



**Pi3k-Akt-Mtor Yolağı Ve Histon Deasetilaz Enzimlerinin
Hedeflenmesinin Akut Myeloid Lösemi Hücreleri Üzerine
Antitümör Etkisinin İncelenmesi**

Program Kodu:1002

Proje No:121Z691

Proje Yürütücüsü:

Dr. Öğr. Üyesi EMEL BAŞAK GENCER AKÇOK

ARALIK 2022

ANKARA

ÖNSÖZ

Akut Miyeloid Lösemi (AML), periferik kan, kemik iliği, dalak ve karaciğerde blast adı verilen olgunlaşmamış miyeloid hücrelerin birikmesiyle karakterize edilen ve sonunda hematopoietik maligniteye yol açan bir hastalıktır. Genetik anormalliklerin yanı sıra PI3K/AKT/mTOR, Wnt, Notch, STAT3, Hedgehog gibi önemli hücreyel yolların AML hücrelerinde deregüle olduğu ve birçok kanserin patogeneğinde rol oynadığı bildirilmiştir. PI3K/AKT/mTOR yolunun, meme kanseri, kolorektal kanser ve hematolojik maligniteler gibi hemen hemen tüm kanserlerde anormal olduğu bulunmuştur ve bu yolun anormal aktivasyonu, artan hücre döngüsü, hücre proliferasyonu dahil olmak üzere kanserin birçok yönde katkıda bulunur. Histon deasetilaz (HDAC), kromatin yeniden şekillenmesi ve gen ekspresyonu için önemli bir epigenetik düzenleyicidir. Bu nedenle, kanser hücrelerinde HDAC'lerin işlevindeki herhangi bir düzensizlik, hücre farklılaşması, anjiyogenez, apoptoz ve hücre proliferasyonu gibi önemli hücreyel olayların düzenlenmesinde yer alan genlerin baskılanmasına yol açabilir. Bu çalışmada, iki farklı AML hücre hattı kullanarak PI3K/AKT/mTOR yolu modülasyonu ve HDAC enzim inhibisyonunun hücre canlılığı, hücre döngüsü ve hücre ölüm mekanizması üzerindeki etkisini araştırmayı amaçlanmıştır. Ne yazık ki, AML için tedavi seçenekleri oldukça sınırlıdır. Bu nedenle AML'ye karşı yeni terapi seçeneklerinin araştırılması gerekmektedir. Son zamanlarda, histon deasetilaz inhibitörleri ilgi çekici antikanser ajanları olarak sunulmuştur. Bununla birlikte, AML'deki etki biçimleri hala tam olarak anlaşılammıştır.

Bu proje ile histon deasetilaz enzimlerinin AML bağlamında PTEN/PI3K/AKT/mTOR otofajik yolu üzerindeki etkisinin ilk kez araştırılmıştır. HDAC enzimlerinin hem AML hem de farklı kanserler üzerindeki etkileri ve AML'nin patogeneğinde birçok epigenetik mekanizmanın rol oynadığı düşünüldüğünde, HDAC inhibisyonu AML için önemli ve yüksek potansiyeli olan bir hedefdir. Bu nedenle PI3K/AKT/mTOR yolağı ve HDAC'lerin farklı alt gruplarda inhibisyonunun araştırılması, AML'nin patogeneğine yol açan mekanizmalar hakkında fikir verebilir. Sonuç olarak, PI3K/AKT/mTOR ve HDAC'nin bu inhibisyonunun, AML'nin ortadan kaldırılmasıyla sonuçlanan daha spesifik bir kombinasyon hedefli tedaviye yol açacağı umulmaktadır. Proje önerisi TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

1	GİRİŞ ve LİTERATÜR ÖZETİ.....	1
1.1	Akut myeloid lösemi	1
1.1.1	Akut myeloid lösemisini moleküler patogenezi	4
1.2	Epigenetik regülasyon	9
1.2.1	Histon deasetilaz enzimleri	9
1.3	Projenin Amacı.....	13
2	GEREÇ ve YÖNTEM	14
2.1	Gereçler	14
2.1.1	Kimyasallar	14
2.1.2	Teçhizatlar	15
2.2	Yöntemler	15
2.2.1	Hücre kültürü.....	15
2.2.2	In vitro hücre canlılığı deneyi	15
2.2.3	Apoptoz deneyleri.....	16
2.2.4	Hücre döngüsü deneyleri.....	17
2.2.5	Western blotlama ile protein ifadesinin tespiti.....	17
3	BULGULAR	19
3.1	CMK ve MOLM-13 hücreleri üzerinde PI3K enzim inhibitörü olan LY294002 antiproliferatif etkileri.....	19
3.2	CMK ve MOLM13 hücreleri üzerinde farklı HDAC inhibitörlerinin antiproliferatif etkileri.....	20
3.3	CMK ve MOLM-13 hücreleri üzerinde LY294002 ve farklı HDAC inhibitörlerinin kombinatoryal antiproliferatif etkileri	21
3.4	CMK ve MOLM-13 hücrelerinde kombinasyon uygulamasının hücre döngüsü üzerine etkisi	23
3.5	CMK ve MOLM-13 hücrelerinde kombinasyon uygulamasının apoptotik hücre ölümü üzerine etkisi.....	26
3.6	Otofaji İnhibisyonunun ve HDAC İnhibisyonunun Kombinasyonunun Otofajinin Moleküler İşaretleri Üzerindeki Etkisi.....	29
3.7	İlaç uygulanan hücrelerin koloni oluşturma potansiyellerinin tespit edilmesi	32
4	TARTIŞMA.....	34
5	SONUÇ ve ÖNERİLER	37
6	KAYNAKLAR	38

ŞEKİL LİSTESİ

		Sayfa No
Şekil 1.1	Normal ve lösemik hematopoez	1
Şekil 1.2	AML'de hassas tıbbın gelişen manzarası ve çeşitli hassas tedavi konseptlerinin klinik gelişimine ilişkin bir bakış açısı sağlar	6
Şekil 1.3	Histon deasetilazların (HDAC'ler) dahil olduğu kanser hücresi biyolojisinin ayırt edici özellikleri	10
Şekil 3.1	PI3K inhibitörü LY294002 inhibitörünün CMK ve MOLM-13 hücreleri üzerine 48 saatlik hücre proliferasyonu.	19
Şekil 3.2	HDAC inhibitörlerinin CMK ve MOLM-13 hücre hatları üzerine 48 saatlik hücre proliferasyonu	21
Şekil 3.3	Sabit GI20 konsantrasyonundaki HDAC inhibitörleri ve LY294002 kombinasyonu uygulanmış CMK hücre hatlarının 48 saatlik hücre proliferasyonu.	22
Şekil 3.4	Sabit GI20 konsantrasyonundaki HDAC inhibitörleri ve LY294002 kombinasyonu uygulanmış MOLM-13 hücre hatlarının 48 saatlik hücre proliferasyonu.	22
Şekil 3.5	Kombinasyon uygulamasının CMK hücre döngüsü ilerlemesi üzerindeki etkisi.	24
Şekil 3.6	Kombinasyon uygulamasının MOLM-13 hücre döngüsü ilerlemesi üzerindeki etkisi.	25
Şekil 3.7	İlaç kombinasyonunun CMK hücrelerinde hücre ölümü üzerine olan etkisi.	27
Şekil 3.8	İlaç kombinasyonunun MOLM-13 hücrelerin hücre ölümü üzerine olan etkisi	28
Şekil 3.9	LY294002 ve PCI34051 (A), SAHA (B), Tubastatin A (C) kombinasyon uygulamasının CMK hücrelerinde 48 saat boyunca LC3B I/II proteininin ifadesi üzerindeki etkisi.	30
Şekil 3.10	LY294002 ve PCI34051 (A), SAHA (B), Tubastatin A (C) kombinasyon uygulamasının MOLM-13 hücrelerinde 48 saat boyunca LC3B I/II proteininin ifadesi üzerindeki etkisi.	31
Şekil 3.11	MOLM-13 ve CMK hücrelerinin yumuşak agar koloni oluşumu mikroskop görüntüsü ve kristal viyolet ile boyanması	33
Şekil 3.12	K562 hücresinin yumuşak agar koloni oluşumu mikroskop görüntüsü ve kristal viyolet ile boyanması	33

TABLO LİSTESİ

		Sayfa No
Tablo 1.1	AML'deki genetik değişiklikler fonksiyonel gruplandırılması	3
Tablo 1.2	Klinik öncesi ve klinik çalışmalardaki HDAC inhibitörleri ve kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması	12
Tablo 2.1	Çalışmada kullanılan spesifik inhibitörlerin kimyasal yapıları	14
Tablo 3.1	Çalışmada kullanılan HDAC inhibitörleri ve hedefledikleri enzimler	20
Tablo 3.2	CMK ve MOLM-13 hücreleri için HDAC inhibitörlerinin GI20 ve GI50 değerleri	21

ÖZET

Akut Miyeloid Lösemi (AML), periferik kan, kemik iliği, dalak ve karaciğerde blast adı verilen olgunlaşmamış miyeloid hücrelerin birikmesiyle karakterize edilen ve sonunda hematopoietik maligniteye yol açan bir hastalıktır. Genetik anormalliklerin yanı sıra PI3K/AKT/mTOR, Wnt, Notch, STAT3, Hedgehog gibi önemli hücreyel yolakların AML patogenezinde rol oynadığı bildirilmiştir. Histon deasetilaz (HDAC) inhibitörleri, AML için umut verici antikanser aktiviteye sahiptir. Çalışmada, PI3K/AKT/mTOR yolunun inhibisyonunun ve HDAC inhibisyonunun farklı AML alt gruplarının hücre hatları olan MOLM-13 ve CMK hücre hatları kullanılarak bu hastalığın altında yatan moleküler mekanizma üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla PI3K inhibitörü LY294002 ve HDAC inhibitörleri (SAHA, PCI-3501 ve Tubastatin A) ve bunların kombinasyonlarının etkisi incelenmiştir. Hücre proliferasyonu MTT hücre sitotoksitesite testi ile apoptoz oranları ise Annexin-V/PI çift boyama yöntemi ile belirlenmiş, ilaçların hücre döngüsüne olan etkileri de PI boyaması ile belirlenmiştir. Otofaji belirteci olan LC3B protein seviyesi moleküler düzeyde western blot ile doğrulanmıştır.

Kullanılan inhibitörler her iki hücre hattı üzerinde düşük mikromolar konsantrasyonda hücre canlılığını azaltmıştır. Sonuçlar LY294002+SAHA kombinasyon tedavisinin MOLM-13 hücrelerinde hücre proliferasyonunu %50, CMK hücrelerinde ise %25 azalma gösterdiği belirlenmiştir. LY294002+Tubastatin A tedavisi, MOLM-13 ve CMK hücrelerinde hücre proliferasyonunu sırasıyla %65 ve %40 oranında azalttığını göstermiştir. Sonuçlarımız, LY294002 ve HDAC inhibitör kombinasyonlarının kontrol hücrelerine kıyasla MOLM-13 hücrelerinde G1 fazı tutuklanmasıyla sonuçlandığını gösterdi. Öte yandan, LY294002+SAHA, LY294002+PCI-3501 ve LY294002+Tubastatin A kombinasyonları ile tedavi edilen CMK hücreleri, sırasıyla G2/M, G2/M ve G1 fazında tutuklanmıştır. Kombinasyonların apoptotik hücre ölümü üzerine etkisine bakılmış, LC3BII/I protein ifade düzeyi kombinasyon tedavisi sonucunda incelenmiştir.

HDAC enzimlerinin hem AML hem de farklı kanserler üzerindeki etkileri düşünüldüğünde, HDAC inhibisyonu AML için önemli ve yüksek potansiyelli bir hedeftir. Bu nedenle PI3K/AKT/mTOR yolağı ve HDAC'lerin farklı alt gruplarda inhibisyonunun araştırılması, AML'nin patogenezinde yol açan mekanizmalar hakkında fikir verebilir. Sonuç olarak, PI3K/AKT/mTOR ve HDAC'nin bu inhibisyonunun, AML'nin ortadan kaldırılmasıyla sonuçlanan daha spesifik bir kombinasyon hedefli tedaviye yol açacağı umulmaktadır.

Anahtar kelimeler: AML, histon deasetilaz inhibitörleri, PTEN/PI3K/AKT/mTOR, otofaji, kombinasyon

ABSTRACT

Acute Myeloid Leukemia (AML) is a disease characterized by the accumulation of immature myeloid cells called blasts in the peripheral blood, bone marrow, spleen, and liver, eventually leading to hematopoietic malignancy. In addition to genetic abnormalities, important cellular pathways such as PI3K/AKT/mTOR, Wnt, Notch, STAT3, Hedgehog have been reported to play a role in the pathogenesis of AML. Histone deacetylase (HDAC) inhibitors have promising anticancer activity for AML. In this study, it was aimed to investigate the effect of inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway and HDAC inhibition on the molecular mechanism underlying this disease using cell lines of different AML subgroups, MOLM-13 and CMK cell lines. For this purpose, the effects of PI3K inhibitor LY294002 and HDAC inhibitors (SAHA, PCI-3501 and Tubastatin A) and their combinations were investigated. Cell proliferation was determined by MTT cell cytotoxicity test and apoptosis rates were determined by Annexin-V/PI double staining method, and the effects of drugs on the cell cycle were determined by PI staining. The level of LC3B protein, a marker of autophagy, was confirmed at the molecular level by western blot.

The inhibitors used decreased cell viability at low micromolar concentrations on both cell lines. It was determined that the LY294002+SAHA combination treatment showed a 50% reduction in cell proliferation in MOLM-13 cells and a 25% decrease in CMK cells. LY294002+Tubastatin A treatment has been shown to reduce cell proliferation in MOLM-13 and CMK cells by 65% and 40%, respectively. Our results showed that combinations of LY294002 and HDAC inhibitor resulted in G0/G1 phase arrest in MOLM-13 cells compared to control cells. On the other hand, CMK cells treated with combinations of LY294002+SAHA, LY294002+PCI-3501 and LY294002+Tubastatin A were arrested in G2/M, G2/M and G0/G1 phase, respectively. The effect of the combinations on apoptotic cell death was investigated. LC3B protein expression level was checked as a result of combination therapy.

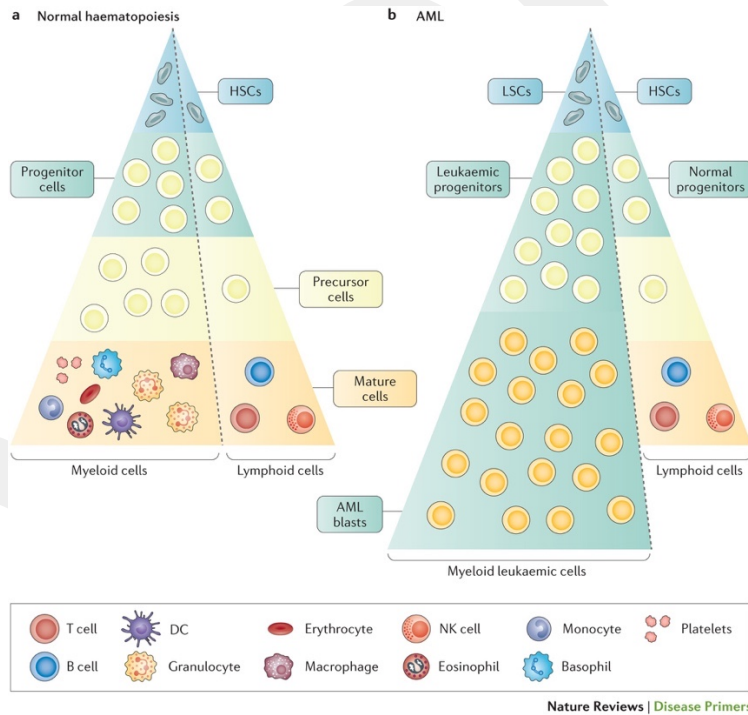
Considering the effects of HDAC enzymes on both AML and different cancers, HDAC inhibition is an important and high-potential target for AML. Therefore, investigation of the PI3K/AKT/mTOR pathway and inhibition of HDACs in different subgroups may provide insight into the mechanisms leading to the pathogenesis of AML. Consequently, it is hoped that this inhibition of PI3K/AKT/mTOR and HDAC will lead to a more specific combination of targeted therapy that results in the abolition of AML.

Keywords: AML, Histone deacetylase inhibitors, PTEN/PI3K/AKT/mTOR, autophagy, combination

1. GİRİŞ ve LİTERATÜR ÖZETİ

1.1 Akut myeloid lösemi

Akut Miyeloid Lösemi (AML), periferik kan, kemik iliği, dalak ve karaciğerde, blast adı verilen olgunlaşmamış miyeloid hücrelerin birikimi ile karakterize olan ve sonunda hematopoietik maligniteye yol açan bir hastalıktır (Lima vd.,2016; Yamamoto vd.,2015; Döhner vd., 2015). Kromozomal anormallikler, genetik bozukluklar ve abnormal sinyal yolları AML patogenezinde rol oynayabilir, bu durum AML'yi oldukça karmaşık ve kompleks bir hastalık haline getirir (Lima vd., 2016; Kihara vd., 2014; Döhner vd., 2015; Heidel vd.,2015; Kumar vd., 2011).



Şekil 1.1 Normal ve lösemik hematopoez (Khawaja vd., 2016)

AML her yaşta görülebilir ancak özellikle 65-74 yaş arasında görülme sıklığı yüksek olduğu için yetişkin lösemi türü olarak bilinir ve akut lösemilerin yaklaşık %80'ini oluşturur (Thein vd., 2013; Ocias vd.,2016; Shallis vd., 2019). AML şimdiye kadar üç farklı kategoriye göre sınıflandırılmıştır: Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), Fransız-Amerikan-İngiliz sınıflandırma sistemi (FAB), European LeukemiaNet (ELN). Başlangıçta AML sınıflandırması, AML'yi hücrenel farklılaşma özellikleri ve sitogenetiğe bağlı olarak farklı morfolojik gruplara ayıran Fransız-

Amerikan-İngiliz sınıflandırma sistemine (FAB-M0-M7) göre yapılmıştır (Bennett vd, 1976). Daha sonra 2002 yılında AML, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından morfoloji, sitogenetik ve immünofenotiplemeye dayalı olarak farklı alt tiplere yeniden sınıflandırılmıştır (Vardiman vd. 2002). WHO, AML'yi Tekrarlayan genetik anomalilerle ilişkili AML, Myelodisplazi ile ilişkili değişikliklerle giden AML, Terapi ile ilişkili AML, AML, Sınıflandırılmayan grup, Myeloid Sarkom, Down Sendromu ile ilişkili Myeloid proliferasyonlar ve Blastik plazmositoid dendritik hücre neoplazileri olmak üzere altı ana gruba ayırmıştır (Arber vd, 2016). Ayrıca, WHO sınıflandırması, AML tanısı için gerekli olan lösemik patlama oranını %30'dan (FAB sınıflandırmasına göre) %20'ye düşürmüştür. FAB ve WHO sınıflandırmasına ek olarak, European LeukemiaNet (ELN), 2010 yılında AML için yeni bir sınıflandırma önermiştir (Döhner vd., 2017). ELN, sınıflandırmayı "Hastayla ilişkili faktörler" ve "AML ile ilişkili faktörler" gibi prognostik faktörlere dayalı olarak önermiştir ve AML, klinik sonuç ile genetik anormallikler arasında bir korelasyon göstermek için ELN tarafından Olumlu, Orta-I, Orta-II ve Olumsuz prognoz olarak dört kategoriye ayrılmıştır (Döhner vd., 2017). Yeni geliştirilen sekanslama teknolojilerinin kullanılması, son zamanlarda AML'nin patogenezi hakkındaki bilgilerimizi oldukça genişletmiştir ve hastalığın moleküler, genetik ve epigenetik değişikliklere bağlı olarak farklı risk gruplarına sınıflandırılmasına izin vermiştir (Gbadamosi vd., 2018; Liersch, Döhner vd., 2015). Bu nedenle, genetik anormallikler, hastaları farklı risk gruplarına ayırmak için doktorların baktığı ilk prognostik faktördür. Bu genetik anormalliklerden bazıları, FMS-benzeri tirozin kinaz reseptörü (FLT3), Tet Metilsitozin Dioksijenaz 2 (TET2), İzositrat Dehidrogenaz (IDH), Varsayılan Polycomb Grubu Proteini (ASXL1), Nükleofosmin 1 (NPM1), CCAAT / Arttırıcı Bağlayıcı Protein α (CEBPA) gibi genlerde gelen farklı tip mutasyonları içerir (Gbadamosi vd., 2018; Liersch, Döhner vd., 2015; Döhner vd., 2017) (Tablo 1). Bu sapmaların önemini vurgulamak için WHO, RUNX1, NPM1 CEBPA genlerinde mutasyonu barındıran AML alt gruplarını karakterize etmek ve sınıflandırmak için "tekrarlayan genetik anormallikler ile ilişkili AML" adlı bir grup eklemiştir (Arber vd, 2016). FLT3 bir tür reseptör tirozin kinazdır ve kök hücre farklılaşması ve çoğalması gibi önemli hücresel olaylarda rol alır (Kottaridis vd., 2003; McKenna vd., 2000, Perl vd., 2017). Fakat bu gende meydana gelen iki ana mutasyon, Jukstamembran alanında Internal Tandem Duplikasyonu (ITD) ve Tirozin Kinaz Domaini (TKD) nokta mutasyonu AML fenotipi ile sonuçlanır (Grunwald vd. 2013; Pratz vd., 2017; Whitman vd., 2001; Abu-Duhier vd. 2001). AML için diğer önemli moleküler marker olan NPM1 geni, genomik stabilite, hücre döngüsü ve apoptoz ile ilişkilidir. Bu nedenle, NPM1'de exon 12'de meydana gelen bir mutasyon, çekirdek yerine sitoplazmada anormal protein ekspresyonuna neden olur ve apoptozun düzenlenmesi yoluyla AML hücresinin hayatta kalmasını teşvik eder (Rau vd., 2009; Sportoletti vd., 2011; Falini vd., 2007). Akut miyeloid lösemi 1 proteini (AML1)

olarak da bilinen bir transkripsiyon faktörü olan RUNX1, hematopoitik hücreler tarafından yaygın olarak eksprese edilir ve hematopoitik farklılaşma için gereklidir (Gaidzik vd., 2016).

