göstermektedir. Karakterizasyon amacıyla ilaca bağlı oluşan ikincil kromozomal anomalilerin tespiti için sitogenetik analizlerden faydalanılacaktır. Kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak yüzey markerleri FACS yöntemiyle belirlenecektir. Karakterizasyondan sonra gerek protein gerek mRNA düzeyinde otofajik hücre ölümü çalışılmaya devam edilecektir. Elde etmiş olduğumuz verilerin ek deneylerle doğrulanması gerekmektedir. Ayrıca kronikmyeloid lösemilerde miRNA'ların rolü henüz yeterince bilinmemektedir. Bu bağlamda dirençli hattımızda ve kontrol hücrelerde programlı hücre ölümü miRNA düzeyinde çalışılması planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Robbins K. C., Temel Patoloji (Basic Pathology), 5. baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 1995; 365-377.
2. Robert L. Nussbaum., Thompson & Thompson Genetics in Medicine, 6th Edition, 2005, Olgu Sunumu 16: Chronic Myeloid Leukemia
3. Deininger M., Goldman J.M., ve Melo J., The molecular biology of chronic myeloid leukemia, Blood Journal, 2000; 96: 10
4. <http://atlasgeneticsoncology.org/>, Atlas of Genetics in Cytogenetics in Oncology and Haematology, Chronic myelogeneous leukemia
5. Ertmer, Huber V., Gilch S., Yoshimori T., Erfle V., Duyster J. ve Schatz H.M., The anticancer drug Imatinib induces cellular autophagy, Leukemia, 2007; 21: 936–942
6. Schulz W.A., Molecular Biology of Human Cancers, Hollanda, Springer, 2005; 219-237
7. Bubnoff N. ve ark., Resistance of Philadelphia-chromosome positive leukemia towards the kinase inhibitor Imatinib (STI571, Glivec): a target oncoprotein strikes back, Leukemia, 2003; 17: 829-838
8. De Vita V. T., Hellman S., Rosenberg S.A, Cancer: principles and practice of oncology, 1997, 5th edition. Lippincot-Raven Publishers.
9. Rubin CM., Le Beau MM., Chromosomal abnormalities in myeloid hematologic malignancies, Current Topics in Microbiology and Immunology, 1989; Vol. 49 Springer-Berlag, Berlin
10. Helhmann R., Hochhaus A., Baccarani M., Chronic myeloid leukemia, Lancet, 2007, 370:342-350
11. Johansson B., Fioretos T., Mitelman F. Cytogenetic and Molecular Genetic Evolution of Chronic Myeloid Leukemia, Cytogenetic and Molecular Genetic Aspects of Myeloproliferative Disorders, 2002;107, No. 2
12. Mitelman F., Levan G., Nilsson P. G., Brandt L., Non-random karyotypic evolution in chronic myeloid leukemia, International Journal of Cancer, 2006; 18, 24-30
13. Gu J.j, Ryu J. R., Pendergast A. M., Abl Tyrosine Kinases in T-cell Signaling, Immunology Rewiev, 2009; 228(1): 170-183
14. Bernards A., Rubin C. M., Paskind M., Baltimore D., The First Intron in the Human c-abl Gene Is at Least 200 Kilobases Long and Is a Target for Translocations

