T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇOCUKLUK ÇAĞI AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLİ (ALL) HASTALARIN VE SAĞLIKLI VERİCİLERİN KEMİK İLİKLERİNDEN ELDE EDİLEN HÜCRELERİNDE p97/VALOSİN İÇEREN PROTEİN (VCP) EKSPRESYONUNUN BELİRLENMESİ VE p97/VCP İNHİBİTÖRÜNÜN BU HÜCRELER ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şeyma KİPEL

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Ankara, 2019

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇOCUKLUK ÇAĞI AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLİ (ALL) HASTALARIN VE SAĞLIKLI VERİCİLERİN KEMİK İLİKLERİNDEN ELDE EDİLEN HÜCRELERİNDE p97/VALOSİN İÇEREN PROTEİN (VCP) EKSPRESYONUNUN BELİRLENMESİ VE p97/VCP İNHİBİTÖRÜNÜN BU HÜCRELER ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Şeyma KİPEL

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Ankara, 2019

T.C.

ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇOCUKLUK ÇAĞI AKUT LENFOBLASTİK LÖSEMİLİ (ALL) HASTALARIN VE SAĞLIKLI VERİCİLERİN KEMİK İLİKLERİNDEN ELDE EDİLEN HÜCRELERİNDE p97/VALOSİN İÇEREN PROTEİN (VCP) EKSPRESYONUNUN BELİRLENMESİ VE p97/VCP İNHİBİTÖRÜNÜN BU HÜCRELER ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİNARAŞTIRILMASI

Şeyma KİPEL

Yüksek Lisans Tezi

12/06/2019

Tez Danışmanı
Doktor Öğretim Üyesi Hilal NAKKAŞ

Jüri Üyeleri
Prof. Dr. A. Çevik TUFAN
Prof. Dr. H. Meltem ÖZGÜNER
Prof. Dr. Sevil ÇAYLI
Dr. Öğr.Üye. Hilal NAKKAŞ
Dr. Öğr.Üye. E. Nazlı HAYIRLI ÖZYOL

Okuduğumuz ve savunmasını dinlediğimiz bu tezin bir yüksek lisans derecesi için gereken tüm kapsam ve kalite şartlarını sağladığını beyan ederiz.

Doç. Dr. Ender ŞİMŞEK

Enstitü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans derecesi için gereken tüm şartları sağladığını tasdik ederim.

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

12/06/2019



Şeyma KİPEL

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca benden hiçbir zaman desteğini ve yardımını esirgemeyen ve bana her zaman güvenen değerli danışman hocam Doktor Öğretim Üyesi Hilal NAKKAŞ' a en derin minnet ve şükranlarımı sunuyorum. Ayrıca, çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım ve bana desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Habibe Meltem ÖZGÜNER ve Prof. Dr. Sevil ÇAYLI' ya, değerli anabilim dalı hocalarım Prof. Dr. Ahmet Çevik TUFAN, Doktor Öğretim Üyesi Radwan ABU-ISSA ve Doktor Öğretim Üyesi Bahar KARTAL 'a sonsuz teşekkür ederim.

Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın çok değerli asistanlarına, AYBÜ Histoloji ve Embriyoloji Araştırma Laboratuvarında yürüttüğüm deneysel çalışmalara ilk başladığım dönemde bana yardımcı olan sevgili arkadaşım Araştırma Görevlisi Cansu ŞAHİN' e, Kök Hücre İşleme ve Saklama Laboratuvarı'nda yürüttüğüm deneysel çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan Biyolog Yasin KÖKSAL' a ve Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Biyoistatistik ve Tıbbı Bilişim Anabilim Dalından Doç. Dr. Selcen YÜKSEL ve Araştırma Görevlisi Afra ALKAN 'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, bir telefonumla her zaman yanımda olan sevgili arkadaşlarım ve dostlarıma bana göstermiş oldukları sabır ve sonsuz destek için çok teşekkür ederim.

Ve en büyük teşekkürüm, benim bugünlere gelmemi sağlayan, bütün eğitim hayatım boyunca beni destekleyen, her zaman sevgilerini ve güvenlerini yüreğimde hissettiğim canım annem ve babama….

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vi**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**

TABLOLAR DİZİNİ ..... **xi**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **4**

2.1. Hematopoez 4

2.1.1. Mononükleer Hücreler (MNH) 6

2.2. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemi 7

2.3. Kök Hücre ve Mezenkimal Kök Hücreler 11

2.4. Kemik İliği Mikroçevresi 15

2.4.1. Akut Lenfoblastik Lösemide Kemik İliği Mikroçevresi 16

2.5. Apoptoz 17

2.5.1. Apoptoz Sırasında Meydana Gelen Morfolojik Değişiklikler 18

2.5.2. Apoptozun Moleküler Düzenleyicileri 19

2.5.3. Apoptoz Mekanizması 20

2.5.3.1. İntrinsik Yol (Mitokondri Aracılı Apoptoz) 20

2.5.3.2. Ekstrinsik Yol (Reseptör Aracılı Apoptoz) 21

2.5.4. Apoptoz Belirleme Yöntemleri 21

2.5.4.1. Annexin V/PI ile Apoptoz Tayini 22

2.5.5. Apoptoz ve Kanser İlişkisi 22

2.6. Otofaji 23

2.7. p97/ Valosin İçeren Protein (VCP) 24

2.7.1. p97/ VCP'nin ve Apoptoz ve Otofaji ile İlişkisi…….....25

2.7.2. p97/VCP ve ALL ilişkisi…….……26

2.8. DBeQ (Dibenzylquinazoline-2,4-diamine)……...……...27

3. MATERYAL ve YÖNTEM..... 28

3.1. Çalışma Grubunun Seçilmesi..... 28

3.1.1. Örneklerin Toplanması 29

3.2. Mononükleer Hücrelerin İzolasyonu 30

3.3. Örneklerin Çözülmesi..... 31

3.4. Mezenkimal Kök Hücre (MKH) Ekimi ve Pasajlanması..... 31

3.5. MKH'lerin Karakterizasyonu……..……33

3.5.1. Morfolojik Analiz…….…..33

3.5.2.Farklılaşma Testleri……..…….. 33

3.6. Western Blot Analizi……...……35

3.6.1. p97/ VCP Varlığının Western-Blot Analizi İle

Tespit Edilmesi……....…….37

3.7. p97/VCP İnhibitörü Olan DBeQ İçin Etkin Doz Ve Sürenin

Belirlenmesi……....…….37

3.8. İmmunofloresan Boyama …….……..…...38

3.9. Flow Sitometri ile Apoptoz Tayini…….39

3.9.1. Annexin V/ PI ile Apoptoz Tayini……41

3.10. İstatistiksel Analiz**…….....…….**42

4. BULGULAR……..……..43

4.1. Çalışma Gruplarının Özellikleri……...……...43

4.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Çoğaltılması……..……43

4.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu……....……44

4.4.Western Blot Analizinde p97/VCP Varlığının Tespit Edilmesi ile İlgili Bulgular……46

4.5. p97/VCP İnhibitörü Olan DBeQ için Etkin Doz ve Süre Belirlenmesinin Western-Blot Analiz Sonuçlarına İlişkin Bulgular…….48

4.6. DBeQ Verilen Mononükleer Hücrelerde ve Mezenkimal Kök Hücrelerde p97/VCP, p62 ve LC3B İfadelerinin Western Blot Analizine İlişkin Bulgular……...……50

4.7. p97/VCP İnhibitörü Olan DBeQ İçin Etkin Doz ve Süre Belirlenme Deneylerinin Immunofloresan Sonuçlarına İlişkin Bulgular…….53

4.8. DBeQ Verilen Mezenkimal Kök Hücrelerde p97/VCP, p62 ve LC3B İfadelerinin Immunofloresan Sonuçlarına İlişkin Bulgular……...…..58

4.9. DBeQ Verilen Mezenkimal Kök Hücrelerde ve Mononükleer Hücrelerde Apoptoz Tayini Sonuçlarına İlişkin Bulgular ……...……60

5. TARTIŞMA……...……66

6. SONUÇ VE ÖNERİLER …….…....…73

7. KAYNAKLAR……..…..……74

8. EKLER……..…..……82

EK-1. Etik Kurul İzni 82

EK-2. Özgeçmiş 84

EK-3. Tezden Üretilmiş Sözlü Sunum, Poster Sunumu ve Yayınlar..... 85

ÖZET

Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemili (ALL) Hastaların ve Sağlıklı Vericilerin Kemik İliklerinden Elde Edilen Hücrelerinde p97/Valosin İçeren Protein (VCP) Ekspresyonunun Belirlenmesi ve p97/VCP İnhibitörünün Bu Hücreler Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Akut lenfoblastik lösemi (ALL) kemik iliğinde bulunan lenfoid hücrelerin farklılaşması sırasında meydana gelen mutasyonlar sonucu gelişen malign bir hastalıktır. ALL hastalığının başlangıcında kemik iliği mikroçevresinin etkisi vardır. Bu mikroçevrenin en önemli hücre grubu olan mezenkimal kök hücre (MKH)'ler, birçok sitokinin salgılanmasında önemli role sahiptir.

p97/VCP, AAA+ATPaz ailesinin bir üyesidir. Hücre içinde übikütin proteozom yolağı, endoplazmik retikulum ilişkili protein yıkımı, hücre siklusu, apoptoz ve otofaji gibi birçok önemli yolakta görev yapmaktadır. Yapılan çalışmalarda p97/VCP'nin birçok kanser türünde fazla ifade edildiği ve bu proteine yönelik inhibitörlerin çoğalan kanser hücreleri üzerinde teröpötik ajan olarak etkilerinin olduğu gösterilmiştir. DBeQ (dibenzylquinazoline-2,4-diamine) hücre üzerinde toksik etkisi az olduğu kanıtlanan p97/VCP inhibitörlerindendir.

Tez çalışmamızın amacı çocukluk çağı ALL hastalarının ve sağlıklı vericilerin mononükleer hücrelerinde (MNH) ve MKH'lerde p97/VCP varlığını tespit edip karşılaştırmak ve DBeQ'nun (10 μM-1 saat) bu hücreler üzerindeki etkisini incelemektir.

Bu amaç doğrultusunda izole edilen hücrelerde p97/VCP, p62 ve LC3B ifadesi Western blot analizi ve ımmunofloresan boyama ile belirlenmiştir. Ayrıca DBeQ'nun apoptoz üzerine etkisi Annexin V yöntemi ile flow sitometride incelenmiştir.

Sonuçta hastalara ait hücre gruplarında p97/VCP ifadesinin daha fazla olduğu, DBeQ verildikten sonra p62 ve LC3B'nin ifadelerinin azaldığı ayrıca DBeQ'nun ALL hücre dizilerinde önemli bir apoptotik etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Akut lenfoblastik lösemi, mezenkimal kök hücre, p97/VCP, DBeQ

ABSTRACT

Determination of Expression of p97/Valosin-containing protein (VCP) in Bone Marrow-Derived Cells and Investigation of The Effect of p97/VCP Inhibitor on These Cells at Children with Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) and Healthy Donors

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a malignant disease, which occurs as a result of mutations that occur during differentiation of lymphoid cells in bone marrow. The bone marrow microenvironment has an effect at the onset of ALL. The most important group of cells of this microenvironment is mesenchymal stem cells (MSCs), which have an important role in the secretion of many cytokines.

p97/VCP is a member of AAA+ATPase family. It has an essential role in various important pathways such as intracellular ubiquitin proteasome pathway, endoplasmic-reticulum-associated protein degradation, cell cycle, apoptosis, and autophagy. It is shown that p97/VCP is overexpressed in most of the cancer types and inhibitors for this protein have effects as therapeutic agents on proliferating cancer cells. DBeQ (dibenzylquinazoline-2,4-diamine), is a p97/VCP inhibitör that has been shown to have least toxic effects on cells.

The aim of this study is to determine and compare the presence of p97/VCP in mononuclear cells (MNC) and MSCs in ALL patients and healthy donors and to investigate the effect of DBeQ (10μM-1 hour) on these cells.

For this purpose, the expressions of p97/VCP, p62 and LC3B in the isolated cells were determined by Western blot analysis and immunofluorescence staining. In addition, the effect of DBeQ on apoptosis was investigated by flow cytometry with Annexin V method.

As a result, it was shown that p97/VCP expression was higher in the ALL patient cell groups, the expression of p62 and LC3B decreased after DBeQ which has significant apoptotic activity in ALL cell lines.

Keywords: Acute lymphoblastic leukemia, mesenchymal stem cells, p97/VCP, DBeQ

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALL : Akut Lenfoblastik Lösemi

Apaf : Apoptoz Proteaz Aktive Edici Faktör

Atg : Autophagy related genes (Otofaji ile ilgili genler)

ATPase AAA: ATPase Associated with Diverse Cellular Activities

Bad : Bcl-2-associated death promoter (Bcl-2 ile ilişkili ölüm destekçisi)

Bcl- 2 : B cell lenfoma-2 (B hücreli lösemi)

Bcl-X1 : Bcl-2 Associated X (Bcl-2 ile ilişkili X proteini)

CD : Cluster of Differentation (Farklılaşma küme belirteçleri)

CFU-F : Colony Forming Unit- Fibroblast (Koloni Oluşturan Birim – Fibroblast)

DBeQ : Dibenzylquinazoline-2,4-diamine

DED : Death effector domain (Ölüm effektör alanı)

DISC : Death inducing signalling complex (Ölüm indükleyici sinyal kompleksi)

DMEM-LG : Dulbeco's Modified Eagle Medium -Low Glucose

DMSO : Dimetil sülfoksit

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

EKH : Embriyonik Kök Hücre

ELISA : Enz yme Linked ImmunoSorbent Assay(Enzim bağlı immünosorbent deneyi)

ER : Endoplazmik Retikulum

ERAD : Endoplasmic Reticulum Associated Degradation (ER ilişkili bozunma)

FAB : French-American-British

FGF : Fibroblast Growth Factor (Fibroblast büyüme faktörü)

FITC : Fluorescein isothiocyanate

FSC : Forward Scatter (Önden saçılım)

HIV : Human Immundeficiency Virus (İnsan immunyetersizlik virüsü)

HKH : Hematopoetik kök hücre

HLA-DR : Human Leukocyte Antigen- DR (İnsan lökosit antijeni-DR)

HOX : Homeobox

IFNγ : Interferon gama

Ig : İmmunglobulin

IL : İnterlökin

ISCT : International Society of Cellular Therapy (Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği)

Kİ : Kemik iliği

KİT Ünitesi : Kemik iliği transplantasyon ünitesi

LKH : Lösemik Kök Hücre

MKH : Mezenkimal Kök Hücre

MNH : Mononükleer Hücre

mRNA : Mesajcı RiboNükleik Asit

Notch- 1 : Notch Homolog-1

PI : Propidyum iyodür

PBS : Phosphate Buffer Saline (Fosfat tamponlu tuz çözeltisi)

RT- PCR : Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

SSC : Side Scatter (Yandan saçılım)

TNF : Tümör Nekrozis Faktör

TUNEL : Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling

UPS : Ubikütin Proteazom Sistemi

VCP : Valosin Containing Protein (Valosin içeren protein)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Hematopoetik hiyerarşi modeli……4
Şekil 2.2. Kemik iliği mikroskobik görüntüsü……...……...5
Şekil 2.3. Mononükleer hücrelerin mikroskobik görüntüsü……6
Şekil 2.4. Hematopoetik kök hücrelerin (HKH) mutasyona uğraması ile lösemik blast hücrelerin oluşumu……...…7
Şekil 2.5. Çocukluk çağı kanserlerinin yüzdeleri……....8
Şekil 2.6. Mezenkimal kök hücre farklılaşmaları……...……13
Şekil 2.7. Apoptoz aşamaları……..18
Şekil 2.8. Bcl-2 protein ailesinin sınıflandırması……...19
Şekil 2.9. Apoptoz belirleme yöntemleri……21
Şekil 2.10. p97/VCP'nin yapısal domainleri…….....24
Şekil 2.11 p97/VCP'nin apoptoz ve otofaji ilişkisi……26
Şekil 2.12. p97/ VCP substratları……...27
Şekil 3.1. Ameliyathane ortamında kemik iliği örneklerinin toplanması……...29
Şekil 3.2. MNH izolasyonu ……...30
Şekil 3.3. MKH ekimi……32
Şekil 3.4. MKH'lerin invert mikroskop görüntüsü…… …...33
Şekil 3.5. Hücrelere uygulanan DBeQ' nun süre ve doz bağımlı ilişkisinin incelendiği 12'li kuyucuk örneği……..38
Şekil 3.6. Flow sitometride kapılama gösterimi……40
Şekil 3.7. Flow sitometride apoptoz tespiti için elde edilen grafiğin gösterimi……..…...41
Şekil 4.1. MKH'lerin adipojenik farklılaşmasına ait mikroskop görüntüsü……..…44
Şekil 4.2 MKH'lerin osteojenik farklılaşmasına ait mikroskop görüntüleri…… ….45
Şekil 4.3. Sağlıklı verici ve hasta gruplarına ait MNH' lerin Western blot analizinde p97/VCP ifadesinin sonuçları……..…….….46
Şekil 4.4. Sağlıklı verici ve hasta gruplarına ait MNH' lerin p97/VCP ve β-aktin ifadelerinin Western blot sonuçlarının Image J analiz programı ile okunup orantılandırılması…….…..47
Şekil 4.5. Sağlıklı verici ve hasta gruplarına ait MKH' lerin Western blot analizinde p97/VCP ifadesinin sonuçları……..…….…47

Şekil 4.6. Sağlıklı verici ve hasta gruplarına ait MKH' lerin p97/VCP ve β-aktin ifadelerinin Western blot sonuçlarının Image J analiz programı ile okunup orantılandırılması……..……..48

Şekil 4.7. Aynı sağlıklı vericiye ait MKH'lerde DBeQ'nun doz ve süre çalışmasının Western blot analiz sonuçları…….……..49

Şekil 4.8. Aynı sağlıklı vericiye ait MKH'lerin DBeQ doz ve süre çalışmasının p97/VCP, p62 ve β-aktin ifadelerinin Western blot sonuçlarının Image J analiz programı ile okunup orantılandırılması……...……49

Şekil 4.9. Sağlıklı verici ve hasta gruplarına ait MNH' lerin Western-Blot analizinde DBeQ ile inhibisyon sonrası p97/VCP ifadesinin sonuçları……50

Şekil 4.10. Sağlıklı verici ve hasta gruplarına ait MNH' lerin DBeQ ile inhibisyonu sonrası p97/VCP ve β-aktin ifadelerinin Western blot sonuçlarının Image J analiz programı ile okunup orantılandırılması……..…….51

Şekil 4.11. Sağlıklı verici ve hasta gruplarına ait MKH'lerin Western blot analizinde LC3B, p62 ve p97/VCP ifade sonuçları……..…….52

Şekil 4.12. Sağlıklı verici ve hasta gruplarına ait MKH' lerin, p97/VCP, p62, LC3B ve β-aktin ifadelerinin Western blot sonuçlarının Image J analiz programı ile okunup orantılandırılması……..…..53

Şekil 4.13. Sağlıklı vericiye ait MKH'lerde aynı sürede (1 saat) farklı dozlarda verilen DBeQ'nun Immunofloresan boyama sonuçlar……..54

Şekil 4.14. Sağlıklı vericiye ait MKH'lerde aynı sürede (1 saat) farklı dozlarda verilen DBeQ'nun Immunofloresan boyama sonuçlarının Image J analiz program ile okunup nokta sayısının belirlenmesi…….55

Şekil 4.15. Sağlıklı vericiye ait MKH'lerde aynı dozda (10 μM) farklı sürelerde verilen DBeQ'nun Immunofloresan boyama sonuçları ……...…….56

Şekil 4.16. Hasta grubundan bireye ait MKH'lerde aynı dozda (10 μM) farklı sürelerde verilen DBeQ'nun Immunofloresan boyama sonuçları ……...…….57

Şekil 4.17. Sağlıklı vericiler ve hasta gruplarından bireylere ait MKH'lere verilen DBeQ'nun doz ve süre çalışmasın p62 ve LC3B Immunofloresan boyama sonuçlarının Image J analiz program ile okunan nokta sayısı…….……...58

Şekil 4.18. Sağlıklı verici (A, C, E) ve hasta (B, D,F) MKH'lerde p97/VCP, p62 ve LC3B birikiminin Immunofloresan boyama sonuçları……...……..59

Şekil 4.19. Sağlıklı vericiler ve hasta gruplarından bireylere ait MKH'lerde p97/VCP, p...62 ve LC3B birikiminin Immunofloresan boyama sonuçlarının Image J analiz program ile okunan nokta sayısı…….……....…..60
Şekil 4.20. Sağlıklı vericilere ait MNH' lerde DBeQ verilmeden önce (A ve B) ve verildikten sonra (C ve D) flow sitometrik apoptoz analiz sonuçları…….62
Şekil 4.21. Hastalara ait MNH' lerde DBeQ verilmeden önce (A, B ve C) ve verildikten sonra (D, E ve F) flow sitometrik apoptoz analiz sonuçları……...63
Şekil 4.22. Sağlıklı vericilere ait MKH' lerde DBeQ verilmeden önce (A,B ve C) ve verildikten sonra (D,E ve F) flow sitometrik apoptoz analizi sonuçları…..……64
Şekil 4.23. Hastalara ait MKH' lerde DBeQ verilmeden önce (A ve B) ve verildikten sonra (C ve D) flow sitometrik apoptoz analiz sonuçları…….65

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. MKH'lerin elde edildiği kaynaklar ve farklılaşma kapasiteleri……...14

Tablo 4.1. DBeQ verilen sağlıklı verici ve ALL hastalarına ait vaka sayıları……..….61

1.GİRİŞ

Akut lenfoblastik lösemi (ALL) kemik iliğinde yer alan B ve T progenitör hücrelerin farklılaşması sırasında meydana gelen mutasyonlar sonucu hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalması ile gelişen malign bir hastalıktır. Bu hastalıkta kemik iliğinde bulunan normal hematopoetik hücrelerin yerini lösemik hücreler almaktadır (1). ALL, çocukluk çağında en çok rastlanan kanser türüdür. Çocukluk çağı kanserlerinin %23'ünü oluşturmaktadır. Bu hastalığın tedavisinde var olan yöntemlere ek olarak yeni tedaviler için çalışmalar devam etmektedir.

Kemik iliği, kök hücrelerin en büyük kaynağıdır. Kemik iliğinde mezoderm tabakasından köken alan hematopoetik ve mezenkimal hücreler bulunmaktadır. Hematopoetik kök hücrelerin (HKH) stromaya tutunmasında ve birçok sitokinin salgılanmasında mezenkimal kök hücrelerin (MKH) önemli rolü vardır (2).

Kök hücrelerin kemik iliğinde özel olarak bulundukları ortama kemik iliği mikroçevresi (niş) denir. Kemik iliği mikroçevresinin en önemli hücre gruplarından olan MKH'lerin kendini yenileme ve farklılaşma özelliklerine sahip olmalarını bu mikroçevre sağlar. Kök hücre nişindeki en önemli olay, nişte bulunan kök hücre sayısını sabit tutmaktır. Eğer hücreler çok fazla çoğalır ise, doku homeostazı bozulur ve kanser oluşumu başlar. Bu yüzden lösemi hastalığının başlamasında ve hastalığın ileri safhalarında kemik iliği mikroçevresi önemlidir (3).

Apoptoz veya programlanmış hücre ölümü, fizyolojik veya patolojik olarak istenmeyen, zarar görmüş veya potansiyel olarak neoplastik olan hücreleri yok etmek için kullanılan bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Bu programlanmış hücre ölümünün temelinde genetik mekanizma vardır. Bu tip hücre ölümü DNA'nın nükleozom parçalarına ayrılması, kromatin yoğunlaşması ve çekirdek parçalanması gibi özel şekilsel değişikliklerle karakterizedir. Normal şartlarda apoptoz, vücudun her bir parçasının içerik ve büyüklüğünün fizyolojik gereksinimlerin belirlediği sınırlar içinde

kalmasını sağlar. Apoptozun başlatılması ve baskılanması kompleks bir düzenleyici sinyal ağı tarafından kontrol edilir (4).

p97/ Valosin içeren protein (VCP) AAA+ATPaz (**A**TPases **A**ssociated with diverse cellular **A**ctivities) ailesinin bir üyesidir. Hücre içinde übikütin proteazom yolağı, endoplazmik retikulum ilişkili protein yıkımı, hücre siklusu, apoptoz ve otofaji gibi birçok önemli yolakta görev yapmaktadır (5,6,7). Birçok p97/VCP inhibitörü vardır ama bunların içerisinde hücre üzerinde toksik etkisi daha az olduğu kanıtlanmış tek inhibitör olan DBeQ (dibenzylquinazoline-2,4-diamine)'nun kanser hücrelerinde (HeLa hücreleri: İnsan serviks kanser hücreleri) hücre apoptozunu indüklediği ve hücre çoğalmasını engellediği gösterilmiştir (8).

Bütün bu bilgilerden yola çıkarak tez çalışmamızda çocukluk çağı ALL hastalarının ve sağlıklı vericilerin kemik iliklerinden elde edilen mononükleer hücrelerinde (MNH) ve MKH'lerinde p97/VCP varlığını tespit etmeyi, karşılaktırmayı ve p97/VCP inhibitörü olan DBeQ'nun bu hücreler üzerindeki etkisini araştırmayı amaçladık. Literatürde, insan lösemik blastlarında p97/VCP ile ilgili hücre hattı kullanılarak yapılan tek bir çalışma vardır. Bu çalışmada p97/VCP inhibitörü olarak CB-5038'in etkisi incelenmiştir (9). Ancak insan hücre hattı ile doğal ortamında bulunan hücreler arasında büyük farklılıklar vardır. Literatür taraması yapıldığında ALL hastalarına ait kemik iliği hücrelerinde p97/VCP ifadesini inceleyen bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ayrıca, kanser hücre hatlarında yapılan çalışmada p97/VCP inhibitörü olarak kullanılan ajanın etkisi tam kanıtlanamamıştır. Bu yüzden bu çalışmada inhibitör olarak hücre üzerinde toksik etkisi daha az olduğu bilinen DBeQ kullanılmıştır. İlk olarak ALL hastaları ve sağlıklı vericilerin kemik iliklerinden mononükleer hücreler dansite-gradient yöntemi ile izole edilmiş, elde edilen hücreler kültüre edilip ALL hastalarına ve sağlıklı vericilere ait hücrelerde p97/VCP ifadesi arasında farklılık olup olmadığı immunofloresan boyama ve Western blot yöntemleri ile belirlenmiştir. İkincil olarak ise hücreler farklı doz ve zaman aralıklarında p97/VCP inhibitörü ile inkübe edilip hücre apoptozuna Annexin V/PI yöntemi ile flow sitometride bakılmıştır.

Bunlara ek olarak, DBeQ'nun çalışma mekanizmasını doğrulamak ve p97/VCP'nin aktif çalıştığı hücre yolaklarındaki belirteçlerin DBeQ'dan etkilendiğini

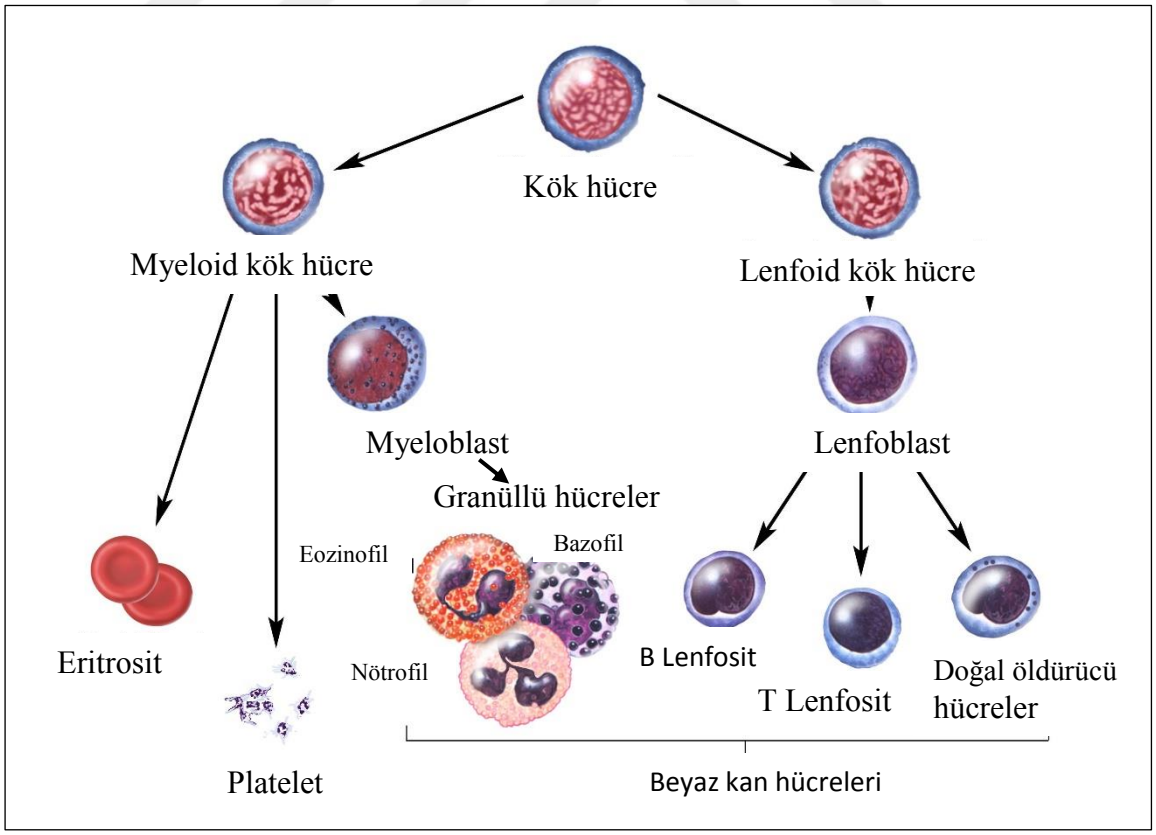
kanıtlamak amacıyla otofaji belirteçleri olan p62 ve LC3B ifadelerine bakılmıştır. Her bir parametreye ait sonuçlar değerlendirilmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçların hem ALL'nin patogenezine hem de başka bazı kanser türlerinin tedavisinde terapötik ajan olarak kullanılması önerilen p97/VCP inhibitörünün ileride ALL hastalığı tedavisinde de kullanılabilir olup olmamasına ışık tutacağını düşünüyoruz.

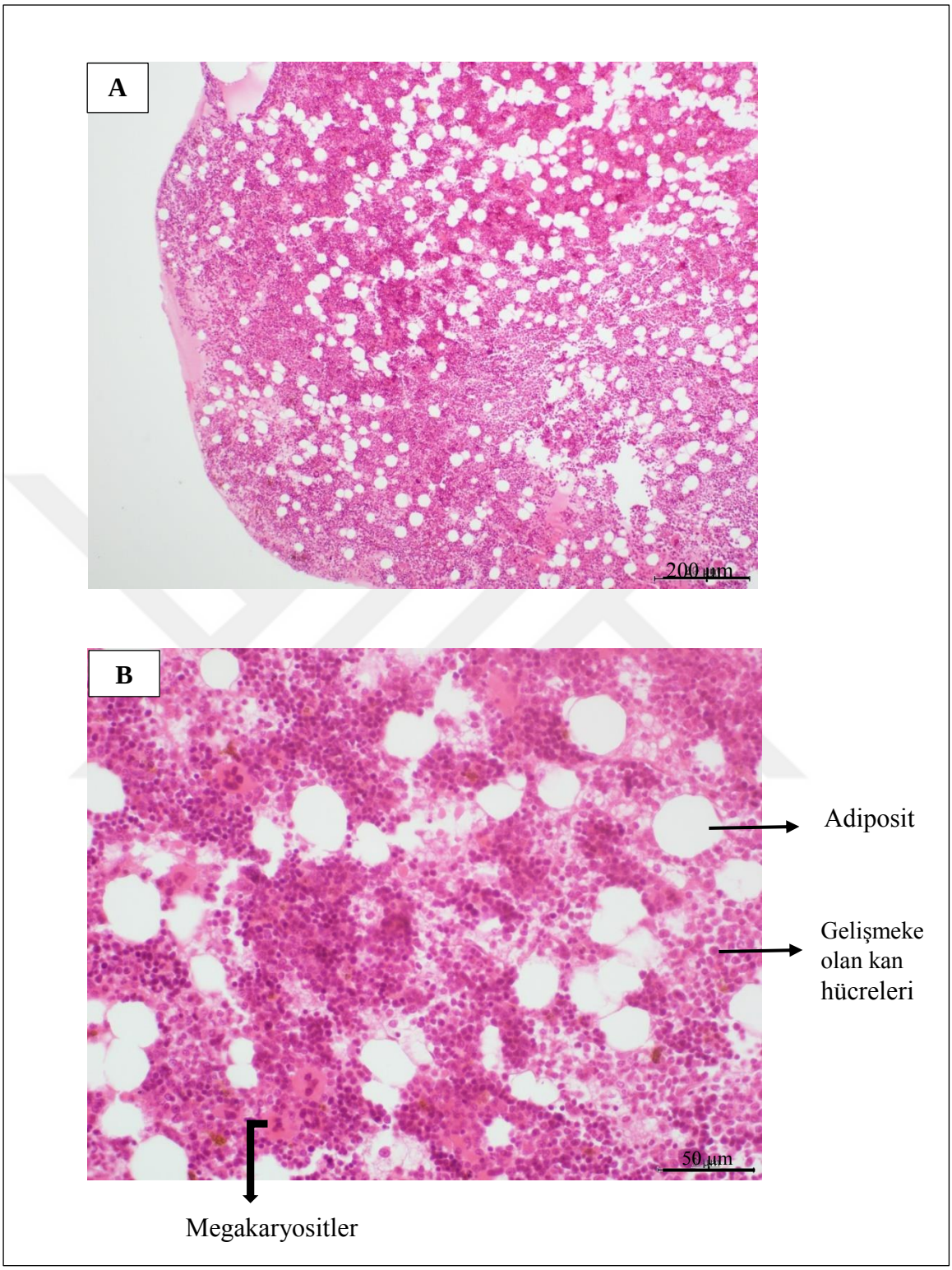
2.GENEL BİLGİLER

2.1.Hematopoez

Hematopoez, yaşam süreleri kısıtlı olan kan hücrelerinin hematopoetik organlarda sürekli üretilmesidir. Embriyogenezin erken dönemlerinde vitellüs kesesinin mezoderminde üretilen kan hücreleri daha sonraki dönemde karaciğer ve dalakta, fetal dönemin sonunda ise kemik iliğinde üretilir. Erişkinde kan üretiminin en önemli merkezi olan kemik iliği, fetal yaşamın 5.ayında işlev görmeye başlar ve doğum anında hematopoetik aktivitesi en aktif olan organdır. Kan hücreleri kemik iliğinde bulunan tek tip öncül hücrelerden meydana gelir. Kemik iliğinde bulunan pluripotent özellikteki kök hücreler myeloid veya lenfoid hücrelere dönüşebilirler (10,11). Lenfoid progenitör hücrelerden kemik iliğinde ve lenfoid organlarda fonksiyonel olarak aktif B lenfositler oluşurken, T lenfositler eğitimlerini timusta tamamlarlar. Myeloid gelişim süreçleri kemik iliğinde gerçekleşir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Hematopoetik hiyerarşi modeli (12).



