

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**K-562 HÜCRE SERİLERİNDE İMATİNİB'E KARŞI
GELİŞEN DİRENÇTE ROL OYNAYAN GEN İFADE
DEĞİŞİMLERİNİN SAPTANMASI**

Yalda HEKMATSHOAR

**TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU**

2013-ANKARA

KABUL ve ONAY

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------------|
| KABUL ve ONAY | ii |
| İÇİNDEKİLER | iii |
| ÖNSÖZ | vi |
| SİMGELER ve KISALTMALAR | vii |
| ŞEKİLLER | ix |
| 1.GİRİŞ | 1 |
| 1.1. Lösemi | 1 |
| 1.2. Kronik Miyeloid Lösemi (KML) | 2 |
| 1.2.1. KML'nin Patobiyolojisi | 2 |
| 1.2.2. KML'nin Klinik Özellikleri | 4 |
| 1.3. BCR-ABL Proteini | 4 |
| 1.4. İlaç Tedavisindeki Direnç Mekanizmaları | 5 |
| 1.4.1. ABC Süperailisi | 8 |
| 1.4.1.1. MDR1/P-gp (ABCB1) | 9 |
| 1.4.1.2. LRP (Akciger Rezistans Protein) | 9 |
| 1.4.1.3. MRP1 (ABCC1) | 10 |
| 1.4.1.4. BCRP (ABCG2) | 10 |
| 1.4.2. SLC22A1/OCT-1 Taşıyıcı İçe Alım Protein | 11 |
| 1.5. KML Tedavisinde İmatinib Mesilat | 12 |
| 1.5.1. BCR-ABL Bağımlı Direnç Mekanizması | 14 |
| 1.5.1.2. BCR-ABL Füzyon Proteininin Yüksek Seviyede İfadesi | 16 |
| 1.5.2. BCR-ABL Bağımsız Mekanizmalar | 16 |
| 1.5.2.1. İlaç taşınmasındaki Defektler | 16 |
| 1.5.2.2. Lösemik Kök Hücre Sessizliği | 18 |
| 1.6. Hücrede Ölüm Yolları | 19 |
| 1.6.1. Apoptoz | 19 |
| 1.6.2. Otofajinin Moleküler Mekanizması | 21 |
| 1.6.2.1 Başlangıç | 22 |

| | |
|--|-----------|
| 1.6.2.2. Otofagozom Oluşumu | 22 |
| 1.6.2.3. Olgunlaşma ve Yıkım | 24 |
| 1.7. Kanserde Otofajinin Paradoksal Etkisi | 25 |
| 1.8. KML ve Otofajinin İlişkisi | 26 |
| 1.9. DNA Tamir Mekanizmaları | 28 |
| 2. GEREÇ VE YÖNTEM | 31 |
| 2.1. Hücre Kültürü Deneyleri | 31 |
| 2.1.1. K- 562 Hücre Hattının Sıvı Azottan Çözdürülmesi | 31 |
| 2.1.2. İmatinib Mesilat Dirençli K-562r Hücre Hattının Kültürü | 31 |
| 2.1.3. K-562s Hücre Hattının ve K-562r Hücre Hattının Pasajlanması | 31 |
| 2.2. RNA İzolasyonu | 32 |
| 2.2.1. Agaroz Jel Elektroforezi | 33 |
| 2.3. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time PCR) | 34 |
| 2.4. İstatistiksel Analiz | 38 |
| 2.5. Akım Sitometri ile Apoptozis Tayini | 38 |
| 2.6. Dizi Analizi | 39 |
| 2.7. MDC (Monodansylcadaverine) Boyama Yöntemiyle Otofagozomların Saptanması | 40 |
| 3. BULGULAR | 41 |
| 3.1. K562s ve K562 r Hücrelerin Mikroskopik Görüntüleri | 41 |
| 3.2. RNA Bütünlük, Kalite ve Miktar Tayini | 41 |
| 3.3. Eş Zamanlı PCR (Real Time PCR, <i>qRT-PCR</i>) Bulguları | 42 |
| 3.4. Direnç Genlerin İmatinib Uygulanması Sonrası İfadelerindeki Değişim | 45 |
| 3.5. Apoptotik Genlerin İmatinib Uygulanması Sonrası İfadelerindeki Değişim | 47 |
| 3.6. Otofajik Genlerin İmatinib Uygulanması Sonrası İfadelerindeki Değişimler | 48 |
| 3.7. DNA Tamir Mekanizmasındaki Genlerin İmatinib Uygulanması Sonrası İfadelerindeki Değişimler | 49 |
| 3.8. Kök Hücre Karakterinden Sorumlu Genlerin İmatinib Uygulanması Sonrası İfadelerindeki Değişimler | 50 |

| | |
|---|-----------|
| 3.9. Akım Sitometri Analizi ile Apoptozis Tayini | 51 |
| 3.10. Ölü ve Canlı Hücre Oranlarının Belirlenmesi | 52 |
| 3.11. Annexin V İle Boyanan Hücrelerin Floresans Mikroskop Görüntüleri | 53 |
| 3.12. MDC (Monodansylcadaverine) Boyama Yöntemiyle Otofagozomların Saptanması | 54 |
| 3.13. Dizi Analiz yöntemiyle Mutasyon Analizi | 55 |
| 4. TARTIŞMA | 57 |
| 4.1. İmatinib'in Taşıyıcı Genler Üzerindeki Etkisi | 57 |
| 4.2. İmatinib Direncinde Otofajik ve Apoptotik Genlerin Rolü | 61 |
| 4.3.İmatinib'in DNA Tamir Genleri Üzerindeki Etkisi | 64 |
| 4.4. İmatinib'in Hücrelerde Kök Hücre Özelliği Kazanmasındaki Etkisi | 65 |
| 5. SONUÇ VE ÖNERİLER | 67 |
| ÖZET | 69 |
| SUMMARY | 70 |
| KAYNAKLAR | 71 |
| ÖZGEÇMİŞ | 82 |

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında, 18 ay boyunca K562 hücrelerine (K562s) artan dozlarda İmatinib uygulanmış ve ilaç konsantrasyonunun yavaş yavaş artırılmasıyla, İmatinibe karşı direnç geliştirilerek, 5µM İmatinibe karşı dirençli hücreler (K562r) elde edilmiştir. *In-vitro* İmatinib direnci gelişimi süresince, BCR-ABL'den bağımsız yolaklardaki gen ifade değişimleri incelenerek moleküler mekanizmalar aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Öncelikle bana bilim yapmayı sevdiren, bu yolda benden hiç birşeyi esirgemeyen ve bu tezi savunacağım günün hayalini birlikte kurduğum canım babama çok teşekkür ediyorum, kader bu hayali gerçekleştirmemize izin vermedi ama onun varlığını tanrının bir meleği olarak hep yanımda hissediyorum ve bu tezi ona ithaf ediyorum.

Tezin oluşturulması sırasında engin bilgi ve yardımlarıyla beni başından sonuna kadar yönlendiren, bilimsel çalışmanın gereklerini üstün hoşgörü anlayışıyla bana öğreten, hiçbir zaman manevi desteğini eksik etmeyen değerli Hocam Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU'na,

Tez çalışmamda kullandığım teknikleri öğrenmemde büyük emeği geçen, deneylerin her aşamasında büyük fedakarlıkla katkı veren Araştırma Görevlisi Dr. Tülin ÖZKAN'a teşekkür ederim.

Deneylerimin her aşamasında yardımlarını benden esirgemeyen Dr. Buket ALTINOK ZAİM'e, Dr. Aynur KARADAĞ'a teşekkür ederim.

3 yıldır içinde olduğum, hayatımın iyi kötü her anını, mutluluklarımı üzüntülerimi paylaştığım, çalışmalarım sırasında hiçbir yardımı ve desteği esirgemeyen başta Bio. Sibel ARAT ve Bio. Meral KUTLUTÜRK'e ve tüm Tıbbi Biyoloji Ailesine sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca, her adımında yanımda olan ve bana her türlü desteği vererek bu günlere gelmemi sağlayan, haklarını asla ödeyemeyeceğim vefakar anneme ve ikinci annem dediğim ablama ve sevgili abime sonsuz teşekkür ve sevgilerimle...

SİMGELER ve KISALTMALAR

| | |
|-------------------|--|
| ADP | Adenozin tri fosfat |
| AKT | Serin/Threonin protein kinaz |
| ALL | Akut lenfoid lösemi |
| AML | Akut Myeloid Lösemi |
| Bcl-2 | B-cell Lenfoma 2 |
| BCR-ABL | Breakpoint cluster region/V-abl Abelson |
| BCRP | Breast-cancer-related protein |
| Bid | BH3 interacting domain death agonist |
| Bim | Bcl-2 interacting mediator of cell death |
| BP | Blast phase (Blast faz) |
| cDNA | complementary DNA (Komplementer DNA) |
| CT | Eşik siklus |
| dH ₂ O | Distile su |
| Dk | Dakika |
| DNA | Deoksiribonükleik Asit |
| ERK | Ekstrasellüler Sinyal-Regüle Kinaz |
| EtOH | Etil alkol |
| FBS | Fetal Bovin serum |
| FDU | Fluorodeoksi Uridin |
| G | Gram |
| GTG | Giemsa/Tripsin |
| KCl | Potasyum Klorür |

| | |
|----------|--|
| KD | Kinase domain |
| KML | Kronik Myeloid Lösemi |
| LYN SRC | v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog/v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian) |
| MAPK | Mitogen-activated protein kinase |
| MDR | Multidrug resistance |
| mM | Mili Molar |
| MRP1 | Multidrug resistance protein 1 |
| NaOH | Sodyum hidroksit |
| OCT-1 | Organic cation transporter-1 |
| PBS | Phosphor Buffer Saline |
| PZR | Polimeraz zincir reaksiyonu |
| Ph | Philadelhia Kromozomu |
| RNA | Ribonükleik Asit |
| RT-PCR | Revers transkripsiyon -PCR |
| Sn | Saniye |
| Taq Pol. | Taq polimeraz |
| TBE | Tris/Borate/EDTA |
| TKI | Tyrozine kinaz inhibitör |
| μ l | Mikro Litre |
| μ M | Mikro Molar |

ŞEKİLLER

| | |
|---|----|
| Şekil 1. 1. Löseminin Oluşum Mekanizması | 1 |
| Şekil 1. 2. Philadelphia kromozomu | 2 |
| Şekil 1. 3. BCR-ABL'in tetiklediği KML oluşumuna karışan mekanizmalar. | 3 |
| Şekil 1. 4. BCR-ABL Proteini | 4 |
| Şekil 1. 5. Kanser hücrelerinde ilaç direncine neden olan mekanizmalar | 6 |
| Şekil 1. 6. Hücredeki çoklu ilaç direncine neden olan mekanizmalar. | 7 |
| Şekil 1. 7. İlaçların 3 yolla hücrenin içerisine alınması | 7 |
| Şekil 1. 8. İmatinib'in kimyasal şekli. | 12 |
| Şekil 1. 9. İmatinib ve Nilotinib'in etki mekanizması | 13 |
| Şekil 1. 10. KD mutasyonları, A: ATP ve fosfat bağlanma bölesi, B:İmatinib bağlanma bölgesi, C: katalitik bölge, A: ABL Kinaz aktivasyon loop | 15 |
| Şekil 1. 11. Otofaji yolağının aşamaları | 22 |
| Şekil 1. 12. BCL-2'nin otofajideki rolü | 23 |
| Şekil 3. 1. a) K562s ve b) K562r hücrelerin mikroskopik görüntüleri | 41 |
| Şekil 3. 2. K562s ve K562r hücrelerden izole edilen RNA'ların %1'lik Agaroz Jel görüntüsü | 42 |
| Şekil 3. 3. MDR amplifikasyon eğrisi grafiği | 43 |
| Şekil 3. 4. Hprt amplifikasyon eğrisi grafiği | 43 |
| Şekil 3. 5. MDR erime eğrisi | 44 |
| Şekil 3. 6. Hprt erime eğrisi | 44 |
| Şekil 3. 7. Direnç genlerinin ifadelerindeki değişim | 45 |
| Şekil 3. 8. Apototik genlerin ifadelerindeki kat artışları | 47 |
| Şekil 3. 9. Otofajik genlerin ifadelerindeki kat artışları | 48 |
| Şekil 3. 10. DNA tamir mekanizmasındaki genlerin ifadelerindeki kat artışları | 49 |
| Şekil 3. 11. Kök hücrede kendini yenilemeden sorumlu genlerin ifadelerindeki kat artışları. | 50 |
| Şekil.3.12. Sırasıyla 0.6µM ve 5 µM imatinib dirençli hücrelerin akım sitometri sonuçları. | 51 |

| | |
|---|----|
| Şekil.3.13. Tripan mavisi boyanmasıyla ölü ve canlı hücrelerin belirlenmesi | 52 |
| Şekil.3.14. Annexin V ile boyanan hücrelerin floresans mikroskop görüntüleri | 53 |
| Şekil.3.15. MDC (Monodansylcadaverine) boyama yöntemiyle otofagozomların saptanması | 54 |
| Şekil.3.16. Dizi analizi sonuçları | 56 |

ÇİZELGELER

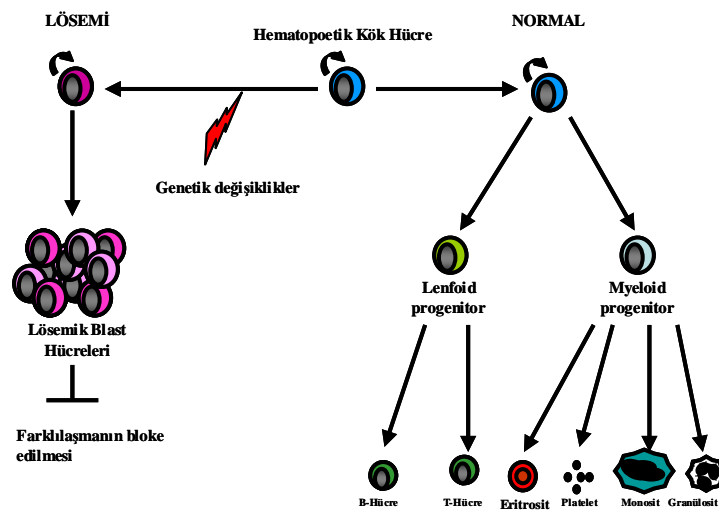
| | |
|---|----|
| Çizelge 1. 1. ABC süper aile üyeleri ve yapıları. | 8 |
| Çizelge 1. 2. Non-Pgp/ ilaç direncinde Mdr1 mekanizmaları | 9 |
| Çizelge 1. 3. ABC süper ailesi üyeleri ve onların substratları ve inhibitörleri | 11 |
| Çizelge 1. 4. KML hücrelerinde çeşitli ilaç uygulamalarından sonra otofajinin indüklenmesi | 27 |
| Çizelge 2. 1. Hücre kültüründe kullanılan malzeme ve gereçler | 32 |
| Çizelge 2. 2. c-DNA sentez protokolü | 35 |
| Çizelge 2. 3. qRT-PCR protokolü | 37 |
| Çizelge 3. 1. İzole edilen RNA örneklerinin spektrofotometrik okumaları | 42 |

1.GİRİŞ

1.1. Lösemi

Kan hücrelerinde ya da öncülerinde mutasyon ve/veya kromozomal translokasyon meydana gelmesi sonucunda ortaya çıkan kontrol dışı çoğalmalar ile karakterize edilen hematolojik malignansi olarak tanımlanmaktadır (Crans ve ark., 2001). Lösemik hücreler, kanser kök hücre kaynaklıdır, mutasyona veya kromozomal anomaliye sahiptirler, genetik kararsızlık, çoğalma, farklılaşma ve apoptozis gibi önemli hücresel fonksiyonlarda bozulma ve özellikle farklılaşmadan kaçış gösterirler. Lösemik hücreler, büyüme avantajı kazanmışlardır, klonal baskınlık ve yayılım gösterirler.

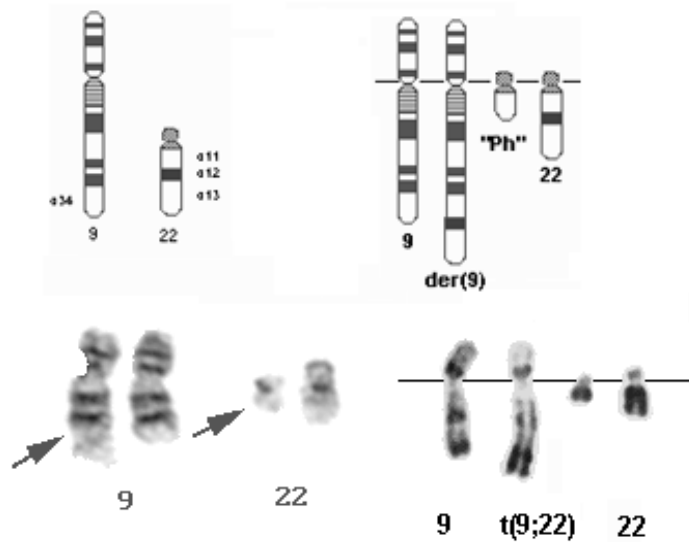
Lösemiler; hematopoetik kök hücrelerden aldıkları kökene göre, myeloid ve lenfoid lösemi olmak üzere ikiye ayrılır. Bunlar da kendi içerisinde akut ve kronik faza göre, akut lenfoid (ALL), akut myeloid (AML), kronik lenfoid (KLL), kronik myeloid lösemiler (KML) olarak gruplandırılırlar (Beksaç ve ark., 1997).



Şekil 1. 1. Lösemilerin Oluşum Mekanizması

1.2. Kronik Miyeloid Lösemi (KML)

Kronik Miyeloid Lösemi (KML) ilk kez bağımsız olarak 1845 yılında patalojist Bennet, Cragie ve Virchow tarafından tanımlanmıştır (Bennet ve ark.,1845; Cragie, 1845; Virchow, 1845). KML hastalığında Philadelphia (Ph) kromozomunun varlığı bir genetik anomali olarak 1960 yılında Hungerford & Nowell tarafından bulunmuştur. Ph kromozomu tüm KML hücrelerinde bulunmaktadır. 1973 yılında Janet Rowley's ve arkadaşları Ph kromozomun varlığını onaylayıp ve bu küçük kromozomun, t (9;22) (q34;q11) kromozomların arasındaki resiprokal translokasyon sonucunda oluştuğunu bulmuşlardır.

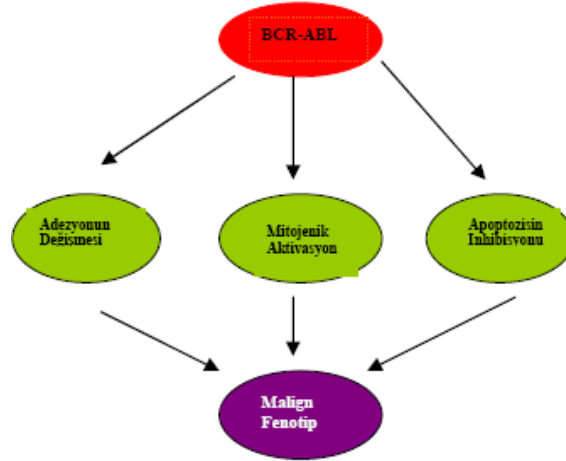


Şekil 1. 2. Philadelphia kromozomu

1.2.1. KML'nin Patobiyolojisi

KML sitogenetik anomaliler ve moleküler mekanizmaları nedeniyle en iyi tanımlanan hastalıklardan birisidir. KML belirli ve özel karyotip anomalisine sahip ilk insan hastalığıdır, KML vakalarının sitogenetik analizinde, % 90'dan fazlasında Philadelphia (Ph) kromozomu tespit edilmiştir. Ph kromozomu (9:22) translokasyonu sonucunda BCR-ABL füzyon onkogenini oluşturmuştur (Rowley, 1973).

BCR-ABL onkoproteini, devamlı aktif olan bir tirozin kinazdır, bu tirozin kinaz hücre içi yolları aktive ederek anormal hücre yapışmasına, proliferasyonun artmasına ve apoptozun inhibisyonuna neden olmaktadır (Yuan ve ark., 2007; Deininger ve ark., 2000; Lugo ve ark., 1990). Blastik faza giren KML hastalarında ek sitogenetik anormallikler gelişir.



Şekil 1. 3. BCR-ABL'ın tetiklediği KML oluşumuna katılan mekanizmalar.

KML biyolojik ajan interferon alpha ($INF-\alpha$) ile tedavi olan ilk neoplastik hastalıklar arasında yer almaktadır, $INF-\alpha$ lösemik klonların oluşumunun baskılanması ve hastanın hayatta kalma süresinin artmasına neden olmaktadır (Talpaç ve ark.,1987). KML ayrıca İmatinib mesilat (STI571, İmatinib, Glivec® veya Gleevec®, Novartis, Basel, Switzerland) tedavi olan ilk neoplastik hastalıklardan birisidir. İmatinibin KML hastalığındaki başarılı etkisi bu hastalığın tedavisinde yeni bir dönemin açılmasına neden olmuştur.

KML, tüm lösemilerin %15 kadarını oluşturur. Yıllık KML insidansı popülasyonda 100.000 de 1-2 vaka şeklinde gerçekleşir. Erkeklerde daha sıktır. Ortalama görülme yaşı 45-55 yaşları olarak saptanmıştır. KML İnsidansı yaşla artış gösterir, hastaların %30'u 60 yaş üstündedir. KML vakaların %3'ü çocukluk çağında görülür (Jaffe ve ark., 2001; Ishihara ve ark., 1983).

1.2.2. KML'nin Klinik Özellikleri

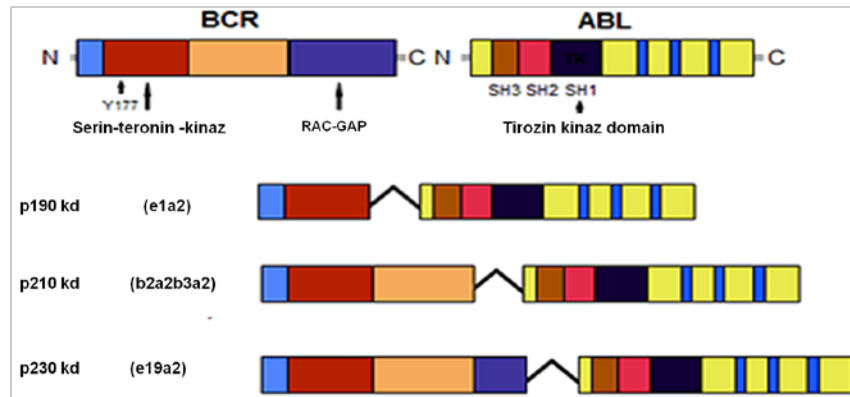
KML, hematopoetik kök hücrelerinin klonal bir hastalığıdır. Kemik iliğinde aşırı miyeloid hiperplazi, çevre kanında olgun miyeloid hücrelerden oluşan yüksek lökosit sayısı (bazofili ile birlikte) ile karakterizedir. KML'nin klinikopatolojik seyri;

1. CP (kronik faz) üç ile altı yıl sürmektedir,
2. AP (akselere faz)
3. BC (blastik faz) sonuncu ve kısa süreli bir aşamadır (Faderl ve ark.,1999; Sawyers ve ark.,1999).

1.3. BCR-ABL Proteini

BCR-ABL geni, 9. kromozomun q34'de yer alan ABL ve 22. kromozomun q11'deki BCR genlerinin füzyonu sonucunda oluşmaktadır. Yapılan analizlere göre BCR-ABL transkriptinin değişik büyüklüklerde olduğu ve 3 izoform protein ürününe (p190, p210 ve p230) dönüştüğü bulunmuştur (Clark ve ark., 1988; Hermans ve ark.,1987) (Şekil.1.4).

İnsanlarda, her üç izoformdan biri belli lösemi tipiyle ilişkilidir. P190 tipi B-ALL tipinde, p210 KML ve p230'da nötropenik KML'de daha çok gözlenmiştir (Pane ve ark., 1996).



Şekil 1. 4. BCR-ABL Proteini

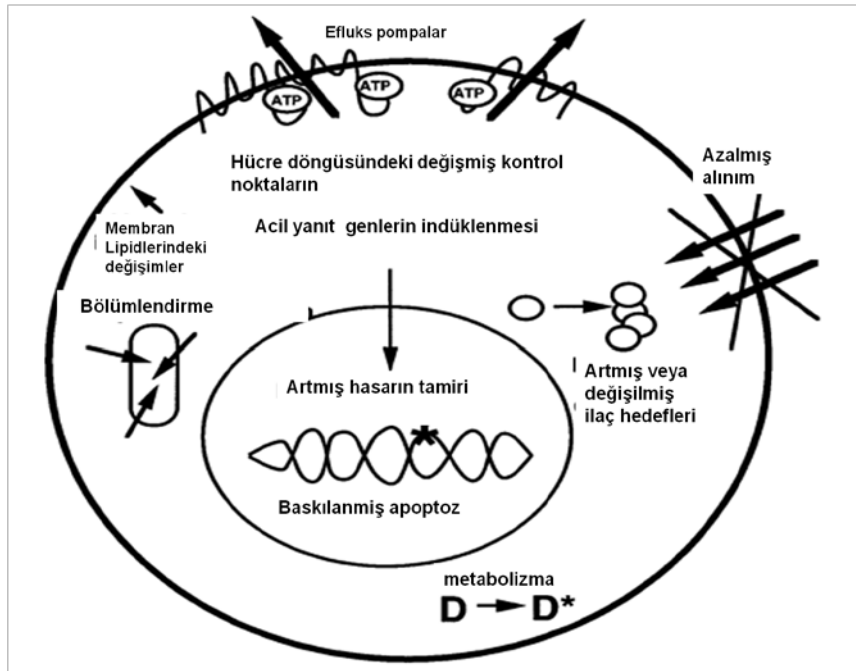
BCR-ABL füzyon geninin ürünü olan BCR-ABL, yapısal olarak aktif bir tirozin kinazdır ki buda KML hastalığının patogeneğinde önemli rol oynamaktadır (Yuan ve ark., 2007).

1.4. İlaç Tedavisindeki Direnç Mekanizmaları

Kemoterapi, kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Tümör hücreleri kemoterapi tedavisinin ilk aşamasında olumlu yönde cevap vermektedirler ancak sonraki aşamalarda bu hücrelerde ilaca karşı direnç gelişmektedir. İlaçların kimyasal bileşenlerine ve hücre içi farklı mekanizmalara bağlı olarak, bu hücrelerde ilacın toksik etkisinden kaçış gözlenmektedir. (Fu-Shing Liu, 2009). Tedavide ilaca karşı oluşan dirençte çeşitli faktörlerin etkisi vardır. Hastalar arasındaki bireysel farklılıklar ve hatta aynı tümör dokusundan alınmış somatik hücrelerin genetik ve epigenetik farklılıkları bu direnç oluşumunda etkilidir. (Fu-Shing Liu, 2009) Normal hücrelerin ilaca gösterdikleri cevap aynıdır, oysa kanser hücrelerinin her biri ilaca farklı yanıt vermektedir (Michael ve Gottesman, 2002).

