

EGE ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA
PROJE KESİN RAPORU
EGE UNIVERSITY SCIENTIFIC
RESEARCH PROJECT REPORT

PROJE NO:13-TIP-014

**KRONİK MYELOSİTER LÖSEMİ HÜCRE MODELİ K-562 ÜZERİNDE
SUNİTİNİB'İN SİTOTOKSİK VE APOPTOTİK ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLEREK LÖKOMOGENEZDE ETKİLİ OLABİLECEK GENLERİN
EKSPRESYON PROFİLLERİNİN ÇIKARTILMASI**

PROJE YÖNETİCİSİ

Prof. Dr. Güray SAYDAM

ARASTIRMACI

Uzm. Dr. Melda CÖMERT

Doç.Dr. Filiz VURAL

Doç.Dr.Buket KOSOVA

Doç.Dr. Fahri ŞAHİN

Arş.Grv. Burçin KAYMAZ TEZCANLI

Uzman Dr. Ajda ERSOY GÜNEŞ

Uzman Dr. Asu Fergün YILMAZ

Uzman Dr. Nur AKAD SOYER

Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı

Faculty of Medicine
Department of Hematology

**Bornova-İZMİR
2015**

ÖNSÖZ

Kronik myelositer lösemi (KML), malign hematopoietik pluripotent kök hücrenin klonal proliferasyonu ile karakterizedir. Normal hematopoez, sitokinlerin ve reseptörlerin önemli rol oynadığı bir dizi sinyal yolağına sahiptir. Bu yollarda ortaya çıkabilecek anormallikler, malign transformasyon, azalmış apoptozis ve kontrolsüz proliferasyonla sonuçlanmaktadır. Bu nedenle sinyal ileti sistemleri, lösemi tedavisinde uygun bir hedef haline gelmiştir. JAK/STAT, Raf/MEK/Erk, PI3K/Akt; lökomogenezde rolü olan, hücre siklusu ve apoptozun regülasyonu ile ilişkili sinyal ileti yollarındandır. VEGF ve PDGF sinyal yolları ise malign hücre proliferasyonu ve tümör anjiogenezinde rol alır. Tirozin kinaz aktivitesine sahip bcr-abl füzyon geni, Ras, Raf, PI3K, JNK/SAPK, Crkl ve STAT5 aktivasyonu ile apoptozu inhibe ederek lösemik hücre proliferasyonunu uyarır. Sunitinib VEGF ve PDGF ile indüklenen endotelial hücre proliferasyonu ve anjiogenezi inhibe etmektedir, ancak diğer sinyal yolları üzerindeki etkisi bilinmemektedir.

Çalışmamızda, sunitinib'in KML hücre modeli K-562 üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkisinin JAK-STAT sinyal ileti yolağı elemanları, tümör süpresör genler ve onkogenler, hematopoez ilişkili genler, hücre siklusu ve VEGF yolağı elemanlarının mRNA seviyesindeki ekspresyon değişimleri üzerine etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Çalışmamız boyunca kullandığımız sunitinib'in K-562 hücreleri üzerinde sitotoksik etki oluşturduğu IC₅₀ dozu önce Tripkan mavisi akabinde de WST-1 hücre proliferasyon analizi ile belirlendi ve belirlenen doz uygulandıktan sonra hücrelerin apoptotik durumu "Cell Death Detection kit" ve "Caspase-3 activity assay" ile değerlendirildi. Hedef genlerin ekspresyon seviyeleri sunitinib uygulamasını takiben eş zamanlı olarak qRT-PCR ile saptandı. Protein ekspresyon analizleri 'WesternBreeze Chromogenic Kit-Anti-Rabbit' kitinin uygulama esaslarına dayanarak western blot analizi ile belirlendi. İstatistik analizler GraphPad Prism metodu ile anlamlılık düzeyi p<0.05 kullanılarak değerlendirildi. Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma Projeleri Alt Komisyonuna projemize verdikleri destek nedeniyle teşekkür ederiz.

Projemiz için demirbaş alınmamıştır.

Projemiz; 15-19 Ekim 2014 tarihlerinde gerçekleştirilen V. Uluslararası Avrasya Hematoloji Kongresinde sunulmuřtur.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ **ŞEKİLLER, TABLOLAR VE GRAFİKLER DİZİNİ** **ÖZET**

ABSTRACT

1. GİRİŞ VE AMAÇ

2. LİTERATÜR ÖZETİ

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Sitotoksitenin saptanması ve IC₅₀ dozun belirlenmesi

3.1.1.Hücre dizisi ve ilaçlar

3.1.2. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

3.1.3. Sitotoksitate Çalışmaları

3.1.5.mRNA Seviyesindeki Gen Ekspresyon Profillerinin Çıkartılması: Array çalışması

4. BULGULAR

4.1.Sunitinib K-562 hücrelerinin proliferasyonunu zaman ve doz bağımlı olarak azaltmıştır

4.2.Sunitinib Lösemik Hücrelerin Apoptozunu Orta Derecede Etkilemektedir

4.3.Real-time qRT-PCR ile Gerçekleştirilen Gen Ekspresyon Tetkik Sonuçları

5. TARTIŞMA

6. KAYNAKLAR

ŞEKİL DİZİNİ

| | Sayfa |
|---|--------------|
| Şekil 1 Hücre proliferasyon WST-1 Yöntemi | 16 |
| Şekil 2A Caspase-3 aktivite tetkiki | 17 |
| Şekil 2B Hücre Ölümünün Saptandığı Tetkiki | 17 |
| Şekil 3 Sunitinib tarafından indüklenen diferansiyel gen ekspresyon profillerinin hiyerarşik diyagramı | 21 |