Tablo 1.1 AML'deki genetik değişiklikler fonksiyonel gruplandırılması (Kjwaha vd., 2016)

Fonksiyonel gruplar	AML'de mutasyona uğramış genler	AML hastalarında görülme sıklığı (%)
Sinyal yolları	<i>FLT3, KIT, KRAS, NRAS</i> and serine/threonine kinases	59
DNA metilasyonu	<i>DNMT3A, TET2, IDH1</i> and <i>IDH2</i>	44
Kromatin modifiye edenler	<i>MLL (KMT2A)</i> füzyonları, <i>ASXL1</i> and <i>EZH2</i>	30
Nükleofosmin	<i>NPM1</i>	27
Miyeloid transkripsiyon faktörleri	<i>RUNX1</i> and <i>CEBPA</i>	22
Transkripsiyon faktörleri	<i>PML-RARA, MYH11-CBFB</i> and <i>RUNX1-RUNX1T1</i>	18
Tümör baskılayıcılar	<i>TP53, WT1</i> and <i>PHF6</i>	16
Spliceosome kompleks	<i>SRSF2</i> and <i>U2AF1</i>	14
Kohesin kompleks	<i>STAG2, RAD21, SMC1</i> and <i>SMC3</i>	13

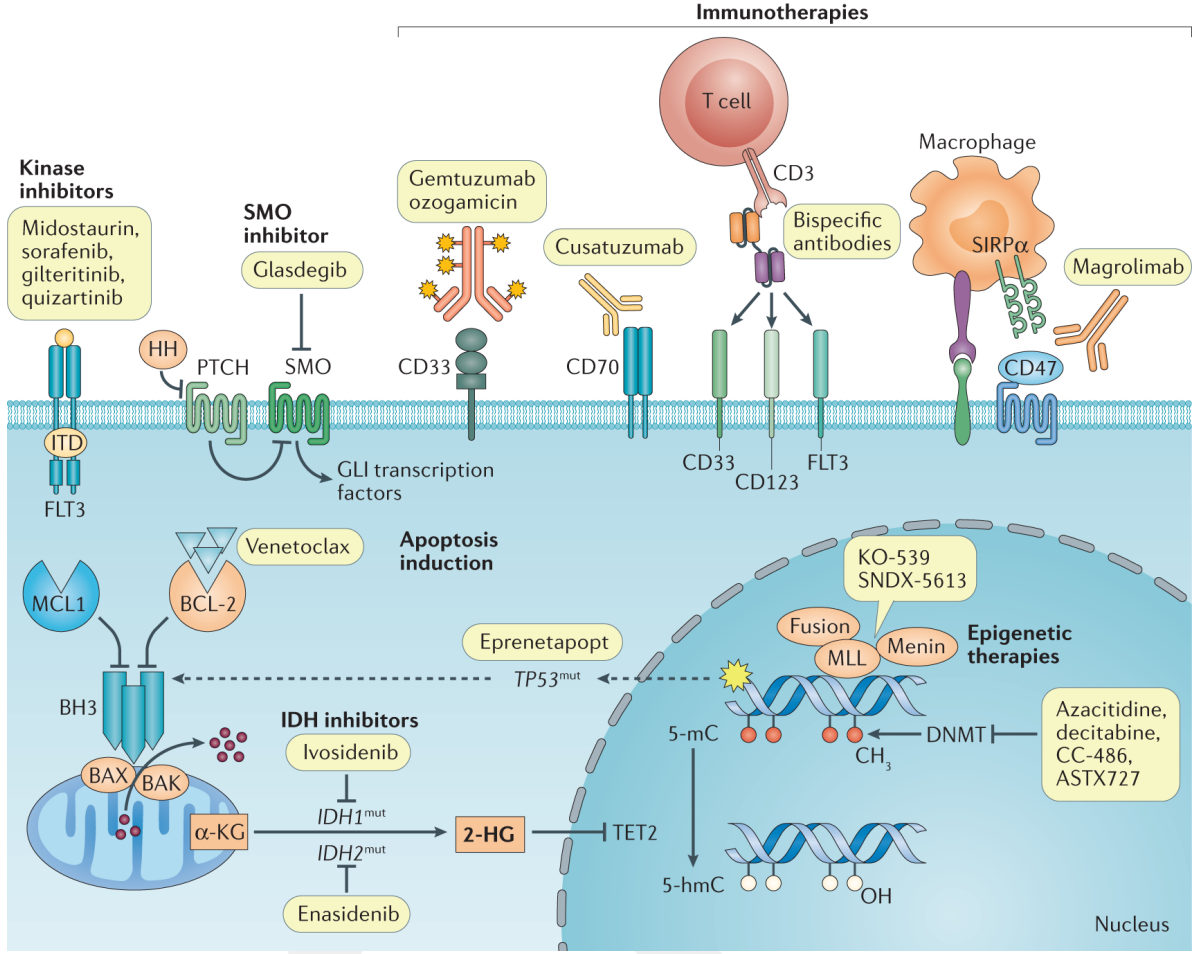
Özellikle, AML1 ve ETO genlerini içeren ve AML vakalarının yaklaşık %10'unda meydana gelen AML1-ETO füzyon proteininin ekspresyonuna yol açan t (8; 21) translokasyonu hastalarda kötü bir prognoza sahiptir (Kumar vd. 2011). AML ye neden olan diğer önemli bir mutasyon, MLL MLLT3-füzyon proteini ile sonuçlanan t(9; 11) (p22; q23) translokasyonudur (Mrózek vd., 1997). Dahası, genetik mutasyonlar AML'yi aralarında akut megakaryoblastik lösemi (AMKL) olan farklı alt gruplara sınıflandırır (Thiollier vd., 2012). AMKL, genetik anormalliklere bağlı olarak down sendromu (DS) -AMKL ve DS-AMKL olmayan olarak ikiye ayrılır. DS-AMKL'nin özelliği, GATA 1 (GATA bağlayıcı protein 1 (globin transkripsiyon faktörü 1)) mutasyonları ile ilişkili trizomi 21 iken, DS-AMKL olmayan t (1; 22) (p13; q13) kromozomal translokasyonu ile karakterize edilir. (Thiollier vd., 2012). AML'nin diğer bir alt tipi akut promiyelositik lösemidir (APL) (Wang vd., 2015; Tallman vd. 1997). APL'nin klinik özelliği, t (15; 17) (q24; q21) kromozomal translokasyondan kaynaklanan Promiyelositik lösemi proteini-Retinoik Asit Reseptörü, Alfa (PML-RARA) füzyon proteindir (Wang vd., 2015; Tallman vd., 1997).

1.1.1 Akut myeloid lösemini moleküler patogenezi

Genetik anormalliklere ek olarak, PI3K / AKT / mTOR, Wnt, Notch, STAT3, Hedgehog gibi önemli hücre yolaklarının da AML hücrelerinde bozulduğu ve AML de dahil olmak üzere birçok kanserin patogenezinde rol oynadığı rapor edilmiştir (Tohda vd., 2014; Staal vd, 2016; Yu vd., 2016; Kubota vd. 2004; Liang vd. 2017; Arberger vd., 2017; Heidel vd.,2015). Bu yollardan biri, hücre büyümesi ve çoğalması, hücre sağ kalımı, hücre metabolizması ve anjiyogenezi düzenleyen en önemli hücre içi yollardan biri olan Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/AKT/Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (mTOR) sinyal yolağıdır (Yu vd., 2016; Kubota vd. 2004; Liang vd. 2017; Arberger vd., 2017; Heidel vd.,2015). PI3K / AKT / mTOR yolağı, meme kanseri, kolorektal kanser ve hematolojik maligniteler gibi hemen hemen tüm kanserlerde anormal olduğu bulunmuştur ve bu yolağın anormal aktivasyonu, artan hücre döngüsü, hücre çoğalması, hücre metabolizması ve hücre sağ kalımı da dahil olmak üzere kanserin çoğu özelliğine katkıda bulunur (Yang vd., 2019).

Reseptör Tirozin Kinaz'lerin (RTK) büyüme faktörleri tarafından uyarılmasıyla, PI3K'in bir alt birimi olan p85, Platelet Kökenli Büyüme Faktörü (PDGF) reseptörü gibi aktive edilmiş reseptörler üzerindeki fosfotirozin motifleri ile etkileşimi yoluyla veya bu reseptörlerle bağlantılı İnsülin Reseptörü Substratı 1 (IRS1) gibi adaptör proteinler üzerinde, plazma membranına alınır. PI3K, fosfatidilinozitol-4,5-bifosfatı (PIP2) fosfatidilinozitol-3,4,5-trisfosfata (PIP3) dönüştürür, bu da fosfoinositide bağımlı kinaz (PDK) -1 ve serin-treonin kinaz AKT gibi proteinler için bağlanma bölgesi oluşturur. Aktive edilen AKT, AKT substratı 1 (AKT1S1) ve Tüberoskleroz Kompleksi 2 (TSC2) proteinleri fosforile ederek mTORC1'i aktive edebilir. mTOR, ökaryotik hücre büyümesini ve metabolizmasını düzenleyen ve protein sentezinden otofajiye kadar birçok temel hücre sürecinin merkezinde yer alan önemli bir proteindir (Zhang vd., 2011).

PI3K aktivitesi, büyüme faktörü reseptörleri tarafından düzenlenir ve bu nedenle, PI3K'nın yukarıdaki RTK'lerde meydana gelecek herhangi bir modülasyon, yolun sürekli aktivitesine neden olabilir (Owusu-Brackett vd., 2019). Ayrıca, PI3K / AKT / mTOR, PIK3CA, PIK3R1, PTEN, AKT, TSC1, TSC2, LKB1, mTOR gibi onkojenler veya tümör baskılayıcı genleri içeren çeşitli genomik değişiklikler dahil olmak üzere birden fazla mekanizma yoluyla anormal şekilde aktive edilebilir (Janku vd., 2011; Hyman vd., 2017; Grabiner vd., 2014; Krueger vd., 2010). PI3K / AKT / mTOR yolağı metastaz, hücre büyümesi, angiogenez gibi farklı kanser ilişkili hücresel olayları düzenleyerek, kanserleşmeyi teşvik eder. Örneğin, PI3K yolunun, pro-angiyojenik faktörlerin aşırı ekspresyonu ya da anti-angiyojenik faktörlerin inhibisyonu aracılığıyla angiogenez teşvik ettiği bulunmuştur (Jiang vd.,2009). Dahası, PI3K yolu, çeşitli mekanizmalar aracılığıyla tümör metastazını destekler (Jiang vd.,2009). Ayrıca, PI3K / AKT / mTOR sinyal yolağı, pro-apoptotik faktörleri inhibe ederek ve S fazı ile ilişkili genlerinin transkripsiyonunu artırarak kanserde hücre döngüsünü teşvik ettiği rapor edilmiştir (Dey vd., 2016).



Şekil 1.2 AML'de hassas tıbbın gelişen manzarası ve çeşitli hassas tedavi konseptlerinin klinik gelişimine ilişkin bir bakış açısı sağlar (Döhner vd., 2021).

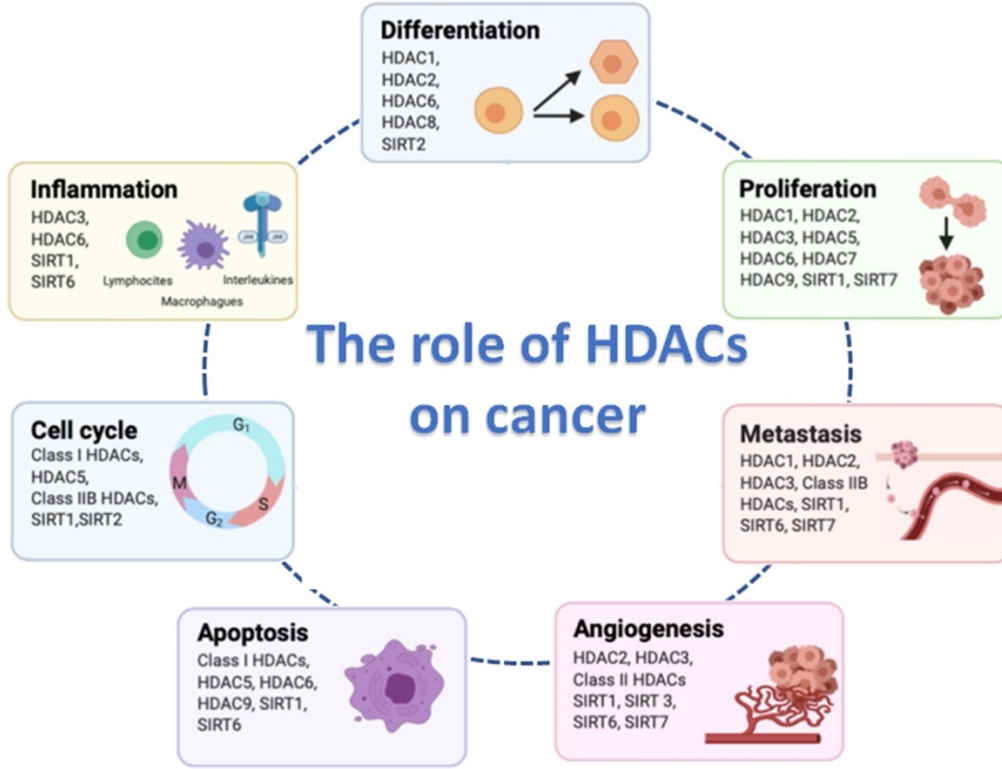
PI3K / AKT / mTOR yolağının kanser gelişiminde ve patogeneziindeki rolü düşünüldüğünde, kanser tedavisinde potansiyel bir terapötik yön olarak bu yolu hedeflemek oldukça önemlidir. Birçok çalışmada, PI3K inhibisyonunun hem hücresele çoğalmayı azalarak hem de hücresele ölümüne neden olarak kanser gelişimini engellediği rapor edilmiştir (Aziz vd., 2010; Martinelli vd.,2013; Zhang vd., 2011). PI3K delta-spesifik inhibitör idelalisib, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan ilk PI3K inhibitörü olup sağlıklı hücrelerin normal işlevi için gerekli olan PI3K sinyalini inhibe etmeden birçok kanser için terapötik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Markham, 2014). Wortmannin ve LY294002, çeşitli tümör hücrelerinde PI3K yolağının inhibisyonu için kullanılan en iyi karakterize edilmiş PI3K inhibitörleridir (Martelli vd.,2009). Tamoksifen ve PI3K'nın ATP bağlanma bölgesinin yarışmalı ve geri dönüşümlü bir inhibitörü olan LY294002'nin kombinasyonu, göğüs Kanseri MCF-7 hücrelerinde sinerjik etki göstermiş ve apoptoz aracılı hücre ölümünü teşvik ederek ve hücre döngüsünün durdurulmasına neden olmuştur (Abdallah vd., 2020). Dahası, Baicalein ve LY294002'nin kombinasyonu, karaciğer kanseri hücrelerinde hücre proliferasyonunu inhibe etmiş ve apoptozunu indüklemiştir (He vd., 2018). Bir pan-PI3K inhibitörü olan Buparlisib, insan tümör hücre dizilerinde antiproliferatif ve apoptotik aktivite göstermiş ve PIK3CA-mutant tümör ksenograflarında anlamlı doza bağlı tümör büyümesi gecikmesi veya gerilemesine neden olmuştur (Maira vd.,2012). Ayrıca, Faz I çalışmasında, daha önce endokrin tedavisi ile tedavi edilen HR + postmenopozal MBC hastalarında fulvestrant ile kombinasyon halinde Buparlisib'in kombinasyon tedavisinde %58,6'lık bir klinik fayda oranı elde edildiği rapor edilmiştir (Ma vd., 2016). Onkojen aktive edici mutasyonların, onkojen amplifikasyonunun, RTK'lerin yukarı akış aktivasyonunun veya tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonunun ardından PI3K-Akt-mTOR sinyal yolunun düzensizliği, AML dahil birçok insan malignitesinde gösterilmiştir (Nepstad vd., 2020). RTK'ler veya GTPazlar gibi zara bağlı proteinlerdeki mutasyonlar, düzensiz PI3K-Akt-mTOR sinyallemesinin başlıca nedenleridir ve AML vakalarının %55'inde gözlenir (Kandath vd.,2013). FLT3 aracılığıyla başlatılan sinyal, AML'de PI3K / AKT / mTOR sinyallemesinin düzensizliğinin en önemli nedenlerinden biridir ve FLT3 gen mutasyonları, yolun anormal aktivasyonuna yol açar. PI3K / AKT / mTOR yolunun sürekli aktivasyonu Akt fosforilasyonu ile sonuçlanır ve AML hücrelerinin hayatta kalması için gereklidir (Watanabe vd., 2019). Ayrıca, PI3K / Akt / mTOR sinyallemesinin yapısal aktivasyonu, de novo AML vakalarında olumlu bir prognostik faktör olabileceği vurgulanmıştır (Tamburini vd.,2007). Tek başına veya diğer ilaçlarla kombinasyon halinde kullanılan PI3K / Akt / mTOR inhibitörlerinin, in vitro veya in vivo birçok çalışmada hücre proliferasyonunu aşağı regüle ederek ve apoptozu indüklediği rapor edilmiştir (Billottet vd., 2009; Casanova vd., 2008; Hao vd., 2019). PI3K / AKT / mTOR AML hücrelerindeki bu rolleri düşünüldüğünde, lösemik büyümeyi engellemek için PI3K / AKT / mTOR yolunun hedeflenmesi oldukça önemlidir.

Günümüzde AML tedavisinde kullanılan klinikte en yaygın tedavi yöntemleri kemoterapi, immünoterapi ve kök hücre naklidir. AML, farklı kromozomal anomalilerini içeren ve bozulmuş sinyal yolların neden olduğu karmaşık bir hastalıktır (Lima vd.,2016; Yamamoto vd.,2015; Döhner vd., 2015; HeideI vd.,2015), bu nedenle geleneksel tedavi yöntemleri AML ile mücadelede çok başarılı değildir ve bu, AML'ye karşı her zaman yeni tedavilere ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Normalde, AML bir genetik hastalık olarak kabul edilmiştir, ancak son zamanlarda yapılan bir dizi çalışma, epigenetik değişikliklerin de AML patogenezinde rol oynadığını göstermiştir (Plass vd. 2008; Lagunas-Rangel vd. 2017; Sheng vd. 2019). Bu epigenetik değişiklikler, DNA metilasyonu ve histon modifikasyonlarını içerir ve kromatin yapısının yeniden modellenmesi ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi gibi önemli olayları düzenler. Bahsedilen epigenetik değişiklikler, DNA metiltransferazlar (DNMT'ler), histon metiltransferazlar (HMT'ler), histon asetiltransferazlar (HAT'lar) ve histon deasetilazlar (HDAC'ler) gibi epigenetik düzenleyici enzimler tarafından katalize edilir (Dawson vd. 2012). Özellikle, asetil grubunu DNA üzerindeki histon proteinlerinden uzaklaştıran ve DNA'yı transkripsiyon faktörleri için daha az erişilebilir hale getiren enzim Histon deasetilaz (HDAC), kromatinin yeniden şekillenmesi ve gen ekspresyonu için önemli bir epigenetik düzenleyicidir. Bu nedenle, kanser hücrelerinde HDAC'lerin işlevinde meydana gelecek herhangi bir düzensizlik, hücre farklılaşması, anjiyogenez, apoptoz ve hücre çoğalması gibi önemli hücrel olayların düzenlenmesini içeren genlerin baskılanmasına yol açabilir (Li vd., 2016). HDAC I (HDAC 1,2,8), HDAC II (HDAC 4,5,6,7,9), HDAC III (sirtuin, SIRT) ve HDAC IV (HDAC 11) olmak üzere dört sınıfa ayrılmış 18 potansiyel insan HDAC enzimi vardır (Ropero vd., 2007).

1.2 Epigenetik regülasyon

1.2.1 Histon deasetilaz enzimleri

Birçok kanser türünde, HDAC'lerin (sınıf I, II, IV) anormal ekspresyonuna rastlanmış ve hastalığın ilerlemesi ve kötü hasta prognozu ile ilişkilendirilmiştir (San vd. 2019; Li vd., 2016). Örneğin, HDAC1 ve HDAC2'nin yüksek oranda ifade edildiği ve mide, yumurtalık ve akciğer kanserinde metastaz ve kötü prognoz ile ilişkili olduğu ortaya konulmuştur (Weichert vd. 2008; Sudo vd., 2011; Weichert vd. 2008; Osada vd., 2004). Ayrıca, HDAC'lerin pro- ve antiapoptotik proteinlerin ekspresyonunu değiştirerek çeşitli kanser hücrelerinde apoptozu düzenlediği gösterilmiştir (Jung vd. 2012; Li vd., 2016). Buna ek olarak, özellikle kromatinin yeniden şekillenmesinde ve DNA hasarı ile ilgili proteinlerin dinamik asetilasyon dengesini korumada kritik öneme sahip olmasından dolayı, HDAC'ların DNA tamir mekanizmasında önemli rolleri olduğu ortaya konulmuştur (Li vd., 2014). DNA hasarı kontrolü ile ilişkili olan HDAC3'ün inaktivasyonu genomik dengesizliğe neden olduğu ve karaciğer hücrelerinde HDAC3'ün delesyonun hepatosellüler karsinoma yol açtığı ortaya konulmuştur. (Bhaskara vd, 2010). HDAC'ler ayrıca invazyon ve metastaz gibi önemli kanser ilişkili hücrel olaylara da katılır. HDAC1 ve HDAC2'nin E-kaderin ekspresyonunu baskıladığını ve pankreas kanserinde metastazı desteklediği gösterilmiştir (Aghdassi vd., 2012). HDAC enzimlerinin hücre içerisindeki birçok önemli hücrel ve kanser ile ilişkili yolağı düzenlediği düşünüldüğünde, son zamanlarda yapılan çalışmalarda, histon deasetilaz inhibitörleri (HDACi), potansiyel antikanser ajanları olarak sunulmuştur (Li vd., 2016). Vorinostat (SAHA), Romidepsin, Panobinostat ve Belinostat gibi HDAC inhibitörleri ilgili kanser tedavisi için FDA tarafından onaylanmış ve klinikte birçok kanser türünün tedavisi için kullanılmaya başlanmıştır (Li vd., 2016). Ayrıca, şu anda potansiyel birçok HDAC inhibitörü için klinik faz çalışmaları devam etmektedir.



