



**BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**İNSAN KRONİK MYELOBLASTİK LÖSEMİ HÜCRE
DİZİSİ K562'DE İMATİNİBİN VE SİLİMARİNİN
BCR-ABL1, GRB2, GAB2, AKT ve *ERK* GEN
İFADELENMELERİNE OLAN ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Moleküler Biyolog Burcu YAZAR ÜNTEKİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2014



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

İNSAN KRONİK MYELOBLASTİK LÖSEMİ HÜCRE
DİZİSİ K562'DE İMATİNİBİN VE SİLİMARİNİN
***BCR-ABL1, GRB2, GAB2, AKT* ve *ERK* GEN**
İFADELENMELERİNE OLAN ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyolog Burcu YAZAR ÜNTEKİN

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Erkan YURTCU

ANKARA, 2014

T.C
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Burcu Yazar Üntekin tarafından yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 11/09/2014

Tez Konusu: “İnsan Kronik Myeloblastik Lösemi Hücre Dizisi K 565’de İmatinibin ve Silimarinin BCR-ABL1, GRB2, GAB2, AKT ve ERK Gen İfadelemelerine Olan Etkisinin Değerlendirilmesi”

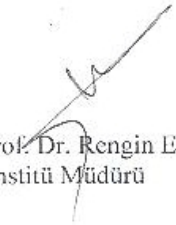
TEZ DANIŞMANI: Doç. Dr. Erkan Yurtcu

TEZ JÜRİSİ ÜYELERİ

Prof. Dr. F.Belgin Ataç	Başkent Üniversitesi
Doç. Dr. Erkan Yurtcu	Başkent Üniversitesi
Prof. Dr. M. Ali Ergün	Gazi Üniversitesi



ONAY: Bu tez, Başkent Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun 12.03. / 2014 tarih ve 463... Karar Sayısı ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Rengin ERDAL
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimin boyunca ve tez çalışmam süresince her konuda özveri, sabır ve sevgiyle bana destek olan tez danışmanım Sayın Doç.Dr. Erkan Yurtcu'ya,

Akademik, bilimsel ve manevi desteği için Başkent Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr. Belgin Ataç'a,

Bilgi ve birikimi ile bu süreçte bana destek olan Sayın Dr. Hasibe Verdi'ye,

Aynı bölümde öğrenci olmaktan dolayı kendimi şanslı hissettiğim başta Uzm. Biyolog Yaprak Yılmaz olmak üzere Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nın tüm yüksek lisans ve doktora öğrencilerine,

Güler yüzle benden yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nın tüm çalışanlarına,

Eğitimime verdikleri önem ve destek ile beni bugünlere getiren sevgili annem Meryem Yazar'a, babam Fikret Yazar'a ve kardeşim Burçin Yazar'a,

Birlikte çıktığımız yolda iyi günde kötü günde benden sevgisini ve desteğini esirgemeyen sevgili eşim Eray Üntekin'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

ÖZET

KML'nin moleküler patogeneğinde Philadelphia (Ph) kromozomu üzerindeki *BCR-ABL1* füzyon geni rol oynar. Oluşan füzyon protein AKT, ERK ve STAT yollarını aktive eden bir tirozin kinaz kodlarken bu proteinin modölatörleri GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2) ve GAB2 (Grb-2-associated binder 2)'dir. KML tedavi protokolünde yer alan STI571 (imatinib mesilat), tirozin kinaz özelliği olan bu enzimin ATP-bağlayıcı bölgesine kompetitif inhibisyonla bağlanır. BCR-ABL1 sinyal iletiminde görevli proteinlerin tirozin fosforilasyonu inhibe olur.

Bu çalışmada, insan KML hücre dizisi K562 hücrelerinde STI571 uygulaması ile birlikte bitkisel bir flavonoid olan silimarin uygulamasının hücre içi sinyal yolları üzerine etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir. K562 hücre dizisi RPMI besiyerinde %5'lik CO₂, %95 nem içeren 37 °C'lik inkübatörde çoğaltıldı. STI571 sitotoksik dozu MTT testi ile belirlendikten sonra hücrelere STI571, silimarin, STI571 ve silimarin kombinasyonu birlikte uygulandı. Kontrol grubu olarak kullanılacak hücre grubuna hiçbir uygulama yapılmadı. Belirlenen doz ve uygulama süreleri sonunda tüm hücrelerden mRNA izolasyonu yapıldı ve bunu takiben cDNA elde edildi. *BCR-ABL1*, *GRB2*, *GAB2*, *AKT* ve *ERK* genlerinin ifadenme düzeyleri real-time PCR yöntemi ile belirlendi.

Sonuç olarak imatinib ve silimarin kombinasyonu uygulanan K562 hücrelerinde *GAB2* ve *ERK* gen ifadenme düzeylerinin azaldığı tespit edildi. Diyete ek olarak alınan silimarin aracılığıyla KML hücrelerinde imatinibin etkinliğinin artırılabilceğinin gösterilmesi ilaç dirençliliğinde rol oynayan sinyal moleküllerinin baskılanabileceğini akla getirmektedir. Bunun ileride yapılacak klinik çalışmalara ışık tutabileceğini düşünüyüyoruz.

Anahtar Kelimeler: Kronik myeloid lösemi, silimarin, imatinib, *BCR-ABL1*, *GRB2*, *GAB2*, *AKT*, *ERK*

ABSTRACT

BCR-ABL1 fusion gene, located on Philadelphia (Ph) chromosome has a major role in the pathogenesis of CML. Fusion protein, the product of this translocation, encodes a tyrosine kinase that activates AKT, ERK and STAT pathways. The modulators of BCR-ABL1 fusion protein are GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2) and GAB2 (Grb-2-associated binder 2) in the activation of cell signalling pathways. STI571, that is given to patients in CML treatment protocol, binds to the ATP-binding domain of tyrosine kinase enzyme by competitive inhibition. The tyrosine phosphorylation of the proteins, responsible of BCR-ABL1 signalling, is inhibited.

The aim of this study is to determine the effect of silimarin, a herbal flavonoid, treatment together with STI571 on human CML cell line K562 signalling pathways. K562 cells were maintained in RPMI 1640 medium, at 37°C in a 95% (v/v) humidified atmosphere of 5% (v/v) CO₂. After determining the cytotoxic dose of STI571 by MTT test, cells were treated by STI571, silymarin, and combination of both STI571 and silymarin. Control group was not treated with any of the substances. After the treatment of cells with previously designated doses and times, mRNA were isolated and cDNA were synthesised. *BCR-ABL1*, *GRB2*, *GAB2*, *AKT* and *ERK* gene expression levels were analyzed with real-time PCR.

In conclusion, the decrease of *GAB2* and *ERK* gene expression levels was determined in K562 cells that are treated with imatinib and silimarin combination. Silimarin as dietary supplement may increase the effect of imatinib and suppress the defined cell signalling pathways on drug resistance on CML cells.

Key words: Chronic myelogenous leukemia, silymarin, imatinib, *BCR-ABL1*, *GRB2*, *GAB2*, *AKT*, *ERK*

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Hematopoetik Hücrelerin Gelişimi	3
2.2 Kronik Myeloid Lösemi	4
2.2.1 Tanım ve tarihçe	4
2.2.2 Klinik	5
2.3 KML'de Sitogenetik Değişiklikler	7
2.4 KML'de Moleküler Patogenez	9
2.4.1 BCR ve ABL proteinlerinin yapısı ve fonksiyonu	9
2.4.2 BCR-ABL1 aracılı lösemik transformasyonun moleküler mekanizması	13
2.5 KML Hastalığında Tanı	17
2.6 KML Hastalığında Tedavi	17
2.7 <i>BCR-ABL1</i> 'in Modülatörleri ve Etkilediği Yolaklar: <i>GRB2</i> , <i>GAB2</i> , <i>AKT</i> ve <i>ERK</i> Genleri	20
2.8 Silimarin	20
2.9 Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemiyle Gen İfadelemesinin Analizi	22
3. GEREÇ ve YÖNTEM	24
3.1 Gereç ve Malzemeler	24

3.1.1 Kullanılan cihazlar	24
3.1.2 Kullanılan kimyasallar	24
3.1.3 Kullanılan tampon ve çözeltiler	25
3.2 Yöntem	25
3.2.1 K562 hücre kültürü çalışmaları	25
3.2.2 MTT hücre proliferasyon testi	25
3.2.3 Hücre kültürlerine imatinib ve silimarin uygulamaları	26
3.2.4 Hücre kültüründen RNA eldesi	27
3.2.5 RNA'dan cDNA eldesi	27
3.2.6 Q-RT-PCR ile <i>ABL1</i> , <i>BCR-ABL1</i> , <i>GRB2</i> , <i>GAB2</i> , <i>AKT</i> ve <i>ERK</i> ifadelenme analizi	28
3.2.7 İstatistiksel analiz	32
4. BULGULAR	33
4.1 MTT Yöntemi ile Belirlenmiş Olan İmatinib IC ₅₀ Değerleri	33
4.2 <i>BCR-ABL1</i> , <i>GRB2</i> , <i>GAB2</i> , <i>AKT</i> ve <i>ERK</i> Genlerinin İfadelenme Düzeyleri	34
5. TARTIŞMA	44
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	50
7. KAYNAKLAR	51

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

α -IFN	α -interferon
ABL1	<i>Abelson murine leukemia 1</i>
AIF	Apoptoz-indükleyici faktör
<i>AKT</i>	v-akt murine thymoma viral onkogen homoloğu
ALL	Akut lenfoblastik lösemi
AML	Akut myeloid lösemi
A-MuLV	Abelson Murine leukemia virusu
AR	Androjen reseptörü
Bax	Bcl-2 ilişkili X-protein
Bcl-2	B-hücre lösemi protein-2
BCR	<i>Breakpoint cluster region</i>
Bid	BH3 etkileşen domain ölüm agonisti
CAD	Kaspaz tarafından aktive olan deoksiribonükleaz
cDNA	Komplementer deoksiribonükleik asit
CFU	Koloni oluşturan unite (<i>colony forming unit</i>)
CFU-E	Eritrosit – koloni oluşturan unite
CFU-GM	Granülosit-makrofaj – koloni oluşturan unite
Cp	Crossing point
Ct	Threshold cycle
Cyto-C	Sitokrom c
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
DHT	Dihidrotestosteron
Diablo	Mitokondriyal IAP(inhibitor of apoptosis) bağlanma proteini
DSO	Dünya Sağlık Örgütü
dTTP	Deoksitimidin trifosfat
dUTP	Deoksiüridin trifosfat
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ERK	Ekstraselüler sinyal-regüle kinaz

EtBr	Etidyum Bromür
FADD	Fas bağımlı ölüm domaini içeren protein
FAK	Fokal adezyon kinaz
FasL	Fas ligand
FISH	Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon
FRET	Floresan rezonans enerji transferi
GAB2	Grb-2-associated binder 2
GAP	<i>GTPase activating protein domain</i>
GM-CSF	Granülosit-makrofaj <i>colony stimulating factor</i>
GRB2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
IC ₅₀	Hücre proliferasyonunun %50 baskılandığı konsantrasyon
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IGFBP	İnsülin benzeri büyüme faktörüne bağlanma proteini
IL-3	Interlökin-3
IRIS	International Randomized study of interferon vs imatinib
JAK	Janus kinaz
JMML	Juvenil myelomonositik lösemi
Kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
KML	Kronik myeloid lösemi
KMPH	Kronik myeloproliferatif hastalıklar
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
MEK	Mitojen bağlı, ekstraselüler regüle edilen kinaz
M-BCR	Major BCR
m-BCR	Minor BCR
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
μ-BCR	Mikro BCR
μM	Mikromolar
μl	Mikrolitre
ng	Nanogram
PBS	Fosfat tamponlu tuz
Ph	Philadelphia

PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PKC	Protein kinaz C
Q-RT-PCR	Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RasGAP	GTPase activating protein
RNA	Ribonükleik asit
RT-PCR	Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SAK	Src ailesi kinazları
SH1, 2, 3	Src homoloji bölgeleri
Smac	İkinci mitokondri kökenli kaspaz aktivatörü
Sos	<i>Son of sevenless</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
TBE	Tris Baz EDTA
tBid	Truncation of Bid
Tyr177	177. pozisyondaki tirozin
U	nite
XPB	<i>Xeroderma pigmentosum – B</i>
Y177	177. pozisyondaki tirozin
°C	Santigrad derece

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Hematopoez	4
Şekil 2.2: KML kronik fazda kemik iliği morfolojisi	6
Şekil 2.3: KML akselere fazda kemik iliği morfolojisi	6
Şekil 2.4: KML blast fazda kemik iliği morfolojisi	7
Şekil 2.5: G-bantlama ile elde edilmiş karyotip görüntüsünde Ph kromozomu	8
Şekil 2.6: <i>ABL1</i> ve <i>BCR</i> FISH problemlerinin idiogram üzerinde ve hücreler üzerinde gösterimi	8
Şekil 2.7: BCR proteininin yapısı	10
Şekil 2.8: <i>ABL1</i> proteininin yapısı	11
Şekil 2.9: <i>ABL1</i> genindeki alternatif 2 kırık noktası	11
Şekil 2.10: BCR genindeki alternatif 3 kırık noktası	11
Şekil 2.11: <i>BCR</i> ve <i>ABL1</i> genlerindeki alternatif kırık noktaları ve oluşan alternatif transkriptler	12
Şekil 2.12: <i>BCR</i> , <i>ABL1</i> ve <i>BCR-ABL1</i> genleri ve kodladıkları proteinler	13
Şekil 2.13: BCR-ABL1 sinyal yolları	16
Şekil 2.14: İmatinibin 2 boyutlu yapısı	19
Şekil 2.15: Silimarinin 2 boyutlu şekli	21
Şekil 2.16: Silimarinin hedeflediği hücresel proliferatif yolların şematik gösterimi	21
Şekil 2.17: RT-PCR kinetiği	23
Şekil 3.1: <i>ABL1</i> geni (ENST00000318560)	29
Şekil 3.2: <i>ABL1</i> geni için elde edilen standard eğrisi	32
Şekil 4.1: K562 hücrelerine imatinibin MTT testi analizleri sonucu belirlenmiş olan etkisi (48 saat ve 72 saat)	33
Şekil 4.2: <i>BCR-ABL1</i> gen ifadenmesinin örnek analizi (<i>BCR-ABL1/ABL1</i>)	34

Şekil 4.3:	48 saat sonunda kontrol ve uygulama gruplarında <i>BCR-ABL1</i> , <i>GRB2</i> , <i>GAB2</i> , <i>AKT</i> ve <i>ERK</i> ifadelenme düzeylerinin karşılaştırılması	35
Şekil 4.4:	72 saat sonunda kontrol ve uygulama gruplarında <i>BCR-ABL1</i> , <i>GRB2</i> , <i>GAB2</i> , <i>AKT</i> ve <i>ERK</i> ifadelenme düzeylerinin karşılaştırılması	36
Şekil 4.5:	48 ve 72 saat sonunda kontrol ve uygulama gruplarında <i>BCR-ABL1</i> , <i>GRB2</i> , <i>GAB2</i> , <i>AKT</i> ve <i>ERK</i> ifadelenme düzeylerinin karşılaştırılması	36
Şekil 4.6:	K562 hücrelerinde kontrol ve uygulama gruplarında 48 saat sonunda <i>BCR-ABL1</i> ifadelenme düzeyleri	37
Şekil 4.7:	K562 hücrelerinde kontrol ve uygulama gruplarında 72 saat sonunda <i>BCR-ABL1</i> ifadelenme düzeyleri	38
Şekil 4.8:	K562 hücrelerinde kontrol ve uygulama gruplarında 48 saat sonunda <i>GRB2</i> ifadelenme düzeyleri	39
Şekil 4.9:	K562 hücrelerinde kontrol ve uygulama gruplarında 72 saat sonunda <i>GRB2</i> ifadelenme düzeyleri	39
Şekil 4.10:	K562 hücrelerinde kontrol ve uygulama gruplarında 48 saat sonunda <i>GAB2</i> ifadelenme düzeyleri	40
Şekil 4.11:	K562 hücrelerinde kontrol ve uygulama gruplarında 72 saat sonunda <i>GAB2</i> ifadelenme düzeyleri	41
Şekil 4.12:	K562 hücrelerinde kontrol ve uygulama gruplarında 48 saat sonunda <i>AKT</i> ifadelenme düzeyleri	41
Şekil 4.13:	K562 hücrelerinde kontrol ve uygulama gruplarında 72 saat sonunda <i>AKT</i> ifadelenme düzeyleri	42
Şekil 4.14:	K562 hücrelerinde kontrol ve uygulama gruplarında 48 saat sonunda <i>ERK</i> ifadelenme düzeyleri	43
Şekil 4.15:	K562 hücrelerinde kontrol ve uygulama gruplarında 72 saat sonunda <i>ERK</i> ifadelenme düzeyleri	43
Şekil 5.1:	Çalışmamız sonucunda imatinib ile silimarin kombinasyonunun ifadelenmelerine etki ettiği belirlenen sinyal moleküllerinin şematik gösterimi	49

TABLolar DİZİNİ

Tablo 2.1: BCR-ABL1'in substratları	14
Tablo 2.1: KML'de tedavi yanıtını belirleme kriterleri	19
Tablo 3.1: LightCycler 2.0 Cihazında <i>BCR-ABL1</i> gen ifadenme analizi için kullanılan program	30
Tablo 3.2: LightCycler 2.0 Cihazında <i>ABL1</i> , <i>GRB2</i> , <i>GAB2</i> , <i>AKT</i> ve <i>ERK</i> gen ifadenme analizi için kullanılan ortak program	31
Tablo 4.1: MTT testi sonuçları (48 saat ve 72 saat inkübasyon)	33

GİRİŞ ve AMAÇ

Kronik myeloid lösemi (KML), kemik iliğinde myeloid seri elemanlarının artışıyla karakterize olan klonal bir hematopoetik kök hücre malignitesidir. KML tüm erişkin lösemilerinin %20'sini oluşturur ve kromozomal bir anomali ile ilişkisi gösterilen ilk neoplazidir. KML'nin moleküler patogenezinde 9. ve 22. kromozomlar arasındaki translokasyon sonucu oluşan Philadelphia (Ph) kromozomu üzerindeki *BCR-ABL1* füzyon geni rol oynar. Bu translokasyon sonucunda oluşan füzyon gen AKT, ERK ve STAT yolaklarını aktive eden bir tirozin kinaz kodlar. Hücre içi yolakların aktivasyonunda BCR-ABL füzyon proteini modülatörleri GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2) ve GAB2 (Grb-2-associated binder 2) rol oynar. GRB2 adaptör protein, reseptör tirozin kinazlar ve diğer fosforile tirozin proteinler ile GAB2 arasında köprü görevi yapar. GRB2, SH2 motifi ile BCR-ABL1 füzyon proteinine ve C-terminal SH3 motifi ile GAB2'deki özgül bölgelere bağlanır. GAB2 taşıdığı birçok bağlantı motifi ile Ras/ERK, PI3K/AKT ve JAK/STAT sinyal yolları ile etkileşir.

KML tedavi protokolünde hastalara bir tirozin kinaz inhibitörü olan STI571 (imatinib mesilat) verilmektedir. STI571 tirozin kinaz enziminin ATP-bağlayıcı bölgesine kompetitif inhibisyonla bağlanır. Bağlanma sonucunda *BCR-ABL1* sinyal iletim yolağında görevli proteinlerin tirozinden fosforillenmesi engellenir. Bu durum hematopoietik hücrelerde büyümenin durmasına ve apoptoza neden olur. Ancak bazı hastalarda imatinibe direnç gelişir. Yapılan çalışmalar *GRB2* ve *GAB2*'nin imatinib direnci ile ilişkili olduğunu göstermiştir.

İçerisinde KML'nin de bulunduğu bir çok malign hastalıkta, hastalar kemoterapinin etkinliğini artırmak için günlük olarak bitkisel kaynaklı ek gıdaları ve vitaminleri diyetlerine dahil etmektedir. Yüzlerce yıldır hepatit ve siroz tedavisi için kullanılan ve deve dikenini bitkisinin özütünden elde edilen silimarin (*Silybum marianum*) polifenolik bir flavonoiddir. Kolon ve prostat kanseri gibi solid kanserlerde silimarinin AKT, STAT, ERK, BCL-2, BAX ve kaspazlar üzerinden apoptozu uyarıcı ve proliferasyonu azaltıcı etkisi olduğu gösterilmiştir. Klinik ve deneysel amaçlı olarak karaciğer hastalıklarının tedavisinde kullanılan silimarinin kemoterapi ve radyoterapiye bağlı hepatotoksisiteyi azalttığı daha önceki

çalışmalarla gösterilmiştir. Silimarinin hepatoprotektif etkileri dışında tip2 diyabeti önleyici, antiinflamatuvar, antimetastatik, antioksidan, lipid peroksidasyonunu engelleyici, antifibrotik, membran stabilize edici özellikleri de vardır.

