

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

PROJE NO: 13-TIP-015
KRONİK MYELOSİTER LÖSEMİ HÜCRE MODELİ K-562
ÜZERİNDE PAZOPANİB'İN SİTOTOKSİK VE
APOPTOTİK ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLEREK
LÖKOMOGENEZDE ETKİLİ OLABİLECEK GENLERİN
EKSPRESYON PROFİLLERİNİN ÇIKARTILMASI

PROJE YÖNETİCİSİ

Prof. Dr. Güray SAYDAM

ARAŞTIRMACI

Doç.Dr. Filiz VURAL

Doç.Dr.Buket KOSOVA

Doç.Dr. Fahri ŞAHİN

Arş.Grv. Burçin KAYMAZ TEZCANLI

Uzman Dr. Nur AKAD SOYER

Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı

Faculty of Medicine
Department of Hematology

Bornova-İZMİR
2015

3- Teşekkür veya Önsöz Bölümü

Ege Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma Projeleri Alt Komisyonuna projemize verdikleri destek nedeniyle teşekkür ederiz.

Prof. Dr. Güray SAYDAM

Proje Yöneticisi

Projemiz için demirbaş alınmamıştır.

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

İçindekiler

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini.....	III
Şekiller Dizini	V
Çizelge ve Tablo Dizini	VI
Özet.....	1
Abstract.....	3
1. Giriş ve Amaç	5
2. Literatür Özeti	5
2.2. KML Moleküler Patogenezi	7
2.2.1. BCR-ABL proteini yapısı ve fonksiyonu	7
2.2.2. BCR-ABL'nin Etkileştiği Sinyal Yolakları.....	9
2.3. Pazopanib.....	11
3. Materyal ve Yöntem.....	11
3.1. Sitotoksitenin saptanması ve IC ₅₀ dozun belirlenmesi.....	12
3.1.1. Hücre dizisi ve ilaçlar	12
3.1.2. Hücre Canlılığının Değerlendirilmesi.....	12
3.1.3. Sitotoksosite Çalışmaları	12
3.1.4. Apoptoz Çalışmaları	13
3.1.5. mRNA Seviyesindeki Gen Ekspresyon Profillerinin Çıkartılması: Array çalışması	13
4. Bulgular.....	14
4.1. Pazopanib K-562 hücrelerinin proliferasyonunu zaman ve doz bağımlı olarak azaltmıştır	14
4.2. Pazopanib Lösemik Hücrelerin Apoptozunu Etkilemektedir	15
4.3. Real-time qRT-PCR ile Gerçekleştirilen Gen Ekspresyon Tetkik Sonuçları.....	15

5. Tartışma.....	20
6. Referanslar	21

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini

ABL	: Abelson geni
AHKHN	: Allojeneik Hematopoetik Kök Hücre Nakli
ALL	: Akut lenfoblastik lösemi
AML	: Akut myeloid lösemi
A-MuLV	: Abelson Mrin 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 rgt
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
GM	: Granlosit/makrofaj nclleri
GTP	: Guanidin trifosfat
HTERT	: The human telomerase reverse transcriptase
HKH	:Hematopoetik kk hücreleri
IFN	: İnterferon
IL	: İnterlkin

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	: Suppressors of cytokin signaling- sitokin sinyalleşme supresörleri
STAT	: Signal Transducers and Activators of Transcription
SY	: Sitogenetik yanıt
THY	: Tam hematolojik yanıt
TKI	: Tirozin Kinaz İnhibitörü

Şekiller Dizini

Şekil 1. Philadelphia Kromozomu.....	7
Şekil 2. G bantlama ile elde edilmiş karyotip görüntüsünde Ph kromozomu ⁽¹⁴⁾	8
Şekil 3. BCR-ABL1 Sinyal Yolakları.....	9
Şekil 4. Pazopanib Moleküler Yapısı.	11
Şekil 5. Hücre proliferasyon WST-1 Yöntemi.	14
Şekil 6. Pazopanib ile apoptozun induksiyonunda artış görülmüştür.	15
Şekil 7. Pazopanib ile kaspaz-3 aktivitesi deneyinde apoptozda artış saptandı.....	15
Şekil 8. Pazopanib tarafından indüklenen diferansiyel gen ekspresyon profillerinin hiyerarşik diyagramı.	19

Çizelge ve Tablo Dizini

Tablo 1. Pazopanib tedavisine bağlı değişik ekspresyon profilleri	16
---	----

Özet

Kronik myelositer lösemi (KML) vakalarının %90'ından fazlasında resiprokal bir translokasyon t(9;22) sonucu ortaya çıkan Philadelphia (Ph) kromozomu ile karakterize klonal myeloproliferatif hastalıktır. KML 'de maligniteyi oluşturan BCR-ABL hibrid onkogenin yüksek tirozin kinaz aktivitesi vardır. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), lösemi gelişiminde potansiyel bir role sahiptir ve VEGF inhibisyonu yeni umut vadeden tedavi yaklaşımıdır. VEGFR hedefleyen multi-target bir tirozin kinaz reseptör inhibitörü olan pazopanib, güvenli ve etkin bir ajandır. KLL'de etkinliği olduğu ileri sürülen pazopanibin KML'deki etkinliği henüz bilinmemektedir.

Bu çalışmanın amacı K-562 KML hücre modelinde pazopanibin potansiyel apoptotik ve sitotoksik etkilerinin değerlendirilmesi ve aynı zamanda pazopanib tedavisi sonrası yeni aday genlerin saptanmasıdır. Hücre proliferasyon analizi WST-1 ile değerlendirildi, apoptoz analizi ise "cell death detection kit" and "caspase-3 activity assay" kiti ile elele gerçekleştirildi. Son olarak, hücre döngüsü düzenleyici genler, apoptoz yolu genler, sitokinler, sinyal transdüksiyonu kaskadı ve VEGF sinyali ile ilişkili genlerin (toplam 48 gen, kontroller dahil) ekspresyonları Taqman problemleri ile dizi formatında qRT-PCR cihazı ABI Fast 7500 aracılığıyla çıkarıldı.

Sonuç olarak sitotoksikite analizi zaman ve doza bağımlı bir şekilde pazopanib, hücre proliferasyonunu belirgin derecede azaltmaktadır. IC50 değeri, inhibisyon eğrisi ile hesaplandı ve 48 saatte 27.5 uM olduğu saptanmıştır. Apoptoz analizlerinde; "Cell Death Detection" deneyi ile apoptozun indüksiyonu % 27.59 (1.38 kat, p = 0.0445) ve kaspaz-3 aktivitesi deneyinde ise %23.02 oranında apoptozda artış (1.29 kat, p> 0.05) görülmüştür.