Kanser hücrelerinde ilaç direncine neden olan mekanizmalar aşağıdaki gibidir (Şekil 1.5):

1. Hücre yüzeyinde bulunan ve ilacın taşınması ve alımını sağlayan reseptörlerin kaybı, ilacın düşük alımına, hücre içi birikimine veya ilacın hücre dışına pompalanmasına neden olmaktadır.
2. İlacın hedefindeki mutasyonlar sonucu değişiklikler meydana gelmektedir .
Örneğin İmatinib tedavisinde bu durum gözlenmektedir.
3. DNA tamir mekanizmasının artması görülmektedir.
4. İlaç metabolizmasındaki meydana gelen değişiklikler, ilacın biyoaktivasyonunun azalmasına ve fazla salgılanan metabolik enzimler tarafından inaktive olmasına yol açmaktadır.

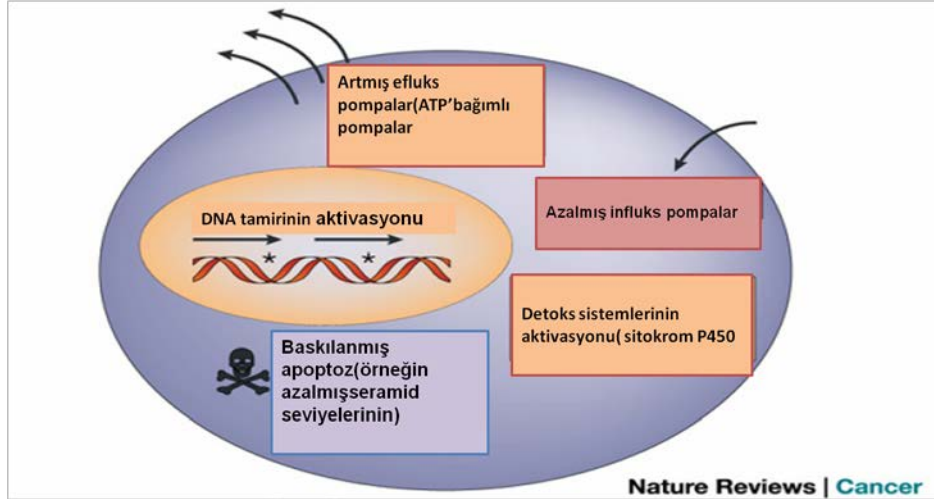


Şekil 1. 5. Kanser hücrelerinde ilaç direncine neden olan mekanizmalar (Michael ve Gottesman, 2002)

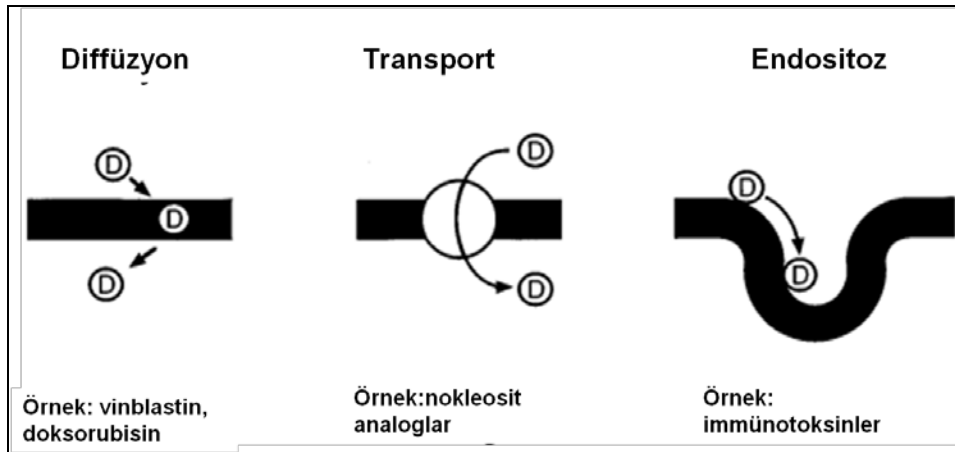
Bazı durumlarda, farklı mekanizmalarla hücre içerisine birden çok ilaç birlikte verilerek tedavinin daha etkili olması sağlanmaktadır. Bu tür çoklu tedavilerde zamanla hücrelerde değişik direnç mekanizmaları devreye girmektedir ve eşzamanlı olarak birbirinden bağımsız birçok ilaca karşı direnç gelişmektedir. Bu olaya MDR (multi drug resistance), çoklu ilaç direnci denir.

Çoklu ilaç direncini (MDR) oluşturan mekanizmalar:

- Hücre içine ilaç alımının azalması,
- Hücre dışına ilaç atılımının artması,
- Artmış DNA tamiri,
- Artmış ilaç metabolizması/ detoksifikasyonu,
- Azalmış apoptoz.



Şekil 1. 6. Hücredeki çoklu ilaç direncine neden olan mekanizmalar.



Şekil 1. 7. İlaçların 3 yolla hücrenin içerisine alınması (Michael ve Gottesman 2002)

Hücre yüzeyinde bulunan iki farklı taşıyıcı protein, tümör hücrelerindeki ilaca direnç mekanizmasından sorumludurlar.

ABC (ATP Bağlayıcı Kaset) Taşıyıcı Protein Ailesi: Transmembran proteinleri olup, enerjiye bağımlı olarak çalışırlar. Hücrede taşımaya aracılık eden proteinler ATP ile çalışan pompalardır.

Çözünen Madde Taşıyıcı Süperailisi: Kanser tedavisinde kullanılan ilaçların hücreler tarafından alınımını sağlamaktadır. Bu proteinlerin fonksiyonlarındaki

azalma, hücrelerin ilaca karşı direnç göstermesine neden olmaktadır (Fu-Shing Liu, 2009).

1.4.1. ABC Süperailesi

ATP bağımlı membran pompasıdır, taşıyıcı proteinlerin görev aldığı taşımada, ilaçların hücre içinden atılımında önemli rol oynamaktadırlar (Higgins, 1992).


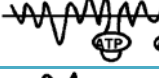
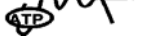
ABC taşıyıcıların aşırı ekspresyonları, kemoteropötik ilaçların hücre dışına atılımını artırdığı için bu proteinler, çoklu ilaç direnci proteinleri olarak adlandırılmıştır. İlk olarak 1970 yılında taşıyıcı protein ailesinden P-glikoprotein'in (MDR-1) kanser ilaçlarına dirençli tümör hücrelerinde yüksek ifade edildiği gösterilmiştir (Jan Maxwell, 2000). Daha sonra 1987 yılında bu proteinin 7. kromozom üzerinde bulunan MDR-1 geni tarafından kodlandığı bulunmuştur (Jan Maxwell, 2000).

İnsanda, çoklu ilaç direncinden ve hücreden taşınmasından (atılmasından) sorumlu olan ABC ailesinin 48 üyesi bulunmuştur (Michael ve Gottesman, 2002).

Bu proteinlerden sadece 14 tanesinin ilaç taşıma görevi saptanmıştır. Şu ana kadar, ATP bağlayıcı taşıyıcı protein ailesinin en büyük grupları, 9 protein çeşidine sahip MRP ve 7 protein çeşidine sahip MDR'dir (Dean ve Allikmets, 2001).

ABC taşıyıcı protein ailesi üyeleri, en az bir ATP bağlayıcı bölge (nükleotid bağlayıcı bölge) ve en az bir transmembran bölge (TM) içermektedir (Çizelge 1.1.).

Çizelge 1. 1. ABC süper aile üyeleri ve yapıları (Michael ve Gottesman, 2002).

| Ortak isimler | Resmi isimler | Yapı | Substrat | Normal lokal |
|-----------------|---------------|---|--|---|
| P-gp, MDR1 | ABC B1 |  | nötral ve katyonik organik bileşikler | bağırsak, karaciğer, böbrek, kan-beyin bariyeri |
| MRP1 | ABC C1 |  | GS-X ve diğer bileşikler, organik anyonlar | Yaygın |
| MXR,BCRP, ABC-P | ABCG2 |  | antrasiklinler, mitoksantron | plasenta, bağırsak, meme, karaciğer |

ABC taşıyıcıları ilaç direnç mekanizmasında önemli rol oynamaktadırlar. ABC taşıyıcılarının yüksek ifadesi, hücre içi ilaç (antrasiklinler, vinka alkaloidleri gibi kemoterapötik ilaçların atıklarının) konsantrasyonunu azaltarak ilaç direncine neden olmaktadır (Michael ve Gottesman, 2002). Bir çok MDR efluks proteini ilaç atım pompası gibi çalışmaktadır, sonuçta toksik maddelerin hücre içi konsantrasyonu azaltılmaktadır.

1.4.1.1. MDR1/P-gp (ABCB1)

MDR1/Pgp geni kromozom 7q21.12'de lokalizedir. Kodladığı protein, ilaç direnci mekanizmasında hücrenin yüzeyinde yer alan, 170kDa büyüklüğünde fosfolipoprotein yapıda bir pompadır. 2 ATP bağlayıcı bölgesi ve 2 transmembran bölgesi bulunmaktadır. Bu transmembran bölgelerinin her birisi altı transmembran domainden oluşmuştur (Chen ve ark., 1986; Jan Maxwell, 2000).

Çizelge 1. 2. Non-Pgp/ ilaç direncinde Mdr1 mekanizmaları (Jan Maxwell, 2000)

| Mekanizma | Protein/Gen |
|--------------------------|-----------------------------------|
| Hücre içi tutulma | MRP/LRP |
| İlaç efluksu | MRP |
| İlaç detoksifikasyonu | Glutasyon S-transferaz |
| Değişmiş çekirdek hedefi | DNA topoizomeraz |
| Apoptotik yanıt | Bcl-2; Bcl-X; Bax; p53; APO-1/FAS |

1.4.1.2. LRP (Akciğer Rezistans Protein)

İlk kez Scheper ve arkadaşları tarafından 1993 yılında çoklu ilaç direnci saptanan akciğer kanseri hücre serisinde varlığı bulunmuştur. Çoklu ilaç direncinden sorumlu bir diğer moleküldür. Bu molekül bir çok farklı ilaca karşı direnç oluşumundan sorumludur, 16. kromozom üzerinde lokalize bir gen tarafından kodlanmaktadır ve 110kDa ağırlığındadır. LRP, ilacı spesifik veziküllere, oradan da hücre dışına pompalamaktadır ve ATP bağımlı taşıyıcı protein ailesinden değildir.

1.4.1.3. MRP1 (ABCC1)

Yıllarca MDR1'in ilaç direnci ile ilişkili tek ABC taşıyıcı proteini olduğu düşünülmüştür ancak MDR1'in aşırı ifadesi olmayan, ilaca dirençli hücre hatlarını tanımlayan çalışmalar, diğer MDR ilişkili proteinlerin varlığına işaret etmiştir. Bu durum ise daha sonra MRP1 olarak ikinci bir ilaç dirençli ABC taşıyıcısının tanımlanmasını sağlamıştır.

MDR1 ve MRP1 yapısal ve fonksiyonel olarak birbirine benzemelerine rağmen yapılarındaki benzer aminoasit oranı %20 civarındadır. Fakat buna rağmen aynı olmayan bir grup anti kanser ilacına direnç gelişiminden sorumludur. MDR1 ile MRP1 farklı mekanizmalar vasıtası ile ilaç direnci geliştirirler. MRP1 geni 31 ekzondan oluşmaktadır ve 16. kromozomda lokalizedir. Hem hücre zarında hem de endoplazmik retikulum membranında yer alan ABCC1 proteinini kodlar. MRP1'in gen ifade düzeylerinin artışı, azalmış intraselüler konsantrasyonlara ve ilaç atılım seviyelerinin yükselmesine neden olmaktadır.

1.4.1.4. BCRP (ABCG2)

İlaç direncinden sorumlu diğer önemli efluks pompasıdır ve ABCG2 geni tarafından kodlanmaktadır. Bu protein 72 kDA ağırlığında ve 665 aminoasitten oluşmaktadır. N-terminal bölgesinde ATP bağlanma domaini ve C-terminal bölgesinde ise transmembran domaini yer almaktadır. ABCG2'nin yarı- taşıyıcı olması nedeniyle fonksiyon gösterebilmesi için homodimerize yada oligomerize olması gerektiği düşünülmektedir (Ni ve ark., 2010) BCRP'nin yüksek ifadesi sonucunda hematopoetik malignitelerin tedavisinde kullanılan ilaçlara (metotreksat, mitoksantron) karşı direnç oluşmaktadır (Breedveld ve ark., 2004).

Çizelge 1. 3. ABC süper ailesi üyeleri ve onların substratları ve inhibitörleri

| Gen | Substratlar | İnhibitörler |
|-------------|---|----------------------|
| P-gp/ ABCB1 | Kolşisin, Doksorubisin, VP16, Adriyamisin, Vinblastin, digoksin | Verapamil, PSC833 |
| MRP/ABCC1 | Doksorubisin, Daunorubisin, VP16, kolşisin, rhodamin | Siklosporin A, V-104 |
| BCRP/ABCG2 | Topotecan, CPT-11, GF120918 | FumitremorginC |

1.4.2. SLC22A1/OCT-1 Taşıyıcı İçer Alım Protein

Çözünen madde taşıyıcı süper ailesinin üyeleri, pasif taşıyıcı olarak maddelerin membrandan enerji harcamadan geçişlerini sağlamaktadır (Koepsell ve ark., 2007). Bu süper aile taşıdıkları substratın ve taşıyıcının tipine bağlı olarak 43 aileye bölünmektedirler. Bazı aileler özel substratlar örneğin oligopeptidler, şekerler, fosfatazlar ve metalleri taşımaktadırlar, diğer aileler çoklu özellikli taşıyıcılardır, bu taşıyıcılar farklı büyüklükte ve yapıda olan substratları taşımaktadırlar (Hediger ve ark., 2004).

SLC taşıyıcılar çoğunlukla plasma membranında ifade olup ve çeşitli hücresel fizyolojik proseslerde örneğin nörotransmittler, besinler veya metabolitlerin iç ve dışa alımında önemli rol oynadıkları bulunmuştur. Çözünen madde taşıyıcı proteinlerinin 22. ailesinin üyeleri genellikle çoklu özellikli taşıyıcılardır. Bu ailenin çoğu üyeleri ince bağırsak, karaciğer ve böbrekte ifade olmaktadır ve buda bu proteinlerin, ilaçların, ksenobiotiklerin, endojen bileşenlerin absorpsiyon ve salgılamasında önemli rolleri olduğunu göstermektedir. Bu aile substrat ve taşıma mekanizmasına göre farklı alt gruplara bölünmektedir (Koepsell ve ark., 2007).

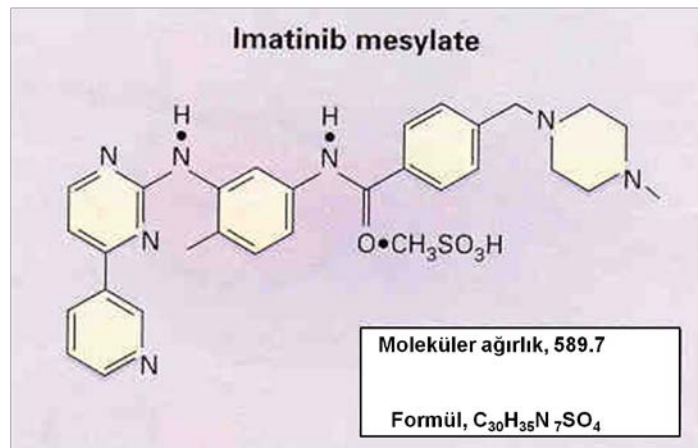
Giderek artan sayıdaki birçok bilimsel çalışma bazı kemoterapötiklerin influks taşıyıcıları için substrat olduklarını göstermiştir. Son zamanda, İmatinib'in hücre içine tercihen SLC22A1 (OCT1 olarak adlandırılır) aracılı olarak transport edildiği ve bu taşıyıcının ifadesinin 6 ay İmatinib tedavisinin ardından tam sitogenetik remisyonun kazanımı için öngörücü belirteç olduğu rapor edilmiştir (Wang ve ark.,

2008). Hücre SLC22A1 taşıyıcısının inhibitörüne maruz bırakıldığında, İmatinib influksu anlamlı derecede azalma göstermektedir(Thomas ve ark., 2004).

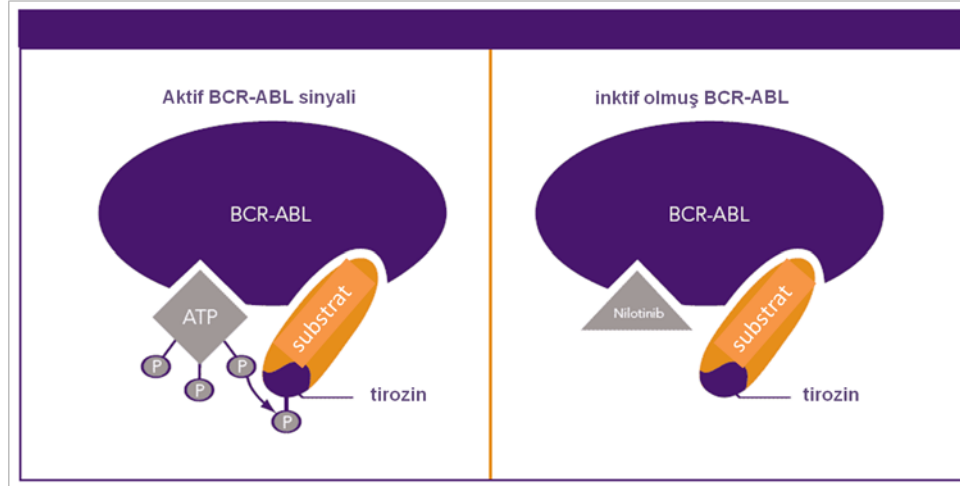
Diğer mekanizmalar, örneğin apoptozu indükleyen ilaçlara karşı duyarsızlık ve ilaç detoksifikasyonu yapan yolların indüklenmesi, kanser tedavisinde kullanılan ilaçlara karşı direnç neden olmaktadır (Michael ve Gottesman, 2002). Bugünkü kullanılan tedavi yöntemleri, hücre yüzeyindeki reseptörleri hedef almanın yanısıra, özel ajanlarla hücre büyümesinde etkili olan kinazların inaktive edilmesi yönündedir. Bu sayede kanser tedavilerinde başarı artışı ve yan etkilerin azalması hedeflenmektedir (Fu-Shing Liu, 2009).

1.5. KML Tedavisinde İmatinib Mesilat

İmatinib mesilat (Gleevec, STI571, CGP57148B), 2-fenilaminopirimidin sınıfında yer alır; BCR-ABL tirozin kinazın seçici inhibitörü olarak tasarlanan etkili bir terapötik ajandır (Corbin ev ark., 2003). İmatinib, BCR-ABL otofosforilasyonunun ve substrat fosforilasyonunun inhibisyonunu gerçekleştirerek, etkilenen hücrelerin proliferasyonunu bloke eder, apoptozisi indükler ve BCR-ABL onkoproteininin etkilerini bloke eder (Walz ve Sattler, 2006).



Şekil 1. 8. İmatinib'in kimyasal şekli.



Şekil 1. 9. İmatinib ve Nilotinib'in etki mekanizması

İmatinib mesilat (Glivec), BCR-ABL tirozin kinaz'ın, küçük inhibitör molekülüdür ve İmatinib yeni teşhis edilmiş KML hastalarında en çok kullanılan ilaçtır. İmatinib BCR-ABL kimerik tirozin kinaz'ın aktivitesini baskılayarak, BCR-ABL tirozin kinaz'ın aracılık yaptığı yolakları ve poliferasyonu inhibe ederek apoptozu indüklemektedir (Jan Maxwell, 2000). Yapılan çalışmalarda, BCR-ABL tirozin kinaz'ın apoptotik genlerin ifade olunmasında (hem transkripsiyon ve hem translasyon aşaması sırasında) etkili olduğu gösterilmiştir. Çoğu zaman, BCL2'nin ifadenmesi ve BCL-X₁ BCL-XL'nin yüksek ifade olmasının BCR-ABL tirozin kinaz'ın varlığıyla ilişkili olduğu bulunmuştur (Yuan ve ark., 2007).

Apoptozis ile bağlantılı genler AML (Akut Miyeloid Lösemi) ve KML tanımında prognoz faktörleri olarak kullanılmaktadırlar (Yuan ve ark., 2007).

TKI (Tirozin kinaz inhibitör)'lere karşı oluşan direnç 2 gruba ayrılır:

1. BCR-ABL bağımlı direnç mekanizması
2. BCR-ABL bağımsız direnç mekanizması

1.5.1. BCR-ABL Bağımlı Direnç Mekanizması

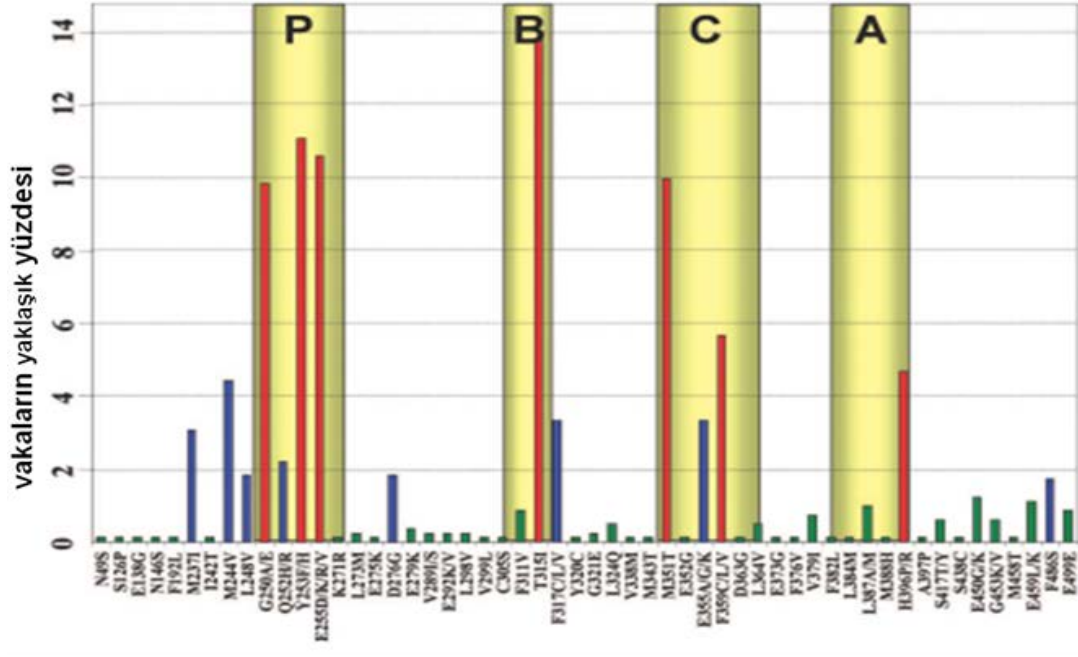
BCR-ABL'nin tirozin kinaz domainlerinde lösemik mutant klonlar bulunmaktadır. BCR-ABL geninin amplikasyonu sonucunda, BCR-ABL proteini de yüksek seviyede ifade olmaktadır.

1.5.1.1. KD (Kinaz Domain) Mutasyonları

Edinilmiş direncin ortaya çıkmasında en yaygın görülen mutasyonlar, KD mutasyonlarıdır ve ilaca hiç yanıt göstermeyen hastalarda nadiren rastlanmaktadır. Bu mutasyonlar ilaç tarafından indüklenmemektedirler, bu direnç mekanizması bakterilerdeki antibiyotik direncine benzer şekilde ortaya çıkmaktadırlar. İlaç uygulandıktan sonra var olan mutant klonlar çoğalırlar çünkü ilaca hassas hücreler ilaca maruz kaldıktan sonra yok olmaya başlarlar ve böylece ilaca dirençli klonlar yaşamaya devam ederler.

Dirençli hastalarda mutasyonlar 4'e ayrılır

1. Doğrudan bağlanmayı bozanlar, belirlenmiş ilk mutasyon T315I'dır. (Gorre, 2001). T315I mutasyonunda, 315 pozisyonunda bulunan treonin, izolösin'e değişmiştir.
2. Bazı mutasyonlar ATP bağlanma loop'unda kümelenmektedir. IM bağlanması için gerekli yapının destabilizasyonuna yol açarlar (G250, Q252, Y253, E255 değişimleri). Mutasyonu taşıyan hastalarda kötü prognoz gözlenmektedir.
3. ABL kinazın aktivasyon loop'undaki mutasyonlar ise IM bağlanmasına etki etmektedirler (IM inaktif konformasyonda bağlanabilir).
4. Katalitik bölgede (aa 350-363) kümelenen mutasyonlardır, bu bölgenin aktivasyon loopuyla yakından bağlantısı bulunduğu için IM'in bağlanmasında etki gösterebilmektedirler.



Şekil 1. 10. KD mutasyonları, A: ATP ve fosfat bağlanma bölgesi, B: İmatinib bağlanma bölgesi, C: katalitik bölge, A: ABL Kinaz aktivasyon loop (Redaelli ve ark., 2009)

Günümüze kadar IM dirençli KML hastalarında yaklaşık 50 amino asitin değişimine yol açan 100'ün üzerinde farklı nokta mutasyonu belirlenmiştir. Farklı mutasyonlar ilaca karşı farklı biyokimyasal hassasiyete sebep olmaktadır. Örneğin: E255K, E255V, T315I mutasyonlarında IM'e karşı hassasiyette 200 kat azalma gözlenmektedir ama diğer yandan F311L, F359V, V379I, L387M mutasyonlarında IM'e karşı hassasiyette 3 kat azalma görülmüştür (Corbin ve ark., 2003).

İn-vitro çalışmalarda İmatinib, dasatinib ve nilotinib için elde edilen IC50 (Inhibitory Concentration) değerleri çalışmalar arasında değişkenlik göstermektedir (O'Hare ve ark.2007; Redaelli ve ark., 2009). Hastanın tedaviye uyumu, ilacın hastadaki absorpsiyonu, metabolizması, transportu, inaktivasyonu, atılımı ve olası diğer ilaçlarla etkileşimi de dikkate alınmalıdır.