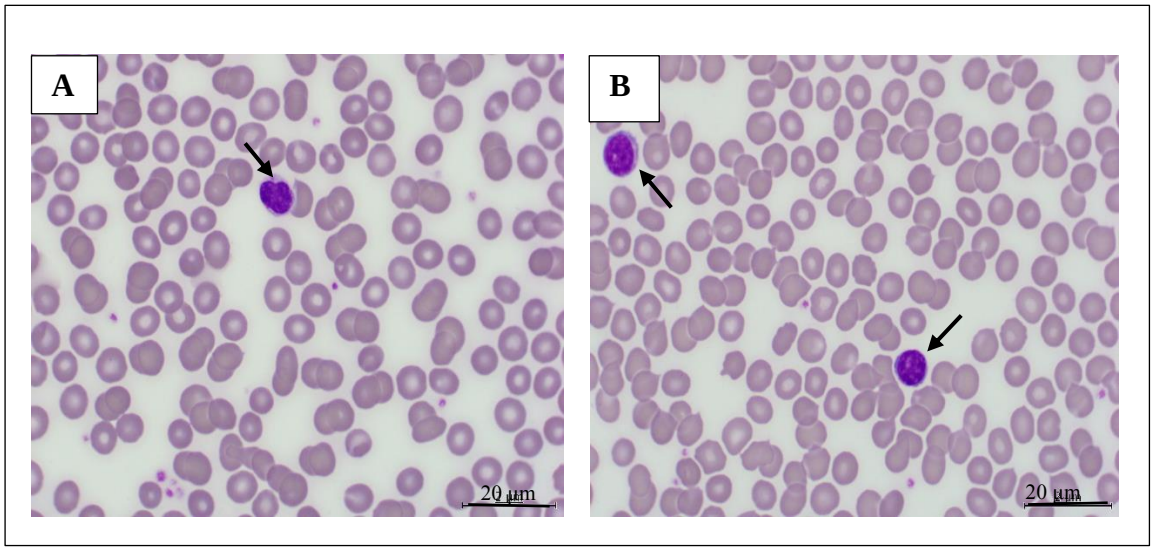
Şekil 2.2. Kemik iliği mikroskobik görüntüsü / Boya: Hematoksilen Eozin A) Bar: 200 µm B) Bar: 50 µm.

2.1.1.Mononükleer Hücreler (MNH)

Tek çekirdekli kan hücreleridir. Monosit ve lenfosit (B, T ve doğal öldürücü (natural killer) hücreler) olmak üzere iki hücre grubundan oluşurlar.

-Monositler: Kemik iliğinde üretilen, tek ve büyük çekirdeğe sahip olan hücrelerdir (Şekil 2.3-A). Monositlerin en temel özellikleri, kandan dokulara ya da dokulardan kana geçebilmeleridir. Üretilen monositler farklılaşarak dokulara spesifik hücreleri oluştururlar. Örneğin, bağ dokusunda makrofaj, akciğerlerde alveolar makrofaj, merkezi sinir sisteminde mikroglia ve kemik dokusunda osteoklast hücreleri gibi (11).

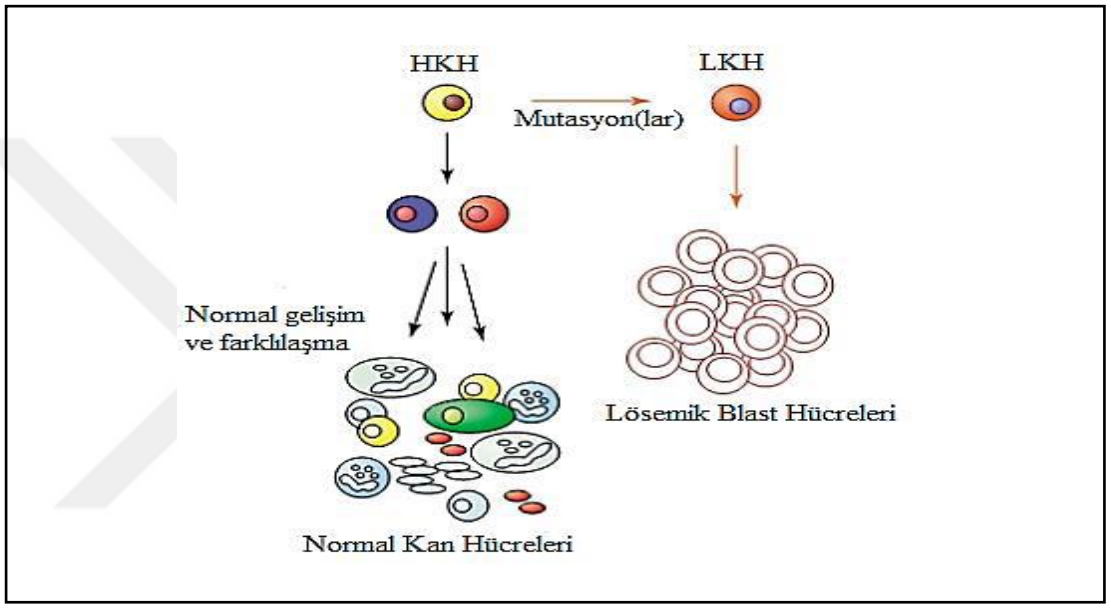
-Lenfositler: Kemik iliğinde üretilen, tek çekirdekli hücrelerdir (Şekil 2.3-B). Lenfositler diğer lökositlerden farklı uyarılar ile bölünmeye başlar. Bu hücrelerin en önemli özellikleri, vücuda yabancı olan maddeleri tanıyıp onları ortadan kaldırmak için bağışıklık sistemini aktif hale getirmeleridir. Lenfositlerin bir çeşidi olan T lenfositler doğumdan önce timus bezinde bu yeteneği kazanırlar. Bu hücre grubu hücresel bağışıklığın bir parçasıdır. Kemik iliğinde bağışıklık yeteneği kazanan B-lenfositler ise sonradan kazanılan bağışıklıktan (humoral bağışıklık) sorumludur (13).



Şekil 2.3. Mononükleer hücrelerin ışık mikroskobik görüntüsü / Boya: Giemsa.
A) Ok: Monosit- Bar: 20 µm B) Ok: Lenfosit-Bar: 20 µm

2.2.Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemi

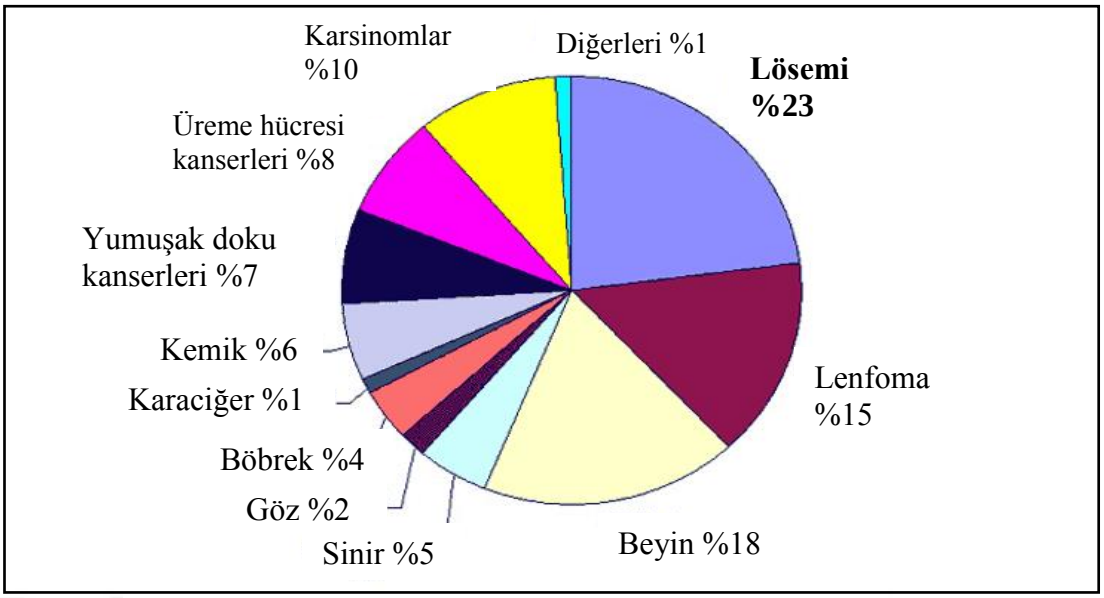
Lösemi, hematopoetik progenitör hücrelerin somatik mutasyon geçirmesi sonucunda oluşan lösemik blast hücrelerinin kontrolsüz çoğalması sonucu kendi anormal serilerini oluşturmalarıyla ortaya çıkan hastalıktır (Şekil 2.4) (14).



Şekil 2.4. Hematopoetik kök hücrelerin (HKH) mutasyona uğraması ile lösemik blast hücrelerin oluşumu (15).

ALL, kemik iliğinde bulunan lenfositlerin (B ve T hücrelerin), farklılaşma mekanizmaları sırasında oluşan mutasyonlar sonucu ortaya çıkan bir hastalıktır (16).

ALL, çocukluk çağında en sık görülen kanser türüdür (Şekil 2.5). Tüm çocukluk malignitelerinin %23'ü ALL'dir (17).



Şekil 2.5.Çocukluk çağı kanserlerinin yüzdeleri (17).

ALL hastalığının nedeni hala kesin olarak bilinmemektedir. Radyasyon, toksik maddeler ve bazı kemoterapi ajanları lösemi oluşumuna neden olur. Kromozomlardaki anormallikler de akut lösemi gelişiminde etkili olabilir. Akut lösemiler için risk faktörleri arasında Down sendromu, kimyasal maddeler ve ilaçlar vardır.

Lösemik hücrelerin sınıflandırılmasında, hücrelerin morfolojik, immunfenotipik ve genetik özellikleri temel alınır (18). ALL sınıflandırması için; lösemik hücrelerin membran ya da sitoplazmik antijenleri (CD; cluster of differentiation), monoklonal antikorlar ve flow sitometri yöntemleri kullanılır (1). ALL sınıflandırmasında morfolojik olarak 3 grup vardır (French-American-British (FAB) sınıflandırması):

1- L1(%31): Küçük, çekirdek düzenli ve dar sitoplazmalı, nükleolus yok
2- L2(%60): Büyük, çekirdek düzensiz ve nükleolus belirgin
3- L3(%9): Büyük, çekirdek uniform ve nükleolus var

Kemik iliği mikroçevresi lösemi başlangıcında ve hastalığın gelişiminde önemli rol oynar. Mikroçevrenin temel hücre gruplarından olan MKH, büyüme faktörleri, sitokinler ve hücre içi sinyaller üreterek ALL hücrelerinin sağ kalmalarını, çoğalmalarını ve ilaç direnci göstermelerini düzenler. MKH'lerin lösemik hücre sağ kalımına etkisi tam olarak bilinmemekle beraber salgıladıkları çeşitli sitokinlerin etkisinin olduğu düşünülmektedir (19).

Lösemi tanısı, klinik bulguların ve periferik kan bulgularının yanı sıra kemik iliği biyopsisi ile de konulabilir. Hastaların çoğunda periferik yaymada lökosit sayısı $10000/mm^3$'in üzerindedir ve %90 'dan fazla blast görülür (20).

ALL hastalığının tedavisinde uygulanan en yaygın yöntem kemoterapidir. Bu tedavi yönteminde, hücrelerin çoğalmasını engelleyen ilaçlar kullanılır. Genellikle tek bir ilaç bütün lösemi hücrelerini yok edemeyeceğinden değişik etkilere sahip birden fazla ilaç kür halinde verilir. Bu uygulamada amaç, malign karakterdeki hücrelerin büyük çoğunluğunun yok edilmesidir (21). ALL kemoterapi tedavisi genellikle birkaç fazdan oluşur:

1) Remisyon indüksiyonu (iyileşme sağlanması): Tanıdan sonraki ilk 3-4 hafta içinde verilen tedavidir. Lösemi hücrelerinin çoğunu yok etmek, hastalığın belirtilerini durdurmak ve kan sayımlarını normale döndürmek için tasarlanmıştır. Ama bu tedavi ile lösemik blastlar ortadan kaldırılırken normal hücreler de zarar görür.

2) Remisyon konsolidasyonu (pekiştirme tedavisi): Terapinin bu aşaması, bir ilaç kombinasyonunun kullanılmasını içerir. İlaçlar remisyon elde etmek için kullanılanlardan farklı olabilir veya farklı dozlarda olabilir. Birkaç ay süren bu tedavide amaç, ilaç kombinasyonlarının daha çok lösemi hücresini öldürmesini sağlamak ve remisyonu devam ettirebilmektir. Bu tedavi fazının bir diğer amacı hastalıklı hücrelerin daha fazla yayılmasını önlemektir.

3) Reindüksiyon: Bu tedavi evresinde de yüksek doz sitotoksik ilaç kürü uygulanarak yoğun bir tedavi amaçlanmaktadır. Hedef bütün lösemik hücreleri öldürmek ve dolayısıyla hastalığın tekrarlanma riskini azaltmaktır.

4) İdame evresi: Bu son tedavi evresinin hedefi, uzun ve yoğun süren tedaviye rağmen hala canlı kalabilen lösemili hücreleri imha etmektir (22).

ALL hastalığının tedavisindeki bir diğer yöntem ise kemik iliği (kök hücre) naklidir. Ancak ülkemizde sınırlı sayıda donör olduğu için bu tedavi de yetersiz kalmaktadır.

ALL hastalığında tedavinin amacı, hastaları mümkün olduğunca düşük komplikasyon ile iyileştirmek ve sonrasında ortaya çıkabilecek olası yan etkileri önlemektir.

2.3.Kök Hücre ve Mezenkimal Kök Hücreler

Kök hücre kavramı ilk olarak 1800'lü yılların ortasında Maximow tarafından kullanılmıştır. Maximow tüm kan elemanlarının tek bir hücreden farklılaşabildiğini bulmuştur (23). İlk yapılan çalışmalar sonucunda kök hücrenin temel özellikleri olan kendini yenileme ve farklı hücre türlerine dönüşebilme yetenekleri ortaya konulmuştur. Kök hücreler diğer hücreler ile kıyaslandıklarında çok yüksek bir telomeraz enzim aktivitesine sahiptir. Bu enzim sayesinde kök hücrelerde yaşlanma daha geç meydana gelir (22).

Kök hücrelerin sahip oldukları 2 temel özellik vardır.

1) Kendini Yenileyebilme: Kök hücreler bölünmeleri sırasında bir yandan yerini alacakları veya tamir edecekleri hücreye dönüşürler, bir yandan da kendi yedeklerini oluştururlar. Kendi yedeğini oluşturması, vücudumuzda bulunan kök hücre havuzlarının devamlılığı için önemlidir. Eğer hücreler kendi yedeğini oluşturmazsa, zamanla kök hücre sayısında azalma meydana gelir. Hücrelerin bölünmesi asimetrik hücre bölünmesi veya simetrik hücre bölünmesi ile gerçekleşir (3).

2) Farklılaşma: Hücrenin üç germ yaprağı ve türevlerine farklılaşabilme yeteneğidir. Bu özellik kök hücreleri, diğer hücrelerden ayıran en önemli özelliktir. Hücrede meydana gelen farklılaşmayı etkileyen birçok etken vardır. Hücre matriks proteinleri, kararlanma aşamaları, morfogenler, histon ve gen metilasyonları ile sinyal yolaklarının kombine etkileri bu etkenlere örnek olarak verilebilir. Kök hücrelerin farklılaşmasındaki en önemli mekanizma epigenetik kontroldür. Kök hücrelerin öncül hücreye mi yoksa özelleşmiş hücreye mi farklılaşacağının kararını genler verir (3).

Kök hücreler farklılaşma kapasitelerine göre totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olmak üzere 5 gruba ayrılır.

►Totipotent kök hücreler organizmanın herhangi bir gelişim evresinde her tür hücresini oluşturabilme yeteneğine sahip hücre olarak tanımlanır. İnsanlarda, zigotu oluşturan ilk sekiz hücre totipotentdir. Embriyonik gelişim sırasında herhangi bir hücreye dönüşme yeteneğine sahiptirler.

►Pluripotent hücreler tüm germ yapraklarına (endoderm, ektoderm, mezoderm) ait dokuları oluşturabilme kapasitesine sahiptirler. Fetal veya yetişkin hücre tiplerini oluşturabilirler.

►Multipotent kök hücrelerin farklılaşması daha sınırlı kapasitededir. İnsan vücudunda sadece belirli birkaç hücre türüne dönüşebilen hücrelerdir. Mezenkimal kök hücreler (MKH) multipotent kök hücrelerin bir örneğidir.

►Oligopotent hücreler az sayıda hücreye farklanabilirler, örneğin lenfoid veya myeloid kök hücreler.

►Unipotent hücreler, gelişmiş bir organizmada tek bir hücre grubuna farklılaşma yeteneği olan hücrelerdir.

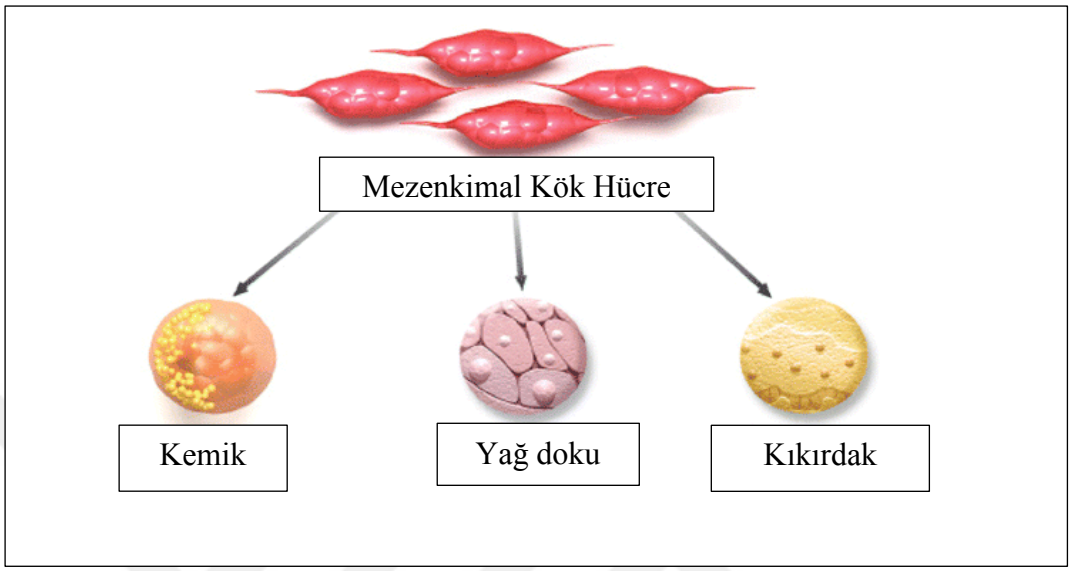
Kök hücreler elde edildikleri kaynağa göre embriyonik kök hücre (EKH) ve yetişkin kök hücre (YKH) olmak üzere 2 ana gruba ayrılır.

1)Embriyonik Kök Hücre (EKH): Döllenmeden birkaç gün sonra meydana gelen blastokistden izole edilir. Buradan izole edilen EKH'ler pluripotent özelliktedir. In vitro olarak çoğaltılıp istenilen hücre tiplerine farklılaştırılabilirler. İnsan vücudunda bulunan 200 hücre tipine de farklılaşabilirler (3,24).

2)Yetişkin Kök Hücre (YKH): Doğum sonrasında organizmalarda farklı dokularda bulunabilen multipotent kök hücrelerdir. Hematopoetik ve mezenkimal kök hücreler en çok çalışılan gruplarıdır. Hematopoetik kök hücreler (HKH) embriyonik dönemde oluşmaya başlar, daha sonra kemik iliğinde gelişerek organizmanın bütün kan hücrelerini oluşturur (3,24). HKH'lerin elde edildikleri kaynaklar; kemik iliği, periferik kan ve umblikal kord kanıdır.

Mezenkimal kök hücre (MKH), HKH'nin keşfinden sonra, 1970 yılında Friedenstein ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir. Yaptıkları çalışmada, fare kemik iliği stromasını başka bir dokuya nakletmiş ve burada stroma hücrelerinin yağ, kıkırdak, kemik ve retikulum hücrelerine dönüşebildiğini göstermişlerdir (3). Böylece kemik iliğinde hematopoetik olmayan öncü hücrelerin var olduğu anlaşılmıştır. Bu hücreler fibroblast kolonisi oluşturan birim (CFU-F; colony forming unit-fibroblast) etkinliğiyle ölçülerek fibroblastların öncüsü hücreler olarak tanımlanmıştır.

MKH'ler, kemik iliği stromasının önemli hücre gruplarından birisidir (23). MKH'lerin kaynağı mezoderm tabakasıdır. Bu yüzden bağ ve destek dokunun temel hücrelerine dönüşebilirler (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Mezenkimal kök hücre farklılaşmaları (25).

Uluslararası Hücresel Tedavi Derneğine (ISCT: International Society of Cellular Therapy) göre MKH'lerin sahip olması gereken özellikler aşağıda sıralandığı gibidir;

1) Hücreler kültür kabının zeminine yapışmalıdır.

2) CD105(+), CD73(+) ve CD90 (+) olmalı ancak HKH belirteci olan CD45, CD34, CD14, CD11b ve CD19 belirteçleri (–) olmalıdır. Ayrıca HLA-DR (İnsan lökosit antijeni)' yi de ifade etmemelidirler.

3) In vitro ortamda kemik, yağ ve kıkırdak hücrelerine farklılaşabilmeleri gerekmektedir.

MKH'ler vücudumuzda birçok dokudan izole edilebilir. Örneğin; kemik iliği, adipoz doku, plasenta, umblikal kord kanı, amniyotik sıvı ve diş pulpasından üretilebilirler (Tablo 2.1.).

Tablo 2.1. MKH'lerin elde edildiği kaynaklar ve farklılaşma kapasiteleri (26).

MKH'nin elde edildiği başlıca yetişkin dokular	**MKH'lerin farklılaşabildiği hücre/doku tipleri**
Kemik iliği	Kemik, kıkırdak, tendon, kas, adipoz doku, sinir hücresi
Adipoz doku	Kemik, kıkırdak, tendon, kas, adipoz doku, sinir hücresi
Plasenta	Kemik, kıkırdak, kas, sinir hücresi
İskelet kası	Kemik, kıkırdak, düz ve çizgili kas, sinir hücresi
Saç folikülü	Deri, düz kas, adipoz doku
Beyin	Kas, sinir hücresi

MKH'lerin en önemli özelliklerinden bir tanesi ımmun düzenleyici olmalarıdır. MKH'lerin sahip oldukları bu özellik sitokinlerin indüklemesi ile ortaya çıkar. Ayrıca, MKH'ler immun sistem homeostazını devam ettirmek için ımmun baskılayıcı molekülleri de ifade ederler (27).

MKH'lerin T hücreler ile olan etkileşimleri özellikle klinik uygulamalarda önemlidir. Örneğin, HKH nakli sırasında oluşan Graft Versus Host hastalığında, MKH'ler sayesinde yan etkiler en aza indirilir. T hücreleri tarafından salgılanan IFN-Ɣ, MKH'ler tarafından inhibe edilir. (27).

MKH'ler sahip oldukları farklılaşma kapasiteleri ve ımmun baskılayıcı özellikleri sayesinde, son yıllarda klinik çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır. Ancak, MKH'lerin ımmun baskılayıcı özellik gösteriyor olması, tümörlerin ımmun sistemden kaçmasını da kolaylaştırabilir. MKH'lerin kanserlerin ilerlemesine olan etkisi ile ilgili çalışmalar, bunun sebebinin MKH'lerin ımmun sistemdeki bütün hücreler ile olan etkileşiminden kaynaklandığını göstermektedir (28). Bu konu ile ilgili çalışmalar devam etmektedir.

2.4. Kemik İliği (Kİ) Mikroçevresi

Kök hücrelerin özel bir ortamda (mikroçevre-niş) bulundukları ilk olarak memelilerdeki hematopoetik kök hücreler ile yapılan çalışmalarda ortaya çıkmıştır. Kök hücre nişinin tanımı ilk kez Schafield tarafından 1978'de yapılmıştır. Kemik iliğinde bulunan hücreler farelerin dalağına verildiğinde hematopoez ile ilgili olan hücre klonları oluşturdukları gözlenmiştir. Kök hücre nişi adı verilen bu bölgeler, kök hücrelerin doku hasarında harekete geçerek onarımda yer almalarını ve sayılarının korunmasını sağlar (3). Niş ile kök hücrelerin etkileşimi sonucu hücre kaderi belirlenir. Kök hücrelerin birbirleriyle veya komşu hücreler ile sinyalizasyonu nişteki kök hücrelerin özelliklerini belirler. Kök hücre nişinin temel görevleri;

1) Nişte bulunan kök hücreleri farklılaşmamış düzeyde tutmak
2) Nişte bulunan kök hücrelerin sayılarını artırmak
3) Hasarlı dokunun onarım süreçlerine katılmak
4) Hücreleri korumak

Kök hücrelerin niş bölgesinde; niş hücreleri, kök hücreler, damarlar, vasküler niş bölgesi (kemik iliğinde), sinir uzantıları ve hücreler arası matriks vardır. Kemik iliği nişinde bulunan makrofajlar, T lenfositler, osteoblastlar ve gliya hücreleri kök hücrelerin oradaki yerleşimini artırır ve etkinlik kazanmalarını destekler.

Kök hücreler nişte 3 şekilde bulunabilirler; sessiz, kendini yenileme sürecinde veya kararlanma aşamasında. Kök hücrelerin bu üç durumdan hangisine geçeceği üzerine hücre içinden ve dışından gelen sinyaller ya da hücrede bulunan genler, transkripsiyon faktörleri ve epigenetik mekanizmalar etkili olabilir (3).

HKH'lerin nişte sessiz kalması için bazı uyaranlar gereklidir. Ayrıca, HKH'lerin kendini yenileme mekanizmalarında Wnt/beta-Catenin, Notch-1 ve HOX genleri önemlidir. Eğer bu sistemlerde bir hata olursa, tümör oluşumu gerçekleşir ve öncül hücreler bölgeyi kaplar ve iyileşme safhasından sonra tekrar nişe dönerek sessiz hale geçerler.

HKH'ler için 2 farklı niş vardır; osteoblastik niş ve vasküler niş. Osteoblastik niş, HKH'lerin sessiz oldukları dönem için önemlidir. Özellikle enfeksiyon, radyasyon

ve kematerapötik ilaçlardan bu nişte korunurlar. MKH'lerden gelişen osteoblastlar bu nişin temel elemanıdır (29). Vasküler niş ise HKH'lerin çoğalması, farklılaşması ve göçünden sorumludur. Hematopoetik öncül hücrelerin bu nişte toplanması fibroblast büyüme faktörüne bağlıdır (30).

2.4.1. Akut Lenfoblastik Lösemide Kemik İliği Mikroçevresi

Kanser gelişiminde genetik, epigenetik ve çevresel faktörler ile birlikte kemik iliği mikroçevresi de büyük bir öneme sahiptir. Son yıllarda yapılan araştırmalar, kanser hücrelerinde hücresel intrinsik değişikliklerin yanı sıra kanser hücresi ile tümör mikroçevresinin etkileşiminin de hastalığın patogenezi açısından önemli olduğunu göstermektedir. Kanserin ilerlemesi için; kanser hücrelerinin çoğalması, lokal yayılım göstermesi, metastaz yapması ve immün sistemden kaçması gerekir. Bunların gerçekleşmesinde tümör mikroçevresi önemli rol oynar (31).

Vücudumuzda organların fonksiyon gören parankim kısımları ve bunlara destek olan stromaları vardır (32). Normal şartlarda, stromanın görevi tümör oluşumuna karşı bariyer oluşturmaktır. Fakat vücutta tümör hücrelerinin oluşması sonucunda, stroma yapısı kanser oluşumunu destekleyen bir çevreye dönüşebilir (33).

Kemik iliği büyük kemiklerin ortasında bulunan süngerimsi yumuşak dokudur (Şekil 2.2.). Vücuttaki ana görevi kan yapımıdır. Bu kadar önemli olan bu doku, herhangi bir nedenden dolayı işlevini yitirdiğinde bazı hastalıklar ortaya çıkabilir. Bu hastalıklardan önemli bir tanesi de lösemidir. Kemik iliği ürettiği sitokin ve büyüme faktörlerinden dolayı kanser hücre yerleşimi için uygun bir mikroçevredir. Akut lösemiler kemik iliği blastlarının sayısının artması ile karakterizedir. Bunun sebebi, nişin bozulması sonucu blastların dolaşıma daha fazla ve kolayca geçişidir. Böylece normal hematopoetik kemik iliği nişi bozulmuş olur (34).

Kanser hücrelerinin yerleşim için kemik iliğini tercih etme sebebi, sitokin ve büyüme faktörlerinin kemik iliğinde fazlaca bulunmasıdır. Vasküler niş periferik kan dolaşımına sadece olgun hücreleri vermekten sorumludur, ancak vasküler nişin bozulduğu durumlarda olgun hücre dışındaki hücreler de dolaşıma geçer (19).

2.5.Apoptoz

Apoptoz terimi ilk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından tanımlanmıştır. İlk tanımlaması "canlılarda hücre azalması" olarak yapılmıştır (35). Apoptoz (programlanmış hücre ölümü) fizyolojik veya patolojik olarak istenmeyen, zarar görmüş veya biyolojik ömrünü tamamlamış hücrelerin, komşu hücrelere herhangi bir zarar vermeden yok edilmesidir (4). Normal şartlarda apoptoz ile hücre ölümü fizyolojik durumlarda görülür. Dokuda herhangi bir hasar yoktur, sadece bölgesel olarak hücre kaybı vardır. Apoptoza gidecek olan hücreler sinyali aldıkları anda, hücrelerde genetik olarak bulunan apoptotik program devreye girer ve hücre ölümü başlar.

Hücrede apoptoz 4 fazdan oluşur.

1) Erken faz: Hücre dışı sinyalin hücre reseptörlerine bağlanmasıyla veya ilaçların-toksinlerin neden olduğu hücre içi uyarılar ile apoptotik cevabı tetikleyen ilk fazdır.

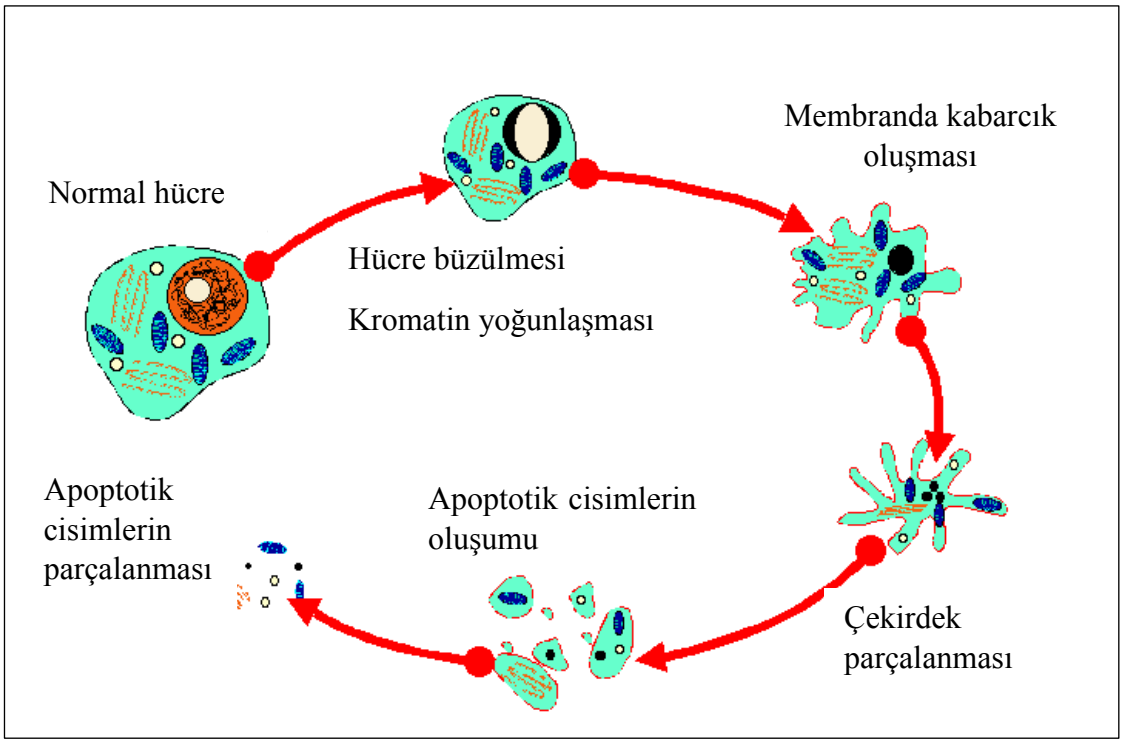
2) Sinyal transfer fazı: Sinyalin hücre ölüm efektör sistemine iletildiği fazdır.

3) Efektör fazı: Kaspaz sisteminin aktivasyonunun gerçekleştiği fazdır.

4) Hücre ölümünden sonraki faz: Hücrelerin DNA'larının bir ya da daha fazla nükleozom parçasına ayrılması, kromatin yoğunlaşması ve çekirdek parçalarına ayrılması sonrası hücrelerin fagositik hücreler tarafından tanınarak yok edildiği fazdır (36).

2.5.1. Apoptoz Sırasında Meydana Gelen Morfolojik Değişiklikler

Apoptotik süreç sırasında hücreler belirgin morfolojik değişiklikler gösterirler. İlk olarak hücreler yuvarlaklaşmaya başlar (37). Tipik olarak hücreler, hücre iskeletindeki filamentlerin parçalanmasını takiben büzüşmeye başlar. Çekirdekteki kromatinin apoptotik dağılımı genellikle nükleer yoğunlaşma benzeri bir görünüme yol açar (37). Hücreler küçülmeye devam eder ve hücrelerin makrofajlar tarafından uzaklaştırılması için organeller sıkıca paketlenir. Makrofajlar (fagositik hücreler), dokulardan apoptotik hücrelerin temizlenmesinden sorumludur ve bu da nekrotik hücre ölümüyle ilişkili problemlerin çoğunu önler (38). Apoptotik hücrelerin makrofajları aktifleştirebilmesi için hücrelerin, plazma membranı değişikliklerine maruz kalmaları gerekmektedir. Bu değişikliklerden biri, fosfatidilserinin hücre zarının iç kısmından dış yüzeye translokasyonudur. Apoptozun son aşamaları genellikle membran kabarcıklarının ortaya çıkması ve apoptotik cisimler olarak adlandırılan küçük keseciklerin görünümü ile karakterizedir (39) (Şekil 2.7).



