

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KRONİK MİYELOİD LÖSEMİ’DE GELİŞEN
DİRENÇTE HÜCRELERİN YENİDEN
PROGRAMLANMASINDA MİTOKONDRİLERİN
ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Yalda HEKMATSHOAR

TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU

İKİNCİ DANIŞMAN
Prof. Dr. Marie-Luce VIGNAIS

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Müdürlüğü'nün
16B0230006 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

2019

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Kronik Miyeloid Lösemi’de Gelişen Dirençte Hücrelerin Yeniden Programlanmasında Mitokondrilerin Etkisinin Araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı:

Tarih:

İmza:

KABUL ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Yalda HEKMATSHOAR tarafından hazırlanan “Kronik Miyeloid Lösemi’de Gelişen Dirençte Hücrelerin Yeniden Programlanmasında Mitokondrilerin Etkisinin Araştırılması.” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 02/09/2019

İmza
Prof. Dr. Fatma Belgin ATAÇ
Başkent Üniversitesi
Jüri Başkanı

İmza
Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU
Ankara Üniversitesi
Danışman

İmza
Prof. Dr. Kamil Can AKÇALI
Ankara Üniversitesi
Üye

İmza
Prof. Dr. Hayat ERDEM
Hacettepe Üniversitesi
Üye

İmza
Doç. Dr. Oya Sena AYDOS
Ankara Üniversitesi
Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Prof. Dr. Mehmet AKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	viii
Simgeler Ve Kısaltmalar	x
Şekiller	xvi
Çizelgeler	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kronik Miyeloid Lösemi	1
1.2. Kanseri ve İlaç Direnci Mekanizmaları	1
1.2.1. İlaç Taşıyıcı Pompalar	2
1.2.2. İlaç Hedefindeki Değişiklik	3
1.2.3. DNA Onarımı ve Genomik İstabilite	4
1.2.4. Senesens'ten (Yaşlanma) Kaçış	5
1.2.5. Tümör Heterojenitesi	5
1.2.6. Kanseri Kök Hücre	6
1.2.6.1. Epitelial Mezenkimal Transisyon	7
1.2.6.2. Hücre Membran Taşıyıcı (ABC ailesi)	9
1.2.6.3. Hipoksi	9
1.2.7. Apoptoz ve Metabolik Adaptasyonun İnhibisyonu	10
1.2.7.1. Mitokondri ve Kanseri	10
1.2.7.2. Mitokondri Dinamiği	11
1.2.7.3. Mitokondrinin Kanseri Gelişimindeki Rolü	12
1.2.7.4. Metabolizmanın Kanseri Gelişimindeki Rolü	13
1.2.7.5. ATP ve ATP Aracılıklı İlaç Direnci	17
1.2.7.5.1. Hücre İçi ATP'nin İlaç Direncindeki Rolü	17

1.2.7.5.2. Hücre Dışı ATP'nin İlaç Direncindeki Rolü	18
1.2.8. HSP (Heat shock protein)	18
1.2.8.1. HSP90 (Heat shock protein 90)	20
1.2.8.2. HSP90 İnhibitörü Gamitrinib'in Apoptoz Yolağındaki Etkisi	24
1.2.8.3. HSP90 İnhibitörü Gamitrinib'in Otofaji Yolağındaki Etkisi	24
1.2.8.4. HSP90 inhibitörü Gamitrinib'in ER-Stresi Üzerindeki Etkisi	25

2. GEREÇ VE YÖNTEM 32

2.1.Çalışmada Kullanılan Yöntemler 33

2.1.1. K-562S , K-562R ve K562R-adh Hücre Hatlarının Kültürü ve Pasajlanması 33

2.1.2. Hücre Sayımı ve Canlı Hücrelerin Belirlenmesi 34

2.1.3. MTT (Dimetil Tiazol) Hücre Canlılık Testi 34

2.1.4. RNA İzolasyonu 36

2.1.4.1. Agaroze Jel Elektroforezi 37

2.1.5. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time PCR), İntegrin ve Kanseri Kök Hücre PCR array 38

2.1.6. FISH Analizi 42

2.1.7. CD24 ve CD44 Proteinlerinin Akım sitometri ile Analizi 44

2.1.8. Mitokondri Miktarının Floresan Belirteçlerle Tayini: 45

2.1.9. Annexin V-PE ve 7AAD ile Apoptoz Tayini 46

2.1.10. Kaspaz 3/7 Aktivasyonunun Tayini 47

2.1.11. Rhodamin Assay ile P-glikoprotein Aktivite Tayini 48

2.1.12. ATP Ölçüm Testi 48

2.1.13. Mitobiyogenez 50

2.1.14. Mitokondriyal membran potansiyelinin belirlenmesi 51

2.1.15. Hücre Döngüsü Tayini 52

2.1.16. Sitokrom C Salınımının Saptanması 53

2.1.17. Western Blot Analizi 54

2.1.18. İstatistik 56

3. BULGULAR	57
3.1. K562R-adh Hücrelerin Fenotipik ve Fonksiyonel Karakterizasyonu	57
3.1.1. FISH Yöntemi ile BCR-ABL Füzyon Geni Analizi	58
3.1.2. BCR-ABL Füzyon Geninin Kantitatif Real Time-PCR Analizi	59
3.1.3. Kantitatif Eş Zamanlı PCR Array Analizi	59
3.1.3.1. İntegrin Hücre Panelinde Artan ve Azalan Genlerin İfadeleri	60
3.1.3.2. Kanser Kök Hücre Panelinde Artan ve Azalan Genlerin İfadeleri	64
3.2. Mitokondriyal HSP90 (TRAP-1) İnhibitörü Olan Gamitrinib'in Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi	71
3.3. Gamitrinib Uygulanan K562S, K562R ve K562R-adh Hücrelerinde Annexin V PE ve 7AAD ile Apoptoz Tayini	73
3.4. Gamitrinib Uygulanan K562S, K562R ve K562R-adh Hücrelerinde Kaspaz Aktivitesi Analizi.	77
3.5. Gamitrinib Uygulanan K562S, K562R ve K562R-adh Hücrelerinde Sitoplazmik Sitokrom C Salınım Analizi	80
3.6. Apoptotik Genlerin Analizi	81
3.6.1. BAX Gen İfadesi	82
3.6.2. BCL-2 Gen İfadesi	83
3.6.3. BCL- XL Gen İfadesi	84
3.6.4. BAD Gen İfadesi	85
3.6.5. BIM Gen İfadesi	86
3.7. ER Stres Yolağındaki Genlerin İfadeleri	89
3.7.1. GRP 78 Gen İfadesi	89
3.7.2. CHOP Gen İfadesi	90
3.7.3. IRE-1 Gen İfadesi	91
3.7.4. ATF-6 Gen İfadesi	92
3.7.5. PERK Gen İfadesi	93
3.8. Otofajik Gen İfadeleri	96
3.8.1. BECLIN-1 Gen İfadesi	96
3.8.2. ATG 5 Gen İfadesi	97

3.8.3. ATG 7 Gen İfadesi	98
3.9.İlaç Taşıyıcı Pompaların Gen İfadeleri	101
3.9.1. MDR-1 gen ifadesi	101
3.9.2. MRP-1 gen ifadesi	102
3.9.3. OCT-1 gen ifadesi	103
3.10. Metabolik Yolaklardaki Genlerin İfadesi	106
3.10.1. HK Gen İfadesi	106
3.10.2. PKM-1 Gen İfadesi	107
3.10.3. LDHA Gen İfadesi	108
3.11. Gamitrinib'in ATP Üretimi Üzerindeki Etkisi	111
3.12. Gamitrinib'in Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkisi	112
3.13. MitoTracker Red ile Boyanma Sonuçları	118
3.14. p-Glikoprotein Aktivitesinin Tayini için Rh123 Boyanma Sonuçları	121
3.15. Mitokondriyal Membran Potansiyeli Sonuçları	124
3.16. Mitobiyogenez Analizi	126
4. TARTIŞMA	128
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	169
ÖZET	176
SUMMARY	177
KAYNAKLAR	178
ÖZGEÇMİŞ	206

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında, İmatinib'e duyarlı (K562S) ve dirençli (K562R) hücrelerin yanısıra K562R-adh hücrelerinde, mitokondri şaperon inhibitörü aracılığı ile mitokondrilerin fonksiyonunun bozulması sonucunda metabolizma, hücre ölüm yolları ve kanser kök hücre karakterinin nasıl etkilendiği araştırılmıştır.

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Müdürlüğü'nün 16B0230006 proje numarası ile desteklen çalışmamız Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında yürütülmüştür.

Öncelikle bana bilim yapmayı sevdiren, başarılı bir bilim insanı olmanın gereğinin çok çalışmak olduğunu bana öğreten, hayallerimin peşinden koşmayı ve bu yolda benden hiç birşeyi esirgemeyen canım babama çok teşekkür ediyorum, her ne kadar bu tezi savunacağım günün hayalini birlikte kurmuş olsakta, kader bu hayali gerçekleştirmemize izin vermedi ama onun varlığını hep hissediyor ve onun bana öğrettiği ilkeler doğrultusunda bilim yapmaya devam edip, onun gurur duyacağı bir bilim insanı olmaya çaba göstereceğim 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 danışmanım Prof. Dr. Asuman SUNGUROĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

Tez sürecinde bana laboratuvarında çalışma fırsatı veren ve önerileriyle tezime yön veren eş danışmanım Prof. Dr. Marie-Luce VIGNAIS'e teşekkür ederim.

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

Deneylerimin her aşamasında ve tezi yazma sürecinde, yardımlarını benden esirgemeyen Doç. Dr. Arzu Zeynep KARABAY, Öğr. Gör. Dr. Buket ALTINOK

GÜNEŞ, Dr. Öğr. Üyesi. Aynur KARADAĞ GÜREL, Dr. Öğr. Üyesi. Aslı KOÇ ve Uzm. Bio. Yeter DİLEK'e teşekkür ederim.

Uzun yıllardır içinde olduğum, hayatımın iyi kötü her anını, mutluluklarımı üzüntülerimi paylaştığım, çalışmalarım sırasında hiçbir yardım ve desteği esirgemeyen, başta değerli hocalarım Prof. Dr. Fulya TEKŞEN ve Doç. Dr. Oya Sena Aydos olmak üzere, Bio. Furkan BALBAY, Meral BALA, Dilek YILMAZ, tüm arkadaşlarım ve tüm Tıbbi Biyoloji Ailesi'ne sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca, her adımında yanımda olan ve bana her türlü desteği vererek bu günlere gelmemi sağlayan, haklarını asla ödeyemeyeceğim vefakar ve kahramanım olan anneme ve varlığına daima şükrettiğim kanatsız meleğim ablama ve sevgili abime sonsuz teşekkür ederim.

SİMGELER ve KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Derece Santigrat
CT	Eşik Siklus
dH ₂ O	Distile Su
Dk	Dakika
g	Gravite
G	Gram
mM	Mili Molar
Sn	Saniye
U	Ünite
ug	Mikro gram
µl	Mikro Litre
µM	Mikro Molar
17-AAG	17-N-alilamino-17-demetoksigeldanamisin (<i>17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin</i>)
7AAD	7-Aminoaktinomisin D
ABC	ATP Bağlayıcı Kaset
ABCB1	ATP Bağlama Kaseti Alt Ailesi B Üyesi 1 (<i>ATP Binding Cassette Subfamily B Member 1</i>)
ABCG2	ATP Bağlama Kaseti Alt Ailesi G Üyesi 2 (<i>ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2</i>)
ADP	Adenozin difosfat
AKT	Serin/Threonin Protein Kinaz
ALL	Akut Lenfoid Lösemi
AML	Akut Myeloid Lösemi
AP	Akselere (hızlanmış) faz
ASK1	Apoptoz Sinyali Regüle Kinaz 1 (<i>Apoptosis Signal-Regulated Kinase 1</i>)
ATF4	Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 4

ATG5	Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 5
ATF6	Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 6
ATF6 α	Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 6 α
ATG7	Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 7
ATP	Adenozin Trifosfat
BAD	BCL2 ile İlişkili Hücre Ölümü Agonisti (<i>BCL2 Associated Agonist Of Cell Death</i>)
BAK	BCL2 Antagonisti / Öldürücü 1 (<i>BCL2 Antagonist/Killer 1</i>)
BAX	BCL2 ile İlişkili X, Apoptoz Düzenleyici (<i>BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator</i>)
BCL-2	B-Hücreli Lenfoma 2 (<i>B-Cell Lymphoma 2</i>)
BCL-XL	B-Hücreli Lenfoma-Ekstra Geniş (<i>B-Cell Lymphoma-Extra Large</i>)
BCR-ABL	Breakpoint Cluster Region/V-Abl Abelson
BCRP	Meme Kanseri Direnç Proteini (<i>Breast-Cancer-Related Protein</i>)
BER	Baz Kesip Çıkarma Onarımı (<i>Base Excision Repair</i>)
BID	BH3 Etkileşimli Alan Ölüm Agonisti (<i>BH3 Interacting Domain Death Agonist</i>)
BIM	Bcl-2 Etkileşimli Hücre Ölümü Aracısı (<i>Bcl-2 Interacting Mediator of Cell Death</i>)
BP	Blast Faz
bZIP	Bazik Lösin-Zincir 8 (<i>Basic Leucine-Zipper 8</i>)
CCCP	Karbonil Siyanid M-Klorofenil Hidrazon (<i>Carbonyl Cyanide M-Chlorophenyl Hydrazone</i>)
CDK1	Siklin Bağımlı Kinaz-1(<i>Cyclin-Dependent Kinase 1</i>)
cDNA	Komplementer DNA (<i>Complementary DNA</i>)
CHOP	C / EBP Homolog Protein (<i>C/EBP Homologous Protein</i>)
CP	Kronik Faz (<i>Chronic Phase</i>)
CypD	Siklofilin D (<i>Cyclophilin D</i>)
DAPI	4 ', 6-diamidino-2-fenilindol
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksinükleosid Trifosfat

DRP1	Dinamin ile İlgili Protein 1 (<i>Dynamin-Related Protein 1</i>)
eIF2 α	Ökaryotik Translasyon Başlatıcı Faktörü-2 A (<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 A</i>)
EMT	Epitelyal Mezenkimal Transisyon
EMT-TF	EMT'yi İndükleyen Transkripsiyon Faktörleri
ER	Endoplazmik Retikulum
ERAD	ER ile İlişkili Bozulma (<i>ER-Associated Degradation</i>)
ERK	Ekstrasellüler Sinyal-Regüle Kinaz
EtOH	Etil alkol
FBS	Fetal Bovin serum
FDU	Fluorodeoksi Uridin
FISH	Floresan In Situ Hibridizasyon
FOXA2	Forkhead Box A2
FOXC2	Forkhead Box C2
G0	Gap Evresi
G1	Gap 1 Evresi
G6P	Glikoz 6-fosfata
GRP78	Glukoz Düzenleyici Protein 78 (<i>Glucose-Regulated Protein 78</i>)
GRP94	Glukoz Düzenleyici Protein 94 (<i>Glucose-Regulated Protein 94</i>)
GTG	Giemsa/Tripsin
GTPaz	Guanosin Trifosfataz
HIF1 β	Hipoksi İndükleyici Faktör-1 β (<i>Hypoxia-Inducible Factor 1 β</i>)
HIF1 α	Hipoksi İndükleyici Faktör-1 α (<i>Hypoxia-Inducible Factor 1α</i>)
HK	Heksokinaz
HPRT	Hipoksantin-Guanin Fosforibosiltransferaz (<i>Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyltransferase</i>)
HSP	Isı Şok Protein (<i>Heat Shock Protein</i>)
HSP70	Isı Şok Protein 70 (<i>Heat Shock Protein 70</i>)
HSP90	Isı Şok Protein 90 (<i>Heat Shock Protein 90</i>)
IM	İmatinib Mesilat
IMM	İç Mitokondri Membranı
IRE-1	İnositol Gerektiren Enzim-1 (<i>Inositol-Requiring Enzyme-1</i>)

JNK	C-Jun N Terminal Kinaz
KCl	Potasyum Klorür
KD	Kinaz Domain
KKH	Kanser Kök Hücreleri
KML	Kronik Myeloid Lösemi
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LRP	Akciğer Direncine Bağlı Proteini
LYN SRC	V-Yes-1 Yamaguchi Sarcoma Viral Related Oncogene Homolog/V-Src Sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) Viral Oncogene Homolog (Avian)
M fazı	Mitoz Fazı
MAD2	Mitozu durdurma yetersizliği (Mitotic Arrest Deficient 2)
MAPK	Mitojenle-Etkinleşen Protein Kinaz (<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>)
MCL1	Miyeloid Hücre Lösemi Dizisi 1 (<i>Myeloid Cell Leukemia Sequence 1</i>)
MDR	Çoklu İlaç Direnci (<i>Multidrug Resistance</i>)
Mfn1	Mitofusin 1
Mfn2	Mitofusin 2
MMR	Yanlış Eşleşme Onarımı (<i>Mismatch Repair</i>)
mRNA	Mesajcı RNA
MRP1	Çoklu İlaç Direnciyle İlişkili Protein 1 (<i>Multidrug Resistance Protein 1</i>)
MSX2	Msh Homeobox 2
MTCO1	Mitokondrial Kodlanan Sitokrom C Oksidaz I (<i>Mitochondrially Encoded Cytochrome C Oxidase I</i>)
mtDNA	Mitokondriyal DNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NANOG	Nanog Homeobox
NaOH	Sodyum Hidroksit
NER	Nükleotid Kesip Çıkarma Onarımı (<i>Nucleotide Excision Repair</i>)
OCT-1	Organik Katyon Transporter-1 (<i>Organic Cation Transporter-1</i>)
OMM	Dış Mitokondri Membranı

