



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GENİSTEİNİN KRONİK MYELOBLASTİK HÜCRE DİZİSİNDE
SİNYAL YOLAKLARINA ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

BİYOLOG Nur ERDEN ARMUTCUOĞLU
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ANKARA, 2016



BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GENİSTEİNİN KRONİK MYELOBLASTİK HÜCRE DİZİSİNDE
SİNYAL YOLAKLARINA ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOG Nur ERDEN ARMUTCUOĞLU

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Erkan YURTCU

ANKARA

2016

T.C
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Biyoloji Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Nur Erden Armutcuoğlu tarafından yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

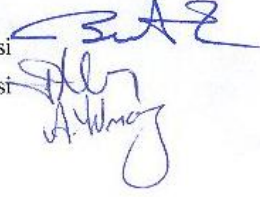
Tez Savunma Tarihi: 01/09/2016

Tez Konusu: "Genisteinin Kronik Myeloblastik Hücre Dizisinde Sinyal Yolaklarına Etkisinin Değerlendirilmesi"

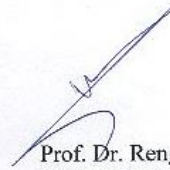
TEZ DANIŞMANI: Doç. Dr. Erkan YURTCU

TEZ JÜRİSİ ÜYELERİ

Prof. Dr. F.Belgin Ataç	Başkent Üniversitesi
Doç. Dr. Erkan Yurtcu	Başkent Üniversitesi
Doç. Dr. Akın Yılmaz	Hitit Üniversitesi



ONAY: Bu tez, Başkent Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunun 02/09/2016 tarih ve 131/..... Karar Sayısı ile kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Rengin ERDAL
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve tez çalışmam süresince her konuda özveri, sabır ve sevgiyle bana destek olan tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Erkan Yurtcu'ya,

Akademik ve bilimsel desteği için Başkent Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Belgin Ataç ve Yrd. Doç. Dr. Hasibe Verdi'ye

Bilgi ve birikimi ile bu süreçte bana destek olan sevgili dostlarım Sayın Arş. Gör. Yeşim Korkmaz ve Biyolog Aslıhan Bahadır Varol'a,

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nın tüm yüksek lisans ve doktora öğrencilerine,

Güler yüzle benden yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nın tüm çalışanlarına,

'Şerefle bitirilmesi gereken en önemli görev hayattır' ilkesiyle beni büyüten, eğitim hayatıma verdikleri önem ve değer için sevgili annem Zahide Erden'e, babam Hakan Erden'e ve kardeşim Yağmur Erden'e,

Her anımda yanımda olan, iyi günde kötü günde benden sevgisini ve desteğini esirgemeyen sevgili eşim Emre Armutcuoğlu'na,

Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

ÖZET

Kronik myeloid lösemi (KML) malign klonal hematopoetik kök hücre hastalığıdır. Moleküler patogenezinde Philadelphia (Ph) kromozomu üzerindeki *BCR-ABL1* füzyon geni rol oynar. Oluşan füzyon proteini tirozin kinaz kodlar ve bu tirozin kinaz AKT, ERK, STAT yolları üzerinde etkili olup modülatörleri GAB2 ve GRB2'dir. KML tedavi protokolünde yer alan STI571 (imatinib mesilat, Gleevec™), tirozin kinaz özelliği olan bu enzimin ATP-bağlayıcı bölgesine yarışmalı inhibisyonla bağlanır. Genistein; östrojenik özelliğinin yanı sıra tirozin kinaz inhibitör aktivitesine sahip olan bitkisel bir flavonoiddir.

Bu çalışmada, insan KML hücre dizisi K562 hücrelerine STI571 uygulaması ile birlikte genistein uygulamasının hücre içi sinyal yolları üzerine etkisinin protein seviyesinde belirlenmesi hedeflenmiştir.

K562 hücre dizisi %5'lik CO₂, %95 nem içeren 37°C'lik inkübatörde çoğaltıldı. STI571 ve genisteinin sitotoksik dozu MTT testi ile belirlendi. STI571 ve genisteinin etkileri 24 ve 48 saat periyotlarla değerlendirildi. Hücrelere STI571, genistein, STI571 ve genistein kombinasyonları birlikte uygulandı. Kontrol grubu olarak kullanılan hücre grubuna bir uygulama yapılmadı.

Tüm gruplarda protein düzeyleri ELISA metoduyla belirlendi. Sonuçlar uygun istatistiksel yöntemlerle değerlendirildi. Verilerimiz toplu halde değerlendirildiğinde STI571 ve genisteinin tek başına ya da birlikte uygulanması ile protein düzeylerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı belirlendi.

Bu çalışmada ilk kez genisteinin STI571 ile birlikte etkileri bir protein paneli üzerinde değerlendirilmiştir. STI571'in ve genisteinin tirozin kinaz inhibitörü özellikleri bilinmektedir. Ancak her iki ajanın protein düzeyleri üzerine etkilerini inceleyen çalışmalarda tartışmalı sonuçlar mevcuttur. Biz de STI571 ve genisteinin tek başına ve birlikte kullanımıyla bu tartışmalı konuya açıklık getirmeyi hedefledik. Sonuçlarımıza göre her iki ajanın birlikte kullanılmasının protein düzeyleri açısından anlamlı bir fark oluşturmadığını gösterdik.

Anahtar Kelimeler: KML, imatinib, genistein, BCR ABL1, GRB2, GAB2, ERK, AKT

ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia (CML) is a malign clonal hematopoietic stem cell disease. BCR-ABL1 is a fusion gene which is located on Philadelphia (Ph) chromosome, plays a role on molecular pathogenesis of the disease.

Induced fusion protein encodes the tyrosine kinase which has effect on AKT, ERK, STAT pathways and GAB2 and GRB2 are its modulators. STI571 (imatinib mesilat) which is used for CML treatment protocol, has tyrosine kinase inhibitor property and binds to the ATP-binding region of this enzyme with competitive inhibition. Genistein is a herbal flavonoid which has estrogenic effects besides tyrosine kinase inhibitor.

In this study, we aimed to determine the effect of STI571 and genistein application for intercellular signal transduction pathways at protein level on the human CML cell line K562 cells. K562 cells were cultured at 5% CO₂, 95% humidity and 37 °C. The cytotoxic dosages of STI571 and genistein were determined with MTT test. The effects of STI571 and genistein were evaluated at 24 and 48 hours period. The cells were treated to STI571, genistein alone and STI571 and genistein combination. Untreated cells were used as control group.

The protein levels of all groups were determined by ELISA method. The data were evaluated statistically. There was no statistically significant alteration about the amount of protein levels with STI571 and genistein alone and in combination.

This is the first report about the effects of STI571 and genistein on a protein panel. STI571 and genistein are well known agents about their tyrosine kinase inhibitory effects. However previous reports about these chemicals on the protein levels have controversial results. We aimed to contribute with our results about STI571 and genistein when used alone or in combination. As a conclusion STI571 and genistein have no statistically significant effect on the protein levels.

Keywords: Chronic myeloid leukemia, imatinib, genistein, BCRABL1, GRB2, GAB2, ERK, AKT

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Kronik Myeloid Lösemi	2
2.1.1 Tanım ve Tarihçe	2
2.1.2 BCR-ABL Geninin Oluşumu ve Yapısı	3
2.2 Sinyal Yolakları	6
2.2.1 Ras ve Map Kinaz Yolağı	8
2.2.2 Jak-Stat Yolağı	9
2.2.3 PKB yolağı	10

2.2.4 Myc Yolağı	11
3. STI571	12
4.Genistein	14
4.1 Tanım ve Özellikler	14
4.1.1 Antikarsinojenik etkileri	15
5. Gereç ve Yöntem	16
5.1 Gereç ve Malzemeler	16
5.1.1 Kullanılan Cihazlar	16
5.1.2 Kullanılan Kimyasallar	16
5.1.3 Kullanılan Tampon ve Çözeltiler	17
5.2 Yöntem	17
5.2.1 Hücre Kültürü Çalışmaları	17
5.2.2 MTT Testi	17
5.3 Hücrelere STI571ve Genistein Uygulamalarının yapılması	19
5.4 Hücre Kültüründen Protein İzolasyonu	19
5.5 Hücre Kültüründen Protein Tayini	20
5.6 ELISA Yöntemi	21
5.6.1 Grb ve Erk 1/2 ELISA Deney Prosedürü	22
5.6.2 PKB ELISA Deney Prosedürü	22
5.6.3 GAB2 ELISA Kit Uygulamaları	23
5.6.4 p190/BCR-ABL ELISA Deney Prosedürü	24

6. BULGULAR	24
6.1 MTT Yöntemi ile Belirlenmiş olan STI571 ve Genistein değerleri	24
6.2 BCR-ABL Protein Düzeyleri	25
6.3 GRB2 Protein Düzeyleri	26
6.4 GAB2 Protein Düzeyleri	27
6.5 ERK Protein Düzeyleri	28
6.6 AKT Protein Düzeyleri	29
7. TARTIŞMA	30
8.KAYNAKLAR	35

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

ABL1	A belson murine leukemia 1
AIF	Apoptoz-indükleyici faktör
AKT	v-akt murine thymoma viral onkogen homologu
Bax	Bcl-2 ilişkili X-protein
Bcl-2	B-hücre lösemi protein-2
BCR	Breakpoint cluster region
DNA	Deoksiribonükleik asit
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ERK	Ekstraselüler sinyal-regüle kinaz
GAB2	Grb-2-associated binder 2
GAP	GTPase activating protein domain
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2
IC50	Hücre proliferasyonunun %50 baskılandığı konsantrasyon
IL-3	Interlökin-3
JAK	Janus kinaz
Kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
KML	Kronik myeloid lösemi
MAPK	Mitogen activated protein kinase

M-BCR	Major BCR
m-BCR	Minor BCR
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2Htetrazolium bromide
μM	Mikromolar
μl	Mikrolitre
PBS	Fosfat tamponlu tuz
Ph	Philadelphia
PI3K	Phosphotidyl inositol 3 kinase
Ras GAP	GTPase activating protein
SH1,2,3	Src homoloji bölgeleri 1,2,3
Sos	Son of sevenless
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
Tyr177	177. pozisyondaki tirozin
XPB	Xeroderma pigmentosum – B
Y177	177. pozisyondaki tirozin
$^{\circ}\text{C}$	Santigrad derece

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa numarası
Şekil 2.1 : BCR ve ABL genlerinin translasyonu ve Ph kromozomu	3
Şekil 2.2 : ABL proteininin yapısı	4
Şekil 2.3 : ABL genindeki alternatif kırılma noktası	4
Şekil 2.4 : BCR proteinin yapısı	5
Şekil 2.5 : BCR genindeki alternatif kırılma noktaları	6
Şekil 2.6 : BCR-ABL sinyal yolları	7
Şekil 2.7 : BCR-ABL'ın malign forma dönüşme etkenleri	8
Şekil 2.8 : Jak/Stat yolağı	10
Şekil 2.9 : PI3 kinaz yolağının şematik gösterimi	11
Şekil 2.10 : Myc yolağının şematik gösterimi	12
Şekil 3.1 : STI571' in yapısı	12
Şekil 3.2 : STI571' in etki mekanizması	13
Şekil 4.1 : Genistein ve 17 β-östradiolün kimyasal yapısı	14

TABLULAR ve GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa numarası

Tablo 6.1 : MTT analizi sonuçlarına göre belirlenen dozlar	25
Grafik 6.1 : 24 ve 48 saat BCR-ABL protein düzeyleri	25
Grafik 6.2 : 24 ve 48 saat GRB2 protein düzeyleri	26
Grafik 6.3 : 24 ve 48 saat GAB2 protein düzeyleri	27
Grafik 6.4 : 24 ve 48 saat ERK protein düzeyleri	28
Grafik 6.5 : 24 ve 48 saat AKT protein düzeyleri	29

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kronik myeloid lösemi (KML), kemik iliğinde myeloid hiperplazi ile belirgin, dolaşım kanında myeloid, eritroid, platelet hücrelerinin artışı ile tanımlanan malign klonal hematopoetik kök hücre hastalığıdır. KML tüm lösemilerin %20'sini oluştururken, sıklığı 1-1,5/100.000'dir. 20 yaş altında nadir olarak, 40-50'li yaşlarda ise sıklıkla görülür. Ph kromozomu KML'nin %90'unda görülen sitogenetik bir bulgudur. Ph kromozomu 9. ve 22. kromozomlarının uzun kolları arasındaki t(9:22)(q34;q11) translokasyonu sonucu oluşan kromozom 22'dir. Oluşan bu translokasyon, kromozom 9q34'teki 3' *ABL* genini (Abelson proto-onkogeni, sitoplazmada ve çekirdekdeki tirozin kinazı kodlar), kromozom 22 q 11'deki 5' *BCR* gen segmentine ekler ve füzyon *BCR-ABL* geni oluşur. *BCR-ABL* geninde tirozin kinaz aktivitesi artar.