Gen dizi sonuçlarında, başlangıçta VEGF sinyalizasyonu ilgili genlerin ekspresyonları baskılanmış bulundu. Aralarında, özellikle FLT1 (-2,25 kat, p = 0.043) ve KDR (2,65 kat;p=0.045) anlamlı inhibisyon göstermektedir. Ayrıca CASP8 (-1,38 kat), CDK4 (1.18 kat), JunB (-1,36 kat), BAX (-1,24 kat), BCL2L1 (-1,41 kat), NFKBIA (-1,73 kat), PIK3CA (-1,07 kat), REL (-1.25 kat; p> 0.05 tümü) gibi onkogenler ekspresyonlarında da azalma tespit edilmiştir. Tümör süpresör genlerin içinde özellikle NF1(1.97kat),NF2(1.57kat), RUNX3

(1.12 kat; $p > 0.05$ all) ekspresyonları artmaktadır. Ayrıca, lösemide terapötik hedef gen mTOR, serin / treonin kinaz ekspresyonunda -1,06 kat azalma saptanmıştır. Apoptoz ilişkili genler arasında; sırasıyla lösemik hücre apoptozis induksiyonu belirtilen A2F1 (apoptoz indükleyici) ekspresyonu 12.43 kat artarken ($p = 0.034$), BCL2 (anti-apoptotik) ekspresyonu -1,71 kat baskılanmıştır. Son olarak, JAK /STAT yolunun üyeleri STAT3, STAT5A ve STAT5B ekspresyonları pazopanib tedavisi ile sırasıyla -1,49, -1,79, -1,14 kat ($p > 0.05$ tümü) baskılanmıştır. Sonuç olarak, deneysel verilerimiz apoptozun induksiyonu, VEGF sinyalizasyonunun ve lösemi hücrelerin proliferasyonunu inhibe eden pazopanib tedavisi, ek laboratuvar araştırmaları ile gelecekte umut vaat eden bir tedavi stratejisi olabilir.

Anahtar Kelimeler: Pazopanib, Kronik Myeloid Lösemi, Apoptoz.

Abstract

Chronic myelogenous leukemia (CML) is a clonal myeloproliferative disorder characterized by the presence of Ph chromosome in more than 90 % of the cases, resulting from t(9;22) reciprocal translocation encoding BCR-ABL. BCR-ABL hybrid oncogene has consistently high tyrosine kinase activity which drives malignancy in CML. Vascular endothelial growth factor (VEGF) has a potential role in the development of leukemia and inhibition of VEGF signaling is a promising new therapeutic approach. Pazopanib is a multi-targeted tyrosine kinase receptor inhibitor targeting VEGFR and defined as a safe and effective candidate agent. Its efficacy was put forward in CLL but; still unknown for CML.

The aim of this study is to evaluate the potential cytotoxic and apoptotic effects of pazopanib upon CML cell model K-562 and also to define new candidate target genes after pazopanib treatment via gene profiling assay. While cell proliferation assay was assessed by WST-1, apoptosis analyses were carried out by “cell death detection kit” and “caspase-3 activity assay” kit manuals. Finally; cell cycle regulatory genes, apoptotic pathway genes, cytokines, signal transduction cascade related genes and VEGF signaling related genes’ (totally 48 genes, including controls) expressions will be profiled via qRT-PCR instrument ABI 7500 Fast in array format with Taqman probes.

As for the results; the cytotoxicity assay showed that pazopanib decreased cell proliferation significantly in a time and dose-dependent manner. IC₅₀ value was calculated from the inhibition curve and it was determined to be 27.5 μ M for 48th h. In apoptosis assays; while 27.59% apoptosis induction (1.38 fold, p=0.0445) was detected via “Cell Death Detection” assay, 23.02% increase of apoptosis (1.29 fold, p>0.05) was seen in measurement of caspase-3 activity assay. For gene array results, initially VEGF signaling related genes’ expressions were downregulated. Among them, especially FLT1 (-2.25 fold, p=0.043) and KDR (-2.65 fold; p=0.045) exhibited significant inhibitions. Also down regulation in oncogenes’ expressions were detected such as CASP8 (-1.38 fold), CDK4 (1.18 fold), JUNB (-1.36 fold), BAX (-1.24 fold), BCL2L1 (-1.41 fold), NFKBIA (-1.73 fold), PIK3CA (-1.07 fold), REL (-1.25 fold; p>0.05 all). Among tumor suppressor genes, especially NF1 (1.97 fold), NF2 (1.57 fold), RUNX3 (1.12 fold; p>0.05 all) expressions were upregulated. Besides, leukemia therapeutic

target gene MTOR -a serine/threonine kinase- expression was downregulated by -1.06 fold. Among apoptosis related genes; while A2F1 (apoptosis inducer) expression was 12.43 fold increased (p=0.034), BCL2 (anti-apoptotic) expression was -1.71 fold downregulated which in turn indicated induction in leukemic cell apoptosis. Finally JAK/STAT pathway members STAT3, STAT5A and STAT5B expressions were downregulated following pazopanib treatment (-1.79, -1.14, -1.49 folds respectively; p>0.05 all). In conclusion, our experimental data demonstrated that pazopanib treatment might be a promising therapeutic strategy for preventing proliferation of leukemic cells, inhibiting VEGF signaling and inducing apoptosis in the future with additional laboratory research.

Key Words: Pazopanib, Chronic Myeloid Leukemia, Apoptosis.

1. Giriş ve Amaç

KML (kronik myelositer lösemi), malign hematopoietik pluripotent kök hücrenin klonal proliferasyonu ile karakterizedir. Vakaların %95'inde Ph kromozomu (9,22) translokasyonu sonucu oluşan füzyon transkripti Bcr/Abl lösemik fenotipin gelişmesinden sorumludur. Bu füzyon gen; kontrolsüz tirozin kinaz enzim aktivitesi gösteren Bcr/Abl proteinini kodlar. Normal hematopoez, sitokinlerin ve reseptörlerin önemli rol oynadığı bir dizi sinyal yolağına sahiptir. JAK/STAT, Raf/MEK/Erk, PI3K/Akt; lökomogenezde rolü olan, hücre siklusu ve apoptozun regülasyonu ile ilişkili sinyal ileti yollarındandır. Tirozin kinaz aktivitesine sahip bcr-abl füzyon geni, Ras, Raf, PI3K, JNK/SAPK, Crkl ve STAT5 aktivasyonu ile apoptozu inhibe ederek lösemik hücre proliferasyonunu uyarmaktadır. 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.