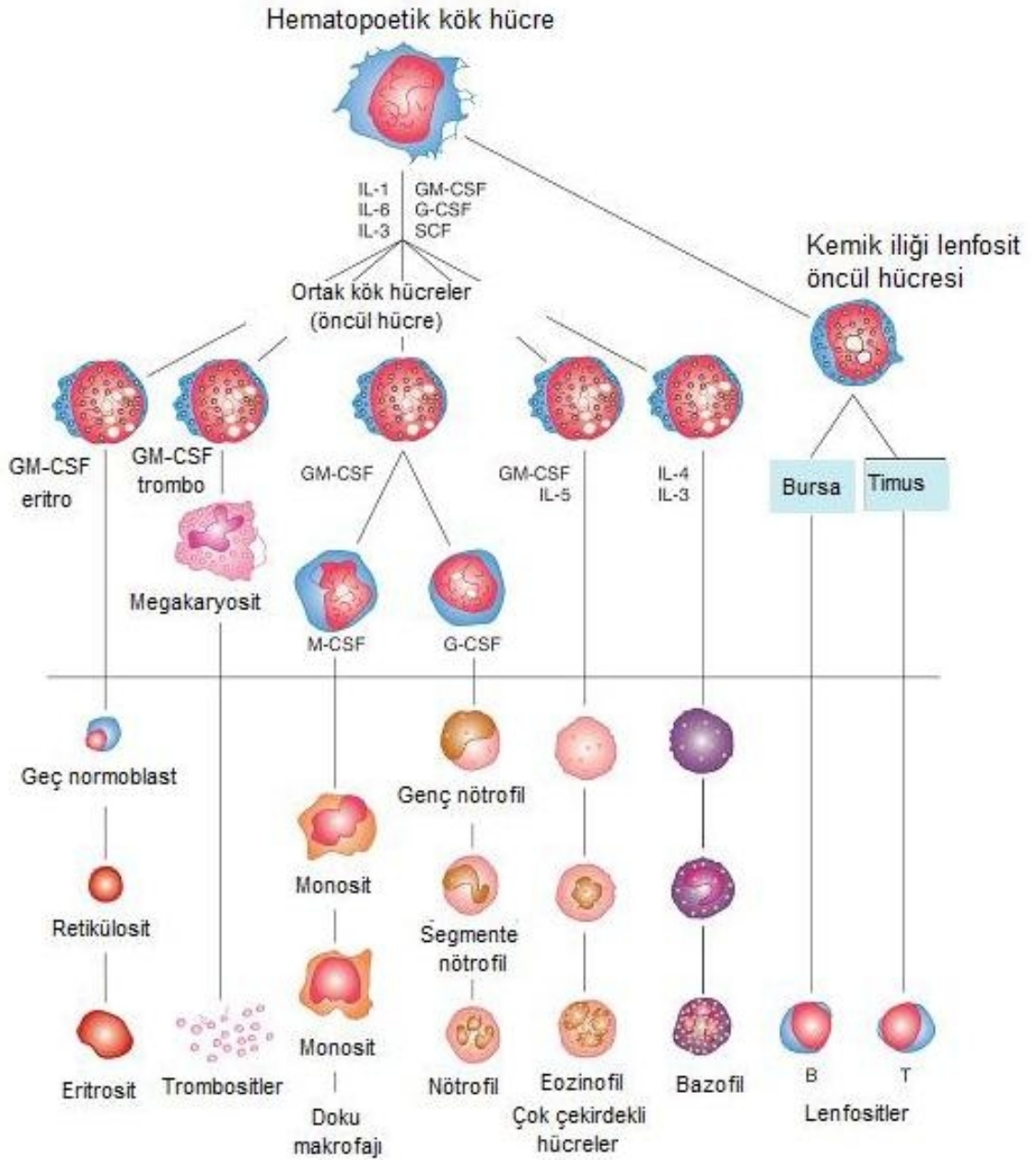
Çalışmamızda insan KML hücre dizisi K562 hücrelerinde STI571 uygulaması ile birlikte silimarin uygulamasının KML patogenezinde rol oynayan hücre içi sinyal yolları üzerine etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

GENEL BİLGİLER

2.1 Hematopoetik Hücrelerin Gelişimi

Hematopoetik kök hücre erişkin dolaşımındaki tüm kan hücrelerinin kaynağıdır ve kemik iliğinde üretilir. Hematopoetik kök hücrelerin en önemli özelliği pluripotent olmalarıdır. Pluripotent özellikteki hücreler kendilerini yenileyebilir ve birçok farklı hücre tipine dönüşebilme kapasitesine sahiptir. Farklılaşarak farklı serilerdeki kan hücrelerini oluştururlar. Ancak hücrelerin kendilerini yenileme özellikleri hücreler morfolojik açıdan farklılaşıp olgunlaştıkça azalır.

Farklılaşma sırasında hematopoetik hücrelerden öncelikle lenfoid ve myeloid seriler oluşur. Bu aşamadan sonra hücreler kültür ortamına alındıklarında oluşturacakları spesifik hücre tiplerine göre “koloni oluşturan ünite” (CFU-*colony forming unit*) adını alırlar. Granülositler ve monositler CFU-GM'den farklılaşarak oluşurken, eritrositler CFU-E'den köken alırlar (1). Bazofil, eozinofil ve nötrofil myelositik seride myeloblasttan köken alırlar. Ayrıca eritrositler ve trombositler de myeloblastik seriden gelişir (2). Hematopoetik kök hücrelerden dolaşıma katılan kan hücrelerinin gelişiminin düzenlenmesi kök hücre faktörü (stem cell factor), granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), interlökin-3 (IL-3), eritropoetin ve trombopoetin gibi büyüme faktörleri ile sağlanır (2).



Şekil 2.1: Hematopoez

CSF, koloni uyarıcı faktör; GM-CSF, granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör; G-CSF, granülosit koloni uyarıcı faktör; SCF, kök hücre faktör; M-CSF, makrofaj koloni uyarıcı faktör; IL, interlökin (2).

2.2 Kronik Myeloid Lösemi

2.2.1 Tanım ve tarihçe

Kronik myeloid lösemi (KML) bir kromozomal anomallikle (Philedelphia [Ph] kromozomu) ilişkisi gösterilen ilk hastalıktır. Klonal bir hematopoetik kök hücre malignitesidir. KML'nin tanımlanması hematopoetik malignitelerin moleküler

mekanizmalarının anlaşılması ve hedefe özgü tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır. Hastalık seçici granülosit hiperplazisine neden olur. Bu hiperplazi trombositoz ile birlikte görülebilir (2).

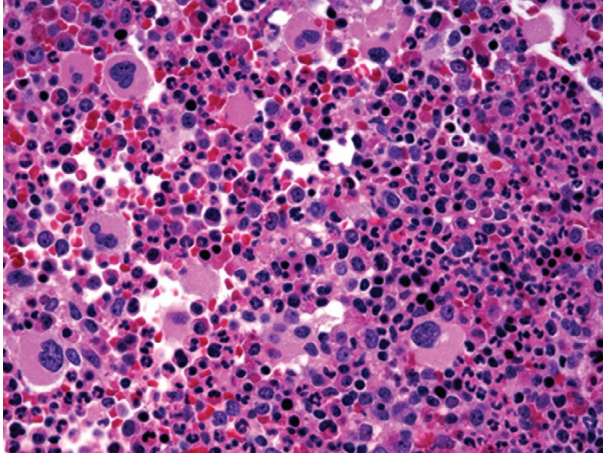
KML ilk kez 1845 yılında tanımlanmıştır. Ph kromozomu ise ilk kez 1960 yılında Nowell ve Hungerford tarafından gösterilmiştir. 1973 yılında Ph kromozomunun t(9;22)(q34;q11.2) resiprokal translokasyonu sonucu oluştuğu anlaşılmıştır. 1984 yılında 22. kromozom üzerindeki kırık noktasındaki *Breakpoint Cluster Region (BCR)* varlığı ve 1985 yılında ise translokasyon sonucu oluşan kimerik proteinin tirozin kinaz özelliği tanımlanmıştır. Zaman içerisinde yapılan çalışmalar ile Ph kromozomu oluşumunun KML hastalığının patogenezindeki rolü anlaşılmıştır. Hastalığın moleküler mekanizmasının tanımlanmasından sonra hedefe yönelik ilk tedavi olarak imatinib mesilat (IM) molekülü geliştirilmiştir. İmatinib mesilat, Abl tirozin kinazın katalitik aktivitesini sağlayan ATP bağlanma motifi olan amino (N-) ucuna ve karboksi (C-) aktivasyon loop bölgesine bağlanır. Böylece proteinin inaktif formda kalmasını sağlar (2).

Kromozom 22'de farklı bölgelerde kırık görülmesi nedeniyle *BCR-ABL1* füzyon geninden artmış tirozin kinaz aktivitesine sebep olan 3 farklı protein ürünü (p190, p210, p230) oluşabilir. Bu proteinlerin varlığı Ph pozitif-hematopoetik öncül hücrelerin farklılaşmayı baskılayan sitokinlere karşı duyarlılıklarını kaybetmelerine, mitojenik aktivite kazanmalarına, apoptoza direnç göstermelerine, kemik iliği stromasına ve fibronektine tutunmalarının azalmasına dolayısıyla da myeloid hücrelerin artmış dolaşımına yol açar (2).

2.2.2 Klinik

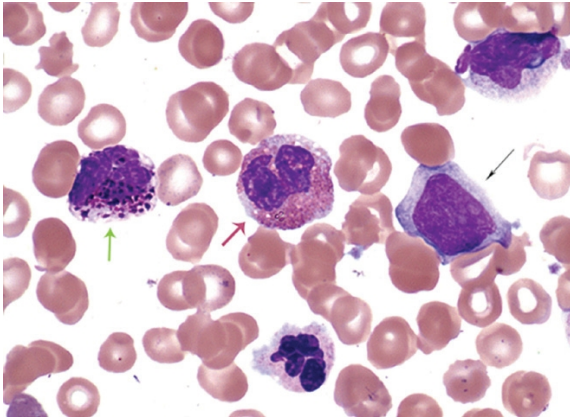
KML hastalığının kronik, akselere ve akut (blast transformasyonu) fazı olmak üzere üç basamağı vardır. Hastaların %80'i kronik fazda tanı alırken, %10 kadarı akselere fazda ve ortalama %10'u blast fazında tanı alır. Genellikle hastalık kronik fazda hiçbir belirti vermeden, direkt olarak blast fazda ortaya çıkar. Tanı FISH ile t(9;22)(q34;q11.2) (Ph) kromozomunun ve/veya RT-PCR ile *BCR-ABL1* füzyonunun varlığının tespiti sonucu kesinleşir (2).

Kronik fazda hastalarda lökosit sayısı artmıştır (yaklaşık 10^6 hücre/ μ l) ve kemik iliğinde blast oranı %10'dan azdır (Şekil 2.2). Ayrıca KML hastalarında kronik fazda artmış trombosit sayısı nedeniyle tromboz riski artmıştır (2).



Şekil 2.2: KML kronik fazda kemik iliği morfolojisi (2).

Akselere veya blast faza transformasyon genellikle belirgin splenomegali, şiddetli anemi ve/veya belirgin trombositopeni ile ilişkilidir. Blast sayısı kronik fazda %10 iken akselere fazda %30'a yükselir. Hastalarda fibrozis nedeniyle kemik iliği yetmezliği ortaya çıkabilir. Bazofillerde %20 ve üzeri artış görülür (Şekil 2.3). Akselere fazda Ph kromozomuna ek sitogenetik anomaliler ortaya çıkabilir (2).

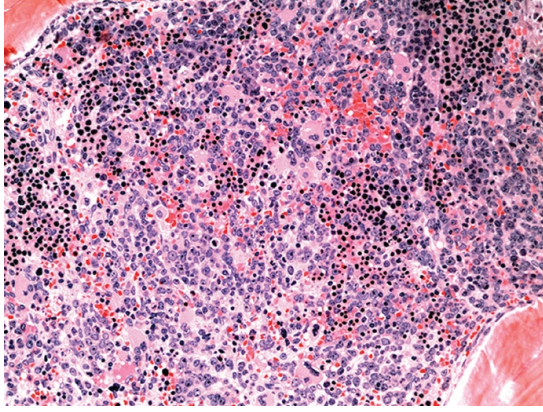


Şekil 2.3: KML akselere fazda kemik iliği morfolojisi (2).

Siyah Ok: Blast
Yeşil Ok: Bazofil
Kırmızı Ok: Eozinofil

KML hastalığının blastik fazında ise ortalama sağkalım süresi 2-4 aydır. Bu fazda *BCR-ABL1* ile TP53 (17p13) ve RB1 (13q14) genlerinin doğrudan ve dolaylı olarak düzenlenmesinde bozulma görülür. Blast oranı %30 üzerine çıkar, myeloid

öncül hücreler lenf bezlerinde, deride ya da kemikte tümörler oluşturabilir (Şekil 2.4) (2).



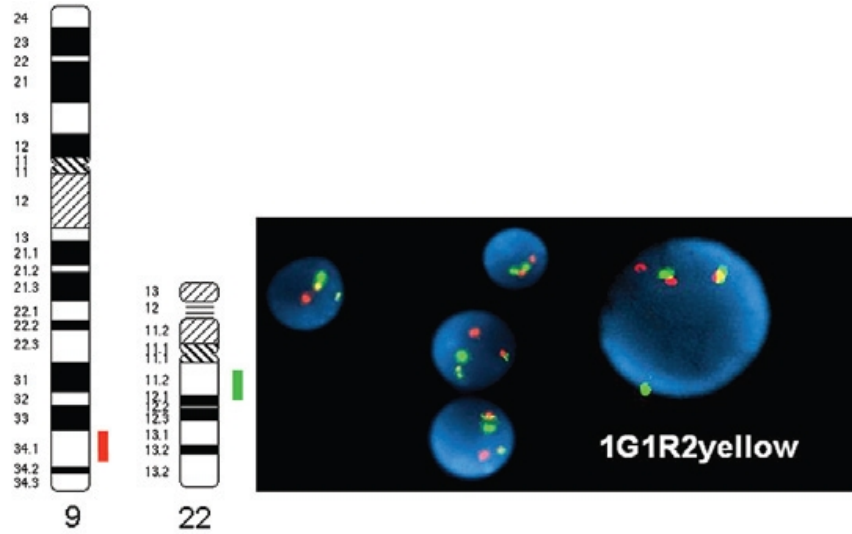
Şekil 2.4: KML blast fazda kemik iliği morfolojisi (2).

2.3 KML'de Sitogenetik Değişiklikler

Kromozom bantlama tekniklerinin geliştirilmesinden sonra 1970'lerde Ph kromozomunun varlığı tespit edilmiştir. Oluşan der(22) üzerinde *BCR-ABL1* onkogeni bulunur. Oluşan der(22) homologundan daha küçük olduğu için sitogenetik analizlerle kolayca gözlenebilir (Şekil 2.5). Sitogenetik analiz yöntemleri ile Ph kromozomu gösterilemeyen olgularda ise FISH ve moleküler tekniklerden yararlanır (Şekil 2.6).



Şekil 2.5: G-bantlama ile elde edilmiş karyotip görüntüsünde Ph kromozomu (2).



Şekil 2.6: *ABL1* ve *BCR* FISH probleminin idiogram üzerinde ve hücreler üzerinde gösterimi (2).

Kırmızı sinyal: 9q34 (*ABL1*)

Yeşil sinyal: 22q11.2 (*BCR*)

Sarı sinyal: Füzyon sinyali t(9;22)(q34;q11.2) (*BCR-ABL1*)

Ayrıca KML hastalarının %20'sinde der(9q)'da büyük delesyonlar gözlenmektedir. Bu delesyonların büyüklükleri değişiklik göstermekle birlikte sadece *BCR-ABL1* füzyonunun kayba değil miR-219-2 ve miR-199b micro-

RNA'larında da kayba sebep olmaktadır. Bu miRNA'ların kaybı hedef genin artmış ifadenmesine ve kötü prognaza yol açar (2).

2.4 KML'de Moleküler Patogenez

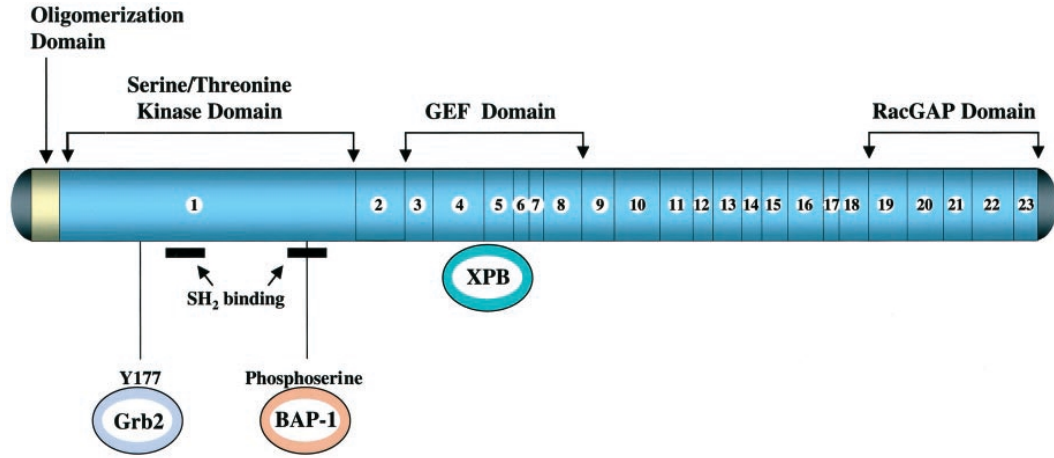
2.4.1 BCR ve ABL proteinlerinin yapısı ve fonksiyonu

22. kromozom üzerinde konumlanmış olan 23 ekzonlu *BCR* geni 130 kb büyüklüğündedir. En çok hematopoetik hücreler ve beyinde olmak üzere yaygın ifadenmesi olan bir gendir. Hematopoetik hücrelerde ifadenmesi incelendiğinde myeloid farklılaşmanın erken evrelerinde daha fazla olduğu ama hücre farklılaştıkça ifadenmesinin azaldığı tespit edilmiştir. *BCR* geni 160 kDa ağırlığında bir serin/treonin kinaz olan BCR proteinini kodlar. Ayrıca 130 kDa ağırlığında ikinci bir proteinin üretiminden de sorumludur (3).

BCR proteini, *BCR* geninin ilk ekzonu tarafından kodlanan bir oligamerizasyon bölgesine, serin/treonin kinaz bölgesine ve birden fazla Src Homology 2 (SH2) bağlayıcı bölgelerine sahiptir. N-ucunda yer alan oligomerizasyon bölgesi ABL1 kinaz aktivasyonuna neden olan bölgedir. Ayrıca hem BCR proteinin hem de füzyon ürünü olan BCR-ABL1'in hücre içi lokalizasyonunu belirler. BCR proteini SH2 bölgeleri ile aktive ettiği ABL1 proteini, reseptörler ve hücre içi sinyal proteinleri ile etkileşir. Bu nedenle bu bölgeler korunmuş bölgelerdir. BCR proteinin serin-treonin kinaz bölgesi serin ve treonin kalıntıları ile otofosforile olur. BCR proteinin Ras yolağı ile etkileşimi ise 177. pozisyondaki tirozinin (Y177/Tyr177) otofosforillenmesi sonucu GRB2'ye bağlanması ile gerçekleşir (3).

BCR proteinin merkez bölgesinde DNA tamir mekanizmasında görevli olan Xeroderma pigmentosum-B'yi (XPB) fosforile eden ve fonksiyonunu engelleyen GEF (Guanin Exchange factor) bulunur. *BCR-ABL1* onkogeninin genomik instabiliteye sebep olmasına bu bölge neden olur.

Proteinin karboksi ucunda ise hücre içi sinyal yollarında ve hücre iskeleti organizasyonunda görevli G-proteinleri ile etkileşen GTPase activating protein (GAP) domaini bulunur (Şekil 2.7) (3).

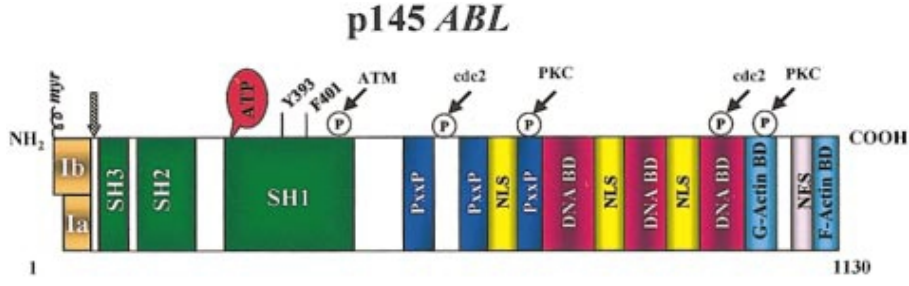


Şekil 2.7: BCR proteininin yapısı (3).

ABL1 Abelson murin lösemi virüs onkogeninin insandaki homologu olan bir proto-onkogendir. 9q34'de konumlanmıştır ve hücre proliferasyonunda görevli sinyal oluşumunda görevli birçok proteini fosforile eden 145 kDa ağırlığında bir reseptör olmayan tirozin kinaz kodlar. *ABL1* geni sürekli ifadelenecek hücre farklılaşması, bölünmesi, adezyonu ve hücrede stres cevabında görev yapar (4).

ABL1 geni ilk ekzonunun alternatif kırılma sonucu oluşan 1a ve 1b olmak üzere iki izoformu vardır. 1b izoformunun plazma membranına bağlanmayı sağlayan kristillenme bölgesi vardır. Sonra sırasıyla N-ucunda 3 tane Src homoloji bölgesi (SH), diğer prolinden zengin proteinlere bağlanmasını sağlayan SH3 bölgesi, fosfotirozinlerle etkileşen SH2 bölgesi ve tirozin kinaz görevi yapan SH1 bölgesi bulunur (4).

Y393 SH1 kinaz domainindeki temel otofosforilasyon bölgesidir. Ayrıca SH1 bölgesi fenilalanin 401 (F401) SH3 domaini içeren tüm tirozin kinaz aktivitesi gösteren proteinlerde yüksek derece korunmuştur. *ABL1* geni C-uçta ise nükleer lokalizasyon bölgesi, 3 tane DNA bağlanma bölgesi ve aktin (G-aktin ve F-aktin) bağlanma bölgesi bulunur. *ABL1* protein aktivitesinin düzenlenmesi SH2 ve SH3 bölgeleri üzerinden gerçekleşir, bu nedenle bu bölgelerdeki delesyon ve mutasyonlar sonucu *ABL1* aşırı aktive olur (Şekil 2.8) (4).

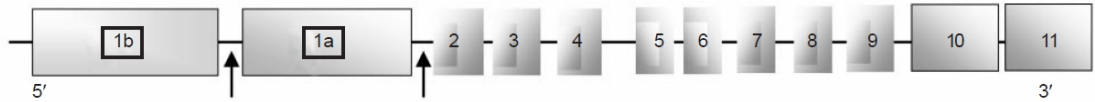


Şekil 2.8: ABL1 proteininin yapısı (4).

