

Hematolojik Malignitelerde Sinyal İleti Sistemleri

Dr. Güray SAYDAM

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalı, İzmir

Sinyal ileti sistemi, normal hücre fonksiyonlarının devamı için gerekli iletişim ve etkileşmeden sorumludur. Gerek hücre içinde organellerin ve hücre yapısının birbiri ile haberleşmesi ve birbirlerinin fonksiyonlarını etkilemesi, gerekse hücrenin diğer hücrelerle haberleşebilmesi için sağlam ve sağlıklı çalışan bir sinyal ileti sistemi gereklidir. Hücreler arası sinyal ileti sistemi nispeten daha makro düzeyde irdelenebilir ve anlaşılması daha kolaydır. Oysa hücre içinde, sitoplazmik zardan başlayan ve DNA'da son bulan bir haberleşme ağı, adeta bir şelale ya da merdiven sistemi vardır ve bu sistemin her basamağı, gerek yukarı yönlü (*upstream*) gerekse aşağı yönlü (*downstream*) elemanlar tarafından kontrol edilmekte ve yine her iki yönde etkileşim gerçekleşmektedir. Ayrıca, membrandan, sitoplazma içine uzanan binlerce şelale olduğu ve bunların ayrıca birbirleri ile de etkileşime girdiği düşünüldüğünde, sistemin ne kadar kompleks olduğu bir kez daha anlaşılmaktadır.

Bu yazıda öncelikle, sinyal ileti sistemi ile ilgili genel bilgiler verilecek ve akabinde, hematopoietik malignitelerden lösemilerde sinyal ileti sistemi anomalilerine ve bunların tedaviye katkılarına değinilecektir.

I. Genel Bilgiler

Ekstraselüler ve intraselüler sinyal ileti sisteminin genel özelliklerini kısaca gözden geçirelim.

I.1. Ekstraselüler Sinyal İleti Sistemi

- Ekstraselüler sinyal ileti molekülleri spesifik reseptörlerine bağlanırlar.**
- Ekstraselüler sinyal ileti molekülleri yakın ya da uzak etkili olabilir.**

- Otokrin sinyal ileti sistemi, aynı grup hücrelerin hareketlerini koordine eder.**
- Gap-junction'lar aracılığıyla, komşu hücreler arasında sinyal paylaşımı gerçekleşir.** Gap-junction'lar, hücre sitoplazmaları arasında doğrudan iletişim sağlar. Aynı zamanda Ca⁺⁺ ve cAMP gibi küçük moleküllerin transportu da bu bağlantılar sayesinde sağlanır.
- Her hücre, ekstraselüler sinyal moleküllerinin spesifik kombinasyonlarına yanıt vermek üzere programlanmıştır.**
- Aynı ekstraselüler sinyal molekülüne, farklı hücreler farklı yanıtlar verir.** (Örneğin Asetilkolin).
- Ekstraselüler sinyal moleküllerinin ortamdaki konsantrasyonu, molekülün yarı ömrü ve yaşam süresine bağlı olarak ayarlanabilir.**
- Nitrik oksid gibi hidrofobik sinyal ileti molekülleri, membrandan özel reseptör gerektirmeden geçebilir ve doğrudan hücre içi hedeflerine ulaşırlar.**
- Nükleer reseptörler, gen reglatuvar proteinleridir ve ligand bağladıktan sonra aktive olurlar.** Bu reseptörleri etkileyen en önemli moleküller; retinoidler, steroid hormonlar, tiroid hormonları ve vitamin D'dir. Bu reseptörler "nuclear receptor superfamily" olarak da bilinirler.

I.2. İntraselüler Sinyal İleti Sistemi

- İster G-protein aracılı, ister enzim-bağlı olsun, hücre yüzeyinde bulunan reseptör aktive olduktan sonra, hücre içine mesajı, küçük ve büyük moleküller aracılığıyla**

ve intraselüler sinyal protein ağı aracılığıyla iletir. Bu iletimin sonunda, hedef proteinlerde mutlak suretle bir değişim olur ve hücrenin davranışı buna göre ayarlanır. Bu işlevde rol alan küçük proteinler “second messenger” olarak da bilinir. Bunlara en iyi örnek, suda çözünebilen cAMP ve Ca⁺⁺, yağda çözünebilen diaçilgliseroldur. Büyük intraselüler sinyal ileti sistemi proteinleri, fonksiyonlarına göre sınıflanabilir ve pek çoğu birden fazla sınıfa sokulabilir.

- 2. Pek çok intraselüler sinyal ileti sistemi proteinleri aynı zamanda bir moleküler “switch” gibi çalışırlar.** Sinyal alındığı zaman, molekülün aktivasyonu ile beraber hücre içi mekanizmalarda açma-kapama fonksiyonu görürler. Hücre içinde, bir yolağın aktivasyonu kadar , inaktivasyonu da önemlidir. Moleküllerin, işlem bittikten sonra tekrar original formlarına dönmele-ri, işlemin ve iletimin sürekliliği açısından oldukça önemlidir. Bu işlemden rol alan en önemli mekanizma fosforilasyon-defosforilasyondur. Fosforilasyondan sorumlu olan enzimler kinaz, defosforilasyondan sorumlu olan enzimler fosfataz olarak bilinir. Bunlar aynı zamanda kendileri de birer protein olduğu için, aktivasyonları yine fosforilasyon-defosforilasyon statuslarına göre belirlenir. İnsan genomunun %2’sinin kinazları kodladığı ve 1000 civarında kinazın olduğu düşünülmektedir. Proteinlerin aktivasyon-inaktivasyonunda rol alan diğer bir önemli sistem GTP-binding proteinlerdir. İki tip GTP binding protein tanımlanmıştır. Birincisi “large trimeric GTP binding proteinler” dir ve bunlar sinyalin G-protein-bağlı reseptörler aracılığıyla iletimini sağlarlar. İkinci grup ise “monomeric GTPase”lardır ve bunlar sinyal iletimi yanı sıra hücre içi veziküler trafficking’den de sorumludurlar.

- 3. İntraselüler Sinyal Kompleksleri, yanıtın hızını, etkinliğini ve spesifitesini arttırlar.**
- 4. Hücre içi sinyal ileti proteinleri arasındaki iletişim-etkileşim, bu proteinlerde yeralan “modüler binding domain”ler aracılığıyla gerçekleşir.**
- 5. Hücreler, ekstraselüler sinyal konsantrasyonundaki artışa, beklenenden daha fazla bir yanıt verebilir.**

6. Hücre, bazı sinyallerin etkisini hatırlayabilir. Eğer sinyal, hücre içindeki ileti sistemini uyaracak konsantrasyondaysa, bu uyarı başladıktan sonra, ortamdan sinyalin çekilmesi, hücre içi sistemde o sürecin sonlanmasına neden olmayabilir. Reseptör tarafından başlatılan olay devam eder ve eğer bu, gen transkripsiyonu gibi önemli bir biyolojik süreci etkiliyorsa, ortada sinyal olmadan bile hücrede ciddi değişiklikler gerçekleşebilir. Hücrelerin farklılaşması ve o şekilde kalması buna çok iyi bir örnektir.

7. Hücreler, sinyale olan sensitivitelelerini ayarlayabilirler. Bir sinyal, reseptörüne bağlandıktan sonra, etkisini gerçekleştirme ve bir süre sonra bu sürecin sona ermesi gerekir. Hücre için bu bir adaptasyon mekanizmasıdır ve bir anlamda densensitizasyon olarak da adlandırılabilir. Bu bir negatif feedback mekanizmasıdır ve bu konuda temel mekanizmalar; reseptör sekestrasyonu, reseptör downregulasyonu, reseptör inaktivasyonu, sinyal proteininin inaktivasyonu ve inhibitör protein üretimi şeklindedir.