1.5.1.2. BCR-ABL Füzyon Proteininin Yüksek Seviyede İfadesi

BCR-ABL geninin amplifikasyonu sonucunda BCR-ABL proteininin aşırı ifade olunması ilk kez İmatinib'e dirençli KML hücre serilerinde saptanmıştır (Mahon ve ark., 2000; Barnes ve ark., 2005). Tüm bir hasta popülasyonunun %18 kadarında saptanmıştır. Aşırı BCR-ABL protein ifadesi sergileyen hücrelerin IM'e daha az hassas oldukları ve daha hızla IM dirençli mutant klonlar geliştirdikleri belirlenmiştir (Barnes ve ark., 2005). Yüksek BCR-ABL protein ifadesi, genomik instabiliteye neden olmaktadır, BCR-ABL KD (kinaz domain) dahil olmak üzere genomun herhangi bir bölgesinde mutasyon gelişimine yatkınlık sağlamaktadır (Barnes ve ark., 2005; Koptyra ve ark., 2008; Yuan ve ark., 2010).

1.5.2. BCR-ABL Bağımsız Mekanizmalar

Bu mekanizmalarla ilgili henüz kesin bilgiler bulunmamakla birlikte, araştırmalar halen sürmektedir. Mekanizmalardan bazıları aşağıdakiler gibidir.

1.5.2.1. İlaç taşınmasındaki Defektler

Çoklu ilaç direnci (MDR), memeli hücrelerinde, bir ilaca maruziyet sonucunda çeşitli ajanlara karşı gelişen çapraz dirençtir. Pek çok durumda, hücre yüzeyinde MDR1 (ABCB1) tarafından kodlanan P-glikoproteininin artmış ifadesi tarafından ortaya çıkmaktadır.

IM ve TKI (tirozin kinaz inhibitör)'leri Pgp'nin substratlarıdır. Pgp ifade eden hücrelerde hücre içi IM düzeyleri anlamlı olarak düşüktür (Hegedus ve ark., 2002). ABCG2 tarafından kodlanan meme kanseri direnç proteini (BRCP) IM direnciyle ilişkilidir. IM, BRCP/ABCG2 ilaç 'efluks' pompasının substratı ve/veya inhibitörü olarak fonksiyon göstermektedir. BRCP/ABCG2'nin insan tümörlerinde

aşırı ifade olduğu görülmüştür ve KML kök hücrelerinde fonksiyonel olarak ifade olmaktadır (Hiwase ve ark., 2008; Burger ve ark., 2004; Hu ve ark., 2008).

İlacı dışarı pompalayan proteinlerin aksine bazı transport proteinler de ilacın hücre içine alınmasından sorumludurlar. OCT1 (the human organik cation transporter 1), IM'in aktif şekilde hücre içersine alımını sağlamaktadır. OCT1 inhibisyonu, IM'nin hücre içersindeki konsantrasyonun azalmasına neden olmaktadır (Thomas ve ark., 2004).

Tam bir sitogenetik yanıt alınmış hastaların MNC (mononükleer hücre)'lerinde anlamlı yüksek düzeylerde OCT-1 gen ifadesi gözlenmektedir. Tirozin kinaz inhibitör optimizasyon ve selektivitesine ilişkin bir çalışmada düşük OCT1'in fonksiyonel aktivitesinin, kronik faz KML hastalarında hastalığın geleceği için prediktif olduğu saptanmıştır (Engler ve ark., 2010; White ve ark., 2010).

Src ailesi kinazlar Lyn ve Hck myeloid hücrelerde primer olarak ifade olurlar ve BCR-ABL ifade eden hücre serilerinde aktive olmaktadır (Geahlen ve ark., 2004; Hu ve ark., 2006). Yapılan çeşitli çalışmalarda IM'nin artan dozlarına maruz bırakılarak oluşturulan IM dirençli hücre serilerinde ve KML hastalarının hücrelerinde Lyn'nin aktive ve yüksek ifade olduğu gösterilmiştir (Donato ve ark., 2003). Src kinaz inhibitörüyle Lyn'nin baskılanmasıyla IM dirençli hücre serilerinin proliferasyonunda ve hayatta kalmalarında azalma saptanmıştır. Bu etki IM'e hassas hücrelerde görülmemiştir (Donato ve ark., 2003; Dai ve ark., 2004).

Lyn ekspresyonu yüksek olan hastalarda, sadece BCR-ABL kinazların İmatinib ile inhibe olmaları, BCR-ABL aracılıklı sinyallerin tamamının ortadan kalkması için yetmemektedir ve bu yüzden Lyn inhibisyonu, IM direncinin ortadan kaldırılması için gereklidir (Wu ve ark., 2008). Mikrodizin temelli çalışmalarda IM-dirençli hücrelerde, hassas hücrelere kıyasla daha fazla veya daha az ifade olan genler belirlenmiştir. Bu genlerin pek çoğu, sinyal iletiminde, transkripsiyonel düzenlemede rol oynamaktadırlar (Tipping ve ark., 2003; Grosso ve ark., 2009).

1.5.2.2. Lösemik Kök Hücre Sessizliği

Kanser kök hücreler tümör oluşumunda özel yeteneğe sahiptirler. Bu hücreler, kendini yenileme ve farklılaşma gibi normal kök hücrelerle bir çok ortak özelliğe sahiptirler. Son zamanlarda yapılan bir çok çalışma kanser kök hücrelerinin çeşitli tümörlerdeki varlığını göstermektedir, bu da kendini yenileme ve farklılaşmayı regüle eden moleküler mekanizmaların tanımlanmasında rol oynamaktadır, çünkü bu yollarda etkili olan genler tümörün ilerlemesinde de etkilidir.

Kanser kök hücreleri, tümörojenik ve tümörojenik olmayan hücrelerin oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Tümörojenik hücreler yüzey belirteçleri aracılığıyla tümörojenik olmayan hücrelerden ayrılabilir. Son zamanlarda kanser kök hücrelerin (KKH) ilaç direncindeki rolü giderek önem kazanmıştır. KKH'ler kemoterapiye direnç göstererek hastalığın yeniden nüks etmesine ve tümörlerin metastazına neden olmaktadır. KKH'lerinin ilaç direncindeki moleküler mekanizmaları tam olarak açıklanmamıştır. Yapılan bir çok çalışma KKH'lerin ilaç tedavisindeki kaçışlarında mekanizmanın, bu hücrelerin kök hücre karakteri almasını sağlayan bir çok moleküle ilişkili olduğunu göstermiştir. Bu önemli genlerden SOX-2, OCT-4 ve NANOG genlerinin ilaç direnciyle bağlantılı olduğu bulunmuştur.

OCT-4, SOX2, NANOG genleri kök hücre belirteci olarak kanser kök hücrelerinde yüksek ifade göstermektedirler.

OCT-4, embriyonik kök hücrelerde transkripsiyon faktörü olarak fonksiyon göstermektedir, bu gen çoğu tümörlerde kök hücre benzeri fenotiplerin oluşumunda rol oynamaktadır. OCT-4 geni az farklılaşmış tümörlerle tam farklılaşmış olanlarla kıyaslandığında anlamlı derecede ifade olduğu gözlenmiştir.

SOX-2 ve NANOG insan somatik hücrelerinin, embriyonel kök hücre özelliğine sahip pluripotent kök hücrelerine yeniden programlanmalarına neden olmaktadır. Her iki gen de embriyonik kök hücrelerde transkripsiyon faktörü olarak fonksiyon göstermektedir (Shaobin ve ark., 2013).

Sessiz lösemik kök hücreler toplam KML kök ve projenitör hücrelerinin %1'ni oluşturmaktadır. Tedavi görmeyen KML hastalarının kan ve kemik iliğinden elde edilmektedir (Holyoake ve ark., 1999; Jorgensen ve ark., 2007). *İn-vitro* çalışmalar, IM'in bu hücrelerin çoğalmalarını engellediğini ancak hücre döngüsünde canlı

olarak beklemelerini sağladığını göstermiştir (Holyoake ve ark., 1999). Dasatinib ve nilotinib'e de aynı cevap alınmıştır.

KML kök hücreleri *in-vitro*da G-CSF (granulocyte colony stimulating factor) uygulamasıyla hücre döngüsüne girerler (Jorgensen ve ark., 2006; Holtz ve ark., 2007). 2008'de keşfedilen farnezil transferaz inhibitörü, BMS-214662'nin KML sessiz projenitör hücrelerinin apoptoza götürülmesinde ve ölümlerine sebebiyet verilmesinde etkin olduğu gözlenmiştir. Bu inhibitörün, IM ve Dasatinib ile kombine verilince daha çok etki gösterdiği bulunmuştur (Copland ve ark., 2008).

BCR-ABL, SDF1 reseptörü olan CXCR4'ü inhibe etmektedir. SDF1 kemokin olarak stromal hücreleri tarafından üretilir ve CD34+ projenitör hücrelerinin kemik iliğinde bulunan kendi mikro çevrelerinde tutunmalarını sağlamaktadır (Salgia ve ark.,1999; Ganju ve ark., 1998). IM, CXCR4'ün ifadenmesini düzenleyerek KML hücrelerinin kemik iliğindeki stromal hücrelerine göç etmelerini sağlamaktadır. Bu da KML hücrelerinde bölünmeyi inhibe edip, G0-G1 hücre döngüsünde durdurmakta ve sessiz olarak hayatta kalmalarını artırmaktadır. CXCR4 ve TKI'lerin beraber kullanımının KML tedavisinde önemli gelişmeler sağlanabileceği önerilmektedir (Copland ve ark., 2006; Konig ve ark., 2008).

1.6. Hücrede Ölüm Yolları

1. Apoptotik hücre ölümü (Programlı hücre ölümü)
2. Otofajik hücre ölümü
3. Nekrotik hücre ölümü (Hasar yolu ile hücre ölümü)

1.6.1. Apoptoz

Apoptoz programlanmış hücre ölümü için en temel mekanizmadır ve iki yolak tarafından kontrol edilmektedir:

1. İçsel yolak: BCL2 ailesi tarafından regüle edilmekte ve mitokondri aracılıklı gerçekleşmektedir,
2. Dışsal yolak: Ölüm reseptörü aracılığıyla yapılmaktadır (Kelly ve Strasser, 2011).

KML hücrelerinde TKI uygulanması ile indüklenmiş olan apoptozun, BCL-2'nin aşırı ifade olması nedeniyle tamamen bloke olduğu gösterilmiştir. BCR-ABL1TK'in, KML hücrelerinde içsel apoptoz yolağıyla ilişkili olan molekülleri regüle ettiği belirlenmiştir (Kuroda ve ark., 2006, 2007).

Mitokondri dışı membran bütünlüğü, Bcl-2 protein ailesinin apoptotik ve antiapoptotik üyeleri tarafından regüle edilmektedir. BCL2 ailesi en az 20 proteinden oluşmaktadır ve bu proteinlerde 1'den 4'e kadar korunmuş bölge bulunmaktadır. Bu bölgeler "BCL2 homology domainler" (BH1, BH2, BH3 ve BH4) olarak tanımlanmış olup, apoptotik ve anti apoptotik gruplara bölünmektedirler. Antiapoptotik üyeler BCL2, BCLXL, BCLW BH domainlerin dördünü ve MCL1 üçünü paylaşmaktadırlar, proapoptotik proteinler ise iki alt gruptan oluşmaktadırlar:

1. BAX/BAK-benzeri proteinler,
2. BH3- "only " proteinler.

BAX/BAK-benzeri proteinler, BAX, BAK ve BOK 3 domaininden (BH1-3) , BCLXS iki BH domininden (BH3 ve 4) oluşmaktadır. BH3- "only " proteinler BH3 bölgesinin sadece 9-16 amino asitini paylaşmaktadırlar (Petros ve ark., 2004; Huang ve ark., 1998). Memelilerde en az 8 BH3-"only" protein (BIM, BAD, BIK, BID, HRK, NOXA, PUMA ve BMF) bulunmaktadır.

Sağlıklı hücrelerde, BCL2 ailesinin anti-apoptotik üyeleri, Bax ve Bak proteinlerine bağlanarak bu proteinlerin oligomerizasyonunu engellemektedirler (Kuwana ve ark., 2005; Willis ve ark., 2007). BAX ve BAK proteinlerinin oligomerizasyonu mitokondrinin dışı membranının bozulmasına neden olmaktadır, diğer yandan BH3- "only " proteinler transkripsiyonel baskı veya post-translasyonel

modifikasyon sonucunda inaktif halde bulunmaktadırlar. Ölüm uyarımı aktivasyonu nedeniyle, ilk olarak BH3- "only " proteinler indüklenip, transkripsiyonel veya posttranslasyonel olarak aktif olup, sonra BCL2 anti-apoptotik proteinlerine bağlanarak Bax ve Bak proteinlerinin serbest kalmalarına neden olmaktadır (Kuwana ve ark., 2005; Willis ve ark., 2007). Bu süreç içerisinde, BH3-“only” proteinlerinin farklı üyeleri farklı ölüm uyarıcılarına karşı indüklenir veya aktif hale gelmektedir (Youle ve ark., 2008).

Son zamanlarda KML hücre serileri üzerinde yapılan çalışmalarda BCR-ABL TK inhibitörlerin BH3- "only "proteinlerinin pro- apoptotik üyelerini örneğin BIM (BCL2-interacting mediator of cell death), BAD (BCL2-associated agonist of cell death) ve BMF(BCL2-modifying factor) indüklediği ve aktive ettiği bulunmuştur (Kuroda ve ark., 2006; Shah ve ark., 2008; Airiau ve ark., 2012).

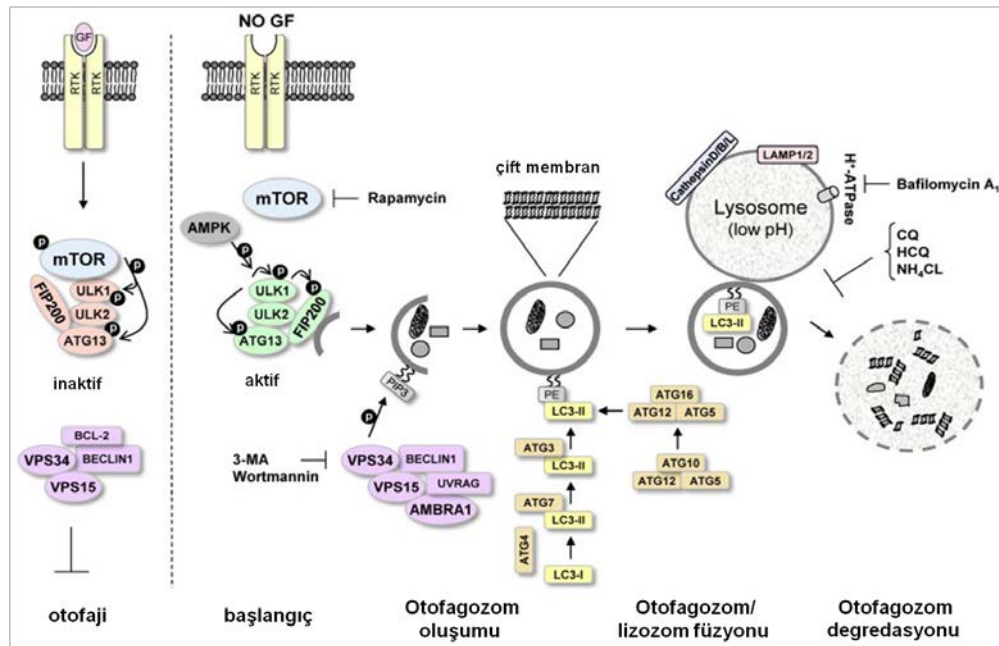
TKI uygulanmayan KML hücrelerinde BCR-ABL1 TK, AKT ve HSC70 (heat shock cognate protein 70)'i aktive ederek BIM proteinini düşük transkripsiyonel seviyede tutmaktadır. Ayrıca MAPK fosforilasyonu ile proteozomal degradasyonu artırarak, Bim'i düşük post-translasyonel seviyede tutmaktadır. (Kuroda ve ark., 2006; Airiau ve ark., 2012; Matsui ve ark., 2007). Buna ilaveten BCR-ABL1 TK, AKT'ı fosforile ederek BAD'ı inaktive etmektedir (Kuroda ve ark., 2006; Kuroda ve ark., 2007; Keeshan ve ark., 2002; Salomoni ve ark., 2000).

1.6.2. Otofajinin Moleküler Mekanizması

Otofaji, hasarlı proteinler ve hücre içi materyallerin lizozom içerisinde yıkım ve parçalanmasını sağlayan bir hayatta kalma mekanizmasıdır (Mizushima, 2007).

Bu hücre içi elementlerin geri dönüşümü, metabolik stres ve açlık dönemlerinde, hücrenin hayatta kalmasında alternatif enerji kaynağı olarak görev yapabilmektedir (Levine ve ark., 2004). Geçen son 10 yılda otofajinin moleküler regülasyonu ile ilgili bilgiler elde edilmiştir. Otofajinin ilk olarak maya üzerinde deneyleri yapılmış ve bu

deneyler sonucunda otofajiden sorumlu olan ATG genleri tanımlanmış, genlerin memelilerde ortologları olduğu bulunmuştur.



Şekil 1. 11. Otofaji yolağının aşamaları (Helgason ve ark., 2011)

1.6.2.1 Başlangıç

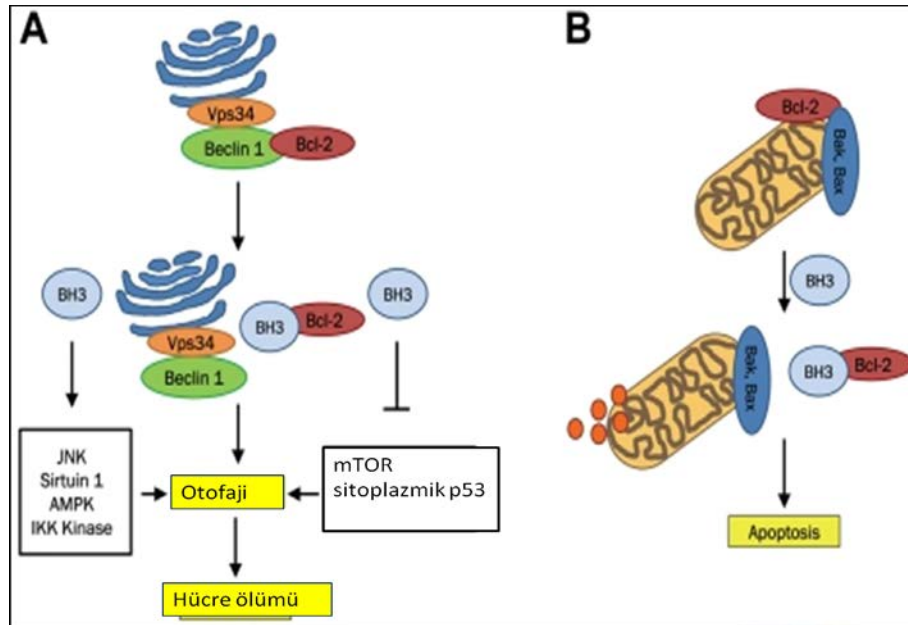
Otofaji başlangıç aşaması serin/threonin kinaz kompleksinin aktivasyonu ile başlamaktadır ve bu kompleks ULK1 ve 2, ATG13 ve FIP200'den oluşmaktadır (Jung ve ark., 2009). Glukoz yokluğu döneminde AMP-aktive edici protein kinaz ULK1'i fosforile ederek, otofaji aktivasyonunun ilerlemesine neden olmaktadır. Alternatif olarak besin varlığında mTOR bu interaksyonu bloke etmektedir. Bu yüzden mTOR otofajinin önemli bir regülatörüdür ve ULK1/2/ATG13/FIP200 kompleksinin ve ATG proteinlerinin inhibisyonunu sağlayarak otofajiyi baskılamaktadır.

1.6.2.2. Otofagozom Oluşumu

PI3K-III sınıfına ait olan VPS34'ün, fagoporların otofagozoma dönüşümünde önemli rolü bulunmaktadır. Otofagozom çift membranlı vezikül olarak otofajide aracı rol

oynamaktadır (Liang ve ark., 2008). VPS34, VPS15 ve otofaji proteini olan Beclin1 ile kompleks oluşturmaktadır (Mizushima, 2007). Antiapoptotik proteini olan Bcl-2, Beclin1'in BH3 domainiyle interaksiyona girerek otofajiyi inhibe etmektedir (Maiuri ve ark., 2007). Bu interaksiyon açlık evrelerinde azalarak Beclin1'i özgür bırakarak otofajinin aktif olmasına neden olmaktadır (Pattingre ve ark., 2005).

Bcl-2'nin bu anti otofajik fonksiyonu, hücrenin hayatta kalması yönünde otofajinin uygun düzeyde kalmasını sağlamaktadır. Bcl-2 aynı zamanda, sitoplazmik kalsiyumun yükselişi ile indüklenen otofajiyi, kalsiyum yükselişini inhibe ederek baskılamaktadır (Hoyer ve ark., 2007).



Şekil 1. 12. BCL-2'nin otofajideki rolü

Uvrag (UV irradiation resistance-associated gene) ve Ambral1 proteinleri Beclin1 ile etkileşime girerek otofajiyi pozitif yönde regüle etmektedir, Beclin1 bağımlı otofaji, Beclin1 bağlanan partnerler tarafından sıkıca regüle edilmektedir (Liang ve ark., 2006). Otofagozomun tamamlanması 2 ubikitin benzeri konjugasyon sistemleri aracılığıyla yapılmaktadır. Otofaji için gerekli olan ATG12/ATG5 ve ATG8-PE konjugasyon sistemleridir. ATG8-PE konjugasyonu, ATG4, ATG7 ve ATG3 aracılığıyla yapılmaktadır. ATG3, ATG8'in lipid modifikasyonunu

gerçekleştirmektedir. ATG4 ise ATG8 ve PE arasındaki amid bağımlı olarak proteinin membranlardan serbest kalmasına neden olmaktadır (Geng ve Klinsky, 2008).

ATG12/ATG5 konjugasyon süreci, ATG12'nin, E2 enzim fonksiyonu gösteren ATG10 aracılığıyla ATG5'e konjuge olmasıyla başlamaktadır. ATG12/ATG5 konjugasyon sistemi ATG16 ile interaksiyona girerek ATG12/ATG5/ATG16 kompleksini oluşturarak E3 enzim- benzer fonksiyon göstermektedir böylece ATG8-PE'nin otofagozomal membrana bağlanmasını regüle etmektedir (Nakatogawa ve ark., 2009).

LC3 (ATG8), otofagozomların önemli bir belirteci olarak bilinmektedir. LC3'ün olgunlaşması, LC3-I'in PE ile (ATG7 ve ATG3 aracılıklı) oluşan iki taraflı konjugasyonu ve LC3-II'nin otofagozomların yüzeyindeki oluşumuyla tamamlanmaktadır (Kabeya ve ark., 2000). LC3-I/II dönüşümünün doğru şekilde yorumlanması çok önemlidir çünkü otofagozomların birikmesi, artan otofajik aktivite sonucunda otofagozom formasyonunun artmasına da bağlı olabilir veya otofagozom yapım-yıkım sürecinin engellenmesi ile ortaya çıkabilir.

1.6.2.3. Olgunlaşma ve Yıkım

Bu aşamada otofagozomların dış membranları lizozomlarla birleşerek otolizozomları oluşturmaktadır. Bu sürecin mekanizması tam olarak bilinmemektedir, ancak LAMP1/2 (lizozomal proteinler), RAB7 (small GTPase) ve katepsin D/B/L gibi proteinler otofagozom olgunlaşmasında rol oynamaktadırlar. RAB7 ve LAMP1/2 otofagozom ve lizozomun birleşmesinde kolaylık sağlamaktadır (Eskelinen, 2005).

Son evredeki otolizozomlarda, otofagozomun iç membranı ve onun içeriği lizozomal hidrolazlar ve özellikle katepsinler tarafından parçalanmaktadır (Xie ve Klinsky, 2007). Otofajiye sadece geri dönüşüm mekanizması olarak

bakılmamalıdır. Bu süreç sıklıkla memeli hücrelerinde, oosit fertilizasyonunda bazal seviyede görünmektedir.

1.7. Kanserde Otofajinin Paradoksal Etkisi

Otofajinin kanserin ilerlemesinde ve gelişiminde farklı fonksiyonu olduğu gözlenmiştir, bunu da tümör hücrelerinin hayatta kalımını indüklemekle ya da bu hücreleri öldürmekle sağlamaktadır. Bu farklı etkiler tümör tipi, hastalığın aşaması ve tedavinin şekline göre geniş çeşitlilik göstermektedir (Rubinsztein ve ark., 2007).

Normal hücrelerde otofaji gerekli bir süreçtir çünkü:

1. Hücre genetik stabilitenin kararlılığını hasarlı mitokondrileri yok ederek sağlamaktadır aksi halde reaktif oksijen türleri oluşur ve bu da DNA'ya hasar vermektedir.
2. Otofaji, proteomda gardiyan rolü oynamaktadır, koşullar değiştiğinde ya da stres ortamlarında adaptasyonun artmasında rol oynamaktadır (Rosenfeldt ve Ryan., 2011).

Otofaji ve kanser arasındaki bağlantı ilk olarak 1999 yılında Levines labratuarında yapılan çalışmada yayınlanmıştır. Bu çalışmada BECLIN1'in haplo yetmezliği olan bir tümör supresör olduğu gösterilmiştir (Liang ve ark., 1999). Sonraki çalışmalar, BECLIN1'in insan meme, over ve prostat kanserlerinde yüksek sıklıkta kaybolduğu bulunmuştur ve heterozigot BECLIN1'i olan farelerin tümör gelişimine yatkın oldukları tespit edilmiştir (Yue ve ark., 2003).

Otofajinin inhibisyonu ile ışın tedavisi, alkilleyici ajanlar ve arsenik trioksitin tümör hücrelerinde apoptotik etkilerinin artmasına neden olmaktadır (Rubinsztein ve ark., 2007). Bu nedenle, otofajik aktivite, hasarlı organeller ve proteinleri çıkararak, reaktif oksijen türlerini azaltarak, nekroz kaynaklı inflamasyonu inhibe ederek normal hücrelerde tümör oluşumunu baskılayabilmektedir (Degenhardt ve ark., 2006). Otofajinin tümör hücrelerinde, hücrelerin korunmasında rolü olduğu da belirlenmiştir ve otofajinin inhibisyonu apoptozun artmasına neden olabilmektedir.

1.8. KML ve Otofajinin İlişkisi

BCR-ABL sinyali, büyüme faktörü aktivasyonu gibi uyarımlar, PI3K/AKT yolağı ve otofajiyi baskılayan mTOR'un aktivasyonuna neden olmaktadır. BCR-ABL'in TKI'larla inhibisyonu hem apoptozu hem de otofajiyi indüklemektedir, aynı etki büyüme faktörünün geri çekilmesinde de gözlenmektedir (Bellodi ve ark., 2009).