VEGF ve PDGF sinyal yolları ise malign hücre proliferasyonu ve tümör anjiogenezinde rol alır. Pazopanib VEGF ve PDGF ile indüklenen endotelial hücre proliferasyonu ve anjiogenezini inhibe etmektedir ve birçok tümör tipinde etkisi gösterilmiştir, ancak diğer sinyal yolları üzerindeki etkisi bilinmemektedir.

Bu çalışmada, pazopanib' 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.

2. Literatür Özeti

2.1. Kronik Myeloid Lösemi

Kronik Myeloid Lösemi (KML), myeloid seri hücrelerinin , diferensiasyonları normal kalmak şartıyla aşırı ve kontrolsüz proliferasyonu ile karakterize hematopoietik pluripotent kök hücre hastalığıdır ⁽¹⁾ ve Dünya Sağlık Örgütü 2008 sınıflamasına göre "Klasik Myeloproliferatif Neoplaziler " arasında yer alır. KML'nin sitogenetik özelliği

olan 9.kromozomdaki Abelson (ABL) protoonkogeni ile 22. kromozomdaki breakpoint cluster region (BCR) geninin 22. Kromozom üzerinde resiprokal translokasyon sonucu ortaya çıkan Philadelphia (Ph) kromozomu olguların yaklaşık %95'inde tespit edilmektedir. ⁽²⁾ Bu füzyon gen; kontrolsüz tirozin kinaz enzim aktivitesi gösteren Bcr/Abl proteinini kodlar ve hücre proliferasyonu, maturasyonu ve adezyon sinyali yollarını aktive ederek ve apoptozisi inhibe ederek malign hücre transformasyonuna yol açar.

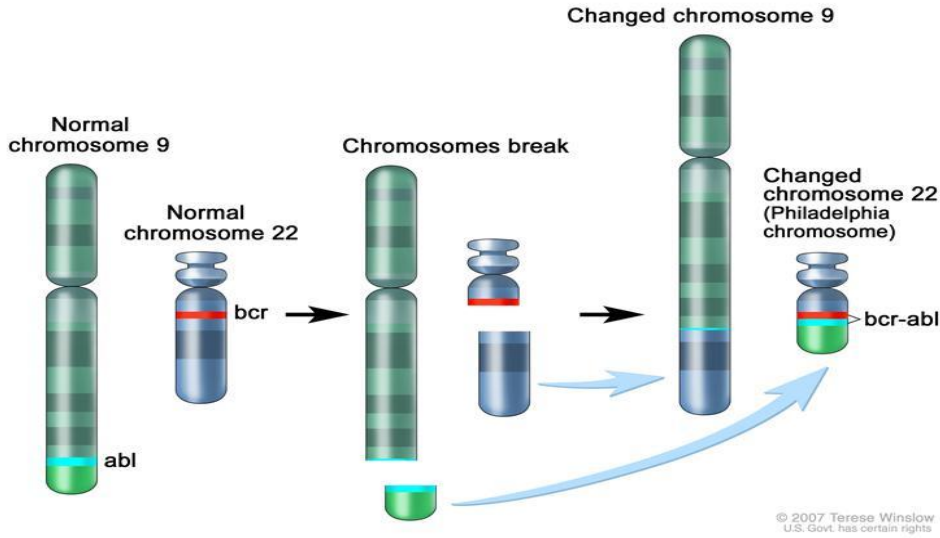
KML ilk olarak 1845 yılında Dr. Rudolf Virchow ve Dr. John Hughes Bennett adlarında iki patolog tarafından lökositöz ve masif splenomegali olan iki hastada tanımlanmıştır.^(3,4) KML;erişkin lösemilerinin yaklaşık % 15-20' sini oluşturur. Yıllık insidansı 100.000' de 1-2 olup,erkeklerde kadınlara göre biraz daha fazladır (1,3 / 1). En sık yaşamın 5 ve 6. Dekatlarında görülmekte olup, her yaşta görülebilir.⁽⁵⁾ Genellikle etyolojide suçlanmış bir ajan yoktur ve vakaların çoğu sporadik vakalar şeklindedir. Bilinen ailesel predispozisyon olmayıp iyonize radyasyonun KML riskini artırdığı bildirilmiştir.⁽⁶⁾

KML moleküler patogenezinde 9 ve 22 kromozomlar arasındaki resiprokal translokasyon ile karakterizedir⁽⁷⁾. Bu translokasyon sonucu kısalmış kromozom 22, Philadelphia (Ph) kromozomu olarak adlandırılır ve Nowell ve Hungerford adlı araştırmacılar tarafından keşfedilmiştir⁽⁸⁾. Ph kromozomu , bir kromozom anormalliğinin spesifik bir maligniteyle bağlantılı ilk özgül genetik değişikliktir ⁽⁹⁾. BCR/ABL füzyon geni ve kodladığı p210 proteini KML patogenezinde yapısal olarak aktif tirozin kinazdır ve miyeloid seri hücrelerinin proliferasyonunu artırır ve yaşam süresini uzatır. ⁽¹⁰⁾ KML tedavisinde geliştirilen İmatinib mesilat (IM) (Glivec,Gleevec, STI-571; Novartis, Basel, Switzerland) KML'de önemli bir aktivite göstermektedir , c-ABL, BCR/ABL, Tel/ABL, platelet kökenli büyüme faktörü (PDGF) reseptör tirozin kinaz ve c-kit tirozin kinazların potansiyel inhibitörüdür.⁽¹¹⁾ Halen en yaygın kullanılan KML ilacı olan İmatinib hastalığın seyrini olumlu yönde olmak üzere önemli ölçüde değiştirmiştir.