II. Lösemik Dönüşümde Rol Oynayan Sinyal İletisi Mekanizmaları

Hematopoietik hücrelerin proliferasyonu, farklılaşması ve fonksiyonel hale gelmesi, sitokin ve hormon olarak sınıflanabilen bir dizi ekstraselüler molekül tarafından kontrol edilmektedir. Bu moleküller doğrudan hücre içi gen transkripsiyonu ya da indirekt olarak sitoplazmik sinyal sistemlerinin aktivasyonu ile etki göstermektedirler. Sinyal iletiminde, ekstraselüler sinyali, intraselüler sinyal sistemine ileten/yansıtan membran reseptörleri oldukça önemli rol oynamaktadır. Bu reseptörler ya sahip oldukları enzimatik aktiviteyle ya da onların intraselüler domainlerine eşlik eden katalitik proteinler aracılığıyla hücre içi sinyal yolaklarını aktive etmektedirler. Bu aktivasyon ve hemen ardından gelen inhibisyon sürecinde en önemli olay fosforilasyon ve defosforilasyondur.

Normal hematopoez, sıkı bir şekilde kontrol edilen, sitokinlerin ve reseptörlerinin önemli rol oynadığı bir dizi sinyal yolağına sahiptir. Bu yolakların normal çalışması, normal hematopoezin devamı için oldukça önemlidir. Bu yolaklarda ortaya çıkabilecek anormallikler, malign transformasyon, azalmış apoptozis ve kontrolsüz proliferasyonla sonuçlanmaktadır. Farklı sitokinler, aynı

hücrede aynı yolları uyarabildiği gibi, aynı ya da farklı hücrelerde farklı yolların aktivasyonuna ve sonuçlara neden olabilmektedir. Bunda, paylaşılan reseptör altbirimlerinin rolü olabildiği gibi, ortak transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu da rol oynayabilmektedir.

Sinyal iletim sisteminin majör 3 üyesi bulunmaktadır; kinazlar, adaptör ya da “docking” proteinler ve transkripsiyon faktörleri. Bu konudaki en önemli bilgiler, interferonların etki mekanizmalarının araştırılması sırasında elde olunmuştur. IFN’ler esas olarak Jak/STAT adı verilen non-reseptör tirozin kinazlar üzerinden etki göstermekte ve spesifik tirozin kinaz rezidülerinin fosforilasyonu ile bu sistem aktive olmaktadır. Bu sistemde rol alan protein TK’lar katalitik altbirimlerinin yanı sıra, SH2, SH3 ve pleckstrin gibi diğer altbirimleri sayesinde diğer sinyal iletim molekülleri ile de etkileşime girmektedir.

Tirozin dışında, serine ve treonin rezidülerinin fosforilasyonu da sinyal iletim sisteminde önemli rol oynamaktadır. Bunlar özellikle reseptör tirozin kinaz(RTK) sisteminin hücre içi iletimcisi olarak görev yapmaktadırlar. İlk tanımlandıklarında, RTK’ların, doğrudan transkripsiyonu etkiledikleri düşünülmüşse de, sonradan bunların hücre içinde serine/treonin kinaz üzerinden çalışan Ras/Raf/MEK/ERK gibi sistemleri kullandığı ortaya konmuştur. Örneğin, IL-3 ya da GM-CSF’in reseptörüne bağlanmasından sonra, Shc, Grb-2 ve Sos gibi adaptör protein aktivasyonu gerçekleşmekte ve Ras sisteminin aktivasyonu ile sonuçlanmaktadır. Ras sisteminde aktivasyon, downstream elemanlar olan ERK-1 ve ERK-2 aktivasyonuna ve bunlar da *c-fos* ve *c-jun* gibi transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonunda artışa neden olmaktadır. MAPK ve PI3K sisteminin elemanları da serine/treonin fosforilasyonu üzerinden çalışmaktadır. Ayrıca, IL-3’ün reseptörüne bağlanmasından sonra aktive olan p70S6 kinaz sistemi de serine/treonin fosforilasyonu üzerinden çalışmaktadır. Sonuçta sinyal hangi reseptöre gelirse gelsin, adaptör proteinler aracılığı ile transkripsiyon faktörlerine iletilmekte ve gen transkripsiyonunun regülasyonu sonucu, apoptotik proteinlerin fosforilasyonu, apoptozisin uyarılması ya da spesifik hücre siklus kontrol noktalarındaki siklin bağımlı kinazların fosforilasyonu ile proliferasyona neden olabilmektedir.

Sadece reseptör proteinlerinin ya da adaptör proteinlerin kinaz aktivitesi yoktur. Kinaz aktivitesine sahip tanımlanmış pek çok onkogen

bulunmaktadır. Bunlar *c-ABL*, *c-FMS*, *FLT3*, *c-KIT* ve *PDGFRβ* olarak sınıflanabilir ve bunların hepsi normal hematopoezin regülasyonunda rol oynamaktadır. Bu onkogenlerin negatif domainlerinin fonksiyonlarını ortadan kaldıran veya aktif domainin aktivitesini arttıran mutasyonların ve bunun sonucunda hücre içinde, Ras/Raf/MAPK ya da PI3K yollarının aşırı aktivasyonu ile anormal proliferasyonun ortaya çıktığı bildirilmiştir.

II.1. Jak/STAT Sinyal İletim Sistemi

Hematopoietik hücre proliferasyonu ve farklılaşması, IFN’lar, interleukinler ve koloni uyarıcı faktörler olarak bilinen bir grup polipeptid yapıları sitokinler tarafından kontrol edilmektedir. Bu sitokinler reseptörlerine bağlanır ve downstream kaskadları aktive ederler. Bu reseptörler iki ya da daha fazla alt birimden oluşur (α , β ve γ gibi). Genelde α birimi ligandın bağlanmasından, β ve γ ise sinyalin hücre içine iletilmesinden sorumludur. Bu reseptörlerin en büyük özelliği, kendilerine ait “reseptör tirozin kinaz” aktivitelerinin bulunması ve diğer tirozin kinazları kullanmalarıdır. Ligandın reseptörüne bağlanmasından sonra, dimerizasyon gerçekleşir ve sinyal hücre içine iletilir. Bunu takiben hücre içinde *Src* ya da *Jak* grubu tirozin kinaz aktivasyonu gerçekleşir. *Lck*, *Lyn* ve *Fyn*, *Src* grubunun iyi bilinen üyeleridir.

Jak ailesi, nispeten büyük dört üyeden oluşmaktadır (*Jak1*, *Jak2*, *Jak3* ve *Tyk2*). Bunlar, reseptörlerin intraselüler subunitlerine bağlanır, onları fosforile eder ve adaptör proteinler için “docking site”ler oluştururlar. Jak grubunun 7 alt birimi olduğu bilinmektedir.

Reseptör proteinlerinin dimerizasyon/oligomerizasyonu, Jak proteinlerinin juktapozisyonuna neden olmaktadır. Bu hareket, onların kinaz fonksiyonlarının aktivasyonu ile sonuçlanmakta ve downstream sinyal proteinlerinin (Stat, *Src*-kinaz, *Shc*, *Grb-2* gibi adaptör proteinlerin) fosforilasyonu bunu takip etmektedir.

Jak sistem anomalileri değişik klinik durumlarda bildirilmiştir. Örneğin, t(9;12)(p24;p13) sonucu TEL/JAK2 açığa çıkmaktadır. Bu da IL-3’den bağımsız olarak devamlı bir Stat5 aktivasyonuna ve anormal proliferasyona, lökomojeneze neden olmaktadır. Benzer şekilde HTLV-1’de anormal JAK proteinlerinde artmış tirozin kinaz aktivitesine ve muhtemel lökomojenik potansiyele neden olmaktadır.