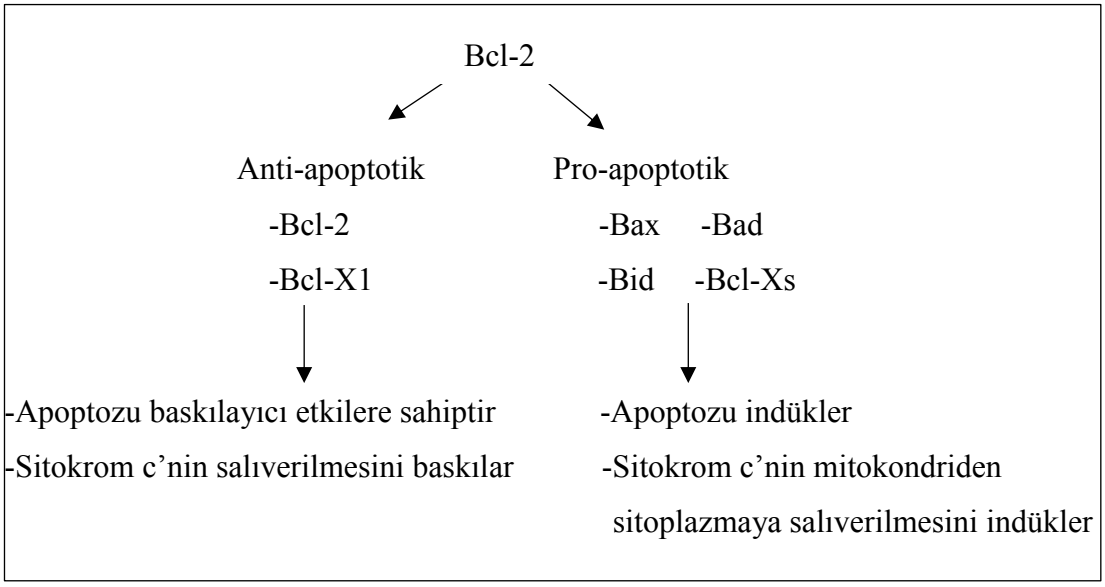
Şekil 2.7. Apoptoz aşamaları (40).

2.5.2. Apoptozun Moleküler Düzenleyicileri

Apoptoz mekanizmasında rol alan en önemli proteinler kaspazlar, Bcl-2 ailesi ve p53'dür.

1) Kaspazlar: Apoptoz mekanizmasında görev alan apoptotik kaspazlar, kaspaz 3-6-7-8-9 ve 10' dur. Bu kaspazlar hücre içerisinde inaktif formda bulunurlar ve aktifleşebilmeleri için hücrede ya T hücre granüllerinde bulunan aspartata özgü serin proteinazlar aracılığına ya da aktif olan kaspaz proteinin inaktif olan kaspaz ile etkileşimine ihtiyaç duyarlar (36). Reseptörlerin hücreler ile etkileşime girmesi sonucu apoptotik sinyaller tetiklenir ve bunun sonucunda başlatıcı kaspazlar aktive olur. Mitokondriye bağlı olan apoptotik sinyaller ise kaspaz 9'u aktive eder ve daha sonra bu kaspaz da kaspaz 3, 6 ve 7'yi aktifleştirir. Bu aktifleşme gerçekleştikten sonra, hücre iskeletinde ve hücre proteinlerinde yıkım gerçekleşir. DNA'da meydana gelen değişiklikler sonucu, hücrelerde morfolojik değişiklikler ortaya çıkmaya başlar (41).

2) Bcl-2 ailesi: Bu ailenin proteinleri apoptozun düzenlenmesinde ve kaspaz aktivasyonunda önemli role sahiptir (42). Bcl-2 ailesi birbirine zıt etkileri olan iki gruptan oluşur (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Bcl-2 protein ailesinin sınıflandırması (42).

3) p53: DNA hasarının tespit edilmesi ve apoptozun başlatılmasından sorumlu ana proteindir. Hücrelerin büyümesini kontrol eder ve potansiyel kanser hücrelerinin apoptoza giderek ölmelerini sağlar. Bcl-2 proteinin ifadesini azaltarak apoptozu indükler (43,44).

2.5. 3 Apoptoz Mekanizması

Hücreler çeşitli hücre ölüm uyaranları (kemoterapi, HIV, büyüme faktörü eksikliği, hücre yaşlanması ve radyasyon vb.) tarafından tetiklenerek iki farklı yol ile apoptoza giderler. Bu yollardan bir tanesi, hücre içi uyaranlar ile tetiklenen mitokondri aracılı apoptoz olarak isimlendirilen intrinsik yoldur. Diğeri ise hücre dışı ölüm uyaranları ile indüklenen reseptör aracılı apoptoz olarak adlandırılan ekstrinsik yoldur (45).

2.5.3.1. İntrinsik Yol (Mitokondri Aracılı Apoptoz)

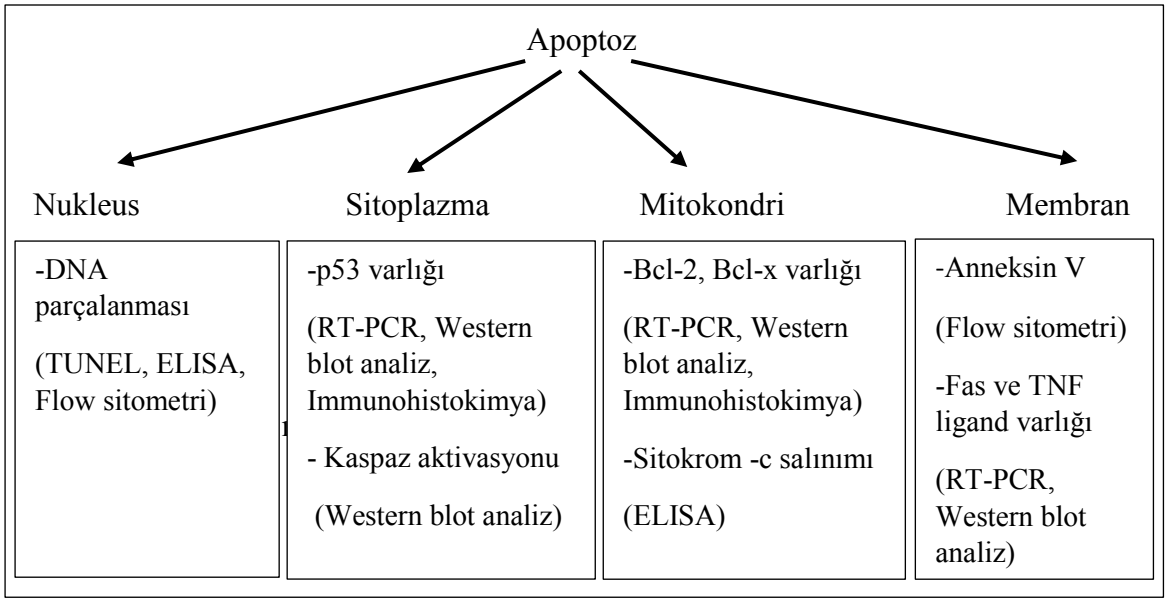
Bu yolun temel özelliği, mitokondri dış membran geçirgenliğinde meydana gelen artıştır. Pro-apoptotik ve anti-apoptotik moleküllerin işlevlerindeki bozulma mitokondri membran geçirgenliğini etkiler (46). Mitokondri membranlarının geçirgenliğini, başta Bcl-2 ve Bcl-x olmak üzere Bcl ailesi proteinleri sağlar. Hücreye yönelik stres sonucu hücrenin yaşamsal işlevlerinin yitirildiğini algılayan pro-apoptotik protein olan Bax ve Bad aktive olur. Bu proteinlerin oluşturduğu oligomerler mitokondrilerin membranlarına saplanıp sitoplazmaya açılan kanalları oluştururlar. Böylece mitokondri geçirgenliği artar. Açılan aralıklardan sitoplazma içine sitokrom-c ile birlikte diğer pro-apoptotik moleküllerin de sızıntısı başlar. Serbestleşen sitokrom c ile apoptotik proteaz aktive eden faktör 1 (Apaf-1) bağlanarak apoptozom adı verilen büyük kompleksi oluşturur. Bu yapı da diğer kaspazları aktive eder ve bunun sonucunda apoptozun temel özelliklerinden biri olan kromatin yoğunlaşması ve DNA parçalanması meydana gelir (39).

2.5.3.2. Ekstrinsik Yol (Reseptör Aracılı Apoptoz)

Apoptozu tetikleyen ölüm reseptörleri 'tümör nekrozis faktör (TNF)' ailesi üyeleri Fas ve TNF-R1 genleridir. Ölüm reseptörleri etkilerini, sitoplazmada bulunan hedefler ile protein-protein etkileşimlerine yol açarak gösterirler. TNF ya da Fas ligandları hücredeki kaspaz sistemini aktive eder. Bunun sonucunda ölüme sebep olan sinyal kompleksi (death- inducing signalling complex: DISC) oluşur. Oluşan bu sinyal kompleksinin önemi; prokaspaz 8'in effektör ölüm bölgesi (death effector domain: DED) ile birleşerek aktif kaspaz 8'i oluşturmasıdır. Kaspaz 8 oluştuktan sonra lenfositler gibi prokaspaz 3'ü aktive ederek hücre ölümüne sebep olabilirler (47,48).

2.5.4. Apoptoz Belirleme Yöntemleri

Apoptoza giden hücrelerin belirlenmesinde kullanılan çeşitli yöntemler vardır (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Apoptoz belirleme yöntemleri (49,50).

2.5.4.1. Annexin V/ PI ile Apoptoz Tayini

Apoptozun erken dönemlerinde hücre zarının bütünlüğü korunur ancak zamanla zarda bulunan fosfolipidlerin asimetrisi kaybolur. Normal hücrede plazma membranın iç kısmında bulunan fosfolipid bağlayan bir protein olan Annexin V hücre yüzeyinde bulunan fosfotidilserine bağlanır. Bu yöntem ile birlikte ölü-canlı hücre ayrımı yapılabilmesi için aynı zamanda propidyum iyodür (PI) ile boyama yapılması ile daha sağlıklı sonuçlara ulaşılabilir. Diğer vital boyaların bağlanmasından daha kısa sürede sonuç verir.

Bu yöntemin en büyük avantajı, hücrede nükleer değişiklik meydana gelmeden, hücre zarındaki değişiklikleri ölçebilmesidir (51). Aynı zamanda diğer yöntemlere göre uygulaması daha kolaydır ve daha güvenilir sonuçlar verir. Hazırlık aşamasında fiksasyon, uzun süreli yıkamalar ya da hücre membranına delikler açılması için reaktif kullanılmasına gerek yoktur (52).

2.5.5. Apoptoz ve Kanser İlişkisi

Apoptoz, belirli moleküler işlemler sonunda hücrenin ölümünü sağlar. Bu mekanizmanın hücrede belirli bir dengede devam etmesi gerekir. Hücreler zamanında ve gerekli sayıda ölmelidir. Mutasyonlar veya çevresel etkiler sonucu hızlanmış ya da yavaşlamış olan apoptoz patolojiktir. Eğer hücrelerde apoptoz çok hızlı gerçekleşiyorsa, gerekenden fazla hücrenin ölümüyle atrofi meydana gelir ya da apoptoz olması gerekenden yavaş gerçekleşiyorsa, istenmeyen hücreler bazı bölgelerde birikerek kanser oluşumuna neden olur.

Kanser, normal bir hücrenin malign olana dönüştüğü bir dizi genetik değişimin bir sonucudur. Kanser oluşumunda önemli olan temel olaylar, hücre büyüme sinyallerinin kontrol mekanizmasında meydana gelen bozukluklar ve kanser hücrelerinin hücre ölüm mekanizmalarını devre dışı bırakarak apoptozdan kaçmalarıdır. 1970'lerin başlarında, Kerr ve arkadaşları apoptozisi potansiyel olarak malign hücrelerin, hiperplazi ve tümör progresyonunun ortadan kaldırılmasına bağlamışlardır. Dolayısıyla, azalmış apoptoz karsinojenezde hayati bir rol oynar.

Malign bir hücrenin apoptoz veya apoptoz direncinde azalma elde etmesinin birçok yolu vardır. Genel olarak, apoptoza neden olan etkenler aşağıdaki gibidir (53).

1) Pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin bozulması: Kanser hücreleri sıklıkla anti-apoptotik Bcl-2 aile proteinlerini ifade ederek veya stabilize ederek hücrelerin apoptozdan kaçışına yardımcı olur. Örneğin, Bcl-2 geninin prostat kanseri, meme kanseri, küçük hücreli akciğer karsinomu ve melanoma gibi solid tümörlerde ifadesi gözlenir. Pro-apoptotik Bcl-2 aile üyelerini ise transkripsiyonel veya trans-transkripsiyonel olarak inhibe eder (54).

2) Tümör baskılayıcı gende meydana gelen değişiklik: Apoptoz ile kanser ilişkisindeki en önemli tümör baskılayıcı gen, apoptozda önemli bir kontrol proteini olan p53'tür. Bu gende meydana gelen herhangi bir mutasyon veya fonksiyon kaybı sonucu kanser oluşabilir (53).

3) Değişmiş kaspaz fonksiyonu: Kaspaz proteinlerinde görülen herhangi bir mutasyon ve malignite arasında ilişki olduğu gösterilmiştir. Örneğin, Kaspaz-3 geninde meydana gelen homozigot delesyon sonucu meme kanseri oluşumu gözlenmiştir (53).

Apoptoza karşı belirgin bir dirence ek olarak, kanser hücreleri değiştirilmiş metabolik profillerle de karakterize edilir. Yapılan çalışmalar, bu metabolik değişkenliğin kanser hücresi sağkalımı, istilası ve metastazında önemli bir rol oynadığını güçlü bir şekilde göstermektedir. Metabolizma, apoptotik mekanizmaları doğrudan veya dolaylı olarak düzenleyebilir ve kanser hücreleri apoptozdan kaçınmak için değiştirilmiş metabolizmayı kullanabilir (54).

2.6. Otofaji

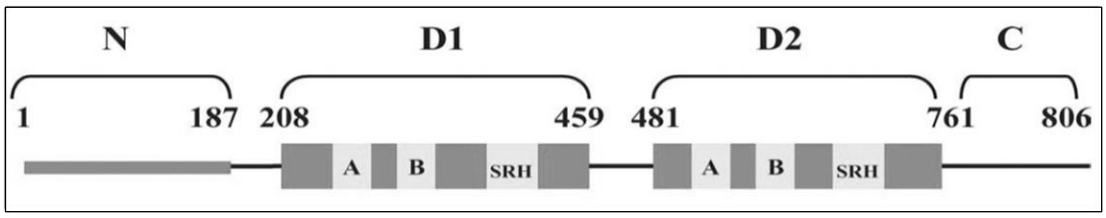
Otofaji, hasarlı organellerin ve makromoleküllerin lizozomlar tarafından parçalanması sürecidir. Hücrelerin kendi kendine yıkımının bir yoludur. Hücre homeostazını korumak için gereklidir, aynı zamanda mikroorganizmaların ve tümörlerin ortadan kaldırıldığı immunite ve patofizyolojik süreçlerde de yer alır.

Otofaji, apoptozun amaçlarına ve süreçlerine ters düşer. Hücre ölümünü tetiklemek yerine hücre sağ kalımını destekler. Otofaji, endoplazmik retikulum (ER) stresinin neden olduğu apoptozu sınırlandırıp yanlış katlanmış proteinleri sindirerek ER fonksiyonunu sürdürür. Ayrıca hücre hayatını uzatan organeller ve proteinler gibi büyük moleküllerin sindirimi yoluyla hücrelere enerji ve besin sağlar. Otofaji, hücreler metabolik strese, ilaç tedavisine ve radyasyon hasarına maruz kaldığında gen bütünlüğünü korumak için önemli bir mekanizmadır. Bu nedenle, kanser hücrelerinde otofajinin inhibisyonu, tümör hücrelerinin radyoterapi ve kemoterapiye olan duyarlılığını artırabilir (55).

p62 ve LC3B otofaji sürecinin en önemli moleküleridir. Son zamanlardaki çalışmalar, p62 ve LC3B'nin tümör oluşumu ve tümörün progresyonu ile yakın bir ilişkiye sahip olduğunu göstermektedir. Hücrelerin özellikle sitoplazmasında ve nadiren de perinükleer membran kısmında ifade edildikleri bilinmektedir (56,57).

2.7.p97/Valosin İçeren Protein (VCP)

p97/VCP, tip II AAA+ATPaz ailesinden bir proteindir ve AAA domaini olarak isimlendirilen iki ATPaz domainine sahiptir (8,58). p97/VCP, iki tane ATPaz domaini (D1 ve D2), N-terminal domaini (N) ve C-terminal domaini (C) olmak üzere dört ana domainden oluşmaktadır (Şekil 2.10). D1 ve D2 domainleri, p97/VCP'nin şaperon aktivitesinden, N terminal domaini poliübikütin 13 zincirlerine bağlanma ve substrat tanınmasından sorumludur.



Şekil 2.10. p97/VCP'nin yapısal domainleri (59).

p97/VCP hücre içinde übikütin-proteazom sistemine (UPS) bağlı proteolizde önemli fonksiyonlara sahip olan bir şaperon proteindir. Bu proteoliz, p97/VCP'nin, übikütin ve kofaktörleri ile ilişkisine bağlıdır. Ayrıca p97/VCP, hücre döngüsünün

gelişimi (60), mitoz sonrası membran kaynaşması ve iğ ipliklerinin ayrılması (61), yanlış katlanmış proteinlerin ER'den geri atılımı (62), proteazomda poliübikütinlenmiş proteinlerin yıkılması (63,64) ve transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu gibi birçok mekanizmada rol almaktadır (65,66).

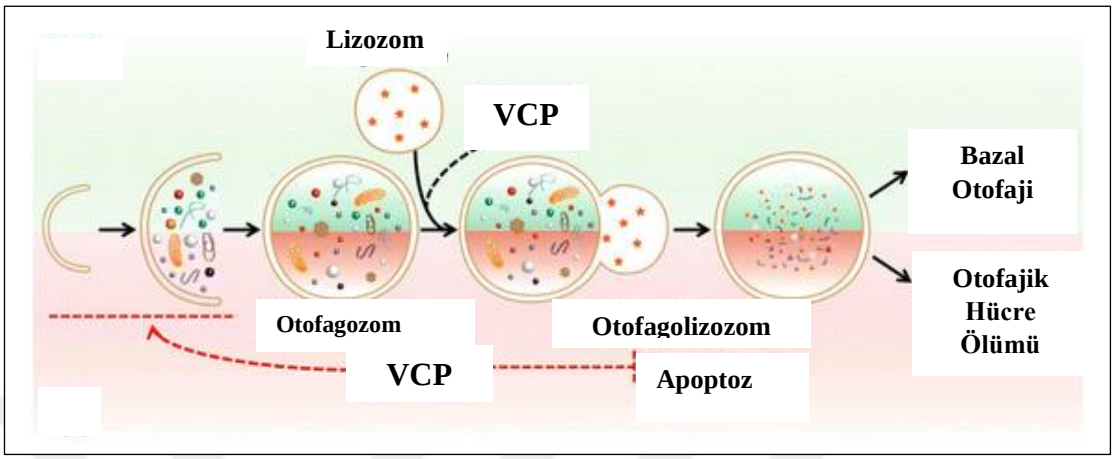
İnsan otofaji sistemlerinin son zamanlardaki proteomik ağ analizi, p97/VCP 'nin otofaji ile ilişkili proteinlerle etkileşimini ortaya koymaktadır. Son yıllarda yapılan araştırmalar, p97/VCP'nin übikütin proteinlerinin etkileşimi aracılığıyla endoplazmik retikulum lümeninde veya zarında lokalize olan yanlış katlanmış proteinlerin ortadan kaldırıldığı süreçte endoplazmik retikulum ilişkili yıkıma (Endoplasmic reticulum-associated degradation/ERAD) aracılık ettiğini göstermektedir. p97/VCP sitoplazmada oluşan yanlış katlanmış proteinlerin temizlenmesi için gerekli olan otofaji yolağında önemli rol oynamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, p97/VCP' nin ayrıca DNA replikasyonu ve onarımı, hücre bölünmesi ve gen transkripsiyonu gibi süreçlerde de önemli rol oynadığı gösterilmiştir (67).

2.7.1. p97/VCP'nin Apoptoz ve Otofaji ile ilişkisi

p97/VCP'nin bilinen en önemli özellikleri otofagozom olgunlaşmasında, otofajide ve apoptoz mekanizmasındaki rolleridir. Otofaji, hücre içerisinde bulunan makro moleküllerin ve organellerin bir kesecik içine alınarak lizozomlara yönlendirilmesi ve lizozomla birleşerek burada parçalanmasına neden olan mekanizmadır. Apoptoz (programlanmış hücre ölümü), fizyolojik veya patolojik olarak istenmeyen, zarar görmüş ya da potansiyel olarak neoplastik hücrelerin uzaklaştırılmasında ortaya çıkan bir mekanizmadır. Bu tip hücre ölümü DNA'nın bir ya da daha fazla nükleozom parçalarına ayrılması, kromatin yoğunlaşması ve çekirdek parçalanması gibi özel şekilsel değişikliklerle karakterizedir. Apoptozun başlatılması ve baskılanması vücutta düzenleyici sinyal ağları tarafından kontrol edilir (4).

Literatürde yer alan çalışmalar özellikle tümör dokularında, poli-ubikütin proteinlerin birikmesi sonucu yanlış katlanmış proteinlerin, endoplazmik retikulum sitoplazmasına geçtiğini ve bu bölgede biriken poli-ubikütin proteinlerinin p97/VCP

ifadesi için bir sinyal görevi gördüğünü göstermektedir (68). Bu proteinlerin bozulması sonucu otofaji mekanizması ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. p97/VCP'nin apoptoz ve otofaji ilişkisi (69).

p97/VCP direk olarak apoptoz mekanizmasında görev alan bir protein değildir. p97/VCP aktivasyonunun inhibitör ile durdurulması sonucu apoptoz mekanizması devreye girer. p97/VCP'nin DBeQ ile inhibisyonu sonucu ERAD ve otofaji yolağı inhibe olur. Bu sayede hücrelerde parçalanma ve aktif kaspaz 3 formu ve kromatin yoğunlaşması ile birlikte apoptoz gözlenmektedir (69).

2.7.2. p97/VCP ve ALL ilişkisi

p97/VCP' nin kanser hücrelerinde fazla ifade edildiği bilinmektedir. Ancak ALL de p97/VCP' nin rolü ile ilgili yapılan çalışma sayısı sınırlıdır. Yapılan bir çalışmada önce p97/VCP' nin köpek lenfoma hücrelerindeki ifadesi gösterilmiş daha sonra da p97/VCP'nin inhibitörü sayesinde kanser hücrelerinde apoptoz meydana geldiği ve bu sayede kanser hücrelerinin sayısının azaldığı gösterilmiştir (67).

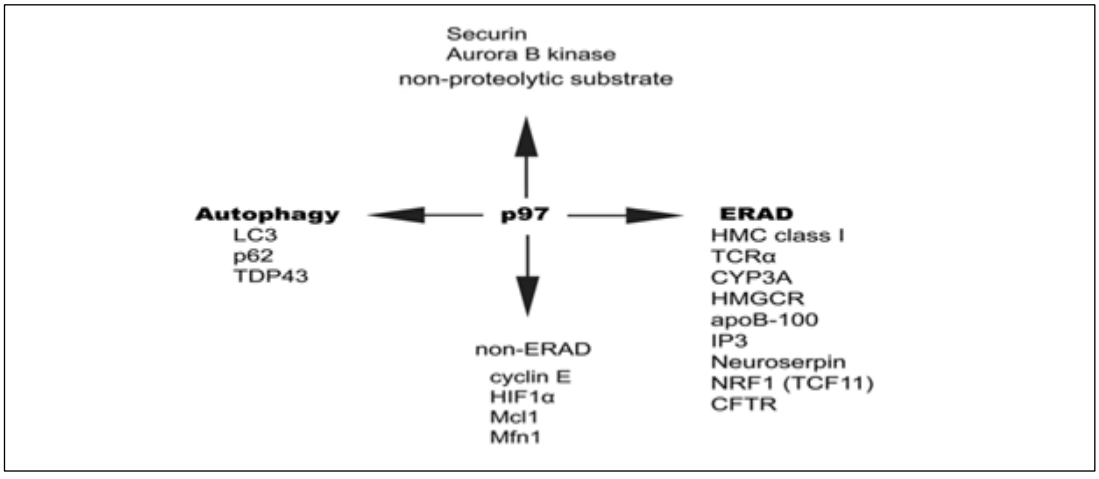
Literatürdeki bir diğer çalışmada ise 10 tane B-ALL insan hücre hattında p97/VCP ifadesi ve inhibitörü olan CB-5083'ün verilmesinin etkisine bakılmış ve birçok hücre hattında CB-5083 sayesinde kanser hücrelerinde apoptoz meydana geldiği gösterilmiştir (9).

2.8. DBeQ (Dibenzylquinazoline-2,4-diamine)

p97/VCP inhibitörü olarak bilinen DBeQ (dibenzylquinazoline-2,4-diamine), kanser hücrelerindeki büyümeyi durduran ve hedef kanser hücrelerini apoptoza götüren bir maddedir (70). DBeQ kanser hücrelerinin büyümesini güçlü bir şekilde inhibe eder ve yürütücü kaspazlar 3 ve 7'yi harekete geçirmede bir proteazom inhibitöründen daha hızlıdır.

DBeQ hem ubikütin proteozom sistemini hem de otofaji mekanizmasını etkileyen özelliğe sahiptir (70), bu da DBeQ'yu diğer proteazom inhibitörlerinden ayıran en önemli özelliktir. Kanser tedavisinde proteazom inhibitörlerinin kilit mekanizmalarının, ERAD'ı bloke etme kabiliyetleri olduğu bilinmektedir. Proteazom inhibisyonuna yanıt olarak otofaji yedek mekanizma olarak indüklendiğinde, p97/VCP'nin kanser hücrelerini öldürmek için etkili bir yaklaşım olabileceği düşünülmektedir. p97/VCP' nin bilinen substratları 4 kategoriye ayrılmıştır. DBeQ, substratların ERAD ve otofaji yolları içinde bozulmasına etki eder (Şekil 2.12) (70).

Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucu, proteazom inhibitörlerinden farklı olarak DBeQ'nun ön plana çıkmasındaki önemli etkenlerden birisi, DBeQ' nun hücreler üzerinde herhangi bir toksik etkisinin olmamasıdır.



Şekil 2.12. p97/ VCP substratları (70).

3.MATERYAL ve YÖNTEM

3.1.Çalışma Grubunun Seçilmesi

Bu çalışma, Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Yenimahalle Eğitim Araştırma Hastanesi Etik Kurulu tarafından incelenmiş olup, kurulun 21.11.2017 tarihli toplantısında gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına karar verilmiştir. (Onay/Protokol No:2017/54). Çalışmamız için Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi kemik iliği nakil ünitesine veya hematoloji bölümüne çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemi tanısı ile gelen hastalardan herhangi bir tedavi uygulanmadan önce kemik iliği örnekleri alınmıştır. Ayrıca hastalar seçilirken bilinen başka bir kronik rahatsızlığı olmamasına ve erkek veya kız cinsiyet farkı gözetmeksizin çocuk (18 yaşından küçük) olmasına dikkat edilmiştir. Sağlıklı vericiler ise, Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesinin kemik iliği transfer ünitesine (KİT) allojenik nakil için başvuran hastaların sağlıklı gönüllü vericilerinden seçilmiştir. Sağlıklı vericiler seçilirken, geçirilmiş ya da geçirmekte olduğu onkolojik hastalığı veya enfeksiyon olmamasına, kemik iliği örneği vermesine fiziksel ve tıbbi engel olmamasına dikkat edilmiştir. Sağlıklı vericilerden alınan gönüllü onam sonrasında kemik iliği nakli gerçekleştirilirken aynı prosedür içerisinde çalışmamız için de örnek alınmıştır.

3.1.1. Örneklerin toplanması

Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi kemik iliği nakil ünitesine veya hematoloji bölümüne çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemi tanısı ile gelen hastalardan herhangi bir tedavi uygulanmadan, tanı amacıyla alınan kemik iliği örneğinden 2-4 ml Kök Hücre İşleme ve Saklama Laboratuvarına gönderilmiştir. Aynı şekilde nakil için kemik iliği nakil ünitesine yatan sağlıklı vericilerden de ameliyathane ortamında krista iliaka posterior superiordan (Şekil 3.1) alınan kemik iliği örneğinden 2-4 ml çalışmamız için ayrılmıştır.



Şekil 3.1. Ameliyathane ortamında kemik iliği örneklerinin toplanması.

3.2. Mononükleer Hücrelerin İzolasyonu

1) Kök hücre işleme ve saklama laboratuvarına gelen kemik iliği 2300 rmp'de 10 dakika santrifüj edilerek plazması ayrıldıktan sonra baştaki örnek miktarı kadar PBS (Phosphate Buffer Saline) (Biochrom, Almanya) ile seyreltilmiştir.

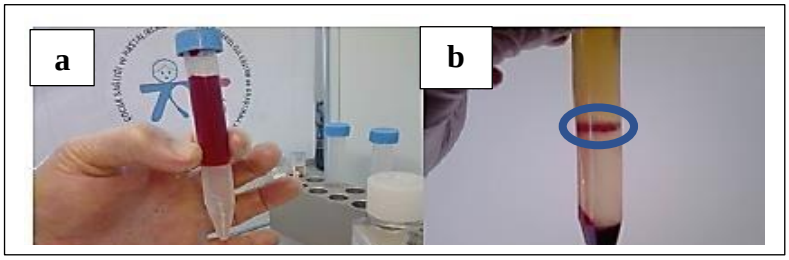
2) Bu ürünün total miktarı kadar fikol (Biocoll, Biochrom, Almanya) boş bir tüpe alınmış ve seyreltilen ürün yavaşça fikolün üzerine eklenmiştir (Şekil 3.2a).

3) Kemik iliği içerisindeki mononükleer hücreler (MNH) santrifüj cihazının frensiz modunda 2000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilerek izole edilmiştir. Orta kısımda toplanmış olan MNH tabakası toplanarak yeni bir tüpe aktarılmıştır (Şekil 3.2b).

4) Fikolu uzaklaştırmak için ortama 5-10 ml PBS eklenerek 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek yıkama işlemi yapılmıştır.

5) Falkon tüpünün dibinde kalan hücreler üzerine 5 ml PBS eklenerek sayım işlemi yapılmıştır. Sayım sonucuna göre yaklaşık $30x10^6$/ml olan hücreler T25'lik flasklara 5 ml büyüme besiyeri ile birlikte ekilmiştir.

6) Dondurulacak olan MNH'lerin bulunduğu kryo-tüpün içerisine Dulbeco's Modified Eagle Medium Low Glucose (DMEM-LG) (Biochrom, Almanya), %20 Fetal bovine serum (FBS) (Biochrom, Almanya) ve %10 Dimetil sülfoksit (DMSO) (Origen, İsveç) içeren dondurma (freezing) solüsyonu eklenerek isopropil alkol içeren polietilen kutular kullanılarak, kademeli bir şekilde 24 saat – 80 ºC de bekletildikten sonra -196 ºC sıvı azot tanklarına alınmıştır.



Şekil 3.2. MNH izolasyonu a) mononükleer hücre tabakasının ayrışması için fikol eklenmesi b) santrifüj sonrası mononükleer hücre tabakasının ayrışması.

3.3.Örneklerin Çözülmesi

1) Kriyovialler azot tankından alındıktan sonra, dondurma solüsyonu büyüme besiyeri içeriğinde DMSO bulunmasından dolayı hücre canlılığını düşürmemek amacı ile çözme işlemi 37 ^{o}C su banyosunda hızlı bir şekilde yapılmış ve dondurma solüsyonu ortamdan uzaklaştırılmıştır.

2) Çözülen ürün yeni bir tüpe alınarak dondurma solüsyonunu ortamdan uzaklaştırmak için 10 ml PBS eklenip 2300 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

3) Santrifüj sonrası üstteki kısım dökülüp, dipte kalan hücre peleti üzerine 2-3 ml PBS eklenerek hücre sayımı yapılmış ve sayım sonucuna göre hücreler işleme alınmıştır.

3.4. Mezenkimal Kök Hücre (MKH) Ekimi ve Pasajlanması

1) İzole edilerek sayımı yapılmış ve dondurulmuş MNH'ler çözülerek 25 cm^{2}'lik flasklara (T25) ekilmiştir. MKH'lerin üretilmesi için gerekli olan uygun ortam 5 ml büyüme besiyeri DMEM-LG, %20 fetal bovine serum, %1 antibiyotik (Penisilin-Streptomisin) (Biochrom, Almanya), eklenerek hazırlanan medyum ile sağlanmıştır ve flasklar 37 ^{o}C de %5'lik karbondioksit inkübatörü (Galaxy 170R, Eppendorf Company, Almanya) içinde bekletilmiştir (Şekil 3.3).

2) 12-48 saatlik inkübasyon sonunda mikroskopta flasklar kontrol edilmiştir. Kültür flaskı tabanına fibroblast benzeri yapışan hücrelerin olup olmadığı gözlenmiştir.

3) Yapışan hücreler gözlendikten sonra her 3 günde bir kültür besiyeri değiştirilmiştir ve bu işlem hücreler kültür kabınının zeminini doldurana kadar devam etmiştir. Buradaki amaç adeziv olmayan hematopoetik hücrelerin ortamdan uzaklaştırılmasıdır.

4) Yaklaşık iki haftanın sonunda, hücrelerin kültür kabını %80-100 oranında doldurduğu gözlenmiştir. Doygunluğa erişen hücreleri pasajlamak için önce kültür ortamından besiyeri uzaklaştırılmıştır ve daha sonra PBS eklenerek hücreler yıkanmıştır.

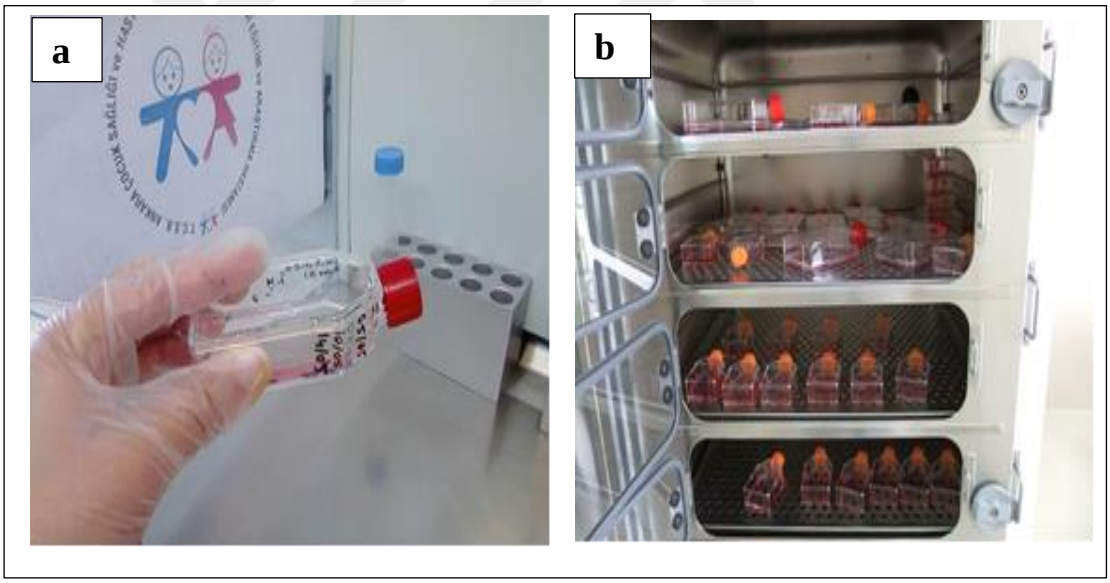
5) Kültür flaskına yapışan hücreleri kaldırmak için 4 ml %5'lik tripsin/EDTA (Biochrom, Almanya) eklenerek hücreler 5 dakika inkübatörde bekletilmiştir. Bu

aşamada hücrelerin yapıştıkları yüzeyden kalkıp kalkmadıkları invert mikroskopta kontrol edildikten sonra kalkmış olan tüm hücreler kültür flasklarından alınmıştır.