- in Chronic Myelogenous Leukemia, 1989, *Molecular and Cellular Biology*, , Vol. 7 ; 3231-3236
15. Wolff L., Contribution of oncogenes and tumor suppressor genes to myeloid leukemia, 1997, *Biochimica et Biophysica Acta* 1332, 67-104
 16. Lucas C.M., Harris R.J., Giannoudis A., ve ark., Chronic myeloid leukemia patients with the e13a2 BCR-ABL fusion transcript have inferior responses to Imatinib compared to patients with the e14a2 transcript, *Haematologica*, 2009;94:1362-1367
 17. Laurent E., Talpaz M., Kantarjian H., Kurzrock R., The *BCR* Gene and Philadelphia Chromosome-positive Leukemogenesis, 2001, *CANCER RESEARCH* 61, 2343–2355
 18. Wagner W., Ouyang Q., Pawelec G., The *abl/bcr* gene product as a novel leukemia-specific antigen: peptides spanning the fusion region of *abl/bcr* can be recognized by both CD4+ and CD8+ T lymphocytes, 2003, Springer-Verlag
 19. Zheng X, Oancea C, Henschler R, Moore MAS, Ruthardt M, Reciprocal t(9;22) ABL/BCR Fusion Proteins: Leukemogenic Potential and Effects on B Cell Commitment, *PLoS ONE*, 2009; 4(10): e7661.
 20. Heisterkamp N., Groffen S., Molecular insights in to the Philadelphia translocation, *Hematologic Patology*, 1991; 5(1): 1-10
 21. Ohsaka A., Hoshino S., Kobayashi M, ve ark., Blast crisis of Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukaemia carrying micro-bcr breakpoint (e19a2 and e191a), *British Journal of Haematology*, 2000,118: 251–254
 22. Cardama A., Cortes J., Molecular biology of *bcr-abl*- positive chronic myeloid leukemia, *BLOOD*, 2009 ;vol: 113, num. 8
 23. Hanks SK, Quinn AM, Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241 (4861): 42–52
 24. Bubnoff N., Duyster J. Chronic myelogenous leukemia, *Dtsche Arztebl International*, 2010; 107(7): 114-21
 25. Deininger W.N., Druker B.J., Specific Targeted Therapy of Chronic Myelogenous Leukemia with Imatinib, *Pharmacol Rev.*, 2003; 55:401–42
 26. P.W. Manley, S.W. Cowan-Jacob, E. Buchdunger, D. Fabbro, G. Fendrich, P. Furet, T. Meyer and J. Zimmermann, Imatinib: a selective tyrosine kinase inhibitor 2002, *European Journal of Cancer* Vol. 38 Suppl. 5 S: 19–S27
 27. Martinelli G., Soverini S., Rosti G, Cilloni D., Baccarani M., New tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia, 2005, *Haematologica*; 90:534-541

28. Bixby D., Talpaz M., Mechanisms of resistance to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia and recent therapeutic strategies to overcome resistance, 2009, *Hematology*
29. F. Palandri, F. Castagnetti, The response to Imatinib and interferon- alfa is more rapid than the response to Imatinib alone: a retrospective chronic myeloid leukemia patients in early chronic phase, 2010, *Hematologica*;96
30. Constantinou C., Papas K.A., Constantinou A.I., Caspase-independent pathways of programmed cell death: The unraveling of new targets of cancer therapy?, *Current Cancer Drug Targets*, 2009; 9: 717-728
31. Lorenzo H.K., Susin S.A., Therapeutic potential of AIF-mediated caspase-independent programmed cell death, *Drug Resistance Updates*, 2007; 235-255
32. Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P. ve ark., Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009, *Cell Death Differ.* 2009; 16(1): 3–11.
33. Duprez L., Wirawan E., Berghe T.V., Vandenabeele P., Major cell death pathways at a glance, *Microbes and Infection*, 2009;11: 1050-1062
34. Elmor S., Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death, *Toxicologic Pathology*, 2007; 35:495–516
35. Alberts B. ve ark., *Molecular biology of the cell*, 4. baskı,
- 35a. Heath-Engel H.M., Chang N.C., Shore G.C., The endoplasmic reticulum in apoptosis and autophagy: role of the BCL-2 protein family, *Oncogene*, 2008; 27, 6419–6433
36. Mizushima N., Autophagy: process and function, *GENES & DEVELOPMENT*, 2007; 21:2861–2873
37. Yorimitsu T., Klionsky D.J., Autophagy: molecular machinery for self-eating, *Cell Death and Differentiation* (2005) 12: 1542–1552
38. Gozuacık D., Kimchi A., Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism, *Oncogene* (2004) 23: 2891–2906
39. Hoyer-Hansen M, Bastholm L, et al. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase-beta and Bcl-2, *Mol Cell* (2007) 25: 193-205.
40. Redaelli S., Piazza R., Rostagno R. ve ark., C -Activity of bosutinib, dasatinib and nilotinib against 18 imatinib resistant BCR/ABL mutants, *JCO*, 2008

EK

KİMYASALLAR VE ÇÖZELTİLER:

WESTERN BLOT ÇÖZELTİLERİ:

LİZİS TAMPONU (50 ml. İçin):