STI571 (Imatinib Mesilat, Gleevec™) KML tedavisinde kullanılan hedefe özgü bir ilaçtır. Tip II protein kinaz inhibitörü sınıfında yer almaktadır. *ABL*, *c-kit* ve *PDGF-R* (Platelet-derived growth factor receptor) bağlı tirozin kinazların inaktif konformasyonuna bağlanır. STI571 *BCR-ABL* tirozin kinaza yönelik geliştirilmiş ve birçok kanser tedavisinde kullanılmaktadır.

İçerisinde KML'nin de olduğu bir çok malign hastalıkta, hastalar kemoterapinin etkinliğini artırmak için günlük olarak bitkisel kaynaklı ek gıdaları ve vitaminleri diyetlerine dahil etmektedir. Genistein soyadan elde edilen isoflavandır ve östrojen benzeri etkileri bulunmaktadır. Apoptozu ve kanser hücrelerinin farklılaşmasını uyarır, hücre proliferasyonunu ve anjiyogenezisi baskılar, osteoklast ve lenfosit işlevini baskılar. Aynı zamanda genistein tirozine bağlı protein kinaz inhibitörüdür. Protein kinaz aracılı sinyal mekanizmasını baskılayarak kanser hücrelerinin büyümesini zayıflatır.

Çalışmamızda insan KML hücre dizisi K562 hücrelerinde STI571 uygulaması ile birlikte genistein uygulamasının KML patogenezinde rol oynayan hücre içi sinyal

yolaklarında rol oynayan BCR-ABL, GRB2, GAB2, AKT ve ERK protein düzeylerine etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

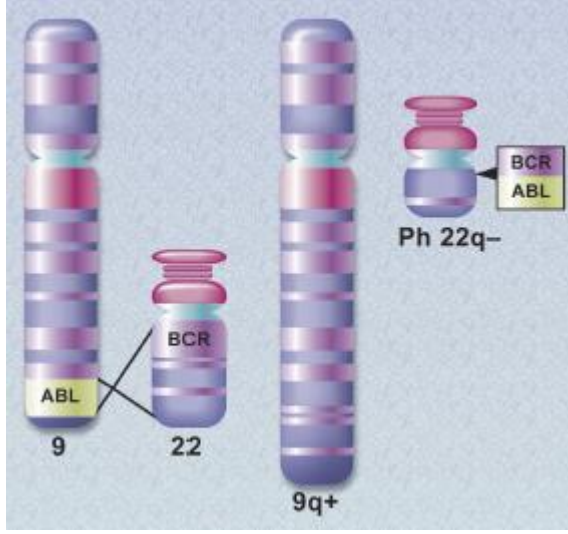
2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kronik Myeloid Lösemi

2.1.1 Tanım ve tarihçe

Kronik myeloid lösemi (KML) anormal hemopoetik kök hücreden köken alan, miyeloid, eritroid ve megakaryositeri etkileyen myeloproliferatif bir hastalıktır. KML kromozomal bozuklukla ilişkisi gösterilen ilk hastalıktır. Bu kromozomal anomalide rol onayan kromozom Philadelphia (Ph) kromozomudur ve kronik faz KML'nin patogenezinde merkezi rolü üstlenmektedir (1). Klinik gelişimi ve kromozom anomalisi nedeni ile KML en iyi tanımlanmış myeloproliferatif hastalıktır. Batı ülkelerindeki sıklığı 1-2/100.000 olup, tüm lösemilerin %20-30'unu oluşturduğu bilinmektedir (2).

1960'ta Nowell ve Hungerford KML'li hastaların kemik iliği hücrelerinde 22. kromozomun uzun kolunun büyük parçasının koparak kaybolduğunu tanımlamış ve kısalmış bu kromozoma buldukları şehrin adı olan Philadelphia (Ph) Kromozomu adını vermişlerdir. Rowley adlı bilim insanı ise, 22. kromozomun bir parçasının kaybolmadığını 9. kromozomun uzun koluna taşındığını göstermiştir (3).

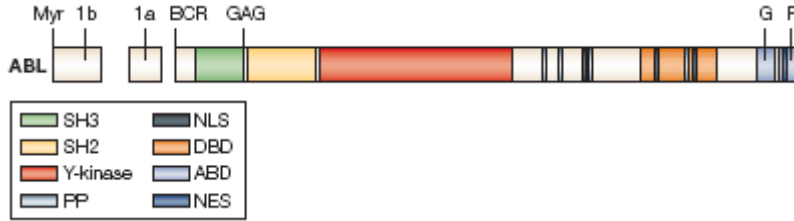


Şekil 2.1: *BCR* ve *ABL* genlerinin translokasyonu ve Ph kromozomu (38)

2.1.2 *BCR-ABL* GENİNİN OLUŞUMU VE YAPISI:

KML'yi tanımlayan *BCR-ABL* geninin oluşumu, 9.kromozomdaki *ABL* geninin 22. kromozoma taşınımı ve 22. kromozomdaki *BCR* geninin ise kromozom 9'a taşınıp birleşmesi ile sonuçlanan bir karşılıklı parça değişimine dayanan kromozomal translokasyondan kaynaklanmaktadır. 9.kromozom üzerinde bulunan *ABL* geni Abelson Murine Lösemi Virüsünün taşıdığı *v-abl* geni ile homolog yapıdadır ve 145 Kd ağırlığında bir protein üretir. *ABL* proteini hem sitoplazma hem de çekirdek içinde bulunur (4-6). Başlıca çekirdekte bulunan *ABL*, genotoksik strese karşı p53 ya da işlevsel homoloğu olan p73'ü kontrol ederek apoptozu baskılar. Hücre döngüsünün G1 fazında kalmasını sağlayarak büyümenin negatif düzenleyicisi olarak rol alır. Sitoplazmada bulunan *ABL* ise sinyal iletiminde rol oynar (7,8). *ABL* geninde ilk ekzonun alternatif kırılması sonucunda oluşan 1a ve 1b şeklinde iki izoform vardır. 1b izoformunu plazma zarına bağlayan miristillenme bölgesi bulunur. Miristillenme bölgesi dışında *ABL* proteininin yapısında 3 farklı alt birim bulunur, SH1 alanı tirozin kinaz fonksiyonuna sahiptir. SH2 ve SH3 alanları ise *ABL* proteinlerinin diğer proteinlerle olan etkileşimini sağlar. *ABL* proteini hücre büyümesi ve çoğalması, programlı hücre ölümü ve hücre döngüsünün

düzenlenmesinden sorumludur. ABL proteininin amino ucunda "cap" olarak adlandırılan yapı bulunur ki bu yapı ABL nin tirozin kinaz aktivitesini sıkı kontrol altında tutmaktadır. Bu kontrolü ABL proteininin SH3 ve katalitik bölgelerine bağlanıp protein kinaz aktivitesini baskılayarak sağlamaktadır (4-6).



Şekil 2.2: ABL geninin yapısı (39).

BCR-ABL1 füzyon transkripti oluşurken *ABL1* geninde kırılma N-ucunda oluşur ve 1a-1b ekzonları veya 1a-2 ekzonları arasında bulunan intronda, 300 kb'lık bir bölgede meydana gelir. Bu ekzonlar alternatif kırılma noktalarıdır. Bundan dolayı *BCR-ABL'* dan oluşan mRNA transkriptinde ilk ekzon bulunmaz. Transkript daima a2 ekzonu ile başlar (9).

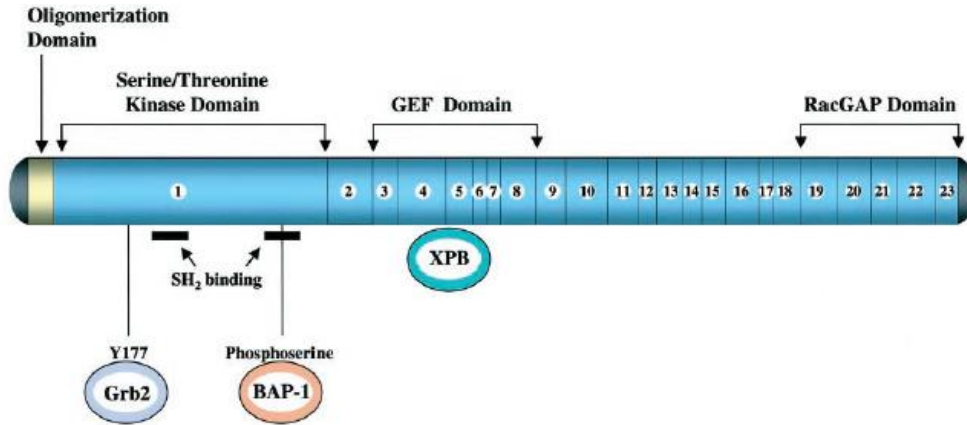


Şekil 2.3 : ABL geninde bulunan alternatif 2 kırılma noktası (9).

BCR geni kromozom 22 üzerinde yerleşmiş olup 1270 aminoasitten oluşmuştur ve 23 ekzon içerir. En çok hematopoetik hücrelerde ve beyinde olmak üzere yaygın ifadenmesi olan bir gendir. Gen ürünü olarak 160 kD ağırlığındaki BCR proteinini üretir (10).

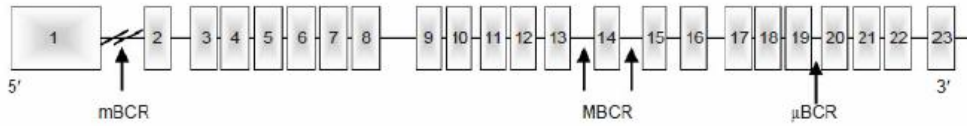
BCR proteini, bir oligamerizasyon bölgesine, serin/treonin kinaz bölgesine ve birden fazla Src Homology 2 (SH2) bağlayıcı bölgelerine sahiptir. Oligomerizasyon bölgesi N-ucunda bulunur ve ABL1 kinaz aktivasyonunu sağlar. Bu bölge hem BCR proteinin hem de füzyon transkripti olan *BCR-ABL'* nin hücre içi lokalizasyonunu belirler. BCR proteini SH2 bölgeleri ile ABL1 proteinini aktive ederek, reseptörler ve hücre içi sinyal proteinleri ile iletişime geçer. Bu sebeple bu bölgeler konsensus bölgelerdir. BCR proteininin merkezinde GEF (Guanin Exchange factor) bölgesi

bulunur. Bu bölge DNA tamir mekanizmasında görevli olan Xeroderma pigmentosum-B'yi (XPB) fosforile eden ve fonksiyonunu baskılayan bölgedir. Ayrıca bu bölge *BCR-ABL1* onkogeninin genomik instabiliteye sahip olmasını sağlar. BCR proteini serin treonin kinaz aktivitesine sahiptir. Ayrıca hücre içi sinyal iletimi, normal büyüme ve gelişme ve hücre iskeletinin düzenlenmesinde rolü olan G-proteinleri ile etkileşen GTPase activating protein (GAP) domaini bulunur (10).



Şekil 2.4: BCR protein yapısının şematik gösterimi (10).

BCR-ABL geninin 5' ucunu *BCR*'den gelen, 3' ucunu ise *ABL* den gelen ekzonlar oluşur. KML hastalarının çoğunda kırılma majör *BCR* olarak adlandırılan 12. ve 16. ekzonlar arasındaki 5.8 kb lik bir bölgeden meydana gelir. Kırılmanın bu bölgeden meydana gelmesi sonucu 210 kD ağırlığında *BCR-ABL* füzyon proteini meydana gelir. KML hastalarının az bir kısmında ise kırılma e2 ekzonunun olduğu yerden oluşur ve minör *BCR* geni meydana gelir. Minör *BCR* geni 190 kD ağırlığında *BCR-ABL* proteinini kodlamaktadır. Kırılmanın e19 ekzonundan olmasıyla ise mikro *BCR* geni oluşur ve 230 kD ağırlığında olan *BCR-ABL* proteinini kodlar. Kırılma *ABL* geninde sabit, *BCR* geninde değişken ise, *ABL* geni sağlıklı hücreleri transformasyona uğratarak kanser hücresine dönüşmesini sağlar, *BCR* geni ise hastalığın fenotipini belirler (11).