Stat ailesi esas olarak Stat-1,3,4 ve 5 izomerlerinden oluşan toplam 10 farklı proteini içermektedir. Yapısı çok iyi aydınlatılmış olup, DNA binding domain, çok iyi korunmuş NH2 domain, transaktivasyondan sorumlu COOH terminal domain ve SH2-SH3 domainlerinden oluşmaktadır. Fosforile olunca dimerler oluşturup aktif forma geçer ve fonksiyon görmek üzere nükleusa geçerler.

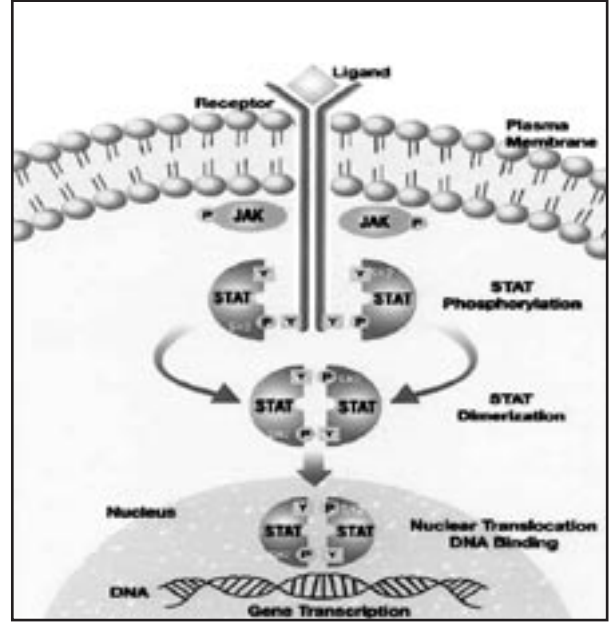
Jak proteinleri, bir grup hücre içi sinyal proteinlerini aktive eder. Bunlar içinde en iyi tanımlanmış olanları STAT grubudur. Jak aktivasyonunu takiben STAT fosforilasyonu gerçekleşir ve homodimer formunu alan STATlar nükleusa göç edip, DNA'ya bağlanır ve gen aktivasyonunu başlatır. STAT aktivasyonu, serin/treonin rezidülerinin fosforilasyonu ile kontrol edilmektedir ve bu kontrol STAT kinazlardan bağımsızdır.

STAT'lar, hücre içinde bazen birbirine zıt olaylara aracılık ederler. Hem hücre proliferasyonunu hem de apoptozisi uyarabilirler. Örneğin STAT1, IFN'un antiproliferatif etkisine aracılık ederken, STAT5, IL-3 ve GM-CSF'in proliferatif etkisine aracılık etmektedir. STAT3 aktivasyonu ise, IL-6 ve IL-10'a bağlı büyüme inhibisyonu, IL-3 ve GM-CSF tarafından uyarılan proliferasyona aracılık etmektedir. STAT1, IFN'a yanıt olarak Fas/FasL ekspresyonunu arttırmakta ve apoptozisi indüklemektedir.

Jak/STAT yolağında, kontrol mekanizması olarak, aktivasyon hızlı ve geçicidir. Proteozom aracılı yıkım ve tirozin defosforilasyonu, inaktivasyonda önemli mekanizmalardır. SOCS ve PIAS, inhibisyonun en önemli mediatörleridir.

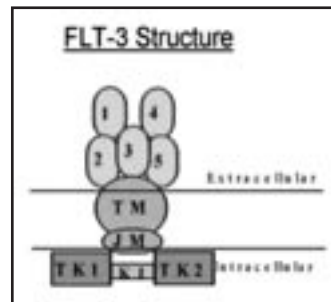
II.2. Reseptör Tirozin Kinazlar (RTK) ve Serin/Treonin Aracılı Sinyal İletimi

RTK'lar, membrana bağlı olan ve, ekstraselüler ligand bağlayıcı domain, transmembran domain ve oldukça iyi korunmuş intraselüler domain kısımlarından oluşan reseptöre bağlı kinazlardır. Bunlar, ligand bağlanması, hücreler arası adezyon molekülleri ya da G-protein bağlı reseptörlerin uyarılması ile aktive olurlar. Bu reseptörlerin fosforile olmuş spesifik domainleri, SH2 içeren sitoplazmik adaptör ve efektör proteinler için yüksek afiniteye sahiptir. RTK'lar başlıca 4 majör gruba ayrılabilir. Class I, epidermal growth faktör reseptörlerini, Class II, insulin-like growth factor-1 reseptörünü, Class III ise, PDGFR, makrofaj koloni stimülatif faktör (FMS-R ya da CSF-1R), stem cell faktör reseptörü (KIT) ve FLT3R, Class



Şekil 1. JAK/STAT sinyal ileti sisteminin çalışması. Ligand tarafından aktive edilen reseptör oligomerizasyonu Jak aktivasyonuna ve STAT fosforilasyonuna neden olmaktadır. Oligo ya da heterodimerler oluşturan STATlar nükleusa geçmekte, spesifik yanıt elemanlarına bağlanmakta ve gen transdüksiyonunu kontrol etmektedir. (Benek M ve arkadaşlarına ait olan 23 numaralı kaynaktan alınmıştır)

IV ise FGFR'yi içermektedir. Bu reseptörler, son zamanlarda, özellikle malign transformasyonda önemli araştırmaların konusu olmakta ve tedavi amaçlı yaklaşımda bir hedef olarak kabul edilmektedir. Özellikle FLT3R'lerin kontrolsüz ve daimi aktivasyonunun akut myeloid lösemiye yol açtığı bildirilmiştir. AML'lerin %30'undan fazlasında saptanan iki farklı moleküler süreç gayet iyi tanımlanmıştır. FLT3R reseptör geninin exon 11 ve 12 sinde ortaya çıkan internal tandem duplikasyon, reseptörün jukstamembran domainini etkilemektedir. Son zamanlarda, codon 835 de tanımlanan nokta mutasyonu, reseptörün aktivasyon loopunu etkilemekte ve AML'lerin %7'sinde rapor edilmektedir. Bu anormal aktivasyonun inhibisyonuna yönelik klinik çalışmalar halen devam etmektedir.



Şekil 2. FLT-3'ün yapısı

Pek çok hücre içi sinyal proteini, aktive olmuş RTK'nin fosfotirozin rezidüsüne bağlanır. Bunlar GTPase activating proteinler, PI3K, Grb-2 ve Src-like tyrosine kinazlardır. Bunların serin/treonin fosforilasyonu, downstream sinyal ileti sistemlerinin ve gen transkripsiyonunun aktivasyonu ile sonuçlanır.

Serin/treonin MAPK'lar geniş bir ailedir ve Ras/Raf/MEK/ERK yolağı, p38 kinaz ailesi, JNK ailesini içermektedir. Ras grubu ise, GTPazların en büyük üyelerinden biridir ve sitoplazmik membranın iç yüzeyinde yer almaktadır. Ras ailesinin üyeleri, başta RTK'lar olmak üzere pek çok reseptörün, sinyal iletiminde rol almaktadır. Bu reseptörlerin aktivasyonu, sitoplazmik domainde tirozin rezidülerinin fosforilasyonu ve Shc ve Grb2 gibi adaptör proteinlerin bağlanması için fosfotirozil-bağlanma bölgelerinin açığa çıkmasına neden olmaktadır. Bunun akabinde, guanin nükleotide exchange faktörler devreye girmekte ve Ras aktivasyonu gerçekleşmektedir.