ÇİZELGE VE TABLO DİZİNİ

| | Sayfa |
|---|--------------|
| Tablo 1 Sunitinib ile muamele edilmemiş kontrol grubu ile sunitinib uygulanan hücre grubunun farklı gen ekspresyonu profilleri | 18 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | | |
|----------|---|--|
| ABL | : | Abelson geni |
| AHKHN: | | Allojeneik Hematopoetik Kök Hücre Nakli |
| ALL | : | Akut lenfoblastik lösemi |
| AML | : | Akut myeloid lösemi |
| A-MuLV: | | Abelson Mürin Lösemi Virüsünün |
| Arg | : | Abl ile ilgili gen |
| ATP | : | Adenosin trifosfat |
| BAP-1 | : | Bcr-associated protein-1 |
| BCR | : | Breakpoint cluster region |
| BİM | : | Bcl-1 Interacting medyatörü |
| DSÖ | : | Dünya Sağlık Örgütü |
| ELN | : | European Leukemia Net |
| EPO | : | Eritropoetin |
| ERK | : | Extracelluler signal regulated kinase |
| FDA | : | Food and Drug Administration |
| FISH | : | Fluoresans in situ hibridizasyon |
| G- CSF | : | Granulosit koloni stimule edici faktör |
| G6PDH | : | Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz |
| GAP | : | GTPaz-aktive edici protein |
| GDP | : | Guanidin difosfat |
| GEF | : | Guanidin exchange faktör |
| GH | : | Growth hormon |
| GİST | : | Gastrointestinal Stromal Tümör |
| GM- CSF: | | Granulosit- makrofaj koloni stimule edici faktör |
| GMÖ | : | Granülosit/makrofaj öncülleri |
| GTP | : | Guanidin trifosfat |
| HTERT | : | The human telomerase reverse transcriptase |
| HKH | : | Hematopoetik kök hücreleri |
| IFN | : | İnterferon |
| IL | : | İnterlökin |
| JAK | : | Janus Kinaz |
| KML | : | Kronik myeloid lösemi |

| | | |
|----------|---|--|
| LÖ | : | Lenfoid öncülleri |
| MAPK: | | Mitojen activated protein kinase |
| M-bcr | : | Major breakpoint cluster region |
| m-bcr | : | Minör breakpoint cluster region |
| MEÖ | : | Megakaryosit/eritrosit öncülleri |
| MMY | : | Major moleküler yanıt |
| MRNA: | | Messenger RNA |
| MTOR | : | Mammalian target of rapamycin |
| MY | : | Moleküler yanıt |
| Myc | : | Myelositomatozis |
| MÖ | : | Myeloid öncülleri |
| PDGF | : | Platelet derived growth factor – trombosit kaynaklı büyüme faktörü |
| Ph | : | Philadelphia kromozomu |
| PI3K | : | Fosfatidil Inositol 3 Kinaz |
| PIAS | : | Protein inhibitors of activated STATs- aktive STAT'ların protein inhibitörleri |
| RT- PCR | : | Ters transkriptaz polimerize zincir reaksiyonu |
| RT-Q-PCR | : | Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction |
| SAPK | : | Stres activated protein kinase |
| SFK | : | SRC family of protein tyrosine kinase |
| SOCS | : | Suppresors of cytokin signaling- sitokin sinyalleşme supresörleri |
| STAT | : | Signal Transducers and Activators of Transcription |
| SY | : | Sitogenetik yanıt |
| THY | : | Tam hematolojik yanıt |
| TKI | : | Tirozin Kinaz İnhibitörü |

ÖZET

Kronik Myelositer Lösemi Hücre Modeli K-562 Üzerinde Sunitinib'in Sitotoksik ve Apoptotik Etkilerinin Değerlendirilerek Lökogenezde Etkili Olabilecek Genlerin Ekspresyon Profillerinin Çıkartılması

Kronik Myelositer Lösemi (KML) patolojisinde %90'ın üzerinde Phledelphia (Ph) kromozomu saptanmaktadır. Bu genin neden olduğu bcr/abl proteini yüksek tirozin kinaz aktivitesine sahiptir. KML tedavisi için çeşitli tirozin kinaz inhibitörleri geliştirilmiştir ancak bu ajanlara direnç gelişimi de söz konusudur.

Sunitinib esas olarak renal hücreli karsinom tedavisinde kullanılan bir tirozin kinaz inhibitörüdür. Sunitinib VEGF ve PDGF ile indüklenen endotelial hücre proliferasyonu ve anjiogenezi inhibe etmektedir, ancak diğer sinyal yollarındaki etkisi bilinmemektedir.

Çalışmamızda, sunitinib'in KML hücre modeli K-562 üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkisinin JAK-STAT sinyal ileti yolağı elemanları, tümör süpresör genler ve onkogenler, hematopoez ilişkili genler, hücre siklusu ve VEGF yolağı elemanlarının mRNA seviyesindeki ekspresyon değişimleri üzerine etkisinin araştırılması hedeflenmiştir. Sunitinib'in sitotoksik efektif dozu IC50 değeri tripan mavisi ve WST-1 hücre proliferasyon analizi testi ile belirlendi. Hedef genlerin ekspresyon seviyeleri sunitinib uygulamasını takiben eş zamanlı olarak qRT-PCR ile saptanmıştır. Protein ekspresyon analizleri 'WesternBreeze Chromogenic Kit-Anti-Rabbit' kitin uygulama esaslarına dayanarak western blot analizi ile belirlenmiştir. İstatistik analizler GraphPad Prism metodu ile anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ kullanılarak değerlendirilmiştir. Sunitinib'in IC50 dozu, 48. saat için 34.5 nM olarak belirlenmiştir. Sunitinib muamelesi sonrasında hücrelerin apoptotik durumu "Cell Death Detection kit" ve "Caspase 3 Activity Assay kit" ile belirlendi.

Çalışmamız; sunitinibin, KML tedavisinde onkogenleri inhibe ederek, hücre siklus düzenleyici genler ile birlikte tümör süpresör genlerini aktive ederek teröpatik cevabı artırabilecek yeni bir terapötik ajan olduğunu desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Sunitinib, Kronik Myeloid Lösemi, Apoptoz

ABSTRACT

Investigating The Cytotoxic And Apoptotic Effects Of Sunitinib Upon K-562 Chronic Myelogenous Leukemia Cell Line And Assesment Of Gene Profiling

Phleladelphia (Ph) chromosome is detected over 90% in Chronic Myeloid Leukemia (CML) pathology. bcr / abl protein caused by Ph has a high tyrosine kinase activity. Variety of tyrosine kinase inhibitors for the treatment of CML has been developed but development of resistance to these agents is also included.

Sunitinib is mainly a tyrosine kinase inhibitor used in the treatment of renal cell carcinoma. Sunitinib inhibits endothelial cell proliferation and angiogenesis induced by PDGF and VEGF, but it is effect on other signaling pathways is unknown.