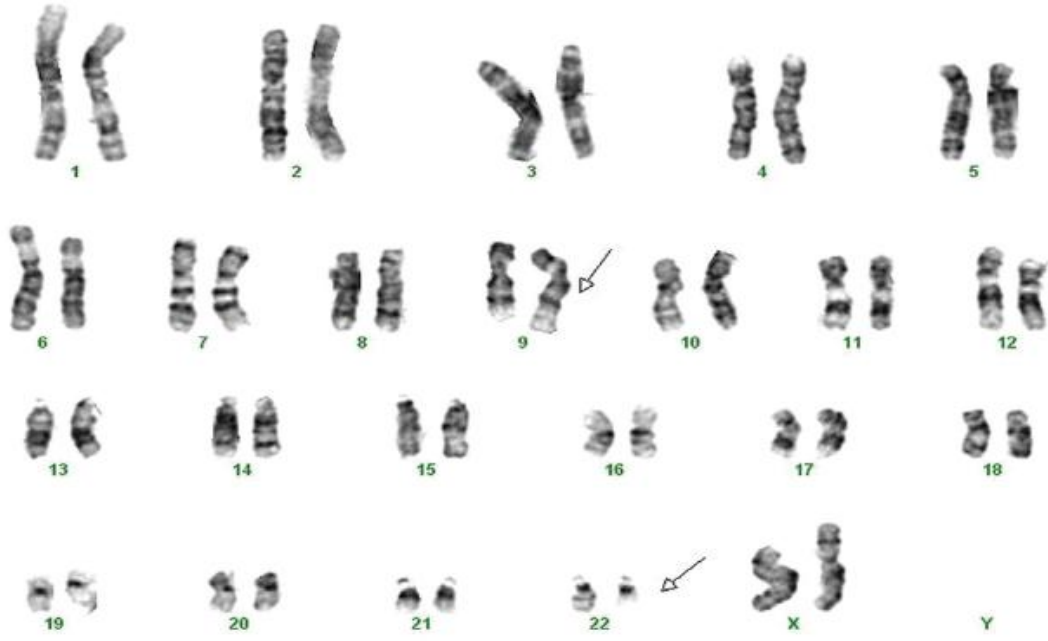
2.2.KML Moleküler Patogenezi

2.2.1. BCR-ABL proteini yapısı ve fonksiyonu

Kromozom bantlama tekniklerinin geliştirilmesinden sonra 1973'te Rowley tarafından 9. ve 22. kromozomlar arasındaki karşılıklı translokasyon sonucu oluşan derivatif / kısalmış kromozom 22 olarak ortaya konmuş ve Philadelphia kromozomu adını almıştır⁽¹²⁾. Ph kromozomu KML vakalarının %90'ından fazlasında bulunmaktadır. Sitogenetik tekniklerin gelişmesiyle daha ayrıntılı bant analizlerinin yapılabilmesi ve kromozomal kırık noktalarının saptanabilmesi, bu karşılıklı translokasyonun, kromozomların uzun kolları arasında (t(9, 22) (q34.1, q11.7) gerçekleştiğini göstermiştir. Yirmiikinci kromozomdaki kırılmalar 5 ila 6 kilobazlık çok sınırlı bir DNA bölgesinde meydana geldiği için kırılma noktalarının yoğunlaştığı bölge 'breakpoint cluster region' anlamında BCR geni olarak isimlendirilir . 9q34.1' de lokalize olan c- abl protoonkogeninin kırılma ile yerinden ayrılarak, 22q11.7' de lokalize bcr bölgesine transloke olmasıyla kimerik Bcr/Abl geni oluşur. ⁽¹³⁾



Şekil 1. Philadelphia Kromozomu.

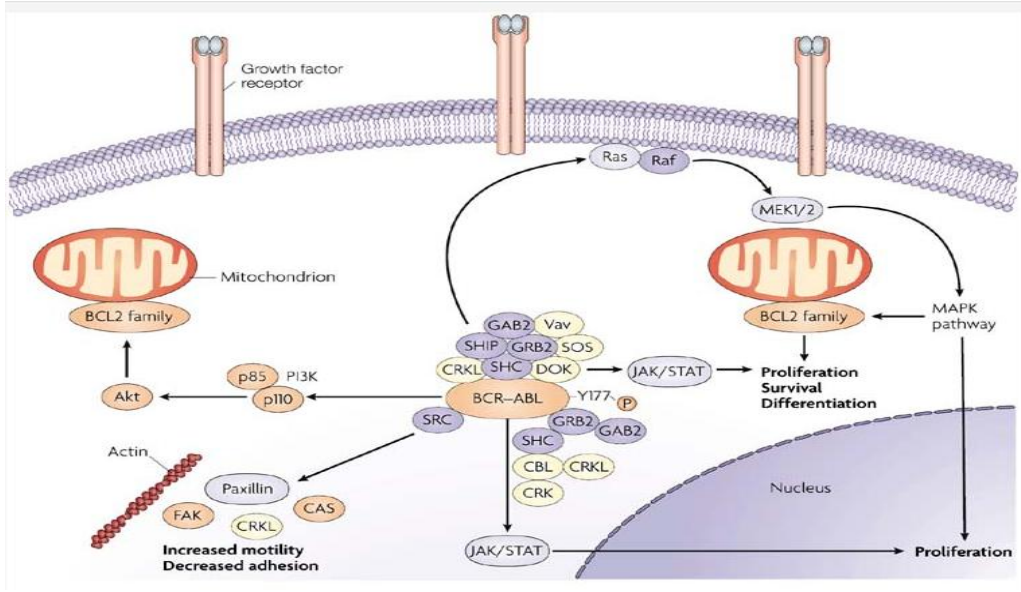


Şekil 2. G bantlama ile elde edilmiş karyotip görüntüsünde Ph kromozomu ⁽¹⁴⁾

22.kromozom üzerinde konumlanmış olan 23 ekzonlu BCR geni 130kb büyüklüğündedir ve 160 kDa ağırlığında bir serin/treonin kinaz olan BCR proteinini kodlar. ABL 1 Abelson murin lösemi virüs onkogeninin insandaki homoloğu 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 ifadelenerek hücre farklılaşması, bölünmesi, adezyonu ve hücrede stres cevabında görev yapar.⁽¹⁵⁾ Abl geninin kırılma noktası ekson 2'in 5 no'lu bölgesinde gerçekleşir. Bcr geni üzerindeki kırılma noktası değişebilir (örneğin ekson b1 ve b2, b3 ya da b4 arasında) ve sonuçta değişik moleküler kütlelere sahip füzyon protein tirozin kinazlar için kodlama yapan değişik boylarda füzyon gen ürünleri meydana gelebilir. KML'de hibrid genden transkripsiyonu olan mRNA molekülünün translasyonu sonucu 210kDa molekül ağırlığında bir onkoprotein ortaya çıkar.⁽¹⁶⁾ p210 Bcr-Abl protein tirozin kinaz aktivitesi, Abl için sıkı bir şekilde düzenlenmiş olan tirozin kinaz aktivitesi, Bcr dizisi eklendiğinde kontrolsüz hale geçer. Bcr'nin eklenmesiyle ayrıca Abl'nin DNA proteini bağlama aktivitesi ve sito iskeletsel aktin mikrofilamentlerine bağlanması da artmaktadır.