Siyah ok: Atm, cdc2 ve PKC fosforilasyon bölgeleri

Gri ok: *BCR-ABL1* füzyonu oluşurken *ABL1* geninde kırığın meydana gelebileceği bölge

BCR-ABL1 füzyon transkripti oluşurken *ABL1* geninde kırık N-ucunda genellikle alternatif 1. ekzonlar arasındaki intronda, 300 kb'lık bir bölge içinde meydana gelir (Şekil 2.9). Bu nedenle *BCR-ABL1* mRNA transkriptinde ilk ekzon bulunmaz. Transkript her zaman a2 ekzonu ile başlar (5).



Şekil 2.9: *ABL1* genindeki alternatif 2 kırık noktası (5).

BCR-ABL1 füzyon proteinin oluşumu sırasında *BCR* geninde kırık 3 alternatif noktada meydana gelebilir (Şekil 2.10) (5).



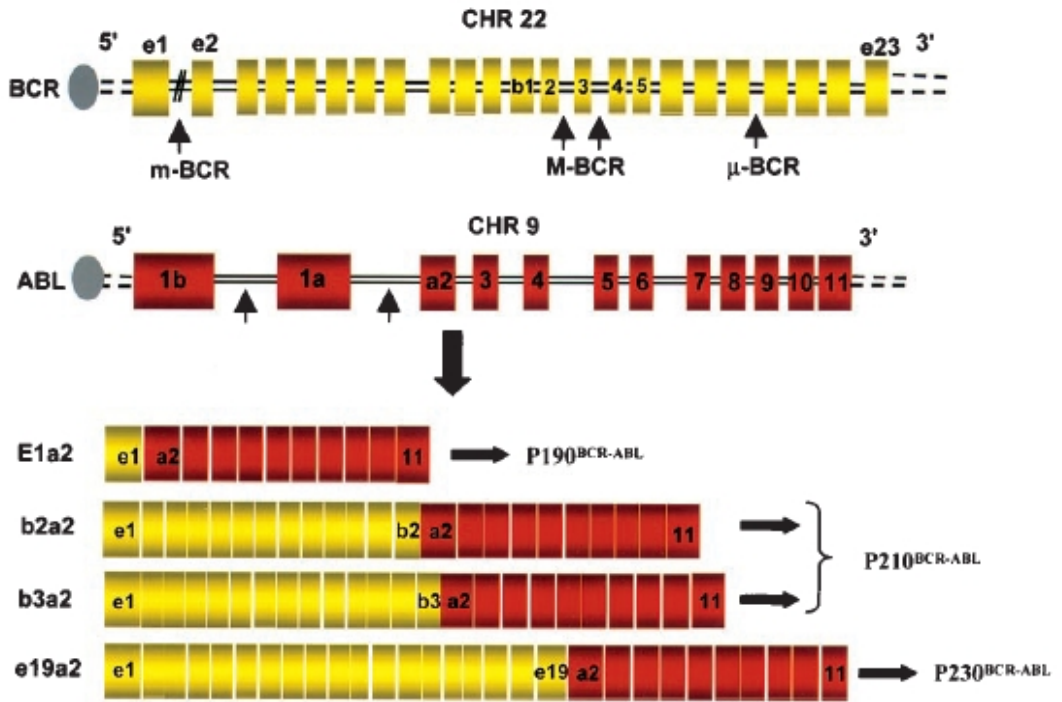
Şekil 2.10: *BCR* genindeki alternatif 3 kırık noktası (5).

Kırık Major BCR (M-BCR) bölgesinde oluştuysa ya 13. ekzondan (e13-b2) ya da 14. Ekzondan (e14-b3) sonraki introndadır. Hibrid transkript 210 kDa ağırlığında olup, e13a2 (b2a2) veya e14a2 (b3a2) içerir. Bu füzyon protein p210-*BCR-ABL1* olarak adlandırılır. KML hastalarının %95'in de ve Ph+ ALL hastalarının %35'inde bu füzyon ürünü bulunur (Şekil 2.11, Şekil 2.12) (3,6).

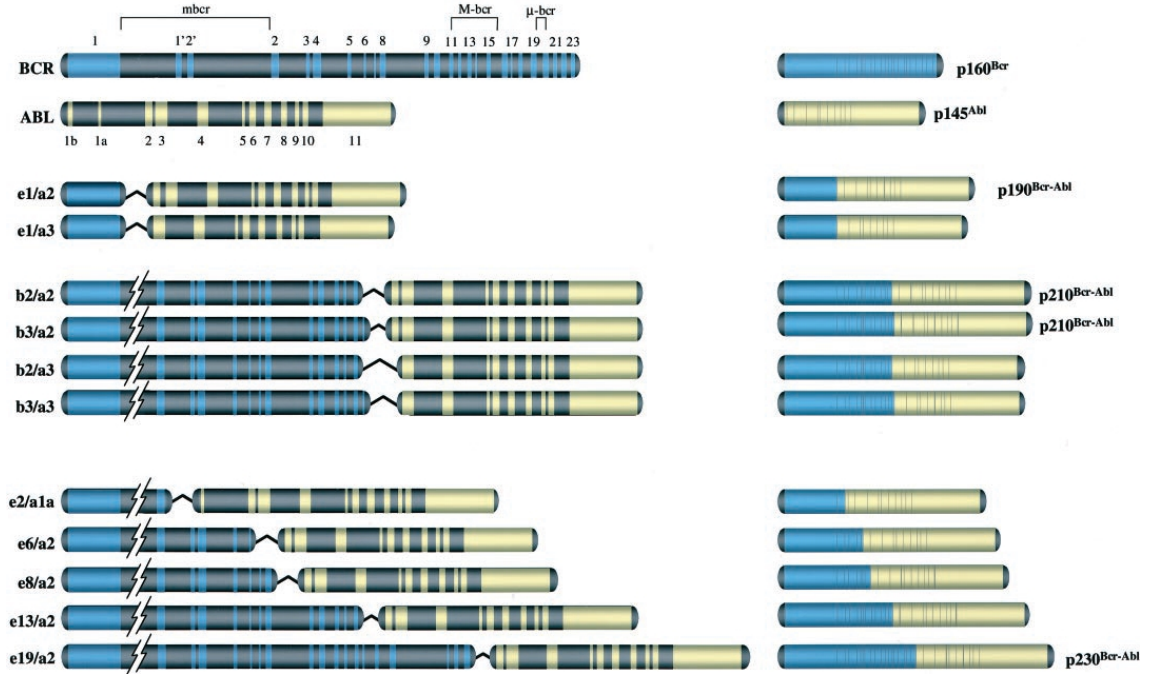
BCR geninde kırık minor BCR (m-BCR) bölgesinde 1.ekzondan sonra (e1a2) oluştuysa KML hastalarının %65'inde, küçük bir grup KML ve AML hastasında

görülen 190 kDa ağırlığında p190-BCR-ABL1 füzyon proteini oluşur (Şekil 2.11, Şekil 2.12) (3, 6).

Üçüncü kırık ise KML hastalarının çok az bir kısmında ve KMPH grubunda kronik nötrofilik lösemi hastalarında görülen, 19.ekzondan (c3) sonra meydana gelen ve hibrid transkriptin e19a2 birleşiminden oluştuğu 230kDa ağırlığındaki P230-BCR-ABL1 proteinini kodlayan mikro BCR (μ -BCR)'dır (Şekil 2.11, Şekil 2.12) (3, 6).



Şekil 2.11: BCR ve ABL1 genlerindeki alternatif kırık noktaları ve oluşan alternatif transkriptler (6).



Şekil 2.12: *BCR*, *ABL1* ve *BCR-ABL1* genleri ve kodladıkları proteinler (3).

2.4.2 *BCR-ABL1* aracılı lösemik transformasyonun moleküler mekanizması

BCR-ABL1 aracılı lösemik transformasyon öncelikle *BCR-ABL1*'in otofosforilasyonu, sonrasında da fosforile füzyon ürünün hücrelerde proliferasyon, apoptoz, adhezyon ve hücre sağkalımında rol oynayan sinyal molekülleri ile etkileşmesi sonucu meydana gelir (7-16). *BCR-ABL1* füzyon proteini oluştuğunda *BCR* proteinine ait oligomerizasyon bölgesi füzyon proteinini dimerizasyona ya da tetramerizasyona uğratar. *BCR*, Tyr177 üzerinden otofosforile olur. *ABL1* tirozinleri transfosforilasyonu aktive eder. *ABL1* kinaz aktivitesi ortaya çıkar. *BCR-ABL1* proteini fosforile olmuş tirozinler üzerinden hücre içi sinyal yollarını etkileyen diğer proteinlerin SH2 bölgeleri ile etkileşir (Tablo 2.1) (4).

Tablo 2.1: BCR-ABL1'in substratları (4).

Protein	Fonksiyon
62 ^{DOK}	Adaptör
Crkl	Adaptör
Crk	Adaptör
Shc	Adaptör
Talin	Hücre iskeleti/membranı
Paksilin	Hücre iskeleti/membranı
Fak	Hücre iskeleti/membranı
Fes	Hücre iskeleti/membranı
Ras-GAP	Ras-GTPaz
GAP-ilişkili protein	Ras aktivasyonu?
PLC γ	Fosfolipaz
PI3 kinaz (p85 alt ünitesi)	Serin kinaz
Syp	Sitoplazmik fosfataz
Bap-1	14-3-3 protein
Cbl	Bilinmiyor
Vav	Hematopoetik farklılaşma

BCR-ABL1 füzyon proteini RAS/MAPK, PI-3 kinaz, CRKL, JAK-STAT ve Src yolağı gibi birçok hücre içi sinyal yolağını aktive eder. BCR-ABL1 aktivasyonu öncül hematopoetik hücrelerinin büyüme faktörlerinden bağımsız olarak çoğalmasına yol açar.

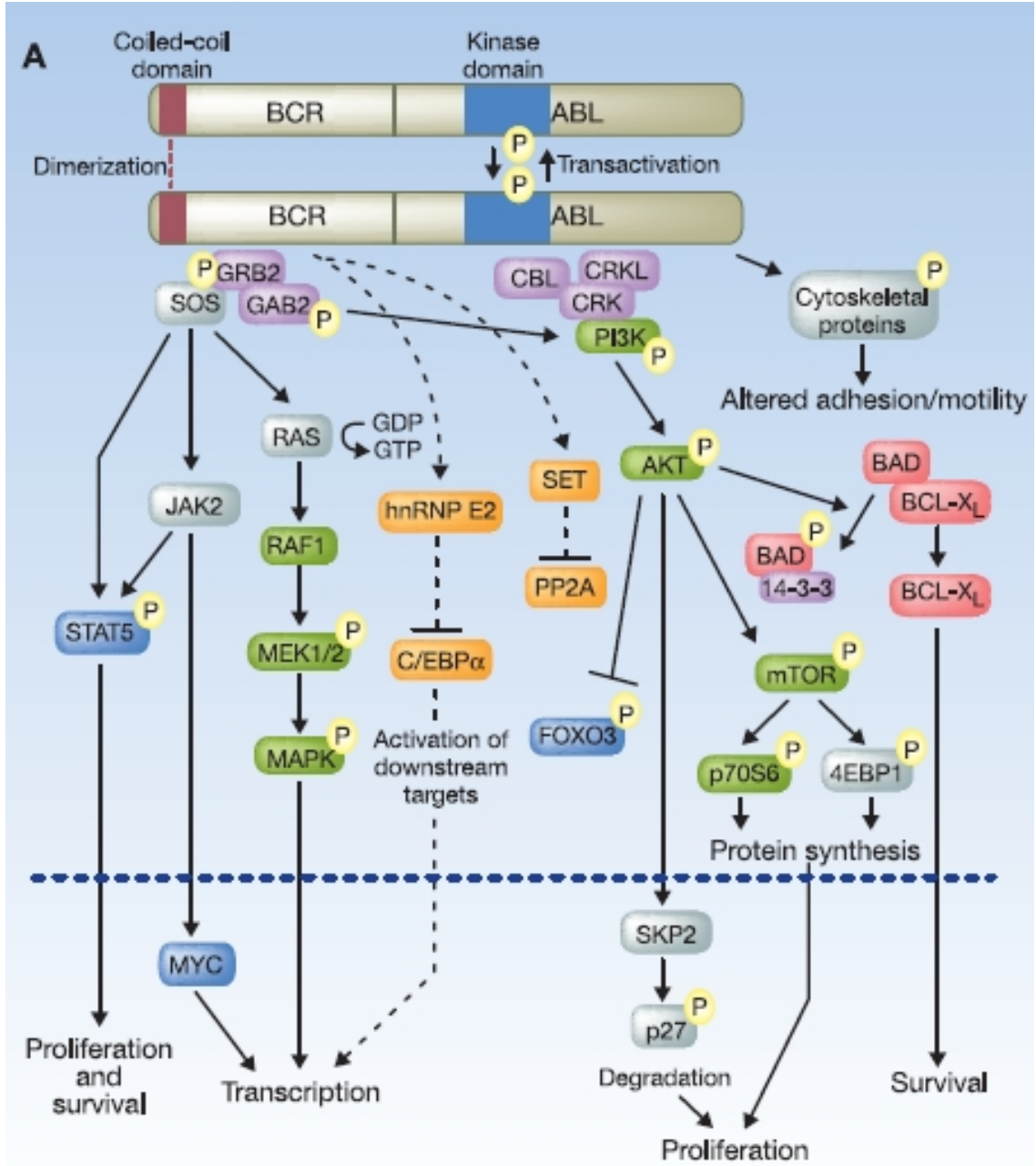
KML'de Ras yolağı hematopoetik hücrelerin proliferasyonuna sebep olan ve apoptozu inhibe eden büyüme faktörleri ve sitokinler tarafından uyarılır. BCR-ABL1 tarafından Ras yolağının aktivasyonunda GAB2, GRB2, Ras aktivatörü Son of sevenless (Sos) ve SH2-SH3 adaptörü CRKL gibi birçok aracı molekül görev yapar. Aktive olan RAS, hücre zarında lokalize bir serin/treonin kinaz olan Ref molekülünün aktivasyonu sağlar. Sonuç olarak MAP/ERK kinazlar ve MAPK (Mitogen Activated Protein Kinaz) aktivasyonu transkripsiyonu artırır.

BCR-ABL1 aracılı transformasyon ve proliferasyonda hücrelerde ikincil haberci sistemini uyarabilen, büyüme ve sağkalımda görev yapan Akt, motilitede

görevli RAC, protein sentezini artırma görevi olan S6 kinaz ve RAS yolağı ile etkileşebilen PI3K yolağının da rol oynadığı bildirilmiştir.

Normalde hematopoetik büyüme faktörlerinin hücre yüzey reseptörlerine bağlanması ile aktive olan JAK (Janus Kinaz) dimerizasyon sonucu aktivasyon olur. Aktive olan JAK, STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) yolağını aktive eder. STAT ifadenmesinin artışı sonucu hücre büyümesi ve sağkalımına etki eder, transformasyonda rol oynar. Ayrıca BCR-ABL1 Src kinazlar üzerinden ya da direkt olarak STAT yolağı ile etkileşebilir. Src ailesi kinazlar non reseptör tirozin kinazlardır. KML'de blast krizine prograsyonda bilinen Hck, Lyn ve Fgr Src kinazlarının rol oynadığı bildirilmiştir.

Yukarıda belirtilmiş sinyal yolaklarının haricinde *BCR-ABL1* aracılı lösemik transformasyonda Myc proto-onkogeni, reaktif oksijen türleri, adezyonu etkileyen Crkl, Paxillin ve fokal adezyon kinaz (FAK) molekülleri rol oynar. Ayrıca DNA onarım genlerinden XPB ile etkileşimi sonucunda BCR-ABL1 genomik instabiliteyi artırır. KML'de BCR-ABL1 aracılığıyla aktive olan yolakların tanımlanması tedavi amaçlı olarak yeni moleküler hedeflerin belirlenmesi açısından önemlidir (Şekil 2.13) (17).



Şekil 2.13: BCR-ABL1 sinyal yolları (17).

Şekilde bu yollarda yer alan transkripsiyon faktörleri mavi, serin/treonin kinazlar yeşil ve apoptozla ilişkili proteinler kırmızı olarak gösterilmiştir. Ayrıca KML kök hücre oluşumu ve transformasyonla ilgili yollar ise turuncu ile gösterilmiştir.

2.5 KML Hastalığında Tanı

KML'de periferik kan ya da kemik iliğinde Ph kromozomunun ve/veya *BCR-ABL1* füzyonunun gösterilmesi ile hastalığın kesin tanısı konur. Sitogenetik analizlerle Ph kromozomunun varlığı, moleküler analizler (RT-PCR) ile *ABL* ve *BCR* genlerindeki kırık noktalarının tespiti yapılabilmektedir. KML tanısında FISH analizi

ilk basamakta maliyet açısından etkin değildir. *BCR-ABL1* varlığı belirlenmiş olan bir hastada ekstra sonuç alınmasını sağlamaz. Ancak sitogenetik analizler ve RT-PCR analizi sonucunda *BCR-ABL1* negatif olarak belirlenmiş ama klinikte KML ön tanısı olan hastalarda tanı anında en duyarlı test olması açısından FISH analizi yapılması gereklidir (2).

2.6 KML Hastalığında Tedavi

KML tedavisinde hedeflenmiş tedavi uygulamalarının keşfedilmesinden önce busülfan, hidroksiüre, radyoterapi, alfa-interferon (α -INF) ve allojenik kök hücre nakli kullanılmaktaydı (18).

Hidroksiüre kronik fazda KML tanısı almış hastalarda lökosit sayısını azaltmayı sağlayan ilk tedavi basamağıdır. Yan etkisi yoktur, ancak hastalarda sadece hematolojik yanıt oluşmaktadır. Hidroksiüre ile sitogenetik yanıt elde edilememektedir (19). Busülfan ise hidroksiüreye benzer şekilde lökosit sayısının düşürülmesini, hematolojik yanıt oluşmasını sağlamaktadır. Ancak yan etkileri daha fazladır (20).

KML’de hedefe özgü tedavilerin kullanılmaya başlanmasından önce allojenik kök hücre nakli yaptırma şansı olmayan hastalarda erken kronik fazda etkili olan antiproliferatif özellik gösteren α -INF tedavisi kullanılmaktaydı. Bu tedavi hastaların %50’sinde hematolojik yanıt yanı sıra sitogenetik yanıt gelişmesini de sağlamaktadır. Fakat erken yan etkileri oldukça fazla olduğu için ancak düşük dozlarda kullanılabilir (20). Sağkalım açısından interferonun tedavide hidroksiüre ve busülfan’dan daha etkili olduğu tespit edilmiştir (19).

KML hastalığında hedeflenmiş tedavilerin geliştirilmiş olmasına rağmen halen tek küratif tedavi allojenik kök hücre naklidir. 50 yaş altı kronik faz KML hastalarında %50 oranında tedavi başarısı sağlamıştır. Ancak akselere fazda %25-35 ve blastik fazda %10’dan daha az tedavi başarısı vardır. Allojenik kök hücre nakli sonrası oluşabilecek en önemli komplikasyon graft-versus-host hastalığıdır. Ayrıca hastaların %15-20’sinde relaps gözlenir. Allojenik kök hücre tedavisinde tedavinin başarısında hasta yaşı, tanıdan itibaren geçen süre, hastalık evresi, verici akrabalık derecesi, verici cinsiyet uyumu, kök hücre kaynağı gibi faktörler etkilidir (21).

BCR-ABL1’i hedefleyen tirozin kinaz inhibitörlerinin geliştirilmesi ile KML tedavisinde büyük gelişmeler olmuştur. KML tedavisine yönelik ilk geliştirilen

tirozin kinaz inhibitörü imatinib mesilattır (STI571). Faz 3 IRIS (International Randomized Study of Interferon versus STI571) çalışması sonucu KML'de ilk basamak tedavi olarak kabul edilmiştir. İmatinibden sonra *BCR-ABL1* hedefli tedaviye yönelik iki tirozin kinaz inhibitörü (dasatinib (BMS-354825) ve nilotinib (AMN107) daha geliştirilmiştir (22).

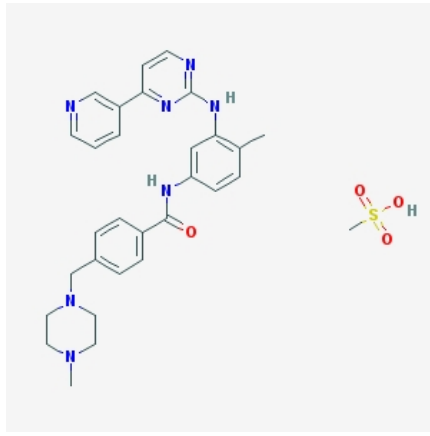
İmatinibin moleküler hedefinde *BCR-ABL1*, *ABL1*, trombosit kaynaklı büyüme faktörü reseptörü (PDGFR α ve β), C-kit reseptörü (KIT) ve koloni stimule eden faktör-1 reseptörü vardır. *BCR-ABL1*, *ABL1*, *KIT*, *PDGFR*'ı hedeflemelerinin yanı sıra dasatinib efrin tip-a reseptörüne 2, Src kinaz ailesine ve Nilotinib ARG'e etki eder. Dasatinib, imatinib direnci ve intoleransı bulunan hasta gruplarında kullanılabilir. Klinik uygulamada dasatinibin T315I, V299 ve F317 mutasyonları taşıyan formları dışında *BCR-ABL1*'in tüm aktif ve inaktif formlarına bağlanabildiğini göstermiştir. Nilotinib, imatinibin kimyasal açıdan değiştirilmesi ile üretilmiş bir tirozin kinaz inhibiötördür. *BCR-ABL1*'in ATP bağlanma bölgesine afinitesi imatinibe göre daha fazladır. İmatinib direnci ve dasatinib başarısızlığı olan olgularda kullanılır. Ancak Y253, E255, T315 ve F359 Abl kinaz domain mutasyonu taşıyan bireylerde dasatinib etkili olmamaktadır (23-25). Dirençli vakalarda tedavi protokolleri oluşturulmasına yönelik olarak inaktif/aktif/inaktif *BCR-ABL1* inhibitörü bosutinib (SKI-606), potent ve dual Abl/Lyn kinaz inhibitörü INNO-406 (NS-187), ON012380, MK-0457, SGX393 ve XL228 molekülleri geliştirilmiştir. Ayrıca KML tedavisinde tirozin kinaz inhibitörü dışında da DNA metilasyon inhibitörü desitabin, farnesil transferaz inhibitörleri tipifarnib ve lorafarnib, protein sentez inhibitörü homoharingtonin kullanımı üzerine araştırmalar devam etmektedir (25).