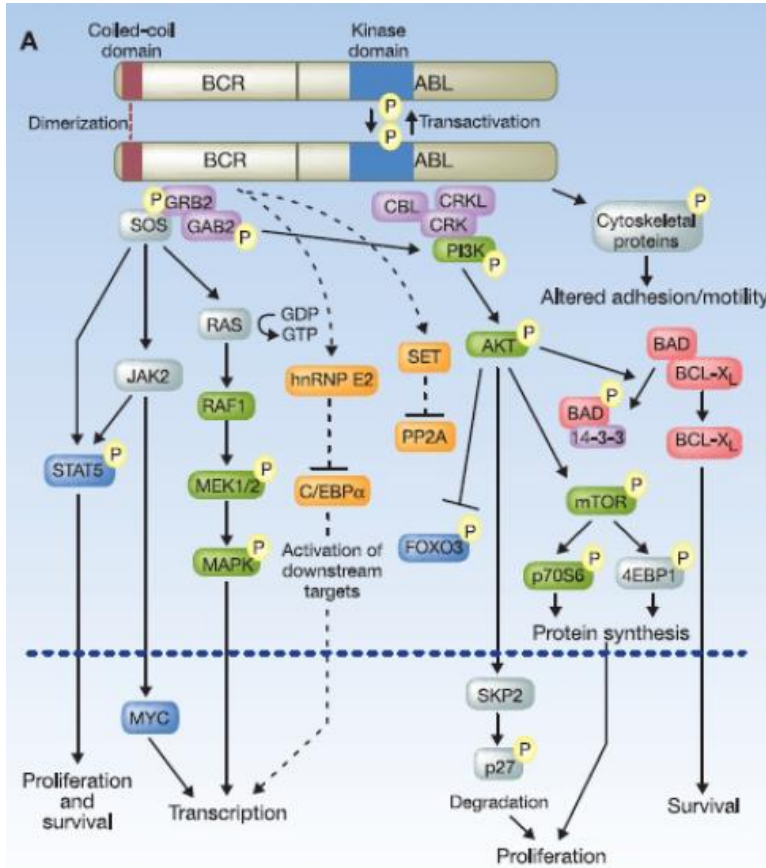
Şekil 2.5: BCR genindeki alternatif kırılma noktaları (9).

2.2 SİNYAL YOLAKLARI:

BCR-ABL füzyon proteini mitojenle aktive olan protein kinaz (RAS/MAPK), Fosfoinozimid 3-Kinaz (PI-3 kinaz), Janus kinaz-sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (JAK-STAT) ve onkogenik protein (Src yolağı) gibi hücre içi sinyal yollarını aktifleştirir. KML'de RAS yolağı apoptozu baskılayan büyüme faktörlerince ve sitokinlerce uyarılır. Ras yolağının aktifleşmesinde GAB2, GRB2, Ras aktivatörü olan Son of sevenless (Sos) ve BCR-ABL'ın SH2-SH3 adaptörü gibi birçok aracı molekül görev yapar. Aktifleşen RAS yolağı, hücre zarında bulunan bir serin/treonin kinaz olan Ref molekülünün aktivasyonu sağlayarak MAP/ERK kinazlar ve MAPK'ların (Mitogen Activated Protein Kinaz) aktivasyonu gerçekleştirerek transkripsiyonu artırır. BCR-ABL aracılı transformasyonda ve proliferasyonda Akt'ın hücrelerde ikincil haberci sistemini uyardığı, büyüme ve sağ kalımda görev yaptığı, RAC'ın (adhezyon sinyallerini yanıtlayan GTP-bağlayıcı protein) motalitede görevli olduğu, PI3K yolağının da protein sentezini artırma görevi olan S6 kinaz ve RAS yolağı ile etkileşebildiği bildirilmiştir (19).

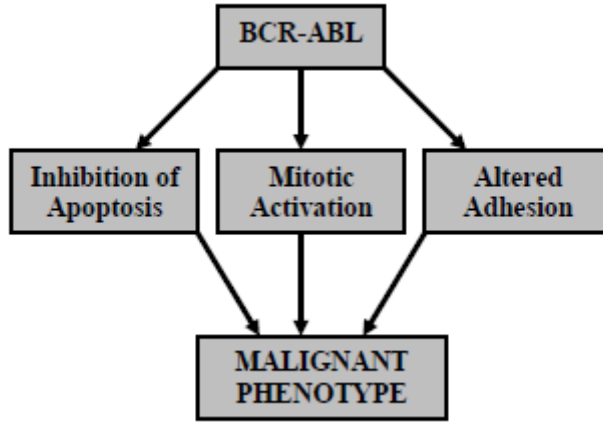
BCR-ABL1 onkoproteini ile sitoplazmadaki moleküllerin etkileşimi hücresel olaylarda farklı sonuçlara neden olur. Örneğin; JAK-STAT yolağının aktivasyonu transkripsiyonda artışa, RAS-MAPK yolağının aktivasyonu hücre çoğalmasında artışa ve PI3K-AKT yolağının aktivasyonu ise apoptozda azalmaya böylelikle de sağ kalımda artışa yol açar. Amino ucunda adaptör bir protein bulunan GRB2'nin, BCR-ABL'ın SH2 domaini ile etkileşen tirozin-fosforilasyon bölgesi bulunur. BCR geni Tyr 177 bölgesinin otofosforilasyonu sonucunda GRB2, GAB2 ve SOS (Son of sevenless) ile etkileşimi meydana gelir. GRB2 kompleksi tirozin fosfataz olan SHP2, RAS ve PI3K yollarının aktivasyonunu sağlar. RAS sinyal yolağının aktive

olmasıyla birlikte MAPK yolu aktifleşir, hücre proliferasyonunda artış sağlanır. PI3K aktivasyonunda, E3 ubiquitin ligaz proteininin yeniden regülasyonuna uğrar dolayısıyla FOXO transkripsiyon faktörlerinin aktivitesini baskılar, sağkalımı artırır. Ayrıca GRB2 nin bir diğer etkisi de p27'nin proteozomal yıkımını sağlayıp, hücre proliferasyonunu ve protein translasyonunu sağlayan mTOR aktivasyonunu sağlayan AKT yolunu aktive eder (19-20).



Şekil 2.6: BCR-ABL sinyal yolları (19).

BCR-ABL'in malign dönüşümünü aktifleştiren üç adet büyük sinyal yolu vardır. *BCR-ABL*'in malign dönüşüm fenotipinde mitotik aktivasyonu olması, apoptozun indüklenmiş olması ve adezyonun sağlanamaması görülmektedir (21).



Şekil 2.7:BCR-ABL'in malign hale dönüşme etkenleri (40).

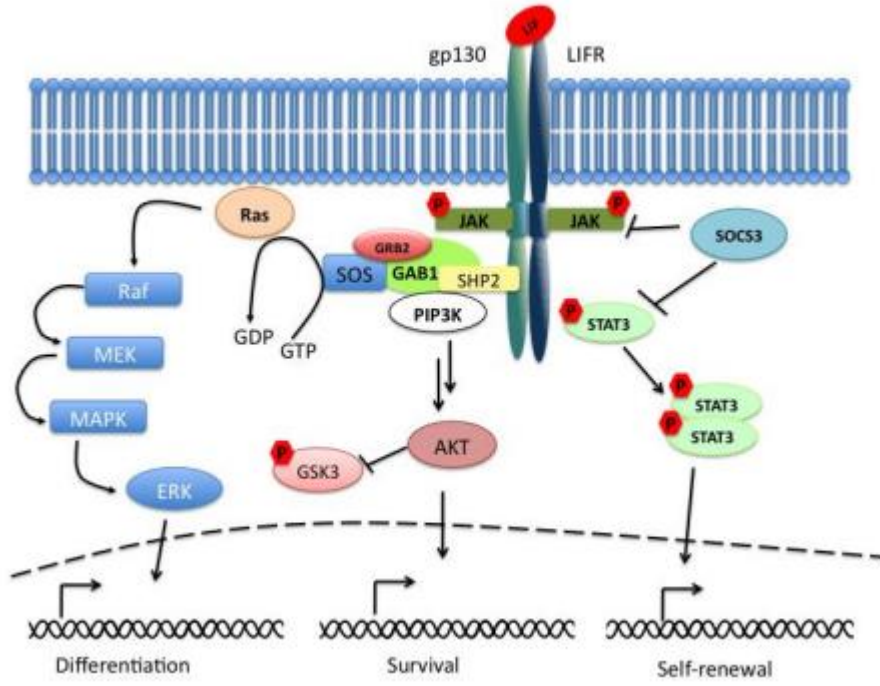
2.2.1 RAS ve MAP KİNAZ YOLAĞI:

Ras ve MAP kinaz sinyal yolları hücrelerin yüzeyinde bulunan reseptörlerden sinyal almasını sağlar ve hücredeki proteinlerle iletişim kurmasını sağlayarak sinyalleri çekirdeğe ulaştırırlar. Sinyal iletimi; reseptörün molekülle bağlanmasıyla başlar ve çekirdekle bağlanması sonucu hücre bölünmesi gibi bazı değişikliklere sebep olmasıyla biter. Bir çok kez raporlandığı gibi Ras ve MAP kinaz yolları BCR-ABL proteiniyle ilişkilidir. Küçük ligand molekülü olan Grb-2 ve SOS otofosforilasyonu tirozin 177 bağlayıcı bölgesine bağlanmasıyla gerçekleşir ve Ras I'i aktive eder. Diğer iki adaptör molekül Shc ve Crkl BCR-ABL proteinin SH2 ve SH3 alanlarına bağlanır ve Ras ve MAPK yollarını aktive eder. Bu zincir reaksiyonlardan herhangi birinde meydana gelen anormallikler ise, BCR-ABL proteinin anormal artışına sebep olur ve sonuçta KML gözlenir (22).

2.2.2 JAK-STAT YOLAĞI:

JAK-STAT yolağı beyaz kan hücrelerinde yüksek düzeyde ifade edilir. Bu yolak aktif olarak transkripsiyona katılmaktadır; bunu da sinyali dışarıdan alıp hücre zarından geçerek çekirdekteki ilgili genlerin promotör bölgesine bağlanarak gerçekleştirmektedir. JAK/STAT yolağı PP1 ve PP2 olmak üzere STAT3 fosfatazlarla düzenlenmektedir (22).

STAT3 fosfatazlar sitosoldeki ve çekirdekteki STAT bileşenlerinin aktivasyonunu arttırmaları. Reseptördeki sinyalin bir parçası olmayan IL-6 reseptörü olan gp80e bağlanır. Reseptör gp130 ise sinyal işleminin bir parçasıdır ve JAK ailesinden bir protein kinaz bağlanır. IL-6-gp80 kompleksi gp130/JAK kompleksine bağlanır ve IL-6-gp80-gp130-JAK kompleksini oluşturur. Bu formasyonun oluşumu IL-6-gp80-gp130-JAK dimerizasyonu ile sonuçlanır. (IL-6-gp80-gp130-JAK2) SHP-2 bu fosforlanmış dimer kompleksine bağlanır (IL-6-gp80-gp130-JAK) ve IL-6-gp80-gp130-JAK2- SHP-2 kompleksi oluşur ve bu kompleks MAPK ve JAK/STAT yolaklarını başlatır. JAK/STAT sinyal yolağı (IL-6-gp80-gp130-JAK2) transkripsiyon faktörü olan STAT3'ü aktive eder. Bu fosforlanmış STAT3 bileşeni (IL-6-gp80-gp130-JAK) kompleksin ayrımını sağlar daha sonra da dimerizasyon gerçekleşir ve bu dimerize olmuş kompleks STAT3 çekirdeğe girer ve defosforilasyon gerçekleşir ve tekrar sitozole geçer bu bir çevrim olarak devam eder (fosforilasyon-defosforilasyon çevrimi) (22).

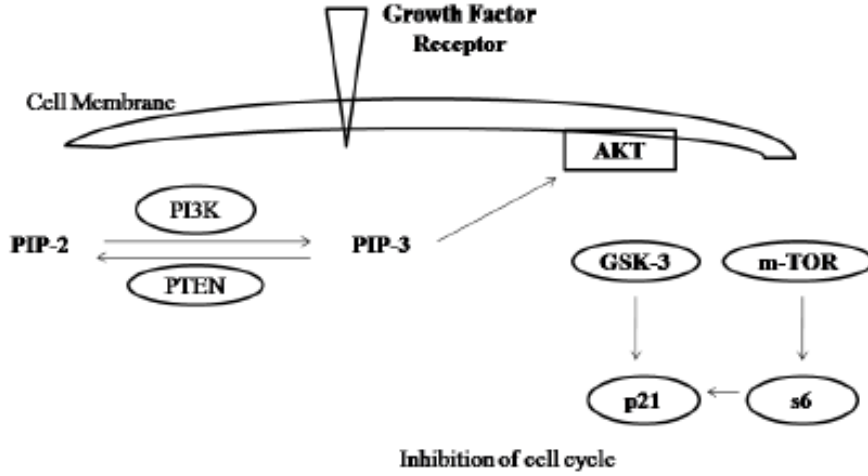


Şekil 2.8: Jak/Stat yolağı (41)

2.2.3 PKB YOLAĞI:

PI3 kinaz yolağı direkt olarak hücre bölünmesi, hücre farklılaşması, hücre çoğalması gibi olaylarla bağlantılıdır. Protein kinaz B proteini (PKB) *Akt1* ve *Akt2* genleri tarafından kodlanır. *Akt1* ve *Akt2* genleri viral *v-akt* onkogeninin insanda bulunan karşılığıdır. PI3 kinaz ve PKB yolunu aktive eden sitokinler ve büyüme faktörleri, hücreler için yaşama sinyallerini oluştururlar. PKB'nin aktivasyonunun hücre döngüsü üzerinde görülen etkileri karsinogenez süresini de etkilemektedir. Hücre döngüsünün erken G1 fazında p21 proteini, siklin D ve siklin bağımlı kinaz 4/6 kompleksi üzerinde uyarıcı etki yapmaktadır. PKB p21 proteinini tetikleyerek hücre döngüsünü ilerletici yönde etki eder aynı zamanda p21 proteininin yıkımını uyarıcı proteinleri baskılamaktadır (22).