OPA1	Optik Atrofi 1 (<i>Optic Atrophy 1</i>)
OXPHOS	Elektron Taşıma Zinciri Düzenegi ve Oksidatif Fosforilasyon
PBS	Phosphor Buffer Saline
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PDI-P5	Protein Disülfid İzomeraz Ailesi A (<i>Protein Disulfide Isomerase Family A</i>)
PDK-1	Piruvat Dehidrojenaz Kinazı 1 (<i>Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1</i>)
PDX1	Pankreatik ve Duodenal Homeobox 1
PERK	Protein kinaz RNA (PKR) benzeri ER kinaz (<i>Protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase</i>)
P-gp	P-glikoproteinler
Ph	Philadelphia Kromozomu
PHA	Phytohemaglutinin
PK	Piruvat Kinaz
PKM	Piruvat Kinaz M1/2
RNA	Ribonükleik Asit
RNaz	Ribonükleaz
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
Rpt3	Regulatory Particle Triple-A Atpase 3
RTK	Reseptör Tirozin Kinaz
RT-PCR	Revers Transkripsiyon -PCR
S fazı	İnterfaz
SDHA	Süksinat Dehidrojenaz Kompleksi Flavoprotein Alt Birimi A (<i>Succinate Dehydrogenase Complex Flavoprotein Subunit A</i>)
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SSC	Standart Saline Sitrat
Taq Pol.	Taq Polimeraz
TBE	Tris/Borate/EDTA
TBH	Tümör Başlatan Hücreler
TKI	Tirozin Kinaz İnhibitör
TMRE	Tetramethylrhodamine, Ethyl Ester
TPP	Trifenil Fosfonyum (<i>Triphenyl Phosphonium</i>)

TRAF-2	TNF Reseptörü İlişkili Faktör 2 (<i>TNF Receptor Associated Factor 2</i>)
TRAP1	Tümör Nekroz Faktörü Reseptörüne Bağlı Protein 1 (<i>Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Protein 1</i>)
UPR	Katlanmamış Protein Yanıtı (<i>Unfolded Protein Response</i>)
UV	Ultraviyole
VDAC	Mitokondriyal Dış Membran Protein Porini (<i>Mitochondrial Outer Membrane Protein Porin</i>)
XBP1	X-Box Bağlayıcı Protein 1(<i>X-Box Binding Protein 1</i>)
ZEB1	Çinko Parmak E-Kutu Bağlama Homeobox 1 (<i>Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1</i>)

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. İlaç direncinde rol oynayan mekanizmalar	2
Şekil 1.2. İlaç direncinden sorumlu metabolik yollar ve enzimler	16
Şekil 1.3. Gamitrinib, ER-stresindeki 3 sinyal yolağının aktivasyonu sağlamaktadır	30
Şekil.2.1. Gereç ve Yöntem şeması.	32
Şekil 3.1. Hücrelerin Işık mikroskopi görüntüsü	57
Şekil 3.2. K562R-adh hücrelerinde metafaz ve interfaz kromozomlarındaki BCR-ABL füzyon geninin FISH analizi.	58
Şekil 3.3. İntegrin panelindeki A) K562R hücrelerinin K562S hücreleri ile kıyaslandığında ifadeleri artan ve azalan genler B) K562R-adh hücrelerinin K562S hücreleri ile kıyaslandığında ifadeleri artan ve azalan genler C) K562R-adh hücrelerinin K562R hücreleri ile kıyaslandığında ifadeleri artan ve azalan genler	61
Şekil 3.4. İntegrin panelindeki hücreler arasında yüksek olarak ifade olan ortak genler	62
Şekil 3.5. İntegrin panelindeki hücreler arasında düşük ifade olan ortak genler	62
Şekil 3.6. İntegrin hücre paneli heat map analiz sonuçları (1.K562S/K562R 2.K562S/K562R-adh 3.K562R/K562R-adh)İ	63
Şekil 3.7. Kanser Kök Hücre Paneli A) K562R hücrelerinin K562S hücreleri ile kıyaslandığında ifadeleri	65
Şekil 3.8. Kanser kök hücre panelindeki hücreler arasında yüksek olarak ifade olan ortak genler	66
Şekil 3.9. Kanser kök hücre panelindeki hücreler arasında düşük olarak ifade olan ortak genler	66
Şekil 3.10. Kanser kök hücre paneli heat map analiz sonuçları	67
Şekil 3.11: Kök hücre pluripotent özelliğini düzenleyen sinyal yolağı.	68
Şekil 3.12. Fokal adezyon yolağı proteinlerinin oranları	68
Şekil 3.13. K562S, K562R ve K562R-adh hücrelerinde akım sitometri yöntemi ile CD24 ve CD44 yüzey	70

Şekil 3.14. Gamitrinib'in K562S, K562R ve K562R-adh hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi A)24.saat, B)48.saat ve C)72.saat	72
Şekil 3.15. K562S hücrelerinin Annexin V sonucu	74
Şekil 3.16. K562R hücrelerinin Annexin V sonucu	75
Şekil 3.17. K562R-adh hücrelerinin annexin V sonucu	76
Şekil 3.18. Gamitrinib uygulanan K562S, K562R ve K562R-adh hücrelerinin Annexin V sonucu	77
Şekil 3.19. Gamitrinib uygulanan K562S, K562R ve K562R-adh hücrelerinde kaspaz aktivitesi sonuçları grafiği	79
Şekil 3.20. Gamitrinib uygulanan K562S, K562R ve K562R-adh hücrelerinde kaspaz aktivitesi tayini	79
Şekil 3.21. A) K562S, B) K562R ve C) K562R-adh hücrelerine İmatinib, Gamitrinib ve kombinasyon olarak uygulanması sonucundaki mitokondrilerinden salınan sitoplazmik sitokrom C western sonuçları	80
Şekil 3.22. K562S, K562R ve K562R-adh hücrelerine İmatinib, Gamitrinib ve kombinasyon olarak uygulanması sonucundaki ışık mikroskopi görüntüleri	81
Şekil 3.23. A) K562S, B) K562R, C) K562R-adh D) Kontrol grubu hücrelerde apoptotik genlerin ifadesi	88
Şekil 3.24. A) K562S, B) K562R, C)K562R-adh, D) Kontrol grubundaki hücrelerde ER stresinden sorumlu genlerin ifadesi	95
Şekil 3.25. A) K562S, B) K562R, C) K562R-adh D) Kontrol grubundaki hücrelerinde otofajik genlerin ifadesi	100
Şekil 3.26. A) K562S, B) K562R, C) K562R-adh, D) Kontrol grubundaki hücrelerinde ilaç taşınmasından sorumlu genlerin ifadesi	105
Şekil 3.27. A) K562S, B) K562R, C) K562R-adh, D) Kontrol grubundaki hücrelerinde metabolik genlerin ifadesi	110
Şekil 3.28. Gamitrinib uygulanan K562S, K562R, K562R-adh hücrelerinde ATP üretimi üzerindeki etkisi	112
Şekil 3.29. Gamitrinib uygulanan K562S, K562R ve K562R-adh hücrelerinin hücre döngüsü analizi	113

Şekil 3.30. K562S hücrelerinin hücre döngüsü analizi	117
Şekil 3.31. K562R hücrelerinin hücre döngüsü analizi	117
Şekil 3.32. K562R-adh hücrelerinin hücre döngüsü analizi	118
Şekil 3.33. K562S, K562R , K562R-adh hücrelerinin mitoTracker-red analizi	120
Şekil 3.34. K562S, K562R, K562R-adh hücrelerinin mitoTracker-red analiz grafiği	121
Şekil 3.35. K562S, K562R, K562R-adh hücrelerinin rhodamine123 analizi	123
Şekil 3.36. K562S, K562R, K562R-adh hücrelerinin rhodamine123 grafiği	123
Şekil 3.37. K562S, K562R, K562R-adh hücrelerinin TMRE grafiği	125
Şekil 3.38. K562S, K562R, K562R-adh hücrelerinin mitobiyogenez sonuçları	127

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. c-DNA sentez protokolü	38
Çizelge 2.2. qRT-PCR Yapılan Genlerin Primer Dizileri	39
Çizelge 2.3. Kök Hücre Panellerindeki Gen Listesi	40
Çizelge 2.4. İntegrin Panellerindeki Gen Listesi	41
Çizelge 3.1. BCR-ABL real time sonuçları	59
Çizelge 3.2. CD24 ve Cd44 genlerinin mRNA seviyesindeki ifadeleri	69

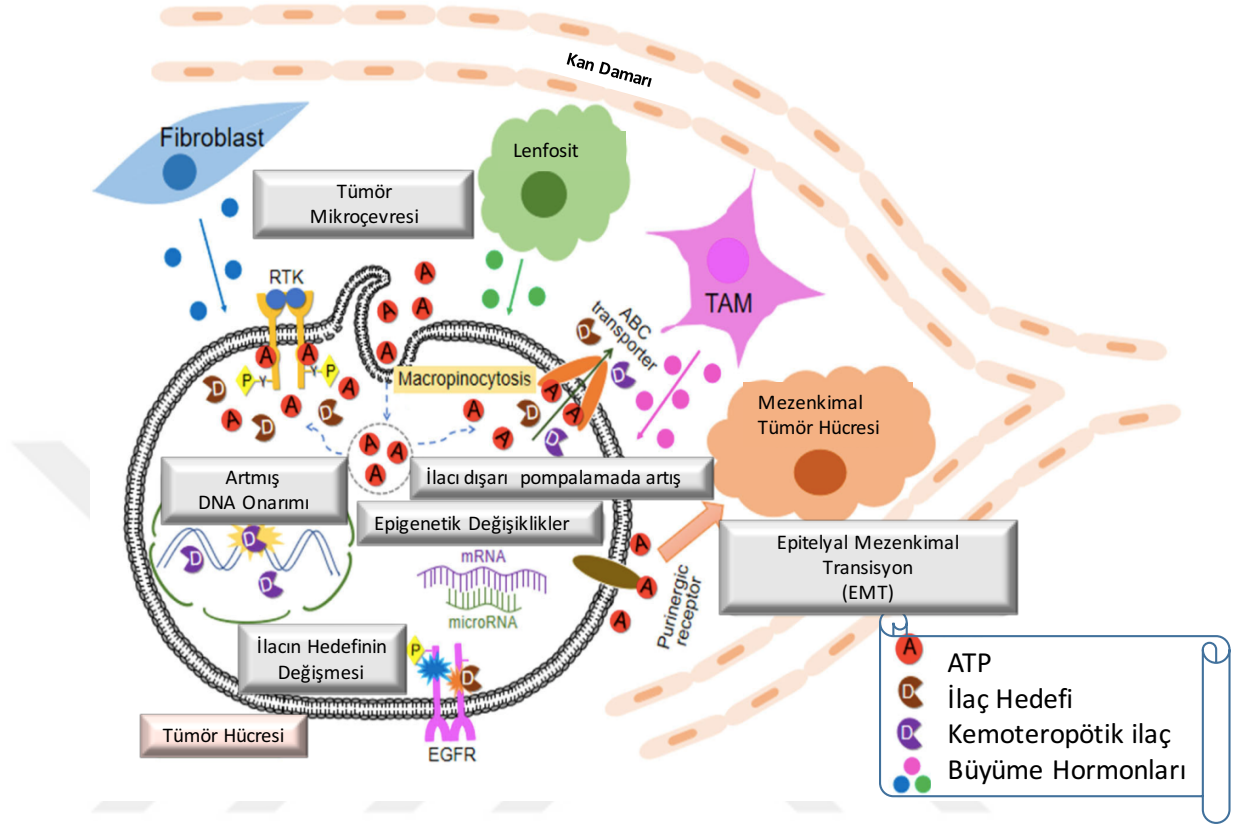
1. GİRİŞ

1.1. Kronik Miyeloid Lösemi

Kronik miyeloid lösemi (KML) miyeloproliferatif bir kan ve kemik iliği hastalığıdır. Philadelphia kromozomu KML’de genetik belirteç olarak BCR-ABL genini oluşturmaktadır. BCR-ABL geni, sırasıyla Abl ve Bcr genlerini içeren 9. ve 22. kromozomların resiprokal translokasyonu (t (9;22) (q34; q11)) sonucunda oluşmaktadır. Bu translokasyon yüksek tirozin kinaz aktivitesine sahip olan BCR-ABL onkoproteinini kodlamaktadır. KML genel olarak, kronik faz (CP), Akselere (hızlanmış) faz (AP) ve Blastik faz (BP) olarak 3 farklı evrede ilerlemektedir (Jain ve ark., 2016). İmatinib mesilat (IM)(Gleevec), İmatinib tedavisine karşı KML’nin ilk evreleri için birinci sıradaki tedavi seçenekleri arasındadır. Ama malesef bazı hastalar İmatinib tedavisine direnç göstermektedir, BCR-ABL’a bağlanma bölgelerindeki mutasyonlar örneğin T315I mutasyonu ilaç direncine neden olmaktadır (Redaelli ve ark., 2009).

1.2. Kanser ve İlaç Direnci Mekanizmaları

Şekil 1.1 de gösterildiği gibi çeşitli mekanizmalar ilaç direncinde rol oynamaktadır;



Şekil 1.1. İlaç direncinde rol oynayan mekanizmalar (X. Wang ve ark., 2019).

1.2.1. İlaç Taşıyıcı Pompalar

İlaç taşıyıcıları çoklu ilaç direncinde önemli rol oynamaktadırlar. ATP bağlayıcı kaset (ABC) proteinleri, çeşitli substratların, özellikle de ksenobiyotiklerin, hücre zarları boyunca aktif taşınmasından sorumlu pompalardır. ABC taşıyıcıları, ATP'yi ADP'ye hidrolize eden iki nükleotit bağlayıcı bölgeye ek olarak, yapısal değişiklikler yoluyla zar boyunca substratları tanıyan ve taşıyan iki transmembran alandan oluşmaktadır.

ABC ailesi;

- i) P-glikoproteinler (P-gp) aynı zamanda çoklu ilaç direnci proteini (MDR-1) veya ATP bağlayıcı kaset alt ailesi B üyesi 1 (ABCB1)
- ii) Çoklu ilaç direnciyle ilişkili Protein 1 (MRP1)
- iii) Meme Kanseri Direnç Proteini (BCRP)
- iv) Akciğer Direncine Bağlı Proteini (LRP) proteinlerinden oluşmaktadırlar.

MDR1, MRP1, BCRP ve LRP gibi efluks proteinleri, ilaçları hücre dışına çıkarır, böylece hücre içi konsantrasyonlarını azaltarak ilaç direncine neden olabilmektedir. Efluks proteinlerinin aşırı ifade edilmesi, lösemi, nöroblastom, akciğer, meme ve yumurtalık kanserleri gibi birçok hematolojik ve solid kanserlerde gösterilmiştir (Zheng 2017, Hekmatshoar ve ark., 2018). İlacı hücre içine pompalayan Organik Katyon Transporter-1 (Oct-1) gibi proteinlerin düşük ifadesi, yetersiz ilaç alımıyla sonuçlanır ve böylelikle ilaç direncine sebebiyet vermektedir (Hekmatshoar ve ark., 2018).

1.2.2. İlaç Hedefindeki Değişiklik

Hızlı hücre proliferasyonunu bozarak kanser hücrelerini öldüren ve normal bölünen hücreleri etkileyebilen geleneksel kemoterapilere kıyasla, hedefe yönelik tedaviler, tümör gelişiminde yer alan özel hedef proteinlerin aktivitesini inhibe ederek kanser hücrelerinin büyümesini engelleyebilir, böylece kanser için daha seçici ve etkili olmaktadır ve böylelikle normal hücreler daha az zarar görürler. Bununla birlikte, hedefe yönelik terapi, ilaç hedeflerinin değişmesinden kaynaklanan direnç problemini de geliştirebilir. Ancak, hedefli terapiler, ilaç hedeflerinin değişmesinden kaynaklanan direnç problemini de geliştirebilir. İlaç hedefindeki değişiklikler, hedef proteindeki ikincil bir mutasyon varlığı

veya epigenetik değişiklikler nedeniyle ifade seviyelerindeki değişiklikler olabilir (X. Wang ve ark., 2019).

1.2.3. DNA Onarımı ve Genomik İnstabilite

DNA hasar onarımı ilaç direncinde rol oynayan başka bir ilaç direnç mekanizmasıdır. DNA onarımı, DNA hasarının hücre DNA onarım mekanizmaları tarafından tanındığı ve düzeltildiği biyolojik bir süreçtir. Artan endojen reaktif oksijen türleri (ROS), ultraviyole (UV) radyasyonu, mutajenik kimyasallar ve kemoterapötik ajan seviyelerinin, DNA değişikliklerinin birikmesine neden olduğu gösterilmiştir. Buna göre, BER (base excision repair=baz kesip çıkarma onarımı), NER (nucleotide excision repair=nükleotid kesip çıkarma onarımı) ve MMR (mismatch repair=yanlış eşleşme onarımı) gibi DNA onarım mekanizmaları, zarar görmüş DNA'nın onarımı için tetiklenir ve böylece DNA'yı hedefleyen ilaçlara direnç sağlar (Bouwman ve Jonkers 2012).

Platin bazlı ilaçlar gibi DNA'ya zarar veren tedavilerin neden olduğu DNA onarımı için NER mekanizması önemli rol oynamaktadır. MMR, genomik bütünlüğün korunmasından sorumludur ve yapılan çalışmalar MMR eksikliğinin cisplatin gibi DNA'ya zarar veren ilaçlara artan tolerans ile bağlantılı olduğunu göstermiştir (Holohan ve ark., 2013)

1.2.4. Senesens'ten (Yaşlanma) Kaçış

Hücresel yaşlanma, büyük ölçüde p53 ve / veya p16INK4a'nın aracılık ettiği tümör baskılayıcı yolların aktivasyonuna yol açan hücre proliferasyonunun geri dönüşümsüz durdurulmasına karşılık gelir (Campisi 2013).