KML takibi hedeflenmiş tedavi sonrasında takip hastalarda tam sitogenetik yanıt (CCyR) gelişimi olup olmadığının sitogenetik analizi ve moleküler yöntemlerle *BCR-ABL1* füzyon gen transkriptinin ölçülmesi ile yapılmaktadır (Tablo 2.1) (21). Hastalığın relaps açısından uzun süreli takibinin moleküler yöntemlerle yapılması öncesinde tam sitogenetik yanıt gelişiminin kemik iliği örneklerinde de doğrulanması gereklidir. Ayrıca hastalar her 3-4 ayda bir periferik kan örneklerinde QF-PCR ile takip edilmektedir (26).

Tablo 2.1: KML’de tedavi yanıtını belirleme kriterleri (21).

HEMATOLOJİK TAM YANIT (CHR)	SİTOGENETİK YANIT (CyR)	MOLEKÜLER YANIT (MR) BCR-ABL1/kontrol geni oranına göre
Lökosit < 10 000/mm ³ Trombosit < 450 000/mm ³ Bazofil < %5 Blast/promyelosit (-) Ekstramedüller tutulum (-) Splenomegali (-) Akselere/blastik faz bulgusu (-)	Tam sitogenetik yanıt (CCyR) %0 Ph+ Kısmi Sitogenetik yanıt (PCyR) %1-35 Ph+ Minör Sitogenetik Yanıt %36-65 Ph+ Minimal Sitogenetik Yanıt %66-95 Ph+ Yanıtsız >%95 Ph+	Tam Moleküler Yanıt (CMR) BCR-ABL1 = 0 Majör Moleküler Yanıt (MMR) BCR-ABL1 oranında standart bazal değer ≥3 log azalma YA DA BCR-ABL1 oranı <%0.1

KML tedavisinde ilk olarak geliştirilen tirozin kinaz inhibitörü imatinib(STI571 (4-[(4-methyl-1-piperazinyl)methyl]-N-[4-methyl-3-[[4-(3-pyridinyl)-2-pyrimidinyl] amino] phenyl] benzamide methanesulfonate; Glivec, Novartis, Basel, İsviçre))’dir. STI571, Glivec ticari adıyla Novartis tarafından 2001 yılında piyasaya sürülmüştür (Şekil 2.14).



Şekil 2.14: İmatinibin 2 boyutlu yapısı. (NCBI, PubChem)

BCR-ABL1 hücre içi sinyal yollarında görevli proteinler ile etkileşerek proliferasyonu artırır ve apoptozu inhibe eder. BCR-ABL’in ATP bağlanma bölgesi bulunur. İmatinib tirozin kinaz enziminin ATP bağlayıcı bölgesine kompetitif inhibisyonla etki eder. Böylece BCR-ABL1 ATP bağlayamaz ve etkileştiği sinyal proteinlerin tirozin fosforilasyonunu gerçekleştirmez (22).

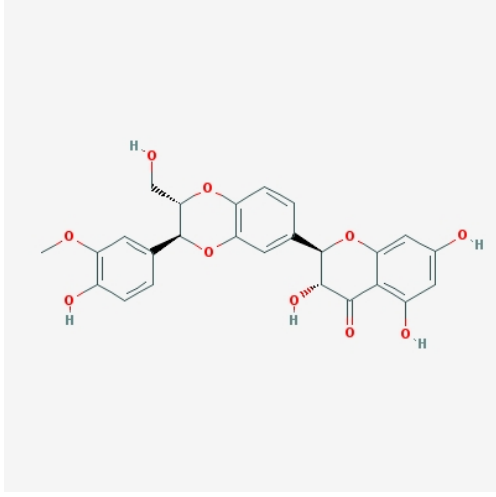
2.7 *BCR-ABL1*'in Modölatörleri ve Etkilediği Yolaklar: *GRB2*, *GAB2*, *AKT* ve *ERK* Genleri

BCR-ABL1 onkoproteini ile sitoplazmik moleküllerin etkileşimi temel hücrel olaylarda değişikliklere neden olur. Örneğin; Ras-MAPK yolağının aktivasyonu proliferasyon artışına, JAK-STAT yolağının aktivasyonu transkripsiyon aktivitesinde artışa ve PI3K-AKT yolağının aktivasyonu ise apoptozda artışa neden olur. BCR-ABL1 amino ucunda adaptör bir protein olan GRB2'nin SH2 domaini ile etkileşen tirozin-fosforilasyon bölgesi bulunur. Ayrıca dimerizasyonda da N-terminal görev yapar. BCR geni Tyr 177 bölgesinin fosforilasyonu BCR-ABL1 aracılı lökomogenez oluşumuna neden olur. Bu bölgenin otofosforilasyonu sonucu GRB2, GAB2 ve SOS (Son of sevenless) ile etkileşir. GRB2 kompleksi RAS, PI3K ve tirozin fosfataz SHP2 yolaklarını aktive eder. RAS sinyal yolağının aktive olması da MAPK yolağını aktive eder, proliferasyon artar. PI3K aktivasyonu ise E3 ubiquitin ligase proteinin upregülasyonu sonucu, FOXO transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini baskılar, sağkalımı artırır. Ayrıca GRB2 p27'nin proteozomal yıkımını sağlar, hücre proliferasyonunu, protein translyasyonunu ve hücre proliferasyonunu artıran mTOR aktivasyonuna neden olan AKT aktivasyonuna neden olur. BCR-ABL1'in Hck ve JAK2'yi direkt/indirekt fosforilasyonu ile STAT aktivasyonuna neden olur. Sonuç olarak myeloid ve lenfoid lökomogenez ortaya çıkar (17, 27).

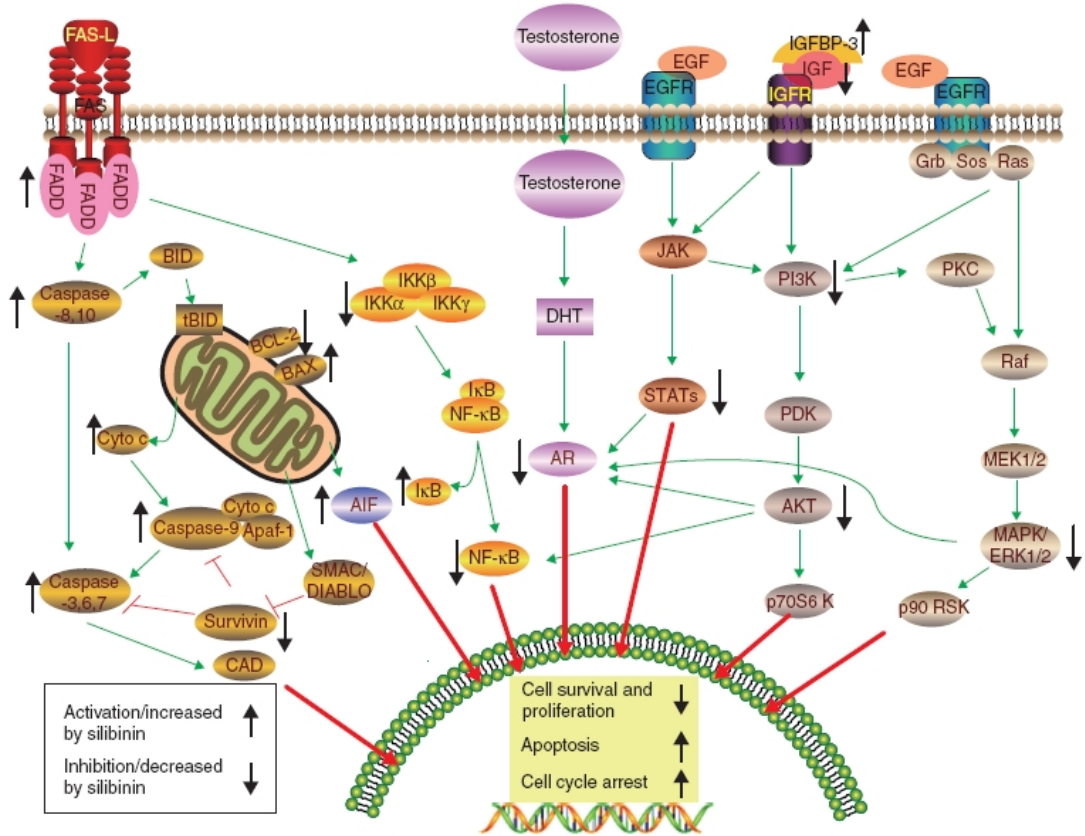
2.8 Silimarin

Flavonoidler bitkiler tarafından sentez edilen antioksidan, anti inflamatuvar, antikanserojen etkilere sahip polifenolik bileşiklerdir. Birçok malign hastalıkta tedaviye destek olarak ve tedavinin etkinliğini artırmak amacıyla bitkisel flavonoidler tüketilmektedir. Bitkisel tedavinin insanlık tarihinde 3000 yıldan fazladır kullanımı vardır (28). İçerisinde KML'nin de bulunduğu bir çok malign hastalıkta, hastalar kemoterapinin etkinliğini artırmak için günlük olarak bitkisel kaynaklı ek gıdaları ve vitaminleri diyetlerine dahil etmektedir. Yüzlerce yıldır hepatit ve siroz tedavisi için kullanılan ve deve diken bitkisinin özütünden elde edilen silimarin (*Silybum marianum*) polifenolik bir flavonoiddir (Şekil 2.15). Silimarinin antiproliferatif etkisi vardır. Silimarinin potansiyel proliferatif sinyal hedefleri reseptör tirozin kinaz sinyalizasyonunda görevli ERK-MAPK, PI3K-AKT-mTOR ve JAK-STAT yolakları, androjen/androjen reseptör sinyal yolağı, NF-κβ

sinyal yolağı, hücre döngüsü düzenleyici (CDK) yolları ve apoptotik sinyal yolları olarak tanımlanmıştır (Şekil 2.16) (29).



Şekil 2.15: Silimarinin 2 boyutlu şekli. (NCBI, PubChem)



Şekil 2.16: Silimarinin hedeflediği hücresel proliferatif yolların şematik gösterimi (29).

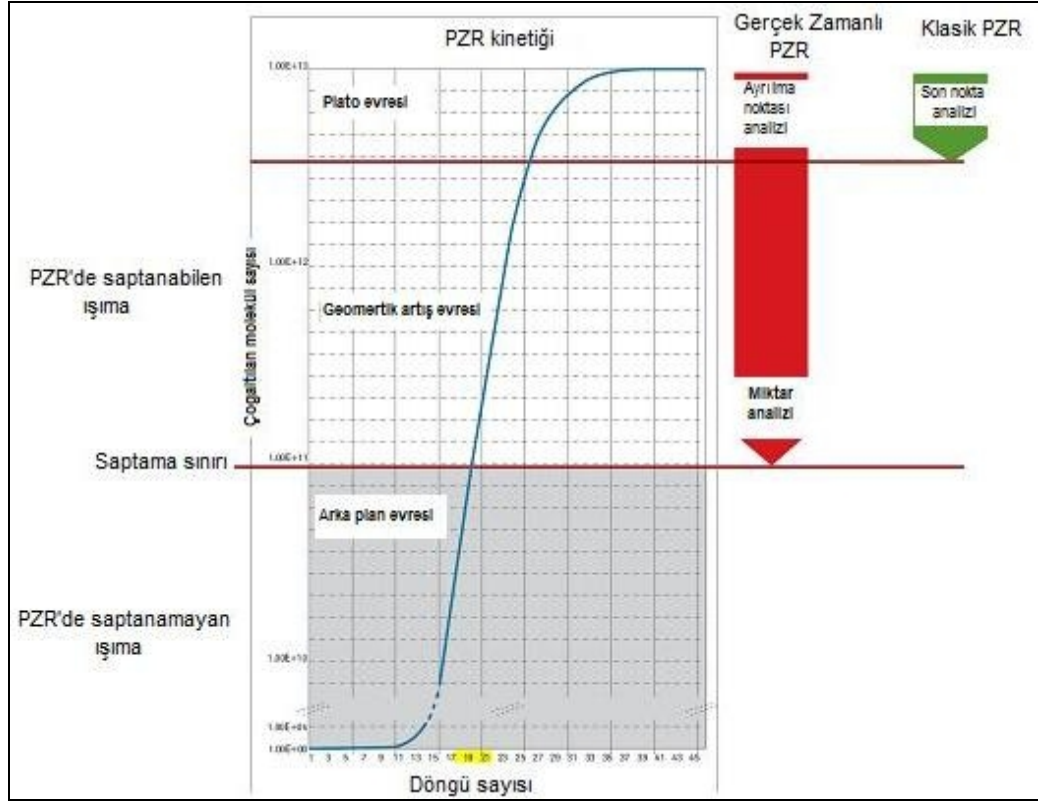
Kolon kanseri, prostat kanseri gibi solid kanserlerde silimarinin AKT, STAT, ERK, BCL-2, BAX ve kaspazlar üzerinden apoptozu uyarıcı ve proliferasyonu azaltıcı etkisi gösterilmiştir. Klinik ve deneysel amaçlı olarak karaciğer

hastalıklarının tedavisinde kullanılan silimarinin kemoterapi ve radyoterapiye bağlı hepatotoksisiteyi azalttığı daha önceki çalışmalarla gösterilmiştir. Silimarinin hepatoprotektif etkileri dışında tip 2 diyabeti önleyici, antiinflamatuvar, antimetastatik, antioksidan, lipid peroksidasyonunu engelleyici, antifibrotik, membran stabilize edici özellikleri de vardır.

2.9 Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemiyle Gen İfadelenmesinin Analizi

PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) sentetik olarak üretilmiş bir çift oligonükleotid primerin çift zincirli kalıp DNA'daki hedefine bağlanması ve bu bağlanan primerlerin arasının deoksिनükleotidler (dNTP) kullanarak ısıya dayanıklı *Thermus aquaticus* (Taq) polimeraz enzimi tarafından geometrik olarak çoğaltılması yöntemidir. Hedef dizi primerlerin özgülüğü ile belirlenir. PCR reaksiyonu çift zincirli DNA'nın denatürasyonu, primerlerin DNA zincirine bağlanması ve primer uzaması basamaklarından meydana gelir.

PCR ürünlerinin gerçek zamanlı niceliksel analizi ise 1990'larda geliştirilen RT-PCR yöntemiyle mümkündür. PCR reaksiyonunun geometrik artışı sırasında reaksiyonlardan floresan sinyal toplayarak ürünlerin niceliksel olarak analizi yapılabilir. Her PCR döngüsünde DNA miktarı arttıkça ışımaya artar. Oluşan bu floresan ışımaya saptanabilir olduğu nokta Cp (Crossing point) olarak isimlendirilir. Cp değeri ile örneklerin başlangıç anındaki DNA yoğunlukları arasında orantı vardır. Bu sayede örneklerin Cp değerleri karşılaştırılarak başlangıç anındaki DNA miktarları birbirleriyle kıyaslanabilir. RT-PCR ışımaya eğrisi belirli bir döngüden sonra plato fazına geçer Şekil (2.17) (30). RT-PCR yöntemi ile gen ifadenmeleri, amplifikasyonlar, delesyonlar ve nokta mutasyonların analizi yapılabilir.



Şekil 2.17: RT-PCR kinetiği (30).

PCR sürecinden önce reverse (ters) transkriptaz enzimi ile mRNA cDNA'ya dönüştürülür. Rekasiyonlarda floresan sinyal kaynağı olarak hidroliz problemleri, hibridizasyon problemleri, TaqMan® problemleri, Molecular Beacon® problemleri ve SYBR® Green I boyası gibi primerlere bağlı ya da primerlerden bağımsız floresan işaretleyiciler kullanılır. Bu floresan işaretleyiciler çift zincirli DNA'ya bağlanır ve çift zincirli DNA'nın artışı ile doğru orantılı olarak floresan sinyal verir. Hedeflenen bölgenin çoğalıp çoğalmadığı reaksiyondan sonra erime eğrisi (melting curve) analizi ya da ürünlerin jel elektroforez analizi ile tespit edilebilir (31, 32).

Relative kantifikasyonda belirli bir RNA'nın ifadenme seviyesi başka bir RNA'nın ifadenme seviyesine oranlanarak gen ifadenmesindeki değişim belirlenir. Hücrelerde sabit ifadelendikleri bilinen referans genler (house-keeping genler) ya da evrensel RNA/DNA molekülleri relative kantifikasyonda referans olarak kullanılır.

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç ve Malzemeler

3.1.1 Kullanılan cihazlar

Laminar flow (Cytobaby, Danimarka)
İnkübatör (Heraus, Almanya)
İnvert mikroskop (Olympos, Japonya)
Işık mikroskobu (Leica, Almanya)
Santrifuj Cihazı (Harrier, İngiltere)
Soğutmalı santrifüj cihazı (Heraus, Almanya)
Vorteks (Dragon Laboratory, Çin)
Spektrofotometre (Epoch, Biotek, ABD)
Otomatik mikropipet (10,100 ve 1000 µl skalasında)(Eppendorf, ABD)
Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
Derin dondurucu (Arçelik, Türkiye)
Termal Cyclers (Bioer, Çin)
Light Cyclers 2.0 (Roche, İsviçre)

3.1.2 Kullanılan kimyasallar

Hücre kültürü medium RPMI 1640 (Biochrom AG, Germany)
Fetal Bovine Serum (Biochrom AG, Germany)
Antibiyotik (PSA)
Tryphan blue
MTT (Sigma-Aldrich, USA)
DMSO (Sigma-Aldrich, USA)
Tripure Isolation Reagent (Roche Diagnostics, Almanya)
RNaz spreyi (RNase free, Mercury, CLP, Pretech Instruments, İsveç)
cDNA sentez kiti (Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit, Roche Diagnostics, Almanya)
Etanol (Merck, Almanya)
İzopropanol (Merck, Almanya)
DEPC (Sigma-Aldrich, USA)

Kloroform (Merck, Almanya)

3.1.3 Kullanılan tampon ve çözeltiler

MTT (5mg/ml konsantrasyonda, PBS ile hazırlanmış)

PBS fosfat tamponu

SDS %10 (50 g SDS + 5 ml 1 N HCl + 500 ml distile su)

DEPC ilave edilmiş (%0,1) steril distile su

3.2 Yöntem

3.2.1 K562 hücre kültürü çalışmaları

American Type Culture Collection (ATCC)'den ticari olarak liyofilize formda temin edilen standardize K562 (Ürün no: ATCC-CCL-243) KML hücreleri (%10 fetal bovine serum (FBS) (Biochrom AG, Germany), %2 L-Glutamin, %1 penisilin/streptomisin karışımı içerecek şekilde hazırlanmış RPMI 1640 (Biochrom AG, Germany)) besi yeri içerisinde, 25 cm²'lik hücre kültür kaplarına (Greiner Bio-One Germany) ekildi. Hücre kültürleri %5 CO₂ ve %95 nem içeren 37°C sabit sıcaklıktaki Heraeus marka (Hanau, Germany) inkübatörde inkübe edildi. İvert mikroskop yardımıyla hücrelerin gelişimleri gözlemlendi ve 2-3 günde bir hücreler pasajlandı. Deneyle için yeterli hücre sayısına ulaşıp ulaşılmadığına Thoma lamı ile düzenli olarak hücre sayımı yapılarak karar verildi. Tüm hücre kültürü çalışmaları laminar akım kabini içinde steril koşullarda yapıldı. Hücre canlılığı tryphan blue atma testi ile belirlendi.

3.2.2 MTT hücre proliferasyon testi

Çalışmamızda uygulanan kimyasalların hücreler üzerindeki sitotoksik etkilerinin belirlenmesinde kantitatif kolorimetrik bir yöntem olan MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H tetrazoliumbromide] hücre proliferasyon testi kullanıldı. MTT testi uygulanan kimyasal konsantrasyonuna bağlı olarak hücre canlılığında ve proliferasyonunda meydana gelen değişimin değerlendirilmesine dayanmaktadır. MTT canlı hücrelerdeki mitokondri enzimleri ile indirgendiğinde çözünmeyen mor renkli kristaller oluşturan sarı renkli bir tetrazolyum tuzudur. Oluşan kristaller çeşitli organik çözücüler (SDS, DMSO, izopropanol gibi) ile çözüldüğünde 540 nm dalga boyunda optik yoğunluklarının ölçülmesi ile kantite

edilir. Sitotoksite arttıkça yani hücre canlılığı ve proliferasyonu azaldıkça formazan oluşumunun azalmasıyla birlikte ölçülen optik yoğunluğun da azaldığı bilinmektedir. IC₅₀ değeri hücre proliferasyonunun uygulanan kimyasal konsantrasyonuna bağlı eğrisinde hücrelerin %50'sinin canlı olduğu kimyasal konsantrasyon değerini ifade etmektedir.

Bu çalışmada STI571'in 48 ve 72 saat için ayrı ayrı IC₅₀ konsantrasyon değeri belirlendi. Her iki uygulama zamanı için 3'er set imatinib MTT testi uygulandı. Literatürden yola çıkılarak imatinib MTT testinde en yüksek doz olarak 0,6 µM konsantrasyon ile uygulamaya başlandı. 48 ve 72 saatlik inkübasyondan sonra plakların her kuyusuna 20 µl MTT (5 mg/ml distile su) eklendi. MTT ile 4 saat inkübasyon sonrasında ise tüm kuyucuklara 100 µl %10'luk SDS (50 g SDS + 5 ml 1 N HCl + 500 ml distile su) eklendi. Bir gece inkübasyonun ardından plaklar ELISA okuyucuda (Epoch Microplate Spectrophotometer System, Biotek, USA) 540 nm dalga boyunda okundu.