Ras aktive olduktan sonra, Raf/serine treonin kinazı aktive etmekte ve bu da MAPK kinazı (diğer adıyla MEK), fosforile etmektedir. Bunun sonucunda MAPK (diğ er adıyla ERK) aktive olmakta, nükleusa göç etmekte ve Elk-1 gibi spesifik transkripsiyon faktörlerini aktive etmektedir. ERK aktivasyonu ayrıca, diğ er kinazların da (örneğin RSK=MAPK activated protein kinazlar) aktivasyonuna yol açmaktadır. RSK'lar hücre siklusunun kontrolü ve apoptozisde önemli rol oynamaktadırlar. Örneğin RSK aktivasyonu, Bad proteini aracılı apoptozisi baskılamakta ve proliferasyonu uyarılmaktadır. Benzer şekilde, Ras/Raf/MEK/ERK sistemi, siklin D1 gibi proteinler üzerinden hücre siklusunu ve c-Myc gibi transkripsiyon faktörlerini de kontrol etmektedir.

Hücre siklusunun kontrolünde diğ er önemli bir regulatuvar kompleks RbE2F repressör kompleksidir. Bu kompleks aktive olunca hücre G1'den S fazına geçemez. Bu esnada aktive olan CDK'lar, Rb fosforilasyonu yapar ve Rb-E2F1 kompleksi ayrılır. Rb inaktive olunca, S fazına geçiş için gerekli olan genlerin transkripsiyonu başlar.

p38 ailesi başlıca dört gruptan oluşmaktadır: α , β , γ ve δ . Bu kinazların aktivasyonu esas olarak, bcr/abl pozitif hücrelerde ve normal hematopoezde, IFN'un antiproliferatif etkilerinden sorumludur.

JNK (SAPK olarak da bilinirler) grubu, MAPK'lerin üçüncü ailesini oluşturmaktadır. MEKK tarafından aktive edilirler ve MEKK/JNK

aktivitesi özellikle p53'ün normal fonksiyon görmesi ve apoptozisi uyarıcı etkisinde önemlidir.

Serine/treonin protein fosfatazlar, kinazların ve özellikle MAPK'ların defosforilasyonundan yani inaktivasyonundan sorumludur. Bu grubun en önemli üyeleri PP1 ve PP2'dir ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Hematoloji ekibi olarak bizim ilgi alanımızı oluşturmaktadır. Bu konuyla ilgili çalışmalarımızdan daha sonra ayrıntılı olarak sözedeceğiz.

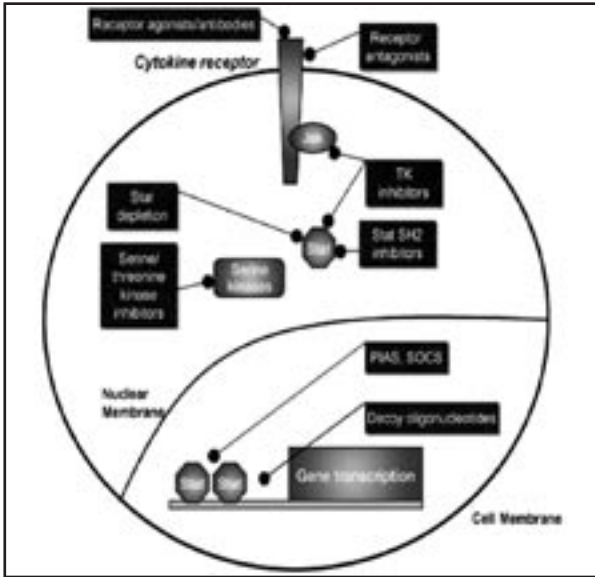
PI3K, AKT(Protein Kinaz B olarak da bilinir) ve protein Kinaz C de serin/treonin fosforilasyonu ile kontrol edilmektedir. PI3K aktivasyonu, AKT/PKB'nin membrana göçüne ve onun da aktivasyonu, pek çok downstream yolların (p70 RSK ve NF κ B gibi) aktivasyonuna neden olmaktadır. Serine/treonin kinaz AKT aktivitesi, hücre yaşamının devamı için önemli bir yoldur. AKT aktivasyonu, I κ B/ NF κ B kompleksinden NF κ B'nin serbestleşmesine ve nükleusa göçüne neden olmaktadır. Ayrıca AKT aktivasyonu caspase-9 inhibisyonuna neden olmaktadır. PTEN ise, AKT için PI3K üzerinden inhibitör gibi davranmaktadır. PTEN, bugün için bir onkogen olarak kabul edilmektedir. Ayrıca bcl-2 proteini de serine/treonin rezidüleri üzerinden fosforile olmaktadır.

Protein Kinaz C (PKC), diğ er bir serine/treonin fosforile edici enzimdir. Raf ve akabinde NF κ B aktivasyonu için PKC oldukça önemlidir. PKC'nın, Jak/STAT üzerinden, myeloid progenitör hücrelerde sinyal iletimini kontrol ettiği de bilinmektedir. PKC ve MAPK inhibisyonuna yönelik tedavi araştırmaları halen devam etmektedir.

Tüm bu karmaşık sinyal ileti sistemlerinde, Jak ve Raf kinazlar, diğ er yollar arasındaki etkileşimi ve iletişimi sağlamaktadır.

1.3. Lösemi Tedavisinde Hedef Olarak Sinyal İletim Sistemi

Malign hücrelerde sinyal ileti sisteminin anormal aktivasyon gösterdiğinin saptanması, bu sistemi tedavi için uygun bir hedef haline getirmiştir. Ancak bu sistemlerin kontrolünde pek çok faktörün rol alması ve yaygın dağılımı, komplikasyonları da beraberinde getirmiştir. Ancak, tümöral dokuda, normal dokuya oranla aşırı oranda bir aktivasyonun varlığı, normal dokuları etkilemeden bunların inhibisyonuna olanak sağlamaktadır. Sinyal iletiminin inhibisyonuna yönelik tedavide en büyük sorun, özgünlük ve seçicilik gibi durmaktadır. Diğ er önemli bir nokta da, bu hedeflerin her birinin, çok

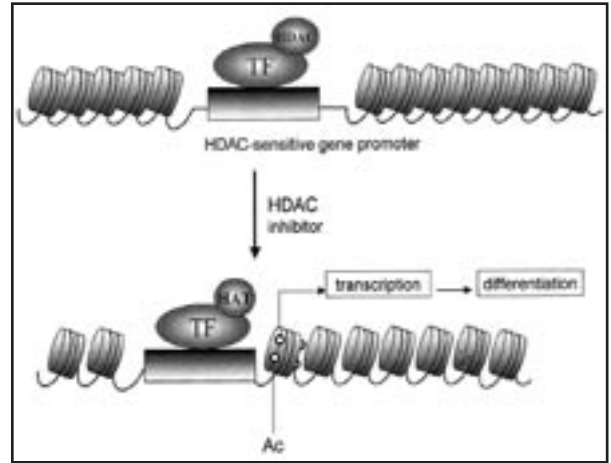


Şekil 4. JAK/STAT sinyal ileti sisteminde inhibisyon için muhtemel hedefler (21 numaralı kaynaktan alınmıştır)

bölgesinin inhibisyonu ve substrat bağlanma bölgesinin inhibisyonu.

Sinyal ileti mekanizmalarının çok daha net bir şekilde öğrenilmesi ve kanser-lösemi etyopatogenezindeki rollerinin aydınlatılması, beraberinde güncel kullanımda olan antikanser ilaçların sinyal sistemine olan etkilerinin araştırılmasını getirmiştir. Örneğin, Fludarabinin, klasik etkilerinin yanı sıra, neoplastik hücrelerde, Stat1 aktivitesinin kaybına yol açtığı ve antineoplastik etkinin bir kısmından bunun sorumlu olduğu ortaya konmuştur.