In our study, to investigate the cytotoxic and apoptotic effect of sunitinib in CML cell model K-562 on JAK-STAT signaling pathway components, all suppressor genes and oncogenes, hematopoiesis -related genes, cell cycle and VEGF pathway components, mRNA level expression changes was aimed. Sunitinib effective dose cytotoxic IC50 was determined by trypan blue and WST-1 cell proliferation assay tests. Expression levels of target genes was determined by qRT –PCR simultaneously after sunitinib application. Protein expression analysis was determined by 'WesternBreeze Chromogenic Kit- Anti- Rabbit ' based on the principles of the application kit by western blot analysis. Statistical analysis were performed by GraphPad Prism method with a significance level of $p < 0.05$. Sunitinib IC50 dose was determined as 34.5 nM for 48 hours. Apoptotic state of the cells after Sunitinib treatment was determined by "Cell Death Detection kit" and " Caspase 3 Activity Assay kit".

Over all, our study support that, sunitinib might be used as a novel therapeutic target to trigger apoptosis in chronic myeloid leukemia cells which in turn might accelerate therapeutic response in regard of inhibiting oncogenes and enhancing tumor suppressors in cooperation with cell cycle regulatory genes.

Key Words: Sunitinib, Chronic Myeloid Leukemia, Apoptosis

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kronik miyeloid lösemi (KML) beyaz kan hücrelerinin miktarındaki artış ile karakterize edilen hematolojik bir kanserdir. KML özgül kromozom anomalisi ile tanımlanan ilk kanser tipidir. KML vakalarının %90'ından fazlasında Philadelphia (Ph) kromozomu görülmektedir.[1] KML tüm lösemi türlerinin %20'sini teşkil eder.

Ph kromozomu oluşurken ABL onkogeni 9. kromozom üzerinde bulunan 9q34.1 bölgesinden 22. kromozom üzerindeki 22q11.2 BCR bölgesine aktarılmaktadır [t(9;22)(q34;q11)]. Bu translokasyon sonucunda KML'nin patogenezinde merkezi rol oynadığı düşünülen BCR-ABL füzyon geni oluşur. Yeni gen, artmış tirozin kinaz aktivitesine sahip bir onkoprotein kodlar. BCR-ABL onkoproteini çeşitli hücre içi sinyal iletim yollarını aktive ederek anormal hücrel adhezyona, artmış hücrel proliferasyona ve apoptozisin baskılanmasına yol açar.[2, 3] Bcr/Abl'de Abl kısmının Src-homolog 1 (SH1) bölümü ATP'nin bağlandığı kısım olduğundan malign transformasyonda ana role sahip, öncelikli moleküler hedefdir. Bu hibrid gen, hücrenin kontrolsüz büyümesini ve bölünmesini sağlayan ve apoptozu baskılayan sinyal ileti yollarını aktif hale getiren tirozin kinaz aktivitesine sahip bir proteini kodlar. Diğer kinazlarda olduğu gibi, BCR/ABL ATP'ye bağlanarak fosfat gruplarını birçok sinyal ileti yollarının aktivasyonuna yol açabilecek substratlara taşır. BCR/ABL füzyon proteini tarafından gerçekleştirilen malign transformasyonun 4 temel mekanizması vardır. Bu mekanizmalar, hücrelerin adhezyon özelliklerini kaybetmesi, mitotik bölünmeyi sağlayan sinyal ileti yollarının sürekli aktif tutulması, apoptozun engellenmesi ve proteazomlarca ABL gen aktivitesini engelleyen proteinlerin parçalanmasıdır. BCR/ABL geni tarafından kontrol edilen bu mekanizmalar nedeni ile, BCR/ABL proteini KML'nin tedavisi için ideal bir hedef olarak görülmektedir ve moleküler hedefli antikanser ajan geliştirme çalışmaları hız kazanmıştır. Sinyal ileti yollarının büyük bir bölümünü, diğer bir proteini fosforile eden (kinaz) ya da proteindeki fosfor gruplarından birini çıkararak (fosfataz) enzimler oluşturur. Tirozin kinazlar (TKlar) ise tirozinleri fosforilize ederler. Nitekim BCR/ABL'in kronik myeloid lösemiye yol açan en önemli özelliği süreklilik gösteren yüksek tirozin kinaz aktivitesidir. Bu bilgiler ışığında tirozin kinaz aktivitesini engelleyen ve klinikte uzun süredir kullanılan imatinib mesilat (STI571), dasatinib ve nilotinib geliştirilmiştir.[4]

Bu ajanlar BCR/ABL proteini üzerinde yer alan ATP bağlanma bölgesine bağlanır ve proteinin substratlarını fosforlamasını engeller. İmatinib kronik ve

hızlandırılmış fazlardaki hastalarda oldukça olumlu sonuçlar vermiş ancak blastik kriz fazındaki hastalarda ve tedavinin ilerleyen dönemlerinde dirençlilik gelişmesi dolayısı ile önemli problemler yaşanmıştır. Nilotinib ve dasatinib, imatinib direncinin daha net anlaşılmasıyla geliştirilmiş ve daha toksik etkili yeni tirozin kinaz inhibitörleri molekülüdür. BCR/ABL füzyon proteinine hedeflenebilen bu ilaçlar daha önce uygulanan ilaçlara direnç geliştirmiş Ph (+) KML ve akut lenfoblastik lösemi tedavisinde kullanılabilir. Ancak tedavinin başında veya ilerleyen dönemlerinde bu ilaçlara karşı direnç gelişmektedir. Bu durum etkili tedavinin önündeki en büyük problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle, hedefe odaklı bu ajanların tanıyıp bağlandığı BCR/ABL onkogeninin ATP bağlanma bölgesindeki mutasyonlar, ajanların bağlanma ve onkogeni inhibe etme yetilerini anlamlı ve önemli derecede düşürebilmektedirler. Öte yandan, BCR/ABL onkogeninin KML hastalarında ve KML’li hücrelerde aşırı ifadesi de direncin bir diğer temel ve önemli nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Daha yüksek miktarlardaki BCR/ABL proteininin inhibe edilmesi amacı ile daha yüksek dozlarda ilacın uygulanması klinikte “maksimum tolere edilebilir doz” engeli dolayısı ile mümkün olamamaktadır. Dolayısı ile direnç probleminin aşılması amacı ile onkogenin ekspresyon ve transkripsiyonunun kontrol edilmesi temel bir çözümü olarak görülebilir.