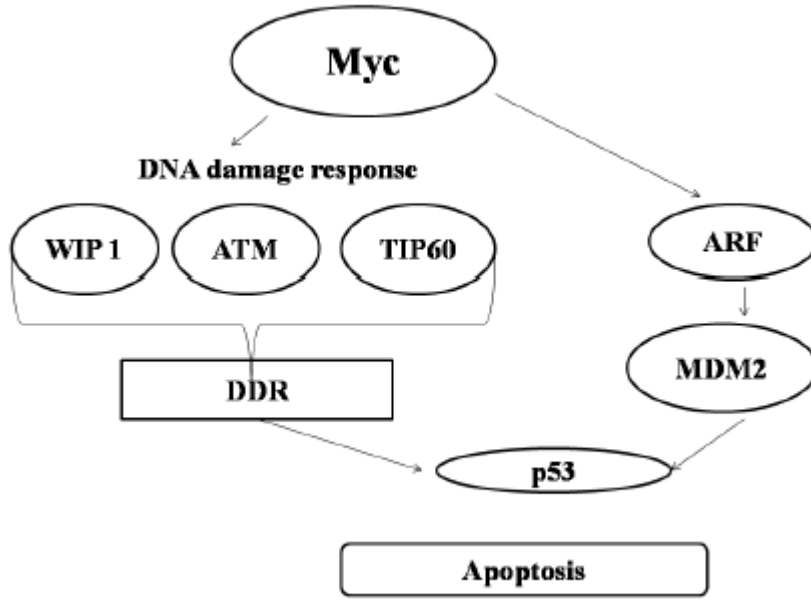
Hücre döngüsünün inhibitör proteinlerinden p27 onkojenik uyarı durumunda fosforile olarak sitoplazmaya geri döner ve hücre döngüsündeki inhibitör etkisi inaktif duruma geçer. Bu durum kontrolsüz PKB uyarısı ile tümör hücrelerinin çoğalması ile ilgili ilişkiyi ortaya çıkarmaktadır (22).



Şekil 2.9: PI3 kinaz yolağının şematik gösterimi (22)

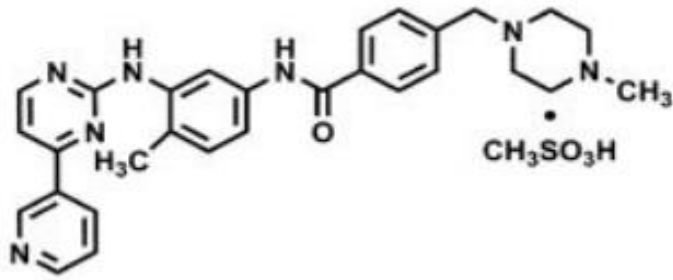
2.2.4 MYC YOLAĞI

Bu yolak birçok hücrel olayda örneğin hücre bölünmesi, hücre farklılaşması, çoğalması, apoptoz gibi oldukça ifade olmuş durumdadır. Bu yolaktaki mutasyon birçok kötü huylu tümöre sebep olur. Myc'nin transkripsiyon faktörü olarak görev yaptığı raporlanmış fakat hedefi hala açıklanamamıştır. BCR-ABL proteininin SH2 alanına bağlanır ve ifadenmesindeki artış BCR-ABL proteininin aşırı artışına sebep olmuştur. Myc protein transkripsiyon faktörü olarak rol yapar ve genlerin enhancer kutu (E-box) ve histon asetil transferazlarına (HATS) bağlanarak aktive olur. Myc proteini ayrıca transkripsiyon reseptörü olarak da bilinir çünkü Miz-1 hedef genini Miz-1e bağlanarak ve p300 ko-aktivatörüyle yer değiştirerek baskılar. Myc yolağı ayrıca DNA replikasyonu ile ilişkilidir. Hala Myc yolağıyla BCR-ABL nin direk ilişkisi tam olarak anlaşılmamıştır fakat v-abl transformasyonunun Myc promotör bölgesini etkileyerek Ras/Raf, E2F transkripsiyon faktörleriyle aktive olduğu bilinmektedir. Ph kromozomu pozitif hücrelerinde ve diğer tümör hücrelerinin çoğalması ve apoptoz sinyalinde Myc etkileri neredeyse aynıdır (22).



Şekil 2.10: Myc yolağının şematik gösterimi (22)

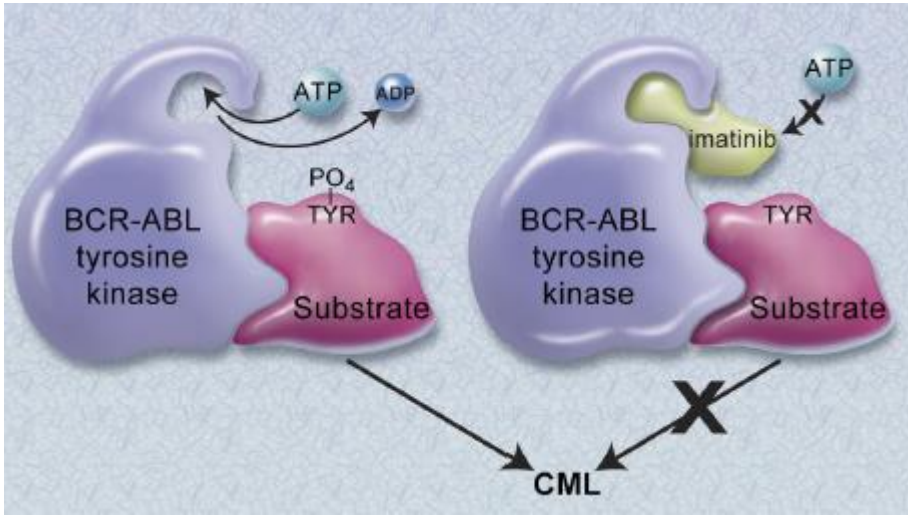
3.STI571 (IMATINIB MESİLAT)



Şekil 3.1: STI571' in yapısı (42)

BCR-ABL tirozin kinaz inhibitörü olan STI571 (imatinib mesilat),1990 yıllarında Nicholas Lydon isimli biyokimyacı tarafından geliştirilmiştir. STI571 tip II protein kinaz inhibitörü sınıfında yer alan hedefe yönelik bir ilaç olarak geliştirilmiş olup 2- phenylaminopyrimidin'in türevidir. STI571 1998'de klinik uygulamaya

girmiş ve KML tedavisinde önemli bir dönem başlamıştır. STI571, *ABL*, *c-kit* (KIT geni tarafından kodlanan tirozin kinaz reseptörü) ve PDGF-R (Trombositten türetilen büyüme faktörü) bağlı tirozin kinazların inaktif konformasyonuna bağlanmak için ATP ile yarışır. STI571 *ABL* kinaz bölgesindeki aminoasitlere bağlanarak adenozin trifosfatın bağlanmasını bloke edip BCR-ABL proteininin inaktif formunda kalmasını sağlar. Böylece adenozin trifosfattan fosfat geçişini engelleyerek ve sinyal ileti yollarını bloke edip hücre büyümesinin duraklamasına ve hücre ölümüne neden olur (12).



Şekil 3.2: STI571' in etki mekanizması (38)

STI571 direnç gelişiminin hastalığın evresi ile orantılı olduğu görülmektedir. STI571 e karşı oluşan direnç mekanizmalarından sonra daha özgül ikinci ve üçüncü kuşak tirozin kinazlar geliştirilmiştir. İkinci kuşak tirozin kinaz inhibitörlerinden birincisi Nilotinib'dir (AMN107). Nilotinib mekanizma olarak STI571 gibi etki etmektedir. Bu nedenle ABLkinazın STI571'deki gibi inaktif yapıda olması gerekir. İkinci kuşak tirozin kinaz inhibitörlerinden ikincisi Dasatinib'tir. Dasatinib (BMS-354825) src ve ABL kinaz inhibitörüdür. STI571 ve nilotinibden farklı olarak ABL kinazın hem aktif hem inaktif formlarına bağlanmakla beraber STI571'den daha etkilidir. Ayrıca STI571'e direnç gösteren BCR-ABL kinaz mutasyonlarına da etkilidir(17). Üçüncü kuşak tirozin kinaz inhibitörü olan Ponatinib (AP24534) BCR-ABL kinazların paninhibitörüdür. Özellikle T3151 mutasyonuna yönelik pozitif etkisi vardır. Bir diğer üçüncü kuşak tirozin kinaz inhibitörü olan Bosutinib (SKI-606)

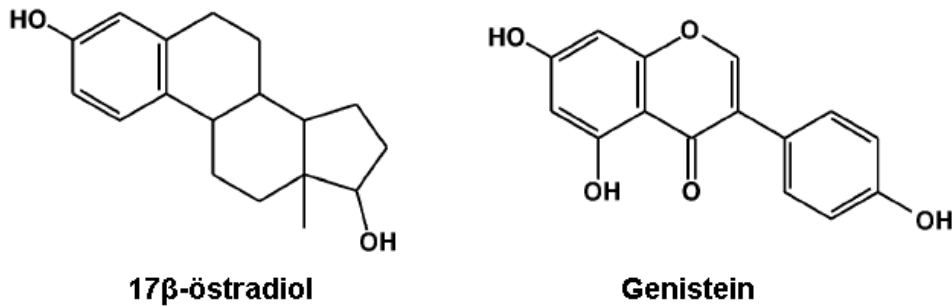
src ve ABL kinazları baskılayarak hücre proliferasyonunu azalttığı ve apoptozu uyarıldığı gözlemlenmiştir. Lösemik hücrelere daha seçici olması nedeniyle diğer ilaçlara göre daha az yan etkileri olduğu gözlenmiştir. (18).

4. GENİSTEİN

4.1 Tanım ve Genel Özellikler:

Flavonoidler antioksidan, antiinflamatuvar, antikanserojen etkilere sahip olan, bitkiler tarafından sentez edilen bileşiklerdir. Birçok malign fenotipli hastalıkta tedaviye ek olarak ve tedavinin etkinliğini daha da artırmak nedeniyle bitkisel flavonoidler tüketilebilmektedir (23). İzoflavonlar biyolojik etkileri sebebiyle son zamanlarda dikkat çekmektedirler. İzoflavonlar arasında en iyi bilinenleri genistein, daidzein ve glisitein olarak sayılabilir. Genistein, en kolay sentezlenebilen ve en güçlü aktiviteye sahip olan izoflavondur (24).

Genistein difenolik bir moleküldür, yapı ve fonksiyon olarak 17 β -östradiole benzerlik göstermektedir (Şekil 3.1). Kimyasal formülü "C₁₅H₁₀O₅" olan genistein, (4',5,7- trihidroksi izoflavon) 240,24 g/mol molekül ağırlığına sahiptir(24).



Şekil 4.1: Genistein ve 17 β -östradiolün kimyasal yapısı (24).

Genistein hem östrojenik hem de antiöstrojenik etki gösterebilmektedir (25-27). Kuvvetli antioksidan özelliğinin dışında, kanserin oluşumunda rol oynayan serbest radikalleri yakalama ve antioksidan enzimlerinin aktivitelerini de artırabilmektedir (24,28). Oksidatif DNA hasarını baskılayabilen en önemli ajanlardan biri olan genisteinin farklı kanser türlerine karşı da anti kanserojen

etkinlik gösterebildiği, kalp-damar ve kemik sağlığının korunması gibi birçok yararlı etkilerinin olduğu bildirilmektedir (24, 28).

4.1.1 Antikarsinojenik Etkileri

Asya toplumlarında genistein içeren diyetlerle beslendiklerinde, meme ve prostat kanseri gibi hormona bağlı kanser türlerinin görülme sıklığı, batılı ülkelere göre daha düşük olduğu yapılan epidomiyolojik çalışmalarla (29,30), genisteinin kanser riskini azalttığı ise deneysel ve klinik çalışmalarla ortaya konmuştur (24,30).