Şekil 1.3 Histon deasetilazların (HDAC'ler) dahil olduğu kanser hücre biyolojisinin ayırt edici özellikleri (Hontecillas-Prieto vd. 2020)

Vorinostat (SAHA), asetilasyonu teşvik eden, gen ekspresyonunu düzenleyen, tümör hücrelerinin farklılaşmasını, büyümesini durduran ve programlı hücre ölümü apoptozunu indükleyen ilk olarak onaylanan HDAC inhibitörüdür (Silva vd., 2013; Bubna, 2015). HDAC'lerin aktif bölgesine bağlanarak, sınıf I ve sınıf II HDAC enzimlerini inhibe eder ve birçok farklı kanser türlerine karşı umut verici klinik aktivite göstermiştir (Silva vd., 2013; Bubna, 2015). Ayrıca birçok faz çalışması, SAHA'nın apoptozu indüklediğini ve tümör hücrelerinin proliferasyonunu ve metastazı azalttığını göstermiştir (Bubna, 2015; Schaefer vd. 2009). Buna ek olarak, birçok çalışma SAHA ile Cytarabine, Etoposide, decitabine gibi inhibitörlerin kombinasyon tedavisi, AML hücrelerinde sinerjistik etki gösterdiği ve hücre proliferasyonunu azaltarak leukemik büyümeyi engellediği ortaya konulmuştur (Kirschbaum vd. 2014, Shiozawa vd. 2009). SAHA – Bendamustin hibrid inhibitörün ile PARP inhibitörü BMN673 kombinasyonu, AML'de güçlü bir sinerjistik etki göstererek, in vitro apoptozu indüklediği ve in vivo fare sağ kalımını uzattığı ortaya konulmuştur (Li vd., 2018). Panobinostat (LBH589), HDAC 1, 2, 3 ve 6 üzerinde baskın bir etkiye sahip olan ve kanser gelişiminde rol oynayan başka bir HDAC'dir (Vilas-Zornoza vd. 2012; San vd., 2019). Tüm HDAC'lerin fonksiyonel aktivitesini inhibe eder ve asetillenmiş histonların ve diğer histon olmayan proteinlerin birikmesini teşvik ederek hücre döngüsü durması ve apoptozu indüklenmesine neden olur (San vd., 2019). Ayrıca, Panobinostat, multipl miyelom (MM) tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır (Suraweera

vd., 2018). FDA tarafından onaylanmış kanser tedavisinde kullanılan diğer önemli bir HDACi Belinostat (PXD101), özellikle HDAC1, 2, 3 ve 6 hedeflemektedir (San vd., 2019). Belinostat, periferik T hücreli lenfoma tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır (Lee vd., 2015). Belinostat'ın ve ATRA ile kombinasyonu, özellikle AML'nin önemli bir alt grubu olan APL hücrelerinde, hücre çoğalmasını inhibe etmiş ve apoptozu indüklemiştir (Valiuliene vd., 2015). Seçici bir HDAC6 inhibitörü olan Tubastatin A, birçok çalışmada kanser tedavisi için umut vaat edici etkiler gösteren başka bir HDAC inhibitörüdür. Tubastatin A glioblastoma hücrelerinde hücre göçünü ve hücrelerin koloni oluşturma kapasitesini azaltmış ve epitelyal - mezenkimal geçişi tersine çeviren bir etki göstermiştir (Urdiciain vd., 2019). Ayrıca, HDAC6'nın melanoma hücrelerinde Tubastatin A ile inhibisyonu, hücre döngüsünü ve hücre çoğalmasını baskılamıştır (Woan vd. 2015). HDAC8'in kromozom 16'nın inversiyonunu [inv (16)] taşıyan bir AML alt tipinde ve farklı hematopoietik malignansilerde yüksek oranda ekspresse edildiği rapor edilmiştir (Spreafico vd., 2020). HDAC8-spesifik inhibitör PCI-34051'in, T hücre lenfomalarında apoptozu indüklediği ortaya konulmuştur. (Balasubramania vd., 2008). Dahası, HDAC8'in PCI-34051 ve farklı varyantları ile baskılanması, in vitro ve in vivo nöroblastoma büyümesini azatmış ve retinoik asit aracılı farklılaşmayı artırmıştır (Rettig vd., 2015). Literatürde bulunan birçok çalışma HDAC inhibitörlerinin AML üzerindeki anti-proliferatif ve anti-apoptotik etkisini desteklemektedir. Özellikle AML'nin heterojen ve kompleks bir patogeneze sahip olması, her zaman potansiyel ek tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulduğunu ortaya koymaktadır.

Kimyasal yapılarına göre farklı gruplara ayrılabilen birçok HDACis türü geliştirilmiştir. HDAC'ler yapısal olarak en az beş sınıfa ayrılabilir: hidroksamatlar, siklik peptidler, kısa zincirli yağlı (alifatik) asitler, benzamidler ve sirtuin inhibitörleri. Hidroksamat bileşikleri, klinik öncesi ve klinik çalışmalarda en yaygın olarak keşfedilen HDAC inhibitörleridir (Tablo 2).

Tablo 1.2 Klinik öncesi ve klinik çalışmalardaki HDAC inhibitörleri ve kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması

Class	HDACis	Specificity
Hydroxamates	Trichostatin A	I, II, and IV
	SAHA/Vorinostat	I, II, and IV
	Belinostat	I, II, and IV
	Panabinstat	I, II, and IV
	Givinostat	I, II, and IV
	Abexinostat	I, II, and IV
	Resminostat	I, II, and IV
	Quisinostat	I, II, and IV
	Riconilostat	HDAC 6
	Practinostat	I, II, and IV
	Tefinostat	I
	MPT0E028	HDAC 1, 2, and 6
	CHR-3996	I
	CUDC-101	I, II
	CUDC-907	I, II
Cyclic peptides	Romidepsin	I
Short chain fatty acids	Sodium butyrate	I, II
	Phenylbutyrate	I, II
	Valproic acid	I, II
	AR-42	I, II
	Pivanex	I, II
	AN-9	I, II
Benzamides	Entinostat	I, II
	Mocetinostat	I, IV
	Tacedinaline	I
	4SC-202	I
	Chidamide	HDAC 1, 2, 3, and 10
Sirtuin inhibitors	CI944	HDAC 1 and 3
	Nicotinamide	III
	Sirtinol	SIRT 1 and 2
	EX527	SIRT 1 and 2
	Cambinol	SIRT 1 and 2

İnhibe edilen HDAC sınıfına bağlı olarak, farklı çalışmalar HDAC'lerin otofajinin inhibitörleri veya aktivatörleri olduğunu göstermiştir. HDAC6 ve HDAC10 gibi sitoplazmik proteinlerin deasetilasyonunu düzenleyen HDAC'ler, otofaji sürecinin düzenlenmesinde doğrudan rol oynamıştır (Koeneke vd., 2015). HDAC6'nın, otofagozomların ve lizozomların füzyonunu kontrol ederek otofajiyi teşvik ettiği ortaya konulmuştur (Lee vd., 2010). Farelerde hem HDAC1

hem de HDAC2'nin aynı anda delesyonu, otofagozom indüksiyonunu ve oluşumunu engellemiştir (Moresi vd.,2012). Ayrıca bazı çalışmalar, HDAC'ların otofaji üzerindeki inhibe edici etkisini göstermiştir. HDAC4'ün baskılanması, artmış LC3-II seviyelerine ve Beclin-1 ve ATG7 gibi önemli otofaji ilişkili önemli proteinler düzenleyerek ile otofaji indüksiyonuna yol açmıştır (Kang vd., 2014). HDAC1 inaktivasyonun, Hep3B hücrelerinde LC3B-II aktivasyonu aracılığıyla tümör hücre büyümesini engellediği ve otofajik hücre ölümünün aktivasyonu ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Xie vd., 2012). PI3K / AKT / mTOR yolağında özellikle mTOR'un otofaji negatif düzenleyicisi olması ve HDAC'ların, özellikle HDAC6 (Lee vd., 2010), otofaji üzerindeki düzenleyici rolü düşünüldüğünde, PI3K / AKT / mTOR yolağı ile HDAC enzimlerini aynı anda hedeflemek aralarında nasıl bir ilişki olduğunu ve altında yatan moleküler mekanizmayı aydınlatacak ve AML hücrelerinde, bu hücreyel yolların AML'nin patogenezinde nasıl bir etkisi olduğu ortaya konulacaktır.

1.3 Projenin Amacı

Sonuç olarak, AML'de, PI3K / AKT / mTOR yolağının hedeflenmesi oldukça önemlidir. Fakat, PI3K inhibisyonunun özellikle bu yolun karmaşıklığından ve diğer yollarla kesişmesinden dolayı tek başına başarılı olmama olasılığı mevcuttur. Tek ajanlı tedavi, kanser yönetiminde sınırlı uygulanabilirliğe sahipken, kombinasyon tedavisi birçok tümör tedavisinde oldukça başarılıdır. HDAC enzimlerinin hem AML hem de farklı kanser üzerindeki etkileri ve birçok epigenetik mekanizmanın AML'nin patogenezinde rol oynadığı düşünüldüğünde, HDAC inhibisyonu AML için önemli ve potansiyeli oldukça yüksek bir hedefdir. Bu nedenle bu proje, PI3K / AKT / mTOR yolağının ve HDAC'ların inhibisyonun ve farklı AML alt grupları üzerindeki etkisini ve bunun altında yatan moleküler mekanizmasını araştırmayı amaçlamıştır. Ayrıca çalışma AML'nin patogenezinde yol açan mekanizmalar hakkında bir fikir verebilir. Sonuç olarak bu PI3K / AKT / mTOR ve HDAC inhibisyonun, AML'nin ortadan kaldırılmasıyla sonuçlanan daha spesifik bir kombinasyon hedefli tedaviye yol açacağı umulmaktadır.

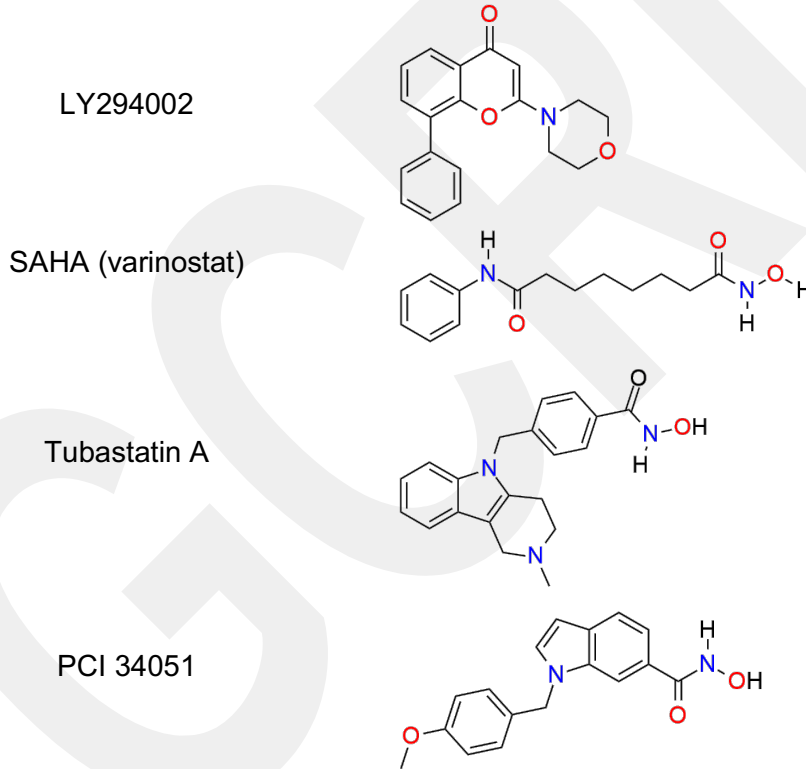
2 GEREÇ ve YÖNTEM

2.1 Gereçler

2.1.1 Kimyasallar

Proje kapsamında kullanılan kimyasallar şu şekildedir: RPMI besiyeri (Sigma-Aldrich, R8758), FBS (Biological industries, 04-127-1A), Penisilin/streptomisin (Gibco, 15140-122-100ml), LY294002 (Sigma, L9908-1MG), SAHA (Sigma, SML0061-5mg), Tubastatin A (Sigma-Aldrich, SML0044-5mg), PCI-34051 (Cayman chemical, 950762-95-5). İnhibitörler DMSO'da çözüldü ve stokları 5 mM olacak şekilde hazırlanıp -20^o'de muhafaza edildi.

Table 2.1 Çalışmada kullanılan spesifik inhibitörlerin kimyasal yapıları



MTT solüsyonu (Sigma Aldrich, M2128), DMSO (Panreacaplichem, 67-68-5-250ml), Propidium Iodide boyama solüsyonu (eBioscience™) Triton-X (Merck Millipore, 1.08603.1000), RNase (Sigma Aldrich, R5503), Pierce™ Fosfataz İnhibitör Mini Tabletleri (Thermo Fisher Scientific, A32957), PVDF membranlar (Merck, IPV00005), metanol (Isolab, 947.046), süt tozu (Serva, 42590.01), GAPDH (Proteintech, 10494-1-AP), LC3B antikor (Cell

Signaling, 2775S), Bovine Serum Albumin (Sigma Aldrich, A9647), Anti-Rabbit IgG –FITC antikorunu (Sigma Aldrich, F0382)

Projede şu deney kiti kullanılmıştır: Annexin V (eBioscience™ Annexin V Apoptosis Detection Kit APC, 88-8007-72), DC protein tahlil kiti (Biorad/USA, 500-0113, 500-0114, 500-0115), ECL Western Blot Substrate (32106; Thermo Scientific™).

2.1.2 Teçhizatlar

Proje kapsamında kullanılan başlıca cihazlar; Varioskan™ LUX çok modlu mikropilaka okuyucu (Thermo Scientific™), BD Biosciences LSRFORTESSA akış sitometresi, ChemiDoc™ Görüntüleme Sistemi (Biorad), Biyogüvenlik kabini (Class II), CO₂ inkübatör (NEW BRUNSWICK), ışık mikroskobu, No Frost Buzdolabı (Vestel NFY 520 EKO), Dikey tip Derin Dondurucular (-80°C, -86HAIER DW), Derin Dondurucular (-20°C, BEKO), Masaüstü Önden Yükleme Otoklav (TUTTNAUER 3850 EL-C), Dalgalı Sallamalı Çalkalayıcı (HEIDOLPH), Uv-Vis Spektrofotometre Cihazı (THERMO GENESYS 10 S).

2.2 Yöntemler

2.2.1 Hücre kültürü

CMK ve MOLM-13 AML hücre hatları, Alman Ulusal Biyolojik Malzeme Kaynak Merkezi'nden (DSMZ) temin edildi, önerilen koşullar altında iki parental hücre hattı kültür edildi. Besiyeri ortamı tüm hücre hatları için aynıydı. %10 FBS ve 100 U/mL penisilin/streptomisin ile desteklenmiş RPMI ortamı (Sigma, R8758) kullanılarak, hücrelerin inkübasyonu 37°C'de %5'lik CO₂ ortamında gerçekleştirildi.

CMK ve MOLM-13 hücreleri, 5x10⁶ hücre/10 mL/96mm x 21mm doku kültürü plakalarına ekildi. %60-70 konfluent duruma geldiklerinde, hücrelerin pasajları 2-3 günde bir yapıldı. Toplanan hücreler 700 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüjleme adımını takiben süpernatant uzaklaştırıldı ve hücre pelleti taze besiyeri ortamı ile çözüldü. Hücreler 96 mm x 21 mm doku kültürü plakalarına (TPP, 93100) ekildi.

2.2.2 In vitro hücre canlılığı deneyi

LY294002 ve HDACi (SAHA + PCI-34051 + Tubastatin A) belirtilen hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerini belirlemek amacıyla hücre proliferasyon testi kullanıldı. İlaç uygulamasından sonra hücrelerin proliferasyonu, 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-

tetrazolyum bromür Hücre Canlılığı Deneyi (MTT) ile hesaplandı. MTT deneyi kolorimetrik bir deneydir ve hücre canlılığının (büyüme ve hayatta kalma) hesaplanması ve belirlenmesi için kullanılmaktadır. Bu amaç doğrultusunda, 10.000 hücreye ilgili inhibitörler eklenerek 48 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her bir kuyucuğa 20 µl MTT reaktifi eklendi ve 2 saat 37°C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon süresi bitiminde 96-kuyucuklu tabaklar 1800 rpm'de 10 dakika santrifüjlenecek ve oluşan formazan kristalleri 100 µl dimetilsülfoksit (DMSO) ile çözüldü. Formazan kristallerinin ve DMSO karışımının homojenleştirilmesi için plakalar, çalkalayıcı üzerinde 15 dakika süreyle inkübe edilip ardından formazan yoğunlukları, spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda Varioskan™ LUX çok modlu mikroparka okuyucu (Thermo Scientific™) ile absorbans ölçüldü.

Spektrofotometrik sonuçlara göre hücre çoğalma grafiği oluşturuldu ve belirtilen inhibitörler için GI50 ve GI20 (hücre büyümesini %50 ve %20 oranında inhibe eden) konsantrasyonu hesaplandı. Sonuç olarak, ilgili ajanların ve kombinasyonların her iki hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkileri belirlendi. (Gencer vd., 2011). Bu deneylerden elde edilen GI50 değerleri, sonraki iş paketlerinde inhibitör konsantrasyonları olarak kullanıldı.

2.2.3 Apoptoz deneyleri

LY294002, SAHA + PCI-34051 ve Tubastatin A tekli ve kombinasyonları ile üç tekrarlı halde ve DMSO kontrol olarak kullanılarak muamele edilen CMK ve MOLM-13 hücrelerinde fosfatidil serinin miktarları ve yerleşimi Anneksin V/Propidyum iyodür ikili boyama yöntemi yardımıyla akış sitometrisi ile belirlendi. Bu amaçla, 1×10^6 hücre inhibitörler ve kombinasyonları ile 48 saat inkübe edildi. İlaçlarla 48 saatlik inkübasyonun ardından hücreler toplandı ve ardından 4°C'de 1700 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Hücreler iki kez 1XPBS ile yıkandı ve her yıkamada hücreler santrifüjlendi. En son yıkama sonrasında PBS uzaklaştırdı ve hücre pelleti 200 µl 1X Anneksin bağlama solüsyonu (ultra saf su ile 1:10 seyreltildi) içinde çözüldü. Daha sonra, bu karışımın üzerine 5 µl Anneksin V ve 5 µl propidyum iyodür eklenip 15 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilecektir. Herhangi bir işleme maruz kalmayan kontrol hücreleri 400 µl 1X bağlama tamponunda çözüldürüldü ve PI+ /FITC+, PI- /FITC- olarak bölündü. Apoptoz tespiti amacıyla, hücreler 5 µL florokrom konjuge Annexin V (eBioscience™ Annexin V Apoptosis Detection Kit APC, kat. no. 88-8007-72) ve 5 µL Propidium Iodide boyama solüsyonu (eBioscience™ Annexin V) ile boyandı. Örnekler oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dakika inkübe edildi. Ardından, hücreler BD LSRFortessa (Becton Dickinson) akış sitometrisinde analiz edildi (Yenigül vd., 2022).

2.2.4 Hücre döngüsü deneyleri

LY294002, SAHA, PCI-34051 ve Tubastatin A inhibitörlerinin tekli ve PI3K:HDACi kombinasyonları ile üç tekrarlı halde ve DMSO kontrol olarak kullanılarak muamele edilen CMK ve MOLM-13 hücrelerinde, hücre döngüsü analizleri akış sitometrisi kullanılarak yapıldı. (Camgoz vd., 2013; Gencer vd., 2011). 1×10^6 hücre ilgili inhibitör ve kombinasyonları ile 48 saat inkübe edildi. 48 saat sonunda hücreler toplandı ve 260 G'de 4 °C'de 10 dakika santrifüjlendi. Santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve hücreler 1 mL soğuk 1XPBS ile çözüldü. 4 °C'de 10 dakika boyunca 260 G'de santrifüjlemenin ardından üst faz atıldı ve pellet 1 ml 1XPBS ile yıkanma adımı iki kez tekrarlandı. Santrifüjün ardından hücreler 1 mL soğuk 1XPBS ile çözüldü ve 4 mL soğuk etanol (%70) santrifüj tüpüne ilave edildi. Karışım, hücreleri ve PBS'yi içerir ve eklenen etanol girdap yoluyla homojenize edildi. Karışım, hücrenin sabitlenmesi için gece boyunca -20 °C'de inkübe edildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından hücreler, 4 °C'de 260 G'de 10 dakika santrifüjlendi ve süpernatant tamamen uzaklaştırıldı. Hücreler 1 mL soğuk 1XPBS ile çözüldürüldü ve 260 G'de 10 dakika 4 °C'de santrifüjlendi, santrifüjlemeden sonra süpernatant atıldı. Pelet, 1XPBS içerisinde 1 mL %0,1 Triton-X (Merck Millipore 1.08603.1000) ve 100 µL RNase (200µg/mL) (Sigma R5503) karışımı ile homojenleştirildi ve 37 °C'de 30 dakika karanlıkta inkübe edildi. Kontrol (işlenmemiş) örneği ikiye bölünmüş ve bu iki tüp (kontroller) pozitif kontrol olarak propidyum iyodür (PI) (Sigma P4170) ile boyanmış (PI+) ve negatif kontrol olarak PI boyanmamış (PI-) işlenmiştir. Örnekler tek tek 100 µL PI (1 mg/mL) eklendi ve işlem görmemiş kontrol PI ile boyandı. 15 dakikalık oda sıcaklığında inkübasyonun ardından örnekler BD Biosciences LSRFORTESS Cell Analyzer akış sitometresi ile analiz edildi.

2.2.5 Western blotlama ile protein ifadesinin tespiti

CMK ve MOLM-13 hücrelerinde, LY294002, SAHA + PCI-34051 ve Tubastatin A inhibitörlerinin tekli ve kombinasyonların protein seviyeleri üzerine etkileri western blot tekniği kullanılarak incelendi. PI3K-AKT-mTOR sinyal yolunun endojen ekspresyon seviyesini tespit etmek için LC3I, LC3II, protein seviyelerini kontrol edilecektir. Özellikle LY294002 inhibitörünün otofagosom oluşumunu engellemesi ve mTOR'un otofajinin negatif düzenleyici olduğu düşünüldüğünde bu kombinasyonun bazal otofaji üzerine etkisinin kontrol etmek önemlidir. Bu amaçla, inhibitörlerin tekli ve kombinasyonları üç tekrarlı halde ve DMSO kontrol olarak kullanılarak CMK ve MOLM-13 hücre hatları (5×10^6 hücre / mL) ile 6 kuyucuklu plakalarda 48 saat boyunca muamele edildi ve hücre lizatları hazırlandı. 48 saatin sonunda, hücreler steril tüplere toplanacak ve 1300 rpm'de 5 dakika santrifüjlendi. Pelet, 1 ml soğuk PBS ile yıkandı

5 dakika boyunca 1300 rpm'de santrifüjlendi. Bu işlem iki kez tekrarlandı. Daha sonra hücreler, 10 µl proteaz inhibitör kokteyli, 10 µl PMSF solüsyonu ve ml başına 10 µl sodyum ortovanadat solüsyonu içeren 1X RIPA liziz tamponunda (ChemCruz, kat. No. Sc-24948) lize edildi ve 4°C hızda en az 20 dk santrifüj edildi. Protein konsantrasyonu DC protein kiti (Biorad/USA cat. no. 500-0113, 500-0114, 500-0115) ile ölçüldü. Daha sonra, 20 µL'de 100 µg protein konsantrasyonu olacak şekilde örnekler Laemmli tamponu ile seyreltildi ve 5 dakika boyunca 95°C'de kaynatılarak denatüre edildi. Ardından SDS-PAGE ile ayrılan örnekler SDS jelden PVDF membrana transfer edilip membran bloklama solüsyonunda inkübe edildi. Bu sayede spesifik olmayan bağlanmalar bloke edildi. Ardından membranlar tespit edilmek istenen ilgili proteinlere özgü birincil antibadiler ile inkübe edildikten sonra yıkanıp ikincil antibadiler ile inkübe edildikten sonra proteinlerin varlığı kromojenik substrat ile saptandı. Western blotlarda internal pozitif kontrol olarak GAPDH proteini kullanıldı (Sha vd., 2013).