Sunitinib çok hedefli, oral bir tirozin kinaz inhibitörüdür. Tip 1 ve tip 2 vasküler endotelial büyüme faktör reseptörleri (VEGFRs), platelet-derived büyüme faktör reseptörleri alfa ve beta (PDGFR-alfa ve PDGFR-beta), kök hücre faktör reseptörü c-KIT, koloni-stimulan faktör 1 (CSF-1), fms-related tirozin kinaz 3 (FLT3), ve RET kinaz gibi antianjiyogenik reseptörlerin fosforilasyonunu inhibe eder. Sunitinibin kolon kanseri, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, melanoma, renal hücreli kanser ve yassı hücreli kanserde yapılan prelinik çalışmalarda tumor büyümesini inhibe ettiği ve tumor regresyonu sağladığı gösterilmiştir. [5] Böylece sunitinib metastatik renal hücreli karsinom ve imatinib-dirençli metastatik gastrointestinal stromal tümörün (GISTs) birinci basamak tedavisi için onay almıştır.[6] Sunitinibin bu iki hastalık üzerindeki etkinliği ve tolerabilitesine dayanarak, bu *in vitro* olarak gerçekleştirilecek hücre kültürü çalışmasında, sunitinib’in KML hücre modeli K-562 üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkisinin JAK-STAT sinyal ileti yolağı elemanları, tumor süpresör genler ve onkogenler, hematopoez ilişkili genler, hücre siklusu ve VEGF yolağı elemanlarının mRNA seviyesindeki ekspresyon değişimleri üzerine etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

2. Literatür Özeti

KML, Ph kromozomuna bağlı gelişen kontrolsüz tirozin kinaz aktivitesi ile karakterize kronik myeloproliferatif bir hastalıktır. Vakaların %95'inde t(9,22)'den oluşan BCR-ABL füzyon gen ürünü lökomogeneziste merkezi rol oynayan kontrolsüz tirozin kinaz aktivitesine neden olur.[3] Tirozin kinaza karşı geliştirilen inhibitör ajanlar, KML tedavisinde bir dönüm noktası olmuştur. İnhibitörlerden İmatinib mesilat KML tedavisinde devrim niteliğinde bir tedavi ajanı olmasına rağmen, ilaca karşı gelişen direnç önemli bir sorun oluşturur. Bu direnci yenmek için ikinci kuşak tirozin kinaz inhibitörleri (TKI) geliştirilmiştir. Ancak ikinci kuşak TKI'lara da direnç gösteren mutasyonlar bulunmaktadır.

Sinclair ve ark. tarafından 2013 te yayınlanan review de TKI'ların proliferan olan matür hücreleri etkilerken, lösemik kök hücreleri eradike edememektedir, bu nedenle tedavi devamına rağmen hastalık persiste etmektedir. Lösemik kök hücreleri etkileyecek alternatif yollar bulmak mutlaka gereklidir. BCR/ABL aktivitesi farklı sinyal yollarının düzenlenmesinden sorumludur. Bu yollar PI3K/AKT/MTOR, JAK-STAT ve otofaji sinyal yollarıdır. LSC hedefleyen terapötik çalışmalarda bu yolların kendisi ve TKI ile kombinasyonu çekici hedefler olarak gösterilmişlerdir.[7]

JAK-STAT yolağı sitokin ve büyüme faktörlerinin extrasellüler sinyal transdüksiyonunda rol oynarlar, bu sitokin ve büyüme faktörleri hematopoez, immun regülasyon, fertilité, laktasyon, büyüme ve embriyogenezde rol oynarlar. JAK ailesi JAK1-3 VE TYK 2 olmak üzere 4 sitoplazmik tirozin kinaz içerir. İnsan hücrelerinde 7 STAT proteini tanımlanmıştır; STAT 1-6, STAT5a ve 5b'yi içerir.[8]

Pozitif feedback yolağında, IFN, ISGF3'ü (interferon stimulated gene factor 3) uyararak genleri aktive eder. JAK-STAT yolağını aktive eden birçok sitokin, örneğin IL6, IL4, LIF, G-CSF, aynı zamanda SOCS-JABs-SSIs vb. STAT yolağı inhibitörlerini artırır.[9] JAK-STAT yolağının negatif regülatörleri tirozin fosfatazlar (SHP 1 VE 2, CD45), PIAS (protein inhibitors of activated STATs), SOCS (supressor of sitokin signaling) proteinleri ve CIS (cytokin inducible SH2-containing protein) dir. JAK-STAT yolağının disregülasyonu hematolojik malignitelerde anahtar rol üstlenmektedir.[8]

Sunitinib esas olarak renal hücreli karsinom ve GİST tedavisinde kullanılan oral bir tirozin kinaz inhibitörüdür. VEGF üzerindeki etkisi bilinmesine rağmen diğer sinyal ileti yollarındaki etkisi tam olarak bilinmemektedir.[5-6] KML hücre hattında yapılmış

Çalışma bulunmamaktadır. Bu *in vitro* olarak gerçekleştirilecek hücre kültürü çalışmasında, sunitinib'in KML hücre modeli K-562 zerindeki sitotoksik ve apoptotik etkisinin JAK-STAT sinyal ileti yolağı elemanları, tmor süpresör genler ve onkogenler, hematopoez ilişkili genler, hücre siklusu ve VEGF yolağı elemanlarının mRNA seviyesindeki ekspresyon değişimleri üzerine etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

3. Materyal ve Yöntem

Materyal

Kronik myeloid lösemi hücre dizisi K-562 [(*Human Caucasian Chronic Myelogenous Leukemia*) – ECACC (*European Collection of Cell Cultures*), *Morphology: Lymphoblast*, *Katalog no: 89121407*, *Lot no: 06/A/015*)] ticari olarak temin edilecektir.

Aптоtozun erken ve geç basamağındaki hücre sel yanıtın kantitatif olarak belirlenmesi için, “Caspase-3” ve “Cell Death Detection” kitleri kullanılacaktır.

Çalışmanın apoptoz analizi basamağında, sunitinibin IC₅₀ dozu ile muamele edilen hücrelerle kontrol grubu hücreler kullanılacaktır.

IC₅₀ dozunda sunitinib ile muamele edilmiş hücreler ve kontrol grubu hücrelerde hedef genlerin mRNA düzeyindeki transkripsiyon değişimi “*Kantitatif Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR)*” ile hedef genlere primer/Taqman prob setlerinin array plağına gömülü olduğu deney setleri kullanılacaktır. qRT-PCR, gerçek zamanlı PCR cihazı ABI 7500 Fast ile gerçekleştirilecektir.