Genisteinin antikarsinojenik etkileri, anjiogenez ve hücre döngüsü ilerleyişinin baskılanmasını etkileme yönündedir. Genisteinin potansiyel antikarsinojenik etkilerine, özellikle *DNA* topoizomeraz II, tirozin protein kinaz, epitelyal büyüme faktörü gibi tümör oluşumunda önemli rol oynayan yapıların etkinliklerini baskıladığını gösteren çalışmalardan sonra yoğunluk verilmiştir (31,32). Genisteinin antiproliferatif özelliği ile hücrelerin bölünerek çoğalmasını önledikleri gibi, antianjiogenetik etkileri ile de anjiogenezi baskılayarak tümör hücrelerinin metastaz yapmalarını azaltırlar (23, 24, 29, 30).

alışmalar genisteinin başta meme ve prostat olmak üzere hormona bağlı kanser türleri ile mide, mesane, kolon, rektum, karaciğer ve pankreas gibi diğer kanser türlerine karşı koruyucu etkisi olabileceğini göstermektedir (23, 33-36). Kan kanserini konu alan çalışmalar sınırlı sayıda olmakla birlikte, genistein lösemi hücrelerinin büyümesini, doza ve verilme süresine bağlı olarak azaltmakta olduğu düşünülmektedir (37). Genisteinin, kanser oluşumunda etkili olan *topoizomeraz* ve *protein kinaz* gibi enzimler üzerinde indükleyici etkisi olduğundan farklı kanser türlerinde de etkileri olabileceği düşünülmektedir (23,24).

5. GEREÇ ve YÖNTEM :

5.1 Gereç ve Malzemeler

5.1.1 Kullanılan cihazlar

Laminar flow (Cytobaby,Danimarka)

İnkübatör (Hereaus, Almanya)

Inverted mikroskop (Olympus, Japonya)

Santrifüj cihazı (Harrier, İngiltere)

Vorteks (Dragon Laboratory, Çin)

Spektrofotometre (Epoch,Biotek,ABD)

Otomatik mikropipet (10µl, 100µl, 1000µl skalalarında,Gilson)

Otomatik multichanel pipet

ELISA Yıkama Cihazı (ELISA Reader)

5.1.2 Kullanılan Kimyasallar

Hücre kültürü besiyeri RPMI 1640 (Biochrome AG,Germany)

Fetal bovine serum (Biochrome AG, Germany)

Antibiyotik (PSA) (Penicilin&Streptomycin)

Tyrphan blue (Sigma-Aldrich,USA)

MTT (Sigma-Aldrich,USA)

DMSO (Sigma-Aldrich,USA)

ELISA Kit (Mybiosource) (PKB, BCR-ABL, ERK, GAB2, GRB2)

Albumin (Sigma-Aldrich, USA)

Bradford Solüsyonu (1X)

Distile su

5.1.3 Kullanılan tampon ve çözeltiler

Bradford solüsyonu (5X, seyreltilmiş)

MTT (5 mg/ml konsantrasyonda, PBS ile hazırlanmış)

SDS %10 (50 g SDS+ 5 ml 1 N HCL+ 500 ml distile su)

5.2 Yöntem

5.2.1 Hücre kültürü çalışmaları

K562 KML hücreleri % 10 fetal dana serumu, %1 penisilin/streptomisin karışımından oluşan RPMI 1640 besiyeri ile birlikte 25 cm²'lik flaslara ekildi. Oluşturulan hücre kültürleri %5 CO₂ ve % 95 nem içeren 37 °C sabit sıcaklıktaki inkübatörde inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin gelişimi inverted mikroskop ile incelendi. 2-3 günde bir hücreler pasajlandı. Yeterli sayıya ulaşması beklendi. Hücre sayımları Thoma lamı ile yapıldı, canlılıklar Tryphan blue testi ile değerlendirildi. Yeterli sayıya ulaşan hücreler MTT testi için hazırlandı.

5.2.2 MTT YÖNTEMİ İLE STI571 VE GENİSTEİNİN IC50 KONSANTRASYONLARININ BELİRLENMESİ:

MTT ([3-(4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H tetrazoliumbromide]) testi sitotoksisitenin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan enzimatik bir

testtir. Bu yöntem ile hücre topluluğundaki canlı hücrelerin oranı kolorimetrik yöntemle kantitatif olarak saptanabilmektedir. MTT testi temel olarak sağlam hücrelerde uygulanan kimyasal düzeyine bağlı olarak mitokondrinin tetrazolium halkasının parçalanması ilkesine dayanmaktadır. Mitokondri enzimleri (süksinat dehidrogenaz) ile indirgendiğinde oluşan sarı renkli tetrazolium kristalleri çeşitli organik çözücüler ile çözüldüğünde mavi mor formazan kristallerine dönüşür. Oluşan kristaller 540 nm dalga boyunda optik yoğunluklarının ölçülmesi ile değerlendirilir.

Yöntem 96 kuyucuklu ELISA plakalarında çalışılır ve şu şekilde uygulanır.

1. 1. kolon besiyeri kontrol kolonudur ve 150 µl besiyeri eklendi, 2.kolon hücre kontrol kolonudur 100 µl besiyeri eklendi. 3. kolon en yüksek ilaç dozun konması açısından boş bırakıldı. 4-12 arasındaki tüm kolonlara da 100 µl besiyeri eklendi.
2. En yüksek ilaç dozu 200 µl olacak şekilde 3.kolona konuldu.
3. İlaç yatay olarak 100 µl dilüe edilerek dağıtıldı.
4. Kuyu başına 15000/50 µl hücre gelecek şekilde hücre süspansiyonu tüm kuyulara dağıtıldı.
5. Kaset belirlenen sürelerle (24, 48 saat) 37 °C de inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyonun ardından 20 µl MTT kuyulara dağıtıldı.
7. 37 °Cde 4 saat inkübasyona bırakıldı.
8. İnkübasyon sonunda tüm kuyulara 100 µl %10 SDS eklenerek bir gece inkübasyona bırakıldı.
9. İnkübasyonun ardından 540 nm değerinde okutulmuş sonuçlar kaydedildi.

Uygulama yapılmayan hücrelerin optik değerlerinden kör okumanın değerleri çıkartılarak elde edilen verilerden grafik çizildi. Elde edilen grafiğin eğimi hesaplandı. Daha sonra bu eğime uygun olarak hücrelere uygulanan kimyasalların IC50 dozları hesaplandı.

5.3 Hücrelere STI571 ve Genistein Uygulamalarının Yapılması:

K562 hücreleri 6 kuyucuklu hücre kültür kaplarının her bir kuyucuğunda 1×10^6 olacak şekilde olacak şekilde ekildi. STI571, genistein, STI571+genistein ve kontrol uygulamaları için 3'er set ekim yapıldı. Setlerden iki tanesi aynı gün bir tanesi farklı günde çalışıldı. Kullanılan genistein DMSO içinde, STI571 ise steril distile su içinde hazırlandı. Her kuyuda son hacim 4 mL olacak şekilde ayarlandı ve kimyasallar MTT sonuçlarına uygun olacak şekilde kondu.

5.4 Hücre Kültüründen Protein İzolasyonu:

Protein izolasyonu için aşağıdaki şekilde lizis tamponu hazırlandı.

Tris HCL (1 M, 10 ml):

1,21 gr Tris-base tartılıp, 10 ml distile su eklendi. pH 7.5 olacak şekilde ayarlanıp, hazırlanan solüsyon otoklavlandı. +4 °C 'de saklandı.

EDTA (0.125 M, 10 ml):

0,7 gr EDTA tartılarak hacim 10 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

CHAPS Buffer (% 5, 5 ml) :

CHAPS 0,25gr tartılıp distile su ile son hacim 5 ml'ye tamamlandı. +4 °C 'de saklandı.

β -mercaptoethanol (0,5 M, 5ml) :

β -mercaptoethanol' den 175 μ l alınıp, 4825 μ l distile su ile tamamlandı.

Lysis tamponu (300 µl) hazırlanışı:

Tris HCl : 3µl

MgCl₂ : 12µl

EDTA: 2.4µl

CHAPS : 30µl

Gliserol : 34.5 µl

Protein coctail : 30µl

β-mercaptoetanol : 3µl

Distile su : 212,1 µl

Tampon her defasında taze hazırlandı. 1,5 ml'lik tüplere hazırlanan hücre gruplarına stok tampondan 300 µl eklendi. Tampon eklenen hücrelerin birkaç kez dondurulup çözülmesi sonucu kuvvetli vorteks uygulanarak parçalanması sağlandı. Hücreler daha sonra +4 °C'ye ayarlanmış soğutmalı santrifüj cihazında 15 dakikada 15000 g'de santrifüj edildi. Santrifüj işlemi tamamlanan hücrelerin üst fazları yeni 1,5 ml'lik tüplere alındı. Pelletler protein miktarının yetersiz gelmesi durumunda işlemi tekrarlamak için saklandı. Üst fazları alınan hücrelerin protein düzeylerini ölçmek için bradford yöntemi uygulandı.

5.5 Hücre Kültüründen Protein Tayini

Total protein içeriğinin belirlenmesi Bradford tarafından geliştirilen metotla gerçekleştirildi. Bradford solüsyonu 5X olarak hazırlandı, karanlık ortamda +4°C'de saklandı. 5X solüsyonunu hazırlamak için 500 mg Coomassie brilliant blue G250' den, 250 mL Ethanolden ve 500 mL fosforik asitten olacak şekilde konuldu, solüsyon 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan 5X solüsyonu 1X'e seyreltildi ve süzüldü. BSA (Bovine serum albumin) taze olarak, 1mg/ml olacak şekilde hazırlandı.

Örnekler hazırlanırken 15 µl örnek + 235 µl distile su olacak şekilde cam tüplere dağıtıldı. Kontrol tüpü (kör) bradford ve distile su içerirdi. Tüplere sırasıyla bradford solüsyonu, distile su ve örnek olacak şekilde koyuldu. Hazırlanan tüpler karanlık ortamda 10 dakika oda ısısında bekletildi. Süre sonunda tüpler iyice vortekslendi ve ELISA kasetine pipetajlanarak konuldu. 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülen absorbans değerlerine göre derişimler belirlendi. Belirlenen derişimlere uygun grafik formüle edilerek çizildi.

5.6 ELISA Yöntemi :

ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) yöntemi antijen veya antikorların saptanması ve ölçülmesi için kullanılan hızlı ve hassas bir yöntemdir. Bu teknikte solid faz 96 kuyucuktan oluşan polisistren kasetlerden meydana gelir. Solid fazın görevi örnek içinde mevcut olan antijen veya antikorları immobilize etmektir. İmmobilizasyon sonrası yapılan inkübasyon sonunda kasetler yıkanarak bağlanmayan materyaller ortamdaki uzaklaştırılır. Örnek ve konjugat eklendikten sonra ikinci kez inkübasyona bırakılır. Burada konjugat genellikle bir enzimle işaretli olan antikordur. Kullanılan yöntem göre konjugat ya solid faza ya da örneğe bağlanır. Kaset yıkanır ve substrat eklenerek tekrar inkübe edilir. Sonuç olarak enzim ve substratın reaksiyonundan kaynaklanan renk değişimi ELISA kaset okuyucuda değerlendirilir.

Bu çalışmada belirlenen sinyal yolları doğrultusunda ve elde edilen örneklerden BCR-ABL (P190), GAB2, GRB2, ERK1-2 VE PKB proteinlerinin düzeyleri ölçülmüştür.

5.6.1 GRB2 ve ERK1-2 ELISA Deney Prosedürü:

1. Deneye başlamadan 30 dakika önce tüm solüsyonlar oda sıcaklığına getirildi.
2. Standart kuyucukları, örnek kuyucukları ve kontrol/blank kuyucukları ayarlanarak her bir standart kuyucuğuna 50 µl standart, her bir örnek kuyucuğuna 50 µl örnek ve her bir kontrol/blank kuyucuğuna 50 µl örnek sulandırıcı (sample diluent) eklendi.
3. Her bir kuyucuğa 100 µl HRP- konjugat reaktifi eklenerek tüm kuyucukları kaplaması için 37 °C de 60 dakika inkübasyona bırakıldı.
4. İnkübasyon sonunda kaset 4 kez yıkandı. Otomatik yıkamada her kuyucuk için 350 µl, 1X yıkama solüsyonu kullanıldı.
5. Yıkama sonunda kaset ters çevrilerek bir kağıt peçete üzerinde yavaşça vurularak kurutuldu.
6. Her bir kuyuya kromojen solüsyon A ve B den 50 µl olacak şekilde konuldu. Yavaşça çalkalanıp, karanlık ortamda 37 °C de 15 dakika inkübasyona bırakıldı.
7. İnkübasyonun ardından her kuyuya 50 µl stop solüsyonu eklendi. Bu aşamada renk maviden sarıya dönmektedir.
8. ELISA okuyucuda 450 nm de optik yoğunluk ölçüldü.
9. Elde edilen değerler ile grafik elde edildi.

5.6.2 PKB (Protein kinaz B) ELISA Deney Prosedürü:

1. Tüm reaktifler uygulamaya başlamadan önce oda sıcaklığına getirildi.
2. Standart ve örnek kuyucuklarına 100 µl standart ve örnek eklendi, blank kuyucuklarına ise 100 µl referance standart & sample diluent eklendi. Yavaşça çalkalandı. 37 °C de 90 dakika inkübasyona bırakıldı.
3. Her kuyucuktaki sıvı uzaklaştırıldı, bu aşamada kaset yıkanmaz. Her bir kuyucuğa 100 µl biotinylated detection Ab working solution eklendi. Kasetin üzeri kaplama membranı ile kaplandı. 37 °C de 1 saat inkübasyona bırakıldı.