2.2.2. BCR-ABL'nin Etkileştiği Sinyal Yolakları

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.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 yolaklarını etkileyen diğer proteinlerin SH2 bölgeleri ile etkileşir. BCR - ABL1 füzyon proteini RAS/MAPK, PI-3 kinaz, CRKL, JAK-STAT ve Src yolağı gibi birçok hücre içi sinyal yolağını aktive eder.



Şekil 3. BCR-ABL1 Sinyal Yolakları.

İnsan tümörlerinin %30'unda Ras -MAPK yolunun aşırı aktivasyonu söz konusudur, yolağının aktivasyonu proliferasyon artışına neden olur. Fosfatidilinositol-3 (PI-3) kinaz enzim aktivitesi Ph pozitif hücrelerin çoğalması için gereklidir. Bcr/Abl füzyon proteini, Cbl, Crk ve Crkl gibi aktivatör moleküllerle birleşerek PI-3 kinazın aktivasyonuna neden olur.⁽¹⁷⁾ Sitokin dönüştürücü sinyallerin en iyi bilinen şekli bir enzim olan Janus Kinaz'lar (JAK) ve sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) olarak adlandırılan transkripsiyon faktörleridir. Jak ailesi, nispeten büyük dört

üyeden oluşmaktadır (Jak1, Jak2, Jak3 ve Tyk2). Bunlar, reseptörlerin intraselüler subunitlerine bağlanır, onları fosforile eder.Stat ailesi esas olarak Stat-1,3,4 ve 5 izomerlerinden oluşan toplam 10 farklı proteini içermektedir.STAT proteinleri stoplazmada inaktif halde bulunan, SH2 domeinine sahip proteinlerdir. Reseptörüne bir ligandın bağlanması STAT proteinlerini bir araya getirir ve reseptörle ilişkili JAK protein tirozin kinazlara SH2 domeinleri boyunca bağlanmasına ve fosforillenmesine sebep olur. Fosforillenmiş STAT proteinleri dimerleşir ve çekirdeğe transloke olarak hedef genlerin transkripsiyonunu etkinleştirir. STAT'lar, hücre içinde bazen birbirine zıt olaylara aracılık ederler. Hem hücre proliferasyonunu hem de apoptozisi uyarabilirler. Örneğin STAT1, IFN'un antiproliferatif etkisine aracılık ederken, STAT5, IL-3 ve GM-CSF'in proliferatif etkisine aracılık etmektedir. STAT3 aktivasyonu ise, IL-6 ve IL-10'a bağlı büyüme inhibisyonu, IL-3 ve GM-CSF tarafından uyarılan proliferasyona aracılık etmektedir. STAT1, IFN'a yanıt olarak Fas/FasL ekspresyonunu arttırmakta ve apoptozisi indüklemektedir.⁽¹⁸⁾

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), organın gelişim evresine ve fizyolojik aktivitesine bağlı olarak pek çok önemli biyolojik aktiviteleri olan multifonksiyonel bir moleküldür. VEGF ilk defa karsinoma hücrelerinden salgılanan, tümörlerin asit sıvısı akımını arttıran bir permeabilite faktörü olarak bulunmuştur ve vasküler permeabilite faktörü (VPF) olarak isimlendirilmiştir. Bundan kısa bir süre sonra VEGF bir anjiogenik faktör olarak izole edilmiş ve endotel hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu stimüle ettiği gösterilmiştir. Bilinen en potent anjiogenik sitokindir.⁽¹⁹⁾ VEGF ailesinin, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F ve plasental büyüme faktörü (PLGF) olmak üzere 7 üyesi vardır.Reseptör tirozin kinaz grubunda yer alan ve VEGF ligandlarını bağlayan başlıca üç tane VEGF reseptörü tanımlanmıştır. VEGFR-1 (Flt-1) endotel hücreleri ile bazı tümör hücrelerinde eksprese edilir ve esas olarak VEGF nin endotel migrasyonunu uyarıcı etkisine aracılık eder. VEGFR-2 (KDR, FLK-1) endotel hücreleri, primitif hematopoietik kök hücreler ve bazı tümör hücreleri ile az sayıda erişkin hücrelerinde eksprese edilir ve VEGF ligandlarının (VEGF, VEGF-C ve VEGF-D) endotel hücrelerinin proliferasyonu, sağ kalımı ve damar geçirgenliği etkilerine aracılık eder. VEGFR-3 (Flt-4) esas olarak VEGF-C ve VEGF-D'yi bağlar, lenfatik ve tümör endotel hücrelerinde eksprese edilir ve lenfanjiyogenezin gelişmesinden sorumludur. Tümör anjiyogenezinde başlıca sorumlu

VEGFR-2 aracılı sinyal iletim yoludur. VEGFR-2 nin bloke edilmesi hücre proliferasyonu, migrasyonu ve sağkalımını ve damar permeabilitesini azalttığı bilinmektedir. VEGFR-1 (Flt-1) in tümör anjiyogenezinin yanı sıra tümör hücrelerinin proliferasyonu, invazyonu ve metastazında da rol oynaması nedeniyle kanser tedavisinde önemli hedefler arasında yer almaktadır. ⁽²⁰⁾ STAT3 aktivitesi vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) düzeyinin artışına yol açarak, tümör anjiyogenezinde de rol oynamaktadır ⁽²¹⁾.

2.3.Pazopanib

Pazopanib,, VEGFR hedefleyen oral, ikinci nesil tirozin kinaz inhibitörüdür. Renal hücreli karsinom ve doku sarkomları tedavisinde kullanılmaktadır. Pazopanib VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, trombosit türevli büyüme faktörü reseptörü- α (PDGFR α ve PDGFR β), fibroblast büyüme faktörü reseptörü 1 (FGFR1) ve FGFR3, sitokin reseptörü KIT, lökosit reseptör tirozin kinaz (LTK), lökosit spesifik protein tirozin kinaz (LCK) ve makrofaj koloni stimüle edici faktör-1 reseptör, mTOR, rapamisin, PI3K, fosfoinositid 3-kinaz, TK, tirozin kinazın potent inhibitörüdür. ⁽²²⁾



5-[[[4-[(2,3-dimethyl-2H-indazol-6-yl)methylamino]-2-pyrimidinyl]amino]-2-methylbenzenesulphonamide monohydrochloride; C₂₇H₂₃N₇O₂S•HCl; M_r = 473.99

Şekil 4. Pazopanib Moleküler Yapısı.