Yöntem:

3.1. Sitotoksitenin saptanması ve IC₅₀ dozun belirlenmesi

3.1.1. Hücre dizisi ve ilaçlar

Hücre dizisi K-562, RPMI-1640 besi yeri kullanılarak, standart şartlarda (37°C’ de ve %95 nem, %5 CO₂’ li inkübatörde) çoğaltılacak ve deneyler için kullanılacaktır. Planlanan çalışma, *in vitro* olarak gerçekleştirilecek hücre kültürü çalışmasıdır.

3.1.2. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi

Hücre canlılığının değerlendirilmesi tripan mavisi kullanılarak yapılacaktır.

3.1.3. Sitotoksite Çalışmaları

Deney düzenekleri, 96 kuyucuklu mikropalakalara ekilen ilaçla muamele edilmiş/edilmemiş hücrelerle kurulacaktır (50.000 hücre/100 µl). Her ölçüm günü için [ilaçla muamele edilmemiş kontrol grubu, 24 – 48 – 72 saat süreyle sunitinibin artan dozlarıyla muamele edilmiş hücreler) için ayrı bir mikropalaka hazırlanacaktır. Sunitinib

ile sitotoksitenin değerlendirilmesi ve IC₅₀ dozunun saptanması, WST-1 kiti ile ELISA cihazında okutulurken, absorbanların kıyaslanmasına göre spektrofotometrik olarak belirlenecektir.

3.1.4. Apoptoz Çalışmaları

IC₅₀ sunitinib dozu ile muamele edilmiş hücreler ile kontrol grubu hücrelerden pelletler elde edilecek ve “Caspase-3” ile “Cell Death Detection Kit” manuellere göre erken ve geç dönemdeki apoptoz, spektrofotometrik olarak ELISA cihazında okutulurken belirlenecektir.

3.1.5. mRNA Seviyesindeki Gen Ekspresyon Profillerinin Çıkarılması: Array çalışması

IC₅₀ sunitinib dozu ile muamele edilmiş hücreler ile kontrol grubu hücrelerden total RNA (“Compact RNA Isolation Kit” ile) izolasyonu sonrasında, cDNA çevrimi gerçekleştirilecek “High Fidelity First Strand cDNA Synthesis Kit” ve gerçek zamanlı PCR cihazı ABI 7500 Fast kullanılarak qPCR yöntemiyle hedef genlerin mRNA rölatif gen ekspresyonları belirlenecektir. ekspresyon değişimi belirlenecek genlere ait liste aşağıda verilmektedir:

| |
|---|
| Lösemi |
| JAK-STAT Sinyal İletim Yolağına Ait Seçilmiş Genler: AKT1, CSF3, IFNA1, IL4, IL6, JAK2, STAT1, STAT3, STAT5A, STAT5B, SOCS1. |
| Lösemi ilişkili Teröpotik Hedef Genler: AKT1, ALOX5, BCL2, CTNNB1, FGR, FOXO3, HCK, HDAC1, HSP90AA1, IFNA1, JAK2, MCL1, MERTK, MTOR, PML, PRKCB, RAC2, SMO. |
| Onkogenler ve Tümör Süpresör Genler |
| Onkogenler: BAX, BCL2L1, CASP8, CDK4, ELK1, ETS1, HGF, JAK2, JUNB, JUND, KIT, KITLG, MCL1, MET, MOS, MYB, NFKBIA, NRAS, PIK3CA, PML, PRKCA, RAF1, RARA, REL, ROS1, RUNX1, SRC, STAT3, ZHX2. |
| Tümör Süpresör Genler: ATM, BRCA1, BRCA2, CDH1, CDKN2B, CDKN3, E2F1, FHIT, FOXD3, HIC1, IGF2R, MEN1, MGMT, MLH1, NF1, NF2, RASSF1, RUNX3, S100A4, SERPINB5, SMAD4, STK11, TP73, TSC1, VHL, WT1, WWOX, XRCC1. |
| |

Apoptoz İlişkili Genler: BAX, BCL2, BCL2L1, BRCA1, CASP8, E2F1, MCL1, MGMT, TNF, VHL, BAD

Hücre Siklusu İlişkili Genler: ATM, BRCA1, BRCA2, CCND1, CDK4, CDKN1A, CDKN2A, CDKN2B, CDKN3, E2F1, HGF, MEN1, STK11, TP53.

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Sinyalizasyonu İlişkili Genler

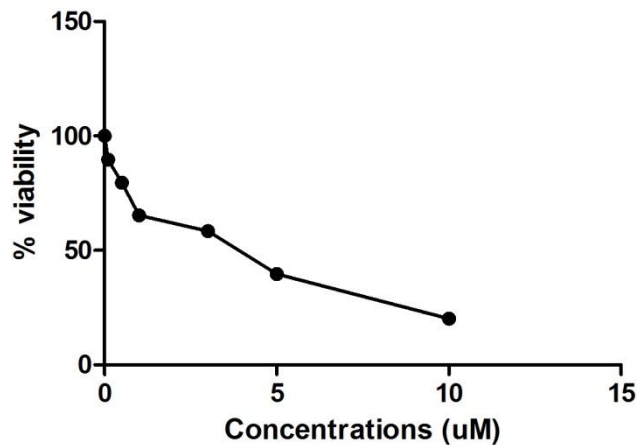
Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü ve diğer Bazı Büyüme Faktörleri ve Reseptörleri: FIGF, FLT1, FLT4, KDR, NRP1, NRP2, PDGFC, PGF, VEGFA, VEGFB, VEGFC.

6. İstatistik: Tüm sonuçlara ait istatistiksel analizler, Student T testi kullanılarak, “GraphPad Prism ver:6” yazılım programıyla yapılacaktır.