MTT hücre proliferasyon testi sonuçları SPSS Software (SPSS Inc., USA) Student's t-test uygulanarak $\alpha = 0.05$ olmak üzere anlamlı farkın belirlenmesi ile analiz edildi.

3.2.3 Hücre kültürlerine imatinib ve silimarin uygulamaları

K562 hücreleri her kuyucukta 1×10^6 hücre olacak şekilde altı kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. 48 saat ve 72 saat imatinib, silimarin ve imatinib+silimarin ile muamele etmek için 2'şer ayrı set kültür kabı hazırlandı. Hücrelere imatinib uygulamasının IC₅₀ dozunda ve IC₅₀ dozunun yarısı (IC₅₀/2) dozda yapılmasına karar verildi. K562 hücrelerine 48 saat inkübasyon için son konsantrasyon IC₅₀ muamele grubu 240 µM/µl imatinib, IC₅₀/2 muamele grubu 120 µM/µl imatinib, 300 ng/µl silimarin ve 72 saat inkübasyon için IC₅₀ grubu 130µM/µl imatinib, IC₅₀/2 muamele grubu 65 µM/µl imatinib, 300 ng/µl silimarin olmak üzere ilgili kimyasallar eklendi (33). Kültür kabının her kuyusunda son hacim 2 ml olacak şekilde kuyulara hücre kültür besiyeri eklendi. Kullanılan Silimarin (Sigma) ve İmatinib mesilat (Novartis, CGP057148B) çözeltileri steril distile su içinde çözülerek hazırlandı. Sonuç olarak 48 ve 72 saat uygulamalar için kontrol, İmatinib(IC₅₀), İmatinib(IC₅₀/2), Silimarin, İmatinib(IC₅₀)+silimarin ve İmatinib(IC₅₀/2)+Silimarin olmak üzere 6'şar, toplam 12 grupta hücre elde edilmiş oldu.

3.2.4 Hücre kültüründen RNA eldesi

RNA izolasyonundan önce kullanılacak tüm cihazlar, araçlar ve yüzey RNaz spreyi (RNase free, Mercury, CLP, Pretech Instruments, İsveç) ile silindi. 48. ve 72. saatlerde uygulama kaplarındaki hücrelerden modifiye ve optimize edilmiş Guanidium Tiyosiyanat (GTC) metodu kullanılarak RNA izole edildi (34). Tüm RNA izolasyon basamakları degradasyonu engellemek amacıyla buz üzerinde gerçekleştirildi. K562 hücreleri, kuyulara 1ml Tripure Isolation Reagent (Roche) eklenerek 1,5 ml lik tüplere aktarıldı. Pipetaj yardımıyla örneklerin homojenizasyonu sağlandı. Tüplere 200 µl klorofom (Merck, Almanya) eklendi. Tüp içeriği vortekslendi. 15 dk 15000 rpm hızda santrifüj edildi. Tüp içeriği 3 ayrı faz oluşturdu. En üstteki aköz faz temiz 1,5 ml lik tüpe alındı. Temiz tüpteki RNA içeren bu sıvıya oda sıcaklığında 500 µl izopropanol eklendi ve tüpler kısa süre vortekslendi. RNA'nın çökmesi için örnekler yaklaşık 16 saat -20°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası örnekler 15 dk 15000 rpm hızda santrifüj edildi. RNA örnekleri pellet halinde tüpün dibinde gözle görülebilir hale geldi. DEPC'li steril distile su ile hazırlanmış 1000µl %75'lik EtOH ile RNA pelletleri yıkandı ve 7500 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Pipet yardımıyla pellete müdahale etmeden üst sıvı uzaklaştırıldı. RNA pelletleri kurutuldu. Kuruduklarında saydamlaşan RNA pelletleri 15 µl DEPC ile muamele edilmiş (%0,1) steril distile su içinde çözüldü. RNA örnekleri kısa süreli olarak -20°C'de saklandı. Ayrıca 72 saat inkübasyon grubundan da aynı protokol ile RNA izole edildi.

RNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığı Epoch Microplate Spectrophotometer System (Biotek, USA) kullanılarak nükleik asitlerin 260 nm'de ve proteinlerin 280nm'de optik yoğunlukları ölçülerek belirlendi. Tüm RNA örnekleri için OD260/OD280 oranı 1.6-2.0 optimal aralığında ölçüldü.

3.2.5 RNA'dan cDNA eldesi

RNA örneklerinden cDNA sentezi Transcriptor High fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, Almanya) kullanılarak yapıldı. Total RNA'dan cDNA sentezlenmesi için kit içeriğinde bulunan random hexamer primer kullanılması tercih edildi.

cDNA sentez reaksiyonu kalıp-primer karışımı içeriği:

	<u>Hacim</u>	<u>Son konsantrasyon</u>
Total RNA	: Değişken	1 µg
Random Hexamer Primer, 600pmol/ µl:	2 µl	2,5 µM
Su (PCR grade)	: Değişken	Son hacim 11.4 µl
Toplam hacim	: 11.4 µl	

Kit protokolüne uygun olarak hazırlanmış olan örnekler 65 °C’de 10 dakika denatüre edildi. Aşağıdaki şekilde hazırlanmış premiksdan tüplere eklendi.

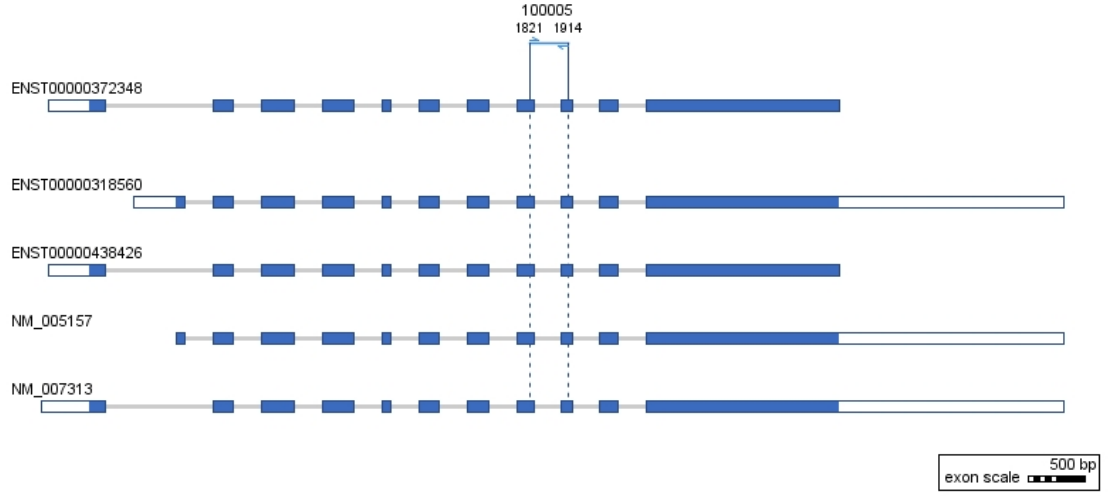
cDNA sentezi için kullanılan karışımın içeriği:

	<u>Hacim</u>	<u>Son konsantrasyon</u>
RT Buffer	: 4 µl	1× (8 mM MgCl ₂)
RNase inhibitor	: 0,5 µl	20U
dNTP miks (her biri 10mM)	: 2 µl	Her biri 1mM
DTT	: 1 µl	5 mM
Transcriptor High Fidelity Reverse transcriptase	: 1,1 µl	10U
Toplam hacim	: 20 µl	

Thermal cycler cihazında kit protokolüne uygun programda (29 °C 10 dk, 48 °C 60 dk ve 85 °C 5 dk) cDNA sentezi gerçekleştirildi.

3.2.6 Q-RT-PCR ile *BCR-ABL1*, *GRB2*, *GAB2*, *AKT* ve *ERK* ifadenme analizi

K562 kontrol grupları ve uygulama gruplarından elde edilen cDNA örnekleri ile *ABL1*, *BCR-ABL1*, *GRB2*, *GAB2*, *AKT* ve *ERK* genlerinin ifadenme analizleri yapıldı. Her örnek için 3 biyolojik replikadan elde edilen cDNA örnekleri 2’şer teknik replika kullanılarak analiz edildi. *BCR-ABL1*, *GAB2*, *GRB2*, *AKT* ve *ERK* genlerinin ifadenme analizinde relatif kantifikasyon yapabilmek için referans gen olarak *ABL1* geni seçildi (Şekil 3.1) (35).



Şekil 3.1: *ABL1* geni (ENST00000318560) (35)

BCR-ABL1 geninin ifadenme analizi LightCycler® t(9;22) Quantification kit (Roche, Almanya) ile diğer genlerin ifadenme analizleri ise RealTime Ready Designer Assays (Roche, Almanya) ile yapıldı (Tablo 3.1). LightCycler® t(9;22) Quantification kit (Roche, Almanya) M-bcr ve m-bcr kırıkları sonucu oluşan *BCR-ABL1* füzyon transkriptlerinin relatif kantifikasyonunu için hazırlanmış bir RT-PCR kitidir.. Primerlerin tasarımı tüm t(9;22) translokasyon ürünlerinin %95'ini oluşturan b3a2, b2a2, b2a3, b3a3 ve e1a2 füzyon transkriptlerinin analizini sağlar (36).

BCR-ABL1 Reaksiyonu:

	<u>Hacim</u>
t(9;22) Detection Mix	: 6,2 µl
Su (PCR grade)	: 6,8 µl
Reaction Mix	: 2 µl
cDNA (kalıp)	: 5 µl
Toplam hacim	: 20 µl

Tablo 3.1: LightCycler 2.0 Cihazında *BCR-ABL1* gen ifadenenme analizi için kullanılan program (36).

Program	Denatürasyon	Amplifikasyon			Soğutma
Parametre					
Analiz Modu	Yok	Kantifikasyon			Yok
Döngüler	1	45			1
Bölüm	1	1	2	3	1
Hedef	95°C	95°C	64°C	72°C	40°C
Zaman (s:dk:sn)	30 sn	1 sn	10 sn	26 sn	60 sn
Rampa değeri (°C/sn)	20	20	20	20	20
Belirleme Modu	Yok	Yok	Tek	Yok	Yok

ABL1, *GAB2*, *GRB2*, *AKT* ve *ERK* genlerinin ifadenenme analizlerinde kullanılan RealTime Ready Designer Assays (Roche, Almanya) primer ve prob içerir. Prob hidroliz probu özelliğindedir. Çalışmamızda kullanılan RealTime Ready Assay'ler LightCycler® Taqman Master (Roche, Almanya) ile çalışmak üzere geliştirildi. Reaksiyon içeriği önerilen şekilde aşağıdaki gibi hazırlandı ve Q-RT-PCR programı uygulandı (Tablo 3.2) (35).

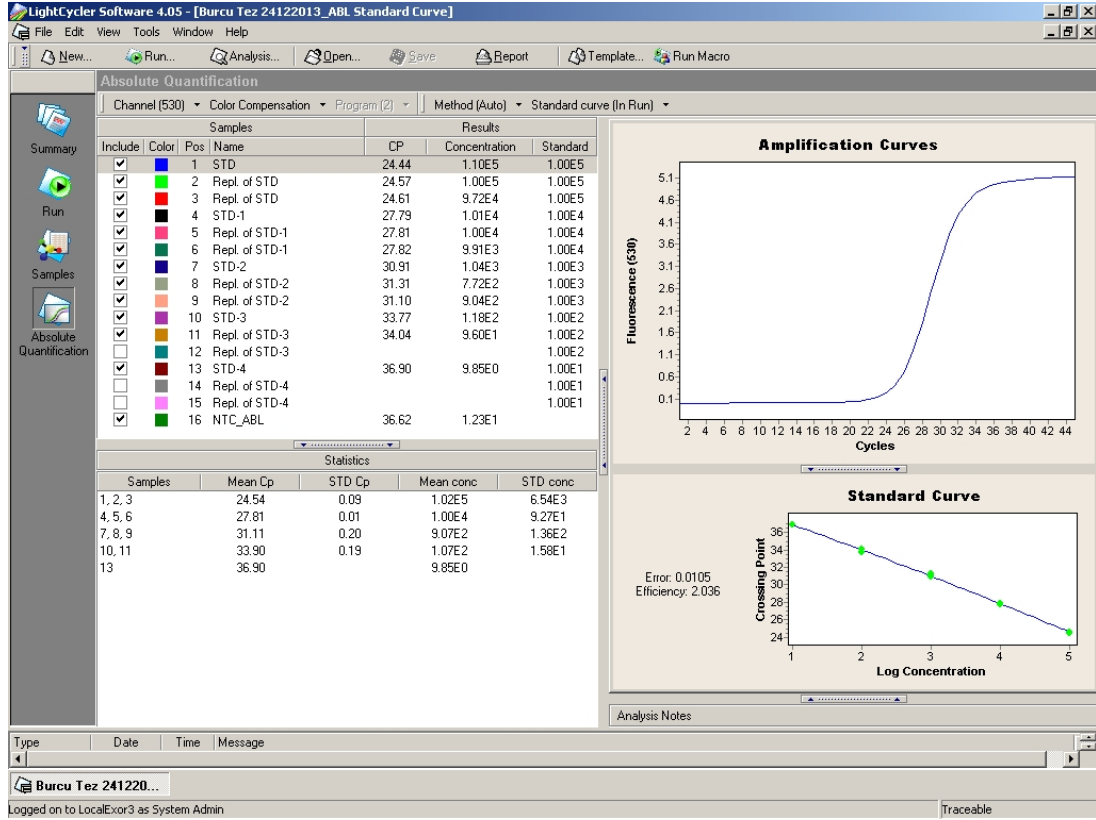
RealTime Ready Assay Reaksiyonu:

	<u>Hacim</u>	<u>Son konsantrasyon</u>
RealTime Ready Assay	: 1 µl	Primerlerin her biri 8pmol Probeların her biri 4pmol
Master Mix (5x)	: 4 µl	1X konsantrasyon
Su (PCR grade)	: 10 µl	
cDNA (kalıp)	: 5 µl	
Toplam hacim	: 20 µl	

Tablo 3.2: LightCycler 2.0 Cihazında *ABLI*, *GRB2*, *GAB2*, *AKT* ve *ERK* gen ifadeneme analizi için kullanılan ortak program (35).

Program	Denatürasyon	Amplifikasyon			Soğutma
Parametre					
Analiz Modu	Yok	Kantifikasyon			Yok
Döngüler	1	45			1
Bölüm	1	1	2	3	1
Hedef	95°C	95°C	60°C	72°C	40°C
Zaman (s:dk:sn)	10 sn	10 sn	30 sn	1 sn	30 sn
Rampa değeri (°C/sn)	20	20	20	20	20
Belirleme Modu	Yok	Yok	Yok	Tek	Yok

Relatif kantifikasyon için *ABLI* geni kullanıldı. *ABLI* geni için elde edilen standard eğrisi şekilde gösterilmektedir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2: ABLI geni için elde edilen standard eğrisi.

Standard eğrisi oluşturulduktan sonra örnekler her reaksiyonda kontrol gruplarından elde edilen cDNA örneği olan kalibratör ile birlikte çalışıldı. Böylece reaksiyon sonunda her örnek için hedef gen/referans gen konsantrasyon oranı hesaplandı. Bu oranın kalibratörün konsantrasyon oranına bölünmesi ile normalizasyon yapıldı. Tüm genler için ifadenme düzeyi sonuçları normalize oran olarak kullanıldı ($\Delta\Delta CT$).

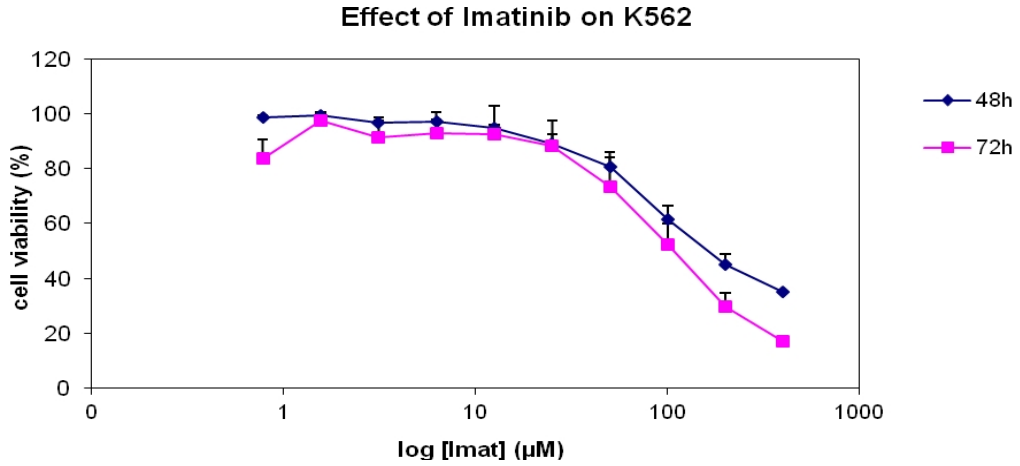
3.2.7 İstatistiksel analiz

Değişkenler küresellik ve varyansların homojenliği ön şartlarının kontrolü sonrası faktöriyel düzende “Tekrarlanan Ölçümler Varyans Analizi (Repeated Measures Analysis of Variance)” yöntemi ile değerlendirilmiştir. Parametrik test varsayımlarını sağlamayan bazı değişkenler için değerlendirme öncesi Box-Cox veri transformasyonu yapılmıştır. Çoklu karşılaştırmalar için düzeltilmiş LSD testi kullanılmıştır. Veriler SPSS (Version 17, Chicago IL, USA) paket programında değerlendirilmiştir.

BULGULAR

4.1 MTT Yöntemi ile Belirlenmiş Olan İmatinib IC₅₀ Değerleri

MTT hücre proliferasyon testlerinin analizi sonrasında imatinib için 48 saat uygulama IC₅₀ konsantrasyonu 240 µM ve 72 saat uygulama IC₅₀ konsantrasyonu 130 µM olarak belirlendi (Şekil 4.1, Tablo 4.1). K562 hücreleri üzerine imatinib etkilerini değerlendirmek için hücelere belirlenen bu IC₅₀ konsantrasyonlarında ve bu IC₅₀ dozlarının yarısında konsantrasyonda uygulamalar yapılmasına karar verildi. K562 hücrelerine, Silimarinin ise literatürdeki çalışmalardan yola çıkılarak plasma peak level olarak belirlenmiş olan 300 ng/µl konsantrasyonda uygulanmasına karar verildi (37).



Şekil 4.1: K562 hücrelerine imatinibin MTT testi analizleri sonucu belirlenmiş olan etkisi (48 saat ve 72 saat).

Tablo 4.1: MTT testi sonuçları (48 saat ve 72 saat inkübasyon).

İmatinib IC ₅₀	48 saat (µM)±SEM	72 saat (µM)±SEM
IC ₅₀₋₁	235,9	155,13
IC ₅₀₋₂	240,4	109,09
IC ₅₀₋₃	151,5	55,023
Ortalama	209,2667±28,91	106,4143±28,93

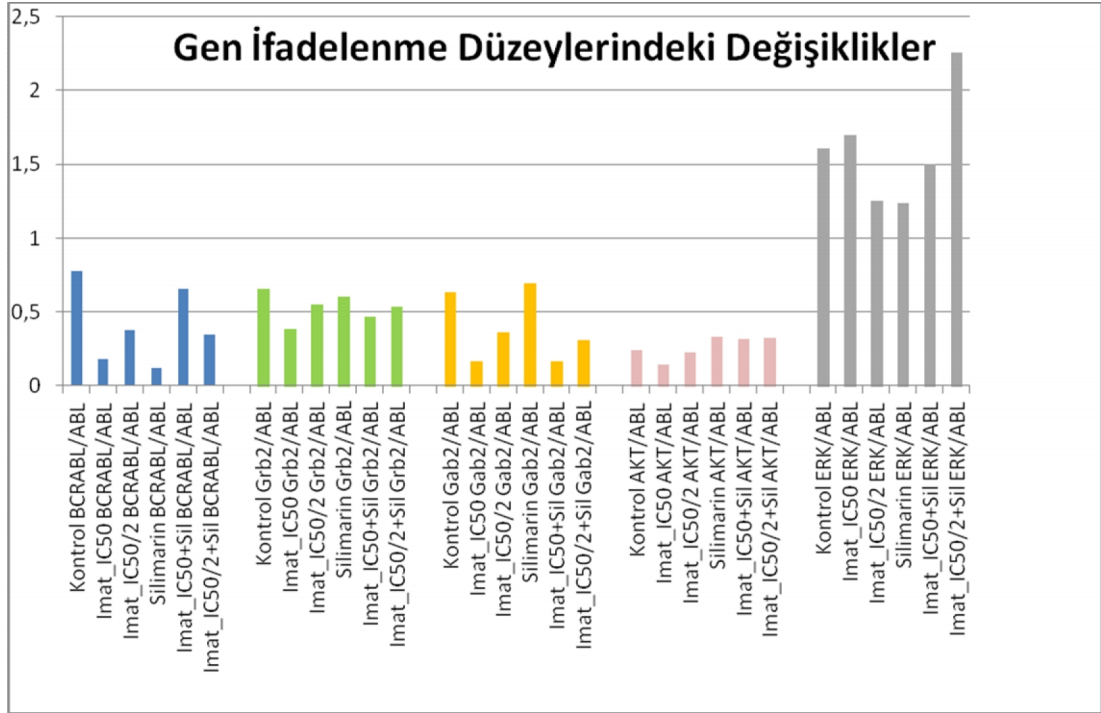
4.2 BCR-ABL1, GRB2, GAB2, AKT ve ERK Genlerinin İfadelenme Düzeyleri
BCR-ABL1, GRB2, GAB2, AKT ve ERK genlerinin ifade düzeyleri kontrol ve uygulama gruplarında RT-PCR yöntemi ile değerlendirildi. Kontrol ve uygulama gruplarındaki hücrelerden elde edilen cDNA örnekleri ile *BCR-ABL1, GRB2, GAB2, AKT* ve *ERK* genlerinin yanı sıra bu genlerin normalizasyonu için seçilen *ABL1* genine özgü problar kullanıldı (Şekil 3.2). Hedef genlerin ifadenmelerinin housekeeping genin ifadenmesine orantılanmasında her reaksiyon için tepkime sırasında oluşan floresan sinyalin eşik değeri geçtiği andaki döngü sayısını ifade eden Ct değerleri kullanıldı (Şekil 4.2). Ct (Cp) değeri reaksiyonun başında mevcut olan cDNA miktarı ile ters orantılıdır. Ct değerlerinin belirlenmesinde her grup için bu örneklerden elde edilen değerlerin ortalamaları kullanıldı. Tüm reaksiyonların kendi aralarında normalizasyonu için ise her deney setinde kontrol grubundan elde edilen cDNA ile ikiyeşer teknik replika olmak üzere kalibratör cDNA kullanıldı.