2.2.6 Koloni oluşturma potansiyellerinin incelenmesi

MOLM-13 ve CMK hücrelerinin koloni oluşturma potansiyelleri Yumuşak Agar Koloni Oluşturma Tekniği kullanılarak incelendi. Bu amaçla hücreler, LY294002, SAHA + PCI-34051 ve Tubastatin A inhibitörlerinin tekli ve kombinasyonları ile muamele edildi ve 2 hafta sonra kristal vyolet ile boyanıp mikroskop altında incelendi. Yumuşak Agar Koloni deneyinde, MOLM-13 ve CMK hücreleri (2.5 x 10³), %10 fetal sığır serumu ile beslenmiş RPMI-1640 içinde % 1,2 agar (Sigma, A1296) bir üst tabakada inkübe edildi. Süspansiyon, altı oyuklu bir plakada %10 fetal sığır serumu ile %0,6 bazal agar üzerine bindirilecek ve agar katılaşana kadar oda sıcaklığında yerleştirildi (Borowicz, 2014). Plakalar, %5 CO₂ inkübatörüne aktarılacak ve kristal vyolet ile boyanmadan önce 2 hafta boyunca 37 ° C'de inkübe edildi. 2 haftanın sonunda, hücreler %0.01'lik kristal vyolet ile 30 dk muamele edildi ve dH₂O ile yıkanıp, boyanan koloniler mikroskop altında sayıldı.

2.2.7 İstatistiksel analizler

Proje de elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmelerinde farklı veriler için farklı istatistik programları kullanılmıştır. Sonuçlar ortalama ± standart sapma (SD) olarak sunulmuştur.

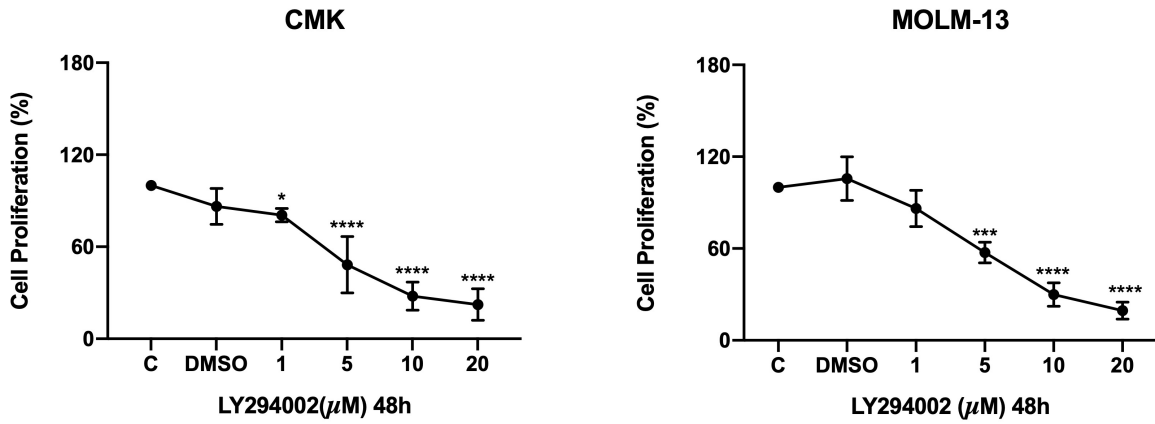
Hücre hatları için tekli ve kombinasyon inhibitör uygulamalarında İstatistiksel analizler iki yönlü ANOVA ile yapıldı. Anlamlılık seviyesi P <0.0001 olarak ayarlandı. Hücre döngüsü için yapılan analizlerde İstatistiksel anlamlılık, tedavi edilmemiş kontrollere kıyasla Dunnett tahlili için tek yönlü bir varyans analizi (ANOVA) kullanılarak tespit edildi. Önem düzeyi, tedavi edilmemiş kontrollere karşılaştırıldığında P<0.0001 olarak ayarlandı.

3 BULGULAR

3.1 CMK ve MOLM-13 hücreleri üzerinde PI3K enzim inhibitörü olan LY294002 antiproliferatif etkileri

LY294002 spesifik bir PI3K inhibitörüdür ve kinaz enziminin ATP bağlanma bölgesine bağlanarak etki gösterir. Bu bağlanma sonucunda, PI3K alt yolağında bulunan AKT fosforilasyonu engellenmiş olur. Hücre proliferasyonunda önemli bir yolak olan PI3K/AKT yolağının inhibisyonu önemlidir.

Öncelikle, CMK ve MOLM-13 hücre hatları LY294002'nin doz optimizasyonları yapılmıştır. Ardından 3 bağımsız deney ile hücre proliferasyon grafikleri her iki hücre hattı için, sırasıyla belirlenmiştir (Şekil 3.1). Bu çalışma sonunda LY294002 inhibitörünün her iki hücre hattı üzerinde düşük mikromolar konsantrasyonda etkili olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar ışığında LY294002 inhibitörünün CMK hücresi için GI20 ve GI50 değerleri sırasıyla 1 μM ve 6,15 μM olarak belirlenirken, MOLM-13 için 2,8 μM ve 6,8 μM şeklinde belirlenmiştir .



Şekil 3.1 PI3K inhibitörü LY294002 inhibitörünün CMK ve MOLM-13 hücreleri üzerine 48 saatlik hücre proliferasyonu. Standart sapma, uygulama başına 3 oyuk olan tekrar sayısı üzerinde yapıldı ve deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlandı (n = 3). İstatistiksel analizler iki yönlü ANOVA ile yapıldı. Anlamlılık seviyesi P < 0.0001 olarak ayarlandı. Tüm veriler ortalama \pm s.d olarak sunulmuştur. Hesaplamalar GraphPad Prism 8 kullanılarak yapıldı.

3.2 CMK ve MOLM13 hücreleri üzerinde farklı HDAC inhibitörlerinin antiproliferatif etkileri

Farklı HDAC inhibitörleri farklı sınıflarda bulunan enzimleri hedeflemektedirler (Xu vd. 2007). HDAC'ler çoğunlukla yardımcı baskılayıcı multiprotein komplekslerinde bulunur. Bu komplekslerde, bir asetil grubunun histon kuyruklarının, özellikle lizin kalıntılarından çıkarılmasına aracılık edebilirler. Bu nedenle, HDAC'lerin kanserdeki fonksiyonlarındaki düzensizlik, esas olarak farklılaşma, anjiyogenez, çoğalma, göç ve metastaz düzenlemesini içeren genlerin baskılanmasına yol açabilir (Morine vd. 2012; Sriraksa vd. 2013; Pchejetsk vd. 2015). Çalışmada kullanılan inhibitörlerden SAHA birçok kanser türünde çalışılmış, etkinliği gösterilmiş ve 2006 senesinde FDA tarafından kutanöz T hücre lenfoma tedavisi için onaylanmış bir inhibitördür (Duvic vd. 2007; Marks ve Breslow 2007). Bu sebeple bu inhibitör bir kontrol olarak kullanılmıştır. Çalışmamızda aşağıda Tablo 3.1'de listelenmiş ve farklı HDAC enzimlerini hedefleyen inhibitörler ile çalışıldı. Bu inhibitörlerden SAHA birçok kanser türünde çalışılmış, etkinliği gösterilmiş ve 2006 senesinde FDA tarafından kutanöz T hücre lenfoma tedavisi için onaylanmış bir inhibitördür (Duvic vd. 2007; Marks ve Breslow 2007). Bu sebeple bu inhibitör bir kontrol olarak kullanılmıştır. PCI-34051'in ise T-hücresi lenfomalarda apoptozu indüklediği gözlemlenmiştir (Balasubramanian vd. 2008). Tubastatin A, seçici bir HDAC 6 enzim inhibitörüdür ve bu enzim birçok kanser tipinde yüksek seviyede ifade edilmektedir (Yenigül ve Gencer-Akçok, 2021). Bu çalışmadaki amaç mümkün olduğunda farklı HDAC enzimleri spesifik olarak hedefleyebilmektir.

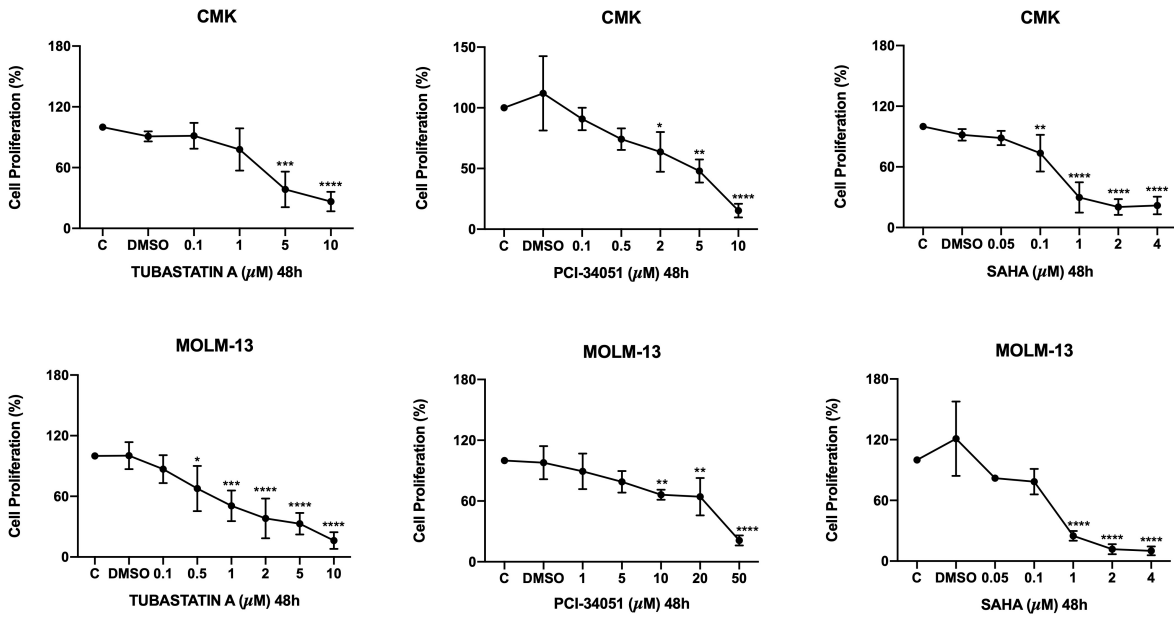
Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan HDAC inhibitörleri ve hedefledikleri enzimler

Inhibitör	HDAC enzimi
SAHA (vorinostat)	Class I/II
Tubastatin A	HDAC 6
PCI 34051	HDAC 8

CMK ve MOLM-13 hücre hatları için 3 HDAC inhibitörünün doz optimizasyonları yapılmıştır. Ardından 3 bağımsız deney ile hücre proliferasyon grafikleri her iki hücre hattı için Şekil 3.2'deki gibi belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda inhibitörlerin GI20 ve GI50 değerleri hesaplanmıştır (Tablo 3.2).

Tablo 3.2 CMK ve MOLM-13 hücreleri için HDAC inhibitörlerinin GI20 ve GI50 değerleri

CMK	GI20 değeri	GI50 değeri
SAHA (μM)	0,07	0,52
Tubastatin A (μM)	1	5,85
PCI 34051 (μM)	1,7	17,05
MOLM-13	GI20 değeri	GI50 değeri
SAHA (μM)	0,05	0,55
Tubastatin A (μM)	0,3	1,26
PCI 34051 (μM)	5,5	28,8

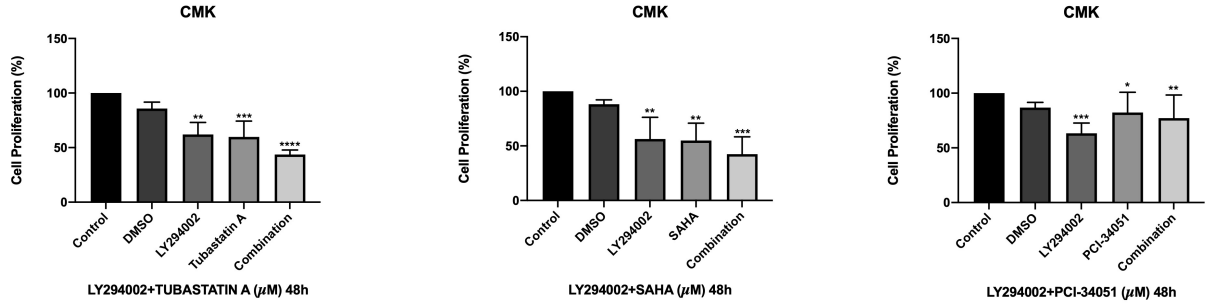


Şekil 3.2 HDAC inhibitörlerinin CMK ve MOLM-13 hücre hatları üzerine 48 saatlik hücre proliferasyonu. Standart sapma, uygulama başına 3 oyuk olan tekrar sayısı üzerinde yapıldı ve deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlandı (n = 3). İstatistiksel analizler iki yönlü ANOVA ile yapıldı. Anlamlılık seviyesi P < 0.0001 olarak ayarlandı. Tüm veriler ortalama \pm s.d olarak sunulmuştur. Hesaplamalar GraphPad Prism 8 kullanılarak yapıldı.

3.3 CMK ve MOLM-13 hücreleri üzerinde LY294002 ve farklı HDAC inhibitörlerinin kombinatoryal antiproliferatif etkileri

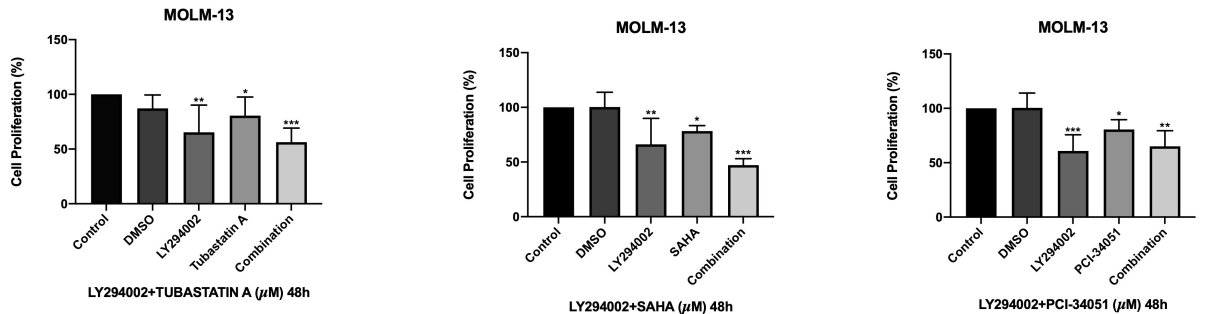
Çalışmada kullanılan PI3K inhibitörünün HDAC inhibitörleri ile kombinasyon şeklinde uygulanmaları sonucunda ortaya çıkacak antiproliferatif etkileri incelemek için MTT deneyi yapılmıştır. CMK (Şekil 3.5) ve MOLM-13 (Şekil 3.6) hücre hatlarına HDAC inhibitörü ve LY294002 inhibitörünün GI20 değerleri tekli ve kombinasyon şeklinde uygulanmıştır. Bu deney sonucunda DMSO çözücüsünün etkisi de gözlenmiştir ve beklendiği gibi ilaç uygulanmamış kontrol hücreleri ile aynı canlılıkta oldukları saptanmıştır. CMK hücrelerinde LY294002 ve

PCI34051 kombinasyonunun tekli ilaç uygulamasına göre çok fark gözlenmemiştir. İlaç uygulanmamış hücelere kıyasla CMK hücrelerinde LY294002:Tubastatin A, LY294002:SAHA kombinasyonu sırasıyla %40 ve %25 azalmaya sebep olmuştur. LY294002+PCI-34051 ile 48 saatlik tedavi sonrasında her iki hücre hattının çoğalması yaklaşık %30 oranında azaldı.



Şekil 3.3 Sabit GI20 konsantrasyonundaki HDAC inhibitörleri ve LY294002 kombinasyonu uygulanmış CMK hücre hatlarının 48 saatlik hücre proliferasyonu. Standart sapma, uygulama başına 3 oyuk olan tekrar sayısı üzerinde yapıldı ve deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlandı (n = 3). İstatistiksel analizler iki yönlü ANOVA ile yapıldı. Anlamlılık seviyesi P <0.0001 olarak ayarlandı. Tüm veriler ortalama ± s.d olarak sunulmuştur. Hesaplamalar GraphPad Prism 8 kullanılarak yapıldı

Benzer şekilde MOLM-13 hücrelerinde de PCI-34051 kombinasyon uygulaması sonucunda tekli LY294002 uygulamasından daha iyi bir antiproliferatif etki gözlenmemiştir. Ancak SAHA ve Tubastatin A kombinasyonları sonucunda ilaç uygulanmayan kontrole göre ve tekli ilaç uygulamasına göre daha istatistiksel olarak anlamlı bir inhibisyon elde edilmiştir. LY294002+SAHA kombinasyon tedavisinin MOLM-13 hücrelerinde hücre proliferasyonunu %50 azalttığını gösterirken, LY294002+Tubastatin A tedavisi bu hücrelerde %65 azalma saptanmıştır. Öte yandan, LY294002+PCI-34051 ile 48 saatlik tedavi sonrasında her iki hücre hattının çoğalması yaklaşık %70 oranında azaldı. Bu sonuçlar ile MOLM-13 hücreleri için kombinasyon tedavisinin en iyi çalıştığı kombinasyonların LY294002 ile Tubastatin A ve SAHA kombinasyonu olduğunu söyleyebiliriz.



Şekil 3.4 Sabit GI20 konsantrasyonundaki HDAC inhibitörleri ve LY294002 kombinasyonu uygulanmış MOLM-13 hücre hatlarının 48 saatlik hücre proliferasyonu. Standart sapma, uygulama başına 3 oyuk olan tekrar sayısı üzerinde yapıldı ve deney 3 kez bağımsız olarak tekrarlandı (n = 3). İstatistiksel analizler iki yönlü ANOVA ile yapıldı. Anlamlılık seviyesi P <0.0001 olarak ayarlandı. Tüm veriler ortalama ± s.d olarak sunulmuştur. Hesaplamalar GraphPad Prism 8 kullanılarak yapıldı.

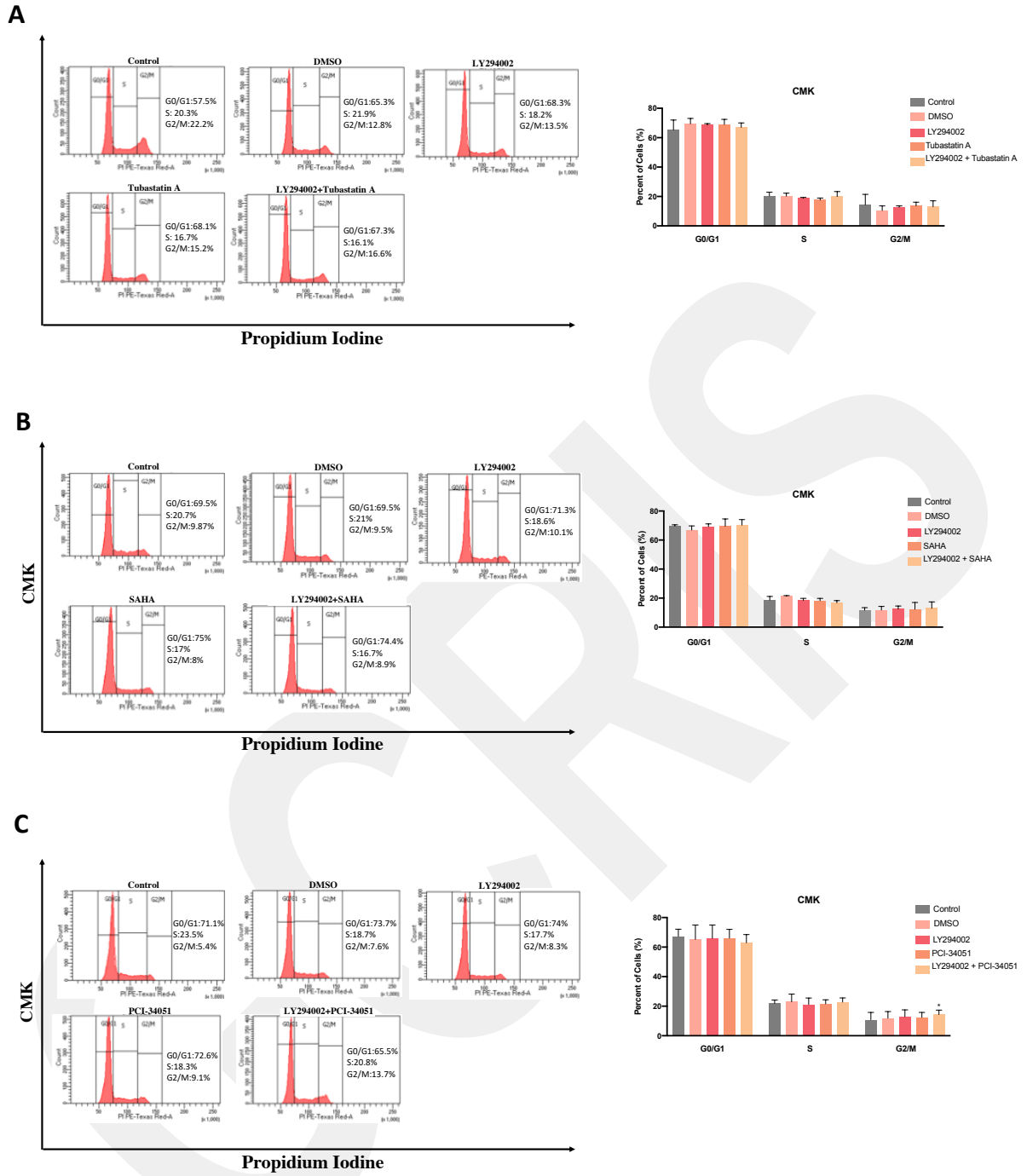
3.4 CMK ve MOLM-13 hücrelerinde kombinasyon uygulamasının hücre döngüsü üzerine etkisi

LY294002 uygulaması sonucunda PI3K/AKT yolağı inhibe edilmesi sonucunda spesifik olarak G1 hücre tutulması gözlenmekte ve nihayet apoptoz görülmektedir (15,16). HDAC enzimlerinin hücre döngüsü düzenlenmesindeki ve hücre döngüsü kontrol noktalarındaki rolü bilinmektedir (Jamaladdin vd., 2014; Li vd., 2020). Çalışmanın bu kısmında PI3K inhibisyonu ve HDAC inhibisyonunun hücre döngüsü tutulması üzerine sinerjistik bir etki yapıp yapmadığının gözlenmesi amaçlanmıştır.