4. Bulgular

4.1.Sunitinib K-562 hücrelerinin proliferasyonunu zaman ve doz bağımlı olarak azaltmıştır

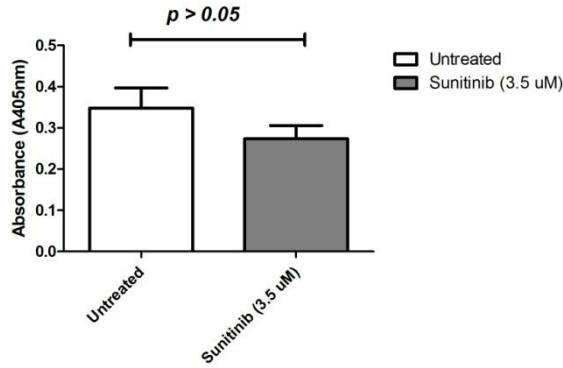
Sunitinib tedavisi ile K-562 hücrelerinde gözlenen sitotoksiste WST-1 hücre proliferasyon yöntemi ile tespit edilmiştir ve saptanan veriler sunitinibin doz ve süreye bağlı olarak hücre proliferasyonunu azalttığını göstermiştir. Sunitinib inhibisyon eğrisine göre, K-562 hücrelerinde IC₅₀ dozu sunitinib tedavisinin 48. saati için 3.5 µM olarak saptanmıştır. (Şekil 1).



Şekil 1: Hücre proliferasyon WST-1 Yöntemi: IC₅₀ değeri Sunitinib tedavisinin 48. saati için 3.5 µM olarak saptanmıştır.

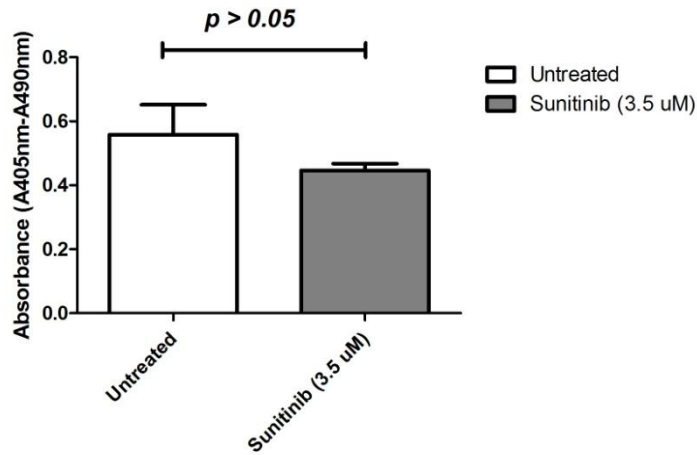
4.2.Sunitinib Lösemik Hücrelerin Apoptozunu Orta Derecede Etkilemektedir

Genellikle apoptosis tetkikleri sunitinibin tedavi edilmeyen hücelere göre lösemik hüceler üzerinde orta derecede bir etkisi olduğunu göstermektedir. Caspase-3 aktivite tetkiki ile elde edilen absorbans seviyesi sonuçları sunitinib uygulanan K-562 hücelerinde aktivitesinin %21.37 artmış olduğunu göstermiştir. Bu da apoptotic aktivitede 1.271 katlık bir artış olarak karşımıza çıkmaktadır. ($p=0.067$, Şekil 2A).



Şekil 2A: Caspase-3 aktivite tetkiki: 1.271 katlık apoptozis indüksiyonu sunitinib tedavisi sonrasında saptanmıştır.

Hücre ölümü analiz sonuçlarına göre absorbans düzeyleri, tedavi uygulanmamış hücelere göre sunitinib uygulanmış hücelerde %20.06 apoptozis indüksiyonu olduğunu göstermiştir. Bu sonuç apoptozis oranında 1.251 kat artış şeklinde hesaplanmaktadır. ($p=0.062$, Şekil 2B). Bu sonuçlar, sunitinibin lösemik hüceler üzerinde orta derecede apoptotik etkisi olduğunu göstermektedir.



Şekil 2B: Hücre Ölümünün Saptandığı Tetkik: Sunitinib tedavisi sonrası 1.251 kat apoptoz artışı saptanmıştır.

4.3.Real-time qRT-PCR ile Gerçekleştirilen Gen Ekspresyon Tetkik Sonuçları

Gen ekspresyon analiz çalışmalarında, sunitinib tedavisine bağlı olarak, bazı sinyal yollarını regüle eden ve hücresel süreçlerde önemli rol oynayan birtakım genlerde transkripsiyonel farklılıklar saptandı. Bu sinyal yolları VEGF ve JAK/STAT sinyal yollarıdır. Hücresel süreçleri ve cevapları etkileyenler ise apoptoz, hücre siklusu regulator genleri, tümör supresör genler ve onkogenlerdir. Sunitinib tedavisine bağlı değişik ekspresyon profilleri tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1: Sunitinib ile muamele edilmemiş kontrol grubu ile sunitinib uygulanan hücre grubunun farklı gen ekspresyonu profilleri

| | Gen sembolü | katsayı | <i>p</i> değeri |
|----------------------------------|---------------|--------------|-----------------|
| VEGF sinyal genleri | <i>FLT4</i> | 1,77 | <i>0,01</i> |
| | <i>FLT1</i> | -1,01 | <i>0,98</i> |
| | <i>VEGFA</i> | -1,04 | <i>0,73</i> |
| | <i>VEGFB</i> | -1,29 | <i>0,04</i> |
| | <i>KDR</i> | -1,30 | <i>0,21</i> |
| | <i>VEGFC</i> | -1,31 | <i>0,07</i> |
| | <i>PGF</i> | -1,60 | <i>0,02</i> |
| Apoptoz ilişkili genler | <i>BCL2</i> | 1.04 | <i>0,96</i> |
| | <i>E2F1</i> | 1.01 | <i>0,88</i> |
| | <i>CASP8</i> | 1.01 | <i>0,98</i> |
| | <i>BAD</i> | -1.56 | <i>0,46</i> |
| | <i>BAX</i> | -1.47 | <i>0,05</i> |
| | <i>BCL2L1</i> | -1.28 | <i>0,25</i> |
| Tümör supresörler | <i>NF1</i> | <i>2.65</i> | <i>0,05</i> |
| | <i>RUNX3</i> | 1.58 | <i>0,16</i> |
| | <i>SMAD4</i> | 1.03 | <i>0,91</i> |
| Onkogenler | <i>RAF1</i> | -1.13 | <i>0,30</i> |
| | <i>NFKBIA</i> | -1.29 | <i>0,18</i> |
| | <i>JUNB</i> | -1.31 | <i>0,10</i> |
| | <i>NRAS</i> | -1.61 | <i>0,01</i> |
| | <i>PIK3CA</i> | -1.98 | <i>0,02</i> |
| | <i>JUND</i> | <i>-2.78</i> | <i>0,04</i> |
| JAK/STAT yolak elemanları | <i>JAK2</i> | 1.08 | <i>0,71</i> |
| | <i>STAT1</i> | 1.12 | <i>0,58</i> |

| | | | |
|--|---------------|-------|------|
| | <i>STAT3</i> | 1.18 | 0,27 |
| | <i>STAT5A</i> | 2.05 | 0,06 |
| | <i>IL6</i> | -1.23 | 0,31 |
| | <i>STAT5B</i> | -1.44 | 0,3 |
| | <i>SOCS1</i> | -2.07 | 0,06 |
| Hücre siklusu regulator genleri | <i>CDKN1A</i> | -1.4 | 0,17 |
| | <i>CDKN2A</i> | -1.4 | 0,47 |
| | <i>CDK4</i> | 1.08 | 0,64 |
| | <i>CDKN2B</i> | 1.86 | 0,11 |
| | <i>CDKN3</i> | 2.06 | 0,06 |