Kemoterapötik ajanlar, KML'nin de dahil olduğu hematopoetik kanserlerin tedavisinde kullanılmaktadır, bu ajanlar otofaji ve apoptozu indüklemektedirler. Hücrenin ölüm ve hayatta kalma arasındaki tercihini, apoptoz, otofaji ve nekroz mekanizmaları arasındaki denge belirlemektedir. Apoptoz ve hayatta kalma arasındaki son karar hücrenin olgunlaşma statüsüne göre değişmektedir. KML hastalığında, öncül CD34+/CD38- hücrelerinde kendi projenitörlerine karşı, TKI tedavisi bu hücrelerde farklı sinyal yolaklarının tetiklenmesine neden olmaktadır, örneğin BCR-ABL'in inhibisyonu progenitörlerde apoptozu, ancak öncül kök hücrelerde otofajiyi tetikleyebilmektedir.

Çoğu durumlarda otofajinin inhibisyonu, kansere karşı ilaçların etkisini artırmaktadır, buna rağmen otofaji inhibisyonunun programlanmış ve nekrotik ölümü artırdığıyla ilgili kesin sonuçlar bulunmamaktadır. Fare model çalışmalarında, otofajinin hayatta kalma yolağı olarak fonksiyon gösterdiği ve onun inhibisyonun lenfoma hücrelerinde P53 veya ilaç ile indüklenmiş hücre ölümünü artırdığı gözlenmiştir. Bu bulgular otofaji inhibitörleri örneğin CQ gibi hücre ölümünü indükleyen ilaçlarla birlikte verildiğinde, hematolojik neoplazmların tedavilerinde yararlı olduğu gösterilmiştir. Son zamanlardaki KML ve otofaji ile ilgili yayınlar aşağıda özetlenmiştir.

Çizelge 1. 4. KML hücrelerinde çeşitli ilaç uygulamalarından sonra otofajinin indüklenmesi (Vignir Hegason ve ark., 2011)

| ilaç | İlaç hedefi | Hücre tipi | Hücre etkisi | Otofaji inhibitör | İlaç ve otofaji inhibitörünün etkisi |
|---------------------|-------------------|--|-------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|
| Crotoxin | Belli değil | K562 | Apoptoz ve otofaji indüksiyon | 3-MA NH ₄ Cl | Artmış hücre ölümü |
| SAHA | Histon deasetilaz | Hücre serileri, öncül KML MNC | Apoptoz ve otofaji indüksiyon | 3-MA CQ | Artmış hücre ölümü |
| Bafetinib | BCR-ABL | K562 | Apoptoz ve otofaji indüksiyon | CQ 3-MA | Artmış hücre ölümü |
| İmatinib | BCR-ABL | K562 | Apoptoz ve otofaji indüksiyon | CQ | Artmış hücre ölümü |
| İmatinib, dasatinib | BCR-ABL | Hücre serileri, öncül CD34+ 38 – hücreleri | Apoptoz ve otofaji indüksiyon | CQ Bafilomycin A1 | Artmış hücre ölümü |
| İmatinib | BCR-ABL | K562 | Apoptoz ve otofaji indüksiyon | 3-MA | Artmış hücre ölümü |
| OSI-027 | mTOR | K562 | Apoptoz ve otofaji indüksiyon | CQ | Artmış hücre ölümü |

CQ:chloroquine ;3MA: 3-methyladenine, MNC: mononuclear cell, SAHA: suberoylanilide hydroxamic acid

2006 yılında yapılan çalışmada, K562 hücre serilerinin Nörotoksin ve Crotoxin ile muamele edildikten sonra otofaji bu hücrelerde indüklemiştir ve daha sonra 3-MA ve NH₄Cl kullanılarak otofaji inhibisyonu gerçekleştirilmiştir ve böylece nörotoksin'nin sitotoksik etkisini artırdığı gösterilmiştir. Bir yıl sonra, Carew ve arkadaşları yaptıkları çalışmada otofajinin QA ile inhibe edilesinin öncül ilaca dirençli K562 hücrelerinde, histon deasetilaz inhibitörü olan “suberoylanilide hydroxamic” asitin anti kanser etkisinin artırdığını göstermişlerdir. Bu çalışmalar, KML hücrelerin otofajiyi anti kanser ilaçların tedavisinde, hayatta kalma yanıtı olarak indüklediklerini ve otofaji inhibisyonunun yeni tedavi stratejisi olarak İmatinib tedavisinde kullanabileceğini göstermektedir (Carew ve ark., 2008).

BCR-ABL aktivitesindeki inhibisyonun otofajiyi indüklediğine dair ilk bulgu 2008 yılında elde edilmiştir, bu çalışmada Befetinib, c-ABL ve LYN kinaz inhibitörü, K562 hücrelerinde otofajiyi indüklediği gösterilmiştir (Kamitsuji ve ark., 2008). Otofaji yanıtının CQ ve Befetinib ile muamele edildikten sonra koruyucu etkisi olduğu gözlenmiştir. Bir kaç ay sonra K562 hücrelerinde İmatinibin otofajiyi

indüklediği gösterilmiştir ve böylece İmatinib'in CQ ile birlikte tedavide verilmesinin İmatinib'in hücre ölümü üzerindeki etkisini artırdığı saptanmıştır (Mishima ve ark., 2008).

Otofajinin T315I mutasyonun taşıyan hücre serilerinde, İmatinib sonucunda otofajinin indüklenmediği ve c-ABL (T315I) direnç mutasyonun aşırı ifade olunması İmatinib ile muamele edildikten sonraki indüklenmeyi bloklamadığını göstermiştir. İmatinib mTOR'u inhibe ederek otofajiyi indüklemektedir.

BCR-ABL ifade eden hücrelerde, mTOR'un otofajiyi blokladığı iddiasını desteklemek için, OSI-027 (mTOR inhibitörü) kullanılarak otofajinin K562 hücrelerinde indüklendiği gösterilmiştir (Carayol, 2010).

1.9. DNA Tamir Mekanizmaları

Memeli hücreler çeşitli içsel ve dışsal tahrip edici etkenlere, genomda mutasyon oluşumuna neden olan etkenlere maruz kalmaktadırlar. Yaklaşık her gün 50,000-100,000 DNA modifikasyonu her bir hücrede gerçekleşmektedir (Hubscher and Maga, 2011). Mutasyon tamiri gerçekleşmemesi durumunda ağır sonuçlar ortaya çıkabilmektedir, böylece çeşitli DNA tamir mekanizmaları bu zor durumlara karşı çalışmaktadır. Bu mekanizmalar NER (nucleotide excision repair=nükleotid kesip çıkarma onarımı), BER (base excision repair=baz kesip çıkarma onarımı), DSB (double strand break), MMR (mismatch repair=yanlış eşleşme onarımı)'den oluşmaktadır.

Şu anda iki tip kesip-çıkarma onarımının varlığı bilinmektedir: Baz kesip çıkarma onarımı, DNA bazlarının spontan hidrolizi ve onları kimyasal yolla değiştiren etkenler nedeniyle oluşan azotlu bazların hasarının onarılmasıyla ilgilidir. Baz kesip-çıkarma onarımı, DNA'daki modifiye bazları tanıyıp ve değiştirirken, nükleotiti kesip-çıkarma onarım yolu (NER), UV'nin neden olduğu pirimidin dimerlerini ve DNA'daki büyük lezyonları onarır. NER yolunda *uvr* gen ürünleri,

DNA'daki lezyonların tanıyıp, kesip çıkarılmasıyla ilgilidirler. Onarım daha sonra DNA polimeraz I ve DNA ligaz tarafından tamamlanır.

Farklı onarım sistemleri DNA'daki diğer hata çeşitlerini düzeltmek için evrimleşmişlerdir. Örneğin DNA sentezinde DNA polimeraz III bir hata düzeltme işlevine sahiptir. Polimerizasyon esnasında hatalı bir nükleotit yerleştirildiğinde enzim kompleksinin hatayı tanıma ve hatalı nükleotiti keserek değiştirme ve onu geri döndürme potansiyeli vardır. Hata-düzeltilme sonrası kalan hatalarla başa çıkmak üzere başka bir mekanizma olan yanlış eşleşme onarımı işlerlik kazanabilir. Diğer DNA lezyonlarındaki gibi değişiklik veya yanlış eşleşmeyi tanıma, doğru olmayan nükleotitlerin uzaklaştırılması ve doğru nükleotitlerle yer değiştirme gerçekleşmelidir. Fakat yanlış eşleşmenin düzeltilmesiyle ilgili olarak özel bir problem vardır. Eğer yanlış eşleşme tanınır fakat ayrımı yapılamaz ve kesip-çıkarma rastgele olursa, doğru bazı taşıyan zincirin kesip-çıkartılması şansı eşittir. Bundan ötürü, onarım enziminin atasal ve yeni zincirin ayrımının yapılması kritik bir basamaktır.

E.coli'de dahil olmak üzere, en azından bazı bakterilerde bu süreç açıklanmıştır ve DNA metilasyon işleminin varlığı belirlenmiştir. Bu bakteriler 5'... GATC.... 3' 3'... CTAG...5' dizisini substrat olarak tanıyan bir enzim olan Adenin Metilaza, sahiptir. Enzimin diziyi tanımasından sonra adeninlerin herbirine bir metil gurubu eklenir. Bu modifikasyon hücre döngüsü boyunca aktif kalır.

Replikasyon döngüsünü takiben, yeni sentezlenmiş zincirler geçici bir süre metillenmemiş olarak kalır. Onarım enzimi bu sürede yanlış eşleşmiş nükleotit çiftini tanır ve tercihen metillenmemiş zincire bağlanır. Metillenmemiş zincirde, yanlış eşleşmenin 5' veya 3' tarafında bir endonükleaz proteini tarafından bir çentik açılır. Çentiklenmiş (kırılmış) DNA zinciri daha sonra açılır ve yeni bir sentezle oluşan boşluk doldurulur. Bu süreçle ilgili proteinler, çentiğin yanlış eşleşmiş çiftin hangi yönünde yapıldığına bağlı olarak biraz farklıdır. Zincirlerin belirlenmesi ve seçilmesi basamağında *E.coli*'nin MutH, L, S ve U gen ürünleri görev alır. Herhangi birindeki mutasyon suşların yanlış eşleşme onarımı açısından hatalı olmalarına yol açar. Burada anlatılan mekanizma *E.coli* üzerindeki çalışmalara dayalı olmasına karşın, maya ve memelilerde homolog proteinleri ilgilendiren benzer mekanizmaların varlığı da bilinmektedir.

Bu tez çalışmasında, 18 ay boyunca K562 hücrelerine (K562s) artan dozlarda İmatinib uygulanmış ve ilaç konsantrasyonunun yavaş yavaş artırılmasıyla, İmatinibe karşı direnç geliştirilerek, 5µM İmatinibe karşı dirençli hücreler (K562r) elde edilmiştir. *İn-vitro* İmatinib direnci gelişimi süresince, BCR-ABL'den bağımsız yollardaki gen ifade değişimleri incelenerek moleküler mekanizmalar aydınlatılmaya çalışılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hücre Kültürü Deneyleri

2.1.1. K- 562 Hücre Hattının Sıvı Azottan Çözdürülmesi

Daha önce dondurulup sıvı azota konmuş olan K-562s ve K562r hücre hattını sıvı azottan çıkarıp çözmek amacıyla önce 100 ml RPMI (Biological Industries/Israel) üzerine 10,2 FBS (Sigma/A.B.D.), 1,2 Penisillin/Streptomisin (Gibco/ A.B.D. ve 1,2 ml L-Glutamin (Gibco/ A.B.D.) konarak besiyeri hazırlandı. Ardından 40 ml'lik bir beherin 1/3'üne kadar distile su kondu. K-562 hücreleri sıvı azottan çıkarılıp hemen bu beher içine alındı. Steril kabin içinde 2 ml besiyeri bu donmuş hücreler üzerine konarak pipetaj yapıldı ve 15 ml'lik steril falkon tüp içine alındı. Üstüne 7-8 ml besiyeri eklenerek 1000 rpm.'de 4 dk. santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant atılarak üzerine 2 ml besiyeri eklendi, pipetaj yapılarak üzerine tekrar yaklaşık 6 ml besiyeri eklenerek 37 °C'de % 5 CO₂'li etüve kaldırıldı.

2.1.2. İmatinib Mesilat Dirençli K-562r Hücre Hattının Kültürü

İmatinib Mesilat direnci geliştirilmiş K-562r hücreleri üzerine 10 ml besiyeri eklenerek 37 °C'de % 5 CO₂'li etüve kaldırıldı.

2.1.3. K-562s Hücre Hattının ve K-562r Hücre Hattının Pasajlanması

Deneylerde kullanılmak üzere çoğaltılan K-562 hücre hatlarının pasajlanması şu şekilde yapıldı. Etüvde T-25 flask ve 10 ml besiyeri içinde bulunan hücreler 15 ml'lik falkona alınarak 1000 rpm'de 4 dk. santrifüj edildi ve süpernatantları atıldı. Pelet üzerine yaklaşık 10 ml besiyeri eklenerek 37 C'de % 5 CO₂'li etüve kaldırıldı.

Etüvde T-25 flask ve 10 ml besiyeri içinde bulunan bulunan K-562r hücreleri 15 ml'lik falkona alınarak 1000 rpm.'de 4 dk. santrifüj edildi ve süpernatantları atıldı. Pelet üzerine 10 ml. besiyeri eklendi. Bu hücreler T-25 flask içine alınarak üzerlerine 5 uM İmatinib konuldu.

Çizelge 2. 1. Hücre kültüründe kullanılan malzeme ve gereçler

| | |
|-----------------------------|--|
| Besi yeri | Hyclone marka, Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 (1X), No: SH30096.0 1 (L-glutaminsiz) |
| Fötal Dana Serumu (FBS) | Hyclone marka, No: SV20160.03 |
| L-Glutamin | PAA marka, 200mM (100X), No: M11-004 |
| Penisilin-Streptomisin | PAA marka, No: P11-010 |
| Hücre Dondurma tüpleri | Appllichem marka, No: 67-68-5 |
| Dimetilsülfoksit (DMSO) | Greiner bio-one marka, 2 ml |
| PBS 10X | Hyclone marka- HyQ Phosphate Buffered Saline.067M (PO4) No: SH30258.01 |
| Flask (75 cm ²) | Orange Scientific marka, No: 5520200 |

2.2. RNA İzolasyonu

K562s ve K562r hücrelerinin kültürü yapıldıktan sonra ilaç direncinden sorumlu, apoptotik ve otofajik genlerin ekspresyonu tespit etmek tüm örneklerden RNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon sırasında aşağıdaki prosedür takip edilmiştir.

-Kültür ortamındaki hücreler 300 x g'de 5 dk santrifüj edildi ve supernatan kısım atıldı.

-Pelet üzerine (1×10^6 hücreye 1 ml Trizol) Trizol eklenir ve homojenize edilmiş hücreler 15-30°C'de 5 dk inkübe edildi.

-Her tüpe 200 µl kloroform eklenir. Tüpler elle 15 sn. boyunca sallandıktan sonra 15-30°C'de 10 dk inkübe edilir. 12,000 x g.'de 2-8°C, 13 dk santrifüj edilip Santrifüj sonrası alttaki faz kırmızı fenol-kloroform fazı, ara faz ve renksiz-akıcı üst

faz olmak üzere 3 faz oluşur. RNA üst fazdadır. (DNA ara fazda ve protein ise alt fazdadır. Bu fazlar saklanır.) Bu faz yeni bir tüpe aktarıldı.

-Üzerine 0.5mL izopropil alkol eklenir. 15-30°C'de 10dk inkübe edilip tüpler 12,000 x g.de 10 dk 2-8°C'de santrifüj yapıldı. Süpernatant atılıp, 1 ml %75'lik etanol eklenir örnekler vortekslendi ve 7,500 x g.de 5 dk 2-8°C'de santrifüjlendi.

-RNA pelleti oda sıcaklığında bekletilerek kurutulup sonrasında RNA, RNaz içermeyen DEPC'li su içinde çözüldü. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrik yöntemle belirlenir (çizelge 3.1). Daha sonra %1'lik Agaroz Jel'de yürütülerek görüntülendi.

2.2.1. Agaroz Jel Elektroforezi

RNA'lar % 1'lik agaroz jelde görüntülenmiştir.

10X TBE Hazırlanışı:

Tris base 81 g

Borik asit 41,5 g

EDTA 30 ml

Tartılan kimyasallar yaklaşık 500 ml dH₂O'da çözülür, pH: 8'e ayarlanır. Son hacim 750 ml'ye tamamlanır.

Yükleme Tamponu Hazırlanışı:

Xylene Cyanol 25 mg

Gliserol 5 ml

dH₂O ile 10 ml'ye tamamlanır. Vorteksenerek karıştırılır.

Etidyum bromür (10 mg/ml stok) Hazırlanışı:

Etidyum bromür 10 mg

sdH₂O 1ml

Etidyum su içerisinde vortekslenerek çözülür.





10X TBE stok solüsyonu 10 kat sulandırılarak 1X TBE tamponu hazırlandı. 1X TBE hem agaroz jelin hazırlanması hem de yürütme tamponu için kullanıldı.

100 ml 1X TBE solüsyonuna 1 gr agaroz eklenerek mikrodalga fırında 330 derecede 4-5 dakika kaynatılarak hazırlandı. 3,5 µl ETBr eklenip iyice karıştırıldıktan sonra donmaya bırakıldı. Donduktan sonra örneklerden 5 µl ve yükleme tamponundan 1 µl pipetleme yapılarak karıştırılıp jel kuyularına yüklendi. 130 voltta 15 dakika yürütüldü.

2.3. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time PCR)

Bu çalışmada qRT-PCR yöntemi kullanılarak genlerin ifadesi kantitatif olarak analiz edilmiştir. İlk olarak hücrelerden izole edilen RNA örneklerinden 500 ng kullanılarak "Transcriptor High Fidelity c-DNA synthesis kit" ile c-DNA sentezlendi (Çizelge 2.2).

Çizelge 2. 2. c-DNA sentez protokolü

| Kalıp-Primer Mix Hazırlanışı: | | |
|--|----------------|--|
| Komponentler | Hacim | Final Konsantrasyon |
| Total RNA | Değişken | 500 ng |
| Random Hexamer Primer | 2µl | 60µM |
| H ₂ O, PCR-grade | Değişken | Son hacim H ₂ O ile 11.4 µl' ye tamamlanır. |
| Toplam Hacim | 11.4 µl | |
| 65 °C' de 10 dk  inkübasyon | | |
| Master Mix Hazırlanışı: | | |
| Komponentler | Hacim | Final Konsantrasyon |
| Transcriptor High Fidelity Revers Transkriptaz Reaksiyon Buffer (5X) | 4 µl | 1X |
| Protector RNaz İnhibitor (40 U/ µl) | 0.5 µl | 20 U |
| Deoksinükleotid Karışımı (10 mM her bir dNTP) | 2 µl | 1 mM her bir dNTP |
| DTT | 1 µl | 5 mM |
| Transcriptor High Fidelity Revers Transkriptaz | 1.1 µl | 10 U |
| Toplam Hacim | 20 µl | |
| 29 °C' de 10 dk  inkübasyon | | |
| 48 °C' de 60 dk  inkübasyon | | |
| 85 °C' de 5 dk  revers transkriptaz inaktivasyon | | |

qRT-PCR uygulamalarında kullanılacak olan apoptotik, otofajik, ilaç direncinden sorumlu ve hprt (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) (Housekeeping/referans gen: Her dokuda hücre hayatini temin için mutlak suretle ifadelenen genlerdir.) genlerine özgü primerler. "Perl Primer" programı kullanılarak tasarlandı.

Hprt: 5'F: TGACACTGGCAAAACAATGCA

Hprt: 5'R: GGTCCTTTTCACCAAGCAAGCT
 Bad : 5'F: GATGAGTGACGAGTTTGTGGA
 Bad : 5'R: CAAGTTCCGATCCCACCAG
 Bcl-2: 5' F: CGCCCTGTGGATGACTGAGT
 Bcl-2 : 5'R: GGGCCGTACAGTTCCACAA
 BIM : 5'F: ATCTCAGTGCAATGGCTTCC
 BIM : 5'R :CATAGTAAGCGTTAAACTCGTCTCC
 LYN : 5'F: GCGGAAGAACTACATTCACC
 LYN : 5'R: CCACTTAATAGGGAAGTTAGCAC
 Mdr-1 : 5'F : AAGGCATTTACTTCAAAGTTGTCA
 Mdr-1: 5'R : GGATTCATCAGCTGCATTTTC
 Mrp-1: 5' F : AGTGCTTTCAGAACACGGTC
 Mrp-1 : 5'R : TTTCCCAGAAAGAGTAGAAGAGGT
 Oct1: 5'F:TCCTCTTCCTGCTCTACTACTGG
 Oct1: 5'R:TGGTCCATTATCTTTATTGCTTCA
 Bcrp : 5'F : CCTTGGGATACTTTGAATCAG,
 Bcrp : 5'R: AGTTGACATAAATCTCCGCT
 Bax : 5' F: GACGGCAACTTCAACTGGG
 Bax: 5' R: AGGAGTCTCACCCAACCAC

"SYBR Green" floresans boyası kullanılarak primerlerin optimize edildiği sıcaklık olan 60°C'de kantitasyon (qRT-PCR) yapıldı (Çizelge 2.3).

Çizelge 2. 3. qRT-PCR protokolü

| Master Mix Hazırlanışı: | |
|--------------------------------|-----------------|
| Komponentler | Hacim |
| H ₂ O, PCR-grade | 2µl |
| Primer (10xconc) (Forward) | 0.5 µl |
| Primer (10xconc) (Reverse) | 0.5 µl |
| Sybr Green (2xconc) | 5 µl |
| c-DNA | 2µl |
| Toplam Hacim | 10 µl |
| qRT-PCR Programı: | |
| Denaturasyon | 95°C 5 dak |
| Amplifikasyon | 95°C 30 sn |
| | 60°C 30 sn |
| | 72°C 30 sn |
| Melting | 95°C 10 sn |
| | 65°C 1 dak |
| | 95°C continuous |
| Cooling | 40°C 10 sn |

2.4. İstatistiksel Analiz

Real-time sonuçlarının istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı T- testi ile analiz edildi.

2.5. Akım Sitometri ile Apoptozis Tayini

Lösemik blast hücrelerini apoptoza ve farklılaşmaya götürdüğü bilinen yüksek doz İmatinibin bu çalışmada kullanılan dozlarda, K562 hücrelerinde etkisini gösterip göstermediğini doğrulamak amacıyla akım sitometri analizleri yapılmıştır. Apoptozis tayini için, hücreler Annexin V ve propidyum iyodür ile işaretlenerek Accuri C6 cihazı ile akım sitometri analizi ile gerçekleştirilmiştir.

Annexin V ve Propidyum İyodür ile İşaretleme Protokolü:

BD Pharmingen FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit kullanılmıştır. Kitin protokolü uygulanmıştır.

- 1 ml besiyerinde 10^6 hücre olacak şekilde hücreler ependorfa aktarıldı.
- 2500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant atılıp, peletin üzerine 1X PBS eklendi. Hafifçe elle vurularak pelet çözüldü.
- 2500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant dökülüp, üzerine tekrar 1XPBS eklendi. Hafifçe elle vurularak pelet çözüldü.
- 2500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant dökülüp pelete kitten çıkan 1X Binding Buffer'dan 200 µl eklendi.
- Bu karışımdan 50 µl başka bir ependorfa aktarıldı. Aktarılan hücrelere 2,5 µl AnnexinV ve 2,5 µl PI eklendi.
- Karanlıkta 15 dakika beklendi.

- Üzerlerine 1X Binding Buffer'dan 200 µl eklendikten sonra akım sitometri analizine başlandı.

2.6. Dizi Analizi

- cDNA'dan çoğaltılan P210 PCR ürünü kullanılarak T315I, M351T, F315L, F359C/L/V mutasyonlarının bulunduğu 6. ekzonlar nested PCR ile çoğaltıldı.
- PCR örnekleri pürifikasyon aşamasından geçirildi. Bu işlem kit protokolüne uygun olarak gerçekleşti (*Promega A9281 Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System*).
- Pürifikasyon (saflaştırma) aşamasından sonra cycle sequencing (*ABI Big Dye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit*) yapıldı.

Bu aşamada,

*2µl Big Dye PCR tüplerine dağıtıldı.

*1 µl (3.2pmol) forward veya reverse primer kullanıldı (Dizide taranacak bölgeye uygun olarak tasarlanır).

*2 µl pürifiye PCR ürünü kullanıldı.

*4µl 5XBuffer

*11µl ddH₂O ile toplam hacim 20µl 'ye tamamlanarak cycle sequencing işlemi gerçekleştirildi.

- PCR ürününün içerisindeki floresan işaretli ddNTP'leri ve diğer PCR bileşenlerini uzaklaştırmak için Etanol/EDTA/sodyum asetat kullanılarak ikinci kez pürifikasyon işlemi yapıldı. Pürifiye edilen örneklerin peletleri üzerine 20 µl formamid eklenildi. Bu 20 µl pürifiye olmuş örnekler cihaza yüklenmeden önce 5 dakika denatüre edildi ve 2 dakika buzda bekletilen örnekler cihaza yüklenildi.

- Dizi analizi örneklerinin yürütülmesi için ABI 310 cihazı kullanıldı. Dizi analiz sonuçları, Chromas programı kullanılarak her örnek mutasyonlar açısından değerlendirildi.

2.7. MDC (Monodansylcadaverine) Boyama Yöntemiyle Otofagozomların Saptanması

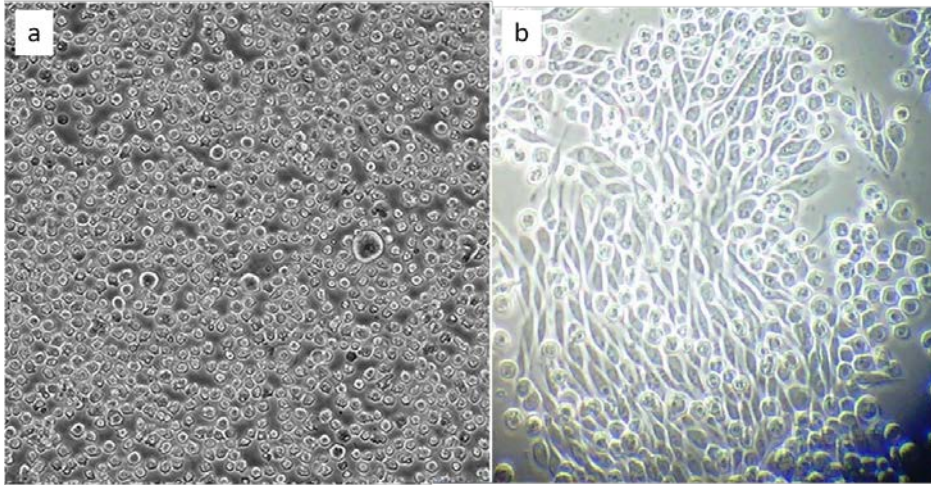
Hücrelerin otofajiye gidip gitmediğini test etmek için floresans bir boya olan ve otofagozomları boyayan MDC boyası ile hücreler muamele edildi. Boyama ve görüntüleme işlemi için aşağıdaki protokol izlendi.