Hücresel yaşlanma içsel ve dışsal uyarıcılar tarafından tetiklenir, bu uyarıcılar arasında 3 önemli uyarıcı olan aktif onkojenler tarafından üretilen aşırı mitojenik sinyali telomer kısalması ve kemoterapötik ilaçların neden olduğu telomerik olmayan DNA hasarı yer almaktadır (Schmitt ve ark., 2002, Gordon ve Nelson 2012). Örneğin, kemoterapide hücre ölümünü indükleyerek kullanılan Doksorubisin ve Cisplatin de yaşlanmayı başlatabilir (Demaria ve ark., 2017).

1.2.5. Tümör Heterojenitesi

Tümörlerde dört heterojenite düzeyi bulunmaktadır: genetik heterojenite, hücre tipi heterojenite (kanser hücreleri, stromal hücreler, immün hücreler, vb.), oksijen / besin dağılımında metabolik heterojenite ve dinamik tümör ilerlemesinde geçici heterojenite.

Tümör heterojenitesi, kanser tedavisinin karmaşıklığını ve zorluğunu artırır, tek bir terapötik kullanarak tüm kanser hücrelerini öldürmeyi neredeyse imkansız hale getirmektedir. Bu problem birçok kanser tedavisinde kullanılan kombinasyon terapilerinin gelişmesine neden olmuştur. Bir çok çalışmada, çeşitli genetik yapıdaki kanser hücrelerinin alt popülasyonlarının, yumurtalık kanseri, renal hücreli karsinom, meme

kanseri ve kronik lenfositik lösemi gibi primer tümörlerde bir arada bulunduğunu göstermiştir.

Bu klonal varyantlar ilaçlara karşı farklı hassasiyete sahiptirler, böylece ilk tedavi sürecinde tümörün sadece bir kısmını öldürülebilir, diğer yandan hassasiyeti az olan kanser hücreleri hayatta kalabilirler (X. Wang ve ark., 2019).

1.2.6. Kanser Kök Hücre

Tümör başlatan hücreler (TBH) olarak da bilinen kanser kök hücreleri (KKH) son yıllarda araştırmacıların ilgi odağı haline gelmiştir. KKH ilk olarak lösemide tanımlanmış daha sonra farklı tiplerdeki solid tümörlerde tanımlanmıştır. Her ne kadar KKH modeli kanserlerin hiyerarşik yapı ve ilerleme modu açısından heterojenliğini açıklasa da, KKH'lerin kökenleri halen belirsiz ve tartışmalıdır. Hipotezlere göre, tümör tipine bağlı olarak, KKH'lerin ya yetişkin kök hücrelerinden, mutasyon geçirmiş yetişkin progenitör hücrelerinden ya da farklılaşma yoluyla kök benzeri özellikler elde eden farklılaşmış hücreler /kanser hücrelerinden türetilbileceğini düşündürmektedir (Phi ve ark., 2018).

Son zamanlarda yapılan araştırmalar KKH'lerin kemoterapiden sonra daha çok güçlendiğini göstermektedir çünkü bir çok kemoterapötik ajan tümör kitlesini yok ederken, tümör dokusunda kalan ve KKH adı verilen bu küçük hücre alt popülasyonu hayatta kalmaya ve çoğalmaya devam edebilmektedir (Dean ve ark., 2005).

KKH'leri çeşitli anti-kanser ilaçlarına karşı aşağıda belirtilen mekanizmaları kullanarak hücre ölümünden kaçmaktadırlar.

1.2.6.1. Epitelyal Mezenkimal Transisyon

Epitelyal Mezenkimal Transisyon (EMT), epitel hücrelerinin birbirlerine yapışmalarını kaybettiği ve mezenkimal kök hücrelerin özelliklerini kazandığı bir süreçtir. Yapılan çalışmalar EMT'nin kemoterapi direncinde kritik bir rol oynadığını göstermektedir. EMT'nin ilaç direncinin indüklenmesini sağlayan mekanizmaları tam olarak anlaşılmamasına rağmen, son zamanlardaki yapılan çalışmalar, EMT ve kanser kök hücrelerinin bağlantılı olduğu ve EMT programının kanser kök hücre fenotipini regüle ettiği gösterilmiştir.

Tümör örneklerinin gen ifade profilleri ve hastaların klinik yanıtları arasındaki ilişki araştırıldığında, EMT-bağılantılı gen ifadeleri ve tedaviye direnç arasında güçlü bir bağ olduğu gözlenmiştir (X. Wang ve ark., 2019).

EMT hücreleri ve kanser hücreleri arasında benzerlikler bulunmaktadır. Olası bir mekanizma, EMT hücrelerinin, Wnt, Notch ve Hedgehog yolları gibi sinyal yolları açısından kanser kök hücreleriyle (KKH) birçok benzerliği paylaşmasıdır (Du ve Shim 2016).

Wnt ve Hedgehog yolaklarının ilaç direnci ile olan bağlantısı gösterilmiştir (Y. Wu ve ark., 2012, Della Corte ve ark., 2015). Bu nedenle EMT, tümör hücrelerinin antikanser ilaçlara karşı direnç kazanmasını ve ilaç kaynaklı hücre ölümünden kaçınmasını sağlar.

EMT'yi indükleyen transkripsiyon faktörleri (EMT-TF'ler) ilaç direncinin geliştirilmesinde de rol oynamaktadır. Twist, Snail, Slug, ZEB ve FOXC2 gibi EMT-TF'lerinin yüksek ifadesinin ilaç direncini indüklediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Haslehurst ve ark., 2012, Siebzehnrbuhl ve ark., 2013, Zhou ve ark., 2015, Pudova ve ark., 2018).

Bazı EMT-TF'lerinin, ABC taşıyıcı aracılıklı ilacın dışa atılımını artırarak, direncin ilerlemesine neden olduğu gösterilmiştir. ABC taşıyıcıları kodlayan genlerin promotörlerinde EMT-TF'ler için bağlanma bölgeleri bulunmaktadır (Saxena ve ark., 2011). MDR ile yakından bağlantılı başka bir ABC taşıyıcısı olan ABCG2, SNAIL, MSX2, SOX2 ve ZEB1 tarafından düzenlenmektedir (X. Wang ve ark., 2019).

Bu EMT-TF'lerinin knock down ile susturulmasının ABC taşıyıcılarını baskılayarak kanser hücrelerini kemoterapötik ilaçlara karşı duyarlı hale getirdiği gözlenmiştir (X. Wang ve ark., 2019).

1.2.6.2. Hücre Membran Taşıyıcı (ABC ailesi)

ABC ailesi proteinlerinin ifadesi KKH'lerinde yüksek olarak ifade olmaktadır ve bu taşıyıcıların yüksek ifade olması kanser hücrelerinin tanımlanmasında kullanılabilmektedir (Begicevic ve Falasca 2017).

1.2.6.3. Hipoksi

Hipoksi, kendini yenilemenin gelişiminde ve sürdürülmesinde önemli rol oynamaktadır ve bu nedenle KKH özelliklerinin korunmasına katkıda bulunur (Simon ve Keith 2008). Hipoksi İndükleyici Faktör-1 α (HIF1 α), hipoksiye verilen hücrel yanıtın önemli düzenleyicisidir. Yüksek oksijen seviyelerinde, HIF1 α ubikutin ekleyip ve bunun sonucundada yıkıma uğrar, aksine oksijen seviyesi düştüğünde, ubikütinasyon inhibe edilir ve HIF1 α aktive edilir. Aktive olmuş HIF1 α çekirdeğe transloke olarak ve Hipoksi İndükleyici Faktör-1 β 1B (HIF1 β) ile dimerize olup, hipoksiye yanıt elementlerinin transkripsiyonunu aktive etmektedir (Semenza 2004). Böylelikle çoğalma ve hayatta kalma yollarını aktive etmenin yanı sıra, anjiogenezin gelişmesinde rol oynayan 60 genin transkripsiyonunu indüklemektedir (Michiels 2004).

Hipoksi, kök hücre ile ilişkili yolların aktivasyonu ve sessizliğin gelişmesi gibi başlıca iki sistem tarafından ilaç direncinde rol oynamaktadır. HIF1 α 'nın aktifleştirilmesiyle, birçok EMT ve kök hücre aktivatörünün ifadesi uyarılır. HIF1 α , Wnt, Hedgehog ve Notch yollarının yanı sıra cMET, CD133, NANOG, SOX2, FOXA2, SOX17 ve PDX1 gibi diğer kök hücre belirteçlerinin ifadelerini indüklemektedir (Majmudar ve ark., 2010, Liu ve ark., 2014).

1.2.7. Apoptoz ve Metabolik Adaptasyonun İnhibisyonu

Mitokondri, apoptoz ve metabolik yeniden programlanma gibi çeşitli moleküler mekanizmaların merkezinde olduğu için kanser ilaç direncinde aktif ve önemli rol oynamaktadır (Guaragnella ve ark., 2014).

Apoptoz, fizyolojik koşullar altında hücrel homeostazın korunmasında önemli bir mekanizma sağlar. BCL-2 ailesi proteinleri apoptoz düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar. BCL2 ailesi, hücre ölümünü başlatmak için gerekli olan BID, BIM, BAD, BAX ve BAK gibi pro-apoptotik proteinlerin yanı sıra hücrenin hayatta kalmasını destekleyen BCL2, BCL-XL ve MCL1 gibi anti-apoptotik proteinlerden oluşmaktadır. Pro-apoptotik genlerin ifadelerinin düşük olması, kronik lenfoblastik lösemi, baş-boyun ve yumurtalık kanserleri gibi çeşitli kanserlerdeki ilaç direnci ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir (Mohammad ve ark., 2015, Galluzzi ve ark., 2018).

Kanser hücre metabolizmasındaki değişiklikler, birkaç metabolik yolağın müdahalesi ile kanser hücresinin çoğalmasını, farklılaşmasını, apoptozunu ve tedaviye olan yanıtını etkilemektedir.

1.2.7.1. Mitokondri ve Kanser

Mitokondri çift membranlı organel olarak dış mitokondri membranı (OMM), iç zar boşluğu, iç mitokondri membranı (IMM) ve matriksten oluşmaktadır. İç mitokondri membranı çok sayıda krista olarak adlandırılan katlamalar içermektedir. Elektron taşıma

zinciri düzeneği ve oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) bu kristalar'da gerçekleşmektedir. Mitokondri aynı zamanda matriksinde binlerce kopyası olan halkasal çift zincir DNA genomuna (mitokondriyal DNA; mtDNA) sahiptir. 16,569 baz çiftinden oluşan mtDNA'sı, elektron taşıma zincirinde görev alan 13 protein, 22 taşıyıcı RNA ve 2 ribozomal RNA'ları kodlamaktadır. Mitokondride işlev gören diğer proteinler, nükleer genom tarafından kodlanır ve polipeptidin mitokondriye verimli bir şekilde verilmesini sağlayan amino terminallerinde bir mitokondriyal lokalizasyon sinyali içerir. Mitokondri Adenozin Trifosfat (ATP) formunda enerji üretmenin yanı sıra, demir-kükürt kümelerinin biyogenezinde ve oksidasyon-redüksiyon (redoks) durumunun düzenlenmesinde, makromolekül öncüllerinin sentezinde ve apoptozun başlamasında fonksiyon göstermektedir (Wai ve Langer 2016).

Mitokondri, çeşitli hücresel uyaranlara yanıt olarak morfolojilerini düzenleme konusunda eşsiz bir kabiliyete sahiptir. Örneğin, besin yoksunluğu sırasında, mitokondriler birbiriyle füzyona girerek ve birbirine bağlı filamentli ağlar oluşturarak besin öncüleri, mtDNA, elektron zincir kompleks bileşenlerinin paylaşımını ve OXPHOS'nun devamlılığını sağlamaktadırlar. Diğer taraftan, mitokondri fizyonu küçük ve fragmente mitokondriler oluşturmaktadır, bu da yüksek enerji ihtiyacı duyan bölgelerdeki mitokondri akımında ve mitoz sonucunda oluşan yavru hücrelerde eşit mitokondri dağılımında önemli rol oynamaktadır (Wai ve Langer 2016).

1.2.7.2. Mitokondri Dinamiği

Lewis ve Lewis 1914 yılında mitokondrilerin devamlı hareket halinde olduğunu ve bölündüğünü göstermişlerdir (Lewis ve Lewis 1914). Daha sonra, teknolojinin gelişmesi, örneğin mitokondriye özgü boyalar (tetramethylrhodamine, ethyl ester) ve floresan

işaretli proteinlerin keşfi (örneğin yeşil floresan-mito) bilim insanlarına füzyona girmiş ve fragmente olmuş mitokondri yapılarını daha doğru bir şekilde göstermelerine olanak tanımış ve bu özel biçimlendirmelerin nasıl direkt olarak mitokondri fonksiyonu ile ilişkili olduğunun açıklanmasına yardımcı olmuştur. Mitokondri dinamiği, çok sayıda korunmuş büyük guanosin trifosfataz (GTPaz) ile düzenlenir. OMM'nin füzyonu mitofusin 1 ve mitofusin 2 (Mfn1 and Mfn2) aracılığıyla düzenlenmektedir, IMM füzyonu ise Optik Atrofi 1 (OPA1) tarafından düzenlenmektedir. Diğer yandan mitokondri fizyonu ise dynamin-related protein 1 (DRP1) tarafından kontrol edilmektedir (Trotta ve Chipuk 2017).

1.2.7.3. Mitokondrinin Kanser Gelişimindeki Rolü

Son zamanlarda mitokondri fonksiyonu ve hücrel metabolizmanın kanserdeki rolü araştırmacıların ilgi odağı olmuştur, özellikle bazı çalışmalar tümör oluşumu sürecinde mitokondri yapısındaki değişiklikleri göstermiştir (Trotta ve Chipuk 2017).

Normal hücrelerdeki biyoenerji (ATP) üretimi pirüvatın mitokondri solunum zincirindeki oksitlenmesi sonucunda sağlanmaktadır, ancak tümör hücreleri oksijen kullanılabilirliğinden bağımsız olarak fermentatif glikolize bağımlıdırlar. Bu süreçte, glukoz sitoplazmada pirüvata daha sonra da laktata dönüşmektedir (Vander Heiden ve ark., 2009).

Geçtiğimiz on yıl boyunca, mitokondriyal dinamik proteinlerin transkripsiyonel, translasyonel ve translasyon sonrası seviyelerde nasıl düzenlendiğinin yanı sıra, hücreye

özgü ve hücre içi bağlamlarda hangi farklı mitokondriyal morfolojilerin tercih edildiği ile ilgili bilgi verilmiştir (Trotta ve Chipuk 2017).

1.2.7.4. Metabolizmanın Kansere Gelişimindeki Rolü

Kanser hücreleri, tümör içindeki yaygın şekilde değişen koşullarla (mikroçevre) örneğin hipoksi, düşük besin kaynakları ve asidoz gibi sert mikroçevre koşulları ile karşı karşıya kalıp uyum sağlamaktadırlar, tüm bu süre boyunca yüksek proliferasyon oranlarını sürdürmekte ve göç fenotipleri geliştirmektedirler (Hekmatshoar ve ark., 2018).

Mitokondriyal solunum;

- (i) Onkojenlere bağlı transformasyona katkıda bulunur,
- (ii) Protein translasyonu gibi yüksek talepli enerji mekanizmalarını destekler,
- (iii) İlaça direnç sağlar,
- (iv) Hücre motilitesini ve metastaz oluşumunu düzenler (Porporato ve ark., 2018).

Kanser hücreleri metabolik bir plastisite ile karakterize edilir ve çevresel koşullara uyum sağlamak için bir metabolik yoldan diğerine geçebilirler (Lehuede ve ark., 2016).

Kanser hücreleri büyük miktarlarda glikoz alımı yapmaktadır ve tercihen normoksik koşullarda bile OXPHOS yerine enerji üretimi için fermentatif glikoliz kullanır. Warburg etkisi olarak adlandırılan bu süreçte yüksek laktat salgılanmasına ve kanser dokusu asitleşmesine yol açmaktadır. Glikoliz enzimlerinin yüksek düzeyde ifade olmasının,

tümörün ilerlemesine ve tedaviye gelişen dirençte katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Şekil 1.2’de glikoliz yolağın yanısıra, ilaç direncinden sorumlu metabolik yollar ve bu yollarda görev yapan enzimler gösterilmiştir.

Geri dönüşü olmayan ilk glikoliz basamağı, glukozun heksokinaz (HK) tarafından katalize edilip, Glikoz 6-fosfata (G6P) dönüşümüdür. Heksokinaz 2'nin (HK2) yüksek ekspresyonunun laringeal, pankreas ve over kanserlerinde kemoterapiye direnç ile korele olduğu gözlenmiştir (Hekmatshoar ve ark., 2018). Tip II heksokinaz, dış mitokondriyal zar içinde bulunan ve "porin" veya "VDAC" olarak adlandırılan protein tarafından oluşturulan transmembran kanallarına bağlanır (Nakashima ve ark., 1986). VDAC bir ADP / ATP translokatorüdür ve HK2’nin hızlı bir şekilde glukozu fosforilleyerek glukoz-6 fosfata dönüştürmesi için gereken ATP kaynağını bolca sağlamaktadır (Pastorino ve ark., 2002). Bu etkileşim, enzimin G-6-P tarafından ürün inhibisyonuna duyarlılığını belirgin şekilde azaltır, mitokondriyal olarak üretilen ATP'ye erişimi sağlar ve proteolitik bozulmaya karşı korur (Pedersen ve ark., 2002). G-6-P ara-prekürsör, sadece tümörlerin büyümesi ve hızlı proliferasyonu için gerekli olan çoğu biyosentetik yollar için önemli bir karbon kaynağı olarak değil, aynı zamanda glikoliz için laktat katabolizma (oluşumu) sırasında başlangıç substratı olarak da görev yapmaktadır (Mathupala ve ark., 1997).