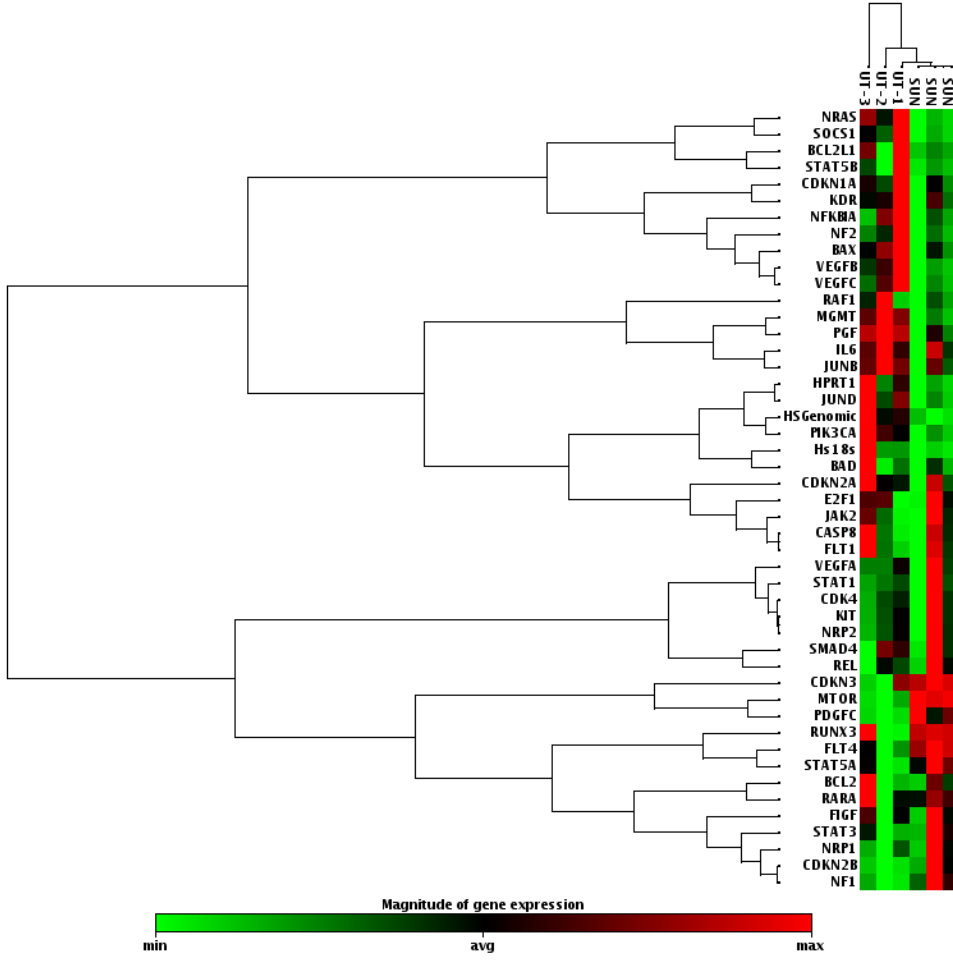
Sunitinib tedavisi uygulanan hücreler ve kontrol hücreler karşılaştırıldığında başlangıç olarak VEGF sinyalini regüle eden VEGFA, VEGFB ve VEGFC nin sırasıyla, -1.01, -1.29 ve -1.31 kat azaldığı (downregülasyon) saptanmıştır ancak sadece VEGFB supresyonu anlamlı düzeydeydi ($p=0,04$). Bunun yanısıra FL4 geni 1.77 kat artış gösterirken (upregülasyon) ($p=0,01$), FLT1; -1.04, KDR; 1.30 ve PGF; -1.60 kat azalmıştı ($p=0,02$). Genel olarak FLT4 hariç, VEGF sinyalizasyonunda beklendiği üzere sunitinib tedavisine bağlı olarak bir hasar oluştuğu gözlenmiştir.

İkincil olarak, KML’de lökomogenez indüksiyon etkisi olan bazı JAK/STAT yolak elemanları analiz edildi. Bu sonuçlara bakıldığında bir non-receptor tirozinkinaz olan JAK2’nin 1.08 kat arttığı, sitokin IL-6 ekspresyonunun -1.23 kat azaldığı saptandı, ancak her ikisi de istatistiksel olarak anlamsızdı ($p>0,05$). Ayrıca Signal Transducers and Activators of Transcription – STAT ailesine ait transkripsiyon faktörleri, STAT1, STAT3, STAT5A ve -5B de değerlendirildi. Bir pro-apoptotik gen olan STAT1 1.12 kat artarken, paralog geni STAT5B -1.44 kat azalmış saptandı; her ikisi için de istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç değildir ($p>0,05$). Fakat kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; güçlü bir onkogen olan STAT3 1.18 kat ve hemato-onkolojik olarak aktif STAT5A 2.05 kat artmış saptandı. Bunların yanısıra, SOCS1 (suppressor of cytokine signaling 1) ekspresyonu -2.07 kat azalmış saptandı, $p=0,06$.

Sonrasında, hücre siklus regulator genlerini çalışılmaya başlandı ve cyclin-dependent kinaz inhibitörleri CDKN1A ve CDKN2A ekspresyonunda azalma olduğu saptandı. Bu düşüş ikisi için de -1.4 kattı ve istatistiksel olarak anlamsızdı. Bunun yanısıra, onkojenik aktivite gösteren Cyclin-dependent kinaz-CDK4 ekspresyonunun arttığı saptandı. CDKN3’in birçok kanser türünde overeksprese olduğu bilinmektedir ve bizim çalışmamızda da 2.06 kat fazla eksprese olduğu saptandı ($p>0,05$). Hücre siklus regülasyon genlerinden sadece tumor supresör geni olarak fonksiyon gören CDKN2B’in 1.86 kat fazla eksprese olduğu saptandı.