Lösemilerde sadece gen ve kromatin yapıların yanı sıra, kromatin bütünlüğünü ve genin normal transkripsiyonunu sağlayan multiprotein komplekslerinde de anormallikler olabildiği bildirilmiştir. Bunların başında, histon asetil transferaz (HDAC) ve DNA metiltransferazlardır. AML-M2 tanılı hastaların çok büyük bir kısmında t(8;21)-(q22;q22) translokasyonu neticesinde, AML1 geninin DNA bağlama bölgesi ile ETO geni arasında füzyon oluşur ve bu füzyon proteini HDAC ile etkileşip, hücresel farklılaşmayı durdurur. Benzer şekilde, çocukluk çağı ALL olgularında, t(12;21)-(p12;q22) translokasyonu neticesinde TEL/AML1 füzyon geni ortaya çıkmakta ve bu genin aktivasyonu ile farklılaşma duraksamaktadır. Bütiratlar, trichostatin A, 5-azacytidine, 2'-deoxy-azacytidine gibi HDAC ve DNA metiltransferaz inhibitörlerinin,



Şekil 5. HDAC inhibitörlerinin çalışma mekanizması.

HDAC: Histone deacetylase complex,
Ac: Acetyl grup,
TF: Transcription factor,
HAT: Histone acetyltransferase
(24 nolu kaynaktan alınmıştır)

akut lösemi tedavisinde kullanımına yönelik çalışmalar halen devam etmektedir.

En iyi bilinen translokasyonlardan birisi, APL'de saptanan t(15;17)(q22;q11.2)'dir. RAR α /PML füzyon geni oluşmakta ve bu gen ürünü olan proteinde her iki domainde aktif olarak kalmaktadır. Bu protein, nükleer reseptör corepressörü olan N-CoR ve SMRT, ve ayrıca HDAC ile etkileşerek, myeloid maturasyonda önemli rolü olan retinoid reseptör genlerini inaktive etmektedir. Farmakolojik dozda ATRA, füzyon proteinini dominant negatif formdan aktivatör forma dönüştürmektedir. Ayrıca retinoidlerin etkilediği sinyal ileti sistemi üzerine etkili olan diğer ilaçlar, ATRA ile sinerjistik etki göstermektedir. Örneğin, ATRA, Stat1 ve Stat2'yi upregüle etmekte ve IFN ile elde olunan inhibitör etkiyi potansiyelize etmektedir. Arsenik trioksidin etki mekanizmasının bir kısmı da RAR α /PML füzyon gen ürününün degradasyonu üzerinden olmaktadır. Arsenik, ayrıca, JNK aktivitesinde artışa, PKC'nin sitozolden membrana translokasyonuna ve aktivasyonuna, CDKI inhibisyonuna ve NF κ B inhibisyonuna neden olmaktadır.

Rituximab (anti CD20) ve alemtuzumab (anti CD52) gibi monoklonal antikorlar hematolojide güncel olarak ve artan oranlarda kullanılmaktadır. Bu antikorların etkilerini tek bir mekanizmayla açıklamak mümkün değildir. Rituximab, hücre içinde kalsiyum dengesinde bozulmaya ve CD20 taşıyan B hücrelerin apoptozisine neden olmaktadır.

dır. İn vivo ortamda, Rituximab'ın, periferik kan hücrelerinde caspazları aktive ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, kompleman ve antikordan bağımsız lizisi de aktive edebilmektedir.

Serine/threonine kinazlar ve lösemik dönüşüm ile ilgili çalışmalar devam etmektedir. Bu grubun en önemli üyesini, daha önce de bahsettiğimiz gibi Ras oluşturmaktadır. Ras antisense oligonükleotidler ve downstream yolakların inhibisyonuna yönelik ilaçlar geliştirilmektedir. Ras'ın -COOH ucunun prenilasyonundan sorumlu olan farnesil transferazların inhibisyonu (FTI) amacıyla R115777, SCH66336, L778123 ve BMS214662 gibi ilaçlar test aşamasındadır. Ayrıca, Raf inhibisyonu için geldanamycin ve radiciol türevleri geliştirilmiştir. Stauromycin ve türevleri, PKC inhibisyonu yapmakta ve değişik klinik aşamalarda halen denenmektedirler. Aberran ERK ve MEK aktivitesi AML ve KML'de gösterilmiştir ve bunun inhibisyonuna yönelik olarak geliştirilen ilaçlardan PD184352 faz I klinik çalışmalarda denenmektedir. Wortmannin ve türevleri, farmakolojik olarak PI3K inhibitörüdür ve halen üzerinde çalışılmaktadır.

Diğer önemli bir sinyal basmağı, apoptozisin kontrolünde rol oynayan IAP grubu proteinlerdir. IAP grubunun en potent üyesi olan XIAP, kazpazları inaktive etmekte ve apoptozisi engellemektedir. IAP'lerin AML'de rolü olduğu gösterilmiştir. XIAP'nin adenoviral antisense oligonükleotidlerle inhibisyonu, AML blastlarının radyoterapiye olan duyarlılığını arttırmaktadır.

Proteinlerin, intraselüler ortamda yıkımında ubiquitin-proteasom sistemi önemli rol oynamaktadır. Spesifik proteinlerin yıkımını kontrol ettikleri ve selektif oldukları için metabolik yolların kontrolünde en önemli mekanizmalardan birisidir. Siklinler ve CDKI, p53, NFκB, c-myc, c-fos, c-jun gibi transkripsiyon faktörleri ve apoptoz indükleyiciler proteazom yoluyla yıkıma uğramaktadır. Bunların inhibisyonu, hücrede normal apoptotik sürecin aktivasyonuna katkıda bulunabilir. PS-341, spesifik bir proteazom inhibitörüdür. Hücre kültürlerinde ve KLL hastalarından elde edilen taze hücrelerde, PS-341'in apoptozisi uyardığı ve ilaç direncini geriletmediği saptanmıştır. Myelom tedavisinde kullanımına yönelik klinik çalışmalar halen devam etmektedir.

Lösemi tedavisinde diğer güncel bir konu, hücre siklusunun kontrolüdür. Rb proteininin siklin/CDK kompleksi tarafından fosforilasyonu

ile bir transkripsiyon faktörü olan E2F serbestleşir ve nükleusa geçip, hedef genlerin transkripsiyonunu regüle eder. Solid malignitelerde, kanser tedavisinde E2F2e yönelik çalışmalar halen devam etmektedir. Siklin ve CDK inhibisyonu, diğer bir hedeftir ve flavopiridol ve staurosporin gibi ajanlara ait çalışmalar halen devam etmektedir. Özellikle flavopiridol ile muamele edilmiş hücre hatlarında doksorubicin hassasiyetinde artış olması, kombinasyon tedavilerinin önünü açmıştır.

Bundan sonraki bölümlerde, bizim Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Hematoloji Laboratuvarı olarak üzerinde ağırlıklı çalıştığımız Portein serine/treonin fosfatazlar ve lösemi tedavisindeki rollerine değineceğiz.

1.3. Protein Serine/threonine Fosfatazlar

Grubumuz, uzun yıllardır laboratuvarımızda, lösemide farklılaştırıcı tedavi ve sinyal ileti sistemi konusunda çalışmalar yapmaktadır. Sinyal ileti sisteminde, özellikle ilgilendiğimiz alan serine/threonine protein fosfataz sistemi olduğu için, bu bölümde, serine/threonine protein fosfataz sistemi ile beraber lösemide farklılaştırıcı tedaviden bahsedeceğiz.

Farklılaşma ve proliferasyon dengesindeki bozulma, lökomojenik işleyişe önemli bir katkı sağlamaktadır. Kontrol edilemeyen proliferasyonun tetiklenmesi ve farklılaşmanın bozulması sinyal yollarının karmaşık basamaklarıyla oluşur. Lökomojenezle ilişkili mekanizmaları aydınlatmak için model hücre hatları araştırmaların popüler parçalarındandır. Bu hücre hatları arasında HL-60 myeloid lösemi hücre hattı, çok iyi tanımlanmış, laboratuvar çalışmalarında sıkça kullanılan bir lösemi modelidir.