- 1 ml besiyerinde 10^6 hücre olacak şekilde hücreler ependorfa aktarıldı.
- 2500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant atılıp, peletin üzerine 1X PBS eklendi. Hafifçe elle vurularak pelet çözüldü.
- 2500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant dökülüp, üzerine tekrar 1XPBS eklendi. Hafifçe elle vurularak pelet çözüldü.
- 2500 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant dökülüp pelete son konsantrasyon $500\mu\text{M}$ olacak şekilde MDC boyası eklendi.
- Karanlıkta ve 37°C 'de 15 dakika inkübe edildi.
- 15 dakika sonunda örnekler 3 kere daha PBS ile yıkandıktan hemen sonra floresans mikroskop altında incelendi.

3. BULGULAR

3.1. K562s ve K562 r Hücrelerin Mikroskopik Görüntüleri

K562s ve K562r hücreler için uygun bir besiyeri olan RPMI 37°C de ve % 5 CO₂ içeren ortamda 18 ay boyunca inkübe edilmiştir. İzole edilen ve inkübe edilen hücrelerin morfolojik görüntüleri inverted mikroskopta görüntülenmiştir.



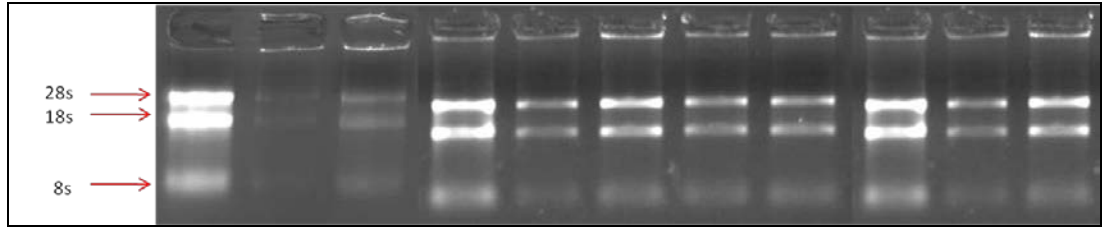
Şekil 3. 1. a) K562s ve b) K562r hücrelerin mikroskopik görüntüleri (10X10 büyütme)

3.2. RNA Bütünlük, Kalite ve Miktar Tayini

İzole edilen örnekler spektrofotometrik olarak ölçüldü (Çizelge 3.1), ardından %1'lik jele yüklenerek görüntülendi (Şekil 3.2).

Çizelge 3. 1. İzole edilen RNA örneklerinin spektrofotometrik okumaları

| Sample ID | ng/ul | 260/280 |
|-----------|--------|---------|
| K562s 0.6 | 72,27 | 1,73 |
| K562r 0.6 | 112,32 | 1,75 |
| K562s 5 | 11,99 | 1,92 |
| K562r 5 | 23,24 | 1,83 |



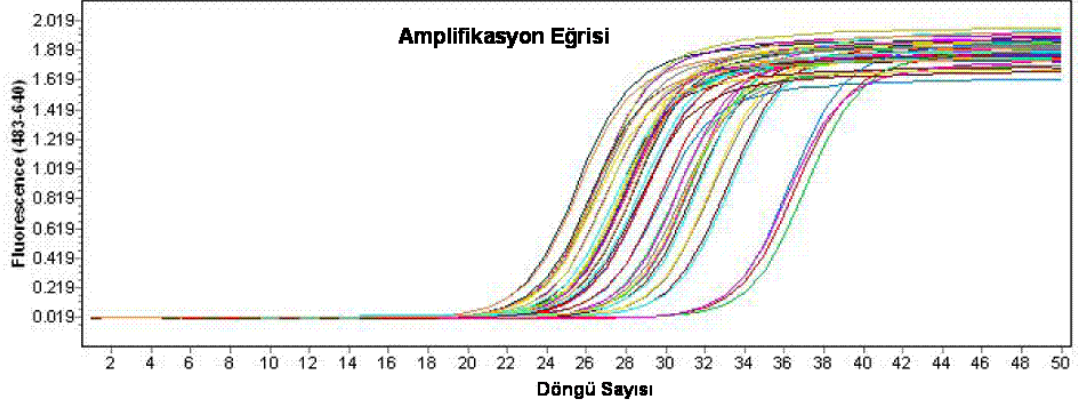
Şekil 3. 2. K562s ve K562r hücrelerden izole edilen RNA'ların %1'lik Agaroz Jel görüntüsü

3.3. Eş Zamanlı PCR (Real Time PCR, *qRT-PCR*) Bulguları

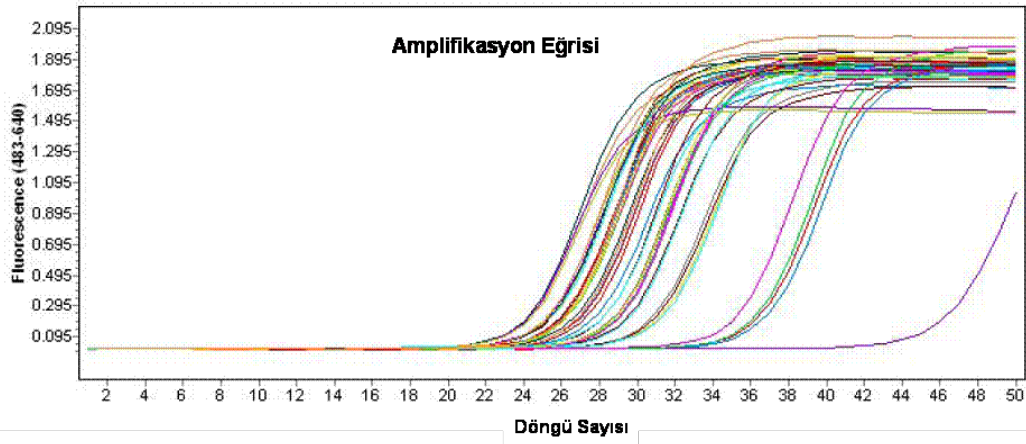
Birbirinden farklı RNA konsantrasyonuna sahip her bir örneğin, başlangıç RNA miktarı 500 ng olacak biçimde ayarlanmıştır ve cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir.

Apoptotik, otofajik ve ilaç direncinden sorumlu genler (hedef gen) ve hprt (housekeeping gen) genleri için tasarlanmış primerlerin optimizasyonu amacıyla yapılan PCR'ların ardından, elde edilen cDNA'lar ile qRT-PCR analizi gerçekleştirilmiştir.

qRT-PCR sonucu oluşan ürün miktarının artmasıyla beraber SYBR Green I daha çok bağlanmakta ve böylelikle floresan ışımaya artmaktadır. Eşik değerinin üzerinde anlamlı floresan artışı gözlenen ilk döngü sayısına sayısına Ct (Cycle Threshold) veya Cp (Crossing point) denilmektedir. Şekil 3.3'de MDR ve Şekil 3.4'de HPRT'ye ait amplifikasyon eğrisi grafikleri gösterilmektedir.



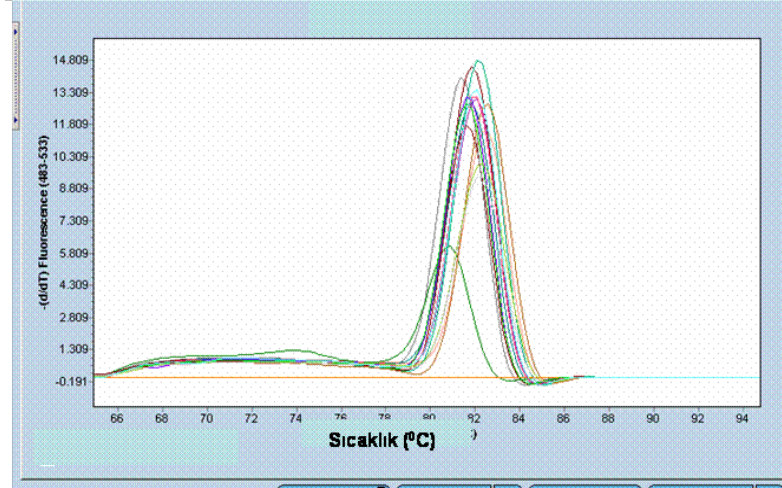
Şekil 3. 3. MDR amplifikasyon eğrisi grafiği



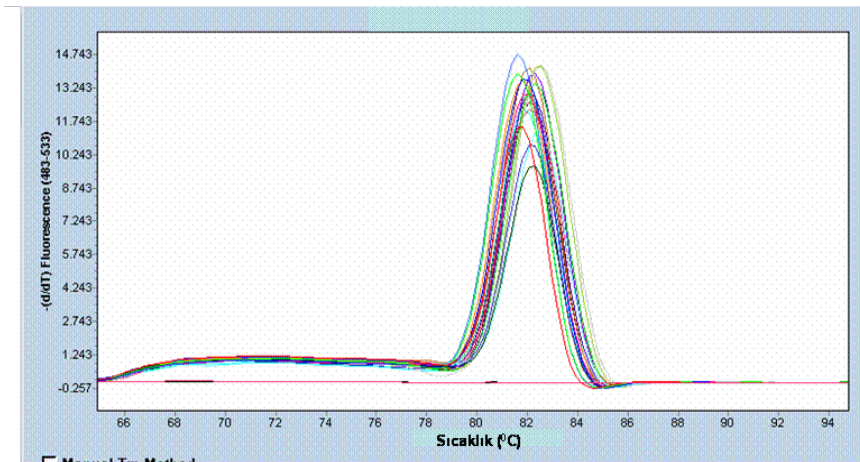
Şekil 3. 4. Hprt amplifikasyon eğrisi grafiği

qRT-PCR analizi sonucunda her bir örnek için üç adet Cp değeri oluşmuştur ve bu değerlerin ortalaması kullanılmıştır.

Her qRT-PCR analizinin ardından, çoğaltılan bölgenin istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için erime eğrisi analizleri yapılmıştır. Şekil 3.5'te MDR'ye ve Şekil 3.6'da HPRT'ye ait erime eğrisi grafikleri görülmektedir.



Şekil 3. 5. MDR erime eğrisi



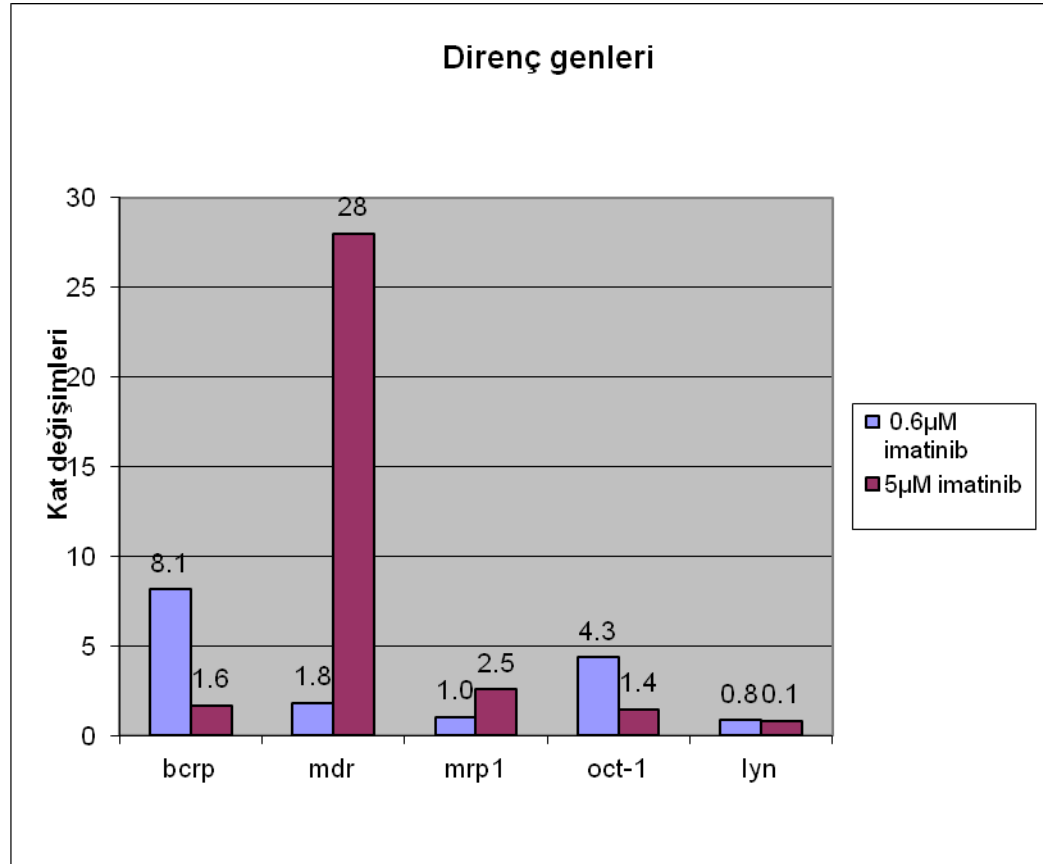
Şekil 3. 6. Hprt erime eğrisi

Gen ifade oranlarının hesaplanmasında;

$$R = \frac{(E_{\text{Hedef}})^{\Delta CP_{\text{Hedef}}(\text{Kontrol-Örnek})}}{(E_{\text{Ref}})^{\Delta CP_{\text{Ref}}(\text{Kontrol-Örnek})}}$$

formülü kullanılmıştır. Bu formül ile hesaplanan gen ifadesi oranları, log₁₀, sonuca dahil edilmesini öngörür. Bu formül ile hesaplanan gen ifadesi oranları, log₂ tabanına çevrilmiştir.

3.4. Direnç Genlerin İmatinib Uygulanması Sonrası İfadelerindeki Değişim



Şekil 3. 7. Direnç genlerinin ifadelerindeki değişim

BCRP geninin K562r hücrelerindeki ifade seviyesi K562s hücrelerindeki ifade seviyesiyle kıyaslandığında 0.6µM İmatinib uygulandığında 8 kat artış gösterirken ilacın dozu 5µM'a yükseldiğinde ifadedeki kat artışı 1.6'ya düşmesine rağmen bu değişim istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

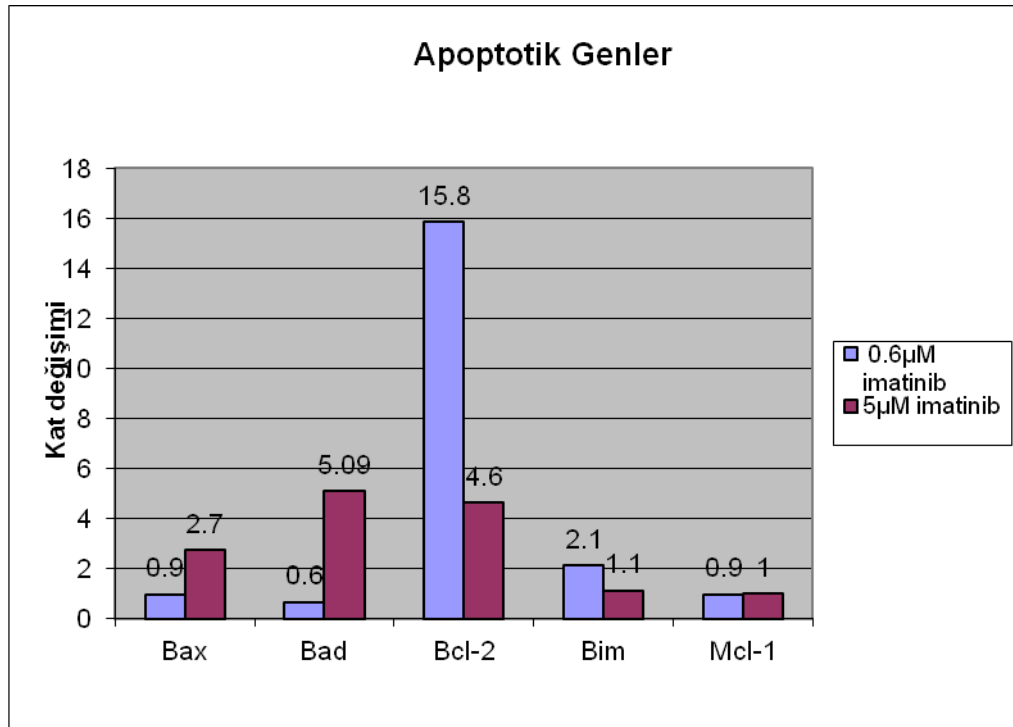
MDR-1 geninin K562r hücrelerindeki ifade seviyesi K562s hücrelerindeki ile kıyaslandığında; 0.6µM İmatinib uygulandığında 1.8 artış gösterirken ilacın dozu 5µM'a yükseldiğinde MDR gen ifadesi 28 kat artmış ve bu değer istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

MRP-1 genin ifade seviyesindeki kat artışı da ilacın dozunun 0.6µM'dan 5µM'a artmasıyla artış gösterip 1.03'den 2.5 kata yükselmiştir ($p<0.05$).

OCT1 geninin K562r hücrelerindeki ifade seviyesi K562s hücrelerindeki ifade seviyesiyle kıyaslandığında 0.6µM İmatinib uygulandığında 4.3 kat arttığı gözlenmiştir, ancak ilacın dozu 5µM'a yükseldiğinde ifadedeki kat artışı 1.4 kata düşmektedir ($p<0.05$).

LYN geninin K562r hücrelerindeki ifade seviyesi K562s hücrelerindeki ifade seviyesiyle kıyaslandığında ilacın dozunun artmasıyla bu genin ifadesinde değişiklik gözlenmemiştir.

3.5. Apoptotik Genlerin İmatinib Uygulanması Sonrası İfadelerindeki Değişim



Şekil 3. 8. Apototik genlerin ifadelerindeki kat artışları

K562r hücrelerinde BCL-2 geninin ifade seviyesi K562s hücrelerindeki ifade seviyesine göre, düşük ilaç dozunda (0.6µM) anlamlı derecede artış gösterip 15.8 kata yükselmektedir, ancak ilacın dozunun artmasıyla (5µM) ifadedeki kat artışı 4.6 kata düşmektedir ($p < 0.05$).

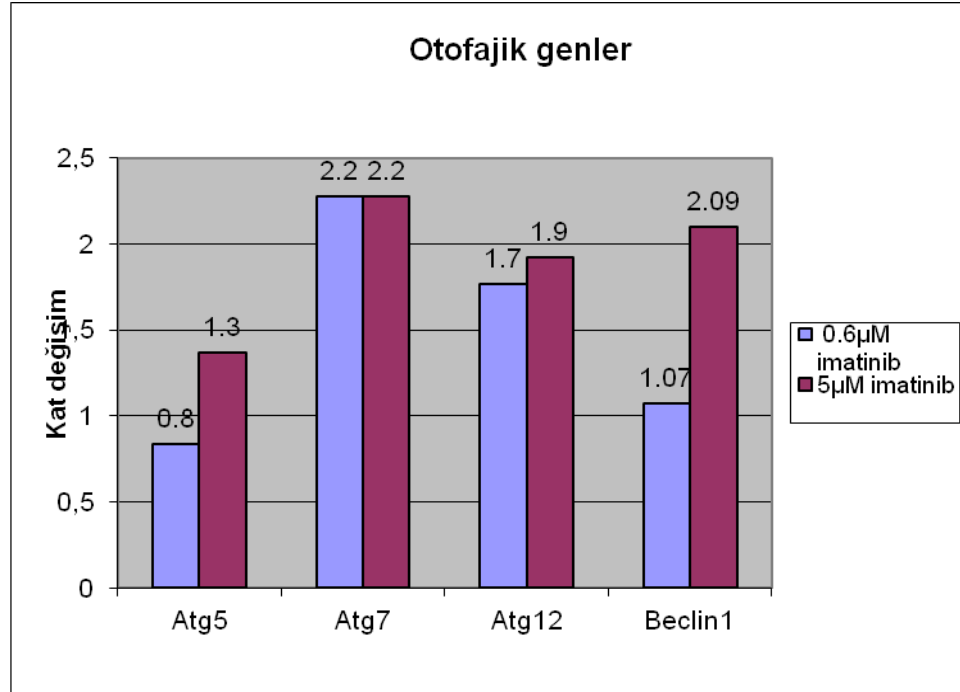
BIM geninin K562r hücrelerindeki ifade seviyesi K562s hücrelerindeki ifade seviyesiyle kıyaslandığında 0.6µM İmatinib uygulandığında ifadedeki kat artışı 2.1'iken ilacın dozunun artmasıyla ifadedeki kat artışı %50 düşüş gösterip 1.1 kata düşmektedir ($p < 0.05$).

BAD geninin K562r hücrelerindeki ifade seviyesi K562s hücrelerindeki ifade seviyesine göre 0.6µM İmatinib uygulandığında ifadedeki kat artışı 0.6 iken ilacın dozunun artmasıyla 5 kat artış göstermiştir ($p < 0.05$).

BAX geninin K562r hücrelerindeki ifade düzeyi, K562s hücrelerindeki ifade seviyesine göre anlamlı bulunmuş olup, 0.6 μ M İmatinib uygulandığında ifadedeki kat artışı 0.9 kat iken ilacın dozunun artmasıyla bu oran 2.7 kat düzeyine çıkmıştır ($p<0.05$).

MCL-1 geninin ifadesindeki kat artışının her iki dozda aynı olduğu gözlenmiştir.

3.6. Otofajik Genlerin İmatinib Uygulanması Sonrası İfadelerindeki Değişimler



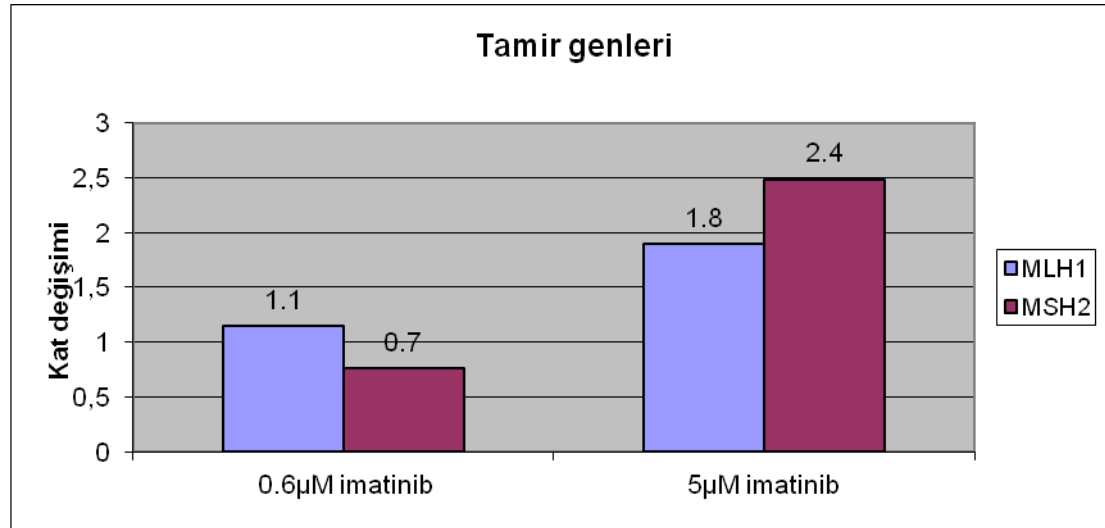
Şekil 3. 9. Otofajik genlerin ifadelerindeki kat artışları

BECLIN1 geninin K562r hücrelerindeki ifade seviyesi K562s hücrelerindeki ifade seviyesiyle kıyaslandığında 0.6 μ M İmatinib uygulandığında 1 kat artış gösterirken ilacın dozu 5 μ M'a yükseldiğinde ifadedeki kat artışı anlamlı derecede artarak 2 kata ulaşmıştır ($p<0.05$).

ATG7 geninin ifadesindeki kat artışı her iki dozda aynı olduğu ve böylece ilacın dozunun artmasının bu genin ifadesini değiştirmediği gözlenmiştir ($p>0.05$).

ATG5 ve ATG12 genlerinin K562r hücrelerindeki ifade seviyesi K562s hücrelerindeki ifade seviyeleriyle kıyaslandığında ilacın dozunun artmasıyla bu genlerin ifadesindeki kat artışı, istatistiksel düzeyde anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).

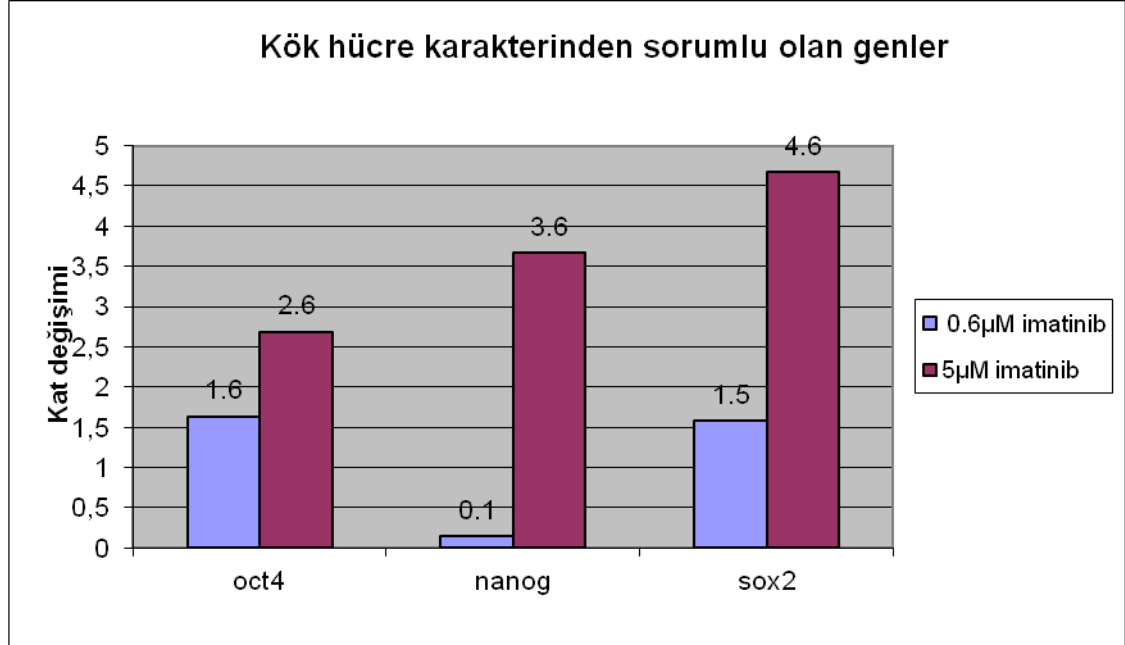
3.7. DNA Tamir Mekanizmasındaki Genlerin İmatinib Uygulanması Sonrası İfadelerindeki Değişimler



şekil 3. 10. DNA tamir mekanizmasındaki genlerin ifadelerindeki kat artışları

MLH1 ve MSH2 genlerinin ifadeleri K562r hücrelerinde K562s hücrelerine göre kıyaslandığında bu genlerin ifadeleri ilacın dozunun artmasıyla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yükselmiştir, MLH1 ve MSH2 genlerinin ifadelerindeki kat artışı 0.6µM İmatinib uygulandığında sırayla 1.14 ve 0.76 katken ilacın dozunun 5µM'a yükselmesiyle 1.89 ve 2.48 kata yükseldiği gözlenmiştir ($p<0.05$).