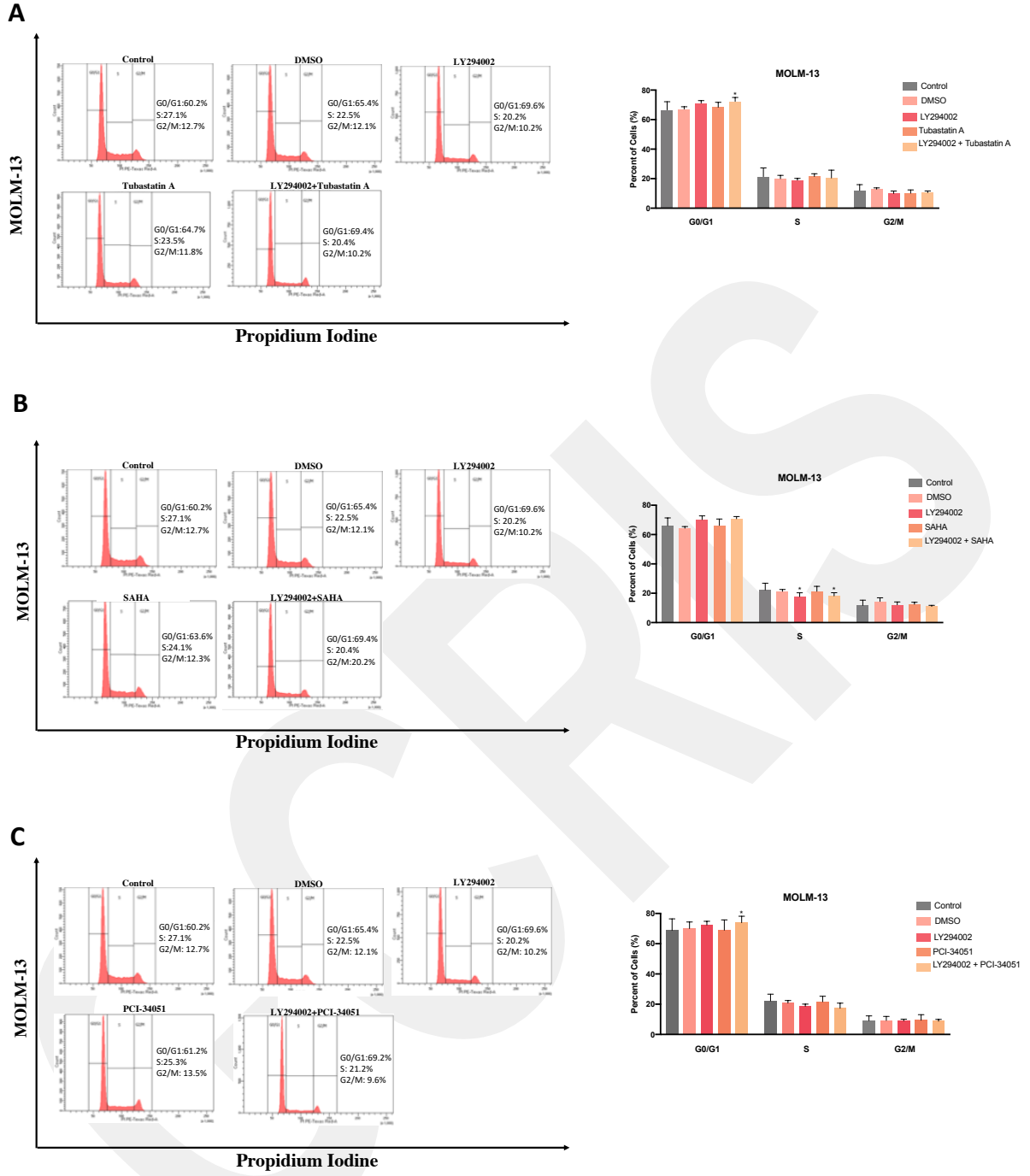
Propidyum iyodür (PI) boyamasının akış sitometrisi ile tespiti ilaç tedavileri gibi çeşitli değişikliklerden sonra hücre döngüsündeki değişiklikleri takip edebilen akış sitometrik analiz yöntemlerinden biridir. PI, nükleik asitlere stokiyometrik olarak bağlanabilen florojenik boyalardan biridir, bu nedenle hücrenin DNA içeriği floresan emisyonu yoluyla tespit edilebilir (Wallen vd. 1982).

Parental CMK ve MOLM-13 hücrelerinde LY294002'nin SAHA, Tubastatin A ve PCI34051 ile kombinasyonunun hücre döngüsü üzerine etkileri Şekil 3.5 (CMK) ve Şekil 3.6 (MOLM-13)'de verilmiştir.

Sonuçlarımız, LY294002+ Tubastatin A (Şekil 3.5a) kombinasyon tedavisi, CMK hücrelerinde kontrol ile karşılaştırıldığında G1 faz tutuklandığını gösterdi. LY294002+SAHA (Şekil 3.5b) ve LY294002+PCI-3501 (Şekil 3.5c) kombinasyonları ile tedavi edilen CMK hücreleri, sırasıyla G0/G1 ve G2/M fazında tutuklandığını ve Öte yandan, LY294002+SAHA (Şekil 3.6b), LY294002+PCI-3501 (Şekil 3.6c) ve LY294002+ Tubastatin A (Şekil 3.6a) kombinasyonlarının, kontrol hücrelerine kıyasla MOLM-13 hücrelerinde G1 fazı durmasıyla sonuçlandığını gösterdi.



Şekil 3.5 Kombinasyon uygulamasının CMK hücre döngüsü ilerlemesi üzerindeki etkisi. Parental CMK hücrelerine 48 saat boyunca HDAC inhibitörlerinin, LY294002'nin G120 değerleri tekli ve kombinasyon şeklinde uygulandı, hücreler toplandı, sabitlendi ve propidyum iyodür ile boyandı. Daha sonra hücreler akış sitometresi ile analiz edildi. Üç bağımsız deney yapıldı, birleştirildi ve analiz edildi. Önem düzeyi, tedavi edilmemiş kontrollerle karşılaştırıldığında $P < 0.0018$ olarak ayarlandı.



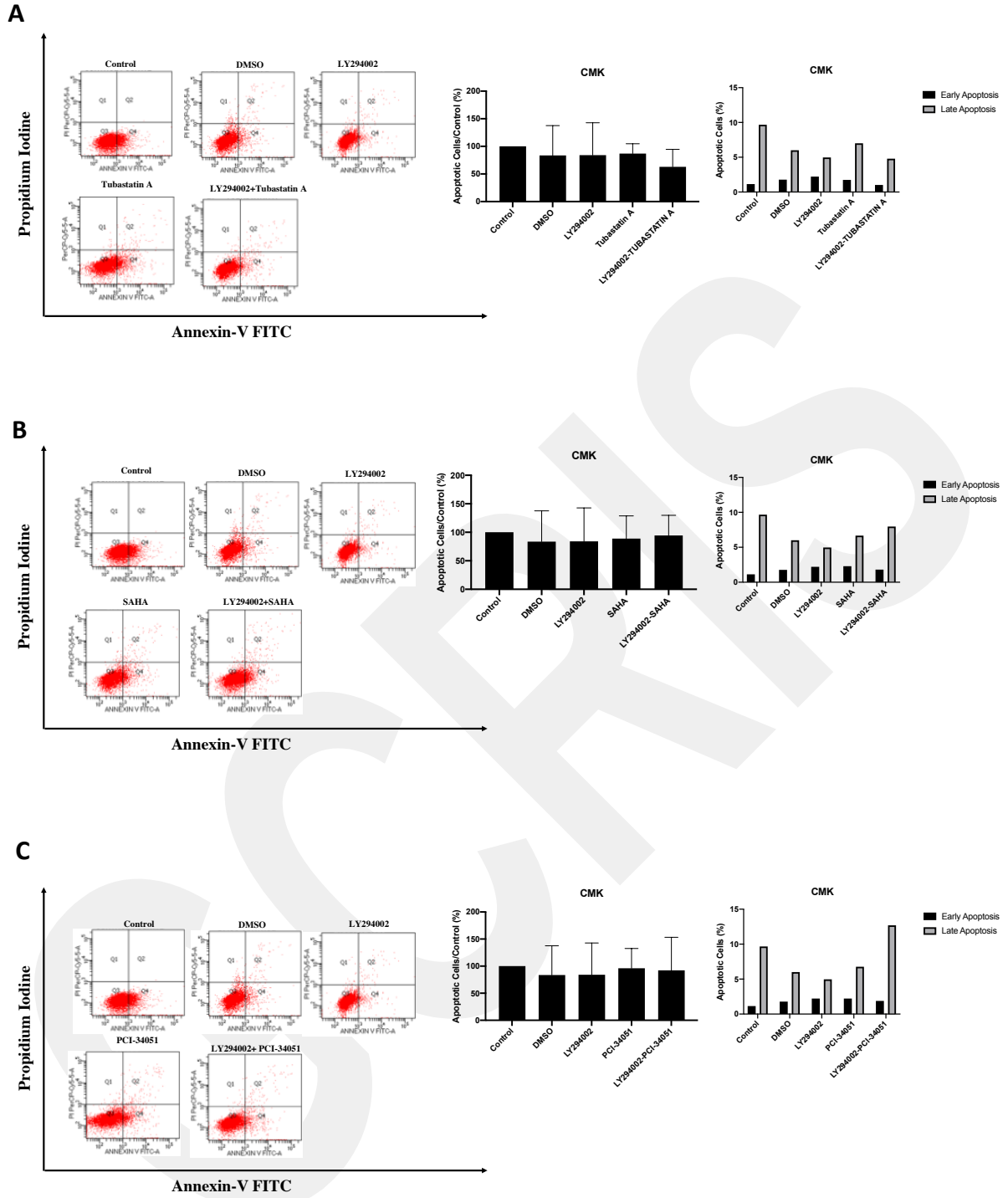
Şekil 3.6 Kombinasyon uygulamasının MOLM13 hücre döngüsü ilerlemesi üzerindeki etkisi. Parental CMK hücrelerine 48 saat boyunca HDAC inhibitörlerinin, LY294002'nin G120 değerleri tekli ve kombinasyon şeklinde uygulandı, hücreler toplandı, sabitlendi ve propidyum iyodür ile boyandı. Daha sonra hücreler akış sitometresi ile analiz edildi. Üç bağımsız deney yapıldı, birleştirildi ve analiz edildi. Önem düzeyi, tedavi edilmemiş kontrollerle karşılaştırıldığında $P < 0.0001$ olarak ayarlandı.

3.5 CMK ve MOLM-13 hücrelerinde kombinasyon uygulamasının apoptotik hücre ölümü üzerine etkisi

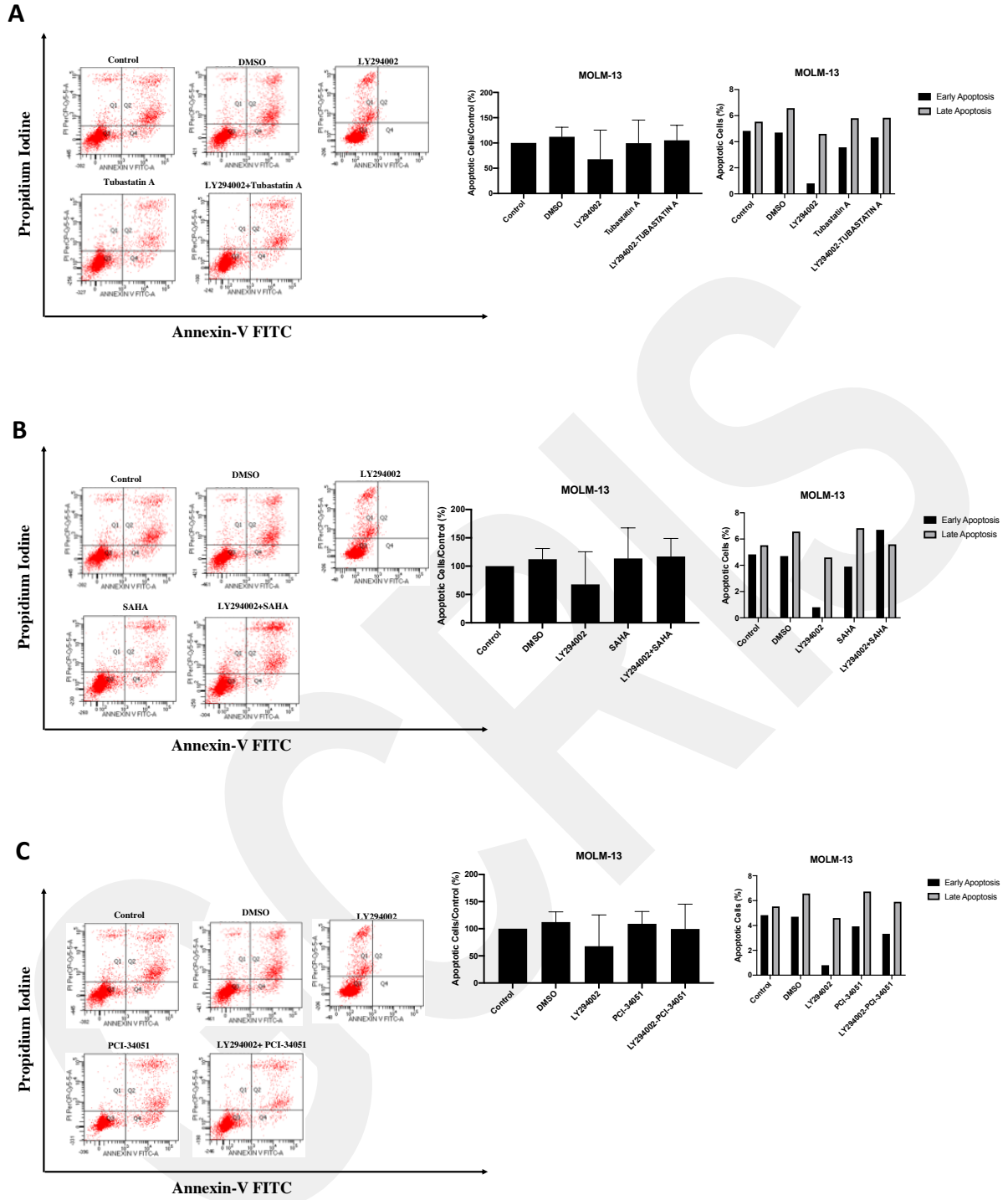
Apoptotik hücrelerin tanımlanmasında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Azalan DNA içeriğine ve morfolojideki değişikliklere bağlı olarak nükleer yoğunlaşma apoptotik hücreleri tanımlamaktadır ve bu hücreler akış sitometrisi, Trypan Mavisi veya Hoechst boyaması gibi farklı yöntemlerle tespit edilebilir. Apoptotik hücrelerde plazma zarı bileşiminde meydana gelen değişiklikler de plazma zarı üzerinde fosfatidilserin görünümü ile tespit edilir. Apoptozun bir göstergesi olarak fosfatidilserinin plazma membranının iç katından dış katına yer değiştirmesi sonucu, fosfatidilserin hücre dış yüzeyinde Annexin V-florokrom konjugatları ile reaksiyona girer. Annexin V-florokrom konjugatları ve propidium iyodür (PI) ikili boyamasının bir kombinasyonu, erken ve geç apoptotik olaylar arasındaki farkı gösterir (Mazumder vd. 2006). PI boyaması hücrelerde nekrotik ya da geç apoptotik hücre popülasyonunu tespit eder. İnhibitörlerin anti-proliferatif ve sitostatik etkilerinin belirlenmesinin ardından proliferasyon test sonuçlarına bağlı olarak inhibitörlerin GI20 değerleri ile kombinasyon deneyi kurulmuştur. Parental CMK ve MOLM-13 hücrelerinde LY294002'nin SAHA, Tubastatin A ve PCI34051 ile kombinasyonunun hücre ölümü üzerine etkileri Şekil 3.7 (CMK) ve Şekil 3.8 (MOLM-13)'de verilmiştir.

Çalışmamız sonucunda, CMK hücre hattında tüm kombinasyonlarda total apoptotik hücre ölümünde ilaç uygulanmamış kontrole kıyasla bir fark gözlenmezken, LY294002:SAHA ve LY294002:PCI-3501 kombinasyonlarında kontrole göre erken apoptotik hücre sayısında sırasıyla % 15,8 ve % 16,4 artış gözlemlenmiştir.

MOLM-13 hücre hattında LY294002:SAHA kombinasyon tedavisi kontrol hücrelerine göre 1,17 kat artmış apoptoz gösterirken, LY294002:Tubastatin A kombinasyonu 0,52 kat artmış apoptotik hücre ölümü ile sonuçlanmıştır. Buna ek olarak LY294002:SAHA kombinasyonunda **MOLM-13 hücresindeki erken apoptotik hücre ölümü işlenmemiş kontrole oranla 1,38 kat erken apoptotik hücre artışı vardır.** Geç apoptotik hücrelere bakıldığında ise bu oran kontrole kıyasla 0,12 kat ile sonuçlanmıştır. LY294002:Tubastatin A kombinasyonunda ise kontrol ile karşılaştırıldığında MOLM-13 hücresinde 0,48 kat artan geç apoptotik hücre görülmüştür.



Şekil 3.7 İlaç kombinasyonunun CMK hücrelerinde hücre ölümü üzerine olan etkisi. Boyanmış hücreler, apoptotik hücrelerin yüzdesini saptanması için akış sitometrisi ile analiz edildi. Temsili histogramlar gösterildi. Sağ alt (Q4; Annexin V-FITC+/PI-) ve sağ üst (Q2; Annexin V-FITC+/PI+) kadrantlarındaki hücreler, sırasıyla erken ve geç apoptozu gösterir. Sağ paneldeki grafikler apoptotik hücrelerin yüzdesini gösterdi. Üstteki grafik toplam apoptotik hücre sayısını (Q2+Q4), alttaki grafik ise erken (Q4) ve geç (Q2) apoptotik hücre popülasyonunu ayrı ayrı göstermektedir.

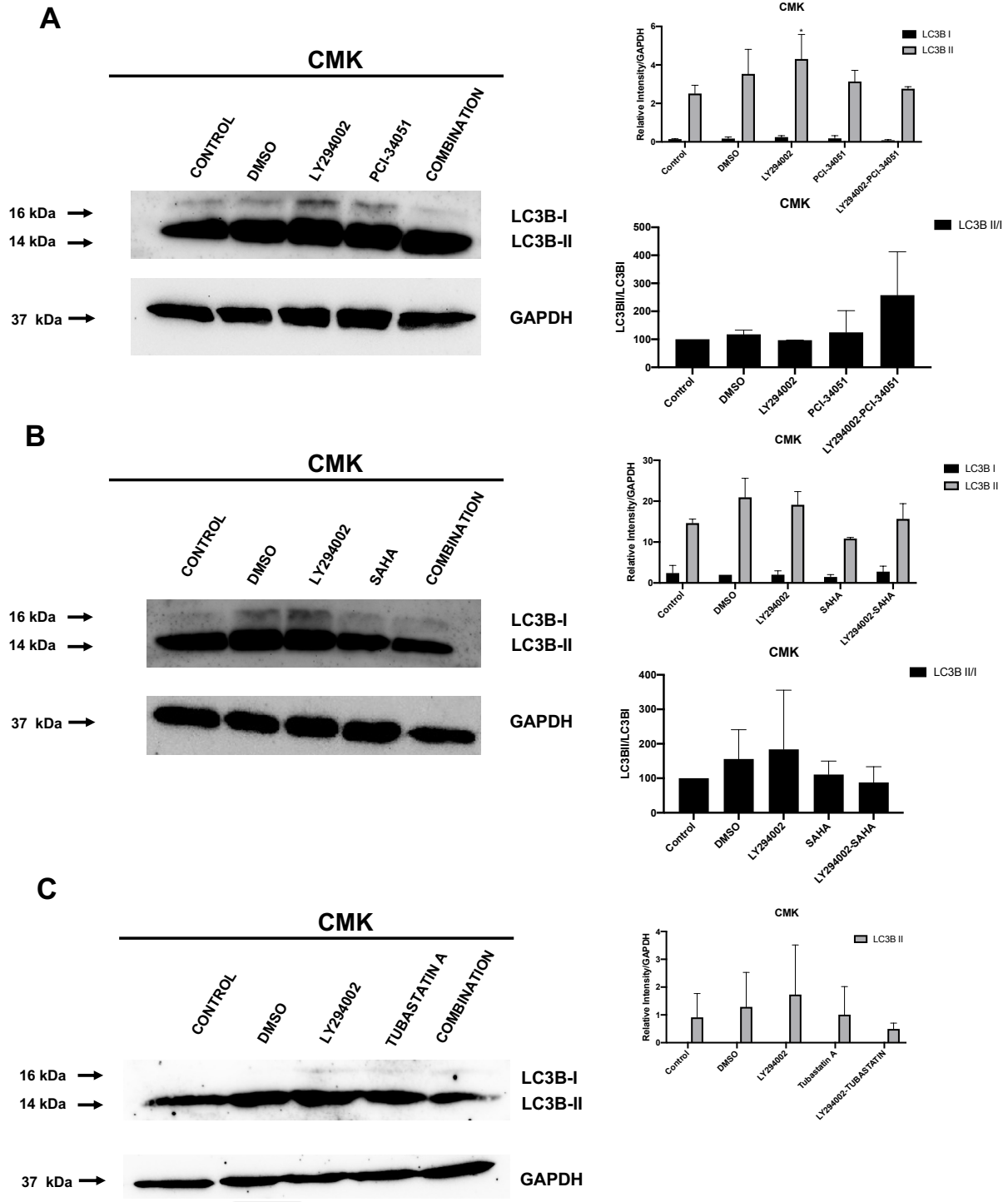


Şekil 3.8 İlaç kombinasyonunun MOLM-13 hücrelerin hücre ölümü üzerine olan etkisi. Boyanmış hücreler, apoptotik hücrelerin yüzdesini saptanması için akış sitometrisi ile analiz edildi. Temsili histogramlar gösterildi. Sağ alt (Q4; Annexin V-FITC+/PI-) ve sağ üst (Q2; Annexin V-FITC+/PI+) kadrantlarındaki hücreler, sırasıyla erken ve geç apoptozu gösterir. Sağ paneldeki grafikler apoptotik hücrelerin yüzdesini gösterdi. Üstteki grafik toplam apoptotik hücre sayısını (Q2+Q4), alttaki grafik ise erken (Q4) ve geç (Q2) apoptotik hücre popülasyonunu ayrı ayrı göstermektedir.