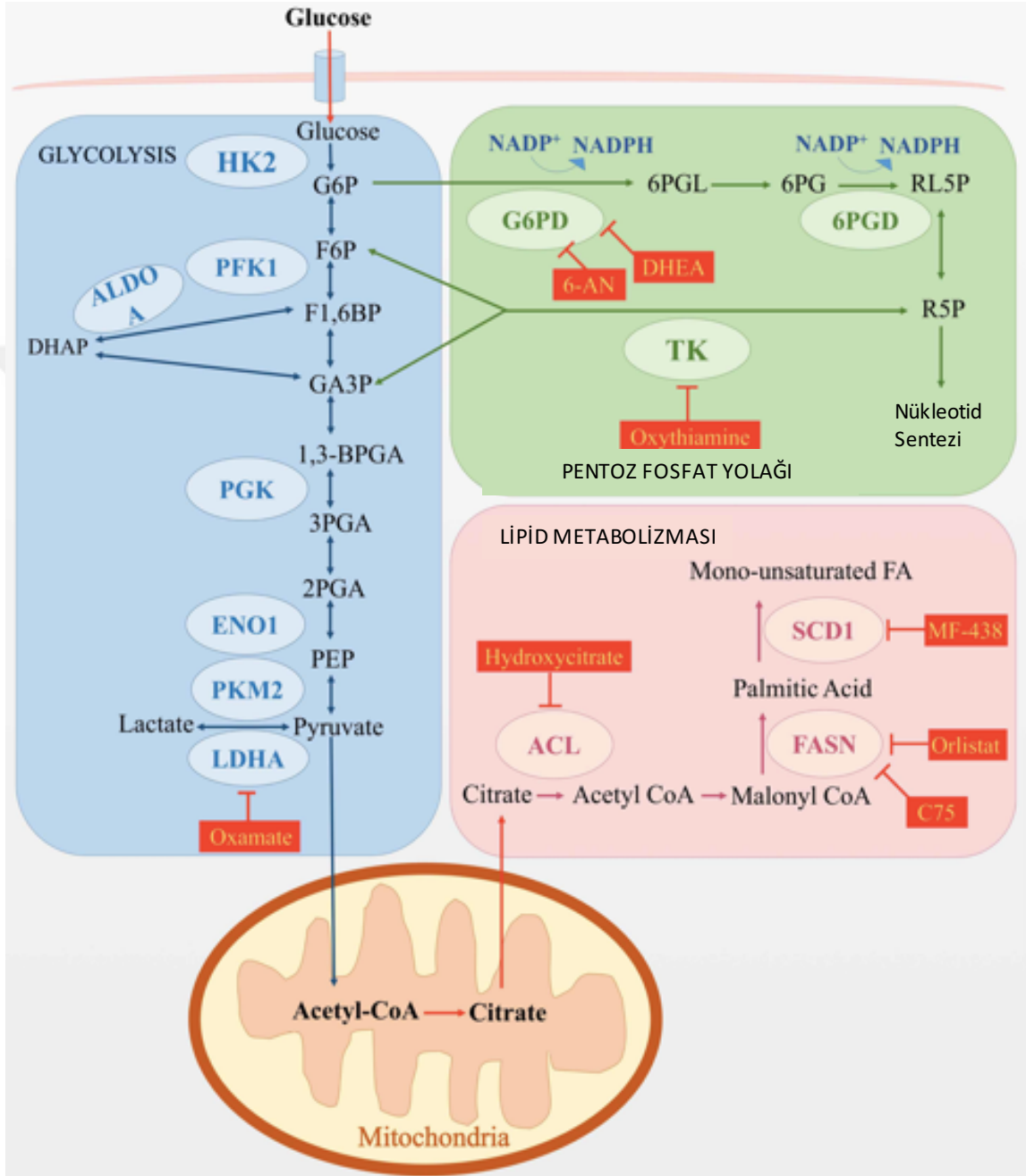
Aerobik koşullarda, bazı tümör hücrelerinde üretilen ATP'nin yarısı glikoliz aracılığıyla üretilir, ancak normal hücrelerde bu değerin genellikle %10'dan az olduğu ve oksidatif fosforilasyonun ATP üretimi için baskın bir yolak olduğu gözlenmiştir (Pedersen ve ark., 2002).

HK2’nin, ilaç indüklemesi sonucunda oluşan ERK aracılı otofajiyi artırarak, over kanserinde cisplatin direncinin artmasına neden olduğu gözlenmiştir (X. Y. Zhang ve ark., 2018).

HIF-1 α 'nın yüksek aktive olması aerobik glikoliz'in önemli bir belirteci olarak tamoxifen direnci ile uyumluluk göstermektedir, böylelikle aerobik glikolizin restorasyonu, tamoxifen dirençli meme kanserinin tedavisi için yeni terapötik hedef olabilir (Woo ve ark., 2015).

Son olarak, glikolizin geri dönüşü olmayan aşamasıda, pirüvat kinazlar (PK), önemli metabolit olan pirüvatın oluşumuna ve böylelikle ATP'nin oluşumuna yol açmaktadır. Carboplatin dirençli A549/R ve PC9/R NSCLC hücre serilerinde PKM2'nin yüksek ifadesinin yüksek glukoz metabolizması ve carboplatin direncinde sorumlu olduğunu göstermiştir (Liu ve ark., 2017).

Birçok kanser hücresi tarafından glukoz kataboliz yolağı olarak tercih edilen fermentatif glikolizde, laktat dehidrogenazlar (LDH), pirüvatın laktata geri dönüşümlü dönüşümünü katalize etmektedirler. Meme ve kolon kanserleri ve Ewing sarkomu dahil olmak üzere farklı kanserlerde, yüksek LDHA ekspresyonu, tedavi direnci ile ilişkilendirilmiştir. Kanserli dokularda yüksek laktat üretimi ve dışa aktarımının, solid tümörlerde gözlenen hücre dışı asidik pH değişimine katkıda bulunduğu gözlenmiştir. Böylece tümör asidozunun bir sonucu olarak, ilaç özellikleri değişir, ilaç Emilimi bozulur ve kemoterapötik verim düşer (Zhao ve ark., 2013, Kolosenko ve ark., 2017).



Şekil 1.2. İlaç direncinden sorumlu metabolik yollar ve enzimler (Hekmatshoar ve ark., 2018).

1.2.7.5. ATP ve ATP Aracılıklı İlaç Direnci

1.2.7.5.1. Hücre İçi ATP'nin İlaç Direncindeki Rolü

Hücre içi ve hücre dışı ATP kanser hücresinin büyümesinde, hayatta kalmasında ve dirençte önemli rol oynamaktadır. Kanser hücrelerinde hücre içi ATP seviyesinin, aynı orijinli normal dokulardakinden daha yüksek olduğu bilinmektedir, bunun nedeni ise Warburg etkisi olarak adlandırılan yani kanser hücrelerindeki glukoz taşıyıcısının upregüle olması ve aerobik glikolizin buna neden olmasıdır (Vander Heiden ve ark., 2009). Ayrıca, hücre içi ATP seviyesinin edinilmiş dirençli kanser hücrelerinde parental hücreler ile kıyaslandığında daha yüksek olduğu saptanmıştır (Zhou ve ark., 2012).

Yapılan bir çalışmada, ilaca duyarlı hücrelere ATP'nin yapay şekilde verilmesi ilaç direnci ile sonuçlanırken, aynı zamanda glikoliz inhibitörü ile hücre içi ATP'nin bitmesi dirençli kanser hücrelerini duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (Zhou ve ark., 2012).

Önceki çalışmada gösterilen daha fazla glikolizle ilişkili ATP yükselmesinin aksine, dirençli hücrelerde hücre içi ATP seviyesindeki artış, direnç gelişimi sırasındaki mitokondriyal ATP sentezindeki artma sonucunda olduğu bulunmuştur. Bu çalışmaya göre dirençli hücrelerin kendilerini çevresel streslerden ve xenobiyotiklerden korumak amacı ile enerji depolarını artırdığı önerilmiştir (Schneider ve ark., 2013)

1.2.7.5.2. Hücre Dışı ATP'nin İlaç Direncindeki Rolü

Çeşitli kanser tiplerinin hücre dışı ATP seviyeleri, kendi normal dokularındaki ATP seviyesi ile kıyaslandığında 10^3 ile 10^4 kat daha fazla olduğu rapor edilmiştir (Pellegatti ve ark., 2008, Wilhelm ve ark., 2010).

Yapılan çalışmalarda, hücre dışı ATP'nin makropinositoz ve diğer endositik mekanizmalar aracılığıyla hücre içine girip, böylelikle hücre içi ATP miktarını artırarak ilaç direnci gelişimine neden olduğu gösterilmiştir (Qian ve ark., 2014, Qian ve ark., 2016, Wang ve ark., 2017).

Yüksek hücre dışı ATP, ABC taşıyıcılarının efluks aktivitesini artırarak anti-kanser ilaçların hücre dışına pompalamasını sağlamaktadır, buna ilaveten kanser hücre plazma membranında bulunan RTK (Reseptör Tirozin Kinaz)'ların hücre içi ATP bağlanma bölgesinde, hücre dışı ATP ile ATP analog antikanser ilaçları arasındaki rekabeti ve RTK fosforilasyonunu artırdığı saptanmıştır (X. Wang ve ark., 2019).

1.2.8. HSP (Heat shock protein)

Son senelerde yapılan araştırmalar, HSP'ler ve ilaç direnci mekanizmaları arasındaki bağlantıyı ortaya çıkarmaktadır. HSP'ler sitotoksik ilaçlar tarafından *in vitro* olarak indüklendiğinden, HSP'lerin tümör hücre toleransında önemli bir rol oynayacağı varsayılmıştır.

HSP'ler kanser hücrelerinde birçok yolakda, örneğin; proliferasyon, göç ve hücre ölüm yolakları (apoptoz, otofaji ve nekroz) düzensizlik göstermektedir. Isı şoku proteinleri (Hsps) “merkezi regülatörlerin” örnek proteinleri olarak yukarıda belirtilen hücre fonksiyonları ve özellikleri kontrol etmektedirler. Bu proteinler genel olarak hücrelerdeki i) kısmen katlanmış ve / veya denatüre proteinlerin doğru katlanmasının koordine edilmesinden, ii) proteinlerin fonksiyonel konformasyonunun kontrolünden ve iii) hasar görmüş protein agregatlarının geri dönüşümsüz oluşumunu önlemeden sorumludurlar (Trepel ve ark., 2010, Condelli ve ark., 2019).

HSP'ler çok sayıda aileyi içerir, bu aile üyeleri tek bir atadan tek gen duplikasyon (çoğaltma) mekanizması yoluyla köken almışlardır ve yüksek bir sekans ve yapısal homoloji ile karakterize edilmektedirler (Glansdorff 2000).

Moleküler ağırlık, sekans, yapısal ve fonksiyonel homolojiye dayanarak, altı HSP ailesi: HSP20, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 ve HSP100 tanımlanmıştır (Condelli ve ark., 2019).

Kanser hücrelerinde çoğunlukla çeşitli stres etkenlerine örneğin hipoksi, besin yoksunluğu, radyoterapi ve kemoterapi gibi çeşitli ağır tedavilere maruz kalmalarından dolayı, strese yanıt olarak farklı organellerinde (sitozol, endoplazmik retikulum ve mitokondri) katlanmamış proteinlerin birikimi gerçekleşmektedir. Bu reaksiyonlar sonunda nekroz, apoptoz ve otofaji gibi hücre ölüm yolaklarının ile sonuçlanır (Powers ve ark., 2010).

1.2.8.1. HSP90 (Heat shock protein 90)

HSP90 ailesinin üyeleri (yaklaşık 90 kDa'lık moleküler ağırlık), yeni sentezlenmiş veya yanlış katlanmış proteinlerin katlanmasını destekleyen ve birikimlerini bloke eden yüksek oranda korunmuş moleküllerdir (Hoter ve ark., 2018). HSP90 ailesi üyeleri i) HSP90 α ve HSP90 β olarak adlandırılan HSP90 izoformları, sitozol ve çekirdekte yer almaktadırlar ii) GRP94, endoplazmik retikulumda lokalizedir (ER), ve iii) TRAP1, esas olarak mitokondride lokalizedir, fakat aynı zamanda ER'de bulunmaktadır (Condelli ve ark., 2019).

HSP90 proteini kanser hücrelerinde yüksek miktarda ifade olmaktadır. Farklı kaynaklardan köken alan çeşitli malign hücrelerde N-terminal bölgesindeki ATPaz aktivitesinin, neoplastik olmayan karşıtları ile kıyaslandığında yaklaşık 100 kat daha fazla arttığı bulunmuştur (Kang ve ark., 2007).

Kanserlerde ATP bağımlı şaperon molekülleri, tümör genez de önemli rol oynayan sinyal yollarındaki geniş aralıktaki protein substratlarının katlanma kalitesini kontrol etmektedirler (Mayer 2010, Park ve ark., 2014). Hsp90'nın ilk hücresel lokalizasyonu sitoplazmadır. Ancak bir Hsp90 havuzu ve onun izoformu olan Tümör Nekroz Faktörü Reseptörüne Bağlı Protein 1 (TRAP1)'in mitokondride olduğu rapor edilmiştir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar TRAP-1'in ER'de de bulunduğunu göstermiştir. TRAP-1 çoğunlukla mitokondride özgün proteinleri ile doğrudan etkileşime girerek, katlanmalarını düzenlemektedir veya ER'de ko-translasyonel kalite kontrolü yaparak proteasomal bozulmalarını önlemektedir. TRAP-1'in özgün proteinleri arasında hücrenin hayatta kalmasını düzenleyen önemli proteinler bulunmaktadır, örneğin Siklofilin D

(CypD) mitokondriyal protein olarak mitokondri bütünlüğünü devam ettirerek hücreleri ölümden korumaktadırlar (Kang ve ark., 2007).

TRAP-1'in hedefinde yer alan protein ağı, hücre döngüsünün ilerlemesinde sorumlu proteinleri içermektedir. Bu proteinler arasında, G2-M ilerlemesinde ve mitotik iğinin oluşumunda rol oynayan Siklin Bağımlı Kinaz-1 (CDK1) ve Mitozu durdurma yetersizliği 2 (MAD2) yer almaktadır (Sisinni ve ark., 2017).

TRAP1, solunum zinciri kompleksi II (süksinat dehidrogenaz-SDH) ve IV'e (yani sitokrom oksidaz) bağlanır, SDH'nin aktivitesini inhibe eder, bunun sonucunda oksijen tüketimi azaltır.

Son yıllarda, HSP90'nın mitokondriyal izoformu olan TRAP1'in rolü giderek artmıştır. Özellikle, TRAP-1'in glikolizi aktive ederek ve OXPHOS'u baskılayarak tümör enerji metabolizmasını değiştirdiği saptanmıştır ve bu fonksiyonu tümöre özgündür (Matassa ve ark., 2018). TRAP-1 upregülasyonu, glikolitik metabolizma ile birçok insan malignitesinde (kolon, göğüs, akciğer, prostat, tiroid karsinoma ve nasopharyngeal) görülmüştür (Matassa ve ark., 2018). Diğer yandan, farklı insan maligniteleri (böbrek, yumurtalık ve servikal karsinomlar) yaygın bir oksidatif metabolizma ve bunun sonucunda TRAP1 ifadesindeki azalma ile karakterize edilmektedir (Matassa ve ark., 2018).

TRAP-1 hem içsel (mitokondri) hemde dışsal (dışsal ligandların örneğin TRAIL ve Fas/CD95L aracılığı ile indüklenen) apoptoz ölüm yolağının düzenlenmesiyle bağlantılıdır.

HSP90 ve TRAP1'in mitokondrideki ifadesinin birçok kanser hücre kültürü çalışmalarında ve kanser hastalarında arttığı bulunmuştur. Bu proteinler tümör oluşumu sürecinde çoğu aşamalarında örneğin neoplastik metabolikten aerobik glikoliz geçişinde önemli rol oynamaktadırlar (Trepel ve ark., 2010).

HSP90 proteinin inhibisyonu geldanamisin adlı molekül aracılığıyla gerçekleşmiştir, ancak geldanamisin toksik etkilerinden dolayı, kimyasal olarak 17-AAG (tanespimisin)'ye modifiye edilmiştir. 17-AAG'nin az toksik olmasından dolayı 1999 yılından itibaren birçok klinik çalışmada kullanılmıştır (Trepel ve ark., 2010). Toksik olmayan farmakolojik profili ve hastalarda iyi tolere edilmesine rağmen, hastalarda anti-kanser etkisinin azaldığı gözlenmiştir. Hsp90 inhibisyonunun sonucunda etkileşim içerisinde olduğu Hsp70'in upregüle olduğu gözlenmiştir (Kang ve ark., 2009). Aslında, Hsp70 yüksek ifadesi Hsp90 inhibisyonunu gösteren geçerli bir belirteçtir (Goloudina ve ark., 2012). Hsp70 yüksek ifade olmasına neden olduğu sıkıntılardan biri, Hsp70'in kendisinin kanser hücrelerinde çeşitli mekanizmalar aracılığıyla proliferasyona yol açması ve apoptozun inhibisyonuna neden olmasıdır. Bu nedenle, Hsp70'in upregüle olmasına neden olmayan Hsp90 inhibitörlerine, örneğin Gamitrinibler gibi inhibitörlere ihtiyaç duyulmuştur (Trepel ve ark., 2010, Goloudina ve ark., 2012).