6) Tripsinin etkisini yok etmek için PBS ile yıkama işlemi yapılmıştır.

7) Tüpte toplanan MKH'ler 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatan kısımları dökülmüştür ve dipte kalan hücreler otomatik sayım cihazında (Beckman Coulter HmX-AL) sayılmıştır.

8) Sayım sonucuna göre 150.000 hücre T25 flaskta 5 ml medium içinde pasajlanmıştır. Hücreler %80-100 doygunluğa ulaştıklarında, bu hücreleri dondurarak saklamak için öncelikle, kryo-tüpün içerisine freezing medium, DMEM-LG, %20 FBS ve %10 DMSO içeren dondurma (freezing) solüsyonu eklenerek isopropil alkol içeren polietilen kutular kullanılarak kademeli bir şekilde 24 saat – 80 ºC de bekletildikten sonra -196 ºC sıvı azot tanklarına alınmıştır.

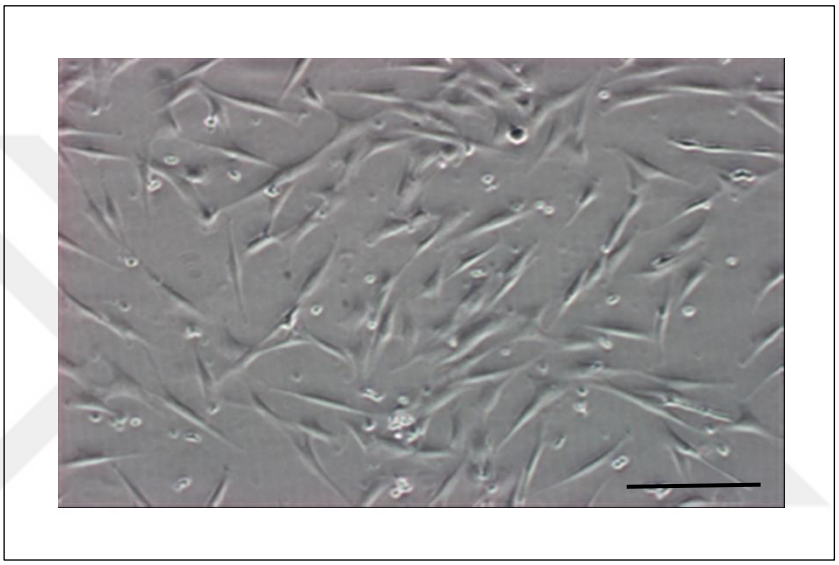


Şekil 3.3. MKH ekimi a) MKH'lerin kültür edilmesi
b) hücrelerin inkübatörde bekletilmesi.

3.5. MKH'lerin Karakterizasyonu

3.5.1. Morfolojik Analiz

MKH'lerin karakterizasyonunda öncelik hücrelerin yüzeye yapışabilmeleri ve iğsi morfoloji göstermeleridir. Hücrelerin morfolojik analizi için invert mikroskop (Olympus CKX41) kullanılmıştır (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. MKH'lerin invert mikroskop görüntüsü
Bar: 20 μm.

3.5.2. Farklılaşma Testleri

İzole edilen hücrelerin karakterizasyonlarının yapılması ve MKH olduklarının kanıtlanması amacı ile adipojenik ve osteojenik farklılaşma kapasitelerine bakılmıştır.

Adipojenik Farklılaşma

1) Pasaj 2 de dondurularak saklanan hücreler çözülerek T25'lik flasklara ekilip çoğaltılmıştır. Haftada 3 kez besiyeri değiştirilerek hücrelerin %90 yoğunluğa ulaşması sağlanmıştır.

2) Hücreler 5 ml PBS ile yıkanmış ve üzerlerine 2 ml adipojenik farklılaşma besiyeri (MesenCult Adipogenic Stimulatory Kit (Human), Stemcell, Kanada) eklenmiştir. İki günde bir kültür ortamı tazelenmiştir.

3) Üç hafta sonunda flasklardaki besiyerleri toplanarak hücreler PBS ile yıkanmıştır ve hücreler 5 ml %10 formol (Sigma, ABD) ile 1 saat fikse edilmiştir.

4) Fiksasyonun ardından formol uzaklaştırılıp, steril distile su ile yıkanmıştır. 5 ml %70 izopropanol (Sigma, ABD) konularak 5 dakika bekletilmiştir.

5) Ardından flaska 5ml Oil Red O (Sigma, ABD) boyası eklenerek 5 dakika oda ısısında bekletilmiş ve ardından distile su ile yıkama yapılmıştır.

6) Flaska 5 ml hematoksilen boyası (Merck) eklenerek 1 dakika oda ısısında tutulmuş, çekirdek boyanması sağlanmıştır. Hematoksilen ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra ortamın kurumaması için 5 ml distile su eklenmiştir.

7) Oil red O boyası ile kırmızı renkte boyanma ve hücre içerisinde yağ damlacıkları görülmesi adiposit farklılaşmasının kanıtı olarak kabul edilmiştir (37).

Osteojenik Farklılaşma

1) Pasaj 2 de saklanan hücreler T25'lik flasklara ekilip çoğaltılmıştır. Haftada 3 kez besiyeri değiştirilerek hücrelerin %90 yoğunluğa ulaşması sağlanmıştır.

2) Daha sonra hücreler 5 ml PBS ile yıkanmış ve kemik hücresine farklılaşması için 5 ml osteojenik farklılaşma besiyeri (MesenCult Osteogenic Stimulatory Kit, Stemcell, Kanada) eklenmiştir. İki günde bir kültür ortamı tazelenmiştir.

3) 3 hafta sonunda flasklardan besiyerleri toplanmış ve 5 ml PBS ile yıkama yapılmıştır.

4) Tespit için 5 ml %4 paraformaldehit (Sigma, ABD) ile 30 dakika oda ısısında fikse edilen hücreler distile su ile yıkanarak paraformaldehit ortamdan uzaklaştırılmıştır.

5)Flasklara 5 ml Alizarin Red boyası (Sigma, ABD) eklenerek 20 dakika oda ısısında bekletilmişlerdir. Ardından boya uzaklaştırılıp flasklar 5 ml distile su ile yıkanmıştır.

6)Alizarin red boyası ile koyu renkte kalsiyum depozitleri görülmesi osteojenik farklılaşmanın kanıtı olarak kabul edilmiştir (37).

3.6. Western Blot Analizi

Hücre veya dokulardaki spesifik bir proteini antikor kullanarak analiz etmemizi sağlayan semikantitatif tekniktir. Bu teknik sayesinde hücre veya dokulardaki proteinin varlığı /yokluğu ya da ilaç uygulamasına bağlı olarak protein ifadesinin artış/azalışına bakılabilir (71). Biz de bu teknik ile p97/VCP, p62 ve LC3B ifadelerine baktık. Bu teknik sırasında kullandığımız aşamalar aşağıdaki basamaklardan oluşmaktadır.

1) Western blot analizi için (DBeQ – ve DBeQ +) hücreler kültür sonrası homojenizasyon için ezilmiştir ve hücreler lizis solüsyonu (50 μM Tris-HCl; Merck, Darmstadt,150 μM NaCl, %1 NP-40; Sigma-Aldrich, Steinheim, pH 7.5) içinde sonikatör (Bandelin, Almanya) ile lizis edilmiştir.

2) Hücreler 10 dakika 4 ^{o}C de 13.000 devirde santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant korunup, pellet kısmı atılmıştır.

3)Süpernatant kısmına sample buffer (%20 SDS, 625 μM Tris, %9 β-Mercaptoethanol; Applicheim, Darmstadt, %0.3 bromphenol blue; Sigma-Aldrich, Steinheim, %50 gliserol) eklenerek dilüe edilmiştir ve sonra 95 ^{o}C de 5 dakika kaynatılıp jele yüklemek için hazır hale getirilmiştir.

4) Hazır jel Novex % 4-12 Bris-Tris Gel (NUPAGE, Invıtrogen) elektroforez tankına yerleştirilmiş ve jelde bulunan taraklar çıkarılmıştır. Jelin üzerini kapatacak şekilde Running buffer eklenmiştir. Örnekler jele yüklemeden önce kontrol amacıyla bir kuyucuğa marker yüklenmiş sonra örnekler yüklenmiştir.

5) Örnekler jele yüklendikten sonra güç kaynağı 150 V'a ayarlanarak 1 saat boyunca proteinlerin yürütülmesi sağlanmıştır.

6) Protein transferi için yarı-kuru transfer sistemi olan semidry blotlama (VWR) cihazı (Scis-Plas) kullanılmıştır. Cihaza ilk olarak ıslatılmış filte kağıt, sonra ıslak membran ve üstüne jel sonra tekrar filtre kağıdı yerleştirilmiştir. Jeldeki proteinlerin membranlara aktarılması için 150 miliamper de 1,5 saat blotlama yapılmıştır.

7) Blotlamanın bitiminde, jelden membrana transfer olan proteinler Ponceu boyası (Roth, Karlsruhe) ile boyanmış ve ardından distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra membran %5'lik süt tozu (Bio-Rad, Münchein) ile %0.1'lik Tween 20 (Roth, Karlsruhe) içeren PBS çözeltisi içinde 1 saat oda ısısında inkübe edilmiştir.

8) Belirlenen dilüsyon oranlarında hazırlanmış primer antikorlar olan p97/VCP (1:1500; ab11433, Abcam), p62 (1:750; ab56416, Abcam) ve LC3B (1:1000; ab48394, Abcam) ile gece boyu 4 ^{o}C de inkübe edilmiştir. Bu primer antikorların dışında ayrıca β-aktin (1:1500; ab8229, Abcam) bakılmıştır. β-aktin tüm insan hücre tiplerinde bulunan hücre iskeleti proteinidir. Tüm hücrelerde ifade edildiğinden Western blot gibi protein tespitini içeren analizler için bir yükleme kontrolü olarak kullanılır.

9) 1 gecelik inkübasyon sonrasında membran 3 kere %0.1'lik Tween 20 içeren PBS (Gibco) çözeltisi ile 5 dakika yıkanmıştır.

10) HRP-konjuge sekonder antikorlar (Anti rabbit 1:1500, Abcam; anti Mouse 1:2000, Abcam) ile 1 saat oda ısısında inkübe edilmiştir.

11)Inkübasyon sonrası membran 3 kere PBS ile yıkanmıştır. ECL (enhanced chemilüminisans) Western blot substrate kit (Abcam) ile membran 2-3 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Membran UVP görüntüleme cihazının içine yerleştirilerek oluşan bandlar görüntülenmiştir.

12) Western blot analizinin sonunda oluşan bandlar Image J programı ile okunmuştur. Program bilgisayara kurulduktan sonra analizi yapılacak olan Western görüntüsü seçilmiştir. İlk band dikdörtgen içerisine alınmış ve analiz kısmından jel sekmesi seçilmiş ve ilk bandı seç tıklanmıştır. İlk band için seçilen dikdörtgen sağa kaydırılmış ve ikinci band üzerine getirilmiş ve tekrar analiz kısmından jel sekmesi seçilerek bir sonraki bandı seç tıklanmıştır. Bu işlem sırasıyla bütün bantlar için tekrarlanmıştır. Bantların seçimi bittikten sonra, analiz kısmından jel sekmesi seçilmiş ve plot lines seçilerek her bir banda ait plot oluşması sağlanmıştır. Sonra programın menüsünde bulunan düz çizgi seçilerek oluşan plotların sınırları belirlenmiştir. Plotların içine

tıklanıldığı zaman yan tarafta sırasıyla rakamlar görülmüştür. Rakamlar excel programına aktarılarak analizleri ve grafik çizimleri yapılmıştır.

3.6.1. p97/ VCP Varlığının Western Blot Analizi İle Tespit Edilmesi

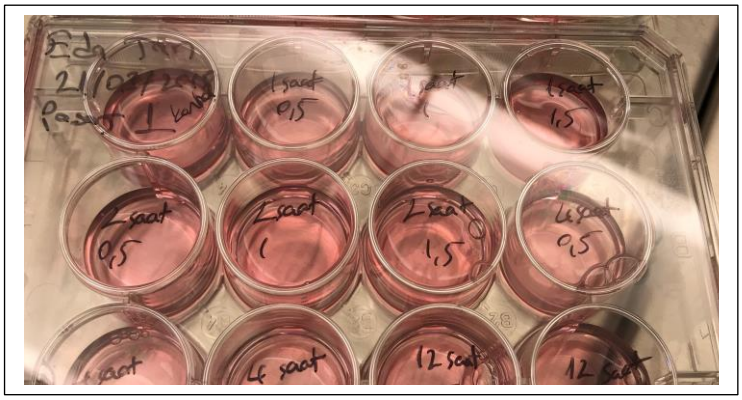
Daha önce yapılan çalışmalarda, kanserli dokularda p97/VCP ifadesinin varlığı tespit edilmiştir (67). Bu çalışma mevcut literatür bilgisi doğrultusunda, ALL hastaları ve sağlıklı vericilerdeki p97/VCP ifadesini görmek üzere planlanmıştır.

Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kök Hücre Laboratuvarında bulunan ALL hastaları ve sağlıklı vericilere ait kemik iliği örneklerinden ilk olarak Dansite-Gradient yöntemi ile mononükleer hücreler izole edilmiştir. Gelen örneğin bir kısmı mezenkimal kök hücrelerin üretilmesi amacıyla kültüre edilmiştir. Yaklaşık 15 gün devam eden hücre kültürü sonucu istenilen mezenkimal kök hücre popülasyonuna ulaşılmıştır. Daha sonra hem ayrılan mononükleer hücrelerde hem de üretilen mezenkimal kök hücrelerde p97/VCP ifadesini tespit etmek için Western blot analizi uygulanmıştır.

3.7. p97/VCP İnhibitörü Olan DBeQ İçin Etkin Doz ve Sürenin Belirlenmesi

1) En etkin DBeQ dozunun ve süresinin belirlenebilmesi için izole edilen hücrelerin 12'li kuyucuklara ekimleri yapıldıktan sonra, daha önceki çalışmalarda da bildirildiği şekilde farklı konsantrasyonlarda (5µM ve 10 µM) DBeQ (177355-84-9, Cayman Chemical Company) uygulaması yapılmış ve hücrelerin inhibitöre değişen zaman aralıklarında (1 saat, 2 saat ve 4 saat) maruz kalmaları sağlanmıştır (Şekil 3.5).

2) DBeQ ile etkileşim süresi biten kuyucuklardan medyumlar çekilip sonra 3 kere PBS ile yıkanmıştır.



Şekil 3.5. Hücrelere uygulanan DBeQ' nun süre ve doz bağımlı ilişkisinin incelendiği 12'li kuyucuk örneği.

3) Yıkama işlemi bittikten sonra, kuyucuğa 100 mikrolitre lysis buffer eklenerek hücrelerde bulunan protein kısmının ortaya çıkması için hücre kazıyıcı yardımı ile hücreler iyice ezilmiştir.

4) Daha sonra hücreler ependorf tüplere alınıp buzun üzerinde sonikatörden geçirilmiştir. Hücreler 4 ºC de14000 devirde 10 dakika santrifüj edilip, santrifüj sonrası süpernatan kısmı ayrılarak western-blot analizine hazır hale getirilmiştir.

5) Ubikutinlenmiş protein birikimleri, otofaji belirteçleri p62 ifadeleri açısından western blot yöntemi ile değerlendirilmiş ve optimum doz ve süre belirlenerek deneyin kalan kısımları için standardize edilmiştir.

3.8.İmmünofloresan Boyama

İmmünofloresan boyama, makromoleküllerin hücre içerisindeki lokalizasyonlarını incelemeye yardımcı olmaktadır. Hücrede saptanmaya çalışılan protein antijen, bu proteinin saptanması için yararlanılan protein ise antikordur. İşaretlenmeye çalışılan proteinin hücrenin neresinde olduğunu gösterebilen avantajlı bir yöntemdir. Bizde bu teknik ile p97/VCP, p62 ve LC3B lokalizasyonlarını inceledik. Bu teknik sırasında kullandığımız aşamalar aşağıdaki basamaklardan oluşmaktadır.

1) İmmunofloresan çalışmalar için, hücreler 12 kuyucuklu kültür kaplarında lameller üzerinde kültür edilmiştir.

2) Sağlıklı verici ve hasta gruplarına ait MKH'lere optimize edilen doz ve sürede DBeQ verilerek inkübe edilmiştir.

3) Daha sonra hücreler PBS ile 3 kere yıkandıktan sonra, 15 dakika %4'lük formaldehit ile tespit edilmiştir. Tekrar PBS ile yıkama yapılmıştır.

4) Fiksasyon sonrası istenmeyen antijenlerin bloklanması amacıyla süper blok kiti (Abcam) ile 1 saat bloklama işlemi yapılmıştır.

5) Bloklama sonrası tekrar PBS ile yıkama işlemi yapılmıştr ve lameller lama alınıp sınırlandırıcı kalem ile işaretlenmiştir.

6) Primer antikor olan p97/VCP (1:1500, ab11433, Abcam), p62 (1:500, ab56416, Abcam) ve LC3B (1:750, ab48394, Abcam) hazırlanıp, hücreler üzerine damlatılmış, gece boyu 4 ^{o}C de inkübe edilmiştir.

7) İnkübasyon sonrası 3 kere 5 dakika süreyle PBS ile yıkanıp, 1 saat oda ısısında uygun sekonder antikorlarla (Anti Mouse IgG Texas Red, Abcam, UK- 1:300, Anti Rabbit IgG FITC, Abcam, UK-1:300) (p97/VCP ve p62 -Texas Red, L3CB- FITC) ile muamele edilmiştir.

8) Fluoresan mikroskop incelemesi için inkübasyon sonrası floresan kapatma medyumu (fluroshield mounting medium with DAPI, Abcam) ile kapatılarak Olympus BX53 fluoresan mikroskop ve bağlı kamerası ile (Zeis Imager MZ) incelenip fotoğraflandırılmıştır.

9) Immunofloresan boyama sonucunda, hücrelerin özellikle sitoplazmalarında oluşan noktacıkların sayımı için Image J programı kullanılmıştır. Program bilgisayara kurulduktan sonra analizi yapılacak olan immunofloresan boyama görüntüsü seçilmiştir. Programda analiz kısmından da ölçüm sekmesi seçilmiştir. Dikdörtgen analiz alanı mikrografta bulunan ilk hücrenin sol üst köşesine konulmuş, sonrasında sağa doğru aynı hizada kaydırılmıştır. Hücrenin sağdaki bitiş sınırına gelinip o sıra tamamlandığında bir alt satıra geçerek o sıranın ölçümleri aynı şekilde soldan sağa

alınmıştır. Bu yöntemle hücrede taranmayan alan kalmayacak şekilde tüm yüzeyin ölçümü gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sırasıyla alandaki ölçümü yapılacak bütün hücreler için tekrarlanmıştır. Hücrelerin seçimi bittikten sonra, her bir hücrenin ölçülmesi sonucu rakamlar oluşmuştur. Rakamlar excel programına aktarıldıkdan sonra ortalamaları alınmıştır ve bakılan her bir protein için sitoplazmada ortalama olarak biriken noktaların sayımı belirlenerek grafik çizimleri yapılmıştır.

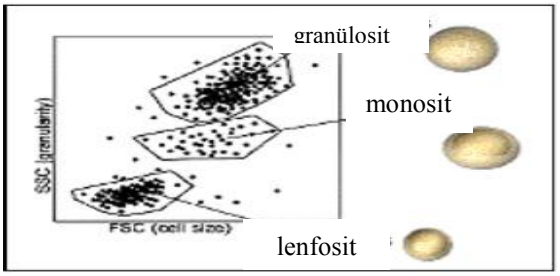
3.9. Flow Sitometri ile Apoptoz Tayini

Flow sitometri, hücrelerin akmakta olan bir akışkanın içindeyken karakteristiklerinin ölçülmesi temeline dayanır. Hücreler lazer ışığı ile aydınlatılmakta olan bir bölmeden geçirilir ve bu sırada hücrelerin ışığın önünden geçerken verdikleri sinyaller analiz edilir.

Flow sitometri üç ana sistemden oluşmaktadır. Sıvı sistem (hücrelerin lazere taşınması ve akış kısmı), optik sistem (ışık enerjisinin oluşması, ışık kaynağı ve filtreler) ve elektronik sistemdir (optik sinyallerin veri aktarımı ve bilgisayar).

Flow sitometride çalışılacak olan numuneler cihaza konur, ilgili antikorla işaretlen hücreler borudan geçerek lazer ışınından geçirilir ve hücreler ışık saçılımı ile floresans verir ve yüklerine göre ayrılırlar (72).

Flow sitometride oluşan grafikte, Forward Scatter (FSC) önden saçılımı ölçer ve hücre boyutunu gösterir. Side Scatter (SSC) ise yandan saçılımı ölçer ve granülariteyi gösterir. FSC ve SSC detektörlerinden elde edilen verilerle lökositlerin hücre büyüklüğü ve granülaritelerine göre kapılamaları gösterilmiştir (Şekil 3.6).

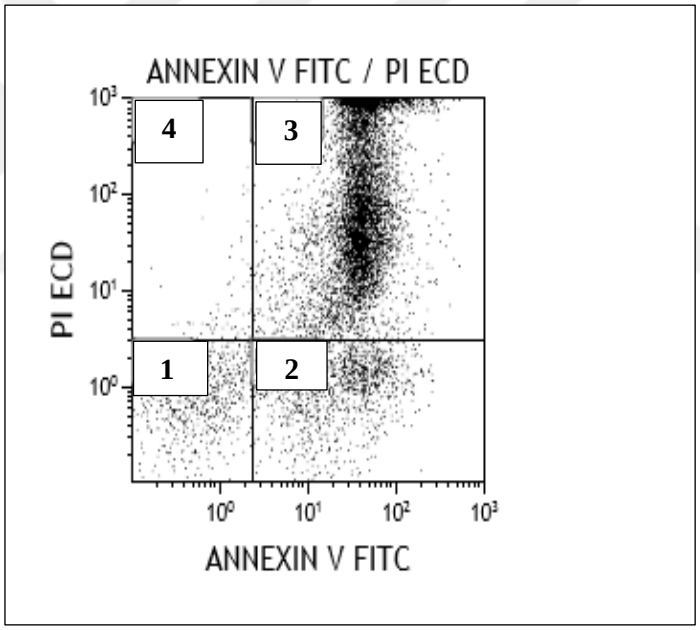


Şekil 3.6. Flow sitometride kapılama gösterimi (73).

3.9.1. Annexin V/ PI ile Apoptoz Tayini

Annexin V yöntemi apoptoz veya nekrozun belirlenmesinde kullanılan en yaygın yöntemlerden birisidir. Hücreler apoptoza girdiğinde, hücrelerin zarında bulunan fosfotidilserin hücre zarının dış kısmına transloke olmaktadır. Bu yöntem sayesinde, floresan bir madde olan Annevin V, fosfotidilserine bağlanarak apoptotik hücrelerin görünür hale gelmesini sağlamaktadır. Hücre ölümü indüklendikten sonra, hücreler Propidium Iyodür (PI) ile boyanır. Bu sayede ölü-canlı hücre ayırımı yapılmaktadır.

Bilgisayar programı ile hücreler analiz edilir ve grafik incelenir. Apoptoz sonucu oluşan grafik 4 farklı bölgeye ayrılır ve her bir bölge farklı özellikteki hücreleri gösterir (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Flow sitometride apoptoz tespiti için elde edilen grafiğin gösterimi.

1.Bölge: Annexin V-/ PI - → Canlı hücreler

2.Bölge: Annexin V+/ PI - → Erken apoptotik hücreler

3.Bölge: Annexin V+/ PI + →Geç apoptotik hücreler

4.Bölge: Annexin V-/ PI + → Nekrotik hücreler gösterilmektedir.

Çalışmamızda p97/VCP inhibitörü olarak kullandığımız DBeQ'nun MKH' leri ve MNH' leri apoptoza götürüp götürmediğini anlamak için flow sitometride Annexin V yöntemi ile apoptoz tespiti yapılmıştır. Bunun için Beckmann Coulter flow sitometri cihazına (Navios-Beckmann Coulter, CA, ABD) uygun Annexin V-FITC/PI apoptoz kiti (Beckmann Coulter, Fransa) kullanılmıştır. Apoptoz tayini için hücreler tüpe alınmış, PBS ile yıkandıktan sonra +4 ^{0}C 'de 1500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısımları dökülmüştür. Daha sonra kit içerisinde yer alan bağlayıcı tampon çözelti hücrelere eklenerek hücreler süspanse edilmiştir. 1 µl Annexin V-FITC ve 5 µl PI eklendikten sonra iyice karıştırılmış ve 15 dakika inkübe edilmiştir. 400 µl bağlayıcı tampon çözelti eklenip, örnekler 30 dakika flow sitometri cihazında değerlendirilmiştir.

3.10. İstatistiksel Analiz

Örnek sayısı az olduğu için herhangi bir istatistiksel analiz uygulanmamıştır. Sağlıklı verici ve hastaların MNH ve MKH' lerinde yapılan Western blot analizinde proteinlerin ifadelerinin oranlarına ve immunofloresan boyama sonucu biriken proteinlerin nokta sayılarına bakmak için Image J analiz sistemi kullanılmıştır. Grafiklerin çizimi için Excel programı kullanılmıştır.

4.BULGULAR

4.1.Çalışma Gruplarının Özellikleri

Çalışmamızda Kök Hücre İşleme ve Saklama Laboratuvarında standart dondurma protokolleri uygulanarak saklanan hasta bireylerin ve sağlıklı bireylerin kemik iliği örnekleri kullanılmıştır. Cinsiyet farkı gözetmeksizin 4-17 yaş aralığında bulunan hasta bireylerin ve 4-31 yaş aralığında bulunan sağlıklı bireylerin kemik iliği örnekleriyle çalışılmıştır. Hasta bireylerin % 40'ı (n= 4), sağlıklı bireylerin ise % 50' si (n= 5) erkektir.

4.2.Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu ve Çoğaltılması

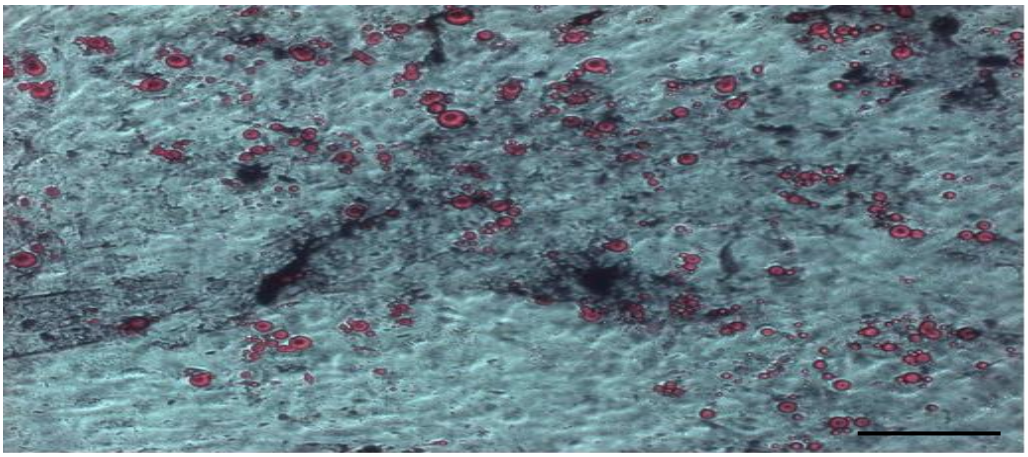
Çalışmamızda kültür ortamına bırakılan MNH'ler yaklaşık 14 gün sonunda kültür kabına yapışmışlardır. Yapışan fibroblast morfolojisindeki hücrelerin mezenkimal kök hücre olduğu düşünülmektedir. Bu hücrelerin MKH olduğunu kanıtlamak için karekterizasyon analizleri yapılmıştır. 14 günün sonunda yüzeye yapışan hücrelerin oranı %80-90 arasında gözlemlenmiştir. Üretilen MKH'lerin bir kısmı dondurularak -196 °C sıvı azot içerisinde saklanmıştır. Bir kısmı ise tekrar kültür edilmiştir ve böylece MKH'lerin sayıca çoğalması sağlanmıştır.

4.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Üretilen hücrelerin MKH olduğunu kanıtlamak için mutlaka karakterizasyonlarının yapılması gerekmektedir. Bunun için Uluslararası Hücresel Tedavi Derneğinin (ISCT/The International Society for Cellular Therapy) MKH'lerin karakterizasyonu için belirlediği kriterler kullanılmıştır (75). Bu kriterlere göre hücreler yüzeye yapışmalı, CD105(+), CD73(+) ve CD90 (+) olmalı ancak HKH belirteci olan CD45, CD34, CD14, CD11b ve CD19 belirteçleri (–) olmalıdır. Ayrıca HLA-DR (İnsan lökosit antijeni)'yi de ifade etmemeleri ve adipojenik ve osteojenik farklılaşma özelliği göstermeleri ile MKH olarak adlandırılabilirler. İlk aşamada kemik iliğinden izole edilen MNH'lerin kültürü sonucu üreyen hücreler yüzeye yapışmıştır ve böylece bu hücrelerin MKH olması için ilk koşul olan yüzeye yapışabilme özellikleri sağlanmıştır.

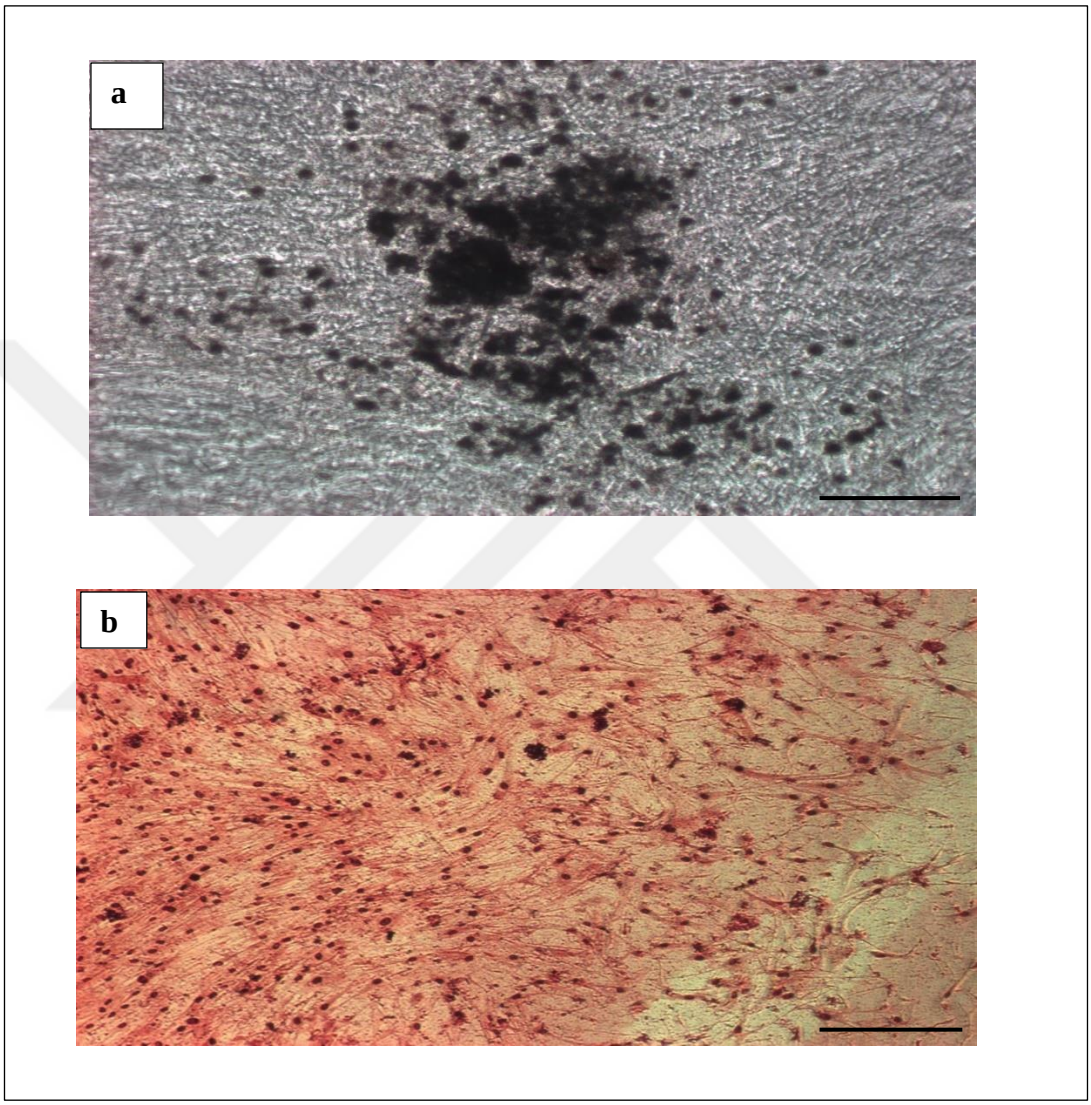
MKH karakterizasyonu için T25'lik flasklara ekilen ve üretilen hücrelerin adipojenik ve osteojenik farklılaşmaları morfolojik olarak analiz edilmiştir.

Adipojenik farklılaşma besiyerinde kemik iliği kaynaklı MKH'lerin morfolojik olarak yağ hücresine farklılaştığı görülmüştür. Yapılan Oil Red-O boyaması ile bu farklılaşma mikroskop altında gösterilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. MKH'lerin adipojenik farklılaşmasına ait ışık mikroskop görüntüsü. Boya: Oil-Red O / Bar: 20 μm.

Osteojenik farklılaşma besiyerinde kemik iliği kaynaklı MKH'lerin morfolojik olarak kemik hücresine farklılaştığı görülmüştür. Işık mikroskop ile yapılan morfolojik gözlem sonucunda kemik hücresine farklılaşan hücreler ve kalsiyum birikintilerinin Alizarin Red boyası ile boyandığı gözlenmiştir (Şekil 4.2).

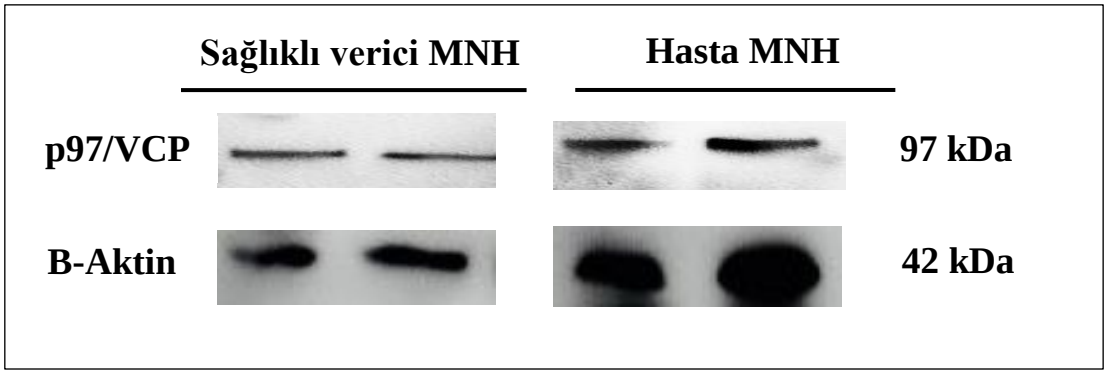


Şekil 4.2. MKH'lerin osteojenik farklılaşmasına ait mikroskop görüntüleri.
a) Boyasız b) Boya: Alizarin Red / Bar: 20 μm.