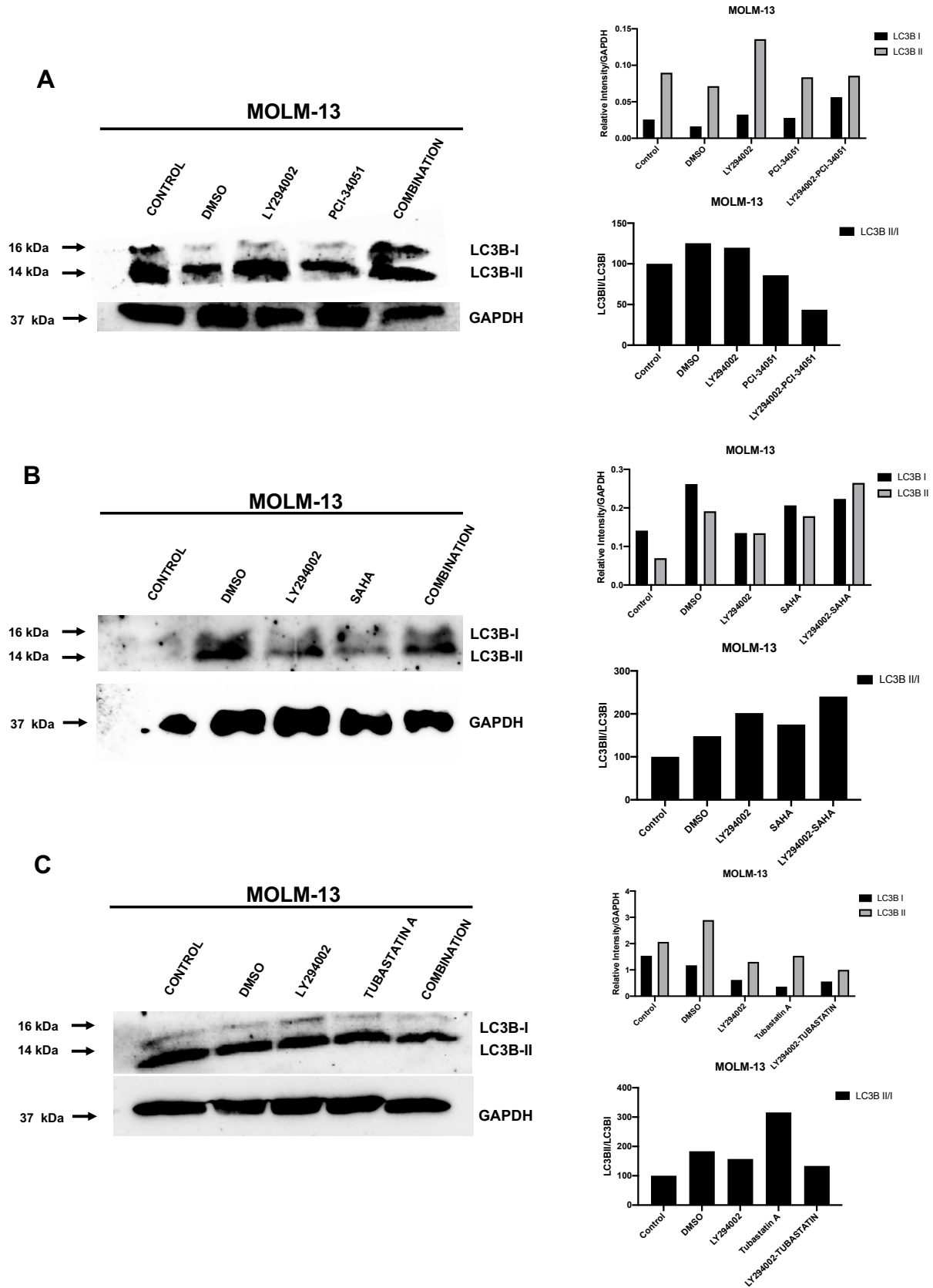
3.6 Otofaji İnhibisyonunun ve HDAC İnhibisyonunun Kombinasyonunun Otofajinin Moleküler İşaretleri Üzerindeki Etkisi

Kombinasyon uygulamasının otofajinin moleküler belirteçleri üzerine etkisini anlamak için etkisini anlamak için, mikrotübüle bağlı protein hafif zincir 3 (LC3) I'in LC3-II'ye dönüşümünün oranına bakıldı. Lizozom ve otofagozomun füzyonu üzerine LC3B-II, lizozomal enzimler tarafından parçalanır ve bu da LC3B-II'nin ekspresyon seviyesinde bir azalmaya yol açar.

Çalışmamızda CMK hücrelerine LY294002:PCI-34051 kombinasyonu uygulandığında kontrol hücrelerine kıyasla LC3BII/I oranı 2,5 kat artmıştır (Şekil 3.9A). Bu sonucun aksine LY294002, SAHA (Şekil 3.9B) ve Tubastatin A (Şekil 3.9C) ile birlikte uygulandığında bu oranda kontrol hücrelerine göre anlamlı bir fark elde edilmemiştir. Ancak bu kombinasyonlarda LY294002 uygulaması LC3BII/I oranını kontrol hücrelerine göre artırmıştır. MOLM-13 için ise LY294002:SAHA kombinasyonu uygulandığında kontrol hücrelerine kıyasla LC3BII/I oranı 2,4 kat artarken (Şekil 3.10B), LY294002:Tubastatin A kombinasyonunda (Şekil 3.10C) 1,3 kat LC3BII/I oranında artış gözlemlenmiştir. Öte yandan, LY294002:PCI-34051 (Şekil 3.10A) kombinasyonunda kontrol hücrelerine göre LC3BII/I oranında anlamlı bir fark gözlemlenememiştir.



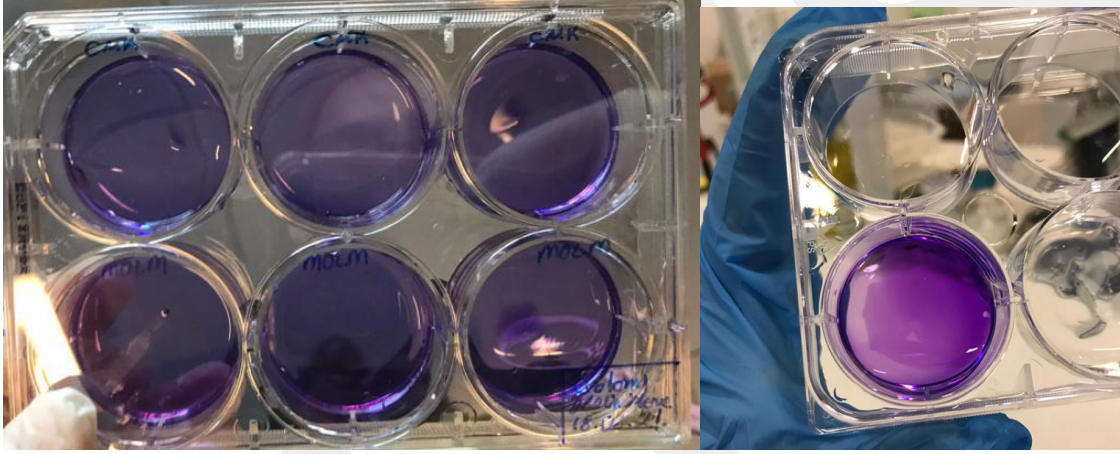
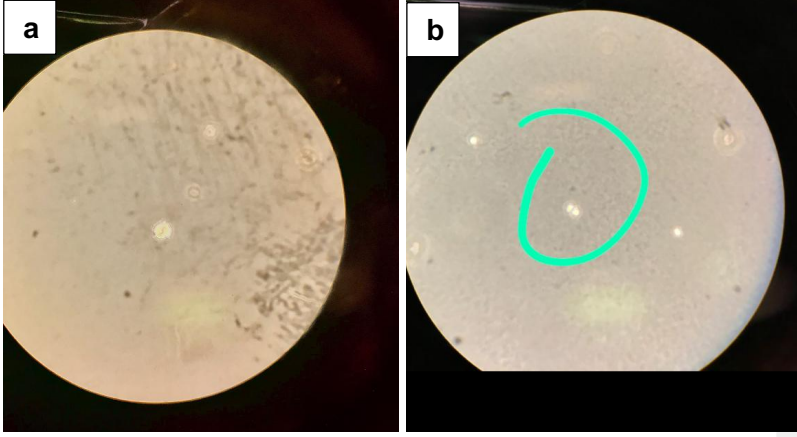
Şekil 3.9 LY294002 ve PCI34051 (A), SAHA (B), Tubastatin A (C) kombinasyon uygulamasının CMK hücrelerinde 48 saat boyunca LC3B I/II proteininin ifadesi üzerindeki etkisi. Sağ panellerde GAPDH ile normalizasyondan sonra LC3B'nin relatif yoğunluğu grafiklerde gösterilmiştir.



Şekil 3.10 LY294002 ve PCI34051 (A), SAHA (B), Tubastatin A (C) kombinasyon uygulamasının MOLM-13 hücrelerinde 48 saat boyunca LC3B I/II proteininin ifadesi üzerindeki etkisi. Sağ panellerde GAPDH ile normalizasyondan sonra LC3B'nin relatif yoğunluğu grafiklerde gösterilmiştir.

3.7 İlaç uygulanan hücrelerin koloni oluşturma potansiyellerinin tespit edilmesi

Proje önerisinde MOLM-13 ve CMK hücrelerinin koloni oluşturma potansiyelleri Yumuşak Agar Koloni Oluşturma Tekniği kullanılarak incelenmek istenmiştir. Bu amaçla hücreler, öncelikle 6 kuyulu plakaya %0,6 üst agara ekilmiş ve plakalar, %5 CO₂ inkübatöründe 2 hafta boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Hücrelerin koloni oluşturma becerileri 2 günde bir mikroskop altında kontrol edilmiş ve hücrelerin sağlıklı bir şekilde büyümedikleri ve parçalandıkları görülmüştür (Şekil 3.11). Bu yüzden üst agarın %0,5, %0,4 ve %0,35 farklı oranları hazırlanmış ve yine hücrelerin çoğalmadığı ve sağlıklı olduğu görülmüştür. Daha sonra agar yerine agaroz kullanılan bazı protokoller denenmiştir. Benzer sonuçlar bu protokollerde de görülmüştür. Ek olarak agar yerine metil selülozünde süspense hücrelerde koloni oluşturma deneyleri için kullanılabileceği bir metotta denenmiştir. Birçok farklı yöntem ve besiyeri konsantrasyonu kullanılmasına rağmen koloni oluşturan hücreler tespit edilememiştir. Hücreler bu şekilde de büyümemiş ve koloni oluşturmamıştır. Ardından, koloni oluşturma potansiyeli bilinen Kronik miyeloid lösemi (KML) hücre hattı olan K562 hücreleri belirtilen protokole uygun bir şekilde Yumuşak Agar Koloni Oluşturma Tekniği kullanılarak %5 CO₂ inkübatöründe 2 hafta boyunca 37 ° C'de inkübe edilmiştir. Sonuçta hücrelerin koloni oluşturduğu görülmüştür (Şekil 3.12). K562 hücreleri şekilde görüldüğü üzere normal şartlar altında da yakın koloniler oluşturarak büyümektedir (Şekil 3.13). Buda MOLM-13 ve CMK hücrelerinin protokol kaynaklı değil de hücre tipi kaynaklı olarak agarda büyümediğinin sebebini açıklamaktadır. Bu iki hücrenin normal şartlar altında da koloni oluşturma yeteneklerinin diğer hücrelere göre daha düşük olduğunu varsayıyoruz. Bu yüzden denediğimiz protokollerde hücrelerin koloni oluşturmamadan parçalandığını düşünüyoruz.



Şekil 3.11 MOLM-13 (a) ve CMK (b) hücrelerinin yumuşak agar koloni oluşumu mikroskop görüntüsü ve kristal viyoletle boyanması



Şekil 3.12 K562 hücrelerinin yumuşak agar koloni oluşumu mikroskop görüntüsü ve kristal viyoletle boyanması

4 TARTIŞMA

Akut Miyeloid Lösemi (AML), periferik kan, kemik iliği, dalak ve karaciğerde patlama adı verilen olgunlaşmamış miyeloid hücrelerin birikmesiyle karakterize edilen ve sonunda hematopoietik maligniteye yol açan bir hastalıktır. Kromozomal anormallikler ve genetik anormallikler, AML'yi oldukça karmaşık bir hastalık yapan AML'nin patogenezinde rol oynayabilir. Genetik anormalliklerin yanı sıra PI3K/AKT/mTOR, Wnt, Notch, STAT3, Hedgehog gibi önemli hücre yolaklarının AML hücrelerinde deregüle olduğu ve birçok kanserin patogenezinde rol oynadığı bildirilmiştir. Bu yollardan biri, hücre büyümesini ve çoğalmasını, hücre sağkalımını, hücre metabolizmasını ve anjiyogenezi düzenleyen en önemli hücre içi yollardan biri olan Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)/AKT/ Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi (mTOR) sinyal yoludur. . PI3K/AKT/mTOR yolunun, meme kanseri, kolorektal kanser ve hematolojik maligniteler gibi hemen hemen tüm kanserlerde anormal olduğu bulunmuştur ve bu yolun anormal aktivasyonu, artan hücre döngüsü, hücre proliferasyonu, hücre metabolizması ve hücre sağkalımı dahil olmak üzere kanserin birçok yönüne katkıda bulunur. AML hücreleri PI3K yolağının aktivasyonuna ihtiyaç duymaktadır ve AML hastalarından alınan örneklerde LY294002 ile bu yolağın spesifik inhibisyonu doza bağlı bir azalma göstermektedir (Xu vd., 2003). Son zamanlarda yapılan birkaç çalışma, epigenetik değişikliklerin AML'nin patogenezinde de rol oynadığını göstermiştir. Histon deasetilaz (HDAC), kromatin yeniden şekillenmesi ve gen ekspresyonu için önemli bir epigenetik düzenleyicidir. Bu nedenle, kanser hücrelerinde HDAC'lerin işlevindeki herhangi bir düzensizlik, hücre farklılaşması, anjiyogenez, apoptoz ve hücre proliferasyonu gibi önemli hücre olaylarının düzenlenmesinde yer alan genlerin baskılanmasına yol açabilir. Bu çalışmada, iki farklı AML hücre hattı kullanarak PI3K/AKT/mTOR yolu modülasyonu ve HDAC enzim inhibisyonunun hücre döngüsü ve hücre ölüm mekanizması üzerindeki etkisini araştırmayı amaçladık; MOLM-13 ve CMK. Literatür çalışmaları, HDAC inhibitörlerinin, kemoterapi veya metilasyonu baskılayıcı ajanlarla kombinasyon halinde bir role sahip olabileceğini göstermiştir (Khan vd., 2012).

Bu çalışmada, spesifik PI3K inhibitörü olan LY294002 ve farklı HDAC enzim inhibitörleri (SAHA, PCI-34051 ve Tubastatin A) kullanılmıştır. LY294002 PI3K aktif bölgesine bağlanan ATP yarışmalı bir inhibitördür. Bu inhibitörün kullanıldığı literatürde birçok çalışma vardır. FLT3-ITD mutasyonlu ve sorafenib dirençli AML hücrelerinde bu inhibitörün direnci geri çevirdiği ve dirençli hücreleri apoptoza götürdüğü gözlenmiştir (Huang vd., 2021). Ayrıca bu inhibitörün kombinasyon çalışmaları AML'de etkili bir şekilde çalışılmıştır. Chen ve arkadaşları, LY294002 inhibitörü ile As2O3 inhibitörünün AML hücreleri üzerinde sinerjistik etkilerini saptamışlardır (Chen vd., 2015). Bcl-2 inhibitörü olan ABT199 ile LY294002 kombinasyonu K562, HL60 ve KG1a hücrelerinin hücre döngüleri üzerinde sinerjistik bir etki göstermişlerdir

(Geng vd., 2021). Çalışmamızda kullandığımız her iki hücre hattı için bu inhibitör için düşük mikromolar seviyesinde GI50 değeri tespit edilmiştir.

HDAC inhibitörleri kanser tedavisinde umut verici ajanlardır. HDAC inhibitörleri, kanser hücrelerinde anormal şekilde baskılanan genleri potansiyel olarak aktive edebilir ve bu şekilde malign fenotipi tersine çevirebilir. Bu ajanlar ayrıca kromatin yapısını değiştirir ve artan genomik kırılabilirliğe ve DNA hasarına yol açabilir. Tek ajanlı HDAC inhibitörü tedavisi yalnızca %10 ila %20 yanıt oranları sağlar. İlk onaylanmış HDAC inhibitörlerinden olan Vorinostat (SAHA), AML'de tek uygulandığında hafif bir inhibitör etkisine sahip olmasına rağmen 5-azasitidin ile kombine edildiğinde %30'luk bir yanıt oranı sağlamıştır (Garcia-Manero vd., 2011). Yapılan bir klinik faz II denemesinde, SAHA ile cytarabine kombinasyonun %85'lik yanıt oranı ile tek başına cytarabine tedavisinden çok daha üstündü (Garcia-Manero vd., 2012); özellikle, FLT3-ITD mutasyonları olan tüm hastalarda yanıtlar vardı. 5-azasitidin ile HDAC inhibitörü Mocetinostat (MGCD0103) kombinasyonunda da cesaret verici sonuçlar bildirilmiştir. HDAC inhibitör tedavisinin tek başına daha hafif ancak kombinasyon çalışmalarında daha kuvvetli sonuçlar göstermesi ve prelinik testlerin PI3K inhibitörlerinin histon deasetilaz (HDAC) inhibitörleri ile kombinasyonu için umut verici anti-kanser aktivitesi ortaya çıkarması bu çalışmanın da motivasyon kaynağıdır (Gupta vd., 2009; Rahmani vd., 2003, 2014). Öte yandan yapılan bir çalışmada PI3K ve histon deasetilaz ikili inhibitörü CUDC-907'nin bir seri AML hücre hatları ve hasta örnekleri üzerinde etkisi çalışılmış, sonuç olarak her iki yolağın inhibisyonunun AML progenitör hücreleri hedeflediği bulunmuştur ve bu iki yolağı hedeflemenin umut verici olduğunu göstermiştir (Li vd., 2019).

Çalışmamızda farklı tip HDAC enzimlerini inhibe eden ilaçlar kullanılmış ve her iki hücre hattında düşük mikromolar konsantrasyonlarda GI50 değeri saptanmıştır. Kullanılan HDAC inhibitörleri arasında HDAC8 inhibitörü olan PCI-34051 ile yapılan kombinasyon çalışmalarında LY294002'nin tek başına uygulanmasına kıyasla çok bir fark gözlenmemiştir. Çalışmamızda PCI-34051 tek başına hücre canlılığını azaltmış, ancak hücre ölümü ya da hücre döngüsü tutulması üzerinde etkili olmamıştır. Spreafico ve arkadaşları beş farklı AML hücresi üzerinde PCI-34051 inhibitörünü test etmiş ve bazı AML hücre hatları için benzer bulguları gözlemlemişlerdir (Spreafico vd., 2020). Farklı bir çalışmada ise HDAC8'in p53 deasetilasyonu yoluyla lösemik kök hücre (LSC) transformasyonunu indüklediği ve spesifik HDAC8 inhibisyonunun AML yayılımı ve hem murin hem de hasta kaynaklı LSC'lerin lösemi başlatma kapasitesini ortadan kaldırdığı gözlenmiştir (Qi vd., 2015). Literatürde yapılmış çalışmalar ışığında PCI-34051 inhibitörünün etkisinin hücre spesifik olduğunu ve çalışmamızda kullandığımız hücrelerde etkili olmadığını düşünmekteyiz. Bu etki, kullandığımız hücrelerdeki HDAC8 ifade düzeyine bağlı olabilir ve bu durum daha ileriki çalışmalarda test edilebilir. Ayrıca stromal sarkoma hücrelerinde SAHA ve LY294002 kombinasyonu en güçlü sinerjistik etkiyi

göstermiştir (Quan vd., 2014). Çalışmamız ile benzer olarak her iki hücre hattında da SAHA kombinasyonu hücre canlılığını anlamlı bir şekilde inhibe etmiştir. Literatürdeki verilerin aksine, çalışmamızda LY294002 ne CMK ne de MOLM-13 hücrelerinde apoptoz indüklememiştir. Aksine MOLM-13 hücrelerinde nekrotik hücre popülasyonunu arttırmıştır. AML blast hücrelerinde 25 uM LY294002 inhibitörünün uygulanması sonucunda hücreler apoptoza gitmiştir (Xu vd., 2002). Başka bir makalede ise MV4-11 AML hücrelerinde 40 ve 80 uM LY294002 inhibitörünün kullanılması apoptotik hücre popülasyonu sırasıyla %13,9 ve %23,4 artmıştır. Çalışmamızda sinerjistik bir apoptotik etki görebilmek için GI20 değeri CMK ve MOLM-13 için 1 ve 2,8 uM olarak kullanılmıştır. Bu sebeple çalışmamızda yüksek oranda apoptoz görülmemesinin sebebi düşük doz kullanımından kaynaklanıyor olabilir. Bir dizi AML ve KML hücresi üzerinde HDAC inhibitörlerinin hassasiyetini gösteren çalışma, CMK hücrelerinin tek başına Tubastatin A ve PCI-34051 inhibitörlerine hassas olmadığını göstermiştir (Stankov vd., 2014). Ancak bizim çalışmamızda kullanılan 10 uM Tubastatin ve PCI-34051, hücre canlılığını %90 oranında azalmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız ilaç kombinasyonunda, kullanılan dozlarda belirgin bir apoptoz indüksiyonu gözlenmemiştir. Bu sonuç doza bağımlı olabilir. Daha yüksek dozlarda apoptoz gözlemlenebilir.