4. İnkübasyonun ardından her kuyucuktaki sıvı çekildi ve ardından 3 kez yıkama işlemi gerçekleştirildi. Otomatik ELISA yıkayıcıda 350 µl su ile yıkandı. Kuyucukların tamamen kuruması sağlandı.
5. Her kuyucuğa 100 µl HRP conjugate working solution eklendi. Kaplama membranı ile kasetin üzeri kapatılıp 37 °C de 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyonun ardından yıkama işlemi 5 kez tekrar edildi.
7. Her kuyucuğa 90 µl substrate solution eklendi. Yenibir kapama membranı ile kaset kaplandı. 37 °Cde 15 dakika karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonda iken renk değişimi gözlenir.
8. Her kuyucuğa 50 µl stop solution eklendi. Renk sarıya döner.
9. ELISA okuyucuda 450 nm de okutularak optik dansite ölçüldü.

5.6.3 GAB2 (Human GRB2-associated binding protein 2) ELISA Deney Prosedürü:

1. Standart tüpleri 4032-11200 G de 30 saniye santrifüj edildi.
2. Standartlar 1 mL sample diluent ile sulandırıldı. Stok solüsyon 1600 pg/ml dir.
3. Sample diluent ten 250 µl her tüpe aktarıldı. Sample diluent standart 0 yerine geçer.
4. Her kuyucuğa 100 µl standart ve örnek eklenir. 37 °C de 2 saat inkübasyona bırakıldı.
5. Her kuyucuktaki sıvı aspire edildi, bu aşamada yıkama yapılmadı.
6. Her kuyucuğa 100 µl Biotin antibody (1x) eklendi. 37 °C de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
7. Tüm kuyular aspire edildi ve yıkandı. Yıkama işlemi 3 kez 2 şer dakika ara ile yapıldı. Son yıkamadan sonra aspire edilerek sıvı uzaklaştırıldı.
8. Her kuyuya 100 µl HRP-avidin (1x) eklendi. 37 °C de 1 saat inübasyona bırakıldı.
9. Yıkama işlemi 7. aşamadaki gibi 5 kez tekrar edilerek yapıldı.
10. Her kuyuya 90 µl TMB substrat eklenerek karanlık ortamda 37 °C de 15-30 dakika inkübasyona bırakıldı.
11. İnkübasyonun ardından her kuyuya 50 µl Stop solution eklendikten sonra hafifçe çalkalandı.

12. ELISA okuyucuda 450, 540, 570 nanometre değerlerinde okutulup yorumlandı.

5.6.4 p190/BCR-ABL (P190) (Human oncogene protein) Deney Prosedürü:

1. Tüm kit komponentleri çalışmadan önce oda sıcaklığına çıkarıldı.
2. Önceden antibadi kaplı kaset kuyucuklarına 50 µl standart ve örnek eklendi.
3. Kontrol kuyusuna 50 µl pH 7.0-7.2 arasında olan PBS eklendi.
4. Her kuyuya 100 µl konjugat solüsyonu eklendi. Eklendikten sonra iyice karıştırılması gerekmektedir.
5. Kaset 1 saat 37 °C de inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyondan sonra otomatik yıkama cihazında kaset 5 kez yıkandı. Yıkama cihazında program 10 saniye yıkama 5 saniye çalkalama şeklinde ayarlandı.
7. Yıkama işleminin ardından her kuyuya 50 µl substrat A ve substrat B eklendi. 10-15 dakika 37 °Cde inkübasyona bırakıldı.
8. İnkübasyonun ardından 50 µl stop solüsyonu eklenerek çalkalandı.
9. 450 nm de okutularak değerler kaydedildi.

6. BULGULAR:

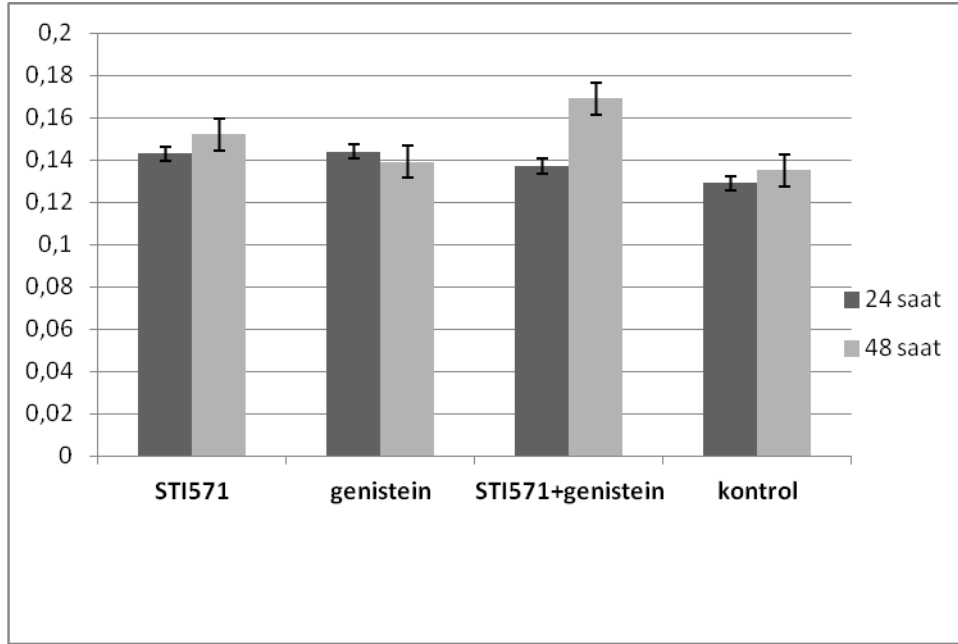
6.1 MTT Yöntemi ile Belirlenmiş olan STI571 ve Genistein değerleri:

MTT hücre proliferasyon testlerinin analizi sonrasında STI571 için 24 saat uygulama konsantrasyonu 30,25 µM, 48 saat uygulama konsantrasyonu 240 µM olarak belirlendi. Genistein için MTT testi uygulanarak 24 saatlik konsantrasyon 513,193 µM, 48 saatlik konsantrasyon 737,744 µM olarak belirlendi. (Tablo 6.1)

Uygulama/Saat	STI571	Genistein
24 saat	30,25µM	513,193µM
48 saat	240µM	737,744µM

Tablo 6.1: MTT hücre proliferasyon testlerinin analizi sonuçlarına göre belirlenen dozlar

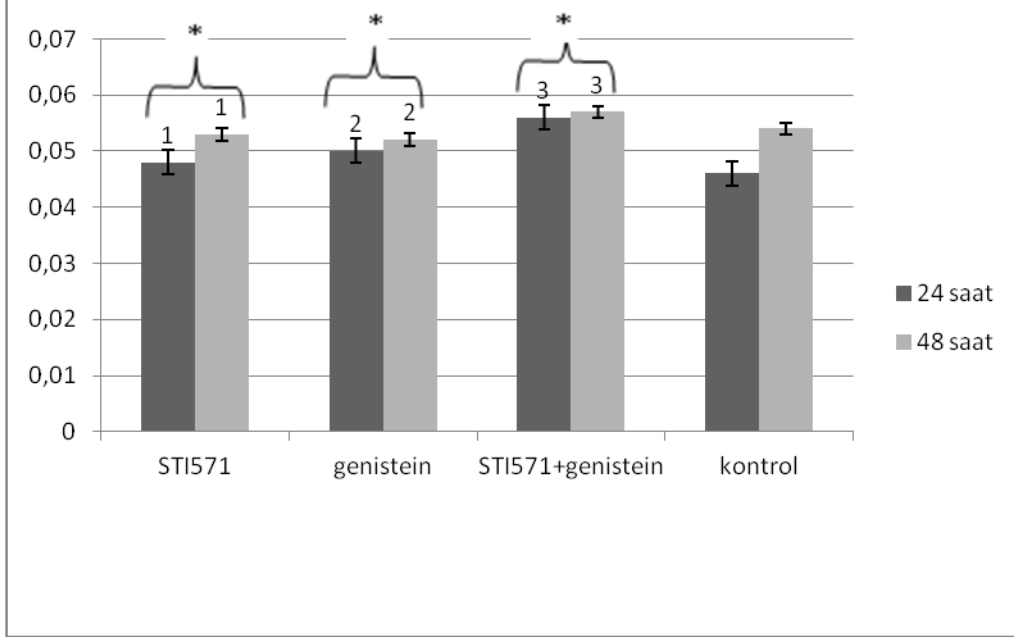
6.2 BCR-ABL protein düzeyleri



Grafik 6.1: 24 ve 48 saat BCR-ABL protein düzeyleri

24 ve 48 saat uygulama sonunda BCR-ABL protein düzeyleri değerlendirildiğinde tüm uygulama grupları için elde edilen değerler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gözlenen fark istatistiksel açıdan anlamsızdır ($p>0,05$)

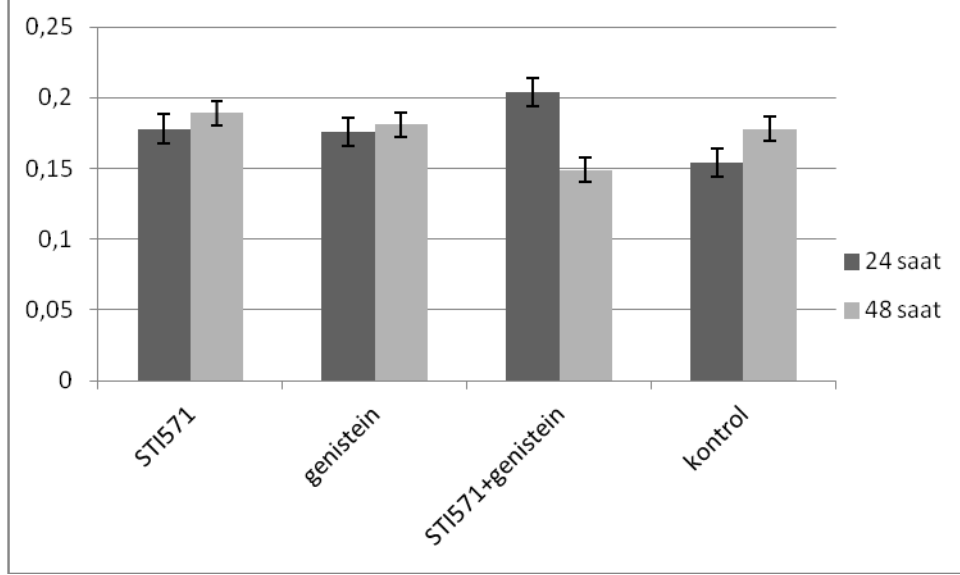
6.3 GRB2 Protein Düzeyleri:



Grafik 6.2: 24 ve 48 saat GRB2 Protein düzeyleri

24 ve 48 saat uygulama sonunda GRB2 protein düzeyleri değerlendirildiğinde tüm uygulama grupları için elde edilen değerler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gözlenen fark istatistiksel açıdan anlamsızdır ($p>0,05$). Ancak tüm uygulama gruplarında 24 ve 48 saat sonunda elde edilen değerler arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark vardır ($p>0,05$).

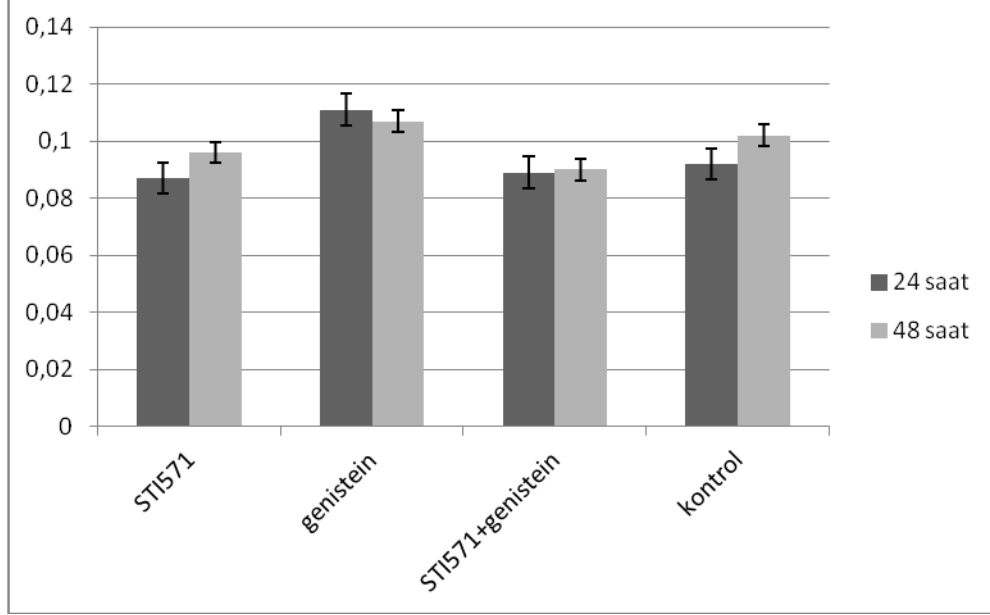
6.4 GAB2 Protein Düzeyleri:



Grafik 6.3: 24 ve 48 saat GAB2 Protein düzeyleri

24 ve 48 saat uygulama sonunda GAB2 protein düzeyleri değerlendirildiğinde tüm uygulama grupları için elde edilen değerler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gözlenen fark istatistiksel açıdan anlamsızdır ($p>0,05$).