4.4.Western-Blot Analizinde p97/VCP Varlığının Tespit Edilmesi İle İlgili Bulgular

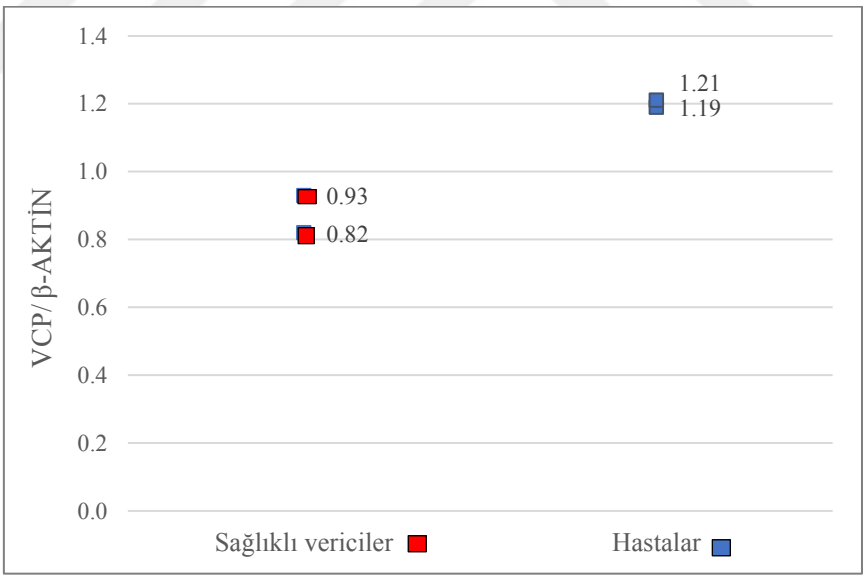
Literatürde yer alan bilgiye göre bir çok kanser türünde p97/VCP ‘nin yüksek olduğu saptanmıştır. Biz de çalışmamızda öncelikli olarak bunun ALL’de doğru olup olmadığını test etmek için, sağlıklı verici ve hasta grubuna ait mononükleer hücreler ve mezenkimal kök hücrelerde Western blot analizi ile p97/VCP varlığına baktık.

Çalışmanın bu aşamasında, p97/VCP’nin ALL hastalarının hücrelerinde de ifade edildiği gösterilmiştir. Ayrıca sağlıklı verici ve hasta grupları arasındaki karşılaştırma sonucu, ALL hastalarında sağlıklı vericilere kıyasla daha fazla p97/VCP ifadesinin olduğu da gözlenmiştir (Şekil 4.3 ve 4.5).

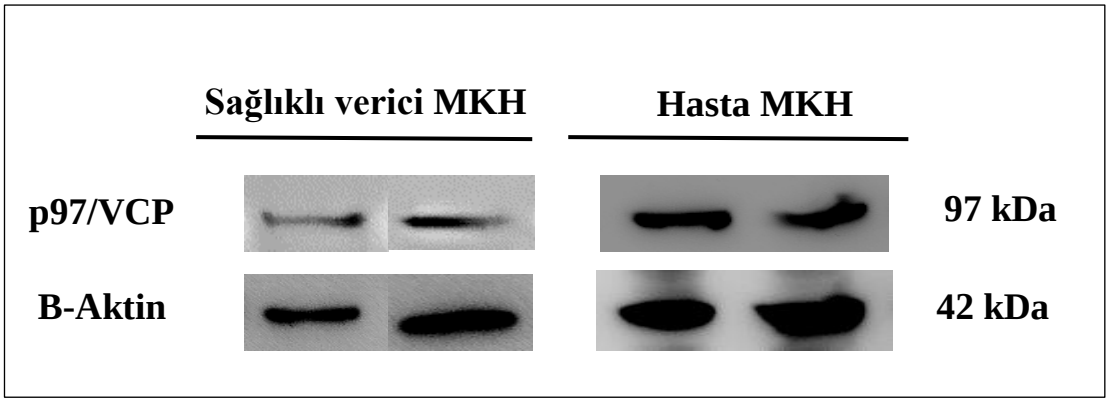


Şekil 4.3. Sağlıklı verici ve hasta gruplarına ait MNH' lerin Western blot analizinde p97/VCP ifadesinin sonuçları.

Sağlıklı verici ve hasta gruplarına ait MNH'lerin Western blot bantları Image J analiz programı ile okunmuştur. Her bandın değeri β-aktin bandının değeri ile orantılanmıştır (Şekil 4.4). Hasta grubuna ait MNH'lerde p97/VCP'nin sağlıklı vericilere göre daha fazla ifade edilidiği gözlemlenmiştir.

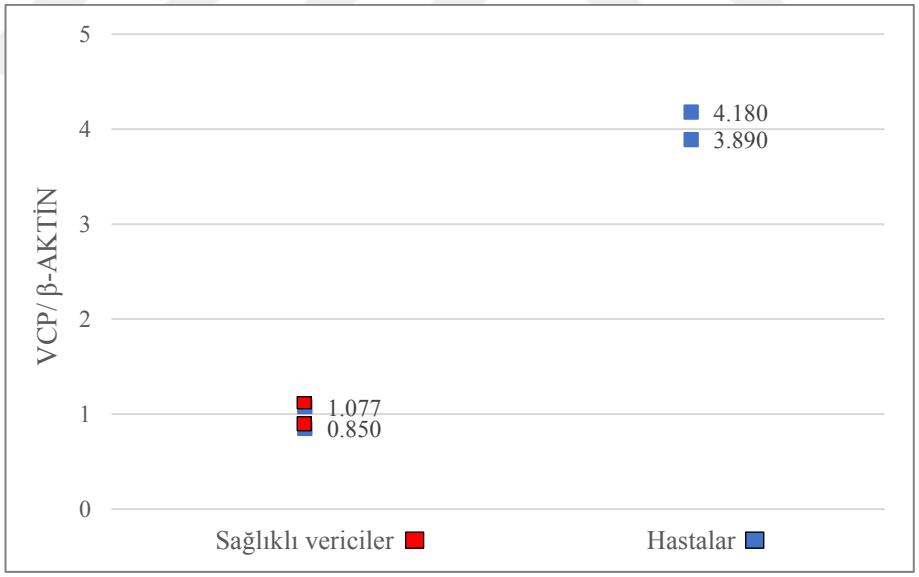


Şekil 4.4. Sağlıklı verici ve hasta gruplarına ait MNH' lerin p97/VCP ve β-aktin ifadelerinin Western blot sonuçlarının Image J analiz programı ile okunup orantılandırılması.



Şekil 4.5. Sağlıklı verici ve hasta gruplarına ait MKH' lerin Western blot analizinde p97/VCP ifadesinin sonuçları.

Sağlıklı verici ve hasta gruplarına ait MKH'lerin Western blot analiz bandları Image J analiz programı ile okunmuştur. Her bandın değeri β-aktin bandının değeri ile orantılanmıştır (Şekil 4.6). Hasta grubuna ait MKH'lerde p97/VCP'nin sağlıklı vericilere göre daha fazla ifade edildiği gözlenmiştir.

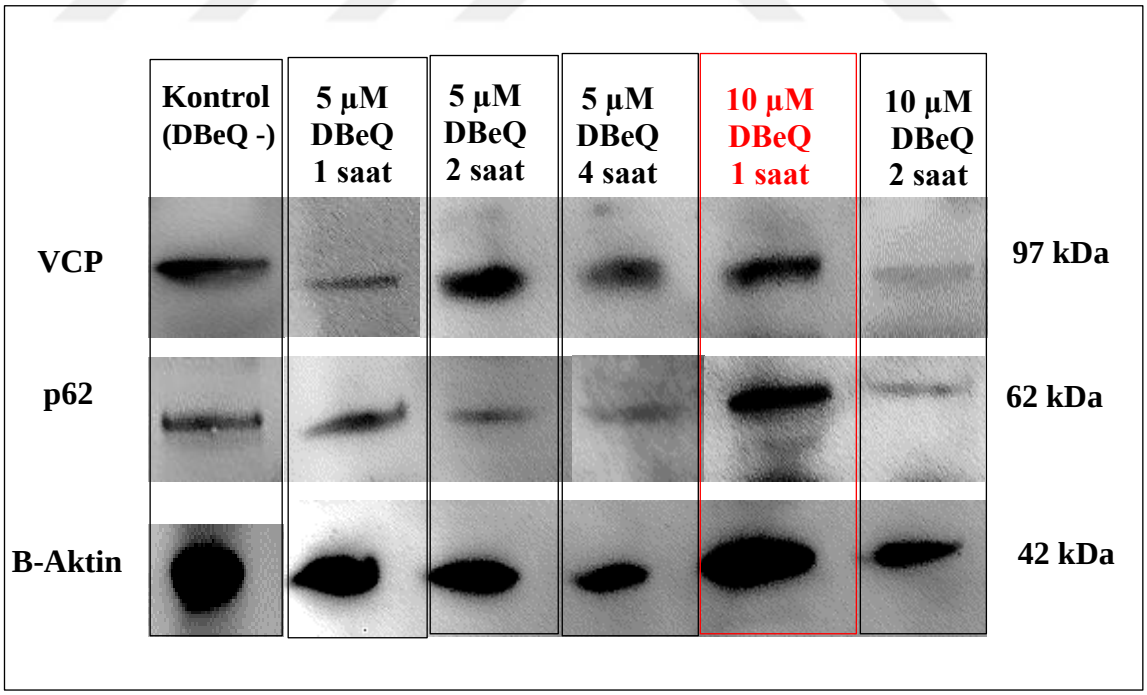


Şekil 4.6. Sağlıklı verici ve hasta gruplarına ait MKH' lerin p97/VCP ve β-aktin ifadelerinin Western blot sonuçlarının Image J analiz programı ile okunup orantılandırılması.

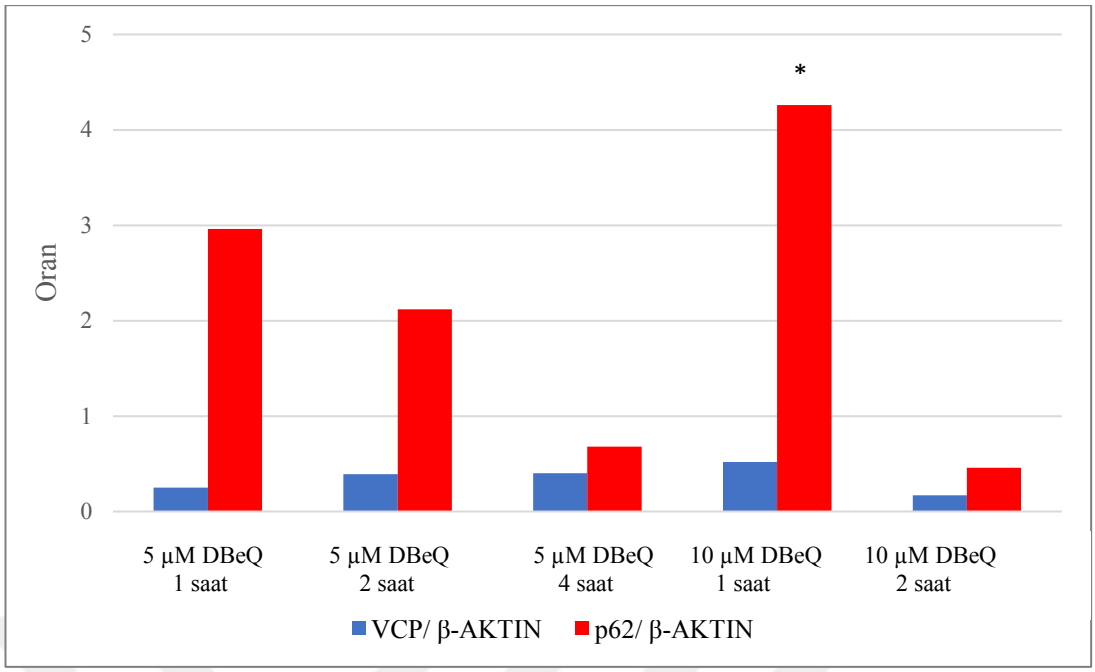
4.5. p97/VCP İnhibitörü Olan DBeQ için Etkin Doz ve Süre Belirlenmesinin Western-Blot Analiz Sonuçlarına İlişkin Bulgular

En etkin DBeQ dozunun ve süresinin belirlenmesi için sağlıklı vericiye ait MKH'lere ekildikleri flasklarda farklı konsantrasyonlarda (5 µM ve 10 µM) DBeQ uygulaması yapılmış ve inhibitöre değişen zaman aralıklarında (1 saat, 2 saat ve 4 saat) maruz kalmaları sağlanmıştır.

Hücrelerin verilen DBeQ'dan nasıl etkilendiklerini anlamak için Western blot analizi yapılmıştır. Aynı zamanda DBeQ'nun çalışma mekanizmasını doğrulamak için, p97/VCP'nin aktif olarak çalıştığı otofaji yolağındaki en önemli otofaji belirteçlerinden biri olan p62 ifadesine Western blot analizi ile bakılmıştır. Süre-doz çalışmasının sonucunda hücreler için en uygun dozun 10 µM, en uygun zamanın ise 1 saat olduğuna karar verilerek deneyin kalan kısımları için DBeQ dozu 10 µM süresi 1 saat olarak standardize edilmiştir.



Şekil 4.7. Aynı sağlıklı vericiye ait MKH'lerde DBeQ'nun doz ve süre çalışmasının Western blot analiz sonuçları.

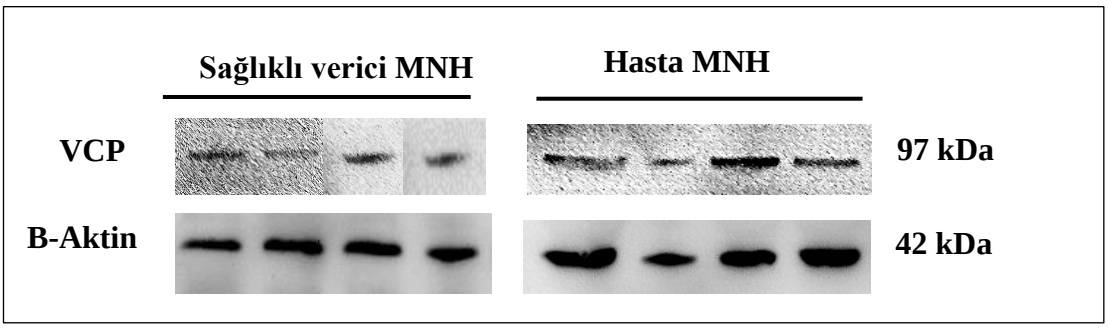


Şekil 4.8. Aynı sağlıklı vericiye ait MKH'lerin DBeQ doz ve süre çalışmasının p97/VCP, p62 ve β-aktin ifadelerinin Western blot sonuçlarının Image J analiz programı ile okunup orantılandırılması. (* ile işaretli olan sütun p97/VCP ve p62 ifadelerine bakıldığında en uygun olan dozun ve zamanın olduğu bandın değerini göstermektedir).

4.6. DBeQ Verilen Mononükleer Hücrelerde ve Mezenkimal Kök Hücrelerde p97/VCP, p62 ve LC3B İfadesinin Western-Blot Analizine İlişkin Bulgular

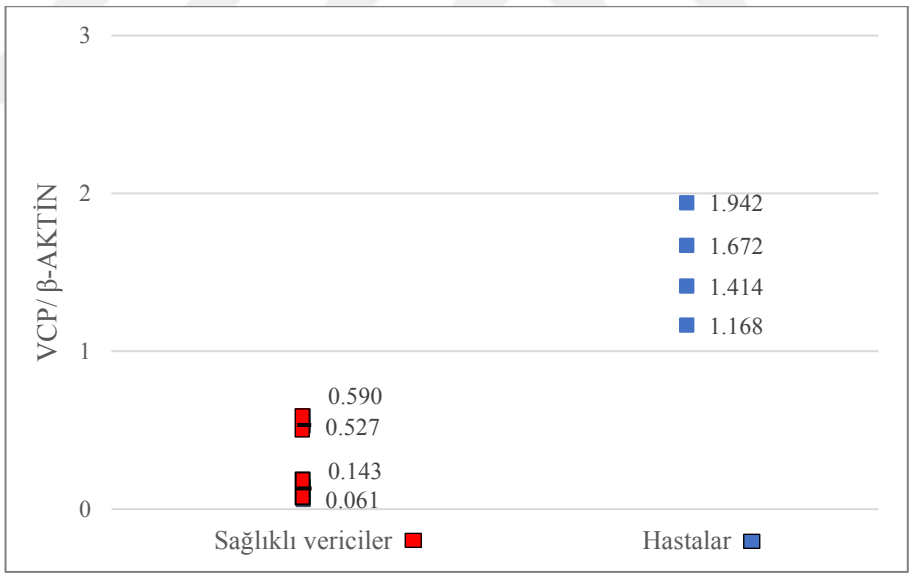
DBeQ verilmesine ilişkin optimizasyon işlemleri yapıldıktan sonra, her iki hücre grubuna DBeQ verilmiş ve p97/VCP ifadesinde meydana gelen değişikliklere Western blot analizi ile bakılmıştır (Şekil 4.9 ve 4.11).

DBeQ + ve DBeQ – gruplar kıyaslandığında Western blot bantlarında p97/VCP ifadesi açısından büyük bir farklılık gözlenmemiştir. Sağlıklı vericiler ve ALL hastaları arasındaki p97/VCP ifadeleri kıyaslandığında ALL grubunun p97/VCP ifadesinin daha fazla olduğu görülmüştür.



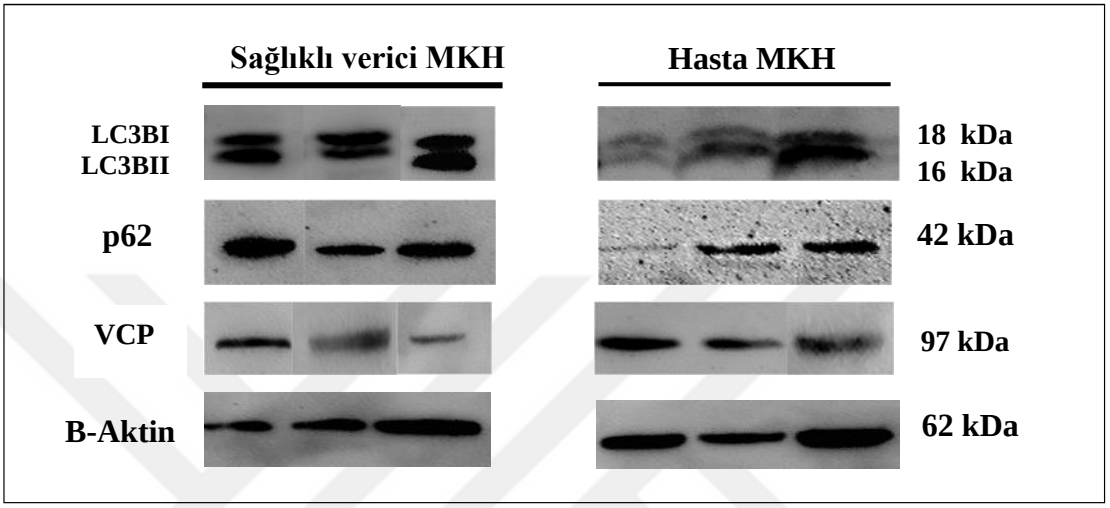
Şekil 4.9. Sağlıklı verici ve hasta gruplarına ait MNH' lerin Western-Blot analizinde DBeQ ile inhibisyon sonrası p97/VCP ifadesinin sonuçları.

Sağlıklı verici ve hasta gruplarına ait MNH'lerin Western blot analiz bandları Image J analiz programı ile okunmuştur. Her bandın değeri β-aktin bandının değeri ile orantılanmıştır (Şekil 4.10). Sağlıklı vericilerin ve ALL hastalarının p97/VCP ifadelerinde DBeQ verilmeden önce ve DBeQ verildikten sonra büyük bir farklılık gözlenmemiştir.



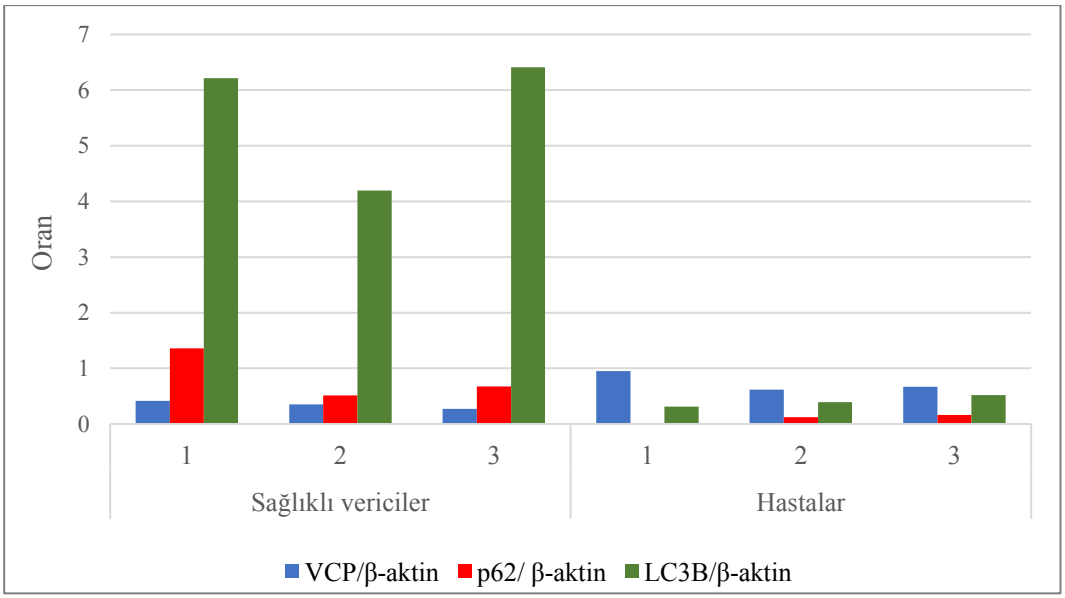
Şekil 4.10. Sağlıklı verici ve hasta gruplarına ait MNH' lerin DBeQ ile inhibisyonu sonrası p97/VCP ve β-aktin ifadelerinin Western blot sonuçlarının Image J analiz programı ile okunup orantılandırılması.

Sağlıklı verici ve hasta gruplarına ait MKH'lerin p97/VCP ifadeleri kıyaslandığı zaman, hasta MKH'lerinde daha yüksek p97/VCP ifadesi görülmüştür. Ayrıca hücrelerin DBeQ'dan etkilendiğini doğrulamak amacıyla p97/VCP ile aynı yolakta görev alan otofaji belirteçleri olan p62 ve LC3B ifadelerine de bakılmıştır (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Sağlıklı verici ve hasta gruplarına ait MKH'lerin Western blot analizinde LC3B, p62 ve p97/VCP ifade sonuçları.

Sağlıklı verici ve hasta gruplarına ait MKH'lerin Western blot analiz bandları Image J analiz programı ile okunmuştur. Her bandın değeri β-aktin bandının değeri ile orantılanmıştır (Şekil 4.12). p97/VCP ifadesinin fazla olduğu hasta MKH örneklerinde daha az p62 ve LC3B ifadesi gözlenmiştir.

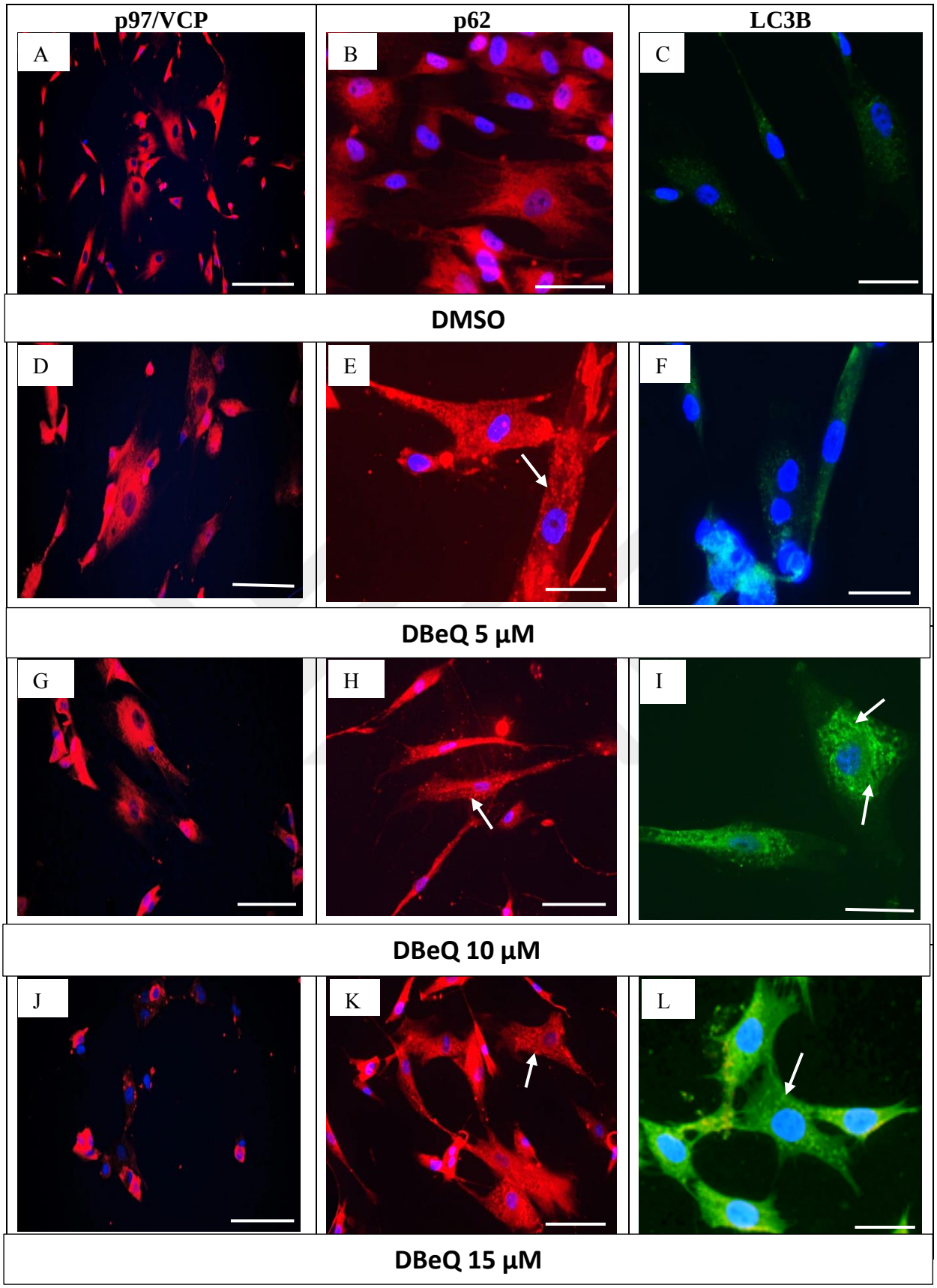


Şekil 4.12. Sağlıklı verici ve hasta gruplarına ait MKH' lerin p97/VCP, p62, LC3B ve β-aktin ifadelerinin Western blot sonuçlarının Image J analiz programı ile okunup orantılandırılması.

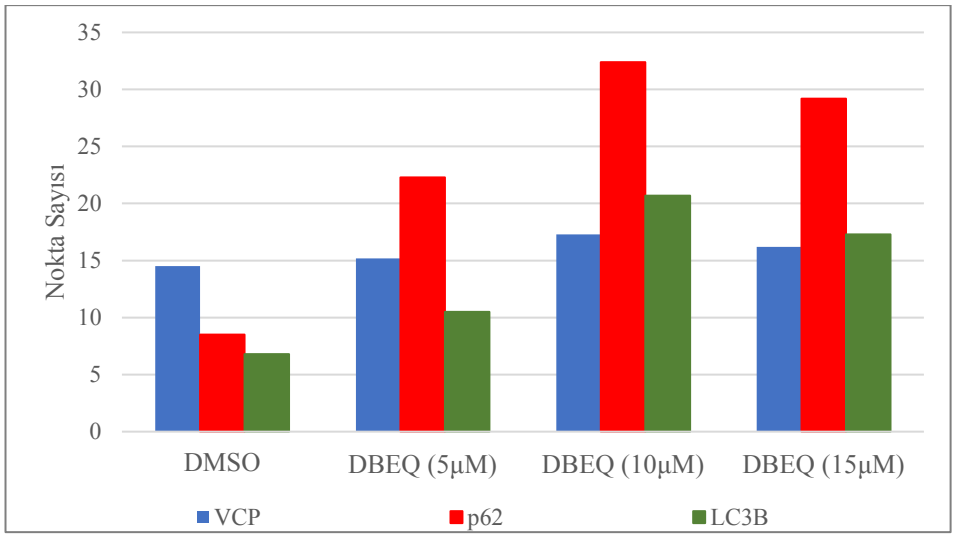
4.7. p97/VCP İnhibitörü Olan DBeQ için Etkin Doz ve Süre Belirlenme Deneylerinin Immunofloresan Boyama Sonuçlarına İlişkin Bulgular

En etkin DBeQ dozunun ve süresinin belirlenmesi için MKH'ler 12'lik kuyucuklara ekildikten sonra, farklı konsantrasyonlarda (5 µM, 10 µM ve 15 µM) DBeQ uygulaması yapılmış ve değişen zaman aralıklarında (1 saat, 2 saat ve 4 saat) inhibitöre maruz kalmaları sağlanmıştır. Daha sonra hücrelerin verilen DBeQ'dan nasıl etkilendiklerini anlamak için immunofloresan boyama analizi yapılmıştır.

İlk aşamada sağlıklı verici MKH'leri farklı dozlarda uygulanan DBeQ (5µM, 10 µM ve 15 µM) ile 1 saat inkübe edilmiştir. p97/VCP ile aynı otofaji yolağını kullanan p62 ve LC3B' nin nasıl etkilendiğine bakılmıştır (Şekil 4.13). DBeQ sayesinde p97/VCP'nin fonksiyonu baskılanınca, otofajik yolaktaki proteinlerin sitoplazmada birikimi başlamaktadır. Otofajide, p62 ve LC3B'nin sitoplazmada birikmesi genel olarak azalmış otofajik aktivite ve bozulmuş otofajinin işareti olarak kabul edilir (76). Optimum doz belirlenirken, sitoplazmada en çok protein birikimi olan 10 µM doz seçilmiştir.

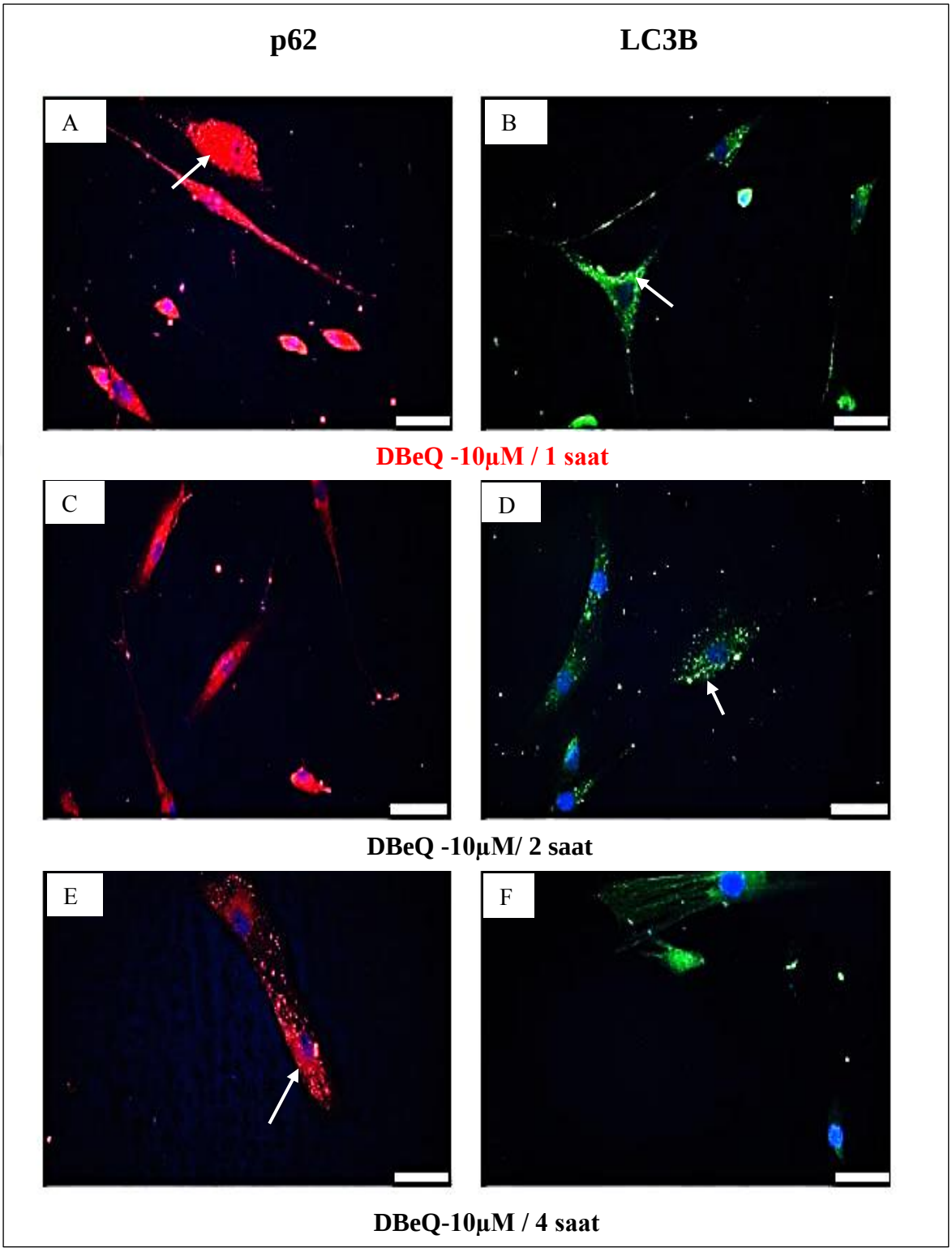


Şekil 4.13. Sağlıklı vericiye ait MKH'lerde aynı sürede (1 saat) farklı dozlarda verilen DBeQ'nun Immunofloresan boyama sonuçları (A-C DMSO; D-F DBeQ 5 µM; G-I DBeQ 10 µM; J-L DBeQ 15 µM). Ok: ilgili proteinin sitoplazmada birikimi. (Floresan belirteçleri; Kırmızı- Texas Red, Yeşil-FITC, Mavi- DAPI / Bar 5 µm).