Set	Sample Type	Pos	Sample Name	Cp Median	Concentration Ratio	Normalized Ratio	Multiplication/Corr...
	Target Calibrator	29, 30	CAL_ABL	25.65	0.04	1.00	
	Reference Calibrator	29, 30	CAL_ABL	24.25			
Result Set 8	Target Unknown	23	Silmarin 48h_1_BCRABL	26.92	[7.98E-3]	[0.21]	1/1
	Reference Unknown	17, 18	Silmarin 48h-1_ABL	24.69			
Result Set 9	Target Unknown	24	Silmarin 48h-2_BCRABL	27.53	[3.95E-3]	[0.11]	1/1
	Reference Unknown	19, 20	Silmarin 48h-2_ABL	24.86			
Result Set 10	Target Unknown	25	Silmarin 48h-3_BCRABL	28.56	[1.05E-3]	[0.03]	1/1
	Reference Unknown	21, 22	Silmarin 48h-3_ABL	25.27			
Result Set 11	Target Unknown	26	Silmarin 72h-1_BCRABL	27.74	[2.65E-3]	[0.07]	1/1
	Reference Unknown	23, 24	Silmarin 72h-1_ABL	25.15			
Result Set 12	Target Unknown	27	Silmarin 72h-2_BCRABL	27.53	[3.48E-3]	[0.09]	1/1
	Reference Unknown	25, 26	Silmarin 72h-2_ABL	25.04			
Result Set 13	Target Unknown	28	Silmarin 72h-3_BCRABL	27.79	[2.39E-3]	[0.06]	1/1
	Reference Unknown	27, 28	Silmarin 72h-3_ABL	25.22			

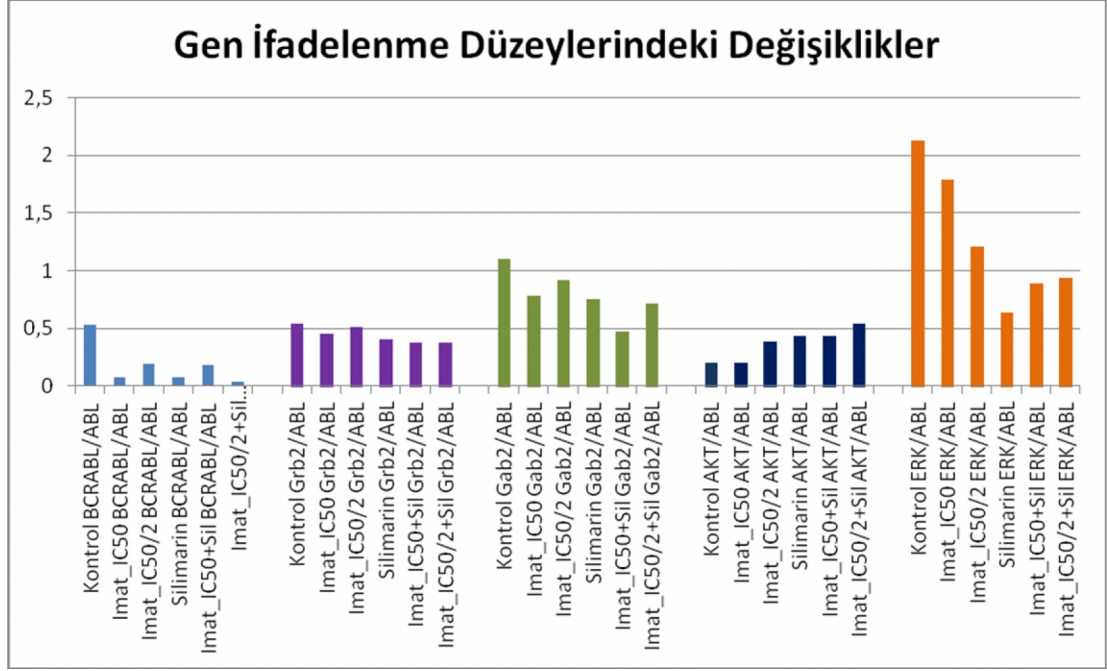
Şekil 4.2: *BCR-ABL1* gen ifadenmesinin örnek analizi (*BCR-ABL1/ABL1*).

Bu analizde 48 ve 72 saat silmarin uygulaması sonucu K562 hücrelerinde *BCR-ABL1* ifadenme düzeylerinin Ct değeri kullanılarak hesaplanması gösterilmektedir.

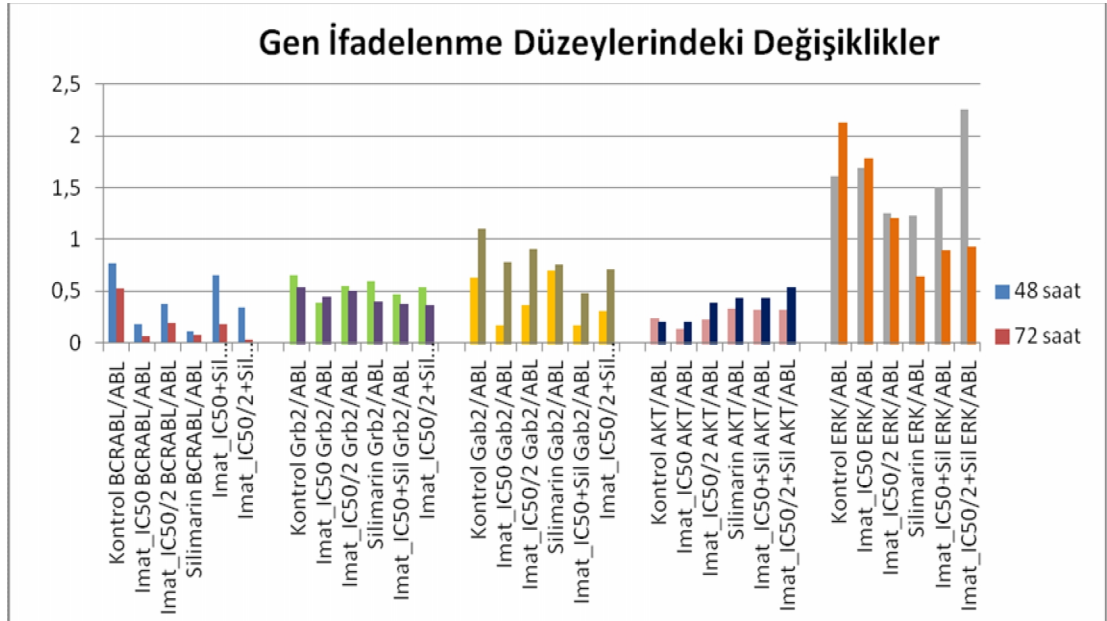
K562 hücrelerinde kontrol ve uygulama gruplarında 48 saat ve 72 saat sonunda *BCR-ABL1*, *GRB2*, *GAB2*, *AKT* ve *ERK* ifadenme düzeyleri belirlendi (Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5).



Şekil 4.3: 48 saat sonunda kontrol ve uygulama gruplarında *BCR-ABL1*, *GRB2*, *GAB2*, *AKT* ve *ERK* ifadenme düzeylerinin karşılaştırılması.



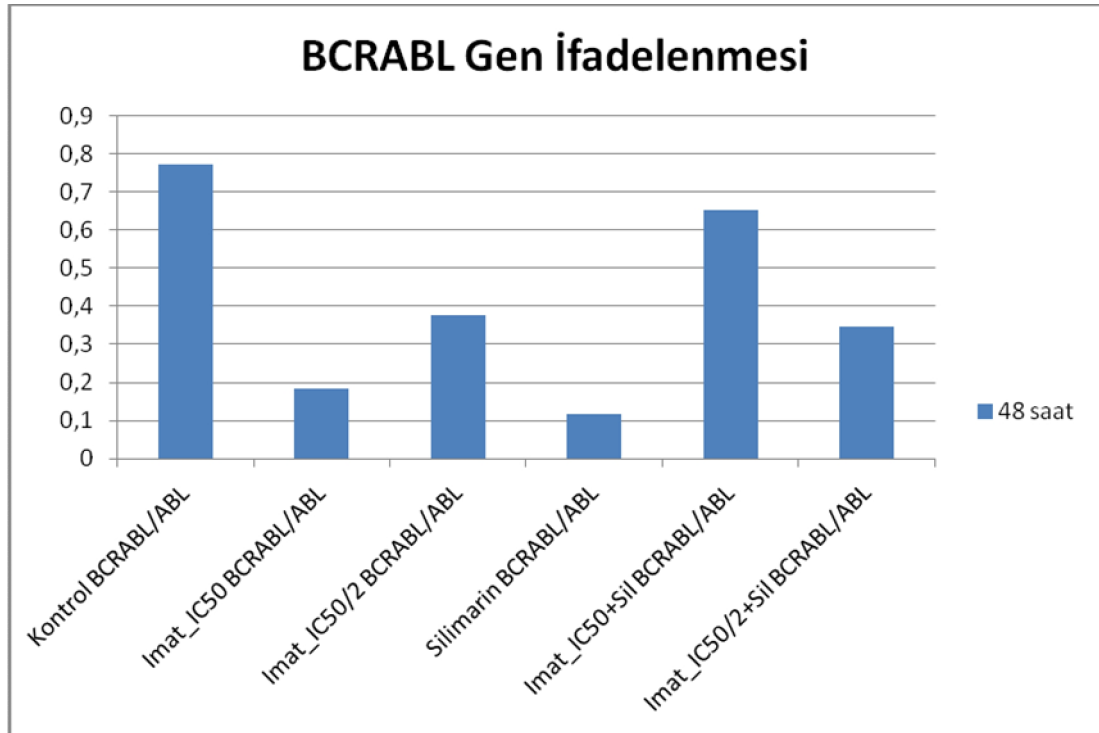
Şekil 4.4: 72 saat sonunda kontrol ve uygulama gruplarında *BCR-ABL1*, *GRB2*, *GAB2*, *AKT* ve *ERK* ifadenme düzeylerinin karşılaştırılması.



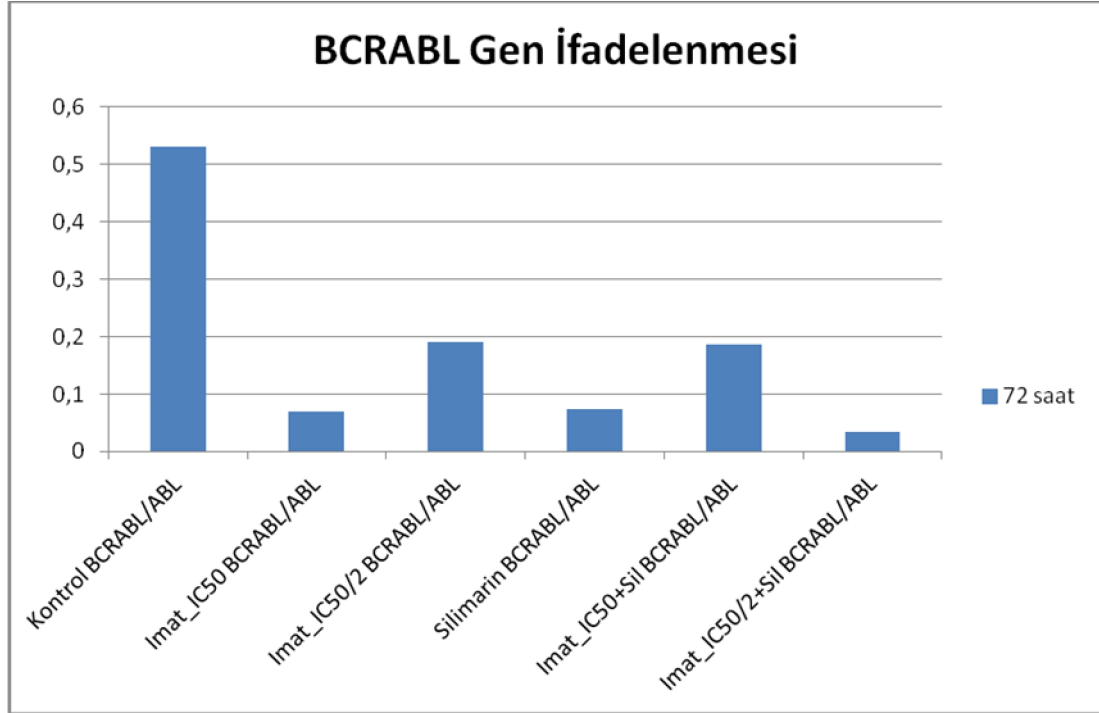
Şekil 4.5: 48 ve 72 saat sonunda kontrol ve uygulama gruplarında *BCR-ABL1*, *GRB2*, *GAB2*, *AKT* ve *ERK* ifadenme düzeylerinin karşılaştırılması.

K562 hücrelerinde *BCR-ABL1* ifadenme düzeyinde 48 saat sonunda tek başına IC₅₀ (240 µM) ve IC_{50/2} (120 µM) dozunda imatinib uygulamasından sonra kontrol grubuna göre azalma gözlemlendi ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. Ayrıca 48 saat sonunda tek başına silimarin (300 ng/µl) uygulamasından

sonra da kontrol grubuna göre *BCR-ABL1* gen ifadenmesinde azalma görüldü. Ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). İmatinib ve silimarinin birlikte uygulandığı gruplarda *BCR-ABL1* ifadenmesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı olmayan azalma tespit edildi ($p>0.05$). 48 saat sonunda grupların kendi aralarında karşılaştırılmaları sonucunda gen ifadenme düzeyleri açısından istatistiksel açıdan anlamlı fark belirlenmedi ($p>0.05$)(Şekil 4.6). Benzer şekilde 72 saat sonunda uygulama grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında *BCR-ABL1* ifadenmesinde azalma meydana geldiği belirlendi. Ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$) (Şekil 4.7).

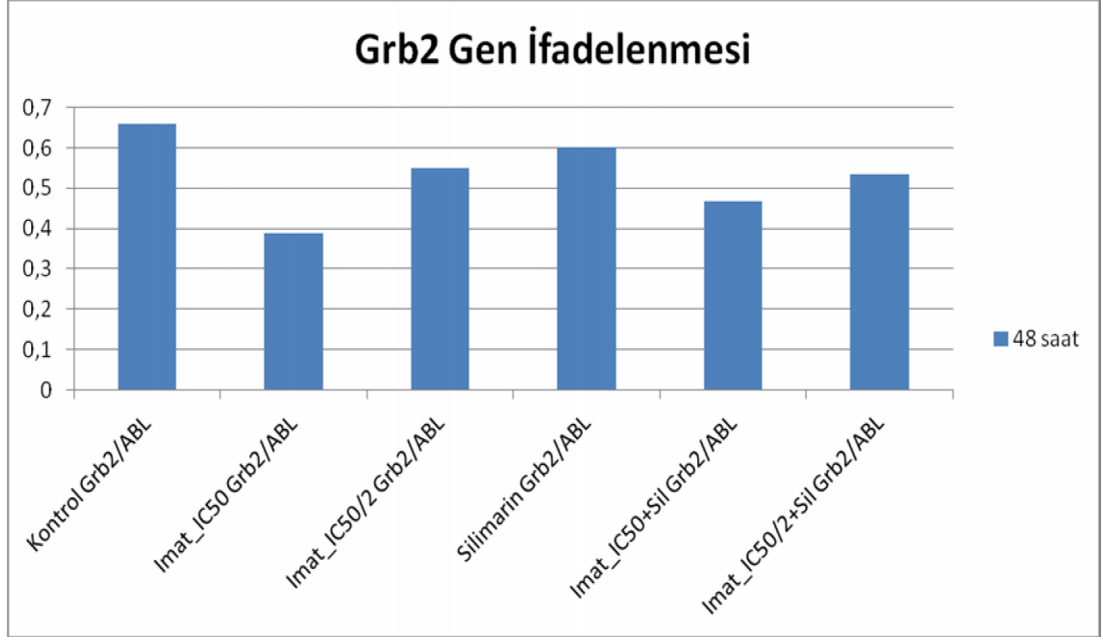


Şekil 4.6: K562 hücrelerinde kontrol ve uygulama gruplarında 48 saat sonunda *BCR-ABL1* ifadenme düzeyleri.

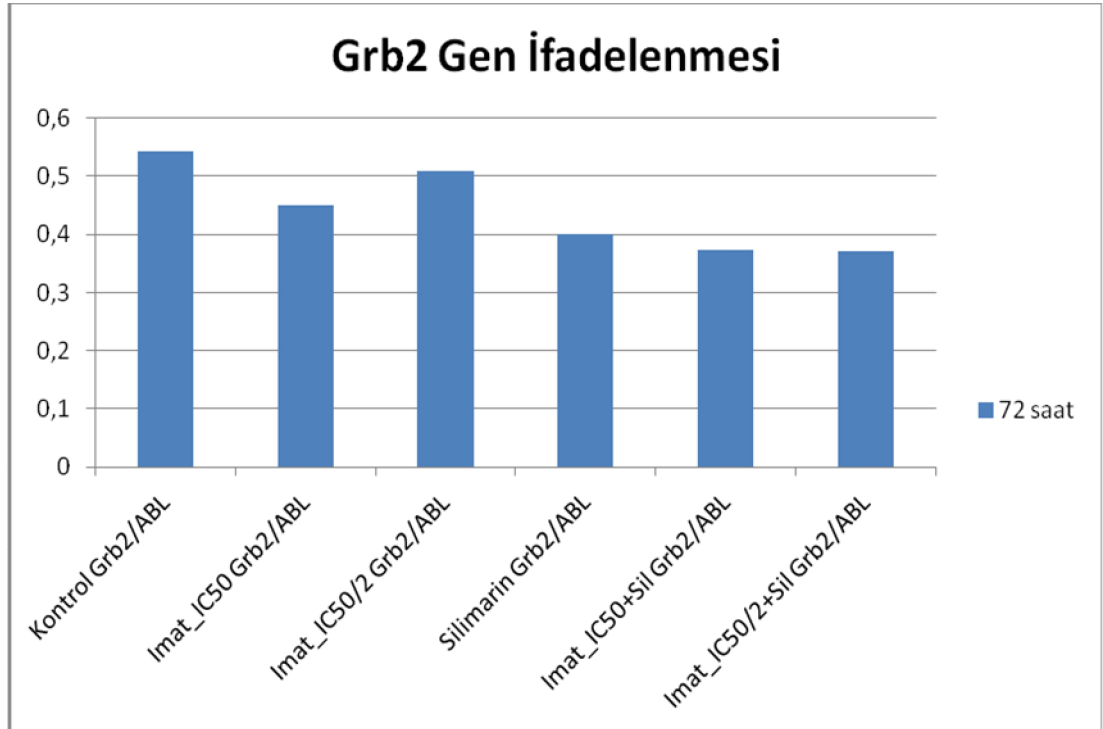


Şekil 4.7: K562 hücrelerinde kontrol ve uygulama gruplarında 72 saat sonunda *BCR-ABL1* ifadenme düzeyleri.

K562 hücrelerinde *GRB2* ifadenme düzeyi açısından 48 saat ve 72 saat sonunda tek başına IC_{50} (240 μ M) ve $IC_{50}/2$ (120 μ M) dozlarında imatinib, tek başına silimarin (300 ng/ μ l) ve imatinib+silimarin uygulamalarından sonra kontrol grubuna göre azalma gözlemlendi ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 4.8, Şekil 4.9). 48 saat ve 72 saat sonunda grupların kendi aralarında karşılaştırılmaları sonucunda da *GRB2* ifadenmelerinde istatistiksel olarak anlamlı taşıyan bir farklılık tespit edilmedi ($p>0.05$).