3.8. Kök Hücre Karakterinden Sorumlu Genlerin İmatinib Uygulanması Sonrası İfadelerindeki Değişimler



Şekil 3. 11. Kök hücrede kendini yenilemeden sorumlu genlerin ifadelerindeki kat artışları.

NANOG geninin K562r hücrelerindeki ifade seviyeleri K562s hücrelerindeki ifade seviyesiyle kıyaslandığında bu genin ifadesinin İmatinib'in dozu 0.6μM'dan 5 μM'a yükseldiğinde anlamlı derecede artış gösterdiği ve bu artışın istatistiksel düzeyde anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$).

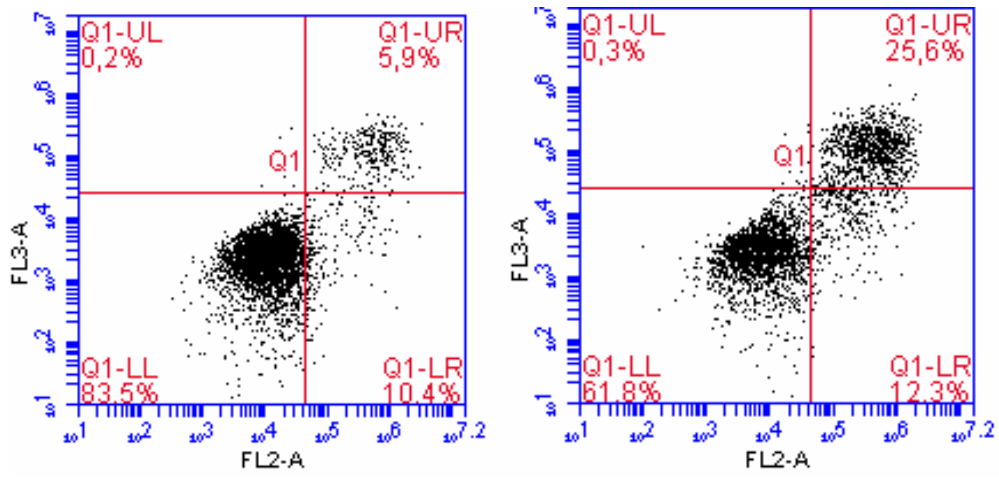
SOX-2 geninin K562r hücrelerindeki ifade seviyesi K562s hücrelerindeki ifade seviyesiyle kıyaslandığında 0.6μM İmatinib uygulandığında 1.5 kat artış gösterirken ilacın dozu 5 μM'a yükseldiğinde ifadedeki kat artışı 4.66'ya yükselmiştir ($p < 0.05$).

OCT-4 geninin K562r hücrelerindeki ifade seviyesi K562s hücrelerindeki ifade seviyesine göre 0.6μM İmatinib uygulandığında 1.6 kat artış gösterirken ilacın dozu 5 μM'a yükseldiğinde ifadedeki kat artışı 2.6'ya yükselmiştir ($p < 0.05$).

3.9. Akım Sitometri Analizi ile Apoptozis Tayini

Hücelere uygulanan tüm dozların apoptotik etkilerini araştırmak amacıyla her doz için örnek alınmıştır. Örnekler, Propidyum İyodur (PI) ve Annexin V ile işaretlenerek akım sitometri analizi yapılmıştır. PI, akım sitometride FL-2 filtresinde ışığa veririrken, Annexin-V FL-1 filtresinde ışığa vermektedir.

Annexin V erken apoptozis, propidyum iyodur ise geç apoptozis ve nekrozu tayin etmektedir.

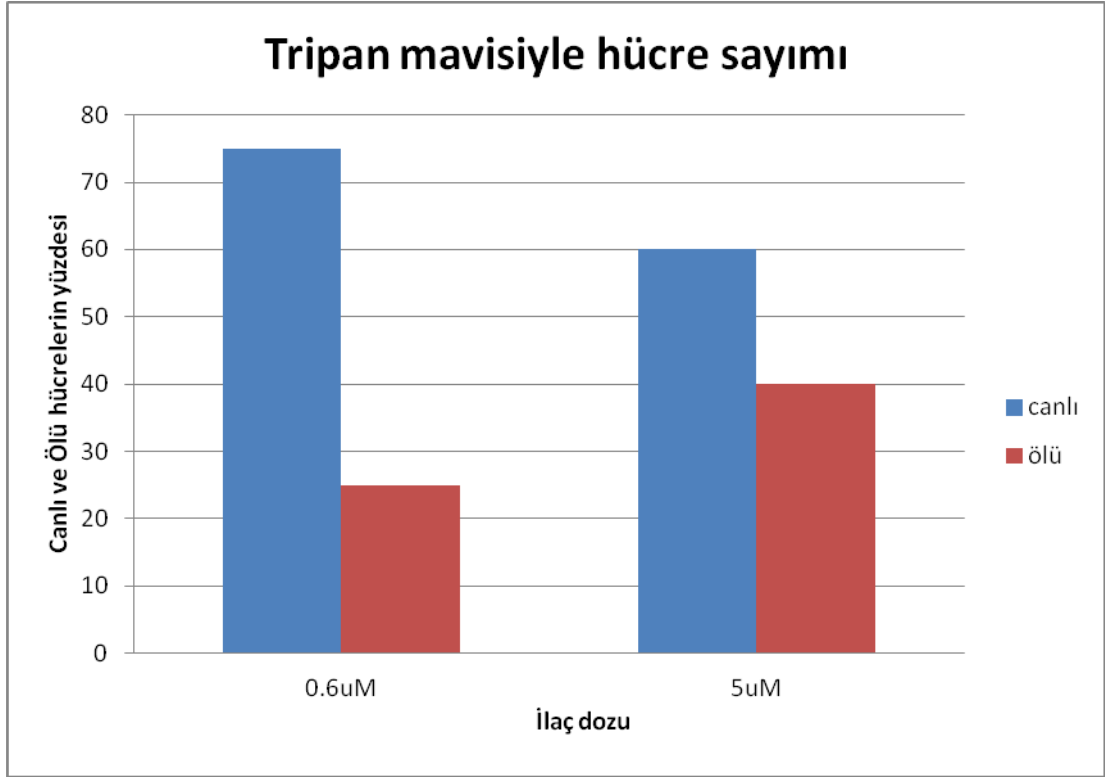


Şekil.3.12. Sırasıyla 0.6μM ve 5 μM imatinib dirençli hücrelerin akım sitometri sonuçları.

Sonuçlara göre,

- 0.6μM imatinib uygulanan K652r hücrelerinde ileri apoptozda olan hücre sayısı %5.9'dur.
- 5μM imatinib uygulanan K652r hücrelerinde ileri apoptozda olan hücre sayısı %25.6'dır.

3.10. Ölü ve Canlı Hücre Oranlarının Belirlenmesi



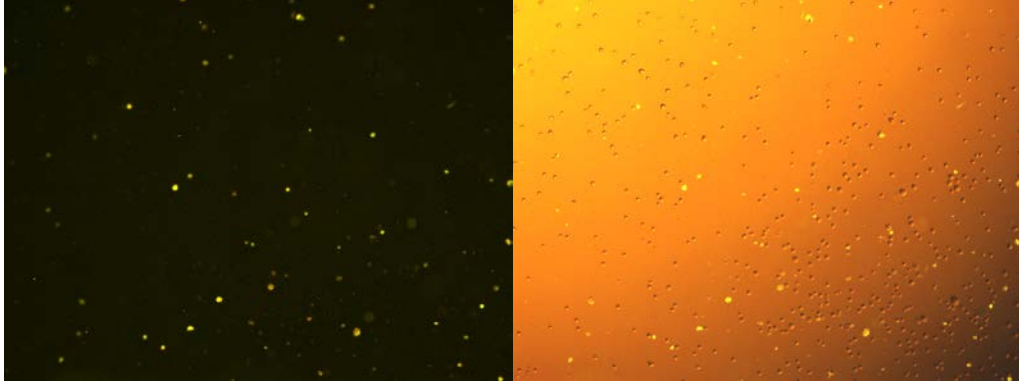
Şekil.3.13. Tripan mavisi boyanmasıyla ölü ve canlı hücrelerin belirlenmesi

K562r hücrelerinde canlılık ve ölüm yüzdesini belirlemek için tripan mavisi ile boyama yöntemi kullanıldı. 0.6µM ve 5µM İmatinib uygulanan K562r hücrelerinin tripan mavisi ile boyanan hücreleri sayma yöntemiyle ölüm ve canlılık oranları ve yüzdesi hesaplandı.

0.6µM İmatinib uygulanan hücrelerde canlı hücre oranının yüzdesi %75'iken ölü hücre oranının yüzdesi %25 olarak bulunmuştur. İlacın dozunun 5µM artmasıyla hücre canlılık oranının %60'a düştüğü ve ölü hücre oranının yüzdesinin de %40'a yükseldiği gözlenmiştir.

3.11. Annexin V İle Boyanan Hücrelerin Floresans Mikroskop Görüntüleri

A) 0.6µM İmatinib



B) 5µM İmatinib

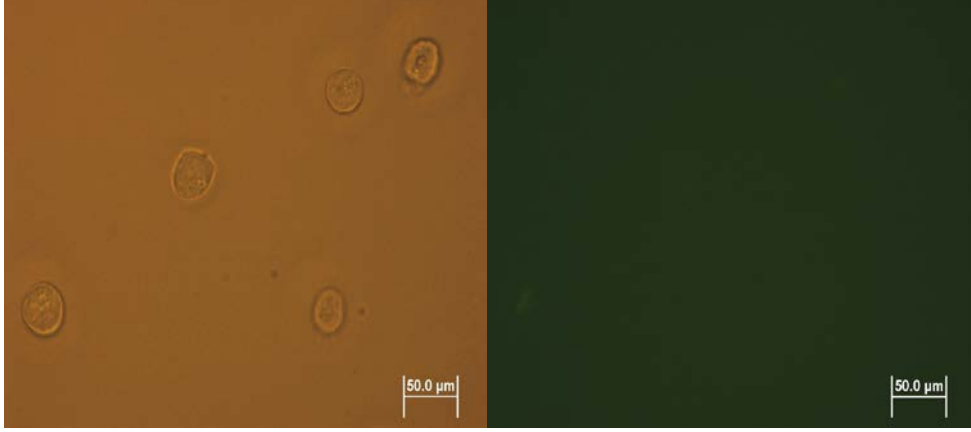


Şekil.3.14. Annexin V ile boyanan hücrelerin floresans mikroskop görüntüleri

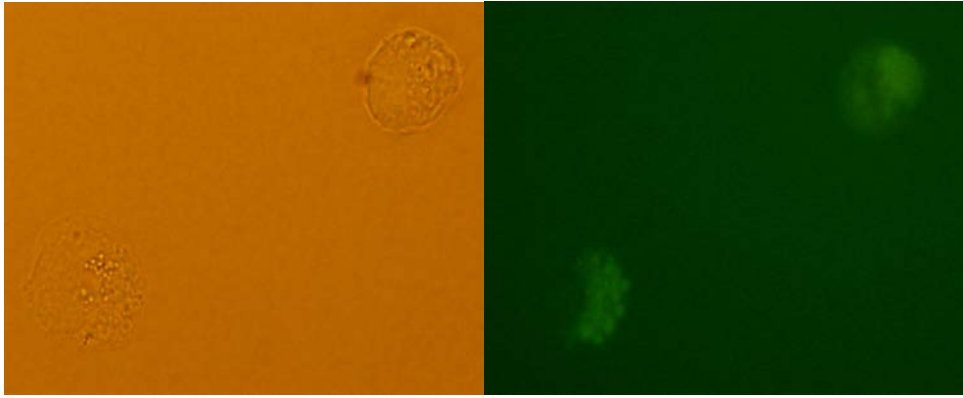
Yüksek doz İmatinib uygulanan hücrelerde ölüm oranının %25'ten %40'a yükseldiği ve bununla paralel olarak apoptotik hücre oranının da % 5.9'dan %25.6 artış gösterdiği saptanmıştır (yeşil hücreler: annexin V pozitif apoptotik hücreler).

3.12. MDC (Monodansylcadaverine) Boyama Yöntemiyle Otofagozomların Saptanması

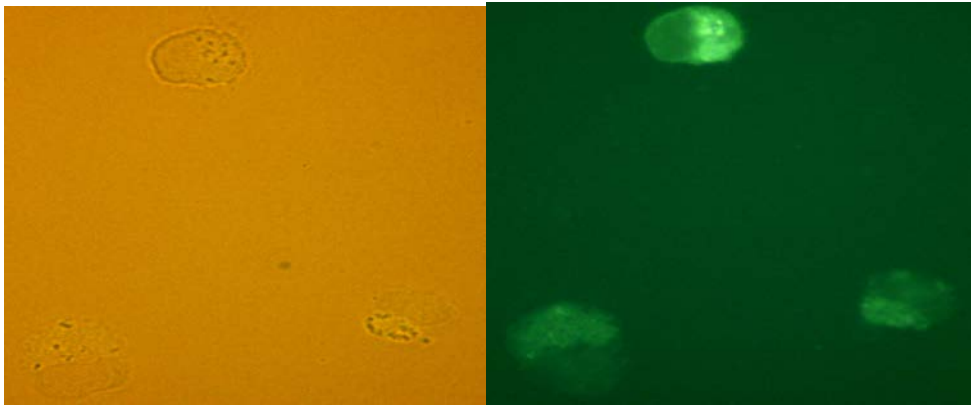
a)K562s



b)K562r 0.6µM



c)K562r 5 µM



Şekil.3.15. MDC (Monodansylcadaverine) boyama yöntemiyle otofagozomların saptanması

İmatinib uygulanmayan K562s hücrelerinde otofaji bulunmazken, K562r 5 μ M hücrelerinde otofagozomlar K562r 0.6 μ M ile kıyaslandığında daha sıklıkla görüntülenmiştir.

3.13. Dizi Analiz yöntemiyle Mutasyon Analizi

DNA yapısında, İmatinib'in dozunun artmasıyla mutasyon oluşup oluşmadığı dizi analizi yöntemiyle incelendi.

K562s , K562r (0.06 μ M) ve K562r (5 μ M) hücreleri analiz edildi ve hücrelerin hiçbirinde mutasyona raslanmadı.



Şekil.3.16. Dizi analizi sonuçları

4. TARTIŞMA

4.1. İmatinib'in Taşıyıcı Genler Üzerindeki Etkisi

İmatinib ve diğer TKI'ler KML hastalığının tedavisinde kullanılarak hayatta kalma şansını artırmaktadır ama hastaların bazılarında TKI'lerine özellikle İmatinibe karşı direnç gelişmekte ve tedavinin başarısız olmasıyla hastalığın yeniden nüks etmesine neden olmaktadır.

KML'de ilaç direnciden sorumlu BCR-ABL'den bağımsız yolaklar; ilaç taşınmasından sorumlu taşıyıcı proteinlerinin ifade seviyelerindeki artış ve azalma, apoptoz sinyal yollarının inhibisyonu, otofajinin indüklenmesi ve transkripsiyon faktörlerindeki değişimler KML tedavisinin başarısızlığında görevli diğer mekanizmalar arasında yer almaktadır.

Bu tez çalışmasında *in-vitro* ortamda insan KML hücresi K562 hücre serisi kullanılarak İmatinib direnciden sorumlu mekanizmalar incelenmiştir. 18 ay boyunca K562 hücrelerine (K562s) İmatinib uygulanarak 5µM İmatinibe karşı dirençli (K562r) hale getirilmiştir. Daha sonra bu dirençli hücrelerde ilaç influks ve efluks genleri, pluripotent kök hücre karakterinde rol oynayan genler, apoptoz ve otofajiden sorumlu genler ve tamirden sorumlu gen ifade değişimleri kıyaslanarak ilaç direncinde etkili olabilecek yollar incelenmiştir.

Yapılan çalışmalarda ilaç taşınmasında sorumlu taşıyıcı proteinlerinin ifade seviyesindeki artış ve azalma incelenmiştir, efluks pompası olan MDR/ABCB1'nin yüksek ifadesi nedeniyle oluşan direncin hücre ölümünün inhibisyonuyla ilişkili olduğu ve MDR1'in kaspaz-bağımlı apoptoz, UV radyasyon, serum açlık durumu ve spontan apoptoza karşı ek koruma gelişmesine neden olduğu bulunmuştur (Robinson ve ark., 1997; Pallis ve ark., 2003).

Souza ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları çalışmada ilaç uygulanması sonucunda indüklenen MDR1 ifadesinin BCR-ABL ifade eden hücrelerde kendi ilaç-efluks aktivasyonundan bağımsız apoptoza karşı direncin ilerlemesine neden olduğu bulunmuştur.

În-vitro deneylerinden elde edilen bilgiler, İmatinib duyarlı KML hücre serilerinde MDR1'in indüklenmesine ve böylece ilaç direncinin gelişimine neden olduğunu göstermiştir (Mahon ve ark., 2000; Assef ve ark.,2009).

Mahon ve arkadaşları 2003 yılında yaptıkları çalışmada çoklu ilaç direnci olan KML hücrelerinin çok sayıda ilaca örneğin İmatinibe karşı direnç gösterdiği ve BCR-ABL ifade eden hücre serilerinde MDR1 geninin retroviral transdüksiyon aracılığıyla indüklenerek bu genin yüksek ifadesinin İmatinib direncine neden olduğu bulunmuştur.

Diğer bir *in-vitro* çalışmada İmatinib dirençli KML hücre serilerinde MDR1 geninin susturulması, bu pompanın substratıyla bağlanmasının engellenmesine ve İmatinibe karşı oluşan duyarlılığın indüklenmesine neden olduğu gözlenmiştir (Rumpold ve ark., 2005).

În-vivo çalışmalardan bazıları MDR1'in KML'deki İmatinib direncindeki rolüyle tutarlı bulgular vermemektedir. Zang ve arkadaşlarının 2005 yılında fare kemik iliği üzerinde yaptıkları çalışmada, hematopoetik kök hücrelerinde MDR1 geninin ifadesinin İmatinib direncini etkilemediği gösterilmiştir. Diğer bir *in-vivo* çalışmada ise KML akselere fazında olan hastalarda İmatinib tedavisinin MDR1 genini ifade eden hücrelerin ve efluks fonksiyonunun artmasına neden olduğu bulunmuştur. Ancak İmatinibe dirençli olan KML hastalarında efluks fonksiyonunun MDR1 geninin ifadesinden bağımsız olduğu ve diğer ABC protein taşıyıcılarının etkili olduğu öne sürülmüştür (Stromskaya ve ark., 2008).

Bu tez çalışmasındaki MDR-1 gen ifadesindeki sonuçlar incelendiğinde, hem 0.6µM İmatinibe dirençli (K562r) hücrelerde, hem de 5µM (K562r) İmatinib

uygulanan hücrelerde, Stromskaya ile Zang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaların aksine diğer tüm çalışmalarla uyumlu olarak, MDR-1 gen ifadesinin arttığı belirlenmiştir. Özellikle bizim çalışmada 5µM İmatinib uygulanan hücrelerde MDR-1 geninin ifadesinin 28 kat artarak, çok yüksek ifade edildiği ve bu genin yüksek ifadesinin primer olarak ilaç direncine katkıda bulunduğu görüşünü desteklediği sonucuna varılmıştır.

ABC süper ailesinin diğer bir üyesi olan BCRP/ABCG2 efluks taşıyıcı proteininin de ilaç direncinde rolü olduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır. Brendel ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları çalışmada BCRP/ABCG2 ifadesinin İmatinib direncinde etkili olduğu ve K562 hücrelerinde İmatinibin hücredeki birikiminin azalmasına neden olduğu gösterilmiştir, bu etkileri teyit etmek içinde BCRP/ABCG2 inhibitörü olan fumitremorgin C (FTC) kullanılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen diğer önemli veri, İmatinibin az konsantrasyonda hücreye verilmesi sonucunda ilacın hücre içi birikiminde farklılıklara neden olduğu ama konsantrasyonda farklılıkların olmadığı gözlenmemektedir. Bu veriler İmatinib'in konsantrasyon seviyesine bağlı olarak modülatör veya substrat olarak işlem yaptığı teorisinin güçlenmesine neden olmaktadır. İmatinib BCRP ile etkileşime girmektedir ve bu proteinin yüksek ifade olmasıyla İmatinibin etkilerinin sınırlanmasına neden olmaktadır (Gabriela Nestal ve ark., 2012) Ama henüz İmatinibin BCRP'nin taşıyıcının substratı ya da modülatörü olduğuna dair kesin sonuçlar bulunmamaktadır.

2006 yılında Nakanishi yaptığı çalışmada BCR-ABL ifade eden hücre serilerinde İmatinib ve BCRP arasındaki etkileşim araştırılmıştır, kullanılan hücre serisi İmatinib gibi BCRP'nin substratlarına karşı dirençliken bu direnç BCRP inhibisyonuyla tersine dönüştürülmüştür. Diğer önemli bulgu ise BCRP nedeniyle oluşan ilk ilaç direncinin BCR-ABL inhibisyonu sonucunda azaldığı gözlenmiştir ve buda BCR-ABL'ın BCRP geninin ifadesini transkripsiyonun sonraki aşamalarında regüle ettiğini önermektedir.

Bu tez çalışmasında BCRP geninin ifadesi, ilacın dozunun artmasına bağlı olarak dirençli hücrelerde istatistiksel düzeyde anlamlı bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir. İn vitro İmatinib direnci gelişiminde BCRP'nin etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır.

Taşıyıcı pompaların diğer ailesi olan influks proteinlerin de ilaç direncinde önemli rol oynadığı yapılan laboratuvar ve klinik deneylerle teyit edilmiştir. İçe alım pompalarının en önemli üyelerinden SLC22A1/OCT-1'in ifade seviyesindeki değişiklik ilacın hücre içine alımını etkilemektedir.

Giderek artan sayıdaki birçok bilimsel çalışma bazı kemoterapötiklerin influks taşıyıcıları için substrat olduklarını göstermiştir. Son zamanlarda, İmatinib'in hücre içine tercihen OCT1 aracılı olarak transport edildiği ve bu taşıyıcının ifadesinin 6 ay İmatinib tedavisinin ardından tam sitogenetik remisyonun kazanımı için öngörücü bir belirteç olduğu rapor edilmiştir (Wang ve ark., 2008). Yapılan başka bir çalışmada ise hücrenin, OCT1 inhibitörüne maruz bırakıldığında, İmatinib influksunun anlamlı derecede azaldığı gözlenmiştir (Thomas ve ark., 2004).

Crossman ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları çalışmada, OCT1 geninin ifade seviyelerinin İmatinibin içe alımının azalmasıyla ilişkili olup olmadığı analiz edilmiş, bu nedenle İmatinib tedavisine başlamayan KML hastalardan elde edilen örneklerden OCT1 ifadesinin değişken olduğu ve sağlıklı bireylerin kemik iliğinden elde edilen ifade seviye sonuçlarıyla kıyaslandığında anlamlı bir farklılık gözlenmediği bulunmuştur. Ama İmatinibe yanıt veren hastalarda bu genin ifadesi, yanıt vermeyen hastalarla kıyaslandığında anlamlı derecede arttığı gözlenmiştir.

OCT1 ve İmatinib tedavisinin yanıtı arasında doğrudan bir ilişki olduğunu gösteren yayınların aksine Hu ve arkadaşları 2008 yılında yaptıkları çalışmada OCT1'in kendi başına İmatinib birikimini etkileyemeyeceğini ve bu ilacın OCT1 için yetersiz bir substrat olduğunu öne sürmektedir. Diğer yandan 2008 yılında Wang ve arkadaşları yaptıkları çalışmada İmatinibin klinik yanıtlarının OCT1, MDR1, BCRP taşıyıcıları tarafından etkilenebileceği önerilmiştir. Tedavi öncesi yüksek OCT1 ifade

seviyesine sahip olan hastaların sitogenetik yanıt alma ve hayatta kalma ihtimallerinin yüksek olduğu gözlenmiştir ama aynı veri MDR1, BCRP taşıyıcıları için bulunmamıştır (Wang ve ark., 2008).

Bu çalışmanın sonuçları, yukarıdaki yapılan çalışmalara uygun olarak ilacın dozunun 0.6 μ M'dan 5 μ M'a yükselmesiyle OCT-1 geninin ifadesinde azalma gözlenmiştir. Bu genin düşük ifade edilmesinin. İmatinib'e in vitro direnç gelişiminden sorumlu bir mekanizma olduğu ve etkisini ilaç alımının azalmasına neden olarak dirence katkıda bulunduğu sonucuna varılmıştır.

4.2. İmatinib Direncinde Otofajik ve Apoptotik Genlerin Rolü

KML'de gelişen ilaç direncinde, BCR-ABL'dan bağımsız diğer mekanizmalar arasında yer alan apoptoz yolağının inhibisyonu ve otofajinin indüklenmesi de bulunmaktadır. BCR-ABL tirozin kinazın apoptoz yolağının bloklanmasındaki rolü RAS aktivasyonu, BCL2 geninin ifade edilmesi (Sanchez-Garcia ve ark.,1995) ve PI3K/AKT yolağının aktivasyonuyla bağlantılıdır (Skorski ve ark., 1995).

Kantarjian ve arkadaşları 2002 yılında yaptıkları çalışmada İmatinib'in BCR-ABL transforme hücrelerde apoptozu indüklediğini göstermiştir. BCL-2 ailesinin apoptotik ve antiapoptotik proteinlerinin ifade seviyeleri apoptoz yolağının belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Antiapoptotik ve proapoptotik proteinlerinin üyelerinin birbirine olan oranı hücrelerinin apoptoza gidip gitmediğini belirlemektedir (Oltvai ve ark., 1995).

BCR-ABL1 transforme edilmiş karaciğer kökenli, BAD ve BIM genleri olmayan hematopoetik projenitör hücreleride ve BIM geni RNA interferans aracılığıyla susuturulmuş olan KML hücre serilerinden elde edilen sonuçlara göre, BCR-ABL1TK inhibitörlerinin uygulanması sonucunda apoptoza giden KML hücrelerinde BIM' in önemli rolünün olduğu BAD ve BMF proteinlerinin de bu sürece destek verdiği bulunmuştur (Kuroda ve ark., 2006; Kuroda ve ark., 2007).