HL,60 hücreleri indükleyici moleküllerle uyarıldığında granulositik ve monositik yönde farklılaşır. DMSO ve ATRA uyarısıyla bu myeloid lösemi hücre hatları granulositik hücrelere dönüşür. 1,25(OH)₂D₃ uyarısıyla monositik hücrelere ve forbol ester türevleri ile makrofaj benzeri hücrelere farklılaşır. HL-60 hücrelerinin bu karakteristik özelliği araştırmacıların ilgisini çekmiştir ve bu hücre hattı in vitro çalışmalarda sık tanımlanan model halini almıştır.

1,25(OH)₂D₃, normal insan kemik iliği hücreleri gibi, insan myelojenik lösemik HL-60 hücrelerini terminal olarak matür monositlere farklılaşmak üzere uyarır. Bu ajanla farklılaşma profilerasyon

inhibisyonu ile ilişkilidir. ATRA, kültürde lösemik HL-60 hücrelerinde granulositik farklılaşmayı uyarmaktadır, akut promyelositik lösemili hastalarda yüksek remisyon oranları sağlamaktadır. ATRA'nın biyolojik etkileri "Retinoik Asit Reseptörleri" tarafından yönlendirilmektedir. ATRA ile uyarılmış granulositik farklılaşmada, protein fosforilasyonu ve defosforilasyonu önemli düzenleyici mekanizma gibi gözükmemektedir.

Metilprednizolon da , ATRA ve $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ gibi, steroid hormon ailesinin bir üyesidir ve nükleer hormon reseptörü ailesinden "zinc-finger containing superfamily" üzerinden etki etmektedir. Bu reseptör proteinleri hedef hücredeki spesifik DNA promoter bölgelerine bağlanarak, transkripsiyon başlama hızında doğrudan değişime yolaçmak şeklindedir. Yüksek doz metilprednizolon tedavisinin akut promyelositik lösemi ve diğer akut myeloblastik lösemi subtiplerinde myeloid hücrelerinin matür granulositlere farklılaşmasını in vivo olarak uyardığı gösterilmiştir. Bizim laboratuvarımızdaki çalışmalar, metilprednizolonun HL-60 ve K562 (Ph pozitif transforme KML akut myeloid hücre hattı) hücrelerinin proliferasyonunu baskıladığı ve kısmi olarak terminal granulositik ve monositik farklılaşmayı uyardığı gösterilmiştir.

Son zamanlarda, Arsenik trioksit (As_2O_3) akut myeloid lösemi, özellikle APL tedavisinde tanımlanmıştır. APL hücrelerinin kısmi farklılaşmasını, PML/RAR-alfa ve bcl-2 down-regülasyonu üzerinden sağladığı gösterilmiştir. As_2O_3 uzun zamandır bilinmesine rağmen, apoptoz ve APL hücrelerinin farklılaşması yeni bir gözlemdir. Biz aynı zamanda As_2O_3 'ün HL-60 ve K562 hücre hattında farklılaştırıcı etkisini olduğunu ve bunun serine/threonine protein fosfatase sistemi üzerinden olmadığını gösterdik.

Protein fosforilasyonu, hücre proliferasyonu ve farklılaşması gibi olayları kontrol eden sinyal iletim sistemlerinin temel sürecidir. Kinazlar ve fosfatazlar hücrenin protein fosfatlanması durumunu yönetirler , bu da hücre bölünmesi ve büyümesi gibi temel biyolojik olayları düzenler.

Bu bölümde, ağırlıklı olarak defosforilasyon ve lösemik farklılaşmadan bahsedeceğiz.

Protein Fosfatazlar

Hücrenin fosforilasyon basamağında dengenin bir tarafında bulunan defosforilasyon reaksiyonunu yöneten bu enzimler, substrat proteinleri

olarak etkisini gösterdikleri aminoasitlere göre serin/treonin fosfatazlar ve tirozin fosfatazlar olarak gruplanmaktadır. Bu enzimler katalitik ve regülatuar subuniteler tarafından yapılmıştır. Memeli hücrelerinin ana serin/treonin protein fosfatase katalitik subuniteleri 4 formdan oluşmaktadır; protein fosfatase 1 (PP1), protein fosfatase 2A (PP2A), protein fosfatase 2B (PP2B, kalsinörin) ve protein fosfatase 2C (PP2C). Bu, Cohen tarafından önerilen sınıflama sistemini temel almaktadır. PP1 ve PP2A'nın divalent katyonlara absölu gereksinimi yoktur, bunun yanında PP2B ve PP2C Ca^{+2} /calmodulin ve kısmen Mg^{+2} bağımlıdır. Okadaik asit (OKA), son zamanlarda bulunan bir tümör promoter'ı olup, PP1 için IC_{50} 'si 60-200 nM, PP2A için 1-10 nM arasında olan polietilendirli yağ asidi olup, bu doz farkı sayesinde PP1 ve PP2A ayırımında kullanılabilir. Calyculin A (Cal-A) PP1 için IC_{50} 'si 2 nM, PP2A için 1 nM olan bir spiroketal yağ asididir. PP2A'nın regülatuar subuniteleri saflaştırılmış ve klonlanmıştır, fakat PP1'in regülatuar subuniteleri hakkında daha az şey bilinmektedir. Üç farklı, fakat oldukça benzer, PP1 katalitik subunitesi %85-90 aminoasit sekansı cDNA klonlaması ile tanımlanmıştır (PP1-alfa, PP1-gamma , PP1-delta) ve geniş bir yaygınlıkta memeli dokularında sentez edilmektedir.

PP2A katalitik subunitesi (PP2A-C) genelde holoenzim olarak bulunmaktadır ve farklı B regülatuar subunitelerle heterotrimer oluşturmaktadır. A ve B regülatuar subunitelerinin PP2A-C'nin in vitro fosfatase aktivitesini şekillendirici olduğu gösterilmiştir. A, B, PP2A-C subuniteleri türler arasında yüksek derecede korunma göstermektedir . PP2A'nın regülatuar subunitelerinin substrat spesifitesi üzerindeki etkisi in vitro olarak açıkça gösterilmişse de , metabolizma, büyüme, farklılaşma ve gelişme üzerindeki her birinin rolü büyük oranda bilinmemektedir.

Kalsinörin (PP2B), birçok dokuda varlığı bilinen, temel olarak başlangıçta sinir dokusunda varlığı bilinen bir enzimdir. Memeli hücrelerinden elde edilen kalsinörin holoenzimi büyük 60 kD'luk katalitik subuniteler içeren heterotrimerik birleşkedir; kalsinörin A (CNA), kalsinörin B (CNB), ve kalmmodulin (17 kD'luk Ca^{+2} bağımlı protein). A subunitesi kalmmodulini bağlar , fakat B subunitesi Ca^{+2} 'nin 4 adet molekülüne bağlanır. Kalsinörin regülatuar subunitesi, CNB, FK506-immunofilin ve siklosporin A (CsA) komplekslerinde ana bileşiktir. Kalsinörin, kalmmodulin veya CNB eksikliğinde in vitro

koşullarda fosfataz olarak işlev görme yeteneğine sahip değildir. CNB ve kalmodulin sekansları ilişkili olsa da, bu iki proteinin herhangi biri diğerinin yokluğunu telafi edemez. Kalsinörin, IL-2 reseptör regülasyonunda görev alan NF-AT aktivasyonu ve proliferasyonunda gereklidir ve NF-KB moleküler değişiminde görev almaktadır.