- 1,25 ml 1 M Hepes (pH: 7,6) çözeltisi
- 10 ml. 2M. KCl
- 625 µl 1M. MgCl₂
- 10 µl 500 µM EDTA
- 5 ml. Gliserol
- 500 µl. %20 NP40 solüsyonu
- 500 µl 100 µM PMSF
- 50 µl 1M. DTT
- 50 µl proteaz inhibitör kokteyli.
- Hacim ddH₂O ile 50 ml.'ye tamamlanır.
- Oda sıcaklığında saklanır.
-

TBS:

- 10 mM Tris (pH: 8)
- 150 mM NaCl

TBST:

- %0,05 Tween 20 + TBS

4X YÜRÜTME TAMPONU

- 18,17 gr Tris Bazı
- 4 ml %10'luk SDS
- dH₂O ile hacim 100 ml.'ye tamamlanır.
- pH' ı 12 N HCl ile 8,8' e ayarlanır.

4X YÜKLEME TAMPONU (500 ml için) :

- **0,05M Tris** : 25 ml 1 M Tris Buffer (pH: 6.8) alınır.
- **%0,05 SDS**: 20 ml %10'luk SDS alınır.
- Hacim çift distile su ile 500 ml.'ye tamamlanır.
- Oda sıcaklığında saklanır.

STOK SDS PAGE ÖRNEK YÜKLEME TAMPON ÇÖZELTİLERİ:

2X R/G Stoğu:

- 2,5 ml. 4X Stacking Buffer
- 2,0 ml %10 SDS
- 0,25 mg Brom Fenol Blue boyası
- 2,0 ml Gliserol
- 2,5 ml ddH₂O

4X Gliserol (no R) Stoğu:

- 5 ml. 4X Stacking Buffer
- 0,25 mg Brom Fenol Blue boyası
- 4,0 ml ddH₂O

4X R (no Gliserol) Stoğu:

- 5 ml. 4X Stacking Buffer
- 0,25 mg Brom Fenol Blue boyası
- 4,0 ml ddH₂O

4X R/G Stoğu:

- 5 ml. 4X Stacking Buffer
- 0,25 mg Brom Fenol Blue boyası
- 4,0 ml ddH₂O

Tüm stok örnek tampon stokları oda sıcaklığında saklanır.

SDS PAGE ÖRNEK YÜKLEME ÇÖZELTİLERİ:

Kullanmadan hemen önce aşağıdaki solüsyonlar hazırlanır:

2X R/G:

- 900 λ Stok 2XR no G
- 100 λ Beta Mercapto ethanol.

4X Gliserol (no R) :

- 800 λ Stok 4XG no R
- 200 λ ddH₂O

4X R (no Gliserol):

- 800 λ Stok 4XG no R
- 200 λ Beta Mercapto ethanol.

4X R/G:

- 800 λ Stok 4XR/G
- 200 λ Beta Mercapto ethanol.

% 10' LUK AMONYUM PER SÜLFAT ÇÖZELTİSİ:

- 1 gr. Amonyumpersülfat tartılır.
- Son hacmi 10 ml olacak kadar çift distile suda çözülür.
- + 4 °C' de saklanır.

% 10' luk SDS PAGE JELİ :

- 5 ml % 30' luk Akrilamit bis solüsyonu
- 3,8 ml 4X Running Buffer
- 6 ml çift distile su
- 224 μ l % 10' luk Amonyum per sülfat çözeltisi
- 10 μ l TEMED

% 5' lik YÜKLEME JELİ:

- 900 µl % 30' luk Akrilamit bis solüsyonu
- 1332 µl 4X Running Buffer
- 3 ml çift distile su
- 84 µl % 10' luk Amonyum per sülfat çözeltisi
- 15 µl TEMED

DiĞER ÇÖZELTİLER:

100 µM PMSF:

- 0,174 gr. PMSF tartılır.
- Hacmi ddH₂O ile 10 ml.'ye tamamlanır.
- -20 °C'de saklanır.

1 M DTT:

- 1,54 gr DTT tartılır.
- Hacmi ddH₂O ile 10 ml.'ye tamamlanır.
- +4 °C'de saklanır.

2M KCl:

- 75,56 gr KCl
- Hacmi ddH₂O ile 500 ml.'ye tamamlanır.
- Oda sıcaklığında saklanır.

RNase - Free Su :

- 100 µl DPEC 100 ml suya eklenir.
- Alt üst ederek karıştırılır.
- 12 Saat 37 °C'de bekletilir.
- 10 Dakika 121 °C'de otaklavlanır.