PI3K/AKT/mTOR yolağı, homeostazi teşvik etmek için lizozom aracılı bozunma yoluyla istenmeyen molekülleri ortadan kaldıran hücrenel süreç olan otofaji'nin yukarı akışında bulunur (Aman vd., 2021). mTOR otofajinin negatif düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır (Kim vd., 2015). Mikrotübülle ilişkili protein 1 hafif zincir 3 (MAP1LC3) olarak da bilinen LC3, otofaji sürecinde yer alan önemli bir proteindir (Koukourakis vd., 2015). Artan LC3-II seviyesi, otofaji belirteci olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Rodríguez-Arribas vd., 2017). PI3K inhibitörü LY294002'nin özellikle tekli tedavisinde LC3BII'nin ekspresyon seviyesinin işlenmemiş kontrole bakıldığında iki hücre hattında da arttığı gözlemlenmiştir. PI3K'in inhibisyonu aynı zamanda onun alt yolağında bulunan otofajinin negatif regülatörü olan mTOR'un da ekspresyon seviyesinin azalmasına neden olmakta ve bu durum otofajinin aktivasyonuna neden olmaktadır. Her iki hücre hattında LY294002; Tubastatin A kombinasyonu LC3B II'nin kontrole ve tekli LY294002 tedavisine göre azalmasına neden olmuştur. Bu durum otofajinin azaldığına işaret eder. Otofaji'nin kanser ile olan ilişkisi düşünüldüğünde hem pro-kanser hem anti-kanser olarak rol oynadığı bilinmektedir (Yun vd., 2018). Hücre canlılığı çalışmalarımıza bakıldığında kombinasyon tedavisi tekli tedavilere göre daha fazla canlılıkta azalmaya neden olmuştur. Bu durumda MOLM-13 ve CMK AML hücrelerinde otofajinin pro-kanser olarak rol aldığı şeklinde yorumlanabilir. Çünkü her iki hücre hattında da LY294002; Tubastatin A kombinasyonu sonucunda işlenmemiş kontrol ile karşılaştırıldığında hem hücre canlılığı azalmış hem de LC3B II'nin ekspresyon seviyesinde düşüş meydana gelmiştir. LC3BII

proteininde gözlenen azalmaya, otofagozom oluşumunun azalması ve otofaji-lizozomal sistemden akının azalması neden olabilir. Ayrıca, LC3BII/LC3BI oranına bakıldığında LY294002; PCI-34051 kombinasyonunda CMK hücresinde artarken MOLM-13 de azalmıştır. LY294002; SAHA kombinasyonunda ise LC3BII/LC3BI oranı CMK hücre hattında azalırken MOLM-13 hücre hattında artmıştır. Buda AML'nin farklı alt tiplerinde aynı kombinasyonun farklı sonuçlar verebileceğine işarettir. Çalışmamızda da iki farklı arka plana sahip hücre seçilmiş ve tedaviye verilen yanıtlar karşılaştırmak ve AML'nin patogenezi bakımından yorumlanmak istenmiştir. Buda kişiselleştirilmiş tedavilerin önünü açacak ve kişiye özel yaklaşımlar ile hızlı ve etkili tedavi yöntemleri ile klinikte destek bulacaktır.

Bu çalışmada her ne kadar MOLM-13 ve CMK hücre hattında PI3K ve HDAC inhibisyonunun birlikte otofaji üzerine etkilerini anlamak için LC3B oranına bakılmış olsa altında yatan mekanizmayı anlamak için ilave çalışmalara ihtiyaç vardır. Otofaji oldukça karmaşık birçok farklı proteinin rol aldığı önemli bir hücresel mekanizmadır. Bu yüzden kesin yorumlar yapabilmek için ileri çalışmalarda ULK-1, ATG5, Beclin-1, p62 vb. gibi otofaji ilişkili proteinlerinde ekspresyon seviyesi incelenebilir ve AML'deki potansiyel rolü hakkında daha net yorumlar yapılabilir.

5 SONUÇ ve ÖNERİLER

Şu ana kadar çalışmamızın bazı kısımları ulusal ve uluslararası kongrelerde sözlü ve poster olarak sunulmuştur. Projeden elde edilecek sonuçlara göre, hayvan modellerinde in vivo çalışmalar ve hasta örneklerinde benzer çalışmalar ve projeler planlanacaktır. Proje ile bu sinyal yollarının anlaşılması, kişiye özgü kanser tedavisinde yeni bir yaklaşım ortaya koyacak ve klinik çalışmaların yolunu açacaktır.

Projemiz kapsamında iki öğrencisi bursiyer olarak desteklenmiş ve bu alanda Türkiye'de genç bilim insanlarının eğitime katkı sunulmuştur. Projemiz aynı zamanda bir STAR bursiyerine ev sahipliği yapmıştır ve bölümümüz üçüncü sınıf öğrencimiz projede yer alarak tecrübe kazanmıştır. Proje çalışmalarından elde edilen sonuçlar yüksek etki değerine sahip SCI ya da SCI-E endeksli dergilerde yayınlanmak üzere yazım aşamasındadır.

Proje çalışmalarından elde edilen veriler umut verici ve yeni çalışmalara temel bilgi sağlayacaktır. Özellikle in vivo ve klinik çalışmalar yapılmasına yönlendirebilecektir. Bu agresif hastalığın tedavisi için milli kaynaklarımız ile elde edilen veriler sayesinde yeni ve güçlü bir terapötik seçenek olma potansiyeline sahip çalışma olduğunu düşünüyoruz. Çalışmada elde edilen sonuçları yüksek etki faktörlü dergilerde yayınlamak öncelikli hedefimizdir.

Son olarak, proje önerisinde başta öngörülen hedeflerin yüksek oranda ulaşıldığını düşünmekteyiz.

6 KAYNAKLAR

- [1] Abdallah, M.E., El-Readi, M.Z., Althubiti, M.A., Almaimani, R.A., Ismail, A.M., Idris, S., Refaat, B., Almalki, W.H., Babakr, A.T., Mukhtar, M.H., Abdalla, A.N. and Idris, O. 2020. "Tamoxifen and the PI3K Inhibitor: LY294002 Synergistically Induce Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Breast Cancer MCF-7 Cells", *Molecules*, 25(15), 3355.
- [2] Aberger, F., Hutterer, E., Sternberg, C., Del Burgo, P.J. and Hartmann, T.N. 2017. "Acute myeloid leukemia - strategies and challenges for targeting oncogenic Hedgehog/GLI signaling", *Cell Commun Signal*, 15, (1), 8.
- [3] Abu-Duhier, F.M., Goodeve, A.C., Wilson, G.A., Care, R.S., Peake, I. R. and Reilly, J. T. 2001. "Identification of novel FLT3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia", *British Journal of Haematology*, 113, 983-988.
- [4] Aghdassi, A., Sendler, M., Guenther, A., Mayerle, J., Behn, C.O., Heidecke, C.D., Friess, H., Büchler, M., Evert, M., Lerch, M.M. and Weiss, F.U. 2012. "Recruitment of histone deacetylases HDAC1 and HDAC2 by the transcriptional repressor ZEB1 downregulates E-cadherin expression in pancreatic cancer", *Gut*, 61 (3), 439-48.
- [5] Aman Y, Schmauck-Medina T, Hansen M, et al. 2021. "Autophagy in healthy aging and disease." *Nat Aging*. 1(8):634-650.
- [6] Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., Bloomfield, C. D., Cazzola, M., and Vardiman, J. W. 2016. "The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia" *Blood*, 127, 2391-2405.
- [7] Aziz, S.A., Jilaveanu, L.B., Zito, C., Camp, R.L., Rimm, D.L., Conrad, P. and Kluger, H.M. 2010. "Vertical targeting of the phosphatidylinositol-3 kinase pathway as a strategy for treating melanoma", *Clin Cancer Res.*, 16, 6029–39.
- [8] Balasubramanian, S., Ramos, J., Luo, W., Sirisawad, M., Verner, E. and Buggy, J.J. 2008. "A novel histone deacetylase 8 (HDAC8)-specific inhibitor PCI-34051 induces apoptosis in T-cell lymphomas", *Leukemia*, 22, 1026–1034.
- [9] Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R. and Sultan, C. 1976. "Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group", *Br. J. Haematol*, 33,451– 458.
- [10] Bhaskara, S., Knutson, S.K., Jiang, G., Chandrasekharan, M.B., Wilson, A.J., Zheng, S., Yenamandra, A., Locke, K., Yuan, J.L., Bonine-Summers, A.R., Wells, C.E., Kaiser, J.F., Washington, M.K., Zhao, Z., Wagner, F.F., Sun, Z.W., Xia, F., Holson, EB., Khabele, D. and Hiebert, S.W. 2010. "Hdac3 is essential for the maintenance of chromatin structure and genome stability", *Cancer Cell*, 18, (5), 436-47.
- [11] Billottet C., Banerjee L., Vanhaesebroeck B. and Khwaja A. 2009. "Inhibition of class I phosphoinositide 3-kinase activity impairs proliferation and triggers apoptosis in acute promyelocytic leukemia without affecting atra-induced differentiation", *Cancer Res.*, 69, 1027-36.

- [12] Bondar VM, Sweeney-Gotsch B, Andreeff M, Mills GB, McConkey DJ: 2002. "Inhibition of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway induces apoptosis in pancreatic carcinoma cells in vivo and in vitro." *Mol Cancer Ther.*, 1: 989-997.
- [13] Bubna, A.K. 2015. "Vorinostat-An Overview", *Indian J Dermatol.*, 60(4), 419.
- [14] Cai, S.F. and Levine, R.L. 2018. "Genetic and epigenetic determinants of AML pathogenesis", *Semin Hematol.*, 56(2), 84-89.
- [15] Casanova, I., Bosch, R., Lasa, A., Parreño, M., Céspedes, M.V., Brunet, S., Nomdedéu, J.F., Mangues, M.A., Sierra, J. and Mangues, R. 2008. "A celecoxib derivative inhibits focal adhesion signaling and induces caspase-8-dependent apoptosis in human acute myeloid leukemia cells", *Int J Cancer*, 123, 217-26.
- [16] Chen P, Wu J, Yuan Q, Jiang X, Huang H. The synergistic killing of AML cells co-cultured with HS-5 bone marrow stromal cells by As₂O₃ and the PI3K/Akt signaling pathway inhibitor LY294002. *Pharmazie*. 2015 May;70(5):322-7.
- [17] Dawson, M.A. and Kouzarides, T. 2012. "Cancer epigenetics: from mechanism to therapy.", *Cell*, 150 (1), 12-27.
- [18] de Lima, M.C., da Silva, D.B., Freund, A.P., Dacoregio, J.S., Costa Tel, J., Costa, I., Faraco, D. and Silva, M.L. 2016. "Acute Myeloid Leukemia: analysis of epidemiological profile and survival rate" *J Pediatr (Rio J)*, 92(3), 283-9.
- [19] Dey, N., De, P. and Leyland-Jones, B. 2016. *PI3K-mTOR in cancer and cancer therapy*. New York: Humana Press/Springer.
- [20] Döhner, H., Estey, E., Grimwade, D., Amadori, S., Appelbaum, F.R., Büchner, T., Dombret, H., Ebert, B.L, Fenaux, P., Larson, R.A., Levine, R.L., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G.J., Sanz, M., Sierra, J., Tallman, M.S., Tien, H.F., Wei, A.H., Löwenberg, B., Bloomfield, C.D. 2017. "Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel", *Blood*, 129, 424–447.
- [21] Döhner, H., Weisdorf, D. J. and Bloomfield, C. D. 2015. "Acute Myeloid Leukemia." *New England Journal of Medicine*, 373 (12), 1136-1152.
- [22] Döhner, H., Wei, A.H. & Löwenberg, B. 2021. "Towards precision medicine for AML." *Nat Rev Clin Oncol* 18, 577–590.
- [23] Falini, B., Nicoletti, I., Martelli, M.F. and Mecucci, C. 2007. "Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc + AML): Biologic and clinical features", *Blood*, 109, 874–885.
- [24] Gaidzik, V.I., Teleanu, V., Papaemmanuil, E., Weber, D., Paschka, P., Hahn, J., Wallrabenstein, T., Kolbinger, B., Köhne, C.H., Horst, H.A., Brossart, P., Held, G., Kündgen, A., Ringhoffer, M., Götze, K., Rummel, M., Gerstung, M., Campbell, P., Kraus, J.M., Kestler, H.A., Thol, F., Heuser, M., Schlegelberger, B., Ganser, A., Bullinger, L., Schlenk, R.F., Döhner, K. and Döhner, H. 2016. "RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia are associated with distinct clinicopathologic and genetic features", *Leukemia*, 30, 2282.
- [25] Garcia-Manero G, Estey EH, Jabbour E, Borthakur G, Kadia T, Naqvi K, et al Final report of a phase II study of 5-azacitidine and vorinostat in patients (pts) with newly diagnosed

myelodysplastic syndrome (MDS) or acute myelogenous leukemia (AML) not eligible for clinical trials because poor performance and presence of other comorbidities. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2011;118:Abstract 608.

- [26] Garcia-Manero G, Tambaro FP, Bekele NB, Yang H, Ravandi F, Jabbour E, et al Phase II trial of vorinostat with idarubicin and cytarabine for patients with newly diagnosed acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol* 2012;30:2204–10.
- [27] Gbadamosi, B., Ezekwudo, D., Bastola, S. and Jaiyesimi, I. 2018. "Predictive and Prognostic Markers in Adults With Acute Myeloid Leukemia: A Single-Institution Experience", *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.*, 18(7), e287-e294.
- [28] Geng Y, Wu W, Zhou L, Li J, Geng Y, Yang Y. Synergistic effects of LY294002 and ABT199 on the cell cycle in K562, HL60 and KG1a cells. *Oncol Rep.* 2021 Jun;45(6):97.
- [29] Grabiner, B.C., Nardi, V., Birsoy, K., Possemato, R., Shen, K., Sinha, S., Jordan, A., Beck, A.H. and Sabatini, D.M. 2014. "A diverse array of cancer-associated MTOR mutations are hyperactivating and can predict rapamycin sensitivity", *Cancer Discov.*, 4(5), 554-63.
- [30] Grunwald, M. R. and Levis, M. J. 2013. "FLT3 inhibitors for acute myeloid leukemia: a review of their efficacy and mechanisms of resistance", *International Journal of Hematology*, 97, 683-694.
- [31] Gupta M, Ansell SM, Novak AJ, Kumar S, Kaufmann SH, Witzig TE. Inhibition of histone deacetylase overcomes rapamycin-mediated resistance in diffuse large B-cell lymphoma by inhibiting Akt signaling through mTORC2. *Blood.* 2009; 114(14):2926-2935.
- [32] Hao, Y., Zhang, N., Wei, N., Yin, H., Zhang, Y., Xu, H., Zhu, C. and Li, D. 2019. "Matrine induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway", *Oncol Lett*, 18(3), 2891-2896.
- [33] He, K., Yu, X., Wang, X., Tang, L., Cao, Y., Xia, J. and Cheng, J. 2018. "Baicalein and Ly294002 induces liver cancer cells apoptosis via regulating phosphatidyl inositol 3-kinase/Akt signaling pathway", *J Cancer Res Ther.*, 14(9), S519-S525.
- [34] Heidel, F. H., Arreba-Tutusaus, P., Armstrong, S. A. and Fischer, T. 2015. "Evolutionarily Conserved Signaling Pathways: Acting in the Shadows of Acute Myelogenous Leukemia's Genetic Diversity", *Clinical Cancer Research*, 21(2), 240-248.
- [35] Hontecillas-Prieto, Lourdes, Flores-Campos, Rocío, Silver, Andrewi de Álava, Enrique, Hajji, Nabil, García-Domínguez, Daniel JSynergistic 2020. "Enhancement of Cancer Therapy Using HDAC Inhibitors: Opportunity for Clinical Trials", *Frontiers in Genetics*.
- [36] Hu H, Jiang C, Li G, Lü J, 2005. "PKB/Akt and ERK regulation of caspase-mediated apoptosis by methylseleninic acid in LNCaP prostate cancer cells. *Carcinogenesis.*" 26: 1374-1381.
- [37] Huang A, Zeng P, Li Y, Lu W, Lai Y. LY294002 Is a Promising Inhibitor to Overcome Sorafenib Resistance in FLT3-ITD Mutant AML Cells by Interfering With PI3K/Akt Signaling Pathway. *Front Oncol.* 2021 Nov 8;11:782065.
- [38] Hyman, D.M., Smyth, L.M., Donoghue, M.T.A., Westin, S.N., Bedard, P.L., Dean, E.J., Bando, H., El-Khoueiry, A.B., Pérez-Fidalgo, J.A., Mita, A., Schellens, J.H.M., Chang, M.T., Reichel, J.B., Bouvier, N., Selcuklu, S.D., Soumerai, T.E., Torrisi, J., Erinjeri, J.P., Ambrose, H., Barrett, J.C., Dougherty, B., Foxley, A., Lindemann, J.P.O., McEwen, R., Pass, M., Schiavon, G.,

- Berger, M.F., Chandarlapaty, S., Solit, D.B., Banerji, U., Baselga, J. and Taylor, B.S. 2017. "AKT Inhibition in Solid Tumors With AKT1 Mutations", *J Clin Oncol.*, 35(20), 2251-2259.
- [39] Jamaladdin S, Kelly RD, O'Regan L, et al. 2014. "Histone deacetylase (HDAC) 1 and 2 are essential for accurate cell division and the pluripotency of embryonic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(27):9840-9845.
- [40] Janku, F., Tsimberidou, A.M., Garrido-Laguna, I., Wang, X., Luthra, R., Hong, D.S., Naing, A., Falchook, G.S., Moroney, J.W., Piha-Paul, S.A., Wheler, J.J., Moulder, S.L., Fu, S. and Kurzrock, R. 2011. "PIK3CA mutations in patients with advanced cancers treated with PI3K/AKT/mTOR axis inhibitors", *Mol Cancer Ther.*, 10(3), 558-65.
- [41] Jiang, B.H. and Liu, L.Z. 2009. "PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis", *Adv Cancer Res.*, 102, 19–65.
- [42] Jung, K.H., Noh, J.H, Kim, J.K., Eun, J.W., Bae, H.J., Xie, H.J., Chang, Y.G., Kim, M.G., Park, H., Lee, J.Y. and Nam, S.W. 2012. "HDAC2 overexpression confers oncogenic potential to human lung cancer cells by deregulating expression of apoptosis and cell cycle proteins", *J Cell Biochem.*, 113, (6), 2167-77.
- [43] Kandoth, C., McLellan, M.D., Vandin, F., Ye, K., Niu, B., Lu, C., Xie, M., Zhang, Q., McMichael, J.F., Wyczalkowski, M.A., Leiserson, M.D.M, Miller, C.A, Welch, J.S, Walter, M.J, Wendl, M.C, Ley, T.J, Wilson, R.K, Raphael, B.J and Ding, L. 2013. "Mutational landscape and significance across 12 major cancer types", *Nature*, 502, 333–339.
- [44] Kang, Z.H, Wang, C.Y., Zhang, W.L, Zhang, J.T, Yuan, C.H, Zhao, P.W, Lin, Y.Y, Hong, S, Li, C.Y. and Wang, L. 2014. "Histone deacetylase HDAC4 promotes gastric cancer SGC-7901 cells progression via p21 repression", *PLoS One*, 9(6), e98894.
- [45] Khan I, Altman JK, Licht JD. New strategies in acute myeloid leukemia: redefining prognostic markers to guide therapy. *Clin Cancer Res.* 2012 Oct 1;18(19):5163-71.
- [46] Khwaja, A., Bjorkholm, M., Gale, R. et al. 2016. "Acute myeloid leukaemia." *Nat Rev Dis Primers* 2, 16010.
- [47] Kihara, R., Nagata, Y., Kiyoi, H., Kato, T., Yamamoto, E., Suzuki, K., Chen, F., Asou, N., Ohtake, S., Miyawaki, S., Miyazaki, Y., Sakura, T., Ozawa, Y., Usui, N., Kanamori, H., Kiguchi, T., Imai, K., Uike, N., Kimura, F., Kitamura, K., Nakaseko, C., Onizuka, M., Takeshita, A., Ishida, F., Suzushima, H., Kato, Y., Miwa, H., Shiraishi, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Miyano, S., Ogawa, S., Naoe, T. 2014. "Comprehensive analysis of genetic alterations and their prognostic impacts in adult acute myeloid leukemia patients", *Leukemia*, 28(8), 1586–1595.
- [48] Kim YC, Guan KL. 2015. "mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation." *J Clin Invest.* 2015 Jan;125(1):25-32.
- [49] Kirschbaum, M., Gojo, I., Goldberg, S. L., Bredeson, C., Kujawski, L. A., Yang, A., Marks, P., Frankel, P., Sun, X., Tosolini, A., Eid, J. E., Lubiniecki, G. M. and Issa, J. P. 2014. "A phase 1 clinical trial of vorinostat in combination with decitabine in patients with acute myeloid leukaemia or myelodysplastic syndrome", *Br. J. Haematol.*, 167, 185–193.
- [50] Koeneke E., Witt O. and Oehme I. 2015. "HDAC Family Members Intertwined in the Regulation of Autophagy: A Druggable Vulnerability in Aggressive Tumor Entities", *Cells*, 4(2), 135-168.