Memeli hücrelerinde PP2C'nin iki izoenzimi (PP2C-alfa ve PP2C-beta) klonlanmıştır ve iki izoform %76 homoloji göstermektedir. Fakat, fizyolojik işlevleri hakkında çok az şey bilinmektedir. Embriyonik mezenkimal hücrelerin, MyoD1-uyarısına bağlı farklılaşmasında PP2C geni üretimi artmaktadır.

Monositik Farklılaşma ve Defosforilasyon Dinamikleri

Cal-A, PP1 ve PP2'nin güçlü inhibitörüdür ve, HL 60 hücrelerinin $1,25(OH)_2D_3$ bağımlı monositik farklılaşmasını artırmaktadır ve bu bulgu protein fosfatazların olaydaki rolünün kanıtıdır. $1,25(OH)_2D_3$ ile HL-60 hücrelerinin muamelesi, sitozolik PP1-benzeri aktivitede azalmaya yol açmaktadır ve eş zamanlı olarak zar ve nükleer bölümlerde PP1-benzeri aktivitede artışa yol açmaktadır. Sitozolik PP1-benzeri aktivitedeki azalma monositlerle ilişkili belirli bazı göstergelerin artmış üretimi ile paralellik göstermektedir. $1,25(OH)_2D_3$ tarafından indüklenmiş PP1-benzeri aktivitenin subsellüler dağılımı, temel olarak sitozolik PP1-gamma ve PP1-alfanın seçici translokasyonuna bağlı olmakla beraber PP1-delta ve PP2A dağılımı relatif olarak sabit kalmaktadır. PP1 aktivitesinin hücre içi dağılımı, HL-60 hücrelerinin farklılaşmasının düzenlenmesinin önemli bir ögesi olabilir. C-fos matür transkriptlerin uyarılması ve AP-1 aktivitesindeki artışın, $1,25(OH)_2D_3$ ile uyarılmış proliferasyonun inhibisyonu ve monositik farklılaşmada rolü olduğu düşünülmektedir. $1,25(OH)_2D_3$ 'nin HL-60 hücrelerinde c-myc mRNA üretiminde azalmaya yol açtığı gösterilmiştir. Ayrıca, nükleusta PP1 aktivitesinde artış, transkripsiyon faktörlerini uyarmakta ve başta $1,25(OH)_2D_3$ olmak üzere, diğer farklılaştırıcı ajanların reseptör ekspresyonunu arttırabilmektedir.

$1,25(OH)_2D_3$ ile uyarılmış HL-60 lösemik hücrelerinin monositik farklılaşması sırasında, sitozolik PP2C aktivitesinde artış olduğu ve bu artışa, PP2C protein ekspresyonundaki artışın eşlik ettiği gösterilmiştir. PP2C'nin up-regülasyonu monositlerle alakalı bazı belirli farklılaşma göstergelerinin artışı

ile ilişkilendirilebilir, fakat buna rağmen HL-60 hücre farklılaşmaları için önemli direkt hedefin ne olduğu henüz bilinmemektedir.

CsA ve FK 506 HL-60 hücrelerinin in vitro koşullarda proliferasyonunu uyarmıştır. CsA ve FK 506'nın aktivasyonu takiben, DNA sentezi ve hücre bölünmesi ortaya çıkmakta ve HL-60 hücreleri inhibe olmayan bir şekilde çoğalmaya devam etmektedir. Kalsinörin aktivitesi, HL-60 hücreleri, CsA veya FK 506 ile muamele edildiğinde güçlü olarak inhibe olmaktadır. Bu konsantrasyonlar bu ilaçların terapötik plazma düzeylerine denk gelmektedir ve T-hücre aktivasyonunu inhibe etmek için gerekli konsantrasyonlara, FK 506 daha güçlü olmak üzere, benzerdir. Bizim verilerimiz CsA ve FK 506'nın HL-60 hücre proliferasyonuna olumlu etkilerinin kalsinörin inhibisyonu ile olduğunu göstermektedir. Kalsinörin fosfataz aktivitesi HL-60 hücrelerinin retinoik asit ile uyarılmış granulositik farklılaşması sırasında up-regüle olabilir ve CsA ve FK 506 kullanımı bu etkiyi azaltmaktadır. Kalsinörin temel olarak myeloid hücre proliferasyonunun sinyal iletiminin inhibitör parçasıdır.

Granulositik Farklılaşma ve Protein Fosfatazlar

Kültürde lösemik HL 60 hücrelerinde ATRA granulositik farklılaşmayı uyarır ve akut promyelositik lösemide yüksek remisyon düzeyleri sağlamada klinik olarak etkilidir. Bizim sonuçlarımız, PP1 enziminin ATRA ile uyarılmış HL 60 hücrelerinin granulositik farklılaşmasında değişmediğini, buna karşın ATRA ile uyarılmış farklılaşmada PP2A aktivitesinin azaldığını ortaya koymaktadır. Biz, granulositik farklılaşma sırasında PP2A-C nin belirgin olarak azaldığını, A ve B-alfa regülatuar subunitelerinin ekspresyonlarının değişmediğini gösterdik. ATRA ile muamele, PP2A-C-beta'nın mRNA üretiminde belirgin azalmaya yol açmaktadır. HL 60 hücrelerindeki ATRA ile uyarılmış granulositik farklılaşma nükleer retinoik asit reseptörü aracılığı ile yönlendirilmektedir. Retinoik asit reseptör ailesi transkripsiyon faktörleri tiroid hormon süper-ailesinin üyesidir ve belirli hedef genlerin transkripsiyonunu düzenleyen DNA-bağlayıcı ve retinoik asit bağlayıcı bölgelere sahiptir. ATRA PP2A gen düzenlemesine ya direkt olarak ya da PP2A geninin transkripsiyonunu aktive ederek, veya indirekt olarak, transkripsiyon faktörlerini kodlayan genlerin üretimini değiştirerek etkileyebilir.

Metil-Prednisolon ile Uyarılmış Farklılaşma ve Protein Fosfatazlar

PP1 ve PP2A inhibitörleri (OKA ve CalA) granulositik-monositik farklılaşma sırasında HL 60 ve K 562 hücrelerini etkileyerek ileri farklılaşmaya yol açmaktadır. Bu farklılaşma olayında, metilprednisolon, PP2A regülatuar subunitelerinin up-regülasyonuna ve her iki hücre hattında sitozolik fraksiyonda PP2A fosfataz aktivitesinde artışa yol açmaktadır.

Arsenik Trioksit ile Uyarılmış Farklılaşma ve Protein Fosfatazlar

PP1 ve PP2A inhibitörlerinin ve PP2B inhibitörünü (Siklosporin A) kullanarak yapılan deneyler yukarıda değinilen fosfatazların arsenik ile uyarılmış lösemik farklılaşmada herhangi bir rol almadığını göstermiştir.

ATRA, 1,25(OH)₂D₃ ve diğer ajanların farklılaştırıcı etkilerini sadece serine/threonine protein fosfataz sistemi ile olan etkileşimlerine bağlamak doğru değildir. Protein fosfatazların modülasyonu yanında, protein kinaz C ve protein kinaz C izoformlarının (alfa, beta ve gamma), ATRA ve/veya DMSO ile uyarılmış HL-60 hücrelerinin granulositik farklılaşmasında arttığı gösterilmiştir. HL-60 hücrelerinin 1,25(OH)₂D₃ ile uyarılmış monositik farklılaşmada hem protein kinaz C aktivitesi hem de protein kinaz C-alfa ve protein kinaz C-beta mRNA düzeylerindeki artışla beraberdir. cAMP-bağımlı protein kinaz aktivasyonu, TPA (forbol ester türevleri), ATRA veya DMSO ile HL 60 hücrelerinin farklılaşmasında rol almaktadır. Monositik ve granulositik uyarıcılar protein kinazları hedef molekül olarak paylaşırsa da, protein kinazların modüle edilmesi ve aktivasyonu granulositik ve monositik fenotiplere terminal farklılaşmayı ortaya çıkaran mekanizmaları açıklamak için yetersizdir. Fakat, protein fosfatazların modüle edilmesi kritik bazı substratların fosforilasyonunu düzenlemekte ve HL-60 hücrelerinin hangi fenotipe farklılaşacağını yönlendirmede önemli bir rol almaktadır. PP1, PP2A, PP2B, PP2C'nin in vivo olarak birçok işlevi düzenlediği, pekçok metabolik yolağı, protein sentezini, DNA çoğalması ve hücre siklusunu kontrolde rol aldığı düşünülmektedir.