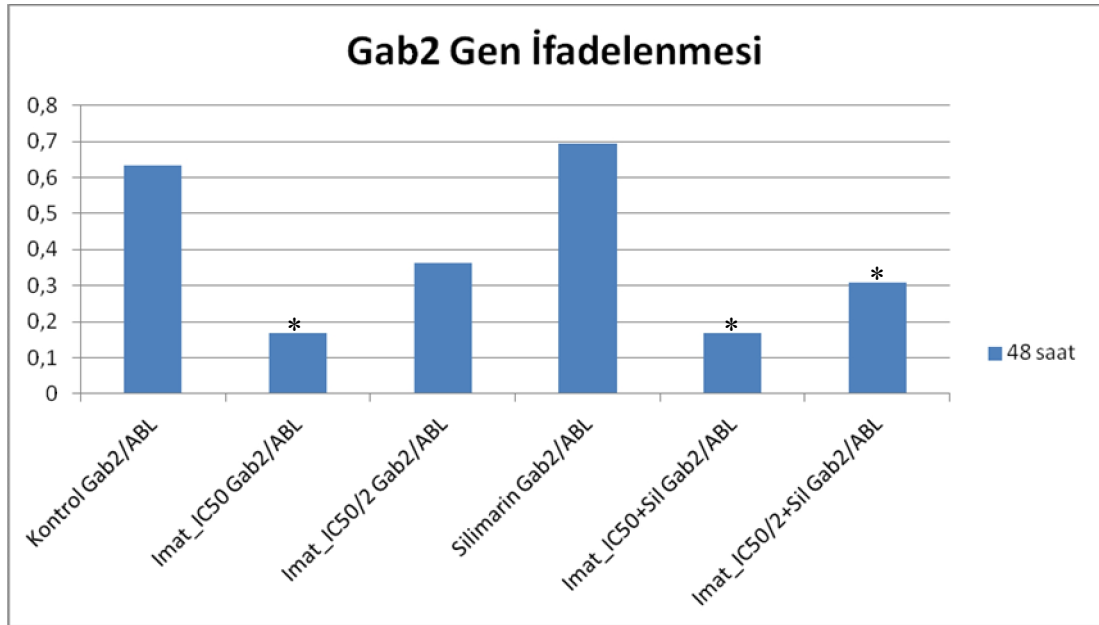
Şekil 4.8: K562 hücrelerinde kontrol ve uygulama gruplarında 48 saat sonunda *GRB2* ifadenme düzeyleri.



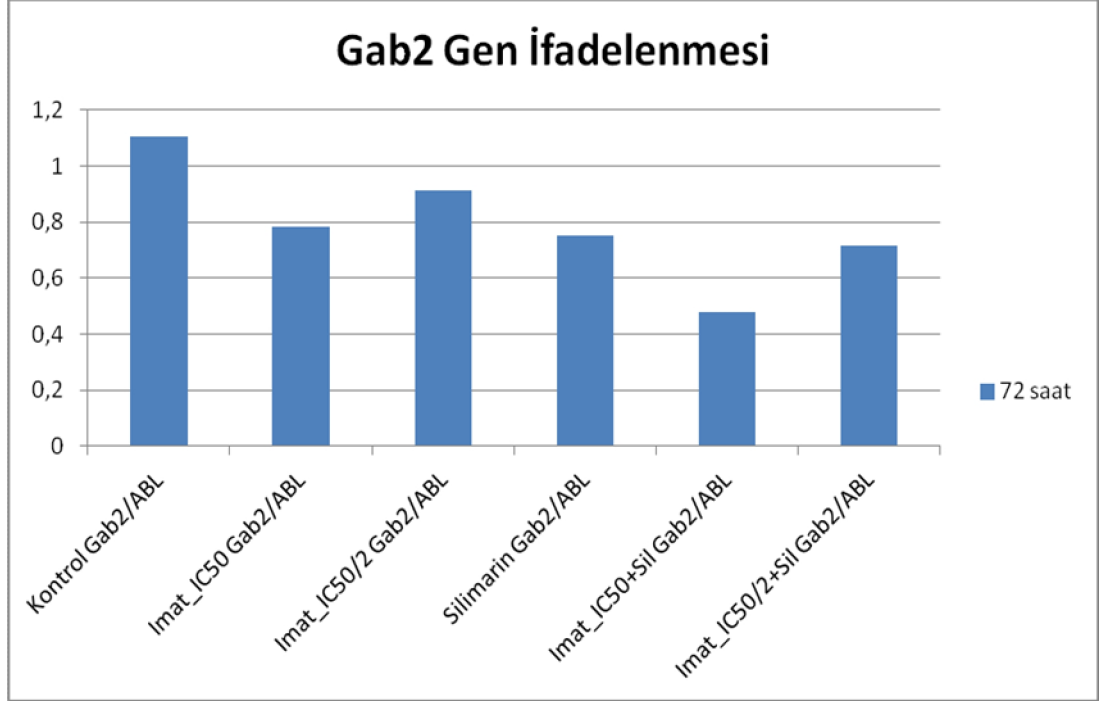
Şekil 4.9: K562 hücrelerinde kontrol ve uygulama gruplarında 72 saat sonunda *GRB2* ifadenme düzeyleri.

GAB2 ifadenmesi açısından K562 hücrelerinde 48 saat sonunda tek başına IC_{50} (240 μM) ve $IC_{50}/2$ (120 μM) dozunda imatinib uygulamasından sonra kontrol

grubuna göre azalma gözlemlendi. IC_{50} (240 μ M) imatinib uygulanan grupta *GAB2* ifadenmesindeki azalma kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). $IC_{50}/2$ (120 μ M) imatinib uygulama grubundaki azalma ise istatistiksel açıdan anlam taşımamaktadır. Ayrıca 48 saat sonunda imatinib+silimarin uygulaması yapılan iki grupta da (IC_{50} imatinib+silimarin ve $IC_{50}/2$ imatinib+silimarin) kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *GAB2* gen ifadenmesinde istatistiksel açıdan anlamlı azalma tespit edildi ($p < 0.05$) (Şekil 4.10). 72 saat sonunda *GAB2* ifadenmesi açısından kontrol ve uygulama grupları karşılaştırıldığında ifadenmenin tüm uygulama gruplarında azaldığı ancak bu azalmanın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı belirlendi ($p > 0.05$) (Şekil 4.11).

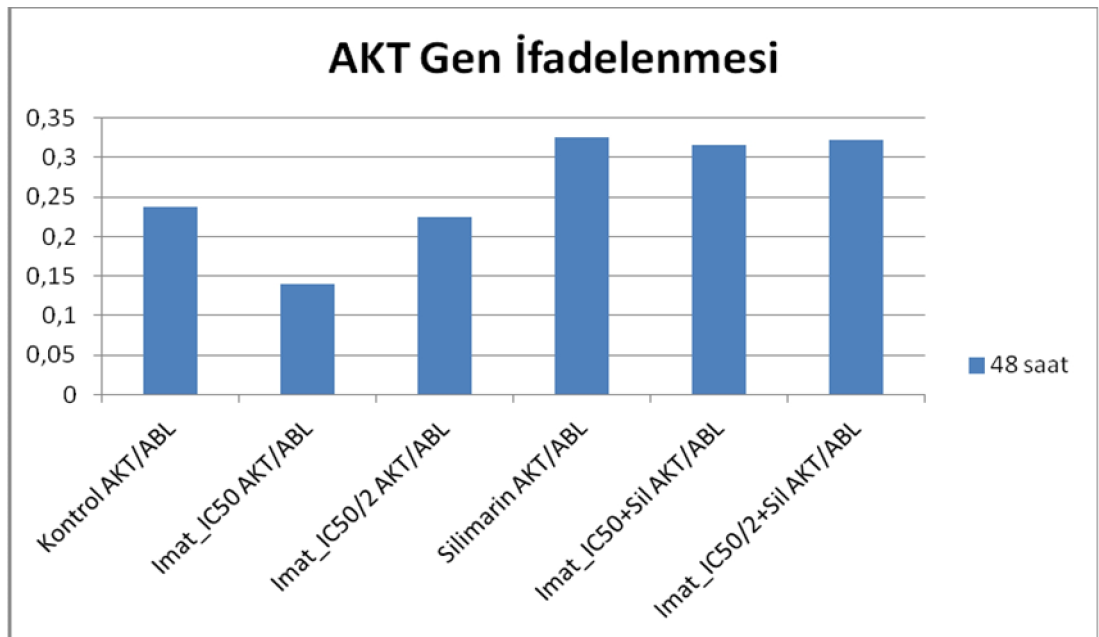


Şekil 4.10: K562 hücrelerinde kontrol ve uygulama gruplarında 48 saat sonunda *GAB2* ifadenme düzeyleri.

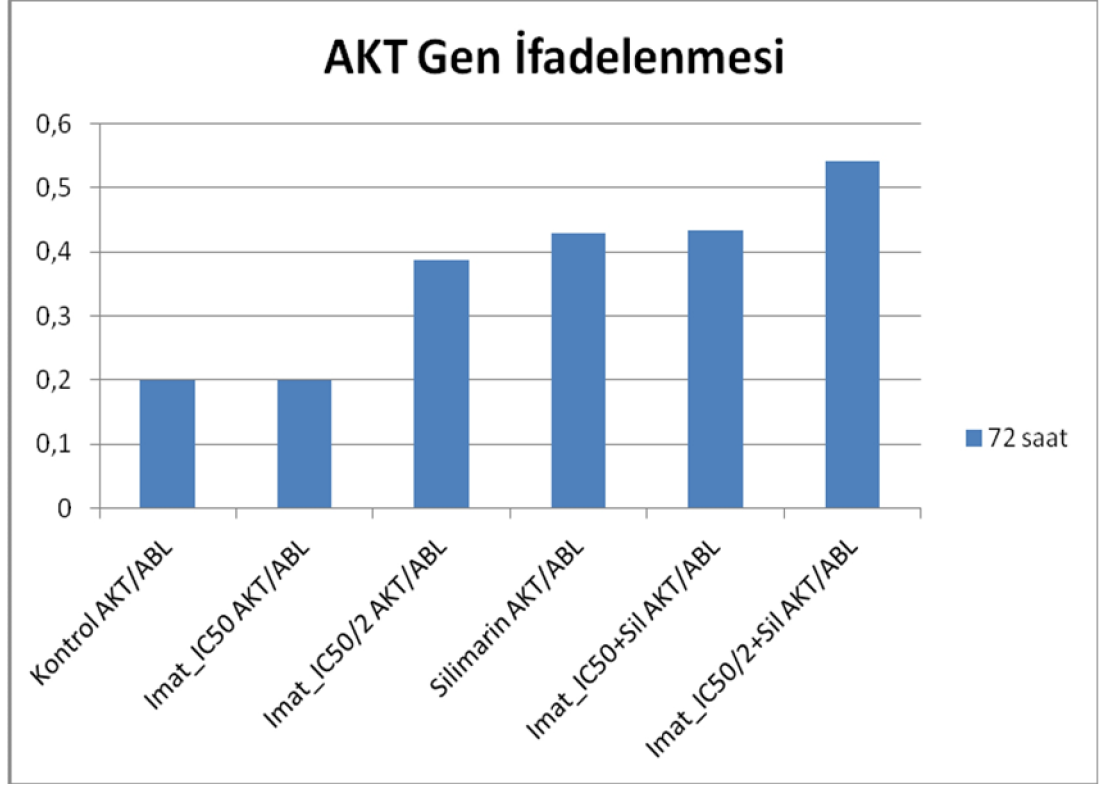


Şekil 4.11: K562 hücrelerinde kontrol ve uygulama gruplarında 72 saat sonunda *GAB2* ifadenme düzeyleri.

K562 hücrelerinde *AKT* ifadenmesi açısından değerlendirme yapıldığında 48 saat ve 72 saat sonunda kontrol grubu ile uygulama grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadığı tespit edildi ($p>0.05$) (Şekil 4.12, 4.13).

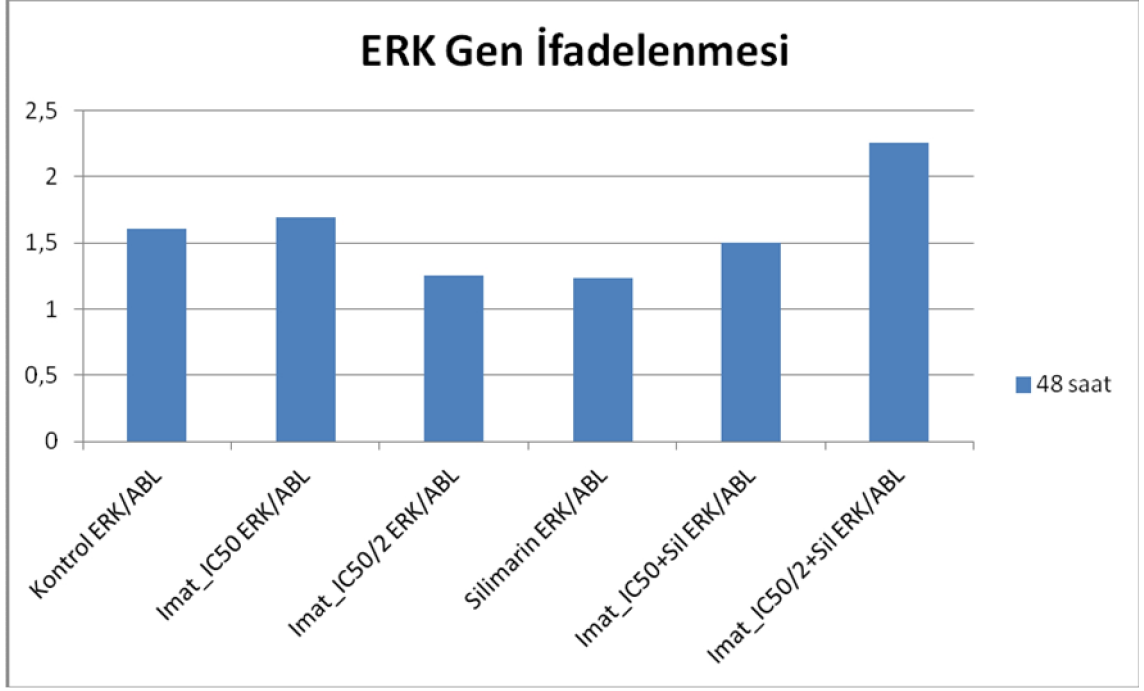


Şekil 4.12: K562 hücrelerinde kontrol ve uygulama gruplarında 48 saat sonunda *AKT* ifadenme düzeyleri.

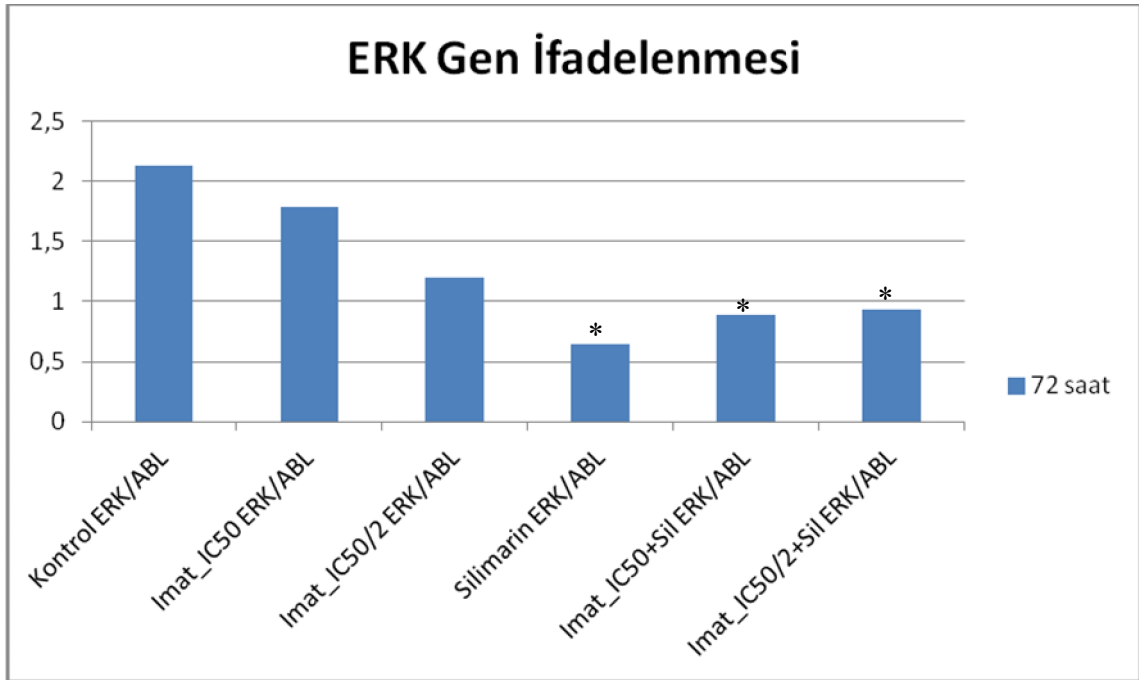


Şekil 4.13: K562 hücrelerinde kontrol ve uygulama gruplarında 72 saat sonunda *AKT* ifadenme düzeyleri.

48 saat sonrası K562 hücrelerinde ERK ifadenmesi açısından kontrol ve uygulama grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılık bulunmadı ($p > 0.05$) (Şekil 4.14). 72 saat sonrasında ise ERK ifadenmesinin tek başına silimarin ve imatinib+silimarin (IC_{50} imatinib+silimarin ve $IC_{50}/2$ imatinib+silimarin) uygulama gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak azaldığı belirlendi ($p < 0.05$) (Şekil 4.15).



Şekil 4.14: K562 hücrelerinde kontrol ve uygulama gruplarında 48 saat sonunda ERK ifadenme düzeyleri.



Şekil 4.15: K562 hücrelerinde kontrol ve uygulama gruplarında 72 saat sonunda ERK ifadenme düzeyleri.

TARTIŞMA

KML moleküler patogenezinin sorumlu Philadelphia kromozomu üzerindeki *BCR-ABL1* füzyon geni JAK-STAT, MAPK-ERK ve PI3K-AKT hücre içi sinyal yollarını aktive ederek lösemik hücrelere seçici büyüme avantajı sağlar. ABL1 proteini sağlıklı hücrelerde çekirdek ve sitoplazma arasında hareket ederken, *BCR* onkogeni ile füzyon olduğunda işlevi değişir. Füzyon protein kalıcı olarak sitoplazmada bulunur ve onkogenik yoldaki proteinler ile sürekli etkileşime geçer. *ABL1*'in tirozin kinaz aktivitesi *BCR* ile füzyonu sonucunda süreklilik kazanır, dimerizasyonu, tetramerizasyonu ve otofosforilasyonu meydana gelir. BCR-ABL1 üzerindeki fosfotirozin rezidülerinin artması sonucunda diğer proteinlerin SH2 bağlanma bölgeleri ile sürekli olarak etkileşir. BCR-ABL1 onkoproteini ve diğer sitoplazmik moleküllerin anormal etkileşimi temel hücrel olayları etkiler. MAPK-ERK yolağının uyarılması artmış proliferasyona, JAK-STAT yolağının uyarılması transkripsiyonel aktivitede artışa ve PI3K-AKT yolağının uyarılması ise apoptozda azalmaya ve sağkalımda artışa neden olur (17).

BCR-ABL1 hücre içi hedef sinyal molekülleri ile GRB2 adaptör proteini üzerinden etkileşir. BCR-ABL1/GRB2 kompleksi, GRB2 proteininin SH3 bölgesi yardımıyla Son of Sevenless (SOS) ile bağlanır. GAB2 adaptör proteini aktive olur ve Ras'ı GDP-bağlı inaktif formundan GTP-bağlı etkin formuna dönüştürür. Ras yolağının akışaşağı yönünde ERK sinyal molekülleri yer alır. Ayrıca oluşan kompleks PI3K-AKT yolağını aktive eder. Forkhead O (FOXO) transkripsiyon faktörünü baskılayarak sağkalımın artmasının yanı sıra p27 proteozomal degradasyonu ve mTOR aktivasyonu sonucu proliferasyonda artışa neden olur. Sonuç olarak mTOR upregülasyonu otofaji gibi önemli hücrel olayları bloke eder. Ayrıca BCR-ABL1'in KML hücrelerinde tanımlanmış tirozin fosforile proteinler olan CRK ve CRKL üzerinden de AKT yolağına etki ettiği gösterilmiştir. AKT yolağının aktivasyonu sonucu apoptotik mekanizmada görevli Bad, Caspase 9, Mdm2 ve Ask1 gibi birçok substrat fosforile olur. Sonuç olarak sağkalımda ve lösemik hücre klonunda artış görülür. Literatürde de *BCR-ABL1*'in aktive ettiği tüm hücre içi sinyal yollarının ortak özelliği proliferasyon kontrolünün kaybına ve lösemik hücre klonunun selektif artışına neden olmaları olarak tanımlanmıştır.

Ayrıca literatürde flavonoidlerin birçok kinazın ATP-bağlanma bölgesine bağlanarak reseptör tirozin kinaz inhibitörü olarak görev yaptığı tanımlanmıştır. *BCR-ABL1* transformasyonunda yer alan yolaklara özgü inhibitörlerin kullanımının KML tedavisinde imatinib etkinliğini artırmasından yola çıkılarak flavonoidlerin bu yolaktaki etkilerinin belirlenmesi önem taşımaktadır (17).

Bu çalışmada insan KML hücre dizisi K562 hücrelerine tedavi protokolünde rutin olarak kullanılan tirozin kinaz inhibitörü imatinib ile birlikte literatürde çeşitli kanser hücreleri üzerinde apoptozu arttırdığı tanımlanmış bitkisel bir flavonoid olan silimarin uygulandı (38). Silimarinin oral yolla alındığında eriştiği en yüksek plazma konsantrasyonunda (300 ng/ml) hepatosellüler karsinoma hücreleri üzerinde doksorubisinin sitotoksik ve genotoksik etkilerini artırdığı da bilinmektedir (39). Bitkisel flavonoidler yüzyıllardır kanser tedavisinde tamamlayıcı moleküller olarak kullanılmaktadır. Silimarin deve dikenini bitkisi tohumundan elde edilen doğal bir flavonoiddir. Literatürde silimarinin prostat, meme, cilt, kolon, akciğer, böbrek ve mesane gibi çeşitli kanser hücrelerinde apoptozu indüklediği, hücre siklusunu regüle ettiği, anjiyogenez, metastaz ve invazyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (40-44). Bizim çalışmamızda ise KML hücre dizisi üzerinde imatinib ve silimarin kombinasyonunun *BCR-ABL1* modulatör proteinleri GRB2, GAB2 ve *BCR-ABL1* akışaşağında yer alan AKT ve ERK ifadenmeleri RT-PCR yöntemi ile mRNA düzeyinde araştırıldı. Hücre dizisi olarak da imatinibe dirençli olmadığı bilinen, standardize K562 hücrelerinin kullanıldı.