Başka bir çalışmada KML hastalarının %36'sında BIM ifadesinin hipermetilasyon sonucunda baskılandığı ve bunun da İmatinib tedavisinin istenmeyen sonuçlarıyla ilişkili olduğu bulunmuştur (San José-Eneriz ve ark., 2009). Bu çalışmalara istinaden KML hücrelerinin hayatta kalmasında BCL-2 protein ailesi ve BCR ABL1 TK arasındaki bağlantı önemlidir, BCL2 ailesinin proteinlerinin regülasyonu yeni-nesil hedefe yönelik tedavileri oluşturabilmektedir. Örneğin ABT-737 gibi BH3-only proteinleri taklit eden küçük moleküllerin yapılmasının ardından BCR-ABL1TKI ile birlikte kullanılmasının ilaç direnci gösteren KML hücrelerinde de önemli ölçüde apoptozu artırdığı saptanmıştır

Bu tez çalışmasında, düşük doz İmatinib'e dirençten antiapoptotik BCL-2 gen ifadesi sorumluyken, yüksek doz ve uzun süre İmatinib uygulandığında BCL-2'nin ifadesinde azalma izlenmiş, pro-apoptotik genler BAX ve BAD genlerinin ifadesinde artış gözlenmiştir.

Normal hematopoetik hücrelerde, büyüme faktörlerinin yokluğunda otofaji, geri dönüşüm fonksiyonu olarak hücrel enerji homeostazisi ve biyoenerjetiklerin korunmasında rol oynamaktadır. Büyüme faktörlerinin yokluğunda, otofajinin hücre korunmasındaki fonksiyonu, apoptotik mekanizmanın yokluğunda gözlenmektedir çünkü normal koşullarda her hangi bir yoksunlukta apoptoz indüklenmektedir (Lum ve ark., 2005).

2009 yılında Bellodi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, İmatinibe maruz kalan KML hücrelerinde otofajinin indüklendiği ve otofajinin KML hücrelerinin hayatta kalmasında önemli rolü olduğu ve KML hücrelerinde otofajinin apoptoza göre daha erken indüklendiği gösterilmiştir. KML kök hücrelerinde TKI'lerinin apoptozu indüklemesindeki başarısızlığın, otofaji aktivasyonunun apoptoza karşı baskın olması nedeniyle açıklamışlardır.

Lisa ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları çalışmada BCR-ABL'ı ifade eden hücrelerde iki farklı ilaç kullanarak bu hücrelerin ilaca verdikleri yanıt ve BCR-ABL geninin yüksek ifade edilmesinin etkisi araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre

ilaç tedavisinde otofajinin indüklenmesinin lösemik hücrelerin hayatta kalmasını sağladığı bulunmuştur. Etoposide kullanılarak BCR-ABL genini düşük seviyede ifade eden hücrelerde apoptoz indüklenmiştir ancak BCR-ABL genini yüksek seviyede ifade eden hücrelerde apoptoza karşı direnç oluşmuştur ancak otofaji indüklenmiştir. Otofajinin hücrelerin geri kazanılmasında önemli rol oynadığı ve otofajinin 3MA veya siRNA'larla ATG7 ve BECLIN1 genlerinin susturulmasıyla inhibisyonunun hücre geri kazanılması ve üremesinin azalmasına neden olduğu tespit edilmiştir.

Otofaji indüklenmesindeki etken moleküler mekanizmaların detayları tam olarak bilinmemektedir ama öyle görünüyor ki otofaji süreci memelilerde PI3K/AKT/mTOR bloklanmasıyla ve BH3-“only” proteinlerinin aktivasyonu ile başlayabilmektedir (Crowley ve ark., 2011; Sheng ve rak., 2011)

BCL2'nin apoptoz ve otofaji yollarının baskılanmasındaki önemli rolü bu proteinin ilaç tedavilerinde hedef olarak seçilmesine neden olmuştur. BECLIN1 ve BCL2 genlerinin ifade seviyeleri tümör oluşumu sırasında ve ilaç tedavi sürecinde hücrelerin apoptoz veya otofaji direncinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. BCL2 ailesi, BECLIN1'in BH3 bölgesine bağlanarak kompleks oluştururlar BECLIN1'in pre-otofagozomal yapının oluşumundaki etkisinin engellenmesine neden olduğu bulunmuştur.

Apoptoz inhibisyonu ve otofajinin etkisi kanserdeki ilaç direncinden sorumlu olduğu son zamanlardaki yapılan çalışmalarda belirlenmiştir, Apoptoz ve otofaji arasındaki ilişkinin daha net belirlenmesi nedeniyle tedavide yeni ilaçların üretimi sağlanmıştır örneğin BH3 taklitçileri bu amaçla kullanılmaktadır. BH3 taklitçileri apoptoza dirençli hücrelerde, hücre ölümüyle ilişkili otofajinin indüklenmesine neden olabilmektedirler. Apoptozun baskılanması otofajinin indüklenmesine diğer yandan otofajinin inhibisyonunun apoptoza neden olduğu bulunmuştur. Otofajinin önemli proteinleri apoptozun indüklenmesinde ve baskılanmasında etkili olduğu ve aynı şekilde apoptozu baskılayan proteinlerin otofajinin bloke edilmesinde rolü olduğu düşünülmektedir. Örneğin otofaji proteini BECLIN1'in antiapoptotik

proteini olan BCL-2 ile oluşturduğu kompleksin otofajinin indüklenmesine neden olduğu bulunmuştur.

Araştırmacıların son zamanlarda yaptıkları çalışmalar BCL2 ve BECLIN1'in oluşturduğu kompleksin parçalama amaçlı yapılmaktadır, böylece ilaç tedavisinin başarı şansının artırmasına neden olmaktadır.

Bu tez çalışmasında hücrelere uygulanan ilacın dozunun artmasıyla, BCL2 geninin ifadesi azalmış ve BECLIN1 genin ifadesi artmıştır, yapılan diğer çalışmalara uygun olarak otofaji inhibitörü olarak bilinen BCL-2'nin ifadesindeki azalma ile BECLIN1'in serbest kalmasına neden olmuştur, ayrıca otofaji belirteci olan BECLIN1 ifadesinin istatistiksel olarak anlamlı artışı nedeniyle otofajinin tetiklendiği anlaşılmıştır. Tüm bu sonuçlara göre yüksek doz İmatinib'e cevapta otofajinin aktif rol oynadığı sonucuna varılmıştır.

Diğer yandan poroapoptotik gen olan BAX ve BAD genlerinin dozu ilaç miktarı arttıkça yükselmiştir buda ilacın etkisi nedeniyle hücrelerde gözlenen %40 apoptotik ölümün apoptoz ölüm yolağını seçmektedirler, aynı zamanda otofajik genlerdeki (ATG5, ATG7, ATG12, BECLIN1) ifadelerin ilaç dozunun artmasıyla yükseldiği ve ilacın etkisinden kaçan hücrelerin hayatta kalma yolağı olarak otofajiyi seçtiği ve böylece ilaca direnç gösterdikleri düşünülmüştür.

4.3.İmatinib'in DNA Tamir Genleri Üzerindeki Etkisi

Çoklu ilaç direncinde etkili olan mekanizmalar arasında DNA tamir mekanizmasının aktivasyonu da yer almaktadır.

Bu tez çalışmasında da DNA tamir mekanizmasında sorumlu yanlış baz eşleşme tamir mekanizmasında rol alan MLH1 ve MSH2 genlerinin ifade düzeyleri araştırılmıştır ve bu genlerin ifadesinin K562r hücrelerinde K562s hücrelerine göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

MutS ve MutL genlerinin ifadeleri İmatinib'in dozuna ve süresine bağlı olarak artış göstermektedir ve bu genlerin artışı nedeniyle DNA tamir mekanizmasının aktive olması nedeniyle hücrelerin apoptoza ve İmatinibe direnç gösterdiği sonucuna varılmıştır.

Lösemide bu konuda yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamaktadır, solid tümörlerde ise farklı olarak ilaca direnç gösteren hücrelerde MSH2 ve MLH1 gen ifadelerinin azalmasının ilaç direncinde ve daha agresif fenotipden sorumlu olduğu bilinmektedir. Ancak bizim çalışmada MLH1 ve MSH2 miktarının artması nedeniyle özellikle İmatinibe karşı gelişen dirençte MMR'rol oynayan genlerin ifadesindeki artışın hücreleri apoptozdan koruyucu bir mekanizma olarak çalıştığı ve böylece dirençten sorumlu olabileceği yorumu yapılmıştır. Bu sonuçlar lösemide özellikle K562 KML hücrelerinde dirençle ilgili ilk veri olması nedeniyle önemlidir.

4.4. İmatinib'in Hücrelerde Kök Hücre Özelliği Kazanmasındaki Etkisi

Yapılan bir çok çalışmada tümör- başlatıcı hücrelerinin kemoterapötik tolerans özellikleri göstermektedirler. MDR hücreleri tümör başlatıcı özelliğine sahiptirler, ama bunun altında yatan mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir.

2013 yılında Xin ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada Doxorubicin'e dirençli K562 /A02 hücrelerini kullanılarak bu hücrelerin tümör- başlatıcı özelliğine sahip olup olmadıkları ve buna bağlı mekanizmalar araştırılmıştır. Bu çalışmada kök hücre karakterinden sorumlu OCT-4, NANOG, SOX-2 genlerinin ifade seviyelerine bakılmıştır, ve bu hücrelerde dirençli olmayan K562 hücrelerle kıyaslandığında, dirençli hücrelerde bu genlerin ifadesi artmıştır. Aynı zamanda K562 /A02 dirençli hücrelerinin *in-vivo* ve *in-vitro* ortamlarda tümör yapıcı özellikler taşıdığı gözlenmiştir.

Bu tez çalışmasında ise, dirençli K562r hücrelerinde NANOG, SOX-2, OCT-4 genlerinin ifadesi K562s hücrelerle kıyaslandığında bu genlerin oldukça yüksek seviyede ifade edildiği belirlenmiştir. Özellikle yüksek doz ve uzun süreli İmatinib

uygulanan hücrelerde, literatürde ilk kez, kök hücre karakterini kazandıran ve kendini yenilemeden sorumlu NANOG, SOX-2, OCT-4 gen ifadelerindeki artışın ilaç direncinden sorumlu olabileceğini destekleyen ilk veriler elde edilmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında *in-vitro* ortamda insan KML hücresi olan K562 hücre serisi kullanılarak İmatinib direncinden sorumlu mekanizmalar incelenmiştir. Bu tez çalışmasının sonunda:

- 18 ay boyunca K562 hücrelerine (K562s) artan dozlarda İmatinib uygulanmış ve ilaç konsantrasyonunun yavaş yavaş artırılmasıyla, devamlı ilaca maruz kalan duyarlı hücrelerde İmatinibe karşı direnç geliştirilerek, 5 μ M İmatinibe karşı dirençli hücreler (K562r) elde edilmiştir.
- İlaç efluks mekanizmalarındaki genlerden MDR1, MRP1, BCRP genlerinin ifade seviyeleri incelenmiş ve özellikle MDR-1 geninin 28 kat artış göstermesi, dirençten sorumlu primer neden olarak düşünülmüştür.
- OCT1 gen ifadesinin yüksek doz İmatinibe dirençli olan hücrelerde azaldığı belirlenmiş ve ilaç inluksunun bozulmasının da ilaç direncine katkıda bulunduğu sonucuna varılmıştır.
- Apoptoz yolağında rol oynayan BCL-2, BAD, BAX genlerinin ifade seviyeleri, İmatinibe direnç oluşumunun başlangıcında (0.6 μ M) artış göstermiştir. Ancak zamana bağlı İmatinib dozunun artırılmasıyla (5 μ M) BAD ve BAX genlerinin ifade seviyeleri daha da artarken, BCL-2'nin ifadesi azalmış ve otofajik genlerden özellikle BECLIN1'in ifadesi artış göstermiştir.
- Özellikle düşük doz İmatinib'e dirençte Bcl-2 gen ifadenmesi neden olurken, yüksek doz ilaca dirençli hücrelerde BECLIN1 gen ifade artışı ile Otofaji mekanizmasının aktivasyonunun direnç gelişimine katkıda bulunduğu sonucuna varılmıştır.
- KML hücrelerinde İmatinib'e karşı gelişen dirençten, Pluripotent kök hücre karakterine dönüşümden ve kök hücrelerde kendini yenilemeden sorumlu OCT-4, NANOG ve SOX-2 genlerinin neden olduğu ilk kez bu tez çalışması ile belirlenmiştir.
- Buna ek olarak embriyonel NANOG, SOX-2 ve OCT-4 genlerinin artan ifade seviyelerinin, yüksek doz İmatinib'e cevapta hücrelerin ya kök hücre özelliği

kazandığını veya lösemik hücreler içerisindeki kanser kök hücre klonunun gelişme göstermesi ile direnç geliştiği düşünülebilir.

- Dirençli ve dirençli olmayan hücrelerde CD34, CD38 ve CD133 pozitif kök hücre oranlarının belirlenmesi ile yukarıdaki soruların yanıtının bulunması planlanmıştır.
- DNA tamir enzimlerinden MLH1 ve MSH2 ifadelerinde gözlenen artış, İmatinib'e dirençli hücrelerde DNA onarım genlerinin de rol oynayabileceğini gösteren ilk veriler elde edilmiştir.
- BCR-ABL bağımsız mekanizmaların hemen hepsinin incelendiği ilk çalışma olmasının yanısıra, 5µM İmatinib direncine sahip bir hücre serisinin elde edilmiş olması da çalışmanın orjinallikleri arasında yer almaktadır.

ÖZET

K-562 Hücre Serilerinde İmatinib'e Karşı Gelişen Dirençte Rol Oynayan Gen İfade Değişimlerinin Saptanması

İmatinib mesilat, BCR-ABL tirozin kinazın seçici inhibitörü olarak tasarlanan etkili bir terapötik ajandır. İmatinib ve diğer TKI'ler KML hastalığının tedavisinde kullanılarak hayatta kalma şansını artırmaktadır ama hastaların bazılarında TKI'lerine özellikle İmatinibe karşı direnç gelişmekte ve tedavinin başarısız olmasıyla hastalığın yeniden nüks etmesine neden olmaktadır. KML'de ilaç direnciden sorumlu mekanizmalar arasında BCR-ABL genindeki mutasyonlar ve BCR-ABL'den bağımsız diğer mekanizmalar görev almaktadır. Bu tez çalışmasında BCR-ABL'dan bağımsız mekanizmalar araştırılmıştır. İlaç taşınmasından sorumlu taşıyıcı proteinlerinin ifade seviyelerindeki artış ve azalma, apoptoz sinyal yollarının inhibisyonu, otofajinin indüklenmesi, DNA tamir mekanizmasındaki artış ve transkripsiyon faktörlerindeki değişimler, ilaç direncinin oluşumunda ve KML tedavisinin başarısızlığında görevli BCR-ABL'den bağımsız mekanizmalar arasındadır.

Bu tez çalışmasında *in-vitro* ortamda insan KML hücresi olan K562 hücre serisi kullanılarak; K562 hücrelerine (K562s) artan dozlarda İmatinib uygulanarak 5µM İmatinibe karşı dirençli (K562r) hale getirilmiştir. İlaç influks ve efluks genleri, pluripotent kök hücre karakterinde rol oynayan genler, apoptoz ve otofajiden sorumlu genler ve tamirden sorumlu gen ifade değişimleri kıyaslanarak ilaç direncinde etkili olabilecek yollar incelenmiştir.

Bu tez çalışması sonunda; ilaç influks ve efluks genlerinden MDR-1, BCRP, OCT-1'in; gen ifadelerinde anlamlı değişiklikler olduğunun belirlenmesi ve özellikle MDR'nin ifadesindeki artış dirençle primer ilişkili bulunmuştur. Apoptoz ve otofaji yollarındaki gen ifade değişimleri en etkin olarak BCL-2 ve BECLIN1'de gözlenmiştir. Düşük doz İmatinib direncinden BCL-2 sorumlu iken yüksek doz İmatinib direncinde otofajinin bu sürece katıldığı belirlenmiştir.

Bu çalışmada ayrıca kök hücre karakterinden ve kendini yenilemeden sorumlu OCT-4, NANOG, SOX-2 genlerinin ifadeleri İmatinib direncinde düşük dozdan yüksek doza doğru orantılı olarak arttığı belirlenmiştir. İlave olarak DNA onarım genlerinden MSH ve MLH gen ifadelerinin İmatinib direnç gelişiminde rol oynadığı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Apoptoz, İmatinib direnci, KML, Otofaji

SUMMARY

Determining Changes in the Expression Of Genes Playing Role in Imatinib Resistance of K562 Cell Lines

Leukemia, occurs in blood cell precursors as a result of mutation and chromosomal translocation, characterized by uncontrollable proliferation and defined as a hematologic malignancy. Chronic myeloid leukemia (CML), $t(9;22)(q34,q11)$ resulting from the Philadelphia (Ph) chromosome is characterized by the presence of fusion of the BCR and ABL genes, resulting in malignant leukemic cells, it is replacing the normal bone marrow, malignant haematopoietic stem cell disease. Imatinib mesylate, the BCR - ABL tyrosine kinase inhibitor selectively designed as an effective therapeutic agent. It is used in the treatment of CML with other TKIs, but the chances of survival of patients with Imatinib decreased because of resistance to Imatinib so it is caused by failure of the treatment. The mechanisms responsible for drug resistance in CML are BCR- ABL gene mutations and BCR- ABL independent mechanisms. BCR-ABL independent mechanisms included expression level of Carrier transporters which are responsible for transporting drugs, inhibition of apoptosis signaling pathways, induction of autophagic, changes in transcription factors, increases and changes in DNA repair mechanisms. In this study, examined the mechanisms responsible for resistance to Imatinib in humal CML cell lines K562. K562 cells (K562s) are obtained by increasing doses of Imatinib to $5\mu\text{M}$ so Imatinib-resistant (K562r) has been made. Then transporting the drug resistant cells, DNA repair, pluripotent stem cell character of the formation, by determining changes in the expression of genes responsible for apoptosis and autophagic pathways and drug resistance genes that may be effective have been identified.

Key words: Apoptosis, Autophagy, CML, Imatinib resistance

KAYNAKLAR

- AÏRĪAU, K., MAHON, F. X., JOSSELĪN, M., JEANNETEAU, M., TURCQ, B., BELLOC, F. 2012. ABT-737 increases tyrosine kinase inhibitor-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia cells through XIAP downregulation and sensitizes CD34(+) CD38(-) population to Īmatinib. *Exp. Hematol.*, 40 (5), 367-378.
- AMĪE S, CORBĪN., PAUL LA, ROSE'E., ERĪC P, STOFFREGEN., BRĪAN J, DRUKER., AND MĪCHAEL W, Deininger. 2003. Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with Īmatinib mesilat resistance remain sensitive to Īmatinib, *BLOOD*, 1 JUNE VOLUME 101, NUMBER 11
- ASSEF, Y., RUBĪO, F., COL' O, G., DEL M' ONACO, S., COSTAS, M. A., KOTSĪAS, B. A. 2009. Īmatinib resistance in multidrug-resistant K562 human leukemic cells. *Leukemia Research*. vol. 33, no. 5, pp. 710–716.
- BARNES, DJ., MELO, JV. 2006. Primitive, quiescent and difficult to kill: the role of non-proliferating stem cells in chronic myeloid leukemia. *Cell Cycle*. Dec;5(24):2862-6.
- BARNES, DJ., PALAĪOLOGOU, D., PANOUSOPOULOU, E, et al. 2005. Bcr-Abl expression levels determine the rate of development of resistance to Īmatinib mesilat in chronic myeloid leukemia. *Cancer Res*;65:8912–8919.
- BEKSAÇ, M., BEKSAÇ, MS., TĪPĪ, VB., DURU, HA., KARAKÁS, MU., ÇAKAR, AN. 1997.
- BELLODĪ, C., LĪDONNĪCĪ, MR., HAMILTON, A., et al. 2009. Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome- positive cells, including primary CML stem cells. *J Clin Invest.*;119(5):1109-1123..
- BRANFORD, S., RUDZKĪ, Z., WALSH, S., PARKĪNSON, I., GRĪGG, A., SZER, J., TAYLOR, K., HERRMANN, R., SEYMOUR, JF., ARTHUR, C., JOSKE, D., LYNCH, K., HUGHES, T. 2003. Detection of h BCR-ABL mutations in patients with CML treated with Īmatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis, *Blood*. 1;102(1):276-83.
- BREEDVELD, P., PLUIM, D., CIPRIANI ET, G. 2005. The effect of Bcrp1 (Abcg2) on the in vivo pharmacokinetics and brain penetration of Īmatinib mesilat (Gleevec): implications for the use of breast cancer resistance protein and P-glycoprotein inhibitors to enable the brain penetration of Īmatinib in patients. *Cancer Research*. vol. 65, no. 7, pp. 2577–2582.
- BREEDVELD, P., ZELCER, N., PLUIM, D., SONMEZER, O., TIBBEN, MM., BEIJNEN, JH., SCHINKEL, AH., VAN TELLINGEN, O., BORST, P., SCHELLEN, S JH. 2004. Mechanism of the

- pharmacokinetic interaction between methotrexate and benzimidazoles: potential role for breast cancer resistance protein in clinical drug-drug interactions. *Cancer Res.*; 64(16):5804-5811.
- BRENDEL, C., SCHARENBERG, C., DOHSE ET, M. 2007. Imatinib mesilat and nilotinib (AMN107) exhibit high-affinity interaction with ABCG2 on primitive hematopoietic stem cells. *Leukemia*. vol. 21, no. 6, pp. 1267–1275.
- BRUNO, CALABRETTA., PAOLO, SALOMONI. 2011. Inhibition of autophagy: a new strategy to enhance sensitivity of chronic myeloid leukemia stem cells to tyrosine kinase inhibitors. *Leukemia & Lymphoma*, February; 52(S1): 54–59
- BURGER, H., VAN TOL, H., BOERSMA, AW, et al. 2004. Imatinib mesilat (STI571) is a substrate for the breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 drug pump. *Blood*;104:2940–2942.
- CAREW, JS., NAWROCKI, ST., GILES, FJ., CLEVELAND, JL. 2008. Targeting autophagy: a novel anticancer strategy with therapeutic implications for Imatinib resistance. *Biologics*.;2(2):201-204.
- CHEN, C-J., CHIN, JE., UEDA, K, et al. 1986. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrugresistant human cells. *Cell* 47:381–89.
- CHRISTOPH, WALZ., MARTIN, SATTLER. 2006. Novel targeted therapies to overcome Imatinib mesilat resistance in chronic myeloid leukemia (CML), *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 57 145–164
- CLARK, SC., MCLAUGHLIN, J., TIMMONS, M., ET AL. 1988. Expression of a distinctive BCR-ABL oncogene in Ph1-positive acute lymphocytic leukemia(ALL). *Science*; 239:775-77.
- CLELIA, MIRACCO., ELENA, COSCI., GIUSEPPE, OLIVERI., PIETRO, LUZI., LORENZO, PACENTI., IRENE, MONCIATTI., SUSANNA, MANNUCCI., MARIA, CATERINA DE NISI., MARZIA, TOSCANO., VALERIA, MALAGNINO., SARA, M. FALZARANO., LUIGI, PIRTOLI., PIERO, TOSI. 2007. Protein and mRNA expression of autophagy gene Beclin 1 in human brain tumours. *International Journal of Oncology*, February, Volume 30 Number 2
- COPLAND, M., HAMILTON, A., ELRICK, LJ., et al. 2006. Dasatinib (BMS- 354825) targets an earlier progenitor population than Imatinib in primary CML but does not eliminate the quiescent fraction. *Blood*;107:4532–4539.
- CORBIN, AS., LA ROSÉE, P., STOFFREGEN, EP., DRUKER, BJ., DEININGER, MW. 2003. Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with Imatinib mesilat resistance remain sensitive to Imatinib. *Blood*. 101(11), 4611-4.
- CORBIN, AS., ROSEE, PL., STOFFREGEN, EP., DRUKER, BJ., DEININGER, MW. 2003. Several Bcr-Abl kinase domain mutants associated with Imatinib mesilat resistance remain sensitive to Imatinib. *Blood*;101:4611–4614.

- CROSSMAN, L. C., DRUKER, B. J., DEININGER, M. W. N., PIRMOHAMED, M., WANG, L., CLARK, R. E. 2005. hOCT 1 and resistance to Imatinib," *Blood*, vol. 106, no. 3, pp. 1133–1134.
- CROSSMAN, L. C., DRUKER, B. J., DEININGER, M. W. N., M. PIRMOHAMED, L. WANG, AND CLARK R. E., 2005. "hOCT 1 and resistance to Imatinib," *Blood*, vol. 106, no. 3, pp. 1133–1134,
- CROWLEY, L. C., ELZINGA, B. M., O'SULLIVAN, G. C., MCKENNA, S. L. 2011. Autophagy induction by Bcr-Abl-expressing cells facilitates their recovery from a targeted or nontargeted treatment. *Am. J. Hematol.* 86 (1), 38-47..
- CROWLEY, L. C., ELZINGA, B. M., O'SULLIVAN, G. C., MCKENNA, S. L. 2011. Autophagy induction by Bcr-Abl-expressing cells facilitates their recovery from a targeted or nontargeted treatment. *Am. J. Hematol.* 86 (1), 38-47.
- DAVÍD, REYNOSO., LAURA, K. NOLDEN., DAN, YANG., SARAH, N. DUMONT., ANTHONY P, CONLEY., AMAURY, G.P. DUMONT., KÍM, ZHOU., ANETTE, DUENSÍNG., JONATHAN, TRENT. 2 0 1 1. Synergistic induction of apoptosis by the Bcl-2 inhibitor ABT-737 and Imatinib mesilat in gastrointestinal stromal tumor cells. *MOLECULAR ONCOLOGY*
- DEAN, M., ALLÍKMETS, R. 2001. Complete characterization of the human ABC gene family. *J Bioenerg Biomembr.* Dec;33(6):475-9. Review.
- DEGENHARDT, K., MATHEW, R., BEAUDOÏN, B., et al. 2006. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell.*;10(1):51-64.
- DEININGER, M. W., GOLDMAN, J. M., AND MELO J. V. 2000The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood.*, 96(10): p. 3343-56.
- DEININGER, M., BUCHDUNGER, E., DRUKER, BJ. 2005. The development of Imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood.* 105(7), 2640-53.
- EDURNE SAN, JOSE´ENERÍZ., XABIER, AGÍRRE., ANTONÍO, JÍME´NEZ-VELASCO., LUCÍA, CORDEU., VANESA, MARTI´N., VÍCTOR, ARQUEROS., LEIRE, GA´ RATE, VÍCENTE FRESQUET, FRANCÍSCO CERVANTES, JOSE´ A. MARTI´NEZ-CLÍMENT, ANABEL HEINÍGER, ANTONÍO TORRES, FELÍPE PRO´SPER, JOSE ROMAN-GOMEZ C. 2 0 0 9. Epigenetik down-regulation of BIM expression is associated with reduced optimal responses to Imatinib treatment in chronic myeloid leukaemia. *EUROPEAN JOURNAL OF CANCER* 451877–1889.
- ENGLER, JR., FREDE, A., SAUNDERS, VA., ZANNETTINO, AC., HUGHES, TP., WHITE, DL. 2010. Chronic myeloid leukemia CD34⁺ cells have reduced uptake of Imatinib due to low OCT-1 activity. *Leukemia*;24:765–770.
- FADERL, S., TALPAZ, M., ESTROV, Z., O'BRIEN, S., KURZROCK, R., AND KANTARJIAN, H. M. 1999. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 1999. 341(3): p. 164-72.