Kaynaklar

1. Grander D, Sangfelt O, Erickson S, How does interferon exert its cell growth inhibitory effect? *Eur J Haematol* 1997; **59**: 129
2. Hague SJ, Williams BR. Signal transduction in the interferon system. *Semin Oncol* 1998; **25**: 14

3. Cohen P. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* 1989; **58**: 453.
4. Uzunoglu S, Uslu R, Tobu M, Saydam G, Terzioğlu E, Buyukkececi F, Omay SB. Augmentation of methylprednisolone-induced differentiation of myeloid leukemia cells by serine/threonine protein phosphatase inhibitors. *Leuk Res* 1999; **23**: 507.
5. Aydın HH, Selvi N, Saydam G, Tobu M, Uzunoglu S, Uslu R, Buyukkececi F, Omay SB. Up-regulation of serine/threonine protein phosphatase type 2A regulatory subunits during methylprednisolone-induced differentiation of leukaemic HL-60 cells. *Clin Lab Haem* 2000; **22**:271.
6. Yuksel S, Saydam G, Uslu R, Sanli UA, Terzioğlu E, Buyukkececi F, Omay SB. Arsenic trioxide and methylprednisolone use different signal transduction pathways in leukemic differentiation. *Leuk Res* 2002; **26**: 391
7. Selleri C, Sato T, Del Vecchio L, Luciano L, Barrett AJ, Rotoli B, Young NS, Maciejewski JP. Involvement of Fas-mediated apoptosis in the inhibitory effects of interferon- α in chronic myelogenous leukaemia. *Blood* 1997; **89**: 957.
8. Mumby MC, Walter G. Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. *Physiol Rev* 1993; **73**: 673.
9. Hicsönmez G, Erdemli E, Tekelioğlu M, et al.(1996) Morphologic evidence of apoptosis in childhood acute myeloblastic leukemia treated with high-dose methylprednisolone. *Leuk Lymphoma* 22(1-2):91-96
10. Tawara I, Nishikawa M, Morita K, Kobayashi K, Toyoda H, Omay SB, Shima H, Nagao M, Kuno T, Tanaka C, Shirakawa S. Down-regulation by retinoic acid of the catalytic subunit of protein phosphatase type 2A during granulocytic differentiation of HL 60 cells. *FEBS Lett* 1994;321(2,3):224
11. Omay SB, Ogasawara H, Toyoda H, Nakai K, Shima H, Nagao M, Mumby MC, Shiku H, Nishikawa M. Translocation of protein phosphatase 1 catalytic subunits during 1,25-dihydroxyvitamin D3-induced monocytic differentiation of HL 60 cells. *Cancer Res* 1995;55(4):774.
12. Uslu R, Sanli UA, Sezgin C, Karabulut B, Terzioğlu E, Omay SB, Goker E. Arsenic trioxide-mediated cytotoxicity and apoptosis in prostate and ovarian carcinoma cell lines. *Clin Cancer Res.* 2000 Dec;6(12):4957-64
13. Molecular Biology of The Cell (Textbook). Fourth Edition, Eds. By Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter B. Garland Science, Taylor and Francis Group. 2002, Chapter 15: Cell Communication,
14. Signal Transduction: Modular Texts in Molecular and Cell Biology 1. Edited by Heldin CH and Purton M. Chapman and Hall. First Edition 1996.
15. Sanli UA, Uslu R, Karabulut B, Sezgin C, Selvi N, Aydın HH, Saydam G, Goker E, Omay SB. Alterations in the activity and expression of serine/threonine protein phosphatases during all trans retinoic acid-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncol Rep.* 2003 Nov-Dec;10(6):2083-8

16. Saydam G, Hakan Aydın H, Sahin F, Selvi N, Oktem G, Terzioglu E, Buyukkececi F, Omay SB. Involvement of protein phosphatase 2A in interferon-alpha-2b-induced apoptosis in K562 human chronic myelogenous leukemia cells. *Leuk Res* 27(8): 709-17, 2003
17. Saydam G, Aydın HH, Sahin F, Kucukoglu O, Erciyas E, Terzioglu E, Buyukkececi F, Omay SB. Cytotoxic and inhibitory effects of 4,4'-dihydroxy chalcone (RVC-588) on proliferation of human leukemic HL-60 cells. *Leuk Res* 27(1):57-64, 2003
18. Sanli UA, Uslu R, Karabulut B, Sezgin C, Saydam G, Omay SB, Goker E. Which dosing scheme is suitable for the taxanes? An in vitro model. *Arch Pharm Res* 25(4):550-5, 2002
19. Omay SB, Saydam G, Aydın HH, Selvi N, Öktem G, Şanlı UA, Töbü M, Büyükkececi F. "Potential Involvement of Calcineurin in Regulating the State of Differentiation and Apoptosis of HL-60 Cells During Methylprednisolone-Treatment". *Turkish Journal of Haematology* 20(3), 143-151 (20)
20. Doğan AL, Güç D. "Sinyal ileti mekanizmaları ve kanser". *Hacettepe Tıp Dergisi* 35;34-42, 2004
21. Ravandi F, Talpaz M, Estrov R. "Modulation of cellular signalling pathways: Prospects for targeted therapy in hematological malignancies". *Clin Can Res* 9;535-550, 2003
22. Plataniotis LC. "Map kinase signalling pathways and hematologic malignancies". *Blood* 101(12);4667-4679, 2003
23. Benekli M, Baer MR, Baumann H, Wetzler M. "Signal transducer and activator of transcription proteins in leukemias". *Blood* 101(8);2940-2954, 2003
24. Martinez-Mancilla M, Zafra G, Reynoso-Gomez E, et al. "A closer look at specific therapeutic strategies in leukemia". *Leuk Lymphoma* 45(9);1767-1773, 2004

Kısaltmalar

IFN	İnterferon
JAK	Janus Kinase
STAT	Signal transducer and activator of transcription
XIAP	X linked inhibitor of apoptosis
CDK	Cyclin dependent kinase
MEK	Mitogen activated protein/extracellular signal regulated kinase kinase
ERK	Extracellular signal regulated kinase
Grb-2	Growth factor receptor binding protein 2
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor
SCOS	Suppressor of cytokine signalling
MAPK	Mitogen activated protein kinase
PI3K	Phosphatidylinositol 3' kinase
PIAS	Protein inhibitor of activated stat
JNK	c-jun NH2-terminal kinase
NF-κB	Nuclear factor kappa beta
IκB	Inhibitor of kappa beta
PTEN	Protein phosphatase and tensin homologue deleted from chromosome 10
PDGFR	Platelet derived growth factor receptor
NPM	Nucleophosmin
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
TK	Tyrosine kinase
HDAC	Histone deacetylase
IAP	Inhibitor of apoptosis
PS-341	Bortezomib
CDKI	Cyclin dependent kinase inhibitor
DMSO	Dimethyl sulfoxide
ATRA	All-trans retinoic acid
SAPK	Stress-activated protein kinase
PKB	Protein kinase B
FLT3R	Fms-like tyrosine kinase 3 receptor