Mitokondriyal Hsp90 inhibitörlerinin bir sınıfı olan, **Gamitrinibler** (GA mitokondriyal matriks inhibitörler) geldanamisin içermektedir, geldanamisin HSP90 ve TRAP1'in ATPaz kısmı ile yarışa girmektedir. Gamatrinitib, guanidinium veya trifenilfosfonyumun tandem tekrarları ile konjuge oluşturarak mitokondriyi hedeflemektedir.

Gamitrinibler *in vitro* kültür edilmiş kanser hücrelerinde hücre ölümünü indüklemenin yanısıra çeşitli *in vivo* xenograft ve genetik fare kanser modellerinde tümör ilerlemesini baskılamıştır.

Gamitrinib kaynaklı sitotoksitite, cyclophilinD (Cyp-D)'nin yeniden aktive olması ile bağlantılıdır. Cyp-D mitokondriyal iç zarda bulunan geçirgenlik geçiş porlarından (PTP). Çünkü PTP'lerin açılması ölüme yol açabilir, Cyp-D aktivasyonu bazen mitokondriyal Hsp90 interaksyonu ile kanser hücrelerinde baskılanmıştır, buda çeşitli hücrel streslere karşı oluşan direncin artmasına neden olmaktadır.

Buna ilaveten, Gamitriniblerin, neoplastik büyüme ile eş zamanlı olarak kanser hücrelerinin mitokondrilerinde organel spesifik stres yanıtlarının indüklenmesine ve biyoenerji dzensizliğine neden olduğu gösterilmiştir (Park ve ark., 2014).

Gamitrinib yapısal olarak 17-AAG'den türetilen abenzoquinone anamsisin temelinden, bağlayıcı sekans ve mitokondriyi hedef alan sekanstan oluşmaktadır. Günümüzde, temel olarak mitokondri hedefleyen sekanslar tarafından ayırt edilebilen 2 farklı önemli Gamitrinib sınıfı bulunurken, diğer yandan 17-AAG kısmı sabit kalmaktadır. Özellikle mitokondriyi hedefleyen sekans triphenyl phosphonium (Gamitrinib-TPP) veya ardarda tekrarlı siklik guanidinyumun içermektedirler (Fernandez-Carneado ve ark., 2005, Armstrong 2007, Kang ve ark., 2009).

Tümör mitokondrisinde, Gamitrinib tek bir hücre ölüm mekanizması ortaya çıkarmaktadır. Gamitrinibler hızlı depolarizasyon, şişme ve son olarak mitokondri membranının bozulması ile birlikte sitokrom C salınımına neden olurlar (Kang ve ark., 2009).

1.2.8.2. HSP90 İnhibitörü Gamitrinib'in Apoptoz Yolağındaki Etkisi

Mitokondriyal hücre ölümünün en önemli araçlarından olan Bcl-2 ailesi proteinleri mitokondri dış membran permeabilitesini düzenleyerek sitokrom C salınımını kontrol etmektedirler (Shimizu ve ark., 1999). Bax/Bak Bcl-2 ailesinin pro-apoptotik ve Bcl-2, Mcl-1 ve Bcl-xL ise anti-apoptotik protein üyeleri arasında yer almaktadırlar. Çeşitli çalışmalar, Gamitrinib'in tek başına uygulandığı durumlarda Bax/Bak ve Bcl-2'den bağımsız olduğunu, Gamitrinib'in birincil etki mekanizmasının sırasıyla: mitokondriyal geçirgenlik, geçiş gözeneklerine ve CyD'ye bağlı olduğunu ortaya koymuştur (Kang ve ark., 2009, Kang ve ark., 2011, Siegelin ve ark., 2011). Genel olarak, Gamitriniblerin neden olduğu hücre ölümü şekli hızlı apoptozdur. Çeşitli kanser hücrelerinde örneğin skuamöz hücreli karsinoma, meme kanseri, glioblastom, akciğer adenokarsinomu ve lösemi hücreleri dahil olmak üzere Gamitrinib'in sitotoksik etkilerine duyarlı olduğu ve neoplastik olmayan hücrelerin ise hem *in vitro* hemde *in vivo* ortamlarda daha az etkilendiği gösterilmiştir (Kang ve ark., 2009).

1.2.8.3. HSP90 İnhibitörü Gamitrinib'in Otofaji Yolağındaki Etkisi

Kanser hücrelerindeki Gamitrinib aracılıklı katlanmamış mitokondriyal protein yanıtı, morfolojik değişiklikler eşliğinde gerçekleşir. Örneğin Gamitrinib uygulanan kanser hücrelerinin sitoplazmalarında belirgin sitoplazmik vakuoller oluşup, ancak aynı konsantrasyondaki 17-AAG ile muamele edilen kanser hücrelerinde sitoplazmik vakuollerin oluşmadığı gözlenmiştir (Siegelin ve ark., 2011). Bu vakuollerin varlığı, kanser hücrelerinin fizyolojik işlevine müdahale edebilecek kadar önemli olduğu belirlenmiştir.

Gamitriniblerin birincil etki mekanizmasının, tümör spesifik mitokondriyi hedef almaları gibi görünse de geniş vakuol oluşumunun, mitofaji bağlamında da gözlenen bir mitokondri sindirim şekli olabileceğini düşünmüştür. Mitofaji, hücrel degradasyon yolu olan otofaji aracılığıyla gerçekleşen mitokondrinin seçici sindirimi olarak tanımlanır (Matsuda ve ark., 2010, Rambold ve Lippincott-Schwartz 2011).

1.2.8.4. HSP90 inhibitörü Gamitrinib'in ER-Stresi Üzerindeki Etkisi

Endoplazmik retikulum(ER), ağırlıklı olarak yeni salgılanan ve zardan geçen (transmembrane) proteinlerin uygun katlanmasını ve olgunlaşmasını sağlamada önemli bir role sahip olan, protein katlanma kontrol noktası olarak bilinen organeldir. Çeşitli patolojik ve fizyolojik koşullar örneğin hücrel ATP seviyesindeki bozulma, kalsiyum değişimi, hipoksi, viral enfeksiyon, enflamatuar sitokinler, besin yoksunluğu ve çevresel toksinler ER homeostazının kaybına ve ER'nin protein katlanma potansiyelin azalmasına neden olmaktadır. Bu olaylar sonunda ER stresi olarak kabul edilen, katlanmamış proteinlerin ER lümeninde birikmesi ve toplanması gerçekleşir (Merksamer ve ark., 2008).

Katlanmamış protein yanıtı (UPR) ER stresinin algılanmasında yer alan bir işlem olarak görülür ve bu sinyali, stresin azaltılmasında veya proapoptotik programların başlatılmasında rol oynayan alt hedeflerinde bulunan transkripsiyon faktörlerinin düzenlenmesine iletir (Chow ve ark., 2015).

ER stresi, UPR'yi protein homeostazını korumak için adaptif bir cevap olarak etkiler. UPR sinyal yolağı, IRE1 α , PERK ve ATF6 α proteinlerini içeren 3 ana daldan

(bölümden) oluşur. ER’de yerleşen bu transmembran proteinleri önemli sinyal elementleridirler. Bu 3 sinyal sensörleri GRP78 (glucose-regulated protein 78 kDa, ER’daki en önemli şaperondur ve BiP olarak da adlandırılır) gibi ER şaperonları ile işbirliği yapmaktadırlar. GRP78 onların aktivasyonunu bağlanma veya boşaltma mekanizması aracılığı ile düzenlemektedir (Reddy ve ark., 2003).

Öncelikle, IRE1 α , PERK ve ATF6 α , GRP78 ile etkileşimle aktive edilir. GRP78, C-terminal bağlama bölgesi ile proteinlerin hidrofobik domainlerine bağlanarak, yanlış katlanma ve katlanmamış protein toplanmasını önlemektedir. GRP78, IRE1 α ve PERK'nin oligomerizasyonunu ve otofosforilasyonunu hızlandırır ve aktive eder, ATF6 ise Golgi aparatına taşınır (Rutkowski ve Kaufman 2004).

IRE1 α , ER sinyal yolağının korunmuş bir dalıdır ve üç bölge içeren iki fonksiyonlu bir tip 1 transmembran protein kinazdır: bir N-terminal lümen bölgesi, bir sitozolik endoribonükleaz (RNaz) alanı ve birde sitozolik serin/treonin kinaz bölgesinden oluşmaktadır (Calfon ve ark., 2002).

ER stres koşulu altında katlanmamış proteinlerin birikimine cevap olarak, IRE1 α 'nın dimerleşmesi ve otofosforilasyonu sitozolik RNaz domainin aktivasyonuna neden olmaktadır ve bu da yapısal değişikliğe neden olmaktadır. Bu yapısal değişiklik sonucunda XBP1 transkripsiyon faktörünü kodlayan mRNA'dan 26-nükleotit intronunun da çıkarılmasını aktive etmektedir (Kohno 2007, Hetz ve ark., 2015). Bu kırılma (splicing) olayı, mRNA'da bir çerçeve kayması ile sonuçlanır ve buda transkripsiyon faktörü XBP1'in aktif ve stabil bir formunun ekspresyonuna yol açmaktadır. Daha sonra XBP1 çekirdeğe aktararak, kalite kontrol gibi hayatta kalma olaylarından sorumlu olan hedef genlerin upregülasyonunu sağlayarak, ER homeostazını ER şaperonları (GRP78,

ERdj4, HEDJ ve PDI-P5 aracılı) ve ERAD (ER ile İlişkili Bozulma) ile korumaktadır (Hendershot 2004, Acosta-Alvear ve ark., 2007).

IRE1 aktivasyonu, iltihaplanma, glukoz metabolizması ve apoptozda önemli rolleri olan sayısız sitozolik RNA, ribozomal RNA ve mikroRNA seviyelerinin azaltılması ile ilişkilidir. Ayrıca, aktif IRE1 α sadece UPR'yi artırmakla kalmaz, aynı zamanda Mitojenle-Etkinleşen Protein Kinaz (MAPK) kinase yolağı gibi diğer yollara aracılık etmektedir. Bu yolda aktive olmuş IRE1 α , adaptör protein Tümör Nekroz Faktörü Reseptörüne Bağlı Protein 2 (TRAF-2) ile etkileşime girerek IRE1 α -TRAF2 kompleksini oluşturur. Bu kompleks Apoptoz Sinyali Regüle Kinaz 1 (ASK1) ile etkileşime girerek IRE1 α -TRAF2-ASK1 kompleksini oluşturur. IRE1 α -TRAF2-ASK1 kompleksi ER-stresi tetikleyicisi c-Jun N terminal kinase (JNK) ile etkileşimi, reaktif oksijen türlerinin üretimi ve nükleer faktörü- κ B içeren otofaji ve inflammatuar yolların aktivasyonu ile sonuçlanır (Urano ve ark., 2000, Yamaguchi ve Wang 2004, Han ve ark., 2009).

PERK, yapısal ve işlevsel olarak IRE1 α bağlantılı olan ve trans otofosforilasyon ve dimerizasyon ile aktive edilen bir tip 1 transmembran kinazdır (Ron ve Walter 2007). ER stres koşulları altında, PERK aşağı substrat olan ökaryotik translasyon başlatıcı faktörü-2 α 'yı (EIF2 α) serin 51'de fosforile ederek ER lümeninde protein sentezinin inhibisyonuna neden olur (Harding ve ark., 2000, Scheuner ve ark., 2001, Lu ve ark., 2004). Bu blokaj, ER'de katlanmış proteinlerin sürekli birikimini azaltarak ER stresini azaltmaktadır. Buna ilaveten, ATF4 transkripsiyon faktörünü kodlayan mRNA'nın seçici olarak translasyonuna izin verir.

ATF6 α , ER stresinin üçüncü bir sensörüdür ve ER hedefli tip 2 transmembran proteinidir. Katlanmamış protein yanıtının altında, ATF6 golgiye transfer olup S1P ve S2P tarafından bölünerek aktifleştirilmiş ATF6 α şeklinde serbest bırakılır. ER stres durumuna ve GRP78, GRP94 yığılmasına yanıt olarak, IRE1 α ve PERK aktivasyonuna benzer

şekilde, redoks durumu, ATF α 'nın aktivasyonunda rol oynamaktadır (Yamamoto ve ark., 2007).

IRE1 α , PERK ve ATF6 α 'nın aktivasyonunun azaltılmış translasyon, arttırılmış ER protein katlama kapasitesi ve yanlış katlanmış ER proteinlerinin temizlenmesi gibi çeşitli etkileri vardır. UPR stres sensörleri, UPR'nin proteostazdaki fonksiyonel rolünü gösteren birkaç transkripsiyon faktörü ile etkileşime girer ve onları aktive eder.

Yüksek konsantrasyonlarda Gamitrinib, kanser hücrelerinde kökenlerine bakılmaksızın ani bir hücre ölümüne neden olur (Siegelin ve ark., 2011). Mekanik olarak, bu olay sitozolde hızlı sitokrom-c salınımı ile mitokondriyal membran potansiyelinin ani bozulmasını ile gerçekleşmektedir. Buna karşılık, daha düşük Gamitrinib konsantrasyonları birkaç organelde tanımlanmış stres yanıtını ortaya çıkarmaktadır. Gamitrinibler, uygulamadan sonra hızlı bir şekilde mitokondriye iletildiğinden, mitokondrideki katlanmamış protein yanıtına (mtUPR) aracılık edebilecekleri gösterilmiştir. Bu varsayım, LN229 glioblastoma hücrelerinde mitokondriyal protein katlanması analizi ile doğrulanmıştır. Düşük doz Gamitrinib-TPP uygulanan LN229 hücrelerinde, tedaviye yanıt olarak kendi mitokondrilerinde çözünmeyen, katlanmayan proteinlerin birikimine neden olmakta bu organel içerisinde yanlış protein katlanması olduğunu göstermektedir (Siegelin ve ark., 2011). Bununla birlikte indirek mitokondriyal stres belirteçi olan Superoksit dismutaz'ın düşük ifadesi gerçekleşmektedir (Mathew ve ark., 2009, Siegelin ve ark., 2011).

Şekil 1.3'te gösterildiği gibi, Gamitrinib ile muamele edilen kanser hücrelerinde zamana bağlı olarak ER-stres kaskadındaki bir çok aşamasında görev alan proteinlerin ifade seviyesinde artışa neden olduğu bulunmuştur: i) inositol-requiring-1 (IRE-1) kinaz aktivasyonu ve onun sonrasında XBP1 splicing ii) Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 6 (ATF6) aktivasyonu ile GRP78 upregülasyonu iii) PKR-like endoplazmik retikulum

kinase (PERK) aktivasyonu ile EIF2 α fosforilasyonunda artış ve stres yanıtı transkripsiyon faktörü C/EBP β and CHOP'da artış gözlenmiştir (Kang ve ark., 2009, Chae ve ark., 2012).

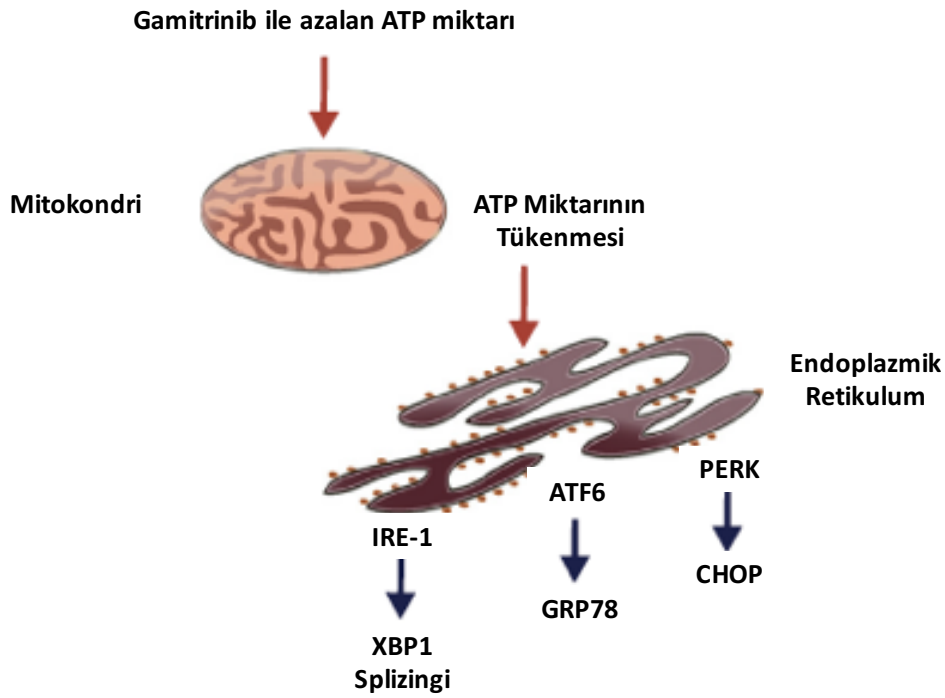
Mitokondriyal stres örneğin mitokondriyal katlanmamış protein yanıtı gen ifadelerini modüle etmektedir ve daha önceki çalışmalar ile tutarlı olarak Gamitrinib-TPP özel bir transkripsiyonel programa neden olup birçok strese-yanıt transkripsiyonel faktörlerinin örneğin glioblastoma hücrelerinde CHOP'un artışına neden olmaktadır (Moiso ve ark., 2009, Cao ve Kaufman 2012). Özellikle, bu transkripsiyonel değişim dizisi ne anti-apoptotik ne de pro-apoptotik Bcl-2 protein ailesine gerek duymaktadır (Siegelin ve ark., 2011). CHOP, nükleer (geno-toksik), mitokondriyal ve en son endoplazmik retikulum da dahil olmak üzere bir dizi hücrel strese cevaben indüklenen bZIP transkripsiyon faktörleri ailesine aittir (Siegelin 2012). Çeşitli çalışmalarda strese yanıt olarak, bir çok ilaç bileşenlerinin CHOP ifadesini artırdığı gösterilmiştir (Siegelin 2012).