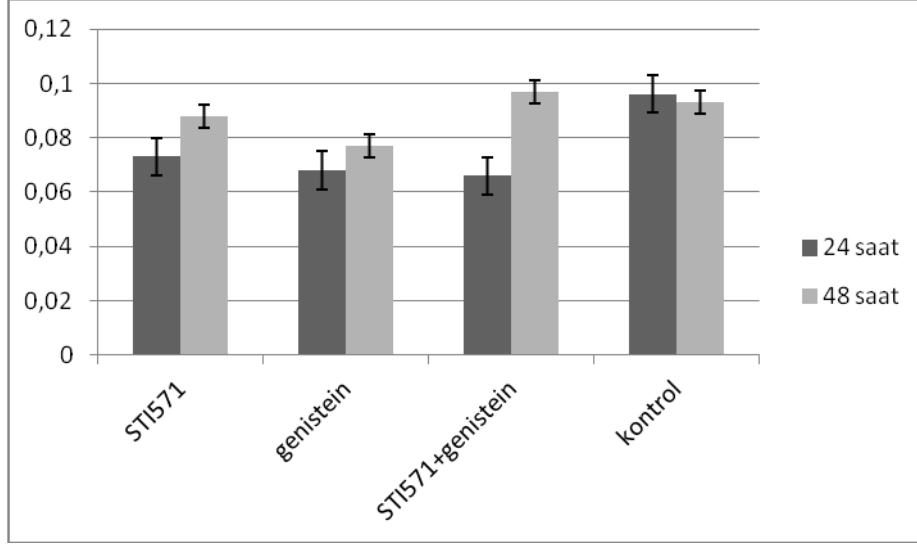
6.5 ERK Protein Düzeyleri:



Grafik 6.4: 24 ve 48 saat ERK Protein düzeyleri

24 ve 48 saat uygulama sonunda ERK protein düzeyleri değerlendirildiğinde tüm uygulama grupları için elde edilen değerler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gözlenen fark istatistiksel açıdan anlamsızdır ($p>0,05$).

6.6 AKT Protein Düzeyleri:



Grafik 6.5: 24 ve 48 saat AKT Protein düzeyleri

24 ve 48 saatlik uygulamalar değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). 48 saatlik uygulamada STI571+ genistein grubu ile STI571 ve genistein grupları arasında gözlenen değer anlamlıdır ($p>0,05$), ancak kontrole göre anlamlılık taşımamaktadır.

7. TARTIŞMA

Klonal bir hastalık olan KML, myeloid seri öncül hücrelerde proliferasyon artışı ve apoptoz azalması ile karakterizedir. Hastalığın moleküler patogeneğinde 9. ve 22. kromozomlar arasında resiprokal translokasyon sonucunda oluşan Philadelphia kromozomu rol oynar. Translokasyon sonucu *BCR-ABL* füzyon transkripti meydana gelir. STI571, KML tedavisinde hedefe yönelik olarak geliştirilen özgül bir tirozin kinaz inhibitörüdür. Etkisini ATP ile yarışarak gösterir. BCR-ABL dimerize olduktan sonra otofosforilasyon süreci tetiklenir ve bunun sonucunda hedefindeki kinazları aktive ederek aracı adaptör proteinleri için bağlanma bölgeleri oluşturur. BCR-ABL bağımlı yollar sağkalım, apoptozisin inhibisyonu ve hücre göçü ve yapışmasını etkiler. Ancak bu sinyal yolağının çok sayıda bileşeni vardır ve bunlar üzerindeki araştırmalar devam etmektedir (19).

Epidemiyolojik çalışmalar diyetle bağılı faktörlerin kanserin her basamağında etkili olduğunu göstermiştir. Soya, farklı topluluklarda beslenme alışkanlıklarına bağılı olarak toplam diyetin %10'una ulaşabilen miktarlarda tüketilmektedir ve bu bireylerin serumlarında soya isoflavonlarının oranı artmıştır. Bu topluluklarda hormon bağımlı kanserlerden ölüm oranları diğerk ülkelerden daha düşüktür. Ayrıca *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla soyanın çok sayıda kanser hücre dizisinin büyümesini engellediği gösterilmiştir. Bu yüzden soya kansere karşı kimyasal koruyucu olarak kabul edilir. Ancak etkinliğı konsantrasyonuna bağılıdır (43).

Bu çalışmada KML hücre dizisi K562 hücre hattı üzerinde STI571 ile literatürlerde çeşitli kanser türlerinde anti-kanser etkisi olduğu saptanan genisteinin birlikte etkinliğı değerlendirilmiştir (23). Daha önce yapılan çalışmalarda genisteinin farklı kanser hücre hatlarında fitoöstrojen etkisinin yanında tirozin kinaz olması nedeniyle hücre proliferasyonunu baskıladığı ve apoptozda önemli role sahip olduğu gösterilmiştir (23).

Çalışmamızda K562 hücre hattında STI571 ve genisteinin ayrı ayrı ve beraber kullanıldığında protein düzeylerinde ortaya çıkması beklenen değışiklikler değerlendirilmiştir. Bu sebeple BCR-ABL, GAB2, GRB2 ve bu modülatörlerin akışaşağı hedefi olan ERK ve AKT protein düzeyleri ELISA yöntemi ile

karşılaştırılmıştır. Hücelere 24 ve 48 saat süreleri ile 30,25 µM ile 240 µM STI571 uygulanmıştır. Uyguladığımız dozlar literatürde daha önce sonuçları yayınlanan çalışmalarla benzerdi. (44).

BCR-ABL protein düzeyleri tüm uygulama gruplarında hem 24 hem 48 saatte, kontrol grubuna benzerdi. STI571 BCR-ABL füzyon proteinine ATP ile yarışmalı olarak bağlanan tirozin kinaz inhibitörüdür (45) ve BCR-ABL hedefindeki proteinlerin fosforile olmasını engeller. Sonuçta STI571, BCRABL düzeyini azaltmaktan daha çok kinaz işlevini azaltarak hedefindeki proteinlerin aktivitesini azaltıcı yönde etki eder. Her ne kadar STI571 kinaz inhibitörü olarak işgörürse de aynı zamanda proteinlerin ve fosfoproteinlerin düzeylerini de azaltır (46,47).

Daha önce Anabilim Dalı'mızda gerçekleştirilen bir başka çalışmada STI571'in *BCR-ABL* mRNA düzeyine etki etmediği gösterilmiştir (48). Bizim sonuçlarımız bu çalışmanın sonuçları ile uyumlu olup STI571 BCR-ABL protein düzeyine etki etmemektedir.

Verilerimize göre bir tirozin kinaz inhibitörü olarak genistein STI571 ile birlikte kullanıldığında BCR-ABL protein düzeyinin azalmasına bir katkı sunmamıştır. Gerek tek başına gerekse ikili uygulama sonrasında elde edilen değerler kontrol grubu ile benzerdir. BCR-ABL ifade eden hücrelerde yüksek doz STI571 etkinliği ancak 2-4 gün sonra ortaya çıkar. Daha önce yapılan çalışmalarda genisteinin ancak 1 mM düzeyde olduğu zaman fosfotirozin içeren proteinleri baskılayarak STI571'e etkinliğine doğrudan katkı sunabildiği gösterilmiştir. Bu genistein dozu deney setimizde kullandığımız dozdan yüksektir. Biz laboratuvar koşullarımızda belirlediğimiz IC50 dozunu kullandık ve aynı zamanda uygulama sürelerimiz K562 hücrelerinin kendi sayısını iki katına çıkardığı süre (bölünme süresi) olan 24 saat ve bunun iki katı olan 48 saat şeklinde düzenlenmiştir. (49)

Genistein IC50 dozunda tek başına kullanıldığı zaman bir başka kinaz olan timidin kinaz üzerinde inhibitör etki göstermemektedir. Etkisi ancak 72 saat uygulandığı zaman en üst düzeye ulaşmaktadır. Genisteinin etkisi süre bağımlıdır ve IC50 dozda kullanıldığında bile ancak 120 saat uygulandığında hücre ölümünü uyarmaktadır (50). Bunların yanısıra primer kanser hücrelerinden farklı olarak K562 hücrelerinin sinyal potansiyeli aşırı artmıştır.(51) Tüm bu veriler bir arada değerlendirildiğinde deney setimizde gerek ajanların tek başına gerekse bir arada

uygulanması ile BCR-ABL protein düzeylerinin neden düşmediğini açıklar niteliktedir.

GRB2, içerisinde BCR-ABL'ın da bulunduğu tirozin kinazlar ile etkileşen bölgesi ile GAB proteinine tutunur ve GAB2'nin tirozin fosforilasyonunu regüle eder. GAB2'nin hedefinde AKT ve ERK yolları bulunduğu için GRB2 sinyal yollarında anahtar rol oynayan proteinlerden birisidir. Bu yolların etki mekanizmaları ise sağkalım, proliferasyon ve transformasyonun regüle edilmesidir (19). Çalışmamızda her iki ajanın tek başına ya da birlikte uygulamalarının GRB2 protein düzeyinde azalmaya sebep olduğunu ancak bunun istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı belirlenmiştir. Ancak dikkate değer bir nokta olarak tüm uygulama gruplarında GRB2 protein düzeylerindeki azalma 24 saatte 48 saate göre anlamlı derecede düşüktü. Buna göre STI571 ve genisteinin GRB2 protein düzeylerindeki etkileri süre bağımlıdır. STI571'in K562 hücrelerindeki etki mekanizması doz bağımlı olarak fosforile haldeki GRB2 üzerinden yürür. STI571, ABL'nin kinaz aktivasyonunu tamamen engellese de içerisinde GRB2'nin de bulunduğu kinaz yürütülü diğer sinyal mekanizmaları farklı yollarla işletilebilir (52). Bu bulgular deney setimizde STI571'in GRB2'nin düzeyi ve dolayısıyla akışaşağı hedeflerinin aktivasyonun engelleyememesini açıklar niteliktedir.

GAB2 bir iskelet proteini olup plazma zar reseptör sinyali ile içerisinde BCR-ABL'ında bulunduğu tirozin kinazların akışaşağı efektörlerini birbirine bağlar (53). Sonuçlarımıza göre STI571 her iki uygulama süresi sonrasında da GAB2 protein düzeyinde anlamlı bir azalmaya neden olmamıştır. Bununla birlikte genistein tek başına ya da STI571 ile birlikte uygulandığında 24 ve 48 saat süreler için GAB2 protein düzeylerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmamıştır. Daha önce yapılan bir çalışmada STI571'in GAB2'nin düzeyini azaltmaktan çok fosforilasyon yeteneğini baskıladığı ve KML hastalarının plazma konsantrasyonu olan 1 μ M'ın 10 katı düzeye çıktığında bile GAB2 proteinin hedefindeki proteinlerle olan etkileşimini engellemediği belirlenmiştir (54). Verilerimiz bu sonuçlarla uyumlu olup STI571 GAB2 düzeyini değiştirmemiştir. Buna ek olarak genistein de deney setimizde kullandığımız uygulama süresi ve konsantrasyonlarda STI571'in etkinliğini değiştirmemiştir.

BCR-ABL hedefinde yer alan Ras sinyal yolağının aktivasyonu lösemik hücrelerin proliferasyonuna neden olur. Ras aktifleştikten sonra adaptör molekül olan Raf1 aracılığıyla MAPK/ERK yolağını aktifleştirir (19). MAPK/ERK yolağı apoptoz ve sağkalımı düzenlemede işlevi olan yolaktır ve çok sayıda proteinin hedefidir. Verilerimize göre STI571 ve genistein tek tek ya da bir arada kullanıldığında ERK protein düzeyinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. K562 hücrelerinde PKC ve BCR-ABL'nin birbirlerinden bağımsız olarak Raf1 aracılığıyla ERK'i aktive ettiği ve bu iki proteinden herhangi birinin baskılanmasının ERK ifadenmesini etkilemediği gösterilmiştir (55). Benzer bir çalışmada bir bitki fenoliği olan resveratrolün BCR-ABL ve ERK'in fosforilasyon ve protein düzeylerine etki etmediği gösterilmiştir (56). Sonuçlarımız bu çalışmaların sonuçları ile uyumlu olup STI571 ve genistein ERK protein düzeylerinde değişiklik oluşturmamıştır.