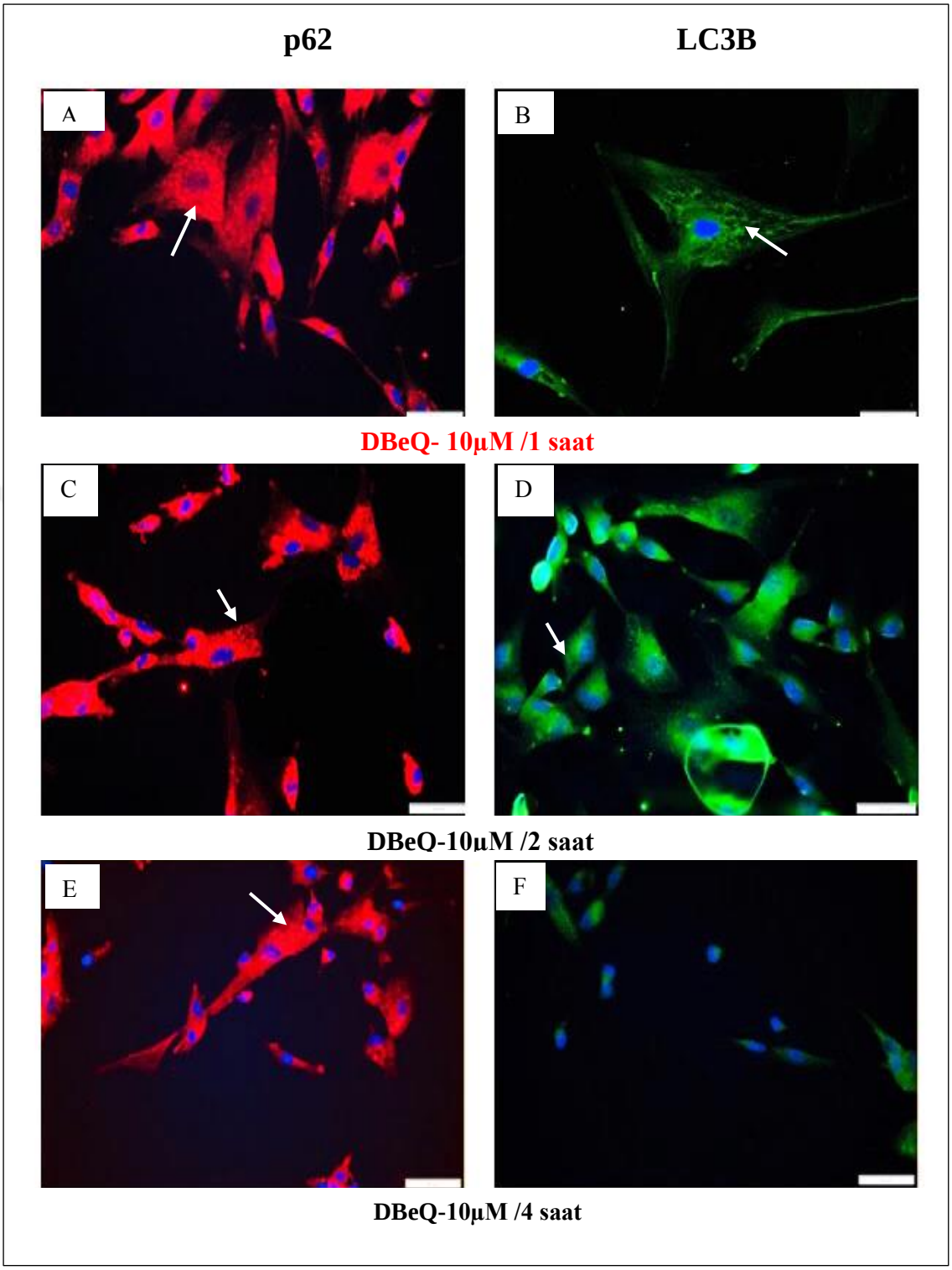


Şekil 4.14. Sağlıklı vericiye ait MKH'lerde aynı sürede (1 saat) farklı dozlarda verilen DBeQ'nun Immunofloresan boyama sonuçlarının Image J analiz program ile okunan nokta sayıları.

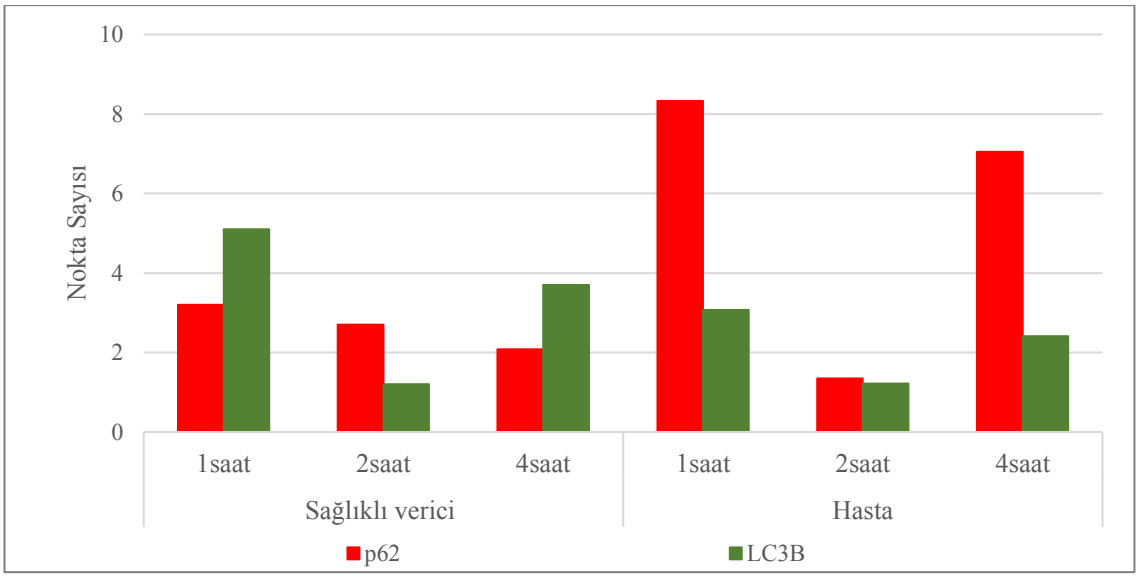
Farklı doz DBeQ uygulandığı zaman meydana gelen değişikliklere bir de farklı sürelerde inkübasyon sonrası bakılmıştır. Aynı sağlıklı vericiye ait olan MKH'lerde aynı dozda fakat farklı sürelerde yapılan inkübasyonlar sonucu, p62 ve LC3B proteinlerinin sitoplazmada en çok 1 saatlik inkübasyon sonrası gözlendiği tespit edilmiştir (Şekil 4.15). Aynı hastaya ait olan MKH'lere aynı dozda fakat farklı sürelerde yapılan inkübasyonlar sonucunda da, p62 ve LC3B proteinlerinin sitoplazmada en çok 1 saatlik inkübasyon sonrası gözlendiği tespit edilmiştir (Şekil 4.16). Bu yüzden ideal zaman olarak 1 saat seçilmiştir.



Şekil 4.15. Sağlıklı vericiye ait MKH'lerde aynı dozda (10 µM) farklı sürelerde verilen DBeQ'nun Immunofloresan boyama sonuçları (A-B 4 saat; C-D 2 saat; E-F 4 saat) Ok: ilgili proteinin sitoplazmada birikimi. (Floresan belirteçleri; Kırmızı- Texas Red, Yeşil-FITC, Mavi- DAPI / Bar 5 µm).



Şekil 4.16. Hasta grubundan bireye ait MKH'lerde aynı dozda (10 µM) farklı sürelerde verilen DBeQ'nun Immunofloresan boyama sonuçları (A-B 1 saat; C-D 2 saat; E-F 4 saat). Ok: ilgili proteinin sitoplazmada birikimi. (Floresan belirteçleri; Kırmızı- Texas Red, Yeşil-FITC, Mavi- DAPI / Bar 5 µm).

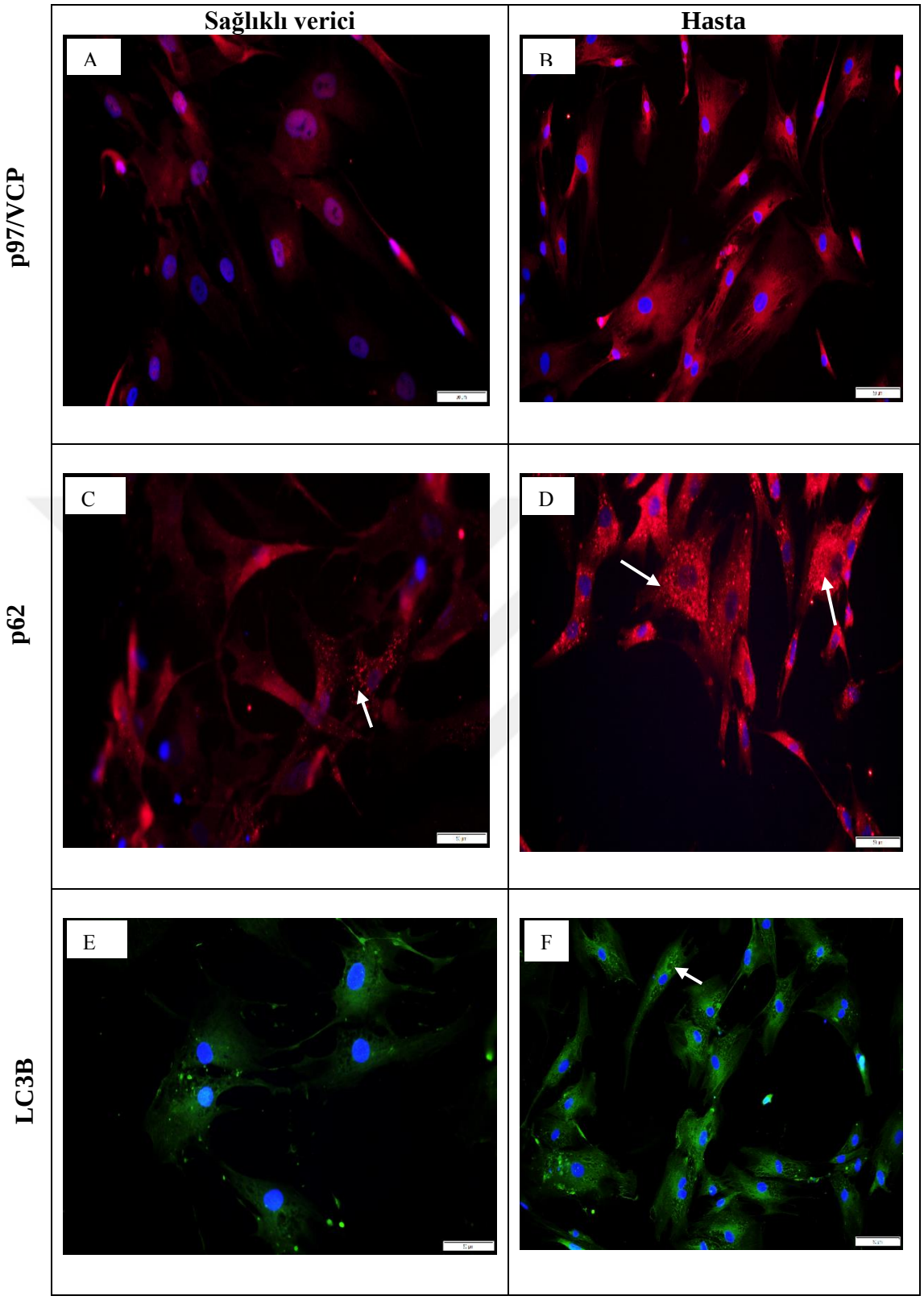


Şekil 4.17. Sağlıklı vericiler ve hasta gruplarından bireylere ait MKH'lere verilen DBeQ'nun doz ve süre çalışmasın p62 ve LC3B Immunofloresan boyama sonuçlarının Image J analiz program ile okunan nokta sayısı.

4.8.DBeQ Verilen Mezenkimal Kök Hücrelerde p97/VCP, p62 ve LC3B İfadesinin Immunofloresan Boyama Sonuçlarına İlişkin Bulgular

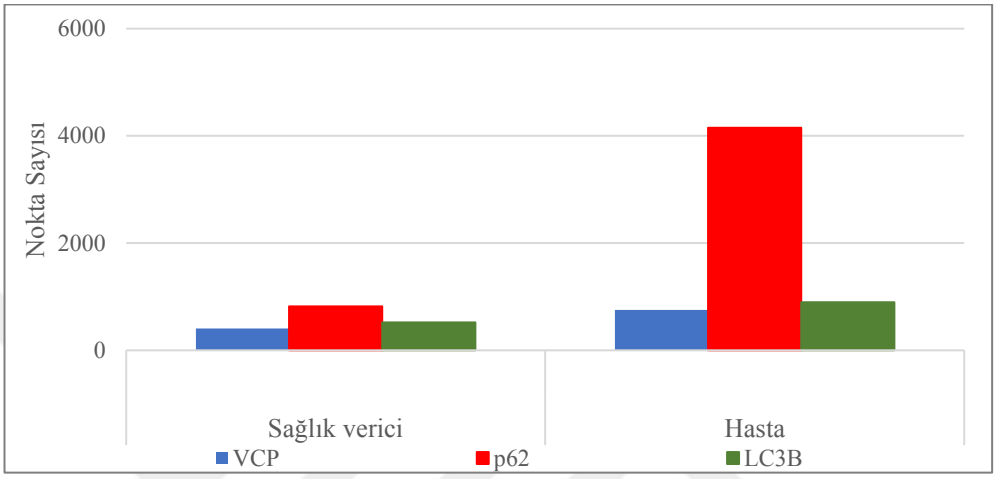
DBeQ verilmesine ilişkin optimizasyon işlemleri yapıldıktan sonra, MKH gruplarına DBeQ verilerek p97/VCP ifadesinde meydana gelen değişikliklere immunofloresan boyama yöntemi ile de bakılmıştır.

Hücrelerin DBeQ'dan etkilenip etkilenmediğini göstermek amacıyla otofaji belirteçleri olan p62 ile LC3B'nin sitoplazmadaki miktarlarına da bakılmıştır. Hasta grubuna ait MKH'lerin sitoplazmasında daha fazla p62 ve LC3B birikimi görülmüştür. Otofajik belirteçlerinin birikmesi hastada daha fazla olan p97/VCP ifadesinin DBeQ ile azaltılabildiğini göstermiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Sağlıklı verici (A, C, E) ve hasta (B, D,F) MKH'lerde p97/VCP, p62 ve LC3B birikiminin Immunofloresan boyama sonuçları. Ok: ilgili proteinin sitoplazmada birikimin göstermektedir. (Floresan belirteçleri; Kırmızı- Texas Red, Yeşil-FITC, Mavi- DAPI / Bar 5 µm).

Sağlıklı verici ve hasta gruplarına ait MKH'lerin ımmunofloresan boyama sonuçlarında p97/VCP, p62 ve LC3B pozitif noktaların belirlenmesi için Image J programı kullanılarak analiz yapılmıştır (Şekil 4.19). Hasta grubuna ait MKH'lerde p62 ve LC3B'nin sitoplazmada birikimi sağlıklı verici grubuna göre daha fazla gözlenmiştir.



Şekil 4.19. Sağlıklı vericiler ve hasta gruplarından bireylere ait MKH'lerde p97/VCP, p62 ve LC3B birikiminin ımmunofloresan boyama sonuçlarının Image J analiz programı ile okunan nokta sayısı.

4.9. DBeQ Verilen Mezenkimal Kök Hücrelerde ve Mononükleer Hücrelerde Apoptoz Tayini Sonuçlarına İlişkin Bulgular

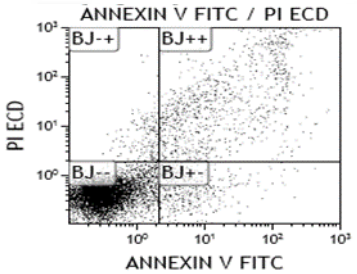
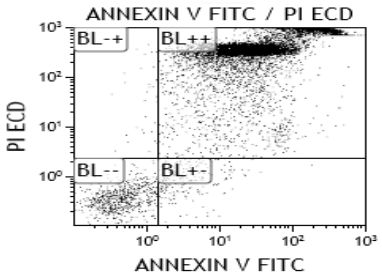
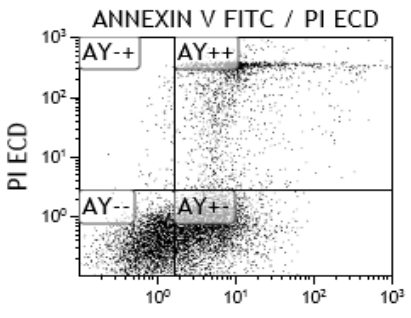
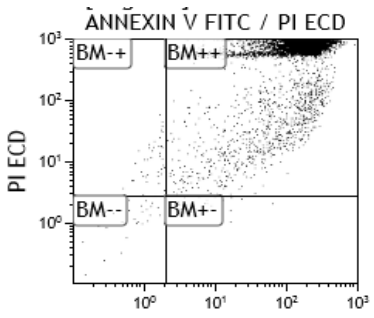
Sağlıklı verici ve ALL hastalarına ait olan MNH ve MKH gruplarında DBeQ verilmesine dair aşağıdaki gibi bir çalışma şeması oluşturulmuştur. DBeQ verilen hücreler DBeQ +, verilmeyen hücreler ise DBeQ – olarak isimlendirilmiştir.

Tablo 4.1. DBeQ verilen sağlıklı verici ve ALL hastalarına ait vaka sayıları

Sağlıklı verici MNH (n=4)	**Hasta MNH (n=6)**	**Sağlıklı verici MKH (n=6)**	**Hasta MKH (n=4)**
2 DBeQ +	3 DBeQ +	3 DBeQ +	2 DBeQ +
2 DBeQ -	3 DBeQ -	3 DBeQ -	2 DBeQ -

Sağlıklı vericilere ait MNH'lerde apoptoz oranı flow sitometride DBeQ verilmeden önce %11.6 ve %21.7 (Şekil 4.20/ A ve B) verildikten sonra ise % 90.2 ve %99 (Şekil 4.20/ C ve D) olarak ölçülmüştür. Hastalara ait MNH' lerde apoptoz oranı DBeQ verilmeden önce % 2.8, %6.6 ve %94.1(Şekil 4.21/ A, B ve C) verildikten sonra ise %73.8, % 95.3 ve %95.9 (Şekil 4.21/ D, E ve F) olarak ölçülmüştür. Her iki çalışma grubunun MNH'lerinde de DBeQ verildikten sonra apoptoz oranı artmıştır.

Sağlıklı verici MNH

DBeQ -	DBeQ +
A 	C 
B 	D 

Gate	Number	%Total	%Gated
All	9,134	100.0000	100.0000
BJ--	7,328	80.2277	80.2277
BJ-+	193	2.1130	2.1130
BJ+-	554	6.0653	6.0653
BJ++	1,059	11.5940	11.5940

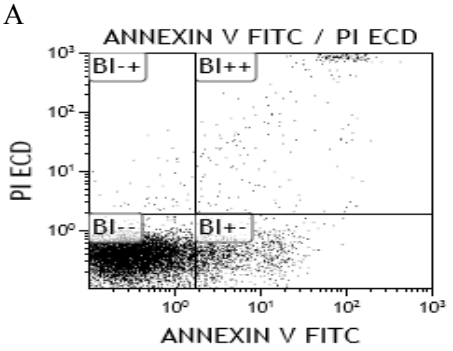
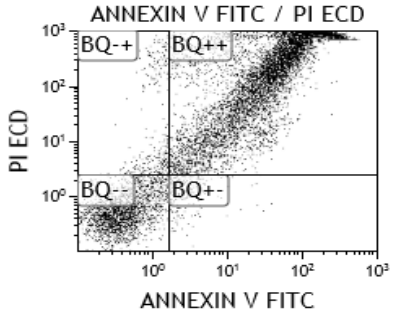
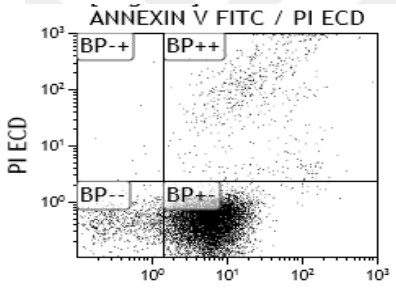
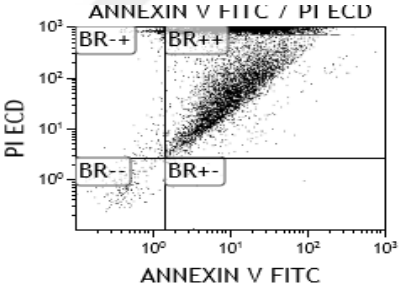
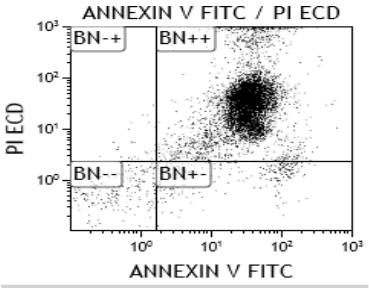
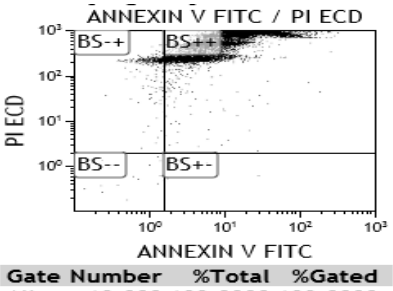
Gate	Number	%Total	%Gated
All	10,000	100.0000	100.0000
BL--	712	7.1200	7.1200
BL-+	31	0.3100	0.3100
BL+-	240	2.4000	2.4000
BL++	9,017	90.1700	90.1700

Gate	Number	%Total	%Gated
All	10,000	100.0000	100.0000
AY--	3,214	32.1400	32.1400
AY-+	84	0.8400	0.8400
AY+-	4,533	45.3300	45.3300
AY++	2,169	21.6900	21.6900

Gate	Number	%Total	%Gated
All	10,000	100.0000	100.0000
BM--	27	0.2700	0.2700
BM-+	38	0.3800	0.3800
BM+-	24	0.2400	0.2400
BM++	9,911	99.1100	99.1100

Şekil 4.20. Sağlıklı vericilere ait MNH' lerde DBeQ verilmeden önce (A ve B) ve verildikten sonra (C ve D) flow sitometrik apoptoz analiz sonuçları.

Hasta MNH

DBeQ -	DBeQ +
A 	D 
B 	E 
C 	F 

Gate	Number	%Total	%Gated
All	10,000	100.0000	100.0000
BI--	8,433	84.3300	84.3300
BI-+	47	0.4700	0.4700
BI+-	1,248	12.4800	12.4800
BI++	272	2.7200	2.7200

Gate	Number	%Total	%Gated
All	10,000	100.0000	100.0000
BQ--	2,108	21.0800	21.0800
BQ-+	299	2.9900	2.9900
BQ+-	213	2.1300	2.1300
BQ++	7,380	73.8000	73.8000

Gate	Number	%Total	%Gated
All	10,000	100.0000	100.0000
BP--	759	7.5900	7.5900
BP-+	9	0.0900	0.0900
BP+-	8,571	85.7100	85.7100
BP++	661	6.6100	6.6100

Gate	Number	%Total	%Gated
All	10,000	100.0000	100.0000
BR--	201	2.0100	2.0100
BR-+	239	2.3900	2.3900
BR+-	29	0.2900	0.2900
BR++	9,531	95.3100	95.3100

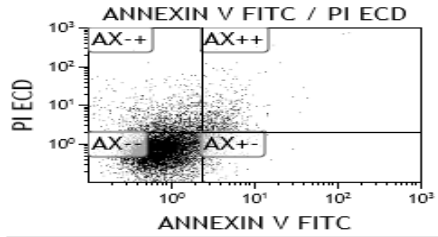
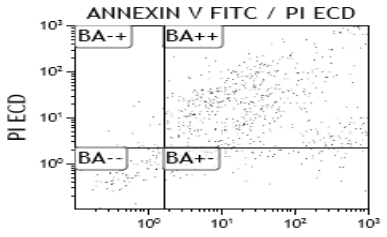
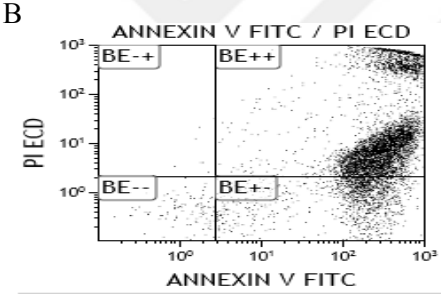
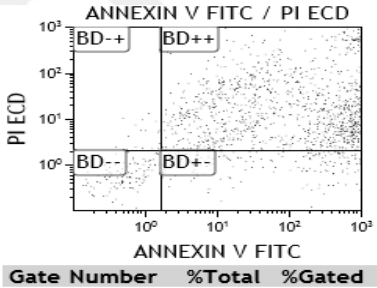
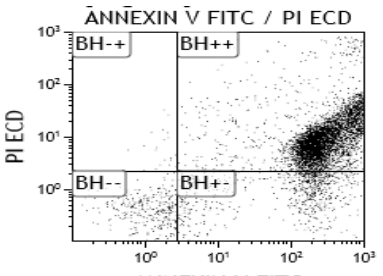
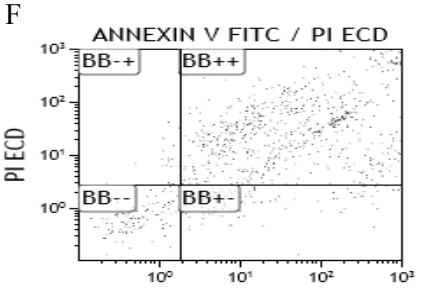
Gate	Number	%Total	%Gated
All	10,000	100.0000	100.0000
BN--	243	2.4300	2.4300
BN-+	30	0.3000	0.3000
BN+-	314	3.1400	3.1400
BN++	9,413	94.1300	94.1300

Gate	Number	%Total	%Gated
All	10,000	100.0000	100.0000
BS--	15	0.1500	0.1500
BS-+	385	3.8500	3.8500
BS+-	9	0.0900	0.0900
BS++	9,591	95.9100	95.9100

Şekil 4.21. Hastalara ait MNH' lerde DBeQ verilmeden önce (A, B ve C) ve verildikten sonra (D, E ve F) flow sitometrik apoptoz analiz sonuçları.

Sağlıklı vericilere ait MKH' lerde apoptoz oranı flow sitometride DBeQ verilmeden önce %5.5, %54.7 ve %62.3 (Şekil 4.22/ A, B ve C) verildikten sonra ise % 75.1, %79.7 ve %86.6 (Şekil 4.22/ D, E ve F) olarak ölçülmüştür.

Sağlıklı verici MKH

DBeQ -	DBeQ+
A 	D 
Gate Number %Total %Gated All 10,000 100.0000 100.0000 AX-- 7,547 75.4700 75.4700 AX-+ 1,297 12.9700 12.9700 AX+- 611 6.1100 6.1100 AX++ 545 5.4500 5.4500	Gate Number %Total %Gated All 830 100.0000 100.0000 BA-- 71 8.5542 8.5542 BA-+ 14 1.6867 1.6867 BA+- 122 14.6988 14.6988 BA++ 623 75.0602 75.0602
B 	E 
Gate Number %Total %Gated All 10,000 100.0000 100.0000 BE-- 126 1.2600 1.2600 BE-+ 7 0.0700 0.0700 BE+- 4,394 43.9400 43.9400 BE++ 5,473 54.7300 54.7300	Gate Number %Total %Gated All 3,350 100.0000 100.0000 BD-- 118 3.5224 3.5224 BD-+ 17 0.5075 0.5075 BD+- 545 16.2687 16.2687 BD++ 2,670 79.7015 79.7015
C 	F 
Gate Number %Total %Gated All 10,000 100.0000 100.0000 BH-- 384 3.8400 3.8400 BH-+ 20 0.2000 0.2000 BH+- 3,370 33.7000 33.7000 BH++ 6,226 62.2600 62.2600	Gate Number %Total %Gated All 1,905 100.0000 100.0000 BB-- 107 5.6168 5.6168 BB-+ 20 1.0499 1.0499 BB+- 129 6.7717 6.7717 BB++ 1,649 86.5617 86.5617

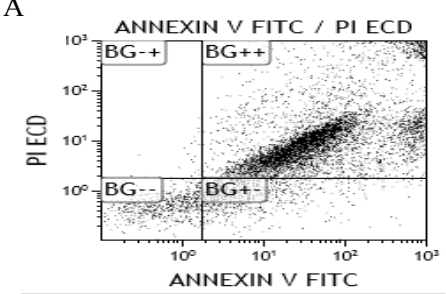
Şekil 4.22. Sağlıklı vericilere ait MKH' lerde DBeQ verilmeden önce (A,B ve C) ve verildikten sonra (D,E ve F) flow sitometrik apoptoz analizi sonuçları.

Hastalara ait MKH' lerde apoptoz oranı DBeQ verilmeden önce % 83.4 ve % 93.4 (Şekil 4.23/ A ve B) verildikten sonra ise % 90 ve %68.9 (Şekil 4.23/ C ve D) olarak ölçülmüştür.

Hasta MKH

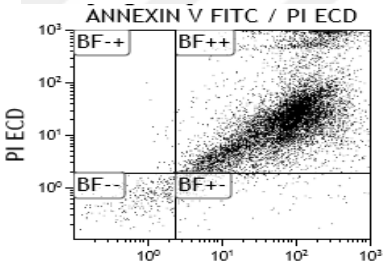
DBeQ -

A



Gate	Number	%Total	%Gated
All	10,000	100.0000	100.0000
BG--	656	6.5600	6.5600
BG-+	22	0.2200	0.2200
BG+-	982	9.8200	9.8200
BG++	8,340	83.4000	83.4000

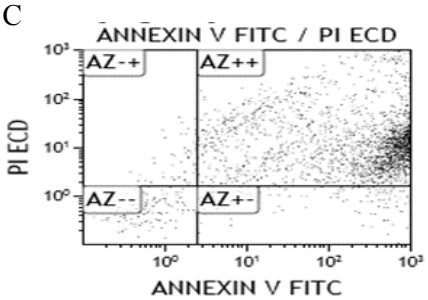
B



Gate	Number	%Total	%Gated
All	10,000	100.0000	100.0000
BF--	299	2.9900	2.9900
BF-+	24	0.2400	0.2400
BF+-	335	3.3500	3.3500
BF++	9,342	93.4200	93.4200

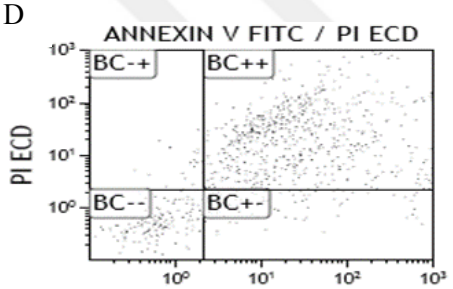
DBeQ +

C



Gate	Number	%Total	%Gated
All	3,876	100.0000	100.0000
AZ--	134	3.4572	3.4572
AZ-+	51	1.3158	1.3158
AZ+-	201	5.1858	5.1858
AZ++	3,490	90.0413	90.0413

D



Gate	Number	%Total	%Gated
All	1,103	100.0000	100.0000
BC--	162	14.6872	14.6872
BC-+	23	2.0852	2.0852
BC+-	158	14.3246	14.3246
BC++	760	68.9030	68.9030

Şekil 4.23. Hastalara ait MKH' lerde DBeQ verilmeden önce (A ve B) ve verildikten sonra (C ve D) flow sitometrik apoptoz analiz sonuçları.

5.TARTIŞMA

Akut lenfoblastik lösemi en yaygın çocukluk çağı kanseridir ve Türkiye'de her yıl yaklaşık 2000 çocuğa ALL teşhisi konmaktadır. %90'ı aşan tedavi oranlarına rağmen çocukluk çağı kanserleri içerisinde morbidite ve mortalitenin önemli bir nedeni olmaya devam etmektedir. ALL'nin ayırt edici özelliği, lenfoid öncül hücrelerin farklılaşması ve proliferasyonunda rol oynayan kromozomal anormallikler ve genetik değişimlerdir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda tüm hücrelerin spesifik zayıflıklarına odaklanan hedefli tedaviler ortaya konmuştur (6). ALL hastalığında da yeni tedavi seçeneklerine açıkça ihtiyaç vardır.

AAA ATPase ailesinin üyesi olan p97/VCP terapötik kullanım için seçilmiş bir proteindir. p97/VCP çeşitli yardımcı proteinlerin etkileşimi aracılığıyla, özellikle ER lümeninde veya zarında lokalize olan yanlış katlanmış proteinlerin ortadan kaldırılmasından sorumlu bir proteindir. ALL hücrelerinin ER stresine karşı belirgin bir şekilde savunmasız olması, p97/VCP'yi ALL'de yeni bir terapötik hedef olarak göstermektedir (7). ER, translokasyon, katlanma ve proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonları dahil olmak üzere sekretuvar yoldaki temel fonksiyonlara sahip hücre içi organeldir. ER stres altındayken hücre, ER şaperonlarının ifadesini artırarak protein yüklenmesini mRNA translasyonun inhibisyonu yoluyla azaltır. Böylece ER ile ilişkili degradasyonu (ERAD) teşvik ederek protein homeostazını düzenlemeye çalışan ubikutin protezom sistemini (UPS) aktive eder (8).

Terapötik kullanım için p97/VCP'nin hedeflenmesi küçük moleküllü inhibitörlerinin sürekli gelişimi ile birleştiğinde p97/VCP'nin yeni nesil kanser tedavilerinin gelişiminde etkili olabileceği düşünülmektedir. p97/VCP inhibisyonu in vivo modellerde umut vericidir. Solid tümörlerde (13,14) ve miyelomda (14) ER stresini ve dolayısıyla hücre ölümünü indükler. Yakın zamanda p97/VCP'ye karşı spesifik inhibitörler geliştirilmiştir. Bu inhibitörler arasında DBeQ, p97/VCP'nin yapısında bulunan hem D1 hem de D2 alanlarını hedeflemektedir. DBeQ' yu diğer inhibitörlerden ayıran özellik, hem ubikutin protezom sistemini (UPS) hem de otofajik protein yıkım yolaklarını etkilemesi ve hücre ölümünü aktive etmesidir (70).

p97/VCP aynı zamanda sitoplazmada yanlış katlanmış proteinlerin temizlenmesi için gerekli olan ve otofaji yolunda rol oynayan bir proteindir. p97/VCP aktivitesinin inhibisyonu sonucu, hücre içi yanlış katlanmış proteinler birikmeye başlar ve hücrelerde meydana gelen otofajinin engellenmesi amaçlanarak hücrelerin apoptoza gitmesi hedeflenir (67). Kanser hücreleri daha yüksek metabolik ve proliferatif aktivite oranlarına bağlı olarak yanlış protein katlanmasının temizlenmesi için daha çok p97/VCP'ye ihtiyaç duyar. Şu ana kadar yapılan çalışmalarda p97/VCP' nin kanser hücrelerinde varlığı incelenmiştir (67). Bu, lenfoma dahil birçok kanser hücresinde p97/VCP'nin fazla ifade edilmesi ile desteklenir (9,67).