TRAP-1'in mitokondriyal lokalizasyonuna rağmen, endoplazmik retikuluma proteozom düzenleyicisi olan partikül TBP7 / Rpt3 ile etkileşime girerek mitokondriyal hedefli proteinlerin olgunlaşmasını denetlemektedirler (Amoroso ve ark., 2012).

Gen ifade analizlerine göre Gamitrinib'in ER üzerindeki etkisi gözlenmiştir. Gamitrinibler, öncelikli olarak mitokondrileri hedef almaktadırlar ve bunun sonucunda ATP üretiminde azalma gerçekleşmektedir (Chae ve ark., 2012).

Gamitrinib aracılı mitokondriyal proteotoksik stres yanıtı ER-stres yanıtına nasıl dönüşmektedir? Bir olasılık, düşük dozdaki Gamitrinibin ER'ye yönlendirilip ER'de bulunan TRAP-1 aktivitesini inhibe etmesidir. Buna ilaveten, mitokondriyal bütünlüğün ve metabolizma ile olan karşılıklı etkileşimin, ER'deki translayon sonrası

modifikasyonları düzenlemektedir (Chae ve ark., 2012). Mitokondriyal metabolizma ile bağlantılı olarak, mitokondriyal Hsp90 şaperon ağının hedef alınmasının, tümör mitokondrisinde enerji üretimini bozmanın yanısıra ER-stresinin başlamasında önemli rol oynadığı bildirilmiştir (Chae ve ark., 2012).



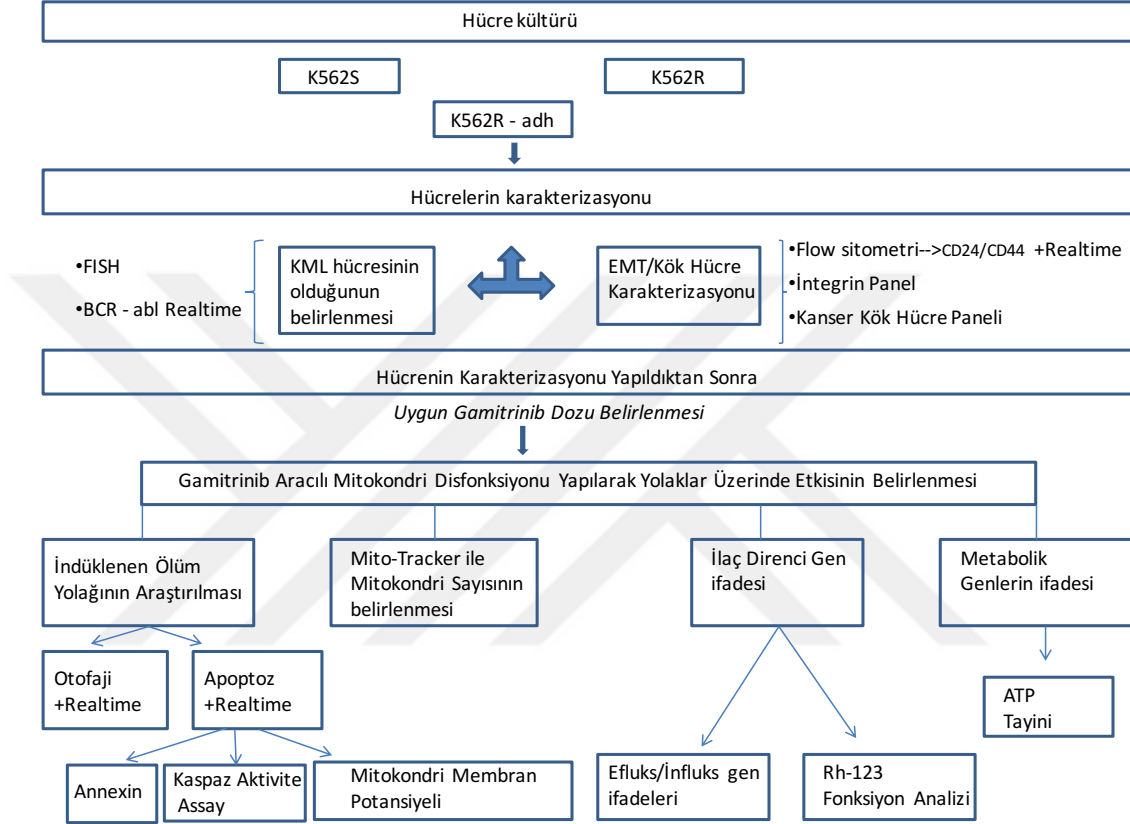
Şekil 1.2. Gamitrinib, ER-stresindeki 3 sinyal yolağının aktivasyonu sağlamaktadır (Siegelin 2013)

Bu tez çalışmasında öncelikle KML’de İmatinib direnci geliştirilerek K562R süspanse ve K562R-adh yapışan hücrelerinin özellikleri araştırılmıştır. Dirençli hücrelerde kanser kök hücre özelliğini analiz etmek amacı ile 3 hücre grubunda (K562S, K562R ve K562R-adh) kanser kök hücre ve integrin PCR array panel genleri çalışılmıştır. Daha sonra İmatinib’e dirençte mitokondrilerin rolünü belirlemek amacıyla mitokondri şaperonu olan Hsp90’nın

inhibitörü kullanılarak mitokondriyal disfonksiyon gerçekleştirip, çoklu ilaç direncinden sorumlu MDR, ER stresi, otofaji, apoptoz ve metabolik genlerin ifadesi araştırılmıştır. Ayrıca AnnexinV ve kaspaz ile apoptoz tayini, ATP miktar analizi, TMRE-mitokondriyal membran potansiyeli analizi ve sitokrom C salınımı analizi yapılmıştır.

Hsp90 inhibitörü aracılı mitokondri disfonksiyonu gerçekleştirilen hücrelerde kanser kök hücre belirteçleri, apoptotik, otofajik, ER stress, metabolizma genlerinin ifadesi belirlenerek hücrelerin yeniden programlanmaları ve direncin nasıl etkilendiği araştırılmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM



Şekil.2.1. Gereç ve Yöntem şeması.

Bu tez çalışmasında yapılan bütün gereç ve yöntemler kısaca şekil 2.1’de şema olarak gösterilmiştir (Şekil 2.1).

2.1. Çalışmada Kullanılan Yöntemler

2.1.1. K-562S , K-562R ve K562R-adh Hücre Hatlarının Kültürü ve Pasajlanması

Deneylerde kullanmak üzere çoğaltılan K-562S (İmatinib'e duyarlı), K562R (İmatinib'e dirençli) süspanse ve K562R-adh (İmatinib'e dirençli yapışan) hücre hatlarının pasajlanması aşağıdaki basamaklar takip edilerek yapılmıştır.

K562S hücreleri süspanse hücrelerdir. Etüvde T-25 flask ve 10 ml besiyeri (RPMI 1640/Lonza) içinde bulunan K562S hücreleri 15 ml'lik falkona alınarak 1000 rpm'de 4 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatantları atılmıştır. Pelet üzerine yaklaşık 10 ml besiyeri eklenerek 37°C'de %5 CO₂'li etüvde kültürleri gerçekleştirilmiştir.

K562R süspanse hücrelerimiz kendi laboratuvarımızda 18 ay süreyle 5 µM İmatinib'e dirençli hale getirilmiş ve üretilmiştir. Etüvde T-25 flask ve 10 ml besiyeri içinde bulunan K-562R hücreleri 15 ml'lik falkona alınarak 1000 rpm'de 4 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatantları atılmıştır. Pelet üzerine 10 ml besiyeri eklenmiş ve bu hücreler T-25 flask içine alınarak üzerlerine 5 uM İmatinib eklenen ortamda kültürlerine devam edilmiştir.

Ancak K562R hattının İmatinib'e maruz bırakıldığı süreçte, belli bir hücre popülasyonun yapışma özelliği gösterdiği tespit edilmiş olup bu hücrelere K562R-adh adı verilmiştir. Önce süspanse olan hücreler tamamen toplanmış daha sonra yapışan hücreler Tripsin/EDTA (%0.25 Tripsin + %0.1 EDTA/GIBCO) ile inkübe edilerek, hücrelerin yapıştıkları yüzeyden ayrılması sağlanmıştır. Tripsinin serum ile inaktivasyonu

yapıldıktan sonra 15 ml'lik falkona alınarak 1000 rpm'de 4 dk. santrifüj edilmiş ve süpernatantları atılmıştır. Bu hücreler T-25 flask içine alınarak üzerlerine 5 uM İmatinib içeren 10ml besiyerinde kültürlerine devam edilmiştir.

2.1.2. Hücre Sayımı ve Canlı Hücrelerin Belirlenmesi

Deneylerimiz sırasında, hücreler, ölü hücrelerin mavi-mor renkte boyanarak ayırt edilmelerine olanak sağlayan Trypan mavisi boyasıyla boyanmışlardır. Bu amaçla eşit hacimde (20ul hücre süspansiyonu+20ul Trypan mavisi) Trypan mavisi ve hücre çözeltisi karıştırılmıştır (Strober 2001). Daha sonra, ml'deki hücre sayısının hesaplanmasına olanak veren Neubauer lamının üzerine bu hücre süspansiyonunundan koyularak lamın, bilinen hacime sahip karelerinde sayım yapılmış ve elde edilen hücre sayısı seyreltme faktörü (2) ve lamın 10^4 çarpanı ile çarpılarak ml'deki canlı hücre sayısı elde edilmiştir.

2.1.3. MTT (Dimetil Tiazol) Hücre Canlılık Testi

Wistar enstitüsü Prof. Dr. Dario Altieri'nin labında sentezlenip bize hediye ettiği Gamitrinib'in hücreler üzerindeki sitotoksik ilaç konsantrasyonlarını saptamak amacıyla MTT yöntemi kullanılmıştır. MTT testi, metabolik olarak aktif hücrelerinde bulunan mitokondriyal süksinat dehidrogenaz enziminin tetrazolyum boyası ile verdiği reaksiyon sonucunda oluşan mor renkte ve suda çözünmeyen formazan kristallerinin çözücüde çözülerek absorbansının ölçümü esasına dayanan bir testtir. MTT testi sonucunda oluşan mor rengin koyuluğunun, canlı hücre sayısı ile korelasyon gösterdiği bildirilmiştir (Mosmann 1983).

Gamitrinib'in etkin dozunun hücre serilerinde belirlemek amacı ile aşağıdaki protokol izlenmiştir.

Hücre kültüründe elde edilen hücre serilerine ait hücrelerden 96 kuyucuklu plağın her bir kuyucuğuna 4×10^4 hücre olacak şekilde 100 μ l hücre besiyeri karışımı ekilmiştir. Plak kuyucuklarına hücrelerin homojen bir biçimde yayılması sağlanıp farklı konsantrasyonlarda Gamitrinib uygulanmıştır. Hazırlanan Gamitrinib konsantrasyonları 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 20, 30, 40 ve 50 μ M şeklindedir. Etkin madde 24 saat, 48 saat ve 72 saat süreyle 37°C'de, %5 CO₂'li etüvde uygulanmıştır. Bunların yanı sıra kontrol amaçlı olarak, Gamitrinib uygulanmayan kuyucuklara Gamitrinib'in çözücüsü olan DMSO aynı oranda uygulanmıştır. K562S hücrelerine uygulanan İmatinib konsantrasyonu 0.2 μ M iken, K562R ve K562R-adh hücrelerine 5 μ M İmatinib uygulanmıştır.

24, 48, 72 saat sonrasında hücrelerin üzerine 10 μ l MTT ajanı, 5 mg/ml konsantrasyonda eklenerek 4 saat 37°C'de, %5 CO₂'li etüvde inkübe edilir, 100 μ l MTT çözelti solusyonu eklenmiştir, bir gece 37°C'de, %5 CO₂'li etüvde inkübe edildikten sonra 96 kuyulu plağın ölçümü spektrofotometre cihazında 550 ve 690 nm'de yapılmıştır.

Gamitrinib uygulanmayan hücrelerin absorbans değeri %100 canlılık olarak kabul edildi ve diğer hücre gruplarındaki canlılık bu değerden hareketle yüzde olarak hesaplandı.

2.1.4. RNA İzolasyonu

K562S, K562R ve K562R-adh hücrelerinin kültürü yapıldıktan sonra ilaç taşınmasından sorumlu, apoptotik, otofajik, metabolik, ER-stresinden sorumlu ve kök hücre belirteçleri olan genlerin ve bunlara ek olarak integrin ve kök hücre PCR arraylerindeki genlerin ifadelerini kantitatif eş zamanlı PCR (qRT-PCR) ile saptamak amacıyla tüm örneklerden RNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon sırasında aşağıdaki prosedür takip edilmiştir.

- Kültür ortamındaki hücreler 300 x g'de 5 dk santrifüj edilmiş ve supernatan kısım atılmıştır.
- Pelet üzerine (1×10^6 hücreye 1 ml Trizol) Trizol eklenmiş ve homojenize edilerek hücreler 15-30°C'de 5 dk inkübe edilmiştir.
- Her tüpe 200 µl kloroform eklenmiştir. Tüpler elle 15 sn. boyunca sallandıktan sonra 15-30°C'de 10 dk inkübe edilmiştir. 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 oluşmuştur. Üst fazda yer alan RNA (DNA ara fazda ve protein ise alt fazdadır. Bu fazlar saklanır.) yeni bir tüpe aktarılmıştır.
- Üzerine 0.5mL izopropil alkol eklenmiştir. 15-30°C'de 10dk inkübe edilip tüpler 12,000 x g.de 10 dk 2-8°C'de santrifüj yapılmıştır. Süpernatant atılıp, 1 ml %75'lik etanol eklenmiş ve örnekler vortek yapılarak 7,500 x g.de 5 dk 2-8°C'de santrifüjlenmiştir.
- RNA pelleti oda sıcaklığında bekletilerek kurutulmuş, sonrasında RNA, RNaz içermeyen DEPC'li su içinde çözülmüştür. Elde edilen RNA'ların konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir. Daha sonra %1'lik Agaroz Jel'de yürütülerek görüntülenmiştir.

2.1.4.1. Agaroz Jel Elektroforezi

Elde edilen RNA örnekleri % 1'lik agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiştir.

% 1'lik agaroz jelin hazırlanışı:

- 100 ml 1X TBE tampon bir beher içerisine alınarak üzerine 1 g toz agaroz tartılıp eklenmiştir.
- Beher mikrodalga fırında 350°C’de 3 dk ısıtılarak agarozun erimesi ve su içerisinde çözünmesi sağlanmıştır.
- Beher kabin içerisine alınarak dış yüzeyinin musluk altına tutularak el yakmayacak kıvama gelene kadar bir miktar soğuması sağlanmıştır.
- Behere 3.5 µl etidyum bromür eklenerek karıştırılmış ve jel tankında donmaya bırakılmıştır.
- Donan jel, içerisinde 1X TBE tamponu bulunan elektroforez tankına aktarılmıştır.
- RNA örneklerinden 2 µl, yükleme tamponundan 2 µl karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir.
- Örnekler 90 voltta 15 dk yürütülmüş ve daha sonra jel görüntüleme cihazında görüntülenerek kaydedilmiştir.