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.

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

Çalışmanın apoptoz analizi basamağında, pazopanibin IC_{50} dozu ile muamele edilen hücrelerle kontrol grubu hücreler kullanılacaktır.

IC_{50} dozunda pazopanib 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 IC_{50} 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 mikrolakalara 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 pazopanibin artan dozlarıyla muamele edilmiş hücreler) için ayrı bir mikrolaka hazırlanacaktır. Pazopanib ile sitotoksitenin değerlendirilmesi ve IC_{50} dozunun saptanması, WST-1

kiti ile ELISA cihazında okutulurken, absorbanların kıyaslanmasına göre spektrofotometrik olarak belirlenecektir.

3.1.4. Apoptoz Çalışmaları

IC₅₀ pazopanib 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 pazopanib 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, CTNNA1, 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

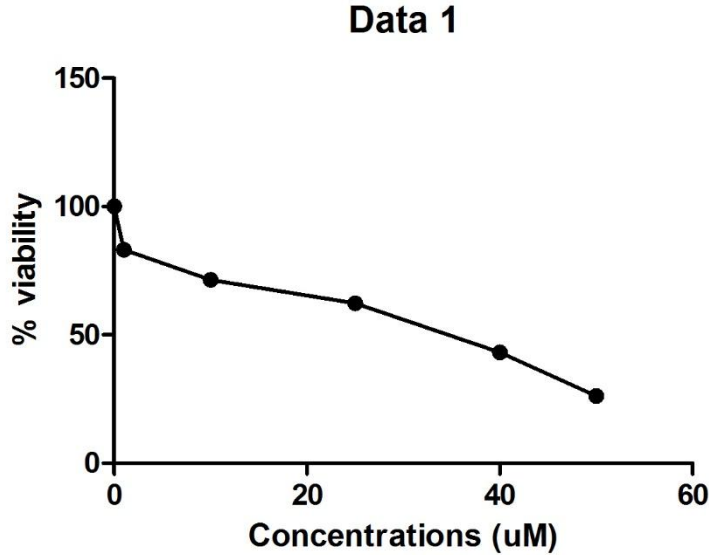
Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü ve diğer Bazı Büyüme Faktörleri ve Reseptörleri: FIGF, FLT1, FLT4, KDR, NRP1, NRP2, PDGFC, PGF, VEGFA, VEGFB, VEGFC.

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

4. Bulgular

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

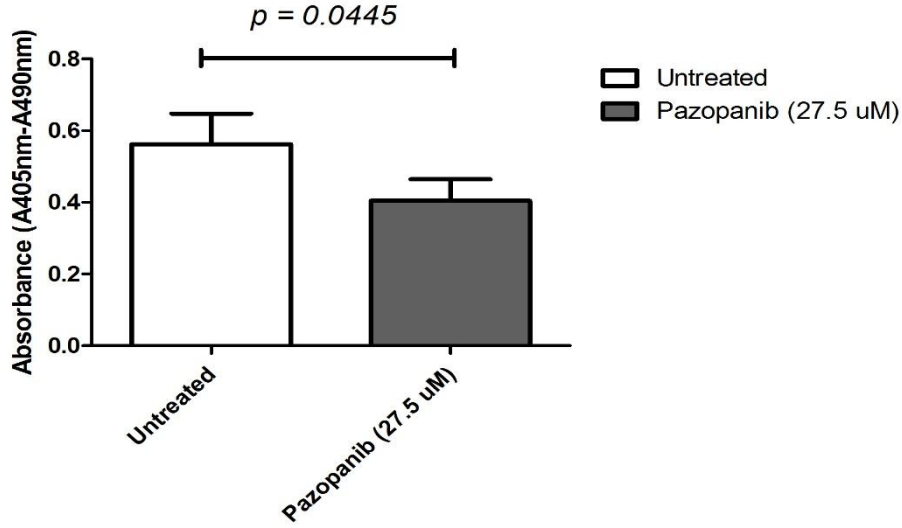
Pazopanib tedavisi ile K-562 hücrelerinde gözlenen sitotoksosite WST-1 hücre Proliferasyon yöntemi ile tespit edilmiştir ve sitotoksosite analizi zaman ve doza bağımlı bir şekilde pazopanib, hücre proliferasyonunu belirgin derecede azaltmaktadır. IC₅₀ değeri, inhibisyon eğrisi ile hesaplandı ve 48 saatte 27.5 uM olduğu saptanmıştır. (Şekil 4).



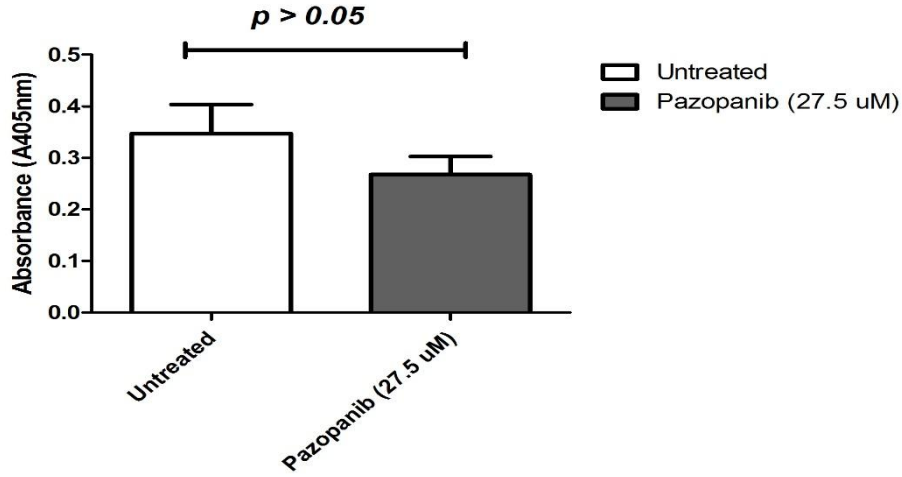
Şekil 5. Hücre proliferasyon WST-1 Yöntemi.

4.2.Pazopanib Lösemik Hücrelerin Apoptozunu Etkilemektedir

Apoptoz analizlerinde; "Cell Death Detection" deneyi ile apoptozun induksiyonu %27.59 (1.38 kat, $p = 0.0445$) ve kaspaz-3 aktivitesi deneyinde ise %23.02 oranında apoptozda artış (1.29 kat, $p > 0.05$) görülmüştür.