Gabriele ve ark. ALL üzerinde yaptıkları çalışmalarında, B-ALL hücre hattında p97/VCP ifade düzeylerinin normal hücrelere göre daha fazla olduğunu göstermişlerdir (9). İlk kez B-ALL hücrelerinde artan p97/VCP ifadesi gösterilmiştir. Bu bilginin biyolojik önemi, malign B-hücrelerinde normal hücrelerden daha fazla miktarda poliubikutinlenmiş ve yanlış katlanmış proteinlerin üretildiğini göstermesidir. Ancak malign B hücrelerinin neden daha fazla poliubikutinlenmiş ve yanlış katlanmış protein ürettiği net değildir. Bunlar artan sekretuvar, metabolik ve proliferatif aktivitenin bir yan ürünü olabilir. Bizim çalışmamızda da bunu destekler şekilde sonuçlar çıkmıştır. p97/VCP ifadesinin hasta grubunda yüksek olduğu sonucu elde edilmiştir. Fakat bizim çalışmamızın en önemli farkı, ALL hastalarına ait primer hücre kullanılmış olmasıdır. Literatürde yer alan bilgiye göre, primer hücre ile hücre hattı arasında önemli farklılıklar vardır. Hücre hattının ömrü sonsuzdur, primer hücrelerin ise ömrü sınırlıdır. Hücre hattı zaman içinde klonla seçilmiştir, primer hücre ise direk dokudan izole edilir. Hücre hattında donör karakteri etkili değildir, primer hücrede ise etkilidir. Hücre hattında mutasyon ihtimali yüksektir, primer hücrede ise düşüktür (77). Tüm bu bilgiler ışığında primer hücrelerin daha doğru bir sonuç vereceğini düşündüğümüz için çalışmamızda hücre hattı yerine primer hücre ile çalışmayı tercih ettik. Primer hücre ile çalışmanın hem avantajları hem de dezavantajları vardır. Avantajları, primer hücreler kişinin yaşı, cinsiyeti, bulunduğu çevre, yaşadığı stres, beslenme alışkanlıkları ve yaşam biçimi gibi birçok özellikten etkilenir. Bu da primer hücreyi in vivo durumu daha iyi yansıtır hale getirir. Dezavantajları ise ilk tanı anında, hasta henüz ilaç almamışken ALL hastasından örnek almak klinik ile ciddi işbirliği gerektirmektedir ve yüksek hasta sayısına ulaşmak zor olabilmektedir. Biz de çalışmamızda her iki gruptan 10'ar kişiye ait örnekleri

incelemeyi planlayarak başlamamıza rağmen hiç tedavi almamış hasta bulmakta yaşadığımız sıkıntılardan dolayı hedeflediğimiz sayıya ulaşamadık. Çalışmamızın zayıf olan ve ilerideki çalışmalarla desteklenmesi gereken yönü örnek sayısında yaşadığımız yetersizliktir. Ancak yine de primer hücre ile çalışmanın hücre hattına göre invivo durumu daha iyi yansıtacağını ve daha kıymetli olduğunu düşündüğümüz için bulabildiğimiz sayıdaki hastaya ait sonuç verilerini sunmayı tercih ettik.

p97/VCP ifadesi insanda görülen ALL malignitesi ile ilişkilidir. İnsanda görülen ALL'de p97/VCP ifadesini incelemek için çalışmamızda MKH ve MNH'lerde p97/VCP seviyeleri Western blot analizi ile incelenmiş ve sağlıklı vericilere ait olan MKH ve MNH'ler ile karşılaştırılmıştır. ALL hastalarına ait olan hücre gruplarında sağlıklı vericilere kıyasla p97/VCP ifadesi daha yüksek bulunmuştur. Bu beklenilen bir bulgudur çünkü kanser hücrelerinde poliubikutinlenmiş protein ve yanlış katlanmış protein daha fazla olduğu için p97/VCP ifadesi de daha fazladır. Immunofloresan analizler de bu bulguları doğrulamıştır.

Kanser hücrelerinde artan p97/VCP ifadesinin inhibe edilmesinin tedavide bir alternatif olabileceği düşünülmüş ve p97/VCP inhibitörleri ile çeşitli çalışmalar yapılmıştır (9). Biz de çalışma alanımız olan ALL hastalarında p97/VCP inhibisyonun nasıl bir sonuca yol açacığını görmek amacıyla deneyimizi planladık. p97/VCP inhibitörleri arasından DBeQ'yu seçme nedenimiz diğer çalışmalarda (9) kullanılan p97/VCP inhibitörü olan CB-5083' den hızlı etki göstermesi ve daha az toksik olmasıdır. DBeQ, p97/VCP'ye bağlı ubikutin-proteazom sistemini etkiler (70). Kanser tedavisinde proteazom inhibitörlerinin kilit mekanizmalarında ERAD'ı bloke etme kabiliyetleri vardır. DBeQ kanser hücre büyümesini güçlü şekilde inhibe eder ve yürütücü kaspaz 3 ve 7'yi harekete geçirmede proteazom inhibitörlerinden daha hızlıdır (78). Buradan yola çıkıp hücrelere DBeQ vererek, p97/VCP aktivitesini durdurup hücrenin otofajiye gitmesini engelleyemeyi bunun sonucunda da hücrelerin apoptoza gitmesini amaçladık. DBeQ'nun dikkat çekici özelliği, yürütücü kaspazların ve hücre ölümünün aktivasyonunu hızlı ve güçlü şekilde başlatmasıdır. Bir prokaspaz aktivatörünün 4-8 saat boyunca 25 μM dozda hücrelere uygulandığında kaspaz indüklediği bildirilirken, 10 μM DBeQ 1-3 saat içinde önemli kaspaz aktivitesini harekete geçirir. DBeQ'nun hızlı kaspaz aktivasyonu ve hücre ölümünü indüklemesi,

p97/VCP inhibisyonun kanser kemoterapisi için proteazom inhibisyonundan daha etkili olabileceğini düşündürmektedir (78).

p97/VCP'yi inhibe etmek amacıyla DBeQ kullanmayı kararlaştırdıktan sonra DBeQ'ya ait uygun doz ve süre belirlenmesi için Western blot analizi ve ımmunofloresan boyaması yapılmıştır. Literatürde yer alan bilgilere göre verilecek DBeQ için denenecek doz Western blot analizleri için 5 μM ve 10 μM, ımmunofloresan boyama için 5 μM, 10 μM ve 15 μM dır. Süre olarak ise 1,2 ve 4 saat belirlenmiştir (78). Çalışmamızda hasta ve sağlıklı vericilere ait MKH ve MNH'lerde yapılan Western blot analiz ve ımmunofloresan boyama yöntemleri ile uygun dozun 10 μM, uygun sürenin ise 1 saat olduğu belirlenmiştir.

p97/VCP inhibisyonunun kanser hücrelerini normal hücrelerden farklı bir şekilde etkileyip etkilemediğini belirlemek için, sağlıklı vericilere ve hastalara ait MKH ve MNH' ler DBeQ ile 1 saat süre ile inkübe edilmiştir. DBeQ, p97/VCP inhibitörü olmasına rağmen p97/VCP ifadesini tamamen inhibe eden bir molekül değildir. p97/VCP'nin N domaininde bulunan ATPaz grubunun fonksiyonunu durdurarak çalışmasını engellemektedir. Proteini tamamen ortadan kaldırmaz. Bu yüzden DBeQ verdiğimiz ve vermediğimiz gruplarda Western blot bandlarında p97/VCP açısından büyük bir farklılık yoktur. Hücrelere DBeQ verildiği zaman, p97/VCP ifadesinde meydana gelen değişiklikleri anlayabilmek için p97/VCP ile aynı yolakta görev alan önemli otofaji belirteçleri olan p62 ve LC3B protein ifadelerine de bakılmıştır. p62, doğal bağışıklık, inflamasyon, tümör oluşumu ve onkogenezi etkileyen biyolojik sinyallerin oluşumuna katılan ve çeşitli proteinleri bağlayan önemli bir adaptör proteindir. Ayrıca p62, LC3B proteinine de bağlanan bir proteindir (76). Otofaji mekanizması sırasında zarar görmüş hücresel bileşenleri ortadan kaldırmak için membrana bağlı otofagozomlar oluşmaya başlar. Otofagozom oluşumu otofajiye bağlı genler ile başlatılır (Atg- Autophagy related genes). LC3B ise otofagozom belirteci olarak bu mekanizmada görev alır (79). Kanser hücrelerine DBeQ verilerek p97/VCP fonksiyonu durdurulduğunda p62 ve LC3B proteinleri de bu inhibisyondan aynı yönde etkilendi ve kanserli hücrelerde ifadeleri azaldı. Böylece hücrelerdeki otofaji yolağı durdurularak hedefimizin gerçekleştiği gözlemlendi.

Immunfloresan boyama sonuçlarına göre ise hem sitozol hem de nukleus çevresinde LC3B ve p62 birikimi gözlemlenmiştir. DBeQ, p97/VCP ubikutin-proteazom sistemindeki şaperon proteinlerden olan LC3B-II birikimini indüklemektir (78). Aynı şekilde DBeQ verilen hücrelerin sitoplazmasında p62 proteinin de biriktiği gözlemlenmiştir (79). Otofajide, p62'nin sitoplazmada birikmesi genel olarak azalmış veya bozulmış otofajiyi gösterir (76). p97/VCP fonksiyonunun durdurulması otofaji yolağını da olumsuz yönde etkilemektedir. Bunun sonucunda sitoplazmada biriken p62 ve LC3B proteinleri olgun otolizozomları oluşturmayı başaramazlar çünkü biriken proteinler yıkıcı olmayan otofagozom birikimini gösterir (80).

En son aşamada hücrelere verilen DBeQ'nun sitotoksik aktivitesini teyit etmek için apoptoz analizi yapılmıştır. Annexin V ile yapılan flow sitometri analiz sonuçlarına göre, apoptoz analizi için 4 gruba ayrılan hücrelerin [1) ALL hastalarına ait MNH (n=6), 2) ALL hastalarına ait MKH (n=4) 3), sağlıklı vericilere ait MNH (n=4), 4) sağlıklı vericilere ait MKH (n=6)] (Tablo 4.1) apoptoza gitme yüzdeleri farklıdır.

Daha sonra gruplar DBeQ verilen (DBeQ +) ve verilmeyen (DBeQ -) olarak iki alt gruba daha ayrılmıştır. Kanser hücrelerine DBeQ verilmesinin apoptozu uyarıp uyarmadığını anlamak için, literatürdeki diğer çalışmada kullanıldığı gibi Annexin V yöntemi kullanılmıştır (9). Ancak o çalışmadan farklı olarak inhibitör sabitlenen tek bir dozda kullanılmıştır (10 μM). Ayrıca diğer çalışmada da (9) olduğu gibi, p97/VCP inhibisyonun hücre çoğalması üzerindeki etkilerini de değerlendirmek için DBeQ verildikten sonra PI dahil edilerek flow sitometrik ölü ve canlı hücrelerin ayırımı yapılmıştır.

Gabriele ve ark. yapmış oldukları çalışmadaki (9), farklı doz ve sürelerde hücrelere verilen p97/VCP inhibitörü ile bakılan apoptoz oranları ve bizim çalışmamızın apoptoz oranları kıyaslandığı zaman, bizim tercih ettiğimiz inhibitörün hücreleri apoptoza götürmekte daha etkili olduğunu söyleyebiliriz.

Sağlıklı vericilere ait MNH'lerde DBeQ verilmeden önce (DBeQ -) apoptoz oranı %11.6 ve %21.7 iken (Şekil 4.20/ A ve B), DBeQ verildikten sonra (DBeQ +)

% 90.2 ve %99'a (Şekil 4.20/ C ve D) çıkmıştır. Hastalara ait MNH' lerde DBeQ – iken apoptoz oranı % 2.8, %6.6 ve %94.1 iken (Şekil 4.21/ A,B ve C), DBeQ + olduğu zaman %73.8, % 95.3 ve %95.9 'a (Şekil 4.21/ D,E ve F) çıkmıştır. Hücreler DBeQ ile inkübe edildikten sonra, p97/VCP ifadesinin inhibe edilmesi sonucu hücrelerdeki otofaji mekanizması durdurularak, apoptoz mekanizması indüklenmiştir. Literatürde yer alan bir çalışmada (77) DBeQ'nun insan kanser hücrelerini, kanser olmayan hücrelere göre daha güçlü bir şekilde apoptoza götürdüğü gösterilmiştir. Bizim sonuçlarımız da bu bulguyu desteklemektedir. Hastaların MNH'lerinde apoptoz oranı sağlıklı vericilere kıyasla daha yüksektir.

Sağlıklı vericilere ait MKH'lerde DBeQ- iken apoptoz oranı %5.5, %54.7 ve %62.3 iken (Şekil 4.22/ A, B ve C) DBeQ + olunca % 75.1, %79.7 ve %86.6'ya (Şekil 4.22/ D, E ve F) çıkmıştır. Sağlıklı verici grubunda DBeQ – olmasına rağmen iki analizde apoptoz oranı yüksek çıkmıştır (Şekil 4.22 B-C). Bu iki apoptoz analizi için kullanılmış olan dondurulmuş hücrelerin çözülüp analize gitmesi sürecinde hücre canlılıklarının durumdan etkilenmiş olabileceği düşünülmektedir. Bu durum dondurulmuş hücre ile çalışmanın dezavantajı olarak kabul edilebilir. Denekten alınan örneğin taze iken çalışılmasının daha avantajlı olacağı düşünülmekle birlikte taşıma, saklama ve deney düzeneği koşulları her zaman buna elverişli olmayabilir.

Hastaya ait MKH'lerde DBeQ – iken apoptoz oranı % 83.4 ve % 93.4 iken (Şekil 4.23/A ve B) DBeQ + olduğunda % 90 ve % 68.9 dur (Şekil 4.23/ C ve D). Hastanın DBeQ almadan önce apoptoz oranın yüksek çıkmasının nedeninin, malign süreçlerin hücre sinyallenmesinde değişikliklere yol açması ve kanserden dolayı kemik iliği mikro çevresinin bozulması olabileceği düşünülmüştür. Hasta grubunda iki analizde beklenilenden farklı bir oranda apoptoz görülmüştür. Bunlardan birisi MKH grubunda olan DBeQ – iken %93 (Şekil 4.23/B), DBeQ + iken %68 (Şekil 4.23/D) olan diğeri de MNH grubundan DBeQ- iken %94 (Şekil 4.21/C), DBeQ + iken %95 (Şekil 4.21/F) olandır. Bu iki örneğin aynı hastaya ait olması kişisel varyasyonların analiz sonuçlarını etkileyebileceğini göstermektedir. Hasta grubu ile ilgili daha kesin bilgi için mutlaka daha çok hasta ile çalışılması gerekmektedir. DBeQ + ve DBeQ – gruplar kıyaslandığı zaman, genel olarak DBeQ + grupların beklenildiği gibi daha yüksek bir apoptoz oranına sahip oldukları görülmektedir.

Tez çalışmamızın sonuçlarına göre; DBeQ sağlıklı verici ve hasta gruplarının hücrelerinde apoptotik hücrelerin yüzdesini artırdığı için p97/VCP inhibitörü olarak görevini tamamlamıştır. p97/VCP hücresel protein homeostazının merkezidir. Bu nedenle ERAD, otofaji yolu ve kromatin ile ilişkili degredasyon dahil olmak üzere hücresel protein yıkımından sorumludur. Sonuç olarak çalışmamız, p97/VCP inhibisyonunun kanser hücre ölümünü indüklediğini göstermiş ve p97/VCP'yi terapötik bir hedef olarak doğrulamıştır. Ancak konu ile ilgili daha fazla deneğin dahil edildiği geniş çaplı çalışamalara ihtiyaç vardır.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmamız kapsamında aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır;

1) ALL hastalarına ve sağlıklı vericilere ait kemik iliği örneklerinden MKH üretildi. Hücrelerin MKH olduğunu kanıtlamak için morfolojik analiz ile adipojenik ve osteojenik farklılaşmalarına bakılarak MKH'lerin karakterizasyonu yapıldı.

2) Western blot analizinde hasta ve sağlıklı MKH ve MNH'lerde p97/VCP varlığı tespit edildi. Ayrıca hasta grubunda p97/VCP ifadesinin sağlıklı verici grubuna göre daha yüksek olduğu gözlendi.

3) Hücre gruplarına verilecek olan p97/VCP inhibitörü olan DBeQ için uygun doz ve sürenin belirlenmesi için Western blot analizleri için 5 μM ve 10 μM, ımmunofloresan boyama için 5 μM, 10 μM ve 15 μM dozlar ve 1, 2 ve 4 saatlik inkübasyon süreleri denendi. Bunun sonucunda uygun olan dozun 10 μM ve uygun sürenin ise 1 saat olduğu belirlendi.

4) Hücrelere DBeQ verildikten sonra MKH ve MNH'lerde p97/VCP ve aynı otofaji yolağında bulunan p62 ve LC3B ifadelerine bakıldı. DBeQ alan hasta grubunda p62 ve LC3B ifadesinin sağlıklı verici grubuna göre daha az olduğu gözlemlendi.

5) Hasta ve sağlıklı bireylere ait MKH ve MNH'ler DBeQ + ve DBeQ- olarak iki gruba ayrıldı ve hücrelerin apoptoza gitme yüzdelerine bakıldı. Her iki grupta da genel olarak DBeQ+ olan hücrelerin daha yüksek bir yüzde ile apoptoza gittiği gözlemlendi.

Elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda, p97/VCP'nin mevcut inhibitörü olan DBeQ'nun ciddi bir ER stres indüksiyonu yoluyla ALL hücre dizilerinde önemli bir apoptotik etkinliğe sahip olduğunu gösterdik. Bu sonuca göre DBeQ, ALL hücre dizilerine karşı önemli bir aktiviteye sahiptir ve bu etkinliğinden dolayı kematerapotik ajan olarak kullanılabileceğini öngörmekteyiz. Ancak yaptığımız çalışmanın daha fazla sayıda deneğe ait MKH ve MNH'lerde denenmesinin elde ettiğimiz verileri kuvvetlendireceğini düşünmekteyiz. ALL tedavisi açısından umut verici olan sonuçlarımızın teyidi bu alanda yapılacak ileri çalışmalara ihtiyaç duymaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Uzunhan TA, Karakaş Z. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemisi, *Çocuk Dergisi*., 2012;12(1):6–15.

2. Lakshmipathy U, Verfaillie C. Stem cell plasticity, *Blood Rev*., 2005;19(1):29–38.

3. Can A. Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavisinde Kullanımları,1. Baskı.Ankara, Akademisyen Tıp Kitabevi, 2014: 39-46, 175-194, 363-426, 437-439.

4. Wickremasinghe R, Hoffbrand,V. Biochemical and genetic control of apoptosis: relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies, *Blood.*,1999,11:3587.

5. Neuwald, A.F, Aravind, L, Spouge, J.L., Koonin, E. AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes, *Genome Res*.,1999,1;27-43.

6. Zwickl, P, Baumeister, W.AAA-ATPases at the crossroads of protein life and death, *Nat Cell Biol*.,1999, 1;97-98.

7. Vale, R.D.AAA proteins, *Cell Biol.,*2000,150;13-19.

8. Ogura, T, Wilkinson, A.J.AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function, *Genes Cells*., 2001,6:575-597.

9. Gugliotta, G, Sudo, M, Cao, Q, Lin, D. Sun H, Takao S, Moigne, R, Rolfe, M, Gery, S, Müschen, M, Cavo M, Koeffler, H. Valosin- Containing Protein/p97 as a Novel Target in Acute Lymphoblastic Leukemia, *NeoPlasıa.,*2017: 750-761.

10. Cao H, Oteiza A, Nilsson SK. Understanding the role of the microenvironment during definitive hemopoietic development. *Experimental Hematology* 2013;41(9):761–768.

11. King KY, Goodell M a. Inflammatory modulation of HSCs: viewing the HSC as a foundation for the immune response. *Nat Rev Immunol;* 2011;11(10):685–692.

12. Winslow T. 11 Things to Know About Immunotherapy for Cancer. https://www.cancerhealth.com/slideshow/what-is-immunotherapy/2. 2017 25.05.2019.

13. Durand C, Dzierzak E. Embryonic beginnings of adult hematopoietic stem cells. *Haematologica.* 2005: 8-100.

14. Margolin, JF Steube, CP Poplack D. Principles and practice of pediatric oncology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 2006. 539-580.

15. Wang, D, Zhu, H, Liu, Y, Yin, R, Zhao, L, Zhang, Z. Multi-Role of Cancer Stem Cell in Children Acute Lymphoblastic Leukemia, *Clinical Epidemiology of Acute Lymphoblastic Leukemia* - From the Molecules to the Clinic.,2013: 75–86.

16. Pui C-H., Williams Hematology In: Acute lymphoblastic leukemia Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K PJ editors, 7th Editio. 2006: 254–255.

17. Gurney JG, Severson RK, Davis S, Robison LL. Incidence of cancer in children in the United States. *Cancer*. 1995;75(8):2186–2195.

18. Simioni C., Zauli G., Martelli A., Vitale M., Ultimo S., Milani D., and Neri L. Physical training interventions for children and teenagers affected by acute lymphoblastic leukemia and related treatment impairments. *Oncotarget.* 2018 Mar 30; 9(24): 17199–17209.

19. Ayala F, Dewar R, Kieran M, Kalluri R. Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression, *Nature.*,2009, 12: 2233-2241.

20. Figuera LE, Borjas-Gutierre C, R Garcia Gonzalez. Pathophysiology of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clinical Epidemiology of Acute Lymphoblastic Leukemia*. 2013: 43–73.

21. Mehrling T. Chemotherapy is getting 'smarter' *Future Oncology*.2015; 11(4), 549-552.

22. Yang Y, Mallampati S, Sun B, Zhang J, Kim S, Lee J-S, et al. Wnt pathway contributes to the protection by bone marrow stromal cells of acute lymphoblastic leukemia cells and is a potential therapeutic target. *Cancer Lett.* 2013;333(1):1–20.

23. Kim E-J, Kim N, Cho S-G. The potential use of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Exp. Mol. Med.* Nature Publishing Group; 2013;45(1): e2.

24. Dexter TM, Spooncer E, Schofield R, Lord BI, Simmons P. Haemopoietic stem cells and the problem of self-renewal. *Blood Cells.* 1984;10(2-3):315–339.

25. Friedrich C.Merely miR210 in mesenchymal stem cell-one size fitu all, *Journal of Molecular Medicine,* 2012,90 : 983-985.

26. Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation.* 2002;105(1):93–98.

27. Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ*. 2014;21(2):216–225.

28. Lazennec G, Jorgensen C. Concise review: adult multipotent stromal cells and cancer: risk or benefit? *Stem Cells.* 2008;26(6):1387–1394.

29. Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. *Journal of Clinical Investigation.* 2006: 1195–1201.

30. Li Z, Li L. Understanding hematopoietic stem-cell microenvironments. Trends in *Biochemical Sciences.* 2006. p. 589–595.

31. Konopleva MY, Jordan CT. Leukemia stem cells and microenvironemnt: biology and therapeutic targeting. Journal of clinical oncology: *official journal of the Amerikan Society of Clinical Oncology*.2011; 29(5):591-599.

32. Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Developmental cell.*2010;18(6):884-901.

33. Juntilla MR, de Sauvage FJ. Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response. *Nature.*2013; 501 (7467):346-354.

34. Karakurt N, Aksu T, Koksal Y, Yarali N, Tunc B, Cetinkaya D, Ozgnuner M. Angiopoietins in The Bone Marrow Microenvironment of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal Hematology*, 2016, Jul;21(6):325-331.

35. Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wideranging implications in human disease. *Journal of Internal Medicine*. 2005. p. 479–517.

36. Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. *Cell Mol Biol Lett*. 2006;11(4): 506–525.

37. Pistritto G. Trisciuoglia D., Ceci C., Garufi A., Dorazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*. 2016 Apr; 8(4): 603–619.

38. Elmore. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 2007,35(4): 495-516.

39. Mehndiratta S.,Sapra S., Singh G.,Singh M.,Nepali K. Quinazolines as Apoptosis Inducers and Inhibitors: A Review of Patent Literature. Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery. 2016, 11 (1).

40. TutorVista. https://www.tutorvista.com/biology/apoptosis. 25.05.2019.

41. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(6):401–410.

42. Aranda M., Ruiz E., and Redondo M. Bcl-2 Inhibition to Overcome Resistance to Chemoand Immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*.2018.

43. Gawda E., Wrzos P.,Sochocka M., Chłapek K., Bulak K., Jędrych M.,and Jędrych B. P53 protein in proliferation, repair and apoptosis of cells. *Protoplasma.* 2014; 251(3): 525–533.

44. Kaczanowski S. Apoptosis: its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging. *Physical biology*. 2016 May 11;13(3):031001.

45. Hu S., Jiang S., Zhang J., Luo D., Yu B., Yang L., Zhong H., Yang M., Liu L., Hong F, and Yang S. Effects of apoptosis on liver aging. *World Journal of Clinical Cases*.2019;7(6).

46. Barnes PJ. Alveolar macrophages as orchestrators of COPD. *COPD.* 2004;1(1):59–70.

47. Hung RWY, Chow AW. Dissecting the "end game": Clinical relevance, molecular mechanisms and laboratory assessment of apoptosis. *Clinical and Investigative Medicine.* 2004;27(6):324–344.

48. Ashkenazi a, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science.* 1998;281(5381):1305–1308.

49. Güleş Ö.,Eren Ü. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi,* 2008 (2) 73-78.

50. Kanev M., Muranlı F.Flow Sitometri ve Kullanım Alanları. *SAÜ Fen Bilimleri Dergisi.* 20. Cilt, 1. Sayı, s. 33-38, 2016.

51. Melamed MR, Lindmo T, Mendelsohn ML. Flow Cytometry and Sorting. New YORK, *Wiley-Liss,* s.91,1990.

52. Kerr, JFR. Shrinkage Nekrosis. A distinct model of cell death. *J. Pathol.* 105: 13, 1971.

53. Wong R. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*. 2011; 30(1): 87.

54. K. Matsuura., K. Canfield., W. Feng.,M. Kurokawa Metabolic Regulation of Apoptosis in Cancer. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2016; 327: 43–87.

55. Aimee L Edinger and Craig B Thompson. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*. 2004, 16:663-669

56. Liu WJ.,Ye L., Huang WF., Guo LJ., Xu HL., Wu HL., Yang C., Liu HF. p62 links the autophagy pathway and the ubiqutin–proteasome system upon ubiquitinated protein degradation, *Cellular & Molecular Biology Letters*An International Journal, 2016, 21:29.

57. Huang R., Liu W. Identifying on essential role of nuclear LC3 for autophagy, *Journal of Autophgy*, 2015, 11(5): 852-853.

58. Maurizi, M.R, Li, C.C. AAA proteins: in search of a common molecular basis. International Meeting on Cellular Functions of AAA Proteins, *EMBO Rep*.,2001,2:980-985.

59. Wang Q, Song C, Li C. Molecular perspectives on p97-VCP: progress in understanding its structure and diverse biological functions, *Struct Biol*.,2004, 146: 44-57.

60. Cao K, Zheng Y. The Cdc48/p97-Ufd1-Npl4 complex: its potential role in coordinating cellular morphogenesis during the M-G1 transition, *Cell Cycle*.,2004, 3: 422-424.

61. Ye Y, Meyer H, Rapoport T.The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol, *Nature.,* 2001, 414: 652-656.

62. Braun S, Matuschewski K, Rape M, Thoms S, Jentsch S.Role of the ubiquitin-selective CDC48(UFD1/NPL4) chaperone (segregase) in ERAD of OLE1 and other substrates, *Embo J,* 2001, 21: 615-621.

63. Jarosch E, Taxis C, Volkwein C, Bordallo J, Finley D, Wolf D, Sommer, T. Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48, *Nat Cell Biol.*,2002, 4: 134-139.

64. Ghislain M, Dohmen RJ, Levy F, Varshavsky A. Cdc48p interacts with Ufd3p, a WD repeat protein required for ubiquitin-mediated proteolysis in Saccharomyces cerevisiae, *Embo J.,* 1996,15: 4884-4899.

65. Dai RM, Li C. Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation, *Nat Cell Biol.*,2001, 3: 740-744.

66. Hitchcock AL, Krebber H, Frietze S, Lin A, Latterich M, Silver PA. The conserved npl4 protein complex mediates proteasome-dependent membrane-bound transcription factor activation, *Mol Biol Cell.*,2001, 12. 3226-3241.

67. Nadeau M, Rico C, Tsoi M, Vivancos M, Filimon S, Paquet M, Boerboom D. Pharmacological targeting of valosin containing protein (VCP) induces DNA damage and selectively kills canine lymphoma cells, *BMC Cancer*.,2015. 479.

68. Miura, G.ER stress: To live or let die,*Nat Chem Biol*.,2014,10:695.

69. Yeo,B, Hong C, Chung K, Woo H, Kim K, Jung S, Kim E, and Yu S. Valosin-containing protein is a key mediator between autophagic cell death and apoptosis in adult hippocampal neural stem cells following insulin withdrawal, *Molecular Brain*.,2016, 9:31.

70. Chou, T, Deshaies, R. Development of p97 AAA ATPase inhibitors, *Landes Bioscience.*,2011:1091-92.

71. Ark M. Hücre Kültürü ve Temel Moleküler Biyoloji Protokolleri,1.Baskı.Ankara, Ankara Nobel Tıp Kitabevleri, 2017: 50-52.

72. Shapiro HM. *Practical Flow cytometry,* 4.baskı. Amerika, 2003, 138-176.

73. Taneli F. Flow sitometri tekniği ve klinik laboratuvarda kullanımı, *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, 2007, 5(2): 75-82.

74. Lennon DP, Caplan AI. Isolation of human marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Hematology.* 2006;34(11):1604–5.

75. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 2006;8(4):315–317.

76. Kim S, Eun H, Jo E. Roles of Autophagy-Related Genes in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Cells*.,2019; *8*(1), 77.

77. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (Eds.). Isolating cells and growing them in culture. In: *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition, 2002.

78. Choua T., Brownb S., Minondc D., Nordind B., Lie K., Jones A.,Chase P., Porubskye P.,Stoltz B., Schoenen F., Patricelli M.,Hodder P., Rosen H., and Deshaies R. Reversible inhibitör of p97, DBeQ, impairs both ubiquitin-dependent and autophagic protein clearance pathways. *PNAS,*2011:4834-4839.

79. Ozsoy A., Cayli S., Sahin C., Ocakli S., Sanci T., Ilhan D. Altered Expression of p97/Valosin Containing Protein and Impaired Autophagy in Preeclamptic plesenta. *Elseiver- Plesenta*, 2018; 45-53.

80. Ju J., Fuentealba R., Miller S., Jackson E., Worms D., Baloh R., Weihl C. Valosin-Containig Protein (VCP) is a Required for Autophagy and is Disrupted in VCP Disease. *Cell Biology*, 2009, 187(6): 875-888.

8.EKLER

EK-1: Etik Kurul İzni

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemili (ALL) hastaların ve sağlıklı vericilerin kemik iliklerinden elde edilen hücrelerinde p97/Valosin içeren protein (VCP) ekspresyonunun belirlenmesi ve p97/VCP inhibitörünün bu hücreler üzerindeki etkisinin araştırılması.
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU		2017/54
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	YBÜ Yenimahalle Eğitim Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Yeni Batı Mh. 2026 Cd. Batıkent/Yenimahalle/ANKARA
	TELEFON	0312 587 20 67
	FAKS	0312 587 20 68
	E-POSTA	yenimahalleeah.etikkurul@gmail.com

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Yrd.Doç.Dr.Hilal NAKKAŞ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Histoloji-Embriyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	-			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)	-			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-			
	ARAŞTIRMANIN FAZI VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
		Gözlemsel ilaç çalışması	☐		
		Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐		
		İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐		
		İlaç dışı klinik araştırma	☒		
		Diğer ise belirtiniz			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Seyfullah Oktay ARSLAN İmza:

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemili (ALL) hastaların ve sağlıklı vericilerin kemik iliklerinden elde edilen hücrelerinde p97/Valosin içeren protein (VCP) ekspresyonunun belirlenmesi ve p97/VCP inhibitörünün bu hücreler üzerindeki etkisinin araştırılması.
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	2017/54

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐

	Belge Adı		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	SİGORTA	☐	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐	
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER:	☒	

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No: 2017/10/06**	**Tarih: 21/11/2017**
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.	

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	**Prof. Dr. Seyfullah Oktay ARSLAN**

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Seyfullah Oktay ARSLAN	Tıbbi Farmakoloji	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Prof. Dr. Fahri BAYIROĞLU	Fizyoloji	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Prof. Dr. Selim Yavuz SANİSOĞLU	Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Kadir DESDİCİOĞLU	Anatomi	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Doç. Dr. Esra ÇÖP	Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Ankara Çoc. Sağ Hast. Hem. Onk. EAH	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Doç. Dr.Sonay İNCESOY ÖZDEMİR	Çocuk Onkoloji	Yıldırım Beyazıt Üniversitesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	izinli
Yrd. Doç. Dr. Atilla ÇİFCİ	Çocuk Sağ. ve Hast.	Yenimahalle Eğitim Araştırma Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Uzm. Dr. Serdar BULUT	Ruh Sağ. ve Hastalıkları	Yenimahalle Eğitim Araştırma Hastanesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Uzm Dr. Filiz Banu ETHEMOĞLU	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	Yenimahalle Eğitim Araştırma Hastanesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Av. Sabri HAFİF	Hukuk	Özel	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Muhtar Fatma BAL	Emekli Bankacı	Serbest	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	

*:Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Seyfullah Oktay ARSLAN İmza:

EK-2. Özgeçmiş

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	: Şeyma KİPEL
Doğum tarihi	: 14.10.1989
Doğum yeri	: Ankara
Medeni hali	: Bekar
Uyruğu	: Türkiye Cumhuriyeti
Adres	: Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara
Tel	: 05547879373
E-mail	: seymakipel@gmail.com
EĞİTİM	
Lise	: Özel Ankara Aziziye Lisesi, ANKARA
Lisans	: Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen- Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, ANKARA
YABANCI DİL BİLGİSİ	
İngilizce	: 70
ÜYE OLUNAN MESLEKİ KURULUŞLAR	
Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği	

EK-3: Tezden Üretilmiş Sözlü Sunum, Poster Sunumu ve Yayınlar

1) Kipel Ş., Nakkaş H., Çaylı S., Köksal Y., Özgüner M. Does The Inhibition of Valosin Containing Protein (VCP) Has an Effect on Apoptosis of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Derived From Acute Lymphoblastic Leukemia Patients And Healthy Donors? *Proceedings.,* 2018, *2*(25), 1576.

2) Kipel Ş., Nakkaş H., Özdemir S., Çaylı S., Özgüner M. p97/Valosin içeren protein (VCP) inhibitörü olan DBeQ'nun çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemili hastaların ve sağlıklı vericilerin kemik iliği hücrelerinde p97/VCP ekspresyonuna doz ve süre bağımlı etkisi. Sözlü Sunum, 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi 10-13 Mayıs 2018, Antalya, Türkiye.

3) Kipel Ş., Nakkaş H., Çaylı S., Köksal Y., Özgüner M. Does The Inhibition of Valosin Containing Protein (VCP) Has an Effect on Apoptosis of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Derived From Acute Lymphoblastic Leukemia Patients And Healthy Donors? Poster Presenatation, 2.International Cell Death Research Congress 1-4 November 2018, İzmir, Turkey.

proceedings

MDPI

Proceedings

Does The Inhibition of Valosin Containing Protein (VCP) Has an Effect on Apoptosis of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Derived From Acute Lymphoblastic Leukemia Patients And Healthy Donors? †

Şeyma Kipel [1], Hilal Nakkaş [1], Sevil Çaylı [1], Yasin Köksal [2] and Habibe Meltem Özgüner [1,2,*]

[1] Department of Histology and Embryology, Ankara Yıldırım Beyazıt University, 06800 Ankara, Turkey; seymakipel@gmail.com (S.K.); gokturkhilal@gmail.com (H.N.); sevilcayli@yahoo.com (S.Ç.)

[2] Ankara Child Health and Disease Hematology Oncology Training and Research Hospital, 06080 Ankara, Turkey; yasinkoksal_44@hotmail.com

* Correspondence: mozguner@hotmail.com

† Presented at the 2nd International Cell Death Research Congress, İzmir, Turkey, 1–4 of November 2018.