Hücelere 48 ve 72 saat boyunca IC_{50} ve $IC_{50}/2$ dozlarında imatinib uygulandı. MTT sonuçlarımızın literatürde gösterilen K562 imatinib IC_{50} dozu ile benzer olduğu görüldü (45). Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde çeşitli hücre kültürü çalışmalarında imatinib etkisinin daha çok apoptoz açısından değerlendirilmiş olduğu göze çarpmaktadır.

BCR-ABL1 gen ifadenmesinin tüm uygulama gruplarında hem 48 saat hem de 72 saat uygulama süreleri açısından kontrol grubuna göre azaldığını belirledik ancak bu düşüş istatistiksel açıdan anlamlı değildi ($p>0.05$). İmatinib *BCR-ABL1* füzyon ürünü olan proteine ATP ile yarışmacı olarak bağlanan özgül bir tirozin kinaz inhibitörüdür (46). İmatinib füzyon proteini üzerinden etkisini göstererek hedefindeki proteinlerin fosforile olmalarını engellemektedir. Yani imatinib füzyon transkriptin

ifadelenmesini azaltmaz bunun yerine hedefindeki proteinlerin aktivitesini azaltarak hücrelerin bölünmesini engeller. Sonuçta imatinibin direkt olarak *BCR-ABL1* mRNA transkript düzeyine etkisinin olmadığı düşünülmektedir. *BCR-ABL1* ifadelenmesinde uygulamalar sonucu meydana gelen azalmanın istatistiksel olarak anlam taşımamasının nedeninin uygulanan IC_{50} ve $IC_{50}/2$ imatinib dozlarında KML hücrelerinden ilaca duyarlılık göstermeyen sayıca %50'den daha yüksek orandaki hücrenin bölünmeye devam etmesi sonucu ortamdaki *BCR-ABL1* transkript düzeyinin artmaya devam etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

BCR-ABL1 sinyal iletiminde GAB ailesinden GAB2 temel rol oynar. GAB proteinleri birçok farklı motif aracılığıyla büyüme faktörleri ve sitokin reseptörlerinin aşağı akış yönünde yer alan Shp2/Ras/ERK, PI3K/AKT/mTOR ve JAK/STAT yollarını aktive eder (47). GAB proteinlerinin reseptör tirozin kinazlar ve diğer tirozin fosforile proteinler ile etkileşiminde GRB2 adaptör protein olarak görev yapar (48). Örneğin; GRB2 merkezi SH2 alt ünitesi aracılığıyla BCR'ın fosfotirozin 177 (Y177) bölgesine ve GAB2'nin C-terminal SH3 alt ünitesine bağlanır. Çalışmamızda *BCR-ABL1*'in doğrudan etkileşimde olduğu *GRB2*'nin ifadelenmesinin kontrol grubu ve uygulama grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde farklı olmamasının sebebinin GRB2'nin *BCR-ABL1* ve GAB2 arasında adaptör bir protein olarak görev yapması ve *BCR-ABL1*'den bağımsız olarak ifadelenmesi olduğu düşünülmektedir.

GAB2 modülatör gen ifadelenmesi 48 saat sadece imatinib IC_{50} , imatinib (IC_{50})+silimarin kombinasyonu ve imatinib ($IC_{50}/2$)+silimarin kombinasyonu ile inkübe edilen hücrelerde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma görüldü ($p<0.05$). 72 saat uygulama grubu için ise *GAB2* gen ifadelenmesinde kontrol grubuna göre azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). *GAB2* adaptör proteini *BCR-ABL1* transformasyonunda anahtar rol oynar. *BCR* geni 177.pozisyonundaki tirozin GRB2 SH2 bölgesi ile etkileşir. GRB2 SH3 bölgesi ise *GAB2* ile etkileşir. *GAB2* üzerinde PI3K p85 alt ünitesi ve Shp2 ile bağlanma bölgeleri bulunur. Sonuç olarak GRB2 SH2 bağlanma bölgesi *GAB2*'nin tirozin fosforilasyonunu regüle eder. *GAB2* downstreaminde ERK ve AKT yolları yer alır (17). Dolayısıyla *BCR-ABL1* GRB2 ve *GAB2* üzerinden sağkalım, proliferasyonu ve transformasyonu regüle eder. Ayrıca KML hücrelerinde *GAB2*

mutasyonları sonucu GAB2'nin aşırı ifadelenmesinin hücrelerde imatinibe direnç gelişmesinde etkili olduğu daha önceden gösterilmiştir (49). Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulardan yola çıkarak imatinib tedavisine ek olarak silimarin desteğinin GAB2 ifadelenme düzeyini düşürerek imatinibe direnç geliştirilmesine engel olabileceği düşünülmektedir. Sonuçları yayımlanan çalışmalar değerlendirildiğinde silimarinin K562 hücreleri üzerinde GAB2 geninin ifadelenmesine etkisini araştıran ilk çalışma bu araştırmadır.

BCR-ABL1'in fosforilasyonu sonucu GRB2 aracılı olarak aktive olan GAB2 fosfotidilinositol 3-kinaza (PI3K) bağlanır. Antiapoptotik ve lökomojenik sinyalleri artıran PI3K/AKT yolu aktif olur (17). Bu nedenle bu yolak KML tedavisinde hedeflidir. Literatürde K562 hücrelerinde silimarin uygulamasının AKT sinyal yolunu inaktive ederek kaspaz inaktivasyonu ve apoptoza yol açtığı protein düzeyinde yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (50). Ancak bu çalışmada AKT inaktivasyonunun total AKT düzeyini değiştirilmeden gerçekleştiği de belirtilmiştir. Literatür ile uyumlu olarak sonuçlarımız AKT mRNA transkript düzeyinde uygulama ve kontrol grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmadığını göstermektedir ($p>0.05$). Silimarinin AKT yoluna etkisinin mRNA düzeyinde değil protein aktivasyonu açısından gerçekleştiğini düşünmekteyiz.

BCR-ABL1 akış aşağı yönünde yer alan Ras sinyal iletim yolunun aktivasyonu lösemik hücrelerin büyüme ve proliferasyonuna neden olur. Ras aktivasyonu sitozolde gerçekleşir. Post translasyonel prenilasyon sonucu Ras aktivasyonu sonrası RAF1 sitozolden hücre zarına geçer. SRC ve diğer kinazlar tarafından fosforile olur. RAF1 de MAPK/ERK yolunu aktive eder (17). Bu yolak KML hücrelerinde apoptozu ve sağkalımı düzenleyici role sahiptir. Çalışmamızın sonuçlarını ERK gen ifadelenmesi açısından değerlendirdiğimizde sadece silimarin, imatinib (IC_{50})+silimarin kombinasyonu ve imatinib ($IC_{50}/2$)+silimarin kombinasyonu uyguladığımız gruplarda kontrol gruplarına göre ifadelenmede istatistiksel açıdan anlamlı azalma olduğu görüldü ($p<0.05$). Literatürde KML hücrelerinde ERK ifadelenmesinin artışının transkripsiyonu, sağkalımı ve proliferasyonu artırdığı gösterilmiştir (4). Elde ettiğimiz sonuçlara göre literatürle uyumlu bir şekilde KML hücrelerine imatinib uygulamasına ek olarak silimarin

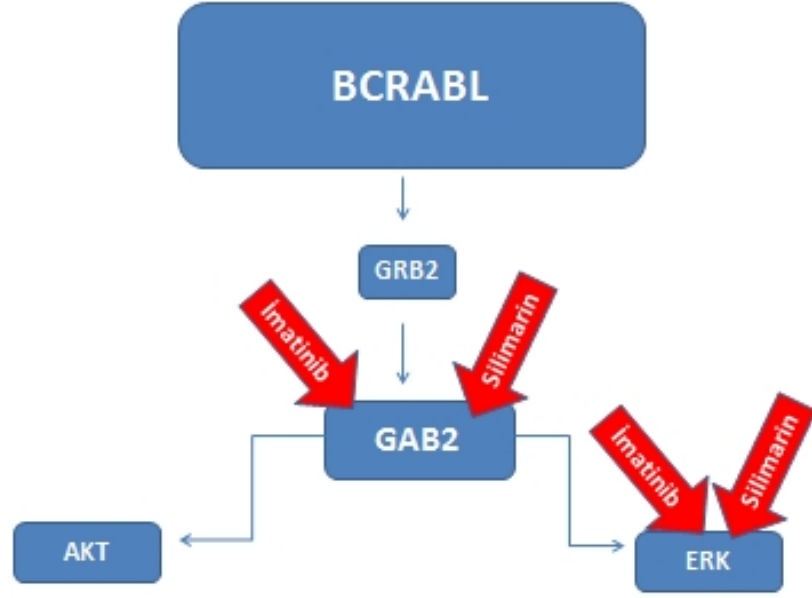
uygulamasının ERK ifadenmesini azaltarak transkripsiyonu baskıladığını ve hücreleri apoptoza yönlendirdiğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda silimarin ile imatinib kombinasyonunun sinyal yolları üzerindeki etkinliğini doz bağımlı ve süre bağımlı olarak da değerlendirdik. Doz bağımlı etkinliği belirlemek amacıyla hücrelere MTT yöntemi ile belirlediğimiz imatinib IC50 dozunun yarı konsantrasyonunda da uygulama yaptık. 48 saat uygulama grubu sonuçlarına göre GAB2 gen ifadenme düzeyinin sadece imatinib IC50 dozu uyguladığımız grupta kontrol grubuna göre azaldığı ancak yalnızca imatinib IC50/2 dozunu uyguladığımız grupta kontrol grubuna göre azalmadığı belirlendi. Ancak imatinib IC50/2 ile silimarin kombinasyonu uyguladığımız grupta ise GAB2 gen ifadenme düzeyinin kontrol grubuna göre düşmüş olduğunu belirledik ($p < 0.05$). Silimarinin K562 hücrelerine GAB2 sinyal yolağında imatinib etkinliğini artırarak etki ettiği belirlendi (Şekil 4.10). Ancak uygulama süresi uzatıldığında (72 saat) silimarinin bu katkısı ortadan kalkmaktadır. 72 saat uygulama grubunda GAB2 gen ifadenme düzeyi açısından kontrol grubuna göre anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p > 0.05$) (Şekil 4.11).

Doz ve süre bağımlı sonuçları ERK ifadenmesi açısından incelediğimizde de silimarinin benzer şekilde katkısı belirlendi. 72 saat uygulama grubunda imatinibin IC50 dozunda ve IC50/2 yarıdozunda ERK ifadenmesi üzerinde etkisi yok iken sadece silimarin ve imatinib ile silimarin kombinasyonu uyguladığımız gruplarda ERK ifadenmesinde azalma tespit edildi ($p < 0.05$) (Şekil 4.15). 48 saat uygulama grubunda silimarinin bu katkısı belirlenemedi ($p > 0.05$) (Şekil 4.14). Uygulama süresi uzatıldığında (72 saat) silimarinin imatinibin ERK sinyal yolağına etkisine katkı sağladığı belirlendi.

Sonuç olarak çalışmamız insan KML hücre dizisi K562 üzerinde silimarinin imatinib ile birlikte kullanımının *BCR-ABL1*, *GRB2*, *GAB2*, *AKT* ve *ERK* mRNA düzeylerine etkisini RT-PCR yöntemi ile göstermiştir. Elde ettiğimiz verilerin analizi sonucu silimarinin KML'de *BCR-ABL1* modülatör proteinlerinden olan GAB2'yi baskılayarak ERK sinyal yolağında downregülasyon sağladığını tespit ettik (Şekil 5.1). Çalışma amacına uygun olarak silimarinin imatinib ile kombine kullanımının etkilediği sinyal yollarının belirlenmesini sağlamış ve KML tedavisinde rutin

imatinib tedavi protokolüne ek olarak silimarin kullanımının imatinib etkinliğini arttırabileceğini göstermiştir.



Şekil 5.1: Çalışmamız sonucunda imatinib ile silimarin kombinasyonunun ifadenmelerine etki ettiği belirlenen sinyal moleküllerinin şematik gösterimi.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın sonuçlarını değerlendirdiğimizde;

- Silimarinin K562 hücrelerinde imatinibin etkisini GAB2 ve ERK sinyal yolları üzerinden artırdığını
- Kullanılan imatinib dozu azaltıldığında bile silimarinin bu yollar üzerinden imatinib etkisine katkı sağladığını
- Bu katkısı göz önünde bulundurularak silimarinin kombinasyon tedavilerinde dikkate alınması gereken bir ajan olduğu sonucuna ulaştık

Silimarinin kronik myeloid lösemi tedavisindeki katkısının daha detaylı moleküler ve in vivo çalışmalarla aydınlatılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Guyton AC, Hall JE. Blood Cells, Immunity and Blood Clotting. Textbook of Medical Physiology (Guyton AC, Hall JE ed.). Tenth edition: USA, W.B. Saunders Company, p: 382-401, 2000.
2. Naeim F, Nagesh RP, Song SX, Grody WW. Morphology, Immunophenotype, Cytogenetics, and Molecular Approaches. Atlas of Hematopathology. First edition: USA, Elsevier Press, p: 155-165, 2013.
3. Laurent E, Talpaz M, Kantarjian H, Kurzrock R. The BCR gene and Philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer Res.* 61:2343-2355, 2001.
4. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 96(10):3343-3356, 2000.
5. Drummond MW, Holyoake TL. Tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid leukemia: so far so good? *Blood Rev.* 15(2):85-95, 2001.
6. Salesse S, Verfaillie CM. BCR/ABL: from molecular mechanisms of leukemia induction to treatment of chronic myelogenous leukemia. *Oncogene* 21(56):8547-8559, 2002.
7. Afar DE, Goga A, McLaughlin J, Witte ON, Sawyers CL. Differential complementation of Bcr-Abl point mutants with c-Myc. *Science* 264(5157):424-426, 1994.
8. Jiang Y, Zhao RC, Verfaillie CM. Abnormal integrin-mediated regulation of chronic myelogenous leukemia CD34+ cell proliferation: BCR/ABL up-regulates the cyclin-dependent kinase inhibitor, p27Kip, which is relocated to the cell cytoplasm and incapable of regulating cdk2 activity. *Proc Natl Acad Sci.* 97(19):10538-10543, 2000.
9. Puil L, Liu J, Gish G, Mbamalu G, Bowtell D, Pelicci PG, Arlinghaus R, Pawson T. Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. *EMBO J.* 13(4):764-773, 1994.
10. Sawyers CL. Molecular consequences of the BCR-ABL translocation in chronic myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma.* 11 (Suppl. 2):101-103, 1993.
11. Bhatia R, Munthe HA, Verfaillie CM. Role of abnormal integrin-cytoskeletal interactions in impaired beta1 integrin function in chronic myelogenous leukemia hematopoietic progenitors. *Exp Hematol.* 27(9):1384-1396, 1999.
12. Gordon MY, Dowding CR, Riley GR, Goldman JM, Greaves MF. Altered adhesive interactions with marrow stroma of haematopoietic progenitor cells in chronic myeloid leukemia. *Nature* 328(6128):342-344, 1987.
13. Bedi A, Zehnbauser BA, Barber JP, Sharkis SJ, Jones RJ. Inhibition of apoptosis by BCR-ABL in chronic myeloid leukemia. *Blood* 83(8):2038-2044, 1994.
14. Cortez D, Kadlec L, Pendergast AM. Structural and signalling requirements for BCR-ABL mediated transformation and inhibition of apoptosis. *Mol Cell Biol.* 15(10):5531-5541, 1995.
15. Cotter TG. BCR-ABL: an anti-apoptosis gene in chronic myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma* 18(3-4):231-236, 1995.

16. McGahon A, Bissonnette R, Schmitt M, Cotter KM, Green DR, Cptter TG. BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. *Blood* 83(5):1179-1187, 1994.
17. O'hare T, Deininger MWN, Eide C. Targeting the BCR-ABL Signaling Pathway in Therapy-Resistant Philadelphia Chromosome-Positive Leukemia. *Clin Cancer Res.* 17:212-221, 2011.
18. Goldman JM. Initial treatment for patients with CML. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program:* 453-460, 2009.
19. von Bubnoff N, Duyster J. Chronic myelogenous leukemia: treatment and monitoring. *Dtsch Arztebl Int.* 107: 114-21, 2010.
20. RabInowitz I, Larson RS. Chronic Myeloid Leukemia. Wintrobe's Clinical Hematology (Greer JP, Foerster J, Lukens JN, Rodgers GM, Paraskevas F, Glader B ed.) Eleventh Edition: Philadelphia, USA, Lippincott Williams & Wilkins. Vol. 2. 2235-58, 2004.
21. Deininger MW. Milestones and monitoring in patients with CML treated with imatinib. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program:* 419-26, 2008.
22. Hochhaus A, Weisser A, La Rosée P. Detection and quantification of residual disease in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia.* 14: 998–1005, 2000.
23. Jabbour E, Cortes JE, Kantarjian HM. Suboptimal response to or failure of imatinib treatment for chronic myeloid leukemia: what is the optimal strategy? *Mayo Clin Proc.* 84(2): 161-169, 2009.
24. Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, Donato N, Nicoll J, Paquette R, Cortes J, O'Brien S, Nilcaise C, Bleickardt E, Blackwood-Chirchir MA, Iyer V, Chen TT, Huang F, Decillis AP, Sawyers, CL. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med.* 354(24): 2531-41, 2006.
25. Kantarjian H, Giles F, Wunderle L, Bhalla K, O'Brien S, Wassmann B, Tanaka C, Manley P, Rae P, Mietlowski W, Bochinski K, Hochhaus A, Griffin JD, Hoelzer D, Albitar M, Dugan M, Cortes J, Alland L, Ottmann OG. Nilotinib in imatinib resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *N Engl J Med.* 354(24): 2542-51, 2006.
26. NCCN Guidelines version 2.2014 CML, 2014.
27. Cilloni D, Saglio G. Molecular Pathways: BCR-ABL1. *Clin Cancer Res.*18(4):1-8, 2012.
28. Pradhan SC, Girish C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian J Med Res.* 124(5):491-504, 2006.
29. Li L, ZenG J, Gao Y, He D. Targeting silibinin in the antiproliferative pathway. *Expert Opin Investig Drugs.* 19(2): 243-255, 2010.
30. LightCycler® Real-Time PCR System Application manual.
31. Shipley GL. An introduction to real-time PCR. Real Time PCR (Dorak MT, ed) USA, Taylor & Francis Group. p: 1-38, 2006.
32. Ponchel F. Real-time PCR using SYBR® Green. Real Time PCR (Dorak MT, ed) USA, Taylor & Francis Group. p: 139-154, 2006.
33. Volate SR, Davenport DM, Muga SJ, Wargovich MJ. Modulation of aberrant crypt foci and apoptosis by dietary herbal supplements quercetin, curcumin, silymarin, ginseng and rutin. *Carcinogenesis* 26(8): 1450-1456, 2005.

34. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162(1):156-159, 1987.
35. RealTime Ready Catalog Assays. Version 03. Instruction manual content version April 2011.
36. LightCycler® t(9;22) Quantification kit instruction manual.
37. Wen Z, Dumas TE, Schrieber SJ, Hawke RL, Fried MW, Smith PC. Pharmacokinetics and metabolic profile of free, conjugated, and total silymarin flavonolignans in human plasma after oral administration of milk thistle extract. *Drug Metab Dispos* 36:65–72, 2008.
38. Noh E, Yi MS, Lee BK, et al. Silibinin enhances ultraviolet B-induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells. *J Breast Cancer* 14:8-13, 2011.
39. Yurtcu E, İseri O, Sahin F. Genotoxic and cytotoxic effects of doxorubicin and silymarin on human hepatocellular carcinoma cells. *Hum Exp Toxicol.* 2014, <http://dx.doi.org/10.1177/0960327114529453>
40. Harifi R, Pasalar P, Kamalinejad M, et al. The effect of silymarin on human skin fibroblasts in an in vitro wound healing model. *Pharm Biol.* 51(3):298-303, 2013.
41. Sadava D, Kane SE. Silibinin reverses drug resistance in human small-cell lung carcinoma cells. *Cancer Lett.* 339(1):102-106, 2013.
42. Colombo V, Lupi M, Falcetta F, Forestieri D, D’Incalci M, Ubezio P. Chemotherapeutic activity of silymarin combined with doxorubicin or paclitaxel in sensitive and multidrug-resistant colon cancer cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* 67(2):369-379, 2010.
43. Singh RP, Tyagi AK, ZHao J, Agarwal R. Silymarin inhibits growth and causes regression of established skin tumors in SENCAR mice via modulation of mitogen-activated protein kinases and induction of apoptosis. *Carcinogenesis* 23(3):499-510, 2002.
44. Tyagi AK, Agarwal C, Chan DC, Agarwal R. Synergistic anti-cancer effects of silibinin with conventional cytotoxic agents doxorubicin, cisplatin and carboplatin against human breast carcinoma MCF-7 and MDA-MB468 cells. *Oncol Rep.* 11(2):493-499, 2004.
45. Lee SM, Bae JH, Kim MJ, et al. Bcr-Abl-independent imatinib-resistant K562 cells show aberrant protein acetylation and increased sensitivity to histone deacetylase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 322 (3)1084-1092, 2007.
46. An X, Tiwari AK, Sun Y, Ding PR, Ashby CR, Chen ZS. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: a review. *Leuk Res.* 34: 1255–1268, 2010.
47. Oh ST, Gotlib J. JAK2 V617F and beyond: role of genetics and aberrant signaling in the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Expert Rev Hematol.* 3: 323-37, 2010.
48. Sullivan C, Peng C, Chen Y, Li D, Li S. Targeted therapy of chronic myeloid leukemia. *Biochem Pharmacol.* 80: 584–91, 2010.
49. Wöhrle FU, Halbach S, Aumann K, et al. Gab2 signaling in chronic myeloid leukemia cells confers resistance to multiple Bcr-Abl inhibitors. *Leukemia* 27(1):118-129, 2013.

50. Xian Z, Yongliang Z, Qinghua L, et al. Silymarin causes caspases activation and apoptosis in K562 leukemia cells through inactivation of Akt pathway. *Toxicology* 227(3):211-216, 2006.