Bu sonuçlar KML hücrelerinin sunitinib ile muamele edilmesinden sonra hücre siklus regulator genlerinde ekspresyonel bir disregülasyon olduğunu göstermektedir. Değerlendirdiğimiz tumor süpresör genlerinden, NF1 (neurofibromin 1) ekspresyonu anlamlı ölçüde upregüle olurken (2.65 kat [$p=0,05$]); Runt-related transcription factor-RUNX3 ve SMAD4 ekspresyonlarının da sunitinib tedavisi sonrası sırasıyla 1.58 and 1.03 kat arttığı ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır ($p>0,05$). Bunların yanısıra, sunitinib tedavisi sonrası transkripsiyonel paternleri değişen onkogenleri de saptadık ve bazı sonuçlar umut vericiydi. Özellikle NRAS, PIK3CA ve JUND onkogenleri kendi mRNA ekspresyonlarında sırasıyla -1.61, -1.98 ve -2.75 kat inhibisyon gösterdiler. Ayrıca diğer onkogenlerde de orta düzeyde downregülasyon saptandı. RAF1'de -1.13 kat, NFKBIA'de -1.29 kat ve JUNB'de -1.31 kat azalma saptandı ancak hiçbiri istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$).

Son olarak bazı apoptoz ilişkili genlerin ekspresyon profilleri incelendi ve sunitinibin neden K-562 hücrelerinde caspase-3 and cell death saptama yöntemleri kullanılarak çalışmanın erken aşamalarında apoptozu düşük düzeyde inhibe ettiğinin mekanizması açıklanmaya çalışıldı. mRNA sonuçlarına göre, anti-apoptotik gen BCL2 ekspresyonu 1.04 kat artarken, pro-apoptotik veya apoptoz indükleyici genler BAD ve BAX ekspresyonları sırasıyla -1.56 ve -1.47 kat, downregüle olmuştur ($p>0,05$). Bu sonuç apoptoz indüksiyonunun apoptoz saptama yöntemimizde neden bu kadar düşük olduğunu açıklamaktadır.



Şekil 3: Sunitinib tarafından indüklenen diferansiyel gen ekspresyon profillerinin hiyerarşik diyagramı

5.Tartışma

Genel anlamda sunitinib tedavisinin JAK2, STAT3 ve STAT5A ekspresyonunda artış ve SOCS1 ekspresyonunda azalma sağlaması nedeni ile JAK/STAT sinyal yolağını çok etkili şekilde inhibe edemediği saptandı. Fakat STAT1 upregülasyonu ve STAT5B downregülasyonu umut vaat eden sonuçlardır.

Onkojenik aktivite gösteren Cyclin-dependent kinaz-CDK4 ekspresyonun arttığı saptandı. CDKN3'ün birçok kanser türünde overeksprese olduğu bilinmektedir ve bizim çalışmamızda da 2.06 kat fazla eksprese olduğu saptandı ($p>0,05$). Hücre siklus regülasyon genlerinden sadece tumor supresör geni olarak fonksiyon gösteren CDKN2B'in 1.86 kat fazla eksprese olduğu saptandı. Bu sonuçlar KML hücrelerinin sunitinib ile muamele edilmesinden sonar hücre siklus regülasyon genlerinde ekspresyonel bir disregülasyon olduğunu göstermektedir.

Bunların yanısıra, sunitinib tedavisi sonrası transkripsiyonel paternleri değişen bazı onkogenler de saptandı ve sonuçlar umut vericiydi. Özellikle NRAS, PIK3CA ve JUND onkogenleri kendi mRNA ekspresyonlarında sırasıyla -1.61, -1.98 ve -2.75 kat inhibisyon gösterdiler. Ayrıca diğer onkogenlerde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da RAF1'de -1.13 kat, NFKBIA'de -1.29 kat ve JUNB'de -1.31 kat azalma saptandı.

mRNA sonuçlarına göre, anti-apoptotik gen BCL2 ekspresyonu 1.04 kat artarken, pro-apoptotik veya apoptoz indükleyici genler BAD ve BAX ekspresyonları sırasıyla -1.56 ve -1.47 kat, downregüle olmuştur ($p>0,05$). Bu sonuç apoptoz indüksiyonunun apoptoz saptama yöntemimizde neden bu kadar düşük olduğunu açıklamaktadır.

Çalışmamız; sunitinibin, KML tedavisinde onkogenleri inhibe ederek, hücre siklus düzenleyici genler ile birlikte tümör supresör genlerini aktive ederek terapötik cevabı artırabilecek yeni bir terapötik ajan olduğunu desteklemektedir.

6. Referanslar

1. Rowley J. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973; 43: 290-293.
2. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*. 1960;132:1497.
3. Kurzrock R, Gutterman JU, Talpaz M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 1988. 319: 990-998.
4. Gora-Tybor J, Robak T. Targeted drugs in chronic myeloid leukemia. *Curr Med Chem* 2008; 15: 3036-3051.
5. Chow Laura QM, Eckhardt SG: Sunitinib: from rational design to clinical efficacy. *J Clin Oncol* 2007, 25(7): 884–896.
6. Ansari Z, George MK. Drug-induced immune-mediated thrombocytopenia secondary to sunitinib in a patient with metastatic renal cell carcinoma: a case report. *J Med Case Rep*. 2013; 26;7(1):54, Nishida T. Imatinib. Sunitinib. *Gan To Kagaku Ryoho* 2007; 34(8): 1196-1200)
7. Sinclair A, Latif AL, Holyoake TL. Targeting survival pathways in chronic myeloid leukaemia stem cells. *Br J Pharmacol*. 2013 Aug;169(8):1693-707. doi: 10.1111/bph.12183.
8. Furqan M, Mukhi N, Lee B, Liu D. Dysregulation of JAK-STAT pathway in hematological malignancies and JAK inhibitors for clinical application. *Biomark Res*. 2013 Jan 16;1(1):5.
9. Clinic manifestations and diagnosis of chronic myeloid leukemia (Last updated September 2010) , Author: Richard A Van Etten, MD, PhD, Section Editor: Richard A Larson, MD, Deputy Editor: Rebecca F Connor, MD, www.uptodate.com