- [51] Kottaridis, P.D., Gale, R.E. and Linch, D.C. 2003. "FIt3 mutations and leukaemia", *Br J Haematol*, 122, 523–38.
- [52] Koukourakis MI, Kalamida D, Giatromanolaki A, Zois CE, Sivridis E, Pouliliou S, Mitrakas A, Gatter KC, Harris AL. 2015. "Autophagosome Proteins LC3A, LC3B and LC3C Have Distinct Subcellular Distribution Kinetics and Expression in Cancer Cell Lines." *PLoS One*. 10(9):e0137675.
- [53] Krueger DA., Care M., Holland KD., Agricola K., Tudor C., Mangeshkar P., Wilson, KA., Byars A. Sahmoud T. and Franz DN. 2010. "Everolimus for Subependymal Giant-Cell Astrocytomas in Tuberous Sclerosis", *The New England journal of medicine*, 363, 1801-11.
- [54] Kubota, Y., Ohnishi, H., Kitanaka, A., Ishida, T. and Tanaka, T. 2004. "Constitutive activation of PI3K is involved in the spontaneous proliferation of primary acute myeloid leukemia cells: direct evidence of PI3K activation", *Leukemia*, 8(8), 1438-40.
- [55] Kumar, C.C. 2011. "Genetic abnormalities and challenges in the treatment of acute myeloid leukemia", *Genes Cancer*, 2(2), 95-107.
- [56] Lagunas-Rangel, F.A., Chávez-Valencia, V., Gómez-Guijosa, M.Á. and Cortes-Penagos, C. 2017. "Acute Myeloid Leukemia-Genetic Alterations and Their Clinical Prognosis", *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res.*, 11, (4), 328-339.
- [57] Lee, H.Z., Kwitkowski, V.E., Del Valle, P.L., Ricci, M.S., Saber, H., Habtemariam, B.A., Bullock, J., Bloomquist, E., Li Shen, Y., Chen, X.H., Brown, J., Mehrotra, N., Dorff, S., Charlab, R., Kane, R.C., Kaminskas, E., Justice, R., Farrell, A.T. and Pazdur, R. 2015. "FDA Approval: Belinostat for the Treatment of Patients with Relapsed or Refractory Peripheral T-cell Lymphoma", *Clin Cancer Res.*, 21(12), 2666-70.
- [58] Lee, J. Y., Koga, H., Kawaguchi, Y., Tang, W., Wong, E., Gao, Y. S., Pandey, U. B., Kaushik, S., Tresse, E., Lu, J., Taylor, J. P., Cuervo, A. M. and Yao, T. P. 2010. "HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy", *The EMBO journal*, 29(5), 969–980.
- [59] Li, X., Li, C., Jin, J, Wang, J., Huang, J., Ma, Z., Huang, X., He, X., Zhou, Y., Xu, Y., Yu, M., Huang, S., Yan, X., Li, F., Pan, J., Wang, Y., Yu, Y. and Jin, J. 2018. "High PARP-1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia and PARP-1 inhibitor and SAHA-bendamustine hybrid inhibitor combination treatment synergistically enhances anti-tumor effects", *EBioMedicine*, 38, 47-56.
- [60] Li G, Tian Y, Zhu WG. 2020. "The Roles of Histone Deacetylases and Their Inhibitors in Cancer Therapy." *Front Cell Dev Biol.* 8, 576946.
- [61] Li, Y. and Seto, E. 2016. "HDACs and HDAC Inhibitors in Cancer Development and Therapy", *Cold Spring Harb Perspect Med.*, 6 (10), a026831.
- [62] Li, Z. and Zhu, W.G. 2014. "Targeting histone deacetylases for cancer therapy: from molecular mechanisms to clinical implications", *Int J Biol Sci.*, 10(7), 757-70.
- [63] Liang, H., Zheng, Q. L., Fang, P., Zhang, J., Zhang, T., Liu, W., Guo, M., Robinson, C. L., Chen, S. B., Chen, X. P., Chen, F. P. and Zeng, H. 2017. "Targeting the PI3K/AKT pathway via GLI1 inhibition enhanced the drug sensitivity of acute myeloid leukemia cells" *Sci Rep.* ,7, 40361.

- [64] Liersch, R., Müller-Tidow, C., Berdel, W.E. and Krug, U. 2014. "Prognostic factors for acute myeloid leukaemia in adults--biological significance and clinical use", *Br J Haematol.*, 165(1), 17-38.
- [65] Ma, C.X., Luo, J., Naughton, M., Ademuyiwa, F., Suresh, R., Griffith, M., Griffith, O.L., Skidmore, Z.L., Spies, N.C., Ramu, A., Trani, L., Pluard, T., Nagaraj, G., Thomas, S., Guo, Z., Hoog, J., Han, J., Mardis, E., Lockhart, C. and Ellis, M.J. 2016. "A Phase I Trial of BKM120 (Buparlisib) in Combination with Fulvestrant in Postmenopausal Women with Estrogen Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer", *Clin Cancer Res.*, 22(7), 1583-91.
- [66] Maira, S.M., Pecchi, S., Huang, A., Burger, M., Knapp, M., Sterker, D., Schnell, C., Guthy, D., Nagel, T., Wiesmann, M., Brachmann, S., Fritsch, C., Dorsch, M., Chène, P., Shoemaker, K., De Pover, A., Menezes, D., Martiny-Baron, G., Fabbro, D., Wilson, C.J., Schlegel, R., Hofmann, F., García-Echeverría, C., Sellers, W.R. and Voliva, C.F. 2012. "Identification and characterization of NVP-BKM120, an orally available pan-class I PI3-kinase inhibitor", *Mol Cancer Ther.*, 11(2), 317-28.
- [67] Markham, A. 2014. "Idelalisib: first global approval", *Drugs*, 74, 1701–7.
- [68] Martelli, A.M., Evangelisti, C., Chiarini, F., Grimaldi, C., Manzoli, L. and McCubrey, J.A. 2009. "Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling network in acute myelogenous leukemia", *Expert Opin Investig Drugs*, 18(9), 1333-49.
- [69] Martinelli, E., Troiani, T., D'Aiuto, E., Morgillo, F., Vitagliano, D., Capasso, A., Costantino, S., Ciuffreda, L.P., Merolla, F., Vecchione, L., De Vriendt, V., Tejpar, S., Nappi, A., Sforza, V., Martini, G., Berrino, L., De Palma, R. and Ciardiello, F. 2013. "Antitumor activity of pimasertib, a selective MEK 1/2 inhibitor, in combination with PI3K/mTOR inhibitors or with multi-targeted kinase inhibitors in pimasertib-resistant human lung and colorectal cancer cells", *Int J Cancer*, 133(9), 2089-101.
- [70] McKenna, H.J., Stocking, K.L., Miller, R.E., Brasel, K., De Smedt, T., Maraskovsky, E., Maliszewski, C.R., Lynch, D.H., Smith, J. and Pulendran, B. 2000. "Mice lacking flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells, and natural killer cells", *Blood*, 95, 3489–3497.
- [71] Moresi, V., Carrer, M., Grueter, C.E., Rifki, O.F., Shelton, J.M., Richardson, J.A., Bassel-Duby, R. and Olson, E.N. 2012. "Histone deacetylases 1 and 2 regulate autophagy flux and skeletal muscle homeostasis in mice", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 109:1649–1654.
- [72] Mrózek K., Heinonen K., Lawrence D., Carroll a J., Koduru P.R., Rao K.W., Strout, M.P., Hutchison, R.E., Moore, J.O., Mayer, R.J., Schiffer, C.A. and Bloomfield C.D. 1997. "Adult patients with de novo acute myeloid leukemia and t(9; 11)(p22; q23) have a superior outcome to patients with other translocations involving band 11q23: a cancer and leukemia group B study", *Blood*, 90, 4532– 4538.
- [73] Nepstad, I., Hatfield, K.J., Grønningsæter, I.S. and Reikvam, H. 2020. "The PI3K-Akt-mTOR Signaling Pathway in Human Acute Myeloid Leukemia (AML) Cells", *Int J Mol Sci.*, 21(8), 2907.

- [74] Ocias, L.F., Larsen, S.L., Vestergaard, H., Friis, L.S., Abildgaard, N. and Frederiksen, H., & On behalf of the Academy of Geriatric Cancer Research (AgeCare). 2016. "Trends in hematological cancer in the elderly in Denmark, 1980–2012" *Acta Oncologica*, 55, 98-107.
- [75] Osada, H., Tatematsu, Y., Saito, H., Yatabe, Y., Mitsudomi, T. and Takahashi, T. "Reduced expression of class II histone deacetylase genes is associated with poor prognosis in lung cancer patients", *Int J Cancer*, 112, (1), 26-32.
- [76] Owusu-Brackett, N., Shariati, M. and Meric-Bernstam, F. 2019. "Role of PI3K/AKT/mTOR in Cancer Signaling" *Predictive Biomarkers in Oncology*. Editors: Badve S., Kumar G. Springer, Cham.
- [77] Perl, A. E. 2017. "The role of targeted therapy in the management of patients with AML", *Blood Advances*, 1, 2281-2294.
- [78] Plass, C., Oakes, C., Blum, W. and Marcucci, G. 2008. "Epigenetics in acute myeloid leukemia", *Semin Oncol.*, 35(4), 378-87.
- [79] Pratz, K. W., and Levis, M. 2017. "How I treat FLT3-mutated AML", *Blood*, 129, 565-571.
- [80] Qi J, Singh S, Hua WK, Cai Q, Chao SW, Li L, Liu H, Ho Y, McDonald T, Lin A, Marcucci G, Bhatia R, Huang WJ, Chang CI, Kuo YH. HDAC8 Inhibition Specifically Targets Inv(16) Acute Myeloid Leukemic Stem Cells by Restoring p53 Acetylation. *Cell Stem Cell*. 2015 Nov 5;17(5):597-610.
- [81] Qing Xu, Serge-Emile Simpson, Timothy J. Scialla, Adam Bagg, Martin Carroll, Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation, *Blood*, Volume 102, Issue 3, 2003, Pages 972-980,
- [82] Quan P, Moinfar F, Kufferath I, Absenger M, Kueznik T, Denk H, Zatloukal K, Haybaeck J. Effects of targeting endometrial stromal sarcoma cells via histone deacetylase and PI3K/AKT/mTOR signaling. *Anticancer Res*. 2014 Jun;34(6):2883-97.
- [83] Rahmani M, Yu C, Reese E. Inhibition of PI-3 kinase sensitizes human leukemic cells to histone deacetylase inhibitor-mediated apoptosis through p44/42 MAP kinase inactivation and abrogation of p21(CIP1/WAF1) induction rather than AKT inhibition. *Oncogene*. 2003; 22(40):6231-6242.
- [84] Rahmani M, Aust MM, Benson EC, Wallace L, Friedberg J, Grant S. PI3K/mTOR inhibition markedly potentiates HDAC inhibitor activity in NHL cells through BIM- and MCL-1-dependent mechanisms in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*. 2014; 20(18):4849-4860.
- [85] Rau, R. and Brown, P. 2009. "Nucleophosmin (NPM1) mutations in adult and childhood acute myeloid leukaemia: towards definition of a new leukaemia entity" *Hematol Oncol.*, 27, 171–181.
- [86] Rettig, I., Koeneke, E., Trippel, F., Mueller, W.C., Burhenne, J., Kopp-Schneider, A., Fabian, J., Schober, A., Fernekorn, U., von Deimling, A., Deubzer, H.E., Milde, T., Witt, O. and Oehme, I. 2015. "Selective inhibition of HDAC8 decreases neuroblastoma growth in vitro and in vivo and enhances retinoic acid-mediated differentiation", *Cell Death Dis.*, 6(2), e1657.
- [87] Rodríguez-Arribas M, Yakhine-Diop SM, González-Polo RA, Niso-Santano M, Fuentes JM. 2017. "Turnover of Lipidated LC3 and Autophagic Cargoes in Mammalian Cells." *Methods Enzymol*. 2017;587:55-70.

- [88] Ropero, S. and Esteller, M. 2007. "The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer.", *Mol Oncol.*, 1(1), 19-25.
- [89] San José-Enériz, E., Gimenez-Camino, N., Agirre, X. and Prosper, F. 2019. "HDAC Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia.", *Cancers (Basel)*, 11(11), 1794.
- [90] Schaefer, E.W., Loaiza-Bonilla, A., Juckett, M., DiPersio, J.F., Roy, V., Slack, J., Wu, W., Laumann, K., Espinoza-Delgado, I., Gore, S.D.; Mayo P2C Phase II Consortium. 2009. "A phase 2 study of vorinostat in acute myeloid leukemia", *Haematologica*, 94(10), 1375-82.
- [91] Shallis, R.M, Wang, R., Davidoff, A., Ma, X. and Zeidan, A.M. 2019. "Epidemiology of acute myeloid leukemia. 2019. Recent progress and enduring challenges", *Blood Rev.*, 36, 70-87.
- [92] Shiozawa, K., Nakanishi, T., Tan, M., Fang, H.B., Wang, W.C., Edelman, M.J., Carlton, D., Gojo, I., Sausville, E.A. and Ross, D.D. 2009. "Preclinical studies of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) combined with cytosine arabinoside and etoposide for treatment of acute leukemias", *Clin. Cancer Res.*, 15, 1698–1707.
- [93] Silva, G., Cardoso, BA., Belo, H. and Almeida, A.M. 2013. "Vorinostat induces apoptosis and differentiation in myeloid malignancies: genetic and molecular mechanisms", *PLoS One*, 8(1), e53766.
- [94] Sportoletti, P. 2011. "How does the NPM1 mutant induce leukemia?", *Pediatr Rep.* 3, e6.
- [95] Spreafico, M., Gruszka, A.M., Valli, D., Mazzola, M., Deflorian, G., Quintè, A., Totaro, M.G., Battaglia, C., Alcalay, M., Marozzi, A. and Pistocchi, A. 2020. "HDAC8: A Promising Therapeutic Target for Acute Myeloid Leukemia", *Front Cell Dev Biol.*, 8, 844.
- [96] Staal, F.J., Famili, F., Garcia Perez, L. and Pike-Overzet, K. 2016. "Aberrant Wnt Signaling in Leukemia", *Cancers (Basel)*, 8, 78.
- [97] Stankov MV, El Khatib M, Kumar Thakur B, Heitmann K, Panayotova-Dimitrova D, Schoening J, Bourquin JP, Schweitzer N, Leverkus M, Welte K, Reinhardt D, Li Z, Orkin SH, Behrens GM, Klusmann JH. Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis in myeloid leukemia by suppressing autophagy. *Leukemia*. 2014 Mar;28(3):577-88.
- [98] Sudo, T., Mimori, K., Nishida, N., Kogo, R., Iwaya, T., Tanaka, F., Shibata, K., Fujita, H., Shirouzu, K. and Mori, M. 2011. "Histone deacetylase 1 expression in gastric cancer", *Oncol Rep.*, 26(4), 777-82.
- [99] Suraweera, A., O'Byrne, K.J. and Richard, D.J. 2018. "Combination Therapy With Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi) for the Treatment of Cancer: Achieving the Full Therapeutic Potential of HDACi", *Front Oncol.*, 8, 92.
- [100] Tallman, M.S., Andersen, J.W., Schiffer, C.A., Appelbaum, F.R., Feusner, J.H., Ogden, A., Shepherd, L., Willman, C., Bloomfield, CD., Rowe, J.M. and Wiernik, P.H. 1997. "All-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia.", *N Engl J Med.*, 337(15), 1021-8.
- [101] Tamburini, J., Elie, C., Bardet, V., Chapuis, N., Park, S., Broët, P., Cornillet-Lefebvre, P., Lioure, B., Ugo, V., Blanchet, O., Ifrah, N., Witz, F., Dreyfus, F., Mayeux, P., Lacombe, C. and Bouscary, D. 2007. "Constitutive phosphoinositide 3-kinase/Akt activation represents a favorable prognostic factor in de novo acute myelogenous leukemia patients", *Blood*, 110, 1025–1028.

- [102] Thein, M.S, Ershler, W.B., Jemal, A., Yates, J.W and Baer, M.R. 2013. "Outcome of Older Patients with Acute Myeloid Leukemia: An analysis of SEER Data over Three Decades" *Cancer*, 119 (15), 2720-272.
- [103] Thiollier, C., Lopez, CK., Gerby, B., Ignacimoutou, C., Poglio, S., Duffourd, Y., Guégan, J., Rivera-Munoz, P., Bluteau, O., Mabialah, V., Diop, M., Wen, Q., Petit, A., Bauchet, A.L., Reinhardt, D., Bornhauser, B., Gautheret, D., Lecluse, Y., Landman-Parker, J., Radford, I., Vainchenker, W., Dastugue, N., de Botton, S., Dessen, P., Bourquin, J.P., Crispino, J.D., Ballerini, P., Bernard, O.A., Pflumio, F. and Mercher, T. 2012. "Characterization of novel genomic alterations and therapeutic approaches using acute megakaryoblastic leukemia xenograft models", *J Exp Med.*, 209(11) 2017-31.
- [104] Tohda, S. 2014. "NOTCH Signaling Roles in Acute Myeloid Leukemia Cell Growth and Interaction with other Stemness-related Signals", *Anticancer Res*, 34, 6259-6264.
- [105] Urdiciain, A., Erausquin, E., Meléndez, B., Rey, J.A., Idoate, M.A. and Castresana, J.S. 2019. "Tubastatin A, an inhibitor of HDAC6, enhances temozolomide-induced apoptosis and reverses the malignant phenotype of glioblastoma cells" ,*Int J Oncol*, 54, 1797-1808.
- [106] Valiulienė, G., Stirblyte, I., Cicenaitė, D., Kaupinis, A., Valius, M. and Navakauskienė, R. 2015. "Belinostat, a potent HDACi, exerts antileukaemic effect in human acute promyelocytic leukaemia cells via chromatin remodelling" , *J. Cell. Mol. Med.*, 19, 1742–1755.
- [107] Vardiman, J. W., Harris, N. L., and Brunning, R. D. 2002. "The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms", *Blood*, 100, 2292-2302.
- [108] Vilas-Zornoza, A., Agirre, X., Abizanda, G., Moreno, C., Segura, V., De Martino Rodriguez, A., José-Eneriz, E.S., Miranda, E., Martín-Subero, J.I., Garate, L., Blanco-Prieto, M.J., García de Jalón, J.A., Rio, P., Rifón, J., Cigudosa, J.C., Martínez-Climent, J.A., Román-Gómez, J., Calasanz, M.J., Ribera, J.M. and Prósper, F. 2012. "Preclinical activity of LBH589 alone or in combination with chemotherapy in a xenogeneic mouse model of human acute lymphoblastic leukemia", *Leukemia*, 26(7), 1517-26.
- [109] Wang, Y.Y., Hao, J., Liu, Z.Y., Weng, X.Q., Sheng, Y., Jiang, C.L., Zhu, Y.M., Chen, B., Xiong, S.M., Li, J.M., Chen, Q.S., Chen, H.Y., Qiao, C. and Chen, Y. 2015. "Novel STAT5B-RARA fusion transcript in acute promyelocytic leukemia: identification and treatment response", *Leuk Lymphoma*, 56(9), 2731-4.
- [110] Watanabe, D., Nogami, A., Okada, K., Akiyama, H., Umezawa, Y. and Miura, O. 2019. "FLT3-ITD Activates RSK1 to Enhance Proliferation and Survival of AML Cells by Activating mTORC1 and eIF4B Cooperatively with PIM or PI3K and by Inhibiting Bad and BIM", *Cancers*, 11, 1827.
- [111] Weichert, W., Denkert, C., Noske, A., Darb-Esfahani, S., Dietel, M., Kalloger, S.E., Huntsman, D.G. and Köbel, M. 2008. "Expression of class I histone deacetylases indicates poor prognosis in endometrioid subtypes of ovarian and endometrial carcinomas.", *Neoplasia*, 10, (9), 1021-7.
- [112] Weichert, W., Röske, A., Gekeler, V., Beckers, T., Ebert, M.P., Pross, M., Dietel, M., Denkert, C. and Röcken, C. 2008. "Association of patterns of class I histone deacetylase

- expression with patient prognosis in gastric cancer: a retrospective analysis.”, *Lancet Oncol.*, 9 (2), 139-48.
- [113] Whitman, S.P, Archer, K.J, Feng, L., Baldus, C., Becknell, B., Carlson, B.D, Carroll, A.J, Mrózek, K., Vardiman, J.W, George, S.L, Koltz, J.E, Larson, R.A, Bloomfield, C.D and Caligiuri, M.A. 2001. “Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study”, *Cancer Res*, 61, 7233-7239.
- [114] Woan, K.V., Lienlaf, M., Perez-Villaroel, P., Lee, C., Cheng, F., Knox, T., Woods, D.M., Barrios, K., Powers, J., Sahakian, E., Wang, H.W., Canales, J., Marante, D., Smalley, K.S.M., Bergman, J., Seto, E., Kozikowski, A., Pinilla-Ibarz, J., Sarnaik, A., Celis, E., Weber, J., Sotomayor, E.M. and Villagra, A. 2015. “Targeting histone deacetylase 6 mediates a dual anti-melanoma effect: Enhanced antitumor immunity and impaired cell proliferation”, *Mol Oncol.*, 9(7), 1447-1457.
- [115] Xie, H. J., Noh, J. H., Kim, J. K., Jung, K. H., Eun, J. W., Bae, H. J., Kim, M. G., Chang, Y. G., Lee, J. Y., Park, H., and Nam, S. W. 2012. “HDAC1 Inactivation Induces Mitotic Defect and Caspase-Independent Autophagic Cell Death in Liver Cancer”, *PLoS ONE* 7(4), e34265.
- [116] Yamamoto, K., Miwa, Y., Abe-Suzuki, S., Abe, S., Kirimura, S., Onishi, I., Kitagawa, M. and Kurata, M. 2016. “Extramedullary hematopoiesis: Elucidating the function of the hematopoietic stem cell niche” *Molecular Medicine Reports*, 13(1), 587-591.
- [117] Yang, J., Nie, J., Ma, X., Wei, Y., Peng, Y. and Wei, X. 2019. “Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials.”, *Mol Cancer*, 18(1), 26.
- [118] Yenigül M, Akçok İ, Gencer Akçok EB. Ethacrynic acid and cinnamic acid combination exhibits selective anticancer effects on K562 chronic myeloid leukemia cells. *Mol Biol Rep*. 2022 Aug;49(8):7521-7530.
- [119] Yenigül, M. & Gencer Akcok, E. 2021. “The therapeutic potential of targeting HDAC6 with Tubastatin A in TFK-1 and EGI-1 cholangiocarcinoma cells” *Cumhuriyet Science Journal*, 42 (4), 775-780.
- [120] Yu J. S. L. and Cui W. 2016. "Proliferation, survival and metabolism: the role of PI3K/AKT/mTOR signalling in pluripotency and cell fate determination.”, *Development*, 143, 3050.
- [121] Yun CW, Lee SH. 2018. “The Roles of Autophagy in Cancer.” *Int J Mol Sci*. 19(11):3466.
- [122] Zhang, J., Roberts, T.M. and Shivdasani, R.A. 2011. “Targeting PI3K signaling as a therapeutic approach for colorectal cancer. *Gastroenterology*”, 141(1), 50-61.
- [123] Xu Q, Simpson SE, Scialla TJ, Bagg A, Carroll M. Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood*. 2003 Aug 1;102(3):972-80.