2.1.5. Kantitatif Eş Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative Real Time PCR), İntegrin ve Kanser Kök Hücre PCR array

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 sentezlenmiştir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. c-DNA sentez protokolü

Kalıp-Primer Mix Hazırlanışı:		
Komponent	Hacim	Final Konsantrasyon
Total RNA	Değişken	500 ng
Random Hexamer Primer	2 µl	60 µM
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
Deoksiniükleotid 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 ilaç taşınmasından sorumlu, apoptotik, otofajik, metabolik, ER-stresinden sorumlu ve kök hücre belirteçleri olan genler ve HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) genlerine özgü primerler "Perl Primer" programı kullanılarak tasarlanmıştır (Housekeeping/referans gen: Her dokuda hücre hayatıyetini temin için mutlak suretle ifadelenen genlerdir.) (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. qRT-PCR Yapılan Genlerin Primer Dizileri

Gene	Forward (5'-3')	Reverse(5'-3')
BAD	GATGAGTGACGAGTTTGTGGA	CAAGTTCCGATCCCACCAG
BCL-2	CGCCCTGTGGATGACTGAGT	GGGCCGTACAGTTCACAA
BIM	ATCTCAGTGCAATGGCTTCC	CATAGTAAGCGTTAAACTCGTCTCC
BAX	GACGGCAACTTCAACTGGG	AGGAGTCTCACCAACCAC
BCL-XL	GATCCCCATGGCAGCAGTAAAGCAG	CCCCATCCCGAAGAGTTCATTCCT
MCL-1	CGAACCATTAGCAGAAAGTATCAC	GATATGCCAAACCAGCTCCT
MDR-1	AAGGCATTTACTTCAAACCTTGTC	GGATTCATCAGCTGCATTTTC
MRP-1	AGTGCTTTCAGAACACGGTC	TTCCAGAAAGAGTAGAAGAGGT
OCT1	TCCTCTTCTGCTCTACTACTGG	TGGTCCATTATCTTTATTGCTTCA
ATG5	TGGGCCATCAATCGGAAACTC	TGCAGCCACAGGACGAAACAG
ATG12	TCCGAGCCAGCGGCCTAACT	AAGGAGGCGCCGGAGTAGGG
BECLIN1	AGCTGCCGTATACTGTTCTG	ACTGCCTCCTGTGCTTCAATCTT
PKM2	CCACTTGCAATTATT TGAGGA A	GTGAGCAGACCTGCCAGACT
PKM1	GAGGCAGCCATGTTCCAC	TGCCAGACTCCGTGAGAACT
LDHA	TGGTCCAGCGTAACGTGAAC	CCAGGATGTGTAGCCTTTGAG
LDHB	TCCCGTGTCAACAATGGTAA	CCCACAGGGTATCTGCACTT
HEXOKINASE 2	ACCCGGGAAAAGCAACTGTTTG	TCACCAGGATAAGCCTCACCAAG
PDK1	TGGTGGAAAAGGCAAAGGAAGTC	CAGACGCCTAGCATTTTCATAGC
HPRT	TGACACTGGCAAAACAATGCA	GGTCCTTTTACCAGCAAGCT
PERK	GTCATCCAGCCTTAGCAAACC	TGTCTTCCTCTTGTTCATTTCGT
GRP78	GTCCTATGTGCGCTTCACTC	GTAACCTTCTTTCCCAATAAGCC
ATF6	GACATCAACAACCAATCTG	TAGAAGACAAATCCAACCTCC

PCR Array, 96 kuyucuklu, 384 kuyucuklu plaka ya da 100 kuyucuklu bir diskte hastalık odaklı genlerin ve yolların analizinin yanı sıra, uygun bir RNA kalite kontrolü için, optimize gerçek zamanlı PCR deneyleri setidir. PCR Array, gen ekspresyon analizlerini gerçek zamanlı PCR hassasiyeti ve bir mikrodizinin (microarray) çoklu gen profillemeye yeteneği ile gerçekleştirir. Bu yöntemde kullanıma hazır olan master miks ve cDNA örneği ile bir karışım hazırlanır. Bu karışımdan her kuyucuğa eşit miktarda dağıtılır ve gerçek zamanlı PCR programında okutulur. Bu çalışmada hücrelerden RNA izole edilerek cDNA sentezi yapılmış ve 88 integrin veya kök hücre genleri ile 8 referans genin ifadeleri analiz edilmiştir (Çizelge 2.3 ve 2.4).

Çizelge 2.3. Kök Hücre Panelindeki Gen Listesi

Gene Table			Gene Table		
Position	Symbol	Gene Name	Position	Symbol	Gene Name
A01	ALCAM	CD166, MEMD	E01	FCER1A	FCE1A, FcERI
A02	C5AR1	C5A, C5AR, C5R1, CD88	E02	FCER2	BLAST-2, CD23, CD23A, CLEC4J, FCE2, IGEBF
A03	CD160	BY55, NK1, NK28	E03	FCGR1A	CD64, CD64A, FCRI, IGFR1
A04	CD163	M130, MM130	E04	HLA-A	HLAA
A05	CD19	B4, CVID3	E05	HLA-DRA	HLA-DRA1, MLRW
A06	CD1A	CD1, FCB6, HTA1, R4, T6	E06	ICAM2	CD102
A07	CD1C	BDCA1, CD1, CD1A, R7	E07	IL12RB1	CD212, IL-12R-BETA1, IL12RB
A08	CD1D	CD1A, R3	E08	IL1R2	CD121b, CDw121b, IL-1R-2, IL-1RT-2, IL-1RT2, IL1R2c, IL1RB
A09	CD2	LFA-2, SRBC, T11	E09	IL2RA	CD25, IDDM10, IL2R, TCGFR
A10	CD209	CDSIGN, CLEC4L, DC-SIGN, DC-SIGN1	E10	ITGA1	CD49a, VLA1
A11	CD22	SIGLEC-2, SIGLEC2	E11	ITGA2	BR, CD49B, GPIa, HPA-5, VLA-2, VLAA2
A12	CD24	CD24A	E12	ITGA3	CD49C, GAP-B3, GAPB3, ILNEB, MSK18, VCA-2, VL3A, VLA3a
B01	CD244	2B4, NAIL, NKR2B4, Nmrk, SLAMF4	F01	KLRB1	CD161, CLEC5B, NKR, NKR-P1, NKR-P1A, NKR-P1A, hNKR-P1A
B02	CD247	CD3-ZETA, CD3H, CD3Q, CD3Z, T3Z, TCRZ	F02	KLRC1	CD159A, NKG2, NKG2A
B03	CD28	Tp44	F03	KLRD1	CD94
B04	CD37	GP52-40, TSPAN26	F04	KRT18	CYK18, K18
B05	CD38	T10	F05	KRT5	CK5, DDD, DDD1, EBS2, K5, KRT5A
B06	CD3D	CD3-DELTA, T3D	F06	KRT8	CARD2, CK-8, CK8, CYK8, K2C8, K8, KO
B07	CD3G	CD3-GAMMA, T3G	F07	MS4A1	B1, Bp35, CD20, CVID5, LEU-16, MS4A2, S7
B08	CD4	CD4mut	F08	MYH10	NMMHC-IIb, NMMHCB
B09	CD40	Bp50, CDW40, TNFRSF5, p50	F09	MYH9	BDPLT6, DFNA17, EPSTs, FTNS, MHA, NMHC-II-A, NMMHC-IIA, NMMHCA
B10	CD40LG	CD154, CD40L, HIGM1, IGM, IMD3, T-BAM, TNFSF5, TRAP, gp39, hCD40L	F10	MYOCD	MYCD
B11	CD5	LEU1, T1	F11	NCAM1	CD56, MSK39, NCAM
B12	CD6	TP120	F12	NOS3	ECNOS, eNOS
C01	CD63	LAMP-3, ME491, MLA1, OMA81H, TSPAN30	G01	NTSE	CALJA, CD73, E5NT, NT, NT5, NTE, eN, eNT
C02	CD69	AIM, BL-AC, P26, CLEC2C, EA1, GP32, 28, MLR-3	G02	PECAM1	CD31, CD31, EndoCAM, GPIIA', PECA1, PECAM-1, endoCAM
C03	CD7	GP40, LEU-9, TP41, Tp40	G03	RETN	ADSF, FIZZ3, RETN1, RSTN, XCP1
C04	CD70	CD27L, CD27LG, TNFSF7	G04	S100A8	60B8AG, CAGA, CFAG, CGLA, CP-10, L1Ag, MA387, MIF, MRP8, NIF, P8
C05	CD72	CD72b, LYB2	G05	SELP	CD62, CD62P, GMP140, GRMP, LECAM3, PADGEM, PSEL
C06	CD74	DHLA, HLADG, II, Ia-GAMMA	G06	ST6GAL1	SIAT1, ST6GalII, ST6N
C07	CD79A	IGA, MB-1	G07	TEK	CD202B, TIE-2, TIE2, VMCM, VMCM1
C08	CD79B	AGM6, B29, IGB	G08	TNFRSF4	ACT35, CD134, OX40, TXGP1L
C09	CD80	B7, B7-1, B7.1, BB1, CD28LG, CD28LG1, LAB7	G09	TNFRSF8	CD30, D1S166E, Ki-1
C10	CD83	BL11, HB15	G10	TPSAB1	TPS1, TPS2, TPSB1
C11	CD86	B7-2, B7.2, B70, CD28LG2, LAB72	G11	VCAM1	CD106, INCAM-100
C12	CD8A	CD8, Leu2, MAL, p32	G12	VWF	F8VWF, VWD
D01	CD8B	CD8B1, LEU2, LY3, LYT3, P37	H01	ACTB	BRWS1, PS1TP5BP1
D02	CD96	TACTILE	H02	B2M	-
D03	CHST10	HNK-1ST, HNK1ST	H03	GAPDH	G3PD, GAPD
D04	COL1A1	O14	H04	HPRT1	HGPRT, HPRT
D05	COL1A2	O14	H05	RPLP0	L10E, LPO, PO, PRLP0, RPPO
D06	CR2	C3DR, CD21, CR, CVID7, SLEB9	H06	HGDC	HIGX1A
D07	CSF1R	C-FMS, CD115, CSF-1R, CSFR, FIM2, FMS, HDLS, M-CSF-R	H07	RTC	RTC
D08	CTLA4	CD, CD152, CELIAC3, CTLA-4, GRD4, GSE, IDDM12	H08	RTC	RTC
D09	DPP4	ADABP, ADCP2, CD26, DPPIV, TP103	H09	RTC	RTC
D10	ENG	END, HHT1, ORW1	H10	PPC	PPC
D11	EPCAM	DIAR5, EGP-2, EGP314, EGP40, ESA, HNPCC8, KS1, 4, KSA, M4S1, MIC18, MK-1, TACSTD1, TROP1	H11	PPC	PPC
D12	FAS	ALPS1A, APO-1, APT1, CD95, FAS1, FASTM, TNFRSF6	H12	PPC	PPC

Çizelge 2.4. İntegrin Panelindeki Gen Listesi

Gene Table			Gene Table		
Position	Symbol	Gene Name	Position	Symbol	Gene Name
A1	ADAMTS1	ADAM Metalloproteinase With Thrombospondin Type 1 Motif, 1	E1	ITGB6	Integrin, Beta 6
A2	ADAMTS13	ADAM Metalloproteinase With Thrombospondin Type 1 Motif, 13	E2	ITGB7	Integrin, Beta 7
A3	ADAMTS8	ADAM Metalloproteinase With Thrombospondin Type 1 Motif, 8	E3	ITGB8	Integrin, Beta 8
A4	CD44	CD44 Molecule (Indian Blood Group)	E4	LAMA1	Laminin, Alpha 1
A5	CDH1	Cadherin 1, Type 1, E-Cadherin	E5	LAMA2	Laminin, Alpha 2
A6	CNTN1	Contactin 1	E6	LAMA3	Laminin, Alpha 3
A7	COL11A1	Collagen, Type XI, Alpha 1	E7	LAMB1	Laminin, Beta 1
A8	COL12A1	Collagen, Type XII, Alpha 1	E8	LAMB3	Laminin, Beta 3
A9	COL14A1	Collagen, Type XIV, Alpha 1	E9	LAMC1	Laminin, Gamma 1
A10	COL15A1	Collagen, Type XV, Alpha 1	E10	MMP1	Matrix Metalloproteinase 1
A11	COL16A1	Collagen, Type XVI, Alpha 1	E11	MMP10	Matrix Metalloproteinase 10
A12	COL1A1	Collagen, Type I, Alpha 1	E12	MMP11	Matrix Metalloproteinase 11
B1	COL4A2	Collagen, Type IV, Alpha 2	F1	MMP12	Matrix Metalloproteinase 12
B2	COL5A1	Collagen, Type V, Alpha 1	F2	MMP13	Matrix Metalloproteinase 13
B3	COL6A1	Collagen, Type VI, Alpha 1	F3	MMP14	Matrix Metalloproteinase 14
B4	COL6A2	Collagen, Type VI, Alpha 2	F4	MMP15	Matrix Metalloproteinase 15
B5	COL7A1	Collagen, Type VII, Alpha 1	F5	MMP16	Matrix Metalloproteinase 16
B6	COL8A1	Collagen, Type VIII, Alpha 1	F6	MMP2	Matrix Metalloproteinase 2
B7	CTGF	Connective Tissue Growth Factor	F7	MMP3	Matrix Metalloproteinase 3
B8	CTNNA1	Catenin (Cadherin-Associated Protein), Alpha 1, 102kda	F8	MMP7	Matrix Metalloproteinase 7
B9	CTNBN1	Catenin (Cadherin-Associated Protein), Beta 1, 88kda	F9	MMP8	Matrix Metalloproteinase 8
B10	CTNND1	Catenin (Cadherin-Associated Protein), Delta 1	F10	MMP9	Matrix Metalloproteinase 9
B11	CTNND2	Catenin (Cadherin-Associated Protein), Delta 2	F11	NCAM1	Neural Cell Adhesion Molecule 1
B12	ECM1	Extracellular Matrix Protein 1	F12	PECAM1	Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule 1
C1	FN1	Fibronectin 1	G1	SELE	Selectin E
C2	HAS1	Hyaluronan Synthase 1	G2	SELL	Selectin L
C3	ICAM1	Intercellular Adhesion Molecule 1	G3	SELP	Selectin P (Granule Membrane Protein 140kda, Antigen CD62)
C4	ITGA1	Integrin, Alpha 1	G4	SGCE	Sarcoglycan, Epsilon
C5	ITGA10	Integrin, Alpha 10	G5	SPARC	Secreted Protein, Acidic, Cysteine-Rich (Osteonectin)
C6	ITGA11	Integrin, Alpha 11	G6	SPG7	Spastic Paraplegia 7 (Pure And Complicated Autosomal)
C7	ITGA2	Integrin, Alpha 2	G7	SPP1	Secreted Phosphoprotein 1
C8	ITGA3	Integrin, Alpha 3	G8	TGFB1	Transforming Growth Factor, Beta-Induced, 68kda
C9	ITGA4	Integrin, Alpha 4	G9	THBS1	Thrombospondin 1
C10	ITGA5	Integrin, Alpha 5	G10	THBS2	Thrombospondin 2
C11	ITGA6	Integrin, Alpha 6	G11	THBS3	Thrombospondin 3
C12	ITGA7	Integrin, Alpha 7	G12	TIMP1	TIMP Metalloproteinase Inhibitor
D1	ITGA8	Integrin, Alpha 8	H1	TIMP2	TIMP Metalloproteinase Inhibitor
D2	ITGA9	Integrin, Alpha 9	H2	TNC	Tenascin C
D3	ITGAD	Integrin, Alpha D	H3	VCAM1	Vascular Cell Adhesion Molecule
D4	ITGAL	Integrin, Alpha L	H4	VCAN	Versican
D5	ITGAM	Integrin, Alpha M	H5	ACTB	Actin, Beta
D6	ITGAV	Integrin, Alpha V	H6	B2M	Beta-2-Microglobulin
D7	ITGAX	Integrin, Alpha X	H7	GAPDH	Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase
D8	ITGB1	Integrin, Beta 1	H8	GUSB	Glucuronidase, Beta
D9	ITGB2	Integrin, Beta 2	H9	HPRT1	Hypoxanthine
D10	ITGB3	Integrin, Beta 3	H10	PGK1	Phosphoglycerate Kinase 1
D11	ITGB4	Integrin, Beta 4	H11	PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A
D12	ITGB5	Integrin, Beta 5	H12	RPL13A	Ribosomal Protein L13a

2.1.6. FISH Analizi

K562R-adh hücrelerinin KML hücre serisi olduğunu belirlemek amacı ile BCR-ABL prob kullanılarak FISH analizi gerçekleştirilmiştir.

- Önceden hazırlanmış ve -20°C' de saklanan besiyeri;

%20 FBS, %2 L-Glutamin ve % 1.5 Penisilin-Streptomisin içeren 100ml RPMI 1640 kullanılmadan önce 37°C de ısıtılmıştır.

Çıkarım işleminde Kullanılan Solüsyonlar;

- Phytohemagglutinin (PHA)
- Sol A ve Sol B (Synchroset)
- Kolşisin (kolsemid) (Biological Industries)
- Hipotonik solüsyon: 75mM KCL (Sigma)
- Carnoy fiksatif: Methanol + Asetik asit (Merck) 3:1

FISH Solüsyonları:

- 20xSSC (Standart Saline Sitrat)
- 0.4xSSC
- 2xSSC
- Tween 20 yıkama solüsyonu : 2xSSC + 40 µl Tween 20
- % 70, % 85 ve %100'lük EtOH
- Hibridizasyon solüsyonu (Cytocell)
- DAPI (0.125 µg /µl)
- FISH problemleri

Hücre Kültürü

- 2 adet 5ml kültür besiyerine 1.106 hücre ekilmiştir.

- Üzerine phytohemagglutinin solüsyonundan 4 damla damlatılıp hafifçe çalkalandıktan sonra 37°C'lik etüvde 72 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.
- Kültürdeki 2. hücreye ise 48. saatte sol A solüsyonundan 20 µl eklenmiştir.
- 67. saatte sol A solüsyonları koyulan 2. hücreye sol B solüsyonundan 20µl eklenmiştir ve 37°C'lik etüvde inkübasyona bırakılmıştır.
- 72. saatin dolmasına 1.5 saat kala tüm kültür tüplerimize 5ml'lik enjektöre çekilen kolşisin solüsyonundan 2 damla damlatılmıştır.

Kromozom Çıkarım İşlemi (Harvest)

- 72. saatlik kültür sonunda hücreler 2000 rpm' de 4 dakika santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant uzaklaştırılıp pellete damla damla ve vortekslenerek 5ml taze hazırlanmış Carnoy fiksatif eklenmiştir ve tekrar 2000 rpm'de 4 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem gerektiği kadar tekrarlanmıştır.
- Pellet pastör pipetle iyice karıştırılmıştır. Alkol ile temizlediğimiz lamların üzerine damlatarak preparatlar hazırlanmış ve kurumaya bırakılmıştır.
- Lamalar etanolde yıkanmıştır (%70, %85, %100) her birinde 2 dakika RT'de bekletilmiştir.
- Daha sonra kurumaya bırakılmıştır.

Prob Hazırlanması:

- 1µl probtan 40µl hibridizasyon solüsyonundan ependorfun içine alınmıştır. İyice pipetaj yapılarak karıştırılmıştır.