- GAMBACORTI-PASSERINIC., GUNBY R., PIAZZA R. Molecular mechanisms of resistance to Imatinib in Philadelphia-chromosome-positive leukemias. *Lancet Oncology*. 4:75-85
- GANJU, RK., BRUBAKER, SA., MEYER, J, et al. 1998. The alphachemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *J Biol Chem*;273:23169–23175.
- GEAHLEN, RL., HANDLEY, MD., HARRISON, ML. 2004. Molecular interdiction of Src-family kinase signaling in hematopoietic cells. *Oncogene*;23:8024–8032.
- GENG, J., KLIONSKY, DJ. 2008. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep.*;9(9):859- 864.
- GORRE, ME., MOHAMMED, M., ELLWOOD, K., HSU, N., PAQUETTE, R., RAO, PN., SAWYERS, CL. 2001. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science*. Aug 3;293(5531):876-80.
- HEDIGER, M. A., ROMERO, M. F., PENG, J. B., ROLFS, A., TAKANAGA, H., AND BRUFORD E. A. 2004. "The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins," *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, vol. 447, no. 5, pp. 465–468.
- HEGEDUS, T., ORFÌ, L., SEPRODÌ, A., VARADÌ, A., SARKADÌ, B., KERÌ, G. 2002. Interaction of tyrosine kinase inhibitors with the human multidrug transporter proteins, MDR1 and MRP1. *Biochim Biophys Acta*;1587:318–325.
- HERMANS, A., HEÏSTERKAMP, N., VON LÏNDERN, M, et al. 1987. Unique fusion of bcr and c-abl gens in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Cell*; 51:33-40.
- HÏGGÏNS, CF. 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8:67–13
- HÏWASE, DK., SAUNDERS, V., HEWETT, D., et al. 2008. Dasatinib cellular uptake and efflux in chronic myeloid leukemia cells: therapeutic implications. *Clin Cancer Res*;14:3881–3888.
- HOLTZ, M., FORMAN, SJ., BHATÌA, R. 2007. Growth factor stimulation reduces residual quiescent chronic myelogenous leukemia progenitors remaining after Imatinib treatment. *Cancer Res*;67:1113–1120.
- HOLYOAKE, T., JÌANG, X., EAVES, C., EAVES, A. 1999. Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia. *Blood*;94:2056–2064.
- HOYER-HANSEN, M., BASTHOLM, L., SZYNIAROWSKI, P., et al. 2007. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Mol Cell*.;25(2):193-205.

- HOYER-HANSEN, M., BASTHOLM, L., SZYŃIAROWSKI, P., et al. 2007. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2. *Mol Cell*;25(2):193-205.
- HU, S., FRANKE, R. M., FİLIPSKI, K. 2008. Interaction of Imatinib with human organic ion carriers. *Clinical Cancer Research*, vol. 14, no. 10, pp. 3141–3148.
- HU, S., FRANKE, RM., FİLIPSKI, KK, et al. 2008. Interaction of Imatinib with human organic ion carriers. *Clin Cancer Res*;14:3141–3148.
- HU, Y., SWERDLOW, S., DUFFY, TM., WEINMANN, R., LEE, FY., LI, S. 2006. Targeting multiple kinase pathways in leukemic progenitors and stem cells is essential for improved treatment of Ph ϕ leukemia in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*;103:16870–16875.
- HUANG, D. C., ADAMS, J. M., CORY, S. 1998. The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4. *EMBO J.*, 17 (4), 1029-1039.
- ISHIHARA, T., SASAKI, M., OSHIMURA, M., KAMADA, N., YAMADA, K., OKADA, M., SAKURAI, M., SUGIYAMA, T., SHIRAIISHI, Y., AND KOHNO, S. 1983. A summary of cytogenetic studies on 534 cases of chronic myelocytic leukemia in Japan. *Cancer Genet Cytogenet.* 9(1): p. 81-91.
- J. THOMAS, L., WANG, CLARK, R. E., AND PIRMOHAMED M. 2004. “Active transport of Imatinib into and out of cells: implications for drug resistance,” *Blood*, vol. 104, no. 12, pp. 3739– 3745,
- JAFFE, E. S., HARRIS, N. L., STEIN, H., AND VARDIMAN, J. W. 2001. *WHO Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.*, Lyon, France: IARC Press.
- JAMES C, YAO. 2007. Molecular targeted therapy for carcinoid and islet-cell carcinoma. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* Vol. 21, No. 1, pp. 163–172, 2007 doi:10.1016/j.beem.01.006
- JAN MAXWELL, NØRGAARD., PETER, HOKLAND. 2000. Biology of Multiple Drug Resistance in Acute Leukemia. *International Journal of Hematology* 72 290-297.
- JAN, MAXWELL NØRGAARD., PETER, HOKLAND. 2000. Biology of Multiple Drug Resistance in Acute Leukemia. *International Journal of Hematology* 72290-297
- JOANA, M., DIAMOND. 2011. Mechanisms of resistance to BCR–ABL kinase inhibitors. *Leukemia & Lymphoma*, February; 52(S1): 12–221& JUNIA V. MELO2
- JORGENSEN, HG., COPLAND, M., ALLAN, EK, et al. 2006. Intermittent exposure of primitive quiescent chronic myeloid leukemia cells to granulocyte-colony stimulating factor in vitro promotes their elimination by Imatinib mesilat. *Clin Cancer Res*;12:626 633.

- JORGENSEN, HG., HOLYOAKE, TL. 2007. Characterization of cancer stem cells in chronic myeloid leukaemia. *Biochem Soc Trans*;35:1347–1351.
- KABEYA, Y., MIZUSHIMA, N, UENO T, et al. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.*;19(21):5720-5728.
- KAMITSUJÍ, Y., KURODA, J., KÍMURA, S., et al. 2008. The Bcr-Abl kinase inhibitor INNO-406 induces autophagy and different modes of cell death execution in Bcr-Abl-positive leukemias. *Cell Death Differ.*;15(11):1712-1722.
- KAMITSUJÍ, Y., KURODA, J., KÍMURA, S., TOYOKUNÍ, S., WATANABE, K., ASHÍHARA, E., TANAKA, H., YUI, Y., WATANABE, M., MATSUBARA, H., MÍZUSHÍMA, Y., HÍRAUMÍ, Y., KAWATA, E., YOSHÍKAWA, T., MAEKAWA, T., NAKAHATA, T., ADACHÍ, S. 2008. The Bcr Abl kinase inhibitor INNO-406 induces autophagy and different modes of cell death execution in Bcr-Abl-positive leukemias. *Cell Death Differ.* 15 (11), 1712-1722.
- KANTARJIAN, H., SAWYERS, C., HOCHHAUS, A., GUÍLHOT, F., SCHÍFFER, C., GAMBACORTÍ-PASSERÍNI, C., NÍDERWÍESER, D., RESTA, D., CAPDEVÍLLE, R., ZOELLNER, U., TALPAZ, M., DRUKER, B., GOLDMAN, J., O'BRIEN, SG., RUSSELL, N., FÍSCHER, T., OTTMANN, O., CONY-MAKHOUL, P., FACON, T., STONE, R., MÍLLER, C., TALLMAN, M., BROWN, R., SCHUSTER, M., LOUGHRAN, T., GRATWOHL, A., MANDELLÍ, F., SAGLÍO, G., LAZZARÍNO, M., RUSSO, D., BACCARANÍ, M., MORRA, E. 2002. Hematologic and cytogenetic responses to Ímatinib mesilat in chronic myelogenousleukemia. *N Engl J Med.* 346: 645–652.
- KEESHAN, K., COTTER, T. G., MCKENNA, S. L. 2002. High Bcr-Abl expression prevents the translocation of Bax and Bad to the mitochondrion. *Leukemia*, 16 (9), 1725-1734.
- KELLY, P. N.; STRASSER, A. 2011. The role of Bcl-2 and its pro-survival,(Kelly and Strasser 2011)relatives in tumourigenesis and cancer therapy. *Cell Death Differ.*, 18 (9), 1414-1424.
- KOEPSSELL, H., LÍPS, K., AND VOLK, C. 2007. “Polyspecific organic cation transporters: structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications,” *Pharmaceutical Research*, vol. 24, no. 7, pp. 1227–1251.
- KONÍG, H., HOLTZ, M., MODÍ, H., et al. 2008. Enhanced BCR-ABL kinase inhibition does not result in increased inhibition of downstream signaling pathways or increased growth suppression in CML progenitors. *Leukemia*;22:748–755.
- KOPTYRA, M., CRAMER, K., SLUPIANEK, A., RÍCHARDSON, C., SKORSKÍ, T. 2008. BCR/ABL promotes accumulation of chromosomal aberrations induced by oxidative and genotoxic stress. *Leukemia*;22:1969–1972.
- KURODA, J., KÍMURA, S., STRASSER, A., ANDREEFF, M., O'REÍLLY, L. A., ASHÍHARA, E., KAMITSUJÍ, Y., YOKOTA, A., KAWATA, E., TAKEUCHÍ, M., TANAKA, R., TABE, Y., TANÍWAKÍ, M., MAEKAWA, T..2007. Apoptosis-based dual molecular targeting by INNO-406, a second-generation Bcr- Abl inhibitor, and ABT-737, an inhibitor of antiapoptotic Bcl-2proteins, against Bcr-Abl-positive leukemia. *Cell Death Differ*, 14 (9), 1667-1677.

- KURODA, J., PUTHALAKATH, H., CRAGG, M. S., KELLY, P. N., Bouillet, P., Huang, D. C., Kimura, S., Ottmann, O. G., Druker, B. J., Villunger, A., Roberts, A. W., Strasser, A. 2006. Bim and Bad mediate Imatinib-induced killing of Bcr/Abl+ leukemic cells, and resistance due to their loss is overcome by a BH3 mimetic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 103 (40), 14907-14912.
- KUWANA, T., BOUCHIER-HAYES, L., CHÍPUK, J. E., BONZON, C., BSULLIVAN, B. A., GREEN, D. R., NEWMEYER, D. D. 2005. BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol. Cell.*, 17 (4), 525-535.
- LIANG, C., FENG, P., KU, B., et al. 2006. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol.*;8(7): 688-699.
- LIANG, C., LEE, JS., INN, KS., et al. 2008. Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat Cell Biol.*;10(7):776-78.
- LIANG, XH., JACKSON, S., SEAMAN, M., et al. 1999. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature.*;402(6762):672-676.
- LUGO, T. G., PENDERGAST, A. M., MULLER, A. J., AND WITTE, O. N. 1990. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science.*, 247(4946): p. 1079-82.
- LUM, J. J., BAUER, D. E., KONG, M., HARRIS, M. H., LI, C., LINDSTEN, T., THOMPSON, C. B. 2005. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*, 120 (2), 237- 248.
- MAHON, F. X., BELLOC, F., LAGARDE, V. 2003. MDR1 gene overexpression confers resistance to Imatinib mesilat in leukemia cell line models. *Blood*. vol. 101, no. 6, pp. 2368– 2373.
- MAHON, FX., DEININGER, MW., SCHULTHEIS, B, et al. 2000. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the tyrosine kinase inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood*;96:1070–1079.
- MAIURI, MC., LE TOUMELIN, G., CRÍOLLO, A., et al. 2007. Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J.*;26(10):2527-2539.
- MARK R, LITZOW. 2006. Imatinib Resistance: Obstacles and Opportunities. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*: May, Vol. 130, No. 5, pp. 669-679.
- MATSUI, H., ASOU, H., INABA, T. 2007. Cytokines direct the regulation of Bim mRNA stability by heat-shock cognate protein 70. *Mol. Cell*, 25 (1), 99-112
- MICHAEL, M., GOTTESMAN. 2002. MECHANISMS OF CANCER DRUG RESISTANCE, *Annu. Rev. Med.*. 53:615–27

- MISHIMA, Y., TERUI, Y., TANIYAMA, A., et al. 2008. Autophagy and autophagic cell death are next targets for elimination of the resistance to tyrosine kinase inhibitors. *Cancer Sci.*;99(11):2200-2208.
- NAKANISHI, T., SHIOZAWA, K., HASSEL, B. A., ROSS, D. D. 2006. Complex interaction of BCRP/ABCG2 and Imatinib in BCR-ABL-expressing cells: BCRP-mediated resistance to Imatinib is attenuated by Imatinib-induced reduction of BCRP expression. *Blood*. vol. 108, no. 2, pp. 678–684.
- NAKATOGAWA, H., SUZUKI, K., KAMADA, Y., OHSUMI, Y. 2009. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol.*;10(7):458-467.
- NARDI, VALENTINAA., AZAM, MOHAMMADA., DALEY, GEORGE Q.B. 2004. Mechanisms and implications of Imatinib resistance mutations in BCR-ABL. *Current Opinion in Hematology*, January - Volume 11 - Issue 1 - pp 35-43.
- NESHAT, MS., RAITANO, AB., WANG, HG., REED, JC., SAWYERS, CL. 2000. The survival function of the Bcr-Abl oncogene is mediated by Bad-dependent and -independent pathways: roles for phosphatidylinositol 3-kinase and Raf. *Mol Cell Biol*; 20: 1179–1186.
- NOWELL, P. C., HUNGERFORD, D. A. 1960. Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst.*, 25: p. 85-109.
- O'HARE, T., EIDE, CA., DEININGER, MW. 2007. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood*;110:2242–2249.
- OLTVAI, ZN., MILLIMAN, CL., KORSMEYER, SJ. 1993. Bcl- 2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*; 74: 609–619.
- PALLIS, M., TURZANSKI, J., GRUNDY, M., SEEDHOUSE, C., RUSSELL N. 2003. Resistance to spontaneous apoptosis in acute myeloid leukaemia blasts is associated with P-glycoprotein expression and function, but not with the presence of FLT3 internal tandem duplications. *British Journal of Haematology*, vol. 120, no. 6, pp. 1009–1016.
- PANE, F., FRIGERI, F., SINDONA, M., et al. 1996. Neutrophilic-Chronic Myeloid Leukemia: A distinct disease with a specific molecular marker(BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood*; 88:2410-14.
- PATTINGRE, S., TASSA, A., QU, X., et al. 2005. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell.*;122(6):927-939.
- PETROS, A. M., OLEJNICZAK, E. T., FESIĆ, S. W. 2004. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1644 (2-3), 83-94.
- RABINOWITZ, J. D., WHITE, E. 2010. Autophagy and metabolism. *Science*. 330 (6009), 1344-1348.

- REDAELLI, S., PIAZZA, R., ROSTAGNO, R, et al. 2009. Activity of bosutinib, dasatinib, and nilotinib against 18 Imatinib-resistant BCR/ ABL mutants. *J Clin Oncol*;27:469–471.
- ROBINSON, L. J., ROBERTS, W. KLING, T. T., AMMING, D. L., STERNBERG, S. S., AND ROEPE, P. D.. 1997. Human MDR 1 Protein overexpression delays the apoptotic cascade in chinese hamster ovary fibroblasts. *Biochemistry*, vol. 36, no. 37, pp. 11169– 11178.
- ROSENFELDT, MT., RYAN, KM. 2011. The multiple roles of autophagy in cancer. *Carcinogenesis*.;32(7):955-963.
- ROWLEY, J. D. 1973. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*,. 243(5405): p. 290-3.
- RUBINSZTEIN, DC., GESTWICKI, JE., MURPHY, LO., KLIONSKY, DJ. 2007. Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov*.;6(4):304-312.
- RUMPOLD, H., WOLF, A. M., GRUENEWALD, K., GASTL, G., GUNSILIUS, E., WOLF, D. 2005. RNAi-mediated knockdown of Pglycoprotein using a transposon-based vector system durably restores Imatinib sensitivity in Imatinib-resistant CML cell lines,” *Experimental Hematology*, vol. 33, no. 7, pp. 767–775.
- S. HU, FRANKE, R. M., FILIPSKI, K. K. et al., 2008. “Interaction of Imatinib with human organic ion carriers,” *Clinical Cancer Research*, vol. 14, no. 10, pp. 3141–3148.
- SALGIA, R., QUACKENBUSH, E., LIN, J, et al. 1999. The BCR/ABL oncogene alters the chemotactic response to stromal-derived factor-1 alpha. *Blood*;94:4233–4246.
- SALOMONI, P., CONDORELLI, F., SWEENEY, S. M., CALABRETTA, B. 2000. Versatility of BCR/ABL-expressing leukemic cells in circumventing proapoptotic BAD effects. *Blood*, 96 (2), 676-684.
- SAN JOSÉ-ENERIZ, E., AGIRRE, X., JIMÉNEZ-VELASCO, A., CORDEU, L., MARTÍN, V., ARQUEROS, V., GÁRATE, L., FRESQUET, V., CERVANTES, F., MARTÍNEZ-CLIMENT, J. A., HEINIGER, A., TORRES, A., PRÓSPER, F., ROMAN-GOMEZ, J. 2009. Epigenetic down-regulation of BIM expression is associated with reduced optimal responses to Imatinib treatment in chronic myeloid leukaemia. *Eur. J. Cancer*, 45 (10), 1877-1889
- SANCHEZ-GARCÍA, I., GRUTZ, G. 1995. Tumorigenic activity of the BCR-ABL oncogenes is mediated by BCL2. *Proc Natl Acad Sci USA*.92: 5287–5291.
- SAWYERS, C. L. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*,. 340(17): p. 1330-40.
- SHAH, N. P., KASAP, C., WEIER, C., BALBAS, M., NICOLL, J. M., BLEICKARDT, E., NICAISE, C., SAWYERS, C. L. 2008. Transient potent BCRABL inhibition is sufficient to commit chronic myeloid leukemia cells irreversibly to apoptosis. *Cancer Cell*, 14 (6), 485-493.

- SHENG, Z., MA, L., SUN, J. E., ZHU, L. J., GREEN, M. R. 2011. BCR-ABL suppresses autophagy through ATF5-mediated regulation of mTOR transcription. *Blood*. 118 (10), 2840-2848.
- SKORSKI, T., BELLACOSA, A., NIEBOROWSKA-SKORSKA, M., MAJEWSKI, M., MARTINEZ, R., CHOI, JK., TROTTA, R., WLODARSKI, P., PERROTTI, D., CHAN, TO., WASIK, MA., TSICHLIS, PN., CALABRETTA, B. 1997. Transformation of hematopoietic cells by BCR/ ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J*; 16: 6151– 6161.
- SOUZA, P. S., VASCONCELOS, F. C., DE SOUZA REIS, F. R., DE MORAES, G. N., MAIA R. C. 2011. P-glycoprotein and survivin simultaneously regulate vincristine-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia cells. *International Journal of Oncology*, vol. 39, no. 4, pp. 925–933.
- Stromskaya, T. P., Rybalkina, E. Y., Kruglov, S. S. et al. 2008. Role of P-glycoprotein in evolution of populations of chronic myeloid leukemia cells treated with Imatinib. *Biochemistry*. vol. 73, no. 1, pp. 29–37.
- TALPAZ, M., KANTARJIAN, H. M., MCCREDIE, K. B., KEATING, M. J., TRUJILLO, J., AND GUTTERMAN, J. 1987. Clinical investigation of human alpha interferon in chronic myelogenous leukemia. *Blood*,. 69(5): p. 1280-8.
- THOMAS, J., WANG, L., CLARK, RE., PIRMOHAMED, M. 2004. Active transport of Imatinib into and out of cells: implications for drug resistance. *Blood*;104:3739–3745.
- THORALF, LANGE., CHRISTINE, GU'N'THER., THOMAS, KO'HLER., RA'INER, KRAHL., SCARLET, MUSIOL., SABINE, LE'IBLEIN., HA'IFA-KATHR'IN, AL-ALI., IRIS VAN, HOOM'ISSEN., DIETGER NIEDERWIESER, AND MICHAEL, W. N. DE'IN'INGER. 2003. High levels of BAX, low levels of MRP-1, and high platelets are independent predictors of response to Imatinib in myeloid blast crisis of CML. *BLOOD*, VOLUME 101, NUMBER 6
- UGO, TESTA., ROBERTA, R'ICCI'ONI. 2007. Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia. *Haematologica*; 92:81-94
- WALZ, C., SATTLER, M. 2006. Novel targeted therapies to overcome Imatinib mesilat resistance in chronic myeloid leukemia (CML). *Crit Rev Oncol Hematol*. 57(2), 145-64.
- WANG, A., GIANNOUDIS, S., LANE, P., WILLIAMSON, M., PIRMOHAMED, AND R. E. CLARK. 2008. "Expression of the uptake drug transporter hOCT1 is an important clinical determinant of the response to Imatinib in chronic myeloid leukemia," *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, vol. 83, no. 2, pp. 258–264.
- WHITE, D. L., SAUNDERS, V. A., DANG, P. 2007. Most CML patients who have a suboptimal response to Imatinib have low OCT-1 activity: higher doses of Imatinib may overcome the negative impact of low OCT-1 activity. *Blood*. vol. 110, no. 12, pp. 4064–4072.

- WHITE, DL., DANG, P., ENGLER, J, et al. 2010. Functional activity of the OCT-1 protein is predictive of long-term outcome in patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia treated with Imatinib. *J Clin Oncol*;28:2761–2767.
- WILLIS, S. N., FLETCHER, J. I., KAUFMANN, T., VAN DELFT, M. F., CHEN, L., CZABOTAR, P. E., IERINO, H., LEE, E. F., FAIRLIE, W. D., BOUILLET, P., STRASSER, A., KLUCK, R. M., ADAMS, J. M., HUANG, D. C. 2007. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science*, 315 (5813), 856-859
- WU, J., MENG, F., KONG, LY., et al. 2008. Association between Imatinib-resistant BCR-ABL mutation-negative leukemia and persistent activation of LYN kinase. *J Natl Cancer Inst*;100:926–939.
- X.MAH, F., DEININGER, M.W., SCHULTHEIS, B. 2000. Selection and characterization of BCR-ABL positive cell lines with differential sensitivity to the signal transduction inhibitor STI571: diverse mechanisms of resistance. *Blood*.vol. 96, pp. 1070–1079.
- YOULE, R. J., STRASSER, A. 2008. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9 (1), 47-59.
- YU, Y., YANG, L., ZHAO, M., ZHU, S., KANG, R., VERNON, P., TANG, D., CAO, L. 2012. Targeting microRNA-30a-mediated autophagy enhances Imatinib activity against human chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia*.
- YUAN, H., WANG, Z., GAO, C, et al. 2010. BCR-ABL gene expression is required for its mutations in a novel KCL-22 cell culture model for acquired resistance of chronic myelogenous leukemia. *J Biol Chem*;285:5085–5096.
- YUAN, WEIÀ-C., DICK, STOCKELBERGA., SARA, HULLBERGB., ANNE, RICKSTENB., HANS, WADENVÌ. 2007. Changes in Expression of Apoptosis-Related Genes Are Linked to the Molecular Response to Imatinib Treatment in Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia Patients. *Acta Haematol*;117:83-90
- YUE, Z., JIN, S., YANG, C., LEVINE, AJ., HEINTZ, N. 2003. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*.;100(25):15077-15082
- Zhou, S., Morris, J. J., Barnes, Y., Lan, L., Schuetz, J. D., Sorrentino, B. P. 2002. Bcrp1 gene expression is required for normal numbers of side population stem cells in mice, and confers relative protection to mitoxantrone in hematopoietic cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 19, pp. 12339–12344.
- ZONG, Y., ZHOU, S., SORRENTINO, B. P. 2005. Loss of Pglycoprotein expression in hematopoietic stem cells does not improve responses to Imatinib in a murine model of chronic myelogenous leukemia. *Leukemia*. vol. 19, no. 9, pp. 1590– 1596.

ÖZGEÇMİŞ

I. Bireysel Bilgiler

Adı: Yalda

Soyadı: HEKMATSHOAR

Doğum Yeri ve Tarihi: 21.12.1985-İran, Tabriz

Uyruğu: İran

İletişim adresi ve telefonu: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji
Anabilim Dalı

II. Eğitim

| YILI | DERECESİ | ÜNİVERSİTE | ÖĞRENİM ALANI |
|-----------|------------------|-----------------------------|-----------------|
| 2005-2009 | Lisans Yüksek | İran/Tabriz Üniversitesi | Hayvan Biyoloji |
| 2011-2013 | Lisans | Ankara Üniversitesi | Tıbbi Biyoloji |

Yabancı Dili: İngilizce

III. Mesleki Deneyimi

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisansı

IV. Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

- Tıbbi Biyoloji ve Genetik Derneği

V. Bilimsel İlgi Alanları

Kanser Genetiği, İlaç Direnci, Epigenetik, Kök Hücre

VI. Bilimsel Etkinlikleri

BİLDİRİLER

1. HCT-116 Kolon Kanseri Hücre Serilerinde Urtica Dioica'nın Oksidan/Antioksidan Etkileri. A. Avcı, S. Aydos, T. Özkan, B. Altınok, A. Karadağ, I. Yükselen, F. Kaplan, Y. Hekmatshoar, E. Doğanay, İ. Durak, A. Sunguroğlu. XII. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (27-30 Ekim 2011 / Antalya)

2. GSTP1 gene methylation analysis in prostate cancer Author(s): Ozkan, T ; Gokce, I; Altinok, B; Karadag, A; Yukselen, I; Hekmatshoar, Y; Aydos, S; Baltaci,; Sunguroglu, A. Source: FEBS JOURNAL Volume: 279 Special Issue: SI Supplement: 1 Pages: 576-576 Published: SEP 2012

3. Investigation of apoptotic and efflux-pump gene expressions in Imatinib resistant CML cell line. Author(s): Sunguroglu, A; Ozkan, T; Altinok, B; Karadag, A; Hekmatshoar, Y. Source: FEBS JOURNAL Volume: 279 Special Issue: SI Supplement: 1 Pages: 574-574 Published: SEP 2012

VERİLEN SEMİNER

Kronik Miyeloid Lösemide İlaç Direnci

KATILINAN BİLİMSEL TOPLANTILAR

- 12.Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi (2011)
- 2.Moleküler Biyolojide yeni Teknolojiler kursu (2011)
- Centrifuges and Pipetts Basic Applications and Maintenance Seminar (2011)
- 4. Ankara Tıp Biyokimya günü (2011)
- II.Kök Hücre Kursu ve VI. Kök Hücre sempozyumu (2011)
- ATCC cell culture seminar (2012)
- 5.Ankara Tıp Biyokimya günü (2012)