AKT yolağı hücre sağ kalımı ve apoptoz arasındaki dengeyi sağlayan yolaktır. Bizim çalışmamızda her iki ajanın birlikte ya da tek başlarına uygulaması ile AKT protein düzeylerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı belirlendi. STI571 K562 hücrelerinde AKT düzeyini değiştirmediği gibi fosforilasyon düzeyini de değiştirmez (47). Daha önce yapılan çalışmalarda farklı hücre dizileri kullanılarak genisteinin AKT yolağı üzerindeki etkisi araştırılmış fakat toplam AKT protein düzeyinde kontrole göre bir değişim elde oluşturmadiği gösterilmiştir (43). Aynı zamanda AKT yolağı kanser hücrelerinde BCR-ABL'dan bağımsız olarak ve sürekli şekilde etkinleştirilir (57). Sonuçlarımız bu çalışmalar ile uyumlu olup her iki ajanın tek başlarına ya da bir arada kullanılması AKT protein düzeylerini değiştirmemiştir.

Bu çalışmada amacımız STI571'in KML patogeneğinde rol oynayan sinyal proteinlerinin düzeyleri üzerine etkilerini genistein aracılığıyla artırıp artmayacağını araştırmaktı. Bu amaçla BCR-ABL, GAB2, GRB2, ERK ve AKT proteinlerinin düzeyleri toplu halde değerlendirilmiştir. Sonuçları yayımlanan çalışmalar dikkate alındığında, bu çalışma ile ilk kez genisteinin STI571 ile birlikte etkileri bir protein paneli üzerinde değerlendirilmiştir. STI571 ve genisteinin tirozin kinaz inhibitörü olduğu bilinmektedir. Ancak her iki kimyasalın protein düzeylerine etkisi üzerine tartışmalı sonuçlar vardır. Biz de bu tartışmalı konuya açıklık getirmeyi hedefledik ve sonuçlarımıza göre her iki ajanın birlikte kullanılmasının protein düzeyleri açısından anlamlı bir fark oluşturmadiğini belirledik. Böylece *in vitro* ortamda

STI571 genistein ikilisinin etki mekanizmasının protein düzeyleri üzerinden olmadığını göstermeye yönelik veriler elde etmiş olduk. Elde ettiğimiz verilerin bundan sonra yapılacak benzer çalışmalara yol gösterici olacağını ve bu iki ajanın etki mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik daha detaylı moleküler analizler gerekli olduğunu düşünüyoruz.

8. KAYNAKLAR

- 1) Mughal TI, Goldman JM. Chronic myeloid leukemia: STI571 magnifies the therapeutic dilemma. *Eur J Cancer* 2001;37:561-68
- 2) Faderl S., Talpaz M., Estrov Z., et al. Chronic myeloid leukemia: biology and therapy. *Ann Intern Med.*, 131, 207-219, 1999
- 3) Litzow M.R. Imatinib resistance obstacles and opportunities. *Arch Pathol Lab Med.* 130, 669-679. 2006.
- 4) Lanauville P. Abl tyrosine protein kinase. *Seminars in immunology*; 7: 255-266. 1995.
- 5) Maru Y, Witte, On. The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. *Cell*; 67: 459-468; 1991.
- 6) Kurzrock R, Kantarjian HM, Druker BJ, et al. Philadelphia chromosome positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann intern Med*; 138: 819-830; 2003.
- 7) Deininger M.W.N., Goldman J.M., Melo J.V.,. The molecular biology of chronic myeloid leukemia., *Blood*, 3343-3356; 2000.
- 8) Saglio G., Cilloni D. Abl: The prototype of oncogenic fusion proteins. *Cell Mol. Life Science* 61, 2897-2911; 2004
- 9) Drummond MW, Holyoake TL. Tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid leukemia: so far so good? *Blood Rew.*15(2):85-95, 2001.
- 10) Laurent E, Talpaz M, Kantarjian H, et al. The BCR gene and Philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer Res.* 61:2343-2355, 2001.
- 11) Michel WND, Jhon MG, Junia VM. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*; 96-10: 3343-56; 2000.

- 12) Walz C, Sattler M. Novel targeted therapies to overcome imatinib mesylate resistance in chronic myeloid leukemia (CML). *Clinical Rev. Onc/Hemat*; 57: 145-164; 2006.
- 13) Tuğlu M.M., Melli M. İmatinib: Mechanisms of Action and Mechanisms of Resistance Development. *Ankara Üniversitesi Tıp Dergisi*; 65(2); 2012.
- 14) Hochhaus, A., S. Kreil, A. S. Corbin, et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* 16 (11):2190-6; 2002
- 15) Weisberg E, Manley PW, Breitenstein W. "Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant BCR- ABL". *Cancer Cell*; 7: 129-141; 2005.
- 16) Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K et al. "Clinical resistance to STI571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification". *Science*; 293: 876-880; 2001.
- 17) Shah NP, Tran C, Lee FY et al. "Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor". *Science*; 305: 399- 401; 2004.
- 18) O'Hare T, Shakespeare W, Zhu X et al. "AP24534, a Pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcome mutation-based resistance". *Cancer Cell*; 16: 401-412; 2009.
- 19) O'hare T, Deininger MWN, Eide C. Targeting the BCR-ABL signaling pathway in therapy-resistant philadelphia chromosome-positive leukemia. *Clin Cancer Res.* 17:212-221, 2011.
- 20) Cilloni D, Saglio G. Molecular Pathways: BCR-ABL1. *Clin Cancer Res.* 18(4):1-8, 2012.

- 21) Pradhan SC, Girish C. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian J Med Res.* 124(5):491-504, 2006.
- 22) Himansu K., Utkarsh R., Saurabh G., et al. Chronic Myeloid Leukemia: Therapeutic Targets, Pathways and Inhibitors. *Nuclear medicine & Radiation therapy* 6:6; 2015.
- 23) Banerjee S., Yiwei L., Wang Z., et al. Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer lett.*, 269 (2); 2008.
- 24) Richard A. D., Daneel F. Genistein. *Phytochemistry* 205-11; 2002
- 25) Barnes S., Kim H., Darley-USmar V., et al. Beyond ERa and ERb: estrogen receptor binding is only part of the isoflavone story. *J. Nutr.* 130-3; 2000.
- 26) Cookie P.S., Selvaraj V, Yellayi S. Genistein, estrogen receptors, and the acquired immune response. *J. Nutr* 704-708; 2006.
- 27) Hsieh C., Santoli R.C., Haslam S.Z, et al. Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (mcf-7) cells in vitro and in vivo. *Cancer research* 3833-3838; 1998.
- 28) Barnes S., Peterson G., Grubbs C., et al. Potential role of dietary isoflavones in the prevention of cancer. *Adv. exp. med. biol.*135-47; 1994.
- 29) Pavese M.J., Farmer L.R., Bergan R.C. Inhibition of cancer cell invasion and metastasis by genistein. *Cancer metastasis rev.* 465-482; 2010.
- 30) Taylor C.K., Levy R.M, Elliott J.C., et al. The effect of genistein aglycone on cancer and cancer risk: a review of in vitro, preclinical, and clinical studies. *Nutr. rev.* 398-415; 2009.

- 31) Yan G.R, Xiao C.L., He G.W., et al. Global phosphoproteomic effects of natural tyrosine kinase inhibitor, genistein, on signaling pathways. *Proteomics* 976-86; 2010.
- 32) Yu X., Zhu J., Mi M. et al. Anti-angiogenic genistein inhibits VEGF-induced endothelial cell activation by decreasing PTK activity and MAPK activation. *Med. oncol.* 349-57; 2012.
- 33) Banerjee S., Zhang Y., Wang Z., et al. In vitro and in vivo molecular evidence of genistein action in augmenting the efficacy of cisplatin in pancreatic cancer. *Int.J. Cancer*, 906-917; 2006.
- 34) Gilad L.A, Tirosh O., Schwartz B. Phytoestrogens regulate transcription and translation of vitamin D receptor in colon cancer cells. *J.Endocrinol*, 387-98; 2006.
- 35) Gu Y., Zhu C.F., Dai Y.L., et al. Inhibitory effects of genistein on metastasis of human hepatocellular carcinoma. *World J.Gastroenterol*, 4952-7; 2009.
- 36) Yanagihara K., Ito A., Toge T. et al. Antiproliferative effects of isoflavones on human cancer cell lines established from the gastrointestinal tract. *Cancer research*, 5815-5821; 1993.
- 37) Uckun M., Messinger Y., Chen C.L., et al. Treatment of therapy-refractory B-lineage acute lymphoblastic leukemia with an apoptosis-inducing CD19-directed tyrosine kinase inhibitor. *Clin cancer res*, 3906-13; 1999.
- 38) Druker B.J. Translation of the philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood*, 4808-17; 2008.
- 39) Ren.R. Mechanisms of BCR–ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nat.rev.cancer*, 172-83; 2005.

- 40) Deininger M. W., Vieira S., Mendiola R., et al. BCR-ABL tyrosine kinase activity regulates the expression of multiple genes implicated in the pathogenesis of chronic myeloid leukemia. *Cancer Res*, 2049-55; 2000.
- 41) Graf U., Casanova E.A., Cinelli P. The role of the inhibitory factor, pathway in derivation and maintenance of murine pluripotent stem cells. *Genes*, 280-297; 2011.
- 42) Wolff N.C., Veach D.R., Tong W.P., et al. A novel tyrosine kinase inhibitor, has greater antileukemic activity than imatinib mesylate in a murine model of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 3995-4003; 2005.
- 43) Sarkar FH, Li Y. Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein. *Cancer Metastasis Rev*, 265-80; 2002
- 44) Cohen M.S., Hussain H.B., Moley J.F. Inhibition of medullary thyroid carcinoma cell proliferation and RET phosphorylation by tyrosine kinase inhibitors. *Surgery* 132-960; 2002.
- 45) An X., Twari AK., Sun Y. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia. *Leuk. Res.*, 1255-68; 2010.
- 46) Zhang M, Luo Z, Liu H, et al. Synergistic anti-leukemic activity of imatinib in combination with a small molecule Grb2 SH2 domain binding antagonist. *Leukemia*. 948-51; 2014
- 47) Shao S, Li S, Qin Y, et al. Spautin-1, a novel autophagy inhibitor, enhances imatinib-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia. *Int J Oncol*. May;44(5):1661-8. doi: 10.3892/ijo.2014.2313; 2014
- 48) Üntekin B. İnsan Kronik Myeloblastik Lösemi Hücre Dizisi K562'de İmatinibin Ve Silimarinin *Bcr-Abl1*, *Grb2*, *Gab2*, *Akt* Ve *Erk* Gen İfadelenmelerine Olan Etkisinin Değerlendirilmesi. Yüksek lisans tezi, Başkent Üniversitesi, Sağlık bilimleri enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD, Ankara, 2014

- 49) Bueno-da-Silva AE1, Brumatti G, Russo FO, et al. Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis is independent of constant tyrosine-kinase activity. *Cell Death Differ.* May;10(5):592-8; 2003.
- 50) Jeong MH1, Jin YH, Kang EY, et al. The modulation of radiation-induced cell death by genistein in K562 cells: activation of thymidine kinase 1. *Cell Res.* Aug;14(4):295-302; 2004.
- 51) Wöhrle FU, Halbach S, Aumann K, et al: Gab2 signaling in chronic myeloid leukemia cells confers resistance to multiple Bcr-Abl inhibitors. *Leukemia*, 27:118–129; 2013.
- 52) Zhang M, Luo Z, Liu H, et al. Synergistic anti-leukemic activity of imatinib in combination with a small molecule Grb2 SH2 domain binding antagonist. *Leukemia.*; 28(4):948-51. doi: 10.1038/leu.2013.323; 2014.
- 53) Ding J, Romani J, Zaborski M, et al, Inhibition of PI3K/mTOR overcomes nilotinib resistance in BCR-ABL1 positive leukemia cells through translational down-regulation of MDM2. *PLoS One.* 11;8(12):e83510. doi: 10.1371/journal.pone.0083510; 2013
- 54) Halbach S1, Rigbolt KT, Wöhrle FU, et al. Alterations of Gab2 signalling complexes in imatinib and dasatinib treated chronic myeloid leukaemia cells. *Cell Commun Signal.* 22;11(1):30. doi: 10.1186/1478-811X-11-30; 2013.
- 55) Roy M, Sarkar R, Mukherjee A, et al. Inhibition of crosstalk between Bcr-Abl and PKC signaling by PEITC, augments imatinib sensitivity in chronic myelogenous leukemia cells. *Chem Biol Interact.* 5;242:195-201. doi:10.1016/j.cbi.2015.10.004.; 2015
- 56) A. Puissant, S. Grosso, A. Jacquet, et al. Imatinib mesylate-resistant human chronic myelogenous leukemia cell lines exhibit high sensitivity to the phytoalexin resveratrol *FASEB J.*, 22 pp. 1894–1904; 2008.
- 57) Ding J, Romani J, Zaborski M, et al. Inhibition of PI3K/mTOR overcomes nilotinib resistance in BCR-ABL1 positive leukemia cells through translational

down- regulation of MDM2. PLoS One. ;8(12):e83510. doi:
10.1371/journal.pone.0083510; 2013.