Şekil 6. Pazopanib ile apoptozun induksiyonunda artış görülmüştür.



Şekil 7. Pazopanib ile kaspaz-3 aktivitesi deneyinde apoptozda artış saptandı.

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

Gen ekspresyon analiz çalışmalarında, pazopanib tedavisine bağlı olarak, bazı sinyal yollarını regüle eden ve hücrel süreçlerde önemli rol oynayan birtakım genlerde

transkripsiyonel farklılıklar saptandı. Pazopanib tedavisine bağlı değişik ekspresyon profilleri tablo 1’de gösterilmiştir.

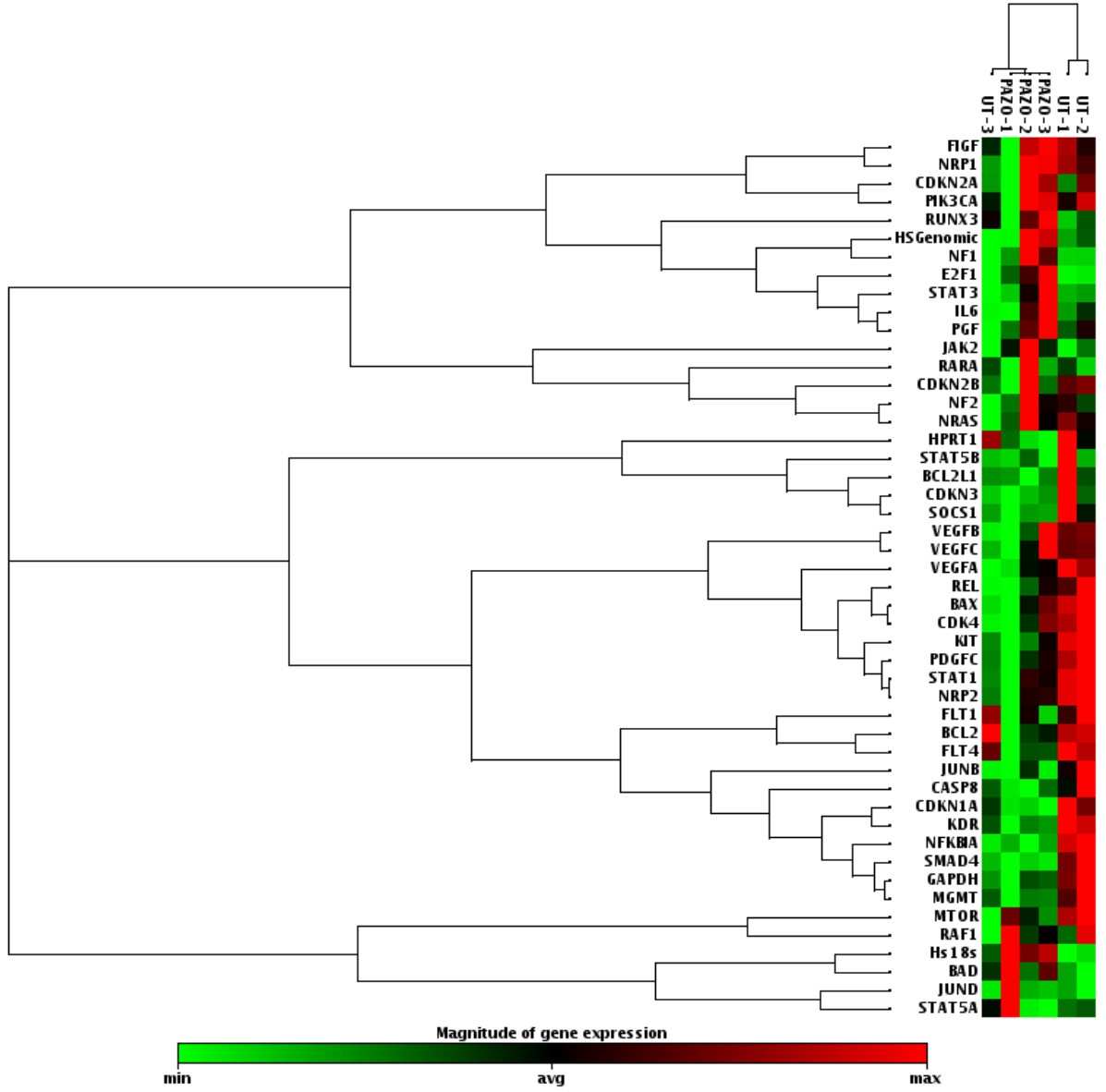
Tablo 1. Pazopanib tedavisine bağlı değişik ekspresyon profilleri

	Gen sembolü	Katsayı	<i>p</i> değeri
Lösemik terapötik hedef	mTOR	-1,06	0,66
	FLT4	-1,7	0,9
VEGF sinyal genleri	FLT1	-2,2	0,04
	VEGFA	-1,1	0,49
	VEGFB	-1,07	0,9
	KDR	-2,6	0,04
	VEGFC	-1,1	0,95
	PGF	1,4	0,2
	PDGFC	-1,35	0,2
	NRP2	-1,5	0,3
	P1	1,02	0,7
	Apoptoz ilişkili genler	BCL2	-1,7
E2F1		12,4	0,03
BAD		-1,56	0,46
Tümör supresörler	NF1	1,97	0,07
	NF2	1,57	0,35
	CDKN2B	-1,22	0,70
	CDKN3	-1,81	0,27
	MGMT	-2,85	0,08
	RUNX3	1,12	0,49
	SMAD4	-4,36	0,08
Onkogenler	RAF1	1,24	0,55
	NFKBIA	-1,73	0,15
	JUNB	-1,3	0,29
	NRAS	1,14	0,5

	PIK3CA	-1,07	0,96
	JUND	-1,56	0,29
	BCL2L1	-1,41	0,49
	BAX	-1,24	0,49
	CASP8	-1,38	0,49
	CDK4	-1,18	0,56
	KIT	-1,79	0,17
	RARA	1,01	0,74
	REL	-1,25	0,46
	JAK2	1,82	0,06
	STAT1	-1,49	0,32
	STAT3	-1,79	0,17
JAK/STAT yolak elemanları	STAT5A	-1,14	0,95
	IL6	1,49	0,33
	STAT5B	-1,49	0,38
	SOCS1	-1,81	0,16
Hücre siklusu regulator genleri	CDKN1A	-1,1	0,5
	CDKN2A	1,09	0,56