Denatürasyon:

- 2µl prob karışımı numune üzerine dikkatlice damlatılmış ve 18X18 mm lamel ile kapatılmıştır. Yapıştırıcı ile yapıştırılmış ve kurumaya bırakılmıştır.
- Hibridizasyon cihazında 75 °C'de 5 dakika denatüre edilmiştir.
- Hibridizasyon cihazında nemli ortamda 42°C'de bir gece süresince inkübe edilmiştir.
- Lamel ve kalan yapışkan dikkatlice çıkarılmıştır.
- Bir şale içerisinde lam 0.4 x SSC, pH 7'de 72 °C'de 2 dakika yavaşça yıkanmıştır.

- 2 x SSC, %0.05 Tween-20'de pH 7'de RT'de 1 dakika yıkanmıştır.
- Lam kurutulmuş ve probun koyulduğu bölgeye 5 µl DAPI damlatılıp üzeri lamelle kapatılmıştır.
- Preparatlar karanlıkta -20°C'de bekletilmiş ve floresan mikroskopunda incelenmiştir.

2.1.7. CD24 ve CD44 Proteinlerinin Akım sitometri ile Analizi

K562S, K562R ve K562R-adh hücrelerinde kanser kök belirteci hücre yüzey proteinleri olan CD24 ve CD44'ün analizinde aşağıdaki basamaklar izlenmiştir:

- Öncelikle hücreler flasktan toplanmıştır.
- Hücreler 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.
- Pelet üzerine PBS eklenmiş ve santrifüj edildikten sonra supernatan kısım uzaklaştırılmıştır. Bu işlem iki kez tekrarlanmıştır.
- Pelet, Blocking buffer içerisinde çözülüp 4 tüpe bölünmüştür.
- Birinci tüp boyasız, ikinci tüp izotip, üçüncü tüp CD24 ve CD44 tüp için ayrılmıştır.
- Primer antikolar kendilerine ait tüplere eklenmiş ve her dört tüp 30-45 dakika boyunca karanlıkta oda ısısında inkübe edildikten sonra iki kez PBS ile yıkanmıştır.

- Pelet PBS içerisinde resüspanse edilerek ACCURI C6 akım sitometre (akım sitometry) cihazında analiz edilmiş ve sonuçlar boyanma yüzdeleri şeklinde ve ortalama floresans yoğunluğu (MFI) olarak kaydedilmiştir.

2.1.8. Mitokondri Miktarının Floresan Belirteçlerle Tayini:

K562R hücrelerinde dirençten sorumlu mekanizmalardan biri olabilecek mitokondri kitlesinin tayini için; canlı hücrelerde mitokondrileri boyayan ve mitokondriyal kitle ve lokalizasyonu için kullanılabilen kırmızı-floresan bir boya olan MitoTracker Red boyası kullanılmıştır ve akım sitometrik olarak ölçüm yapılmıştır.

- K562S, K562R ve K562R-adh hücreleri (5×10^5 hücre/kuyu) olacak şekilde 12-kuyulu plaklara ekilmiştir. K562S, K562R ve K562R-adh hücreler sırasıyla 0.2 μ M ve 5 μ M imatinb ve 10 ve 50 μ M Gamitrinib ile 48 saat boyunca muamele edilmiştir.

K562S, K562R ve K562R-adh hücreleri, mitokondriye özgü floresan boya olan mitoTracker Red ile 20 dakika 37 °C derecede inkübe edildikten sonra RPMI besiyeri ile 3 kez yıkanıp, akım sitometri cihazında analiz edilmiştir. Analiz sonucunda dirençli hücrelerde ve duyarlı hücrelerde mitokondriyal boyanma yüzdeleri ve MFI'lar saptanmıştır.

2.1.9. Annexin V-PE ve 7AAD ile Apoptoz Tayini

Annexin V-PE, apoptotik hücreleri belirlemek için kullanılan ve hücre yüzeyinde filip flop yapan fosfotidil serine diğer fosfolipidlere kıyasla yüksek ilgiyle bağlanan bir boyadır. Annexin V bağlanması kalsiyum bağımlıdır ve Annexin V boyama protokolünde ifade edilmiş en uygun kalsiyum ve tuz konsantrasyonlarında gerçekleşmektedir.

- K562S, K562R ve K562R-adh hücreleri (5×10^5 hücre/kuyu) olacak şekilde 12-kuyulu plaklara ekilmiştir. K562S, K562R ve K562R-adh hücreler sırasıyla 0.2 μ M ve 5 μ M imatinib ve 10 ve 50 μ M Gamitrinib ile 48 saat boyunca muamele edilmiştir.

- İnkübasyon sonrası kuyulardaki hücreler toplanarak PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir (yıkama işlemi 2 kere yapılır). BD Biosciences kit'in protokolüne uygun olarak hücreler 1X binding buffer solusyonunda tekrar süspansiyon edilmiştir.

- 100 μ l süspansiyon hücrelerin üzerine 5 μ l PE Annexin V-PE and 5 μ l 7AAD eklenmiştir.

- Hafifçe vortex edilmiştir.

- Hücreler 15 dakika boyunca oda ısısında inkübe edilmiştir.

- İnkübasyondan sonra hücreler 1X binding buffer ile yıkanmıştır.

200 μ l 1X binding buffer eklenerek akım sitometri (Accuri C6) cihazı ile analiz yapılmıştır.

2.1.10. Kaspaz 3/7 Aktivasyonunun Tayini

Hücre serilerinde apoptoz varlığını ve düzeylerini kıyaslamak amacıyla kaspaz 3/7 aktivasyonunun tayini gerçekleştirilmiştir.

- K562S, K562R ve K562R-adh hücreleri (5×10^5 hücre/kuyu) olacak şekilde 12-well plate kuyularına ekilmiştir. K562S, K562R ve K562R-adh hücreler sırasıyla 0.2 μ M ve 5 μ M İmatinib ve 10 ve 50 μ M Gamitrinib ile 48 saat boyunca muamele edilmişlerdir.

- Hücreler, toplam hacim 1 ml olacak şekilde kuyulardan toplanmıştır.

- Hücrelerin üzerinde 1 μ L of Cell Event Caspase-3/7 Green Detection boyası (Caspase-3 Colorometric Kit, Cat no: BF3100. RD systems) eklenmiştir.

- 30 dakika boyunca 37 °C inkübasyon yapılmıştır.

- 1 μ L of the 1 mM SYTOXTM AADvancedTM dead cell boyası eklenerek 5 dakika inkübasyon yapılmıştır.

- Örnekler daha sonra akım sitometri (Accuri C6) cihazı ile analiz edilmiştir.

2.1.11. Rhodamin Assay ile P-glikoprotein Aktivite Tayini

Hücre serilerinde P-glikoprotein, hücreden Rhodamin 123 gibi boyaları pompalama kabiliyeti, Pgp'nin aktivitesini fonksiyonel olarak belirlemek amacıyla kullanılmıştır.

- K562S, K562R ve K562R-adh hücreler (5×10^5 hücre/kuyu) olacak şekilde 12-kuyulu plaklara ekilmiştir. K562S, K562R ve K562R–adh hücreler sırasıyla 0.2 μ M ve 5 μ M İmatinib ve 10 ve 50 μ M Gamitrinib ile 48 saat boyunca muamele edilmişlerdir.

- Hücreler, toplam hacim 1 ml olacak şekilde kuyulardan toplanmıştır. Hücrelere 150 ng/ml Rh 123 eklenerek 37°C’de 30 dk inkübe edilmiştir.

- Hücreler iki kez PBS ile yıkanmıştır. Hücreler RPMI da resüspanse edilerek 90 dk 37°C’de inkübe edilmiştir.

- PBS ile yıkama işlemi yapıldıktan sonra örnekler akım sitometri (Accuri C6) cihazı ile analiz edilmiştir.

2.1.12. ATP Ölçüm Testi

Dirençten sorumlu mekanizmalardan, metabolizmanın etkilendiğini test etmek amacı ile gerçekleştirilmiştir.

ATP ölçümü için, hücre/doku lizatları, biyolojik sıvılar ve kan hücrelerindeki toplam ATP'yi ölçmek için sağlam ve basit bir yöntem olan Mitokondriyal ATP konsantrasyonu Kolorimetrik ATP Assay Kiti kullanılmıştır. Yöntem, gliserolün fosforilasyonu ile kolorimetrik olarak kolayca ölçülebilen bir ürünün üretilmesi prensibine dayanmaktadır. Kitin protokolü izlenerek 570 nm'de spektrofotometrik olarak ATP miktarı ölçümü yapılmıştır.

- K562S, K562R ve K562R-adh hücreler (5×10^5 hücre/kuyu) olacak şekilde 12- well plate kuyularına ekilmiştir. K562S, K562R ve K562R-adh hücreler sırasıyla 0.2 μ M ve 5 μ M İmatinib ve 10 ve 50 μ M Gamitrinib ile 48 saat boyunca muamele edilmişlerdir.

- Her gruptaki hücreler, 2 kuyu birleştirilerek hücre sayısı 1×10^6 hücre olacak şekilde toplanmıştır. Hücreler 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir.

- Hücreler 100 μ l of ATP Assay Buffer da lizis edildikten sonra 15,000 x g de 2 dk santrifüj edilmiştir.

- Süpernatant toplanmış ve 50 μ l alınarak 96 kuyulu plaklara konulmuştur.

- 50 μ l ATP Reaction Mix eklenerek, 30 dk karanlık bir ortamda inkübe edilmiştir.

Örneklerde spektrofotometri cihazı ile üretilen ATP miktarı kolorimetrik olarak ölçülmüştür.

2.1.13. Mitobiyogenez

Mitokondri biyogenez analizi için Abcam's MitoBiogenesis™ Akım Sitometri kit'i kullanılmıştır. Yöntemin prensibi; biri mitokondriyal DNA (mtDNA) tarafından kodlanan ve diğeri nükleer DNA (nDNA) tarafından kodlanan iki önemli mitokondriyal protein arasındaki oranı Akım sitometri yöntemi ile değerlendirmeye dayanır.

İki proteinin her biri, farklı bir oksidatif fosforilasyon enzim kompleksinin alt birimleridir;

Bu proteinlerden biri mtDNA tarafından kodlanan Kompleks IV' ün (COX-I) 1. altbirimi olan mtDNA tarafından kodlanan MTCO1 proteini diğeri ise Kompleks II'nin (SDH-A) 70 kDa'luk alt ünitesini oluşturan ve nükleer DNA tarafından kodlanan SDHA proteinidir. Kompleks IV, mitokondride kodlanan proteinleri içerirken, Kompleks II'nin proteinleri tamamen çekirdekte kodlanmaktadır. Bu kit ile MTCO1 ve SDHA proteinlerine özgü antikolar kullanılarak bu iki protein arasındaki oranın akım sitometri yöntemi ile değerlendirmesi yapılmıştır.

- K562S, K562R ve K562R-adh hücreler (5×10^5 hücre/kuyu) olacak şekilde 12-kuyulu plaklara ekilmiştir. K562S, K562R ve K562R-adh hücreler sırasıyla 0.2 μ M ve 5 μ M İmatinib ve 10 ve 50 μ M Gamitrinib ile 48 saat boyunca muamele edilmişlerdir.

- 350-500 g'de 5dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır.

- Pelletin üzerine 1ml PBS eklendikten sonra, hafif darbeler ile pelletin PBS'de çözülmesi sağlanmıştır.

- 350-500 g'de 5dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır.

- Pelletin üzerine 100µl 1X Blocking Buffer eklenip, pellet resüspanse edilmiş ve tüpler hafifçe alt üst edilerek 15 dk oda ısısında inkübe edilmiştir.

- Primer antikor ile 1 saat karanlık bir ortamda oda ısısında inkübasyon yapılmıştır.

- 350-500 g'de 5dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır.

- Hücreler PBS ile yıkanmıştır.

- Hücreler, 100 µl PBS'de resüspanse edilerek, akım sitometri (Accuri C6) cihazı ile analiz edilmiştir.

2.1.14. Mitokondriyal membran potansiyelinin belirlenmesi

Aktif mitokondriyi boyamak amacıyla TMRE (tetramethylrhodamine, ethyl ester) boyası kullanılmıştır. TMRE, göreceli olarak negatif yüklerinden dolayı aktif mitokondride kolayca biriken, hücreye nüfuz eden, pozitif yüklü, kırmızı-turuncu bir boyadır. Depolarize veya inaktif mitokondride membran potansiyelinin düşmesi ve TMRE boyasının birikiminin azalması prensibine dayanan yöntemle akım sitometri ile Mitokondriyal membran potansiyeli belirlenmiştir.

- K562S, K562R ve K562R-adh hücreler (5×10^5 hücre/kuyu) olacak şekilde 12 kuyulu plaklara ekilmiştir. K562S, K562R ve K562R-adh hücreler sırasıyla 0.2 µM ve 5 µM İmatinib ve 10 ve 50 µM Gamitrinib ile 48 saat boyunca muamele edilmişlerdir.

- Pozitif kontrol hazırlamak için (mitokondriyal membran potansiyel kaybı), 50 mM CCCP'den 1 μ alıp kontrol tüpüne eklenmiş ve 50 μ M son konsantrasyonuna getirilip, hücreler 15 dakika boyunca 37 ° C'de inkübe edilmiştir.

- Her örneğe (200 nM nihai konsantrasyon) 100 μ l TMRE etiketleme solüsyonundan eklenmiştir ve hücreler inkübatörde (37 ° C ve % 5 CO₂) 15 ila 30 dakika inkübe edilmiştir.

- 300 g'de 5dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır.

- Pelletin üzerine 1ml 1XPBS eklendikten sonra, hafif darbeler ile pelletin PBS'de çözülmesi sağlanmıştır, bu aşama 4 kez tekrar edilmiştir.

- Hücrelerin üzerine 1ml 1X PBS eklenerek yeniden süspanse hale getirilmiştir.

- Akım sitometri (Accuri C6) cihazı ile analiz edilmiştir

2.1.15. Hücre Döngüsü Tayini

Örneklerin hücre döngüsü profili, DNA'nın bir PI (floresan boya) ile boyanması ve yoğunluğunun ölçülmesiyle belirlenmiştir. PI DNA'yı stokiyometrik olarak boyar, böylece G0/G1, S fazı ve G2/M fazdaki hücrelerin tanımlanması gerçekleştirilmiştir (Pozarowski ve Darzynkiewicz 2004).

- K562S, K562R ve K562R-adh hücreler (5×10^5 hücre/kuyu) olacak şekilde 12-kuyulu plaklara ekilmiştir. K562S, K562R süspanse ve K562R yapışan hücreler sırasıyla

0.2 μ M ve 5 μ M İmatinib ve 10 ve 50 μ M Gamitrinib ile 48 saat boyunca muamele edilmişlerdir.

- 350-500 g'de 5dk santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır,
- Pelletin üzerine 1ml PBS eklendikten sonra, hafif darbeler ile pelletin PBS'de çözülmesi sağlanmıştır,
- Hücreler bir gece boyunca ethanol 70% ile fiks edilmiştir,
- Hücreler 100 μ l RNaz ile 37°C de 30 dakika inkübe edilmiştir,
- Hücreler 400 μ l PI solüsyonu ile 4°C de 30 dakika karanlık ortamda boyanmıştır,
- Farklı fazlardaki hücrelerin analizi akım sitometri (Accuri C6) cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

2.1.16. Sitokrom C Salınımının Saptanması

Hücrede apoptozun aktive olma yollarından biri, sitokrom C'nin mitokondriden sitozole salınmasıdır. Bu nedenle Gamitrinib'in ve/veya İmatinib kombinasyonlarının apoptotik etkisini belirlemek amacı ile sitoplazmik sitokrom C tayini western blot analizi ile gerçekleştirilmiştir.

- K562S, K562R ve K562R-adh hücreler (5×10^5 hücre/kuyu) olacak şekilde 12-kuyulu plaklara ekilmiştir. K562S, K562R ve K562R-adh hücreler sırasıyla 0.2 μ M ve 5 μ M İmatinib ve 10 ve 50 μ M Gamitrinib ile 48 saat boyunca muamele edilmişlerdir,

- Hücreler daha sonra 600g de, 5 dakika 4°C santrifüj edilip toplanmıştır,

- Hücrelerin 1 ml soğuk PBS ile yıkama işlemi gerçekleşip, 600 g'de 5dk 4°C santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı uzaklaştırılır,

- Hücreler 100 μ l DTT ve proteaz inhibitör içeren 1x sitozol ekstraksiyon buffer ile suspanse hale getirilmiş, daha sonra 10 dk buzda inkübe edilmiştir,

- Hücreler soğuk doku parçalayıcısı ile homojenize hale getirilmiştir (bu işlem buzun üzerinde 30-50 kere tekrar edilir),

- Homojenize olan hücreler 1.5 ml'mikrosantrifüj tüplere transfer edilip, daha sonra 700 g de 10 dakika 4°C santrifüj edilmiştir,

- Süpernatant yeni 1.5 ml'lik tüplere aktarılıp, 10000g de 30 dakika 4°C'de santrifüj edildikten sonra süpernatant kısmı sitozolik lizati olarak toplanmıştır,

- Westen blot tekniğiyle sitozolik sitokrom C tayini yapılmıştır.

2.1.17. Western Blot Analizi

Sitoplazmik Sitokrom C tayini için western blot analizi yapılmıştır,

- K562S, K562R ve K562R-adh hücrelerinden elde edilen sitozolik ekstreler, Bradford metoduna göre protein tayini yapılmıştır,

- Bu ekstrelerin %15'lik SDS poliakrilamid jel elektroforezi ile moleköl büyüklüklerine göre ayrılmaları sağlanmıştır. Bu amaçla, eşit miktarda protein içeren örnekler yükleme tamponu ile karıştırılmış ve 100°C'de 4 dakika denatüre edilmiştir. Eşit