Published: 6 December 2018

Abstract: Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common cancer type observed in childhood. Bone marrow (BM) microenvironment has significant role both at the beginning and the progress of leukemic period. Mesenchymal stem cells (MSCs) that make up microenvironment, regulate growth factors, cytokines and induction of survival of ALL cells by generating intracellular signals and establishing drug resistance. p97/VCP is a type of protein and it is responsible for also intracellular ubiquitin proteasome pathway, endoplasmic-reticulum-associated protein degradation, cell cycle, apoptosis and autophagy. It is shown that p97/VCP is overexpressed in the most of the cancer types including the ALL. p97/VCP inhibitors serve as therapeutic agents. Amongst p97/VCP inhibitors, DBeQ (dibenzylquinazoline-2,4-diamine) provide to undergo apoptosis and prevents cell proliferation. In this study, MSCs obtained from ALL patients and healthy donors were isolated by density-gradient method and then these cells were cultured. Cells were incubated with DBeQ. Cell apoptosis was determined by Annexin V/PI method (in flow cytometry). According to obtained data, availability of p97/VCP inhibitor which was recommended to be used as therapeutic agent in the treatment of other cancer types, in ALL treatment will be evaluated and this study will provide a basis for future studies.

Keywords: Acute lymphoblastic leukemia (ALL), Mesenchymal stem cells (MSCs), Apoptosis; DBeQ; p97/VCP

1. Introduction

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a malignant disease that develop from uncontrolled proliferation of B and T lymphocyte cells because of mutations occurring in the bone marrow [1]. Mesenchymal stem cells (MSCs) have an important role in the binding of hematopoietic stem cells (HSCs) and secretion of many cytokines [2]. The bone marrow microenvironment provides the self-renewal and differentiation characters of MSCs. The most important events in the stem cell niche is to maintain the number of stem cells in the niche [3].

p97/Valosin containing protein (VCP) is a member of the AAA + ATPase family. p97/VCP has been working on many important pathway such as protein degradation, cell cyle [4]. But the most

important features of p97/VCP are the role of autophagosome maturation, autophagy and apoptosis mechanism [5].

There are many p97/VCP inhibitors but it has been shown that DBeQ has no toxic effects on the cell and induce cell death mechanism [6].

Apoptosis or programmed cell death is a cell mechanism that is used to destroy unwanted, damaged or potentially neoplastic cells [7]. When the cells enter the apoptosis, the phosphatidylserine present in the membrane of the cells in translocated to the outside of the cell membrane.

The aim of this study was to investigate the effects of DBeQ on viability and apoptosis in MSCs that are obtained from childhood ALL patients and compare the results with healthy donors.

2. Materials and Methods

2.1. Selection of Groups

BM samples were derived from the patients (n = 4) who were diagnosed with ALL. Control groups were selected from healthy volunteer donors (n = 6) of patients who applied for allogenic transplantation to BM transplantation unit. After taken approval from healthy donors, sample was taken. The study was approved by the local ethical committee.

2.2. Collection of Samples

2–4 mL BM samples of ALL patients aspirated at the time of diagnosis before treatment, were accepted to Stem Cell Processing and Storage Laboratory. In addition, 2–4 mL BM samples of healthy donors were harvested from posterior iliac crest under general anesthesia.

2.3. Separation of Mononuclear Cells (MNCs) by Density-Gradient Method

BM samples were mixed with PBS (Phosphate Buffered Saline) (Biochrom, Germany) at a ratio of 1:1 and then they laid on 4 mL of Biocoll (1.077 g/mL) separating solution (Biochrom, Germany). MNCs were separated by centrifugation.

2.4. Transition from MNCs to MSCs

MNCs were cultured in 25 cm^2 flasks (T25) with Dulbeco's Modified Eagle Medium Low Glucose (DMEM-LG) (Biochrom, Germany), 10% FBS (Biochrom, Germany) and 1% penicillin-streptomycin (Biochrom, Germany). The culture media were changed every 3 days. In about two weeks, cells reached confluency of 90% in culture flasks.

2.5. Characterization of MSCs

(a)Morphological analysis: Cells adhere to the plastic surface and show spindle-polygonal morphology by using inverted microscope. (b)Differentiation assays: The differentiation assays of mesenchymal stem cells were performed as indicated in our previous studies [8].

2.6. Culture of MSCs with DBeQ

10 μM DBeQ, which is inhibitor of p97/VCP, was added to MSCs and incubated for 1 h.

2.7. Apoptosis Determination by Annexin V/PI

Cells were acquired on a Beckman Coulter Navios using Kalusa version 1.2 software by using Annexin V FITC/PI apoptosis kit for flow-cytometry.

3. Results

Figures 1 and 2 illustrates the data of flow-cytometric analysis. DBeQ was given to the mesenchymal stem cells 2 of 4 patients (Figure 1) and 3 of 6 healthy donors (Figure 2) and they are indicated as DBeQ + in the figures. Non-given groups are indicated as DBeQ −.

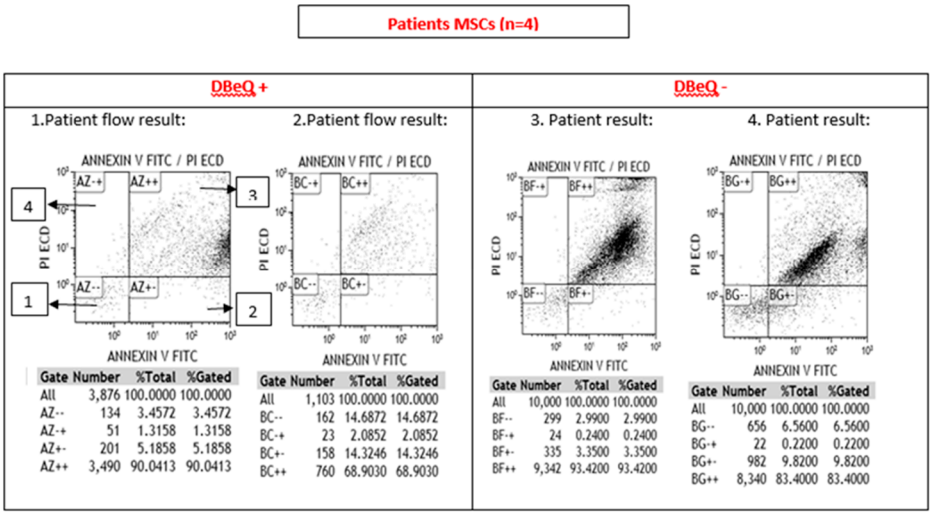


Figure 1. The schematic representation of the graph for apoptosis analysis in flow cytometry is shown in the 1st patient flow results. Field 1 shows live cells. Field 2 shows early apoptotic cells. Field 3 shows late apoptotic. cells. Field 4 shows necrotic cells. Therefore, it is important the results to compare the apoptotic cells after incubating with the inhibitor, to compare the live cells before incubating with the inhibitor.

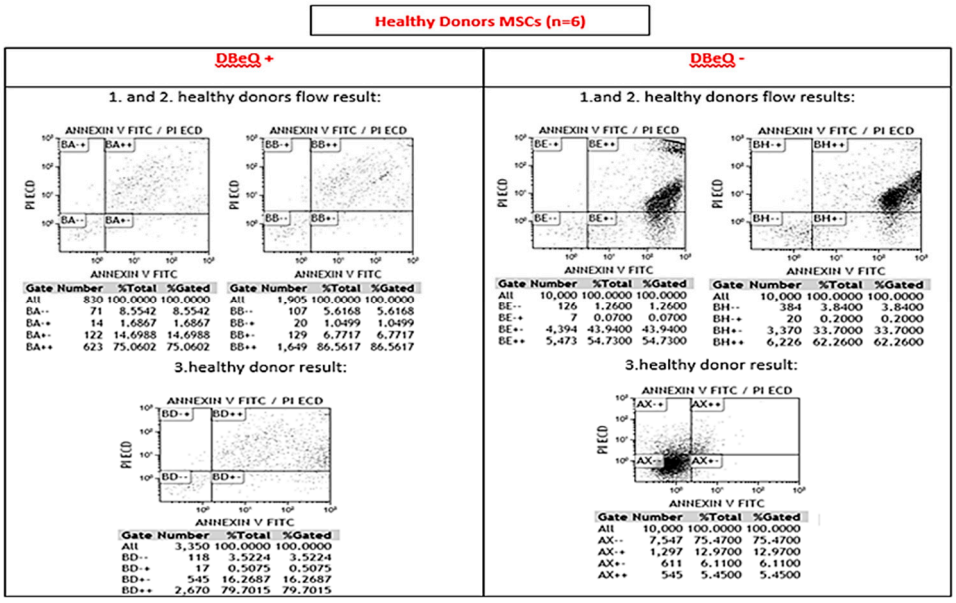


Figure 2. This figure is showed flow analysis results of healthy donor group.

4. Discussion

This is the first report concerning the function of p97/VCP on bone marrow MSCs. In the study we had two groups. The first group BM-MSCs samples were derived from ALL patients ($n = 4$) and the second group BM-MSCs samples were derived from healthy donors ($n = 6$). And then, the groups were subdivided into two which were classified as DBeQ − and DBeQ +. After an hour incubation period we analyzed the apoptotic cell percantage of the groups.

The percentage of late apoptotic cells in patients BM-MSCs were 93% and 83% where as in healthy donors BM-MSCs, these were 54%, 62% and 5% respectively. We did not analyze this results statistically because two of the results of healthy donors (54% and 62%) were relatively higher as expected in normal healthy bone marrow microenvironment. We explain this result as it is possible that we used freezed- thawed samples for two healthy donors BM-MSCs that may change apoptotic

profiles during these procedures and only one sample that we used freshly, expressed normal apoptotic profile with only 5% late apoptotic cells. So, we compared the results with only that freshly used sample. And according to results, the patients BM-MSCs in non-inhibitor (DBeQ −) group have increased number of apoptotic cells when compared with healthy donors BM-MSCs. The higher percentage of apoptosis in patients BM-MSCs could be the result of effected bone marrow microenvironment as it is known that malign processes could lead to changes in cell signaling and could create specialized cancer microenvironment with supportive or destructive MSCs [8].

When the results of DBeQ + groups were compared, the percentage of late apoptotic cells where 90% and 68% in ALL patients BM-MSCs and 75%, 86%, 79% in healthy donors BM-MSCs. The percentage of apoptotic cells in all DBeQ + groups were significantly higher than DBeQ − healthy donors.

In summary, the present study, investigating the apoptotic profiles of BM-MSCs in ALL patients and healthy donors revealed that DBeQ inhibition of p97/VCP in culture conditions induce apoptosis especially in healthy donors BM-MSCs therefore; as ALL patients BM-MSCs have increased apoptotic activity DBeQ only support the apoptotic condition. These preliminary results suggest a possible role of p97/VCP on apoptotic pathway of BM-MSCs. Further studies may provide molecular insight into the roles of p97/VCP in BM-MSCs even in healthy and pathologic conditions.

Author Contributions: H.M.Ö. designed the study; H.M.Ö. and Ş.K. wrote the manuscript; H.M.Ö, Ş.K., S.Ç. and Y.K. provided essential materials/reagents; Ş.K. and Y.K. performed the experiments. H.M.Ö., Ş.K., H.N., S.Ç. and Y.K. analyzed and discussed the data. All authors read approved the final manuscript.

Acknowledgments: Financial disclosure statement: There is no nothing to disclose.

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Uzunhan, T.A.; Karakaş, Z. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemisi. *Çocuk Derg*. **2012**, *12*, 6–15.
2. Lakshmipathy, U.; Verfaillie, C. Stem cell plasticity. *Blood Rev*. **2005**, *19*, 29–38.
3. Can, A. *Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavisinde Kullanımları*, 1 ed.; Akademisyen Tıp Kitapevi: Ankara, Turkey, 2014; pp. 39–46, 175–194, 363–337.
4. Neuwald, A.F.; Aravind, L.; Spouge, J.L.; Koonin, E. AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.* **1999**, *1*, 27–43.
5. Yeo, B.; Hong, C.; Chung, K.; Woo, H.; Kim, K.; Jung, S.; Kim, E.; Yu, S. Valosin-containing protein is a key mediator between autophagic cell death and apoptosis in adult hippocampal neural stem cells following insulin withdrawal. *Mol. Brain* **2016**, *9*, 31.
6. Chou, T.; Deshaies, R. Development of p97 AAA ATPase inhibitors. *Landes Biosci*. **2011**, *10*, 91–92.
7. Wickremasinghe, R.; Hoffbrand, V. Biochemical and genetic control of apoptosis: Relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Blood* **1999**, *11*, 3587–3600.
8. Ok Bozkaya, I.; Azik, F.; Tavil, B.; Koksal, Y.; Ozguner, M.; Tunc, B.; Uckan Cetinkaya, D. The Effect of Granulocyte Colony-Stimulating Factor on Immune-Modulatory Cytokines in the Bone Marrow Microenvironment and Mesenchymal Stem Cells of Healthy Donors. *Biol. Blood Marrow Transplant.* **2015**, *21*, 1888–1894.



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

THED
Ankara 1990

14. ULUSAL HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ KONGRESİ

"hücre hayattır"

10-13 Mayıs 2018

Hotel Su-Antalya

www.thed2018.org



KONGRE PROGRAMI & ÖZET KİTABI

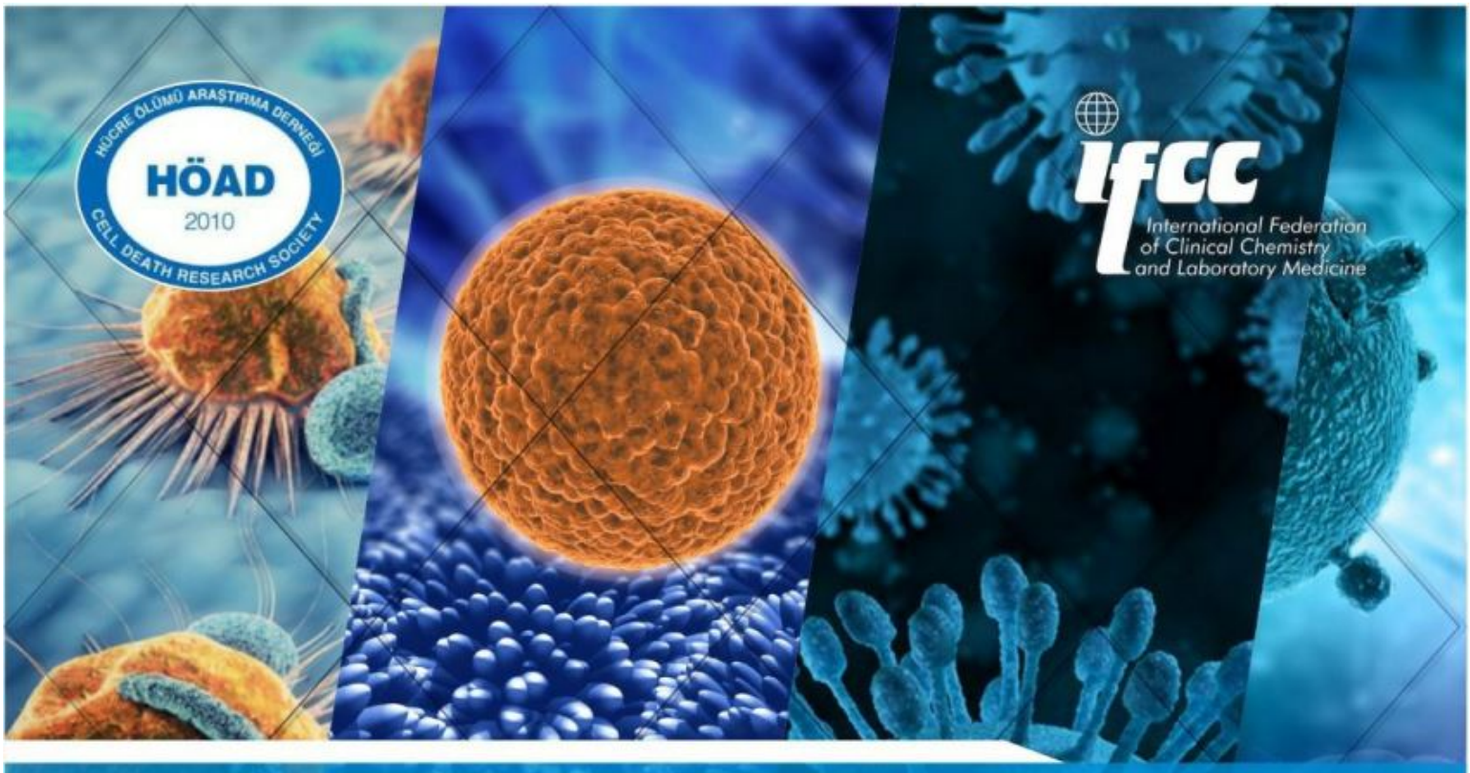
S72

p97/Valosin içeren protein (VCP) inhibitörü olan DBeQ'nun çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemili hastaların ve sağlıklı vericilerin kemik iliği hücrelerinde p97/VCP ekspresyonuna doz ve süre bağımlı etkisi

Şeyma Kipel[1], Hilal Nakkaş[1], Tuba Özdemir Sancı[1], Sevil Çaylı[1], Meltem Özgüner[2]
[1]Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı,Ankara
[2]Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları Hematoloji-Onkoloji Eğitim Araştırma Hastanesi Kök Hücre İşleme Ve Saklama Laboratuvarı, Ankara

Giriş/Amaç: Akut lenfoblastik lösemi (ALL) kemik iliğinde bulunan lenfoid öncül hücreler olan B ve T progenitör hücrelerin farklılaşmasının herhangi bir safhasında meydana gelen mutasyonlar sonucu gelişen malign bir hastalıktır. Bu hastalığın tedavisine yönelik kesin bir kanıt olmamakla birlikte çalışmalar devam etmektedir. p97/VCP AAA+ATPaz ailesinin bir üyesidir. Hücre içinde übikütin proteozom yolağı, endoplazmik retikulum ilişkili protein yıkımı, hücre siklusu, apoptoz, otofaji gibi birçok önemli yolakta görev yapmaktadır. Yapılan son çalışmalarda p97/VCP'nin birçok kanser türünde fazla ifade edildiği ve bu proteine yönelik inhibitörlerin terapötik ajan olarak çoğalan kanser hücrelerinin apoptozu üzerinde etkisinin olduğu gösterilmiştir. Fakat bugüne kadar, ALL hastalarına ait hücrelerde ve sağlıklı donörlerde karşılaştırmalı olarak p97/VCP ekspresyonu ve p97/VCP inhibitörünün bu hücrelerdeki etkisi üzerine bir çalışma yapılmamıştır. Bu nedenle, çalışmadaki ilk amacımız ALL hastaların ve sağlıklı vericilerin kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücre (MKH) ve mononükleer hücrelerinde p97/VCP ekspresyonunu belirlemek, sonrasında da p97/VCP inhibitörü olan DBeQ (dibenzylquinazoline-2,4-diamine) 'nun bu hücreler üzerindeki etkisini araştırmaktır.
Gereç/Yöntem: Ankara Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji-Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kök hücre laboratuvarına gelen sağlıklı vericilerin (n:5) kemik iliği örnekleri ve ALL tanısı alan hastaların (n:5) yeni tanı anındaki kemik iliği örnekleri toplandı. Kemik iliği örneklerinden mononükleer hücreler izole edildi ve MKH üretmek için hücreler kültüre edildi. Kültüre edilen hücrelerde, p97/VCP ekspresyonu immunositokimya ve Western blot yöntemleriyle belirlendi. p97/VCP aktivitesini durduran DBeQ farklı doz (5, 10 ve 15μM) ve zaman aralıklarında (1,2,4 ve 12 saat) hücreler ile inkübe edilerek bu hücreler üzerindeki etkisi western-blot analizi ile gösterildi.
Bulgular: Kemik iliğinden izole edilen mononükleer hücreler ve MKH'lerde p97/VCP ekspresyonu immunositokimya ve Western-blot analizi ile belirlendi. Hasta ve dönor hücre grupları arasındaki farklılıklar incelendi. Elde edilen hücreler üzerinde farklı doz ve zaman aralıklarında denenen p97/VCP inhibitörü DBeQ'nun 15 μM dozunda ve 2-4 saat aralıklarında en etkili inhibisyon etkisine sahip olduğu gözlendi. İleri araştırmalarımız devam etmektedir.
Sonuç: Şu ana kadar elde edilen bulgular p97/VCP'nin dönor ve hasta gruplarına ait mononükleer ve MKH'lerdeki farklı ekspresyonunu ve bu ekspresyonun etkisinin p97/VCP inhibitörü uygulanması ile değiştirildiğini göstermektedir. Bu ön bulgular DBeQ'nun ALL hastalığının klinik tedavisinde kullanılabileceği önermesini desteklemektedir.

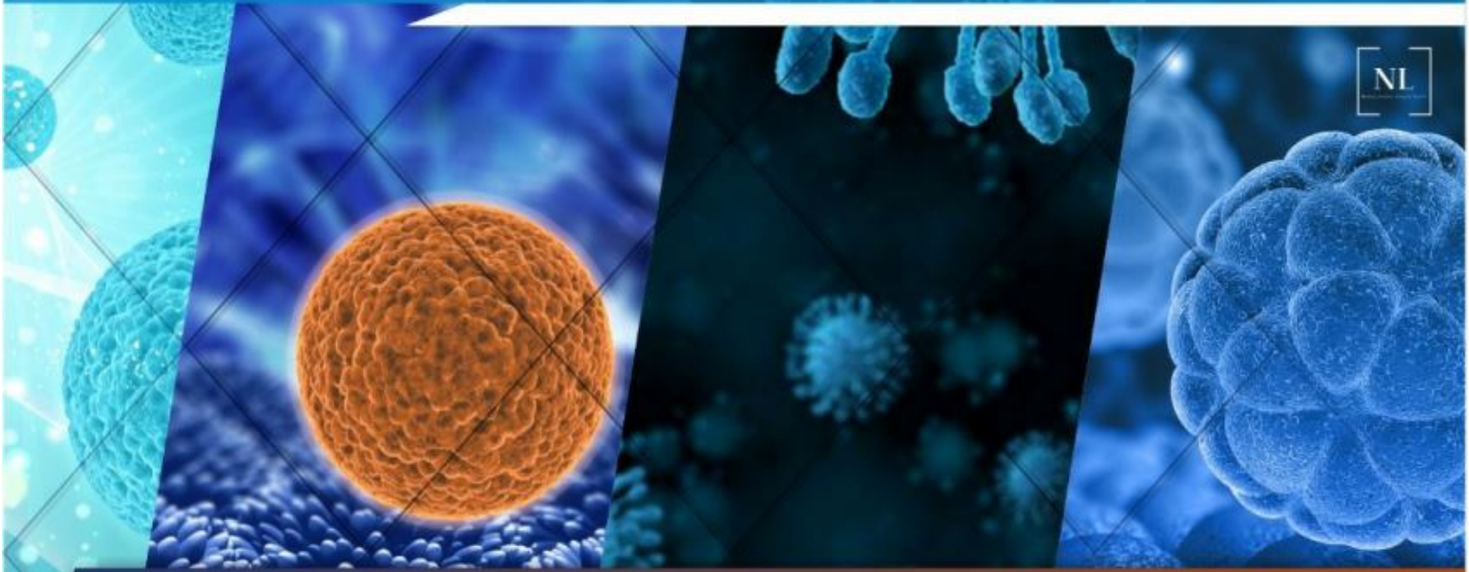
Anahtar Kelimeler: Akut lenfoblastik lösemi(ALL), mezenkimal kök hücre (MKH), p97/VCP, DBeQ



www.celldeathturkey2018.org

2nd INTERNATIONAL CELL DEATH RESEARCH CONGRESS

3rd CONGRESS OF CELL DEATH RESEARCH SOCIETY - TURKEY



01-04 NOVEMBER 2018, Wyndham Grand Izmir Ozdilek, IZMIR

DOES THE INHIBITION OF VALOSIN CONTAINING PROTEIN (VCP) HAS AN EFFECT ON APOPTOSIS OF BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS DERIVED FROM ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA PATIENTS AND HEALTHY DONORS?

Şeyma KİPEL[1], Hilal NAKKAŞ[1], Sevil ÇAYLI[1], Yasin KÖKSAL[2], Habibe Meltem ÖZGÜNER[1,2]

[1]Department of Histology and Embryology, Ankara Yıldırım Beyazıt University, Ankara, Turkey
[2]Child Health and Disease Hematology Oncology Training and Research Hospital., Ankara, Turkey

INTRODUCTION :

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a malignant disease that develop from uncontrolled proliferation of B and T lymphocyte cells because of mutations occurring in the bone marrow [1]. In this disease hematopoietic cells are replaced by leukemic cells in the bone marrow. Bone marrow is the largest source of stem cells in organisms. Hematopoietic and mesenchymal cells originating from the mesoderm layer are found in bone marrow. Mesenchymal stem cells (MSCs) have an important role in the binding of hematopoietic stem cells (HSCs) and secretion of many cytokines [2]. In the bone marrow of the cells, the environment in which they are found is called the bone marrow microenvironment. This microenvironment provides the self-renewal and differentiation characters of MSCs, which are the most important groups of cells in the bone marrow microenvironment. The most important events in the stem cell niche is to maintain the number of stem cells in the niche. The bone marrow microenvironment is important in the onset of leukemia and in the advanced stage of disease [3].

p97/Valosin containing protein (VCP) is a member of the AAA+ATPase family. p97/VCP has been working on many important pathway such as protein degradation, cell cyle [4,5]. But the most important features of p97/VCP are the role of autophagosome maturation, autophagy and apoptosis mechanism [6]. There are many p97/VCP inhibitors but it has been shown that DBeQ (dibenzylquinazoline-2,4-diamine) has no toxic effects on the cell and induce cell death mechanism [7].

Apoptosis or programmed cell death is a cell mechanism that is used to destroy unwanted, damaged or potentially neoplastic cells. This type of cell death is characterized by specific formal changes such as separation of DNA into nucleosome fragments and nucleus degradation [8]. When the cells enter the apoptosis, the phosphatidylserine present in the membrane of the cells in translocated to the outside of the cell membrane. Annexin V, which is a fluorescent agent, binds to phosphatidylserine to make apoptotic cells visible. After cell death is induced, cells are stained with PI for separation dead and alive cells.

The aim of this study was to investigate the effects of DBeQ on viability and apoptosis in MSCs that are obtained from childhood ALL patients and compare the results with healthy donors.

MATERIAL AND METHOD :

Selection of groups: Bone marrow samples were derived from the patients (n=4) who were diagnosed with ALL. In addition, the patients were selected to be free of any other known chronic illnesses and to be children (under 18 years of age) regardless of male or female gender. Control groups were selected from healthy volunteer donors (n=6) of patients who applied for allogenic transplantation to bone marrow transplantation unit. After taken approval from healthy donors, sample was taken during the bone marrow transplantation. The study was approved by the local ethical committee.

Collection of samples: 2-4 ml bone marrow samples of ALL patients aspirated at the time of diagnosis before treatment, were accepted to Stem Cell Processing and Storage Laboratory. In addition, 2-4 ml bone marrow samples of healthy donors were harvested from posterior iliac crest under general anesthesia and also accepted to the laboratory.

Separation of Mononuclear Cells (MNCs) by Density-Gradient method: Bone marrow samples were mixed with PBS (Phosphate Buffered Saline) at a ratio of 1:1 and then they laid on 4 ml of Biocoll (1.077 g/mL) separating solution. MNCs were separated by centrifugation. The supernatant was discharged and buffy coat was collected in other tube. And then the centrifugation process was repeated once more and the cell suspension was prepared for cell culture.

Transition from MNCs to Mesenchymal Stem Cells (MSCs): MNCs were cultured in 25 cm^2 flasks (T25) with Dulbeco's Modified Eagle Medium Low Glucose (DMEM-LG) , 10% FBS and 1% penicillin-streptomycin. The culture media were changed every 3 days. The aim is to remove non-adhesive hematopoietic cells from the environment. In about two weeks, cells with adhesive character have been proliferated and reached confluency of 90 % in culture flasks.

Characterization of MSCs: a) Morphological analysis: Cells adhere to the plastic surface and show spindle-polygonal morphology. Morphological characteristics were determined by using inverted microscope. b) Differentiation assays: To prove that cells are MSCs, osteogenic and adipogenic differentiation capacity is required to be demonstrated in vitro. The differentiation assays of mesenchymal stem cells were performed as indicated in our previous studies [9].

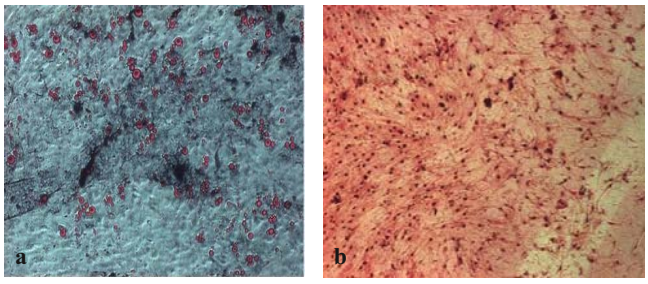


Figure 1: a) Oil Red O was used to demonstrate adipocyte differentiation. It stained of lipid vacuoles in mature adipocytes. b) Alizarin Red was used to osteogenic differentiation. It stained calcium containing osteocytes.

Culture of MSCs with DBeQ: 10 µM DBeQ, which is inhibitor of p97/VCP, was added to MSCs and incubated for 1 hour.

Apoptosis determination by Annexin V / PI: In order to determine that DBeQ effects MSCs in the direction of apoptosis. Cells were acquired on a Beckman Coulter Navios using Kalusa version 1.2 software by using Annexin V FITC/ PI apoptosis kit for flow-cytometry.

RESULTS :

Figure 2 and figure 3 illustrates the data of flow-cytometric analysis. DBeQ was given to the mesenchymal stem cells 2 of 4 patients (Figure 2) and 3of 6 healthy donors (Figure 3) and they are indicated as DBeQ+ in the figures. Non-given groups are indicated as DBeQ -.

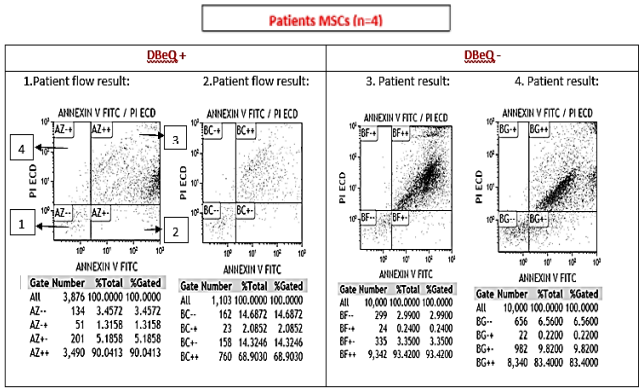


Figure 2: The schematic representation of the graph for apoptosis analysis in flow cytometry is shown in the 1st patient flow results. Field 1 shows live cells. Field 2 shows early apoptotic cells. Field 3 shows late apoptotic cells. Field 4 shows necrotic cells. Therefore, it is important the results to compare the apoptotic cells after incubating with the inhibitor, to compare the live cells before incubating with the inhibitor.

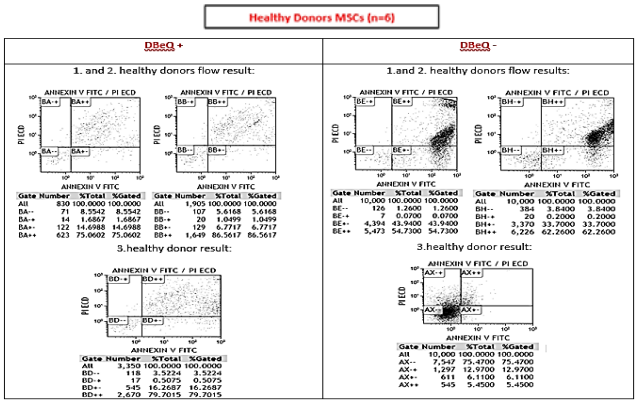


Figure 3 : This figure is showed flow analysis results of healthy donor group

CONCLUSIONS :

Under the light of literature, it is expected that the patients BM-MSCs should have increased number of apoptotic cells than the healthy donors BM-MSCs [8]. Our results confirmed the expectations, the percentage of late apoptotic cells in patients BM-MSCs were 93 % and 83% where as the percentage of late apoptotic cells in healthy donors BM-MSCs were 54 %, 62 % and 5 % respectively. We did not analyze this results statistically because two of the results of healthy donors (54% and 62 %) were relatively higher as expected in normal healthy bone marrow microenvironment. We explain this result as it is possible that we used freezed- thawed samples for two healthy donors BM-MSCs that may change apoptotic profiles during these procedures and only one sample that we used freshly, expressed normal apoptotic profile with only 5 % late apoptotic cells. So, we compared the results with only that freshly used sample. And according to results, the patients BM-MSCs in non-inhibitor (DBeQ -) group have increased number of apoptotic cells when compared with healthy donors BM-MSCs. The higher percentage of apoptosis in patients BM-MSCs could be the result of effected bone marrow microenvironment as it is known that malign processes could lead to changes in cell signaling and could create specialized cancer microenvironment with supportive or destructive MSCs [8]. When the results of DBeQ + groups were compared, the percentage of late apoptotic cells where 90 % and 68 % in ALL patients BM-MSCs and 75 %, 86%, 79% in healthy donors BM-MSCs. The percentage of apoptotic cells in all DBeQ + groups were significantly higher than DBeQ – healthy donors. According to the results of our study, DBeQ seems to be a potent inhibitor of p97/VCP even in BM-MSCs as it led to the induction of apoptotic pathway. Also, we concluded that BM-MSCs have higher percentage of apoptotic cells in ALL patients even without DBeQ inhibition.

REFERENCES :

1)Uzunhan TA, Karakaş Z. Çocukluk Çağı Akut Lenfoblastik Lösemisi, *Çocuk Dergisi*., 2012;12(1):6–15.
2)Lakshmipathy U, Verfaillie C. Stem cell plasticity, *Blood Rev*., 2005;19(1):29– 38.
3)Can A. Kök Hücre Biyolojisi, Türleri ve Tedavisinde Kullanımları.,1. Baskı.Ankara, Akademisyen Tıp Kitapevi, 2014: 39-46, 175-194, 363-37.
4)Neuwald, A.F, Aravind, L, Spouge, J.L., Koonin, E. AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes, *Genome Res*.,1999,1;27-43.
5)Zwickl, P, Baumeister, W.AAA-ATPases at the crossroads of protein life and death, *Nat Cell Biol*.,1999, 1:97-98.
6)Yeo,B, Hong C, Chung K, Woo H, Kim K, Jung S, Kim E, and Yu S. Valosin-containing protein is a key mediator between autophagic cell death and apoptosis in adult hippocampal neural stem cells following insulin withdrawal, *Molecular Brain*.,2016, 9:31.
7)Chou, T, Deshaies, R, Development of p97 AAA ATPase inhibitors, *Landes Bioscience*.,2011:1091-92
8)Wickremasinghe,R, Hoffbrand,V. Biochemical and genetic control of apoptosis: relevance to normal hematopoiesis and hematological malignancies, *Blood*.,1999,11:3587.
9) Ok Bozkaya I, Azik F, Tavil B, Koksal Y, Ozguner M, Tunc B, Uckan Cetinkaya D. The Effect of Granulocyte Colony-Stimulating Factor on Immune-Modulatory Cytokines in the Bone Marrow Microenvironment and Mesenchymal Stem Cells of Healthy Donors. *Biol Blood Marrow Transpant*., 2015 Nov;21(11):1888-94.