Gen dizi sonuçlarında, başlangıçta VEGF sinyalizasyonu ilgili genlerin ekspresyonları baskılanmış bulundu. Aralarında, özellikle FLT1 (-2,25 kat, p = 0.043) ve KDR(2,65 kat;p=0.045) anlamlı inhibisyon göstermektedir. Ayrıca CASP8 (-1,38 kat), CDK4 (1.18 kat), JunB (-1,36 kat), BAX (-1,24 kat), BCL2L1 (-1,41 kat), NFKBIA (-1,73 kat), PIK3CA (-1,07 kat), REL (-1.25 kat; p> 0.05 tümü) gibi onkogenler ekspresyonlarında da azalma tespit edilmiştir. Tümör süpresör genlerin içinde özellikle NF1(1.97kat),NF2(1.57kat), RUNX3 (1.12 kat;p>0.05 all) ekspresyonları artmaktadır. Ayrıca, lösemide terapötik hedef gen mTOR, serin / treonin kinaz ekspresyonunda - 1,06 kat azalma saptanmıştır. Apoptoz ilişkili genlerin arasında; sırasıyla lösemik hücre apoptozis indüksiyonu belirtilen A2F1 (apoptoz indükleyici) ekspresyonu 12.43 kat artarken (p=0.034), BCL2 (anti-apoptotik) ekspresyonu -1,71 kat baskılanmıştır. Son

olarak, JAK /STAT yolunun üyeleri STAT3, STAT5A ve STAT5B ekspresyonları pazopanib tedavisi ile sırasıyla -1,49 , -1,79, -1,14 kat ($p > 0.05$ tümü) baskılanmıştır.



Şekil 8. Pazopanib tarafından indüklenen diferansiyel gen ekspresyon profillerinin hiyerarşik diyagramı.

5. Tartışma

Pazopanib, yapılan çalışmalarda başta VEGF olmak üzere çok hedefli bir tirozin kinaz inhibitörüdür. Çalışmamızda da pazopanib ile VEGF sinyalizasyonu ilgili genlerin ekspresyonları baskılanmıştır. (FLT1 (-2,25 kat, p = 0.043) ve KDR (2,65 kat;p=0.045) Yapılan sitotoksite analizlerinde apoptozu artırarak hücre proliferasyonunu azaltmaktadır. Bununla birlikte tümör süpresör genlerin ekspresyonlarını artırması ve lösemide terapötik hedef gen mTOR,serin / treonin kinaz ekspresyonunda azalma saptanan diğer antitümoral etkileridir.Pazopanib ,multipl myelom ve kronik lenfosittik lösemi hücrelerinde yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda hücre apoptozunu artırttığı, anjiogenezi baskıladığı ve hücre sağkalımını bloke ettiği saptanmıştır. ^(23,24) Ayrıca konvansiyonel kemoterapötik ajanlarla sinerjistik etkisi bulunmaktadır ve yan etki profili mevcut diğer ajanlara göre daha tolere edilebilirdir.

Çalışmamızdaki sonuçların ışığı altında pazopanib KML ve diğer hematolojik hastalıkların tedavisinde diğer tedavi seçenekleri ile birlikte terapötik cevabı artırabilecek, ilaçlara bağlı gelişen toksiteyi ve direnci azaltabilecek yeni bir terapötik ajan olduğunu desteklemektedir.

6. Referanslar

1. Tefferi A, Thiele J, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia*. 2008;22(1):14-22
2. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV: The molecular biology of chronic myeloid leukemia, *Blood* 2000;96:3343-56.
3. Bennett JH. Case of hypertrophy of the spleen and liver in which death took
4. place from suppuration of the blood. *Edinb Med Surg J*. 1845;64:413–423.
5. Virchow R. Weisses Blut. *Frorieps Notizen*. 1845;36:151–156.
6. Goldman JM, Melo JV. Chronic myeloid leukemia-advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med* 2003;349(15):1451-64
7. Preston DL, Kusumi S, Tomogana M, et al. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiat Res*. 1994;137(2 Suppl):S68-97.
8. Rowley JD. A new consistent abnormality in chronic myelogenous leukemia identified quinacrine fluorescence and giemsa staining. *Nature*, 1973; 243:290-293.
9. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, 1960; 132: 1947.
10. Capdeville R, Buchdunger E, Zimmermann J, Matter A. Glivec (STI571, Imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nature Rev*, 2002; 1:493-502.
11. Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukemia. *Nature Reviews, Cancer*, 2005; 5: 172-183

12. Medina J, Kantarjian H, Talpaz M, et al. Chromosomal abnormalities in Philadelphia chromosome negative metaphases appearing during imatinib mesylate therapy in patients with Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Cancer*, 2003; 98:1905-1911.
13. Rowley JD. A new consistent abnormality in chronic myelogenous leukemia identified quinacrine fluorescence and giemsa staining. *Nature*, 1973; 243:290-293.
14. Sattler M, Griffin JD. Molecular mechanisms of transformation by the BCR-ABL oncogene. *Seminars in Hematology*, 2003; 40:4-10
15. 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.
16. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 96(10):3343-3356, 2000.
17. Melo JV: The diversity of bcr-abl fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype, *Blood* 1996;88:2375-84.
18. Kolch W. Meaningful relationships: The regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 2000; 351:289-30
19. Kierszenbaum AL. *Histology and Cell Biology An Introduction to Pathology*. Second edition. Canada: Elsevier 2007; 85-104.
20. Bren E C. VEGF in Biological Control. *Journal of Cellular Biochemistry* 2007; 102: 1358-67.
21. Niu G, Wright KL, Huang M, et al. Constitutive STAT3 activity upregulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* 2002; 21:2000-8.

22. ["VOTRIENT \(pazopanib hydrochloride\) tablet, film coated \[GlaxoSmithKline LLC\]"\(PDF\)](#). *DailyMed. GlaxoSmithKline LLC. November 2013*. Retrieved 27 January 2014.
23. Podar K, Tonon G, Sattler M, et al. The small-molecule VEGF receptor inhibitor pazopanib (GW786034B) targets both tumor and endothelial cells in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103: 19478–83.
24. Julian Paesler, Iris Gehrke, Rajesh Kumar Gandhirajan, et al. The Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors Vatalanib and Pazopanib Potently Induce Apoptosis in Chronic Lymphocytic Leukemia Cells In vitro and In vivo. *Clin Cancer Res* July 1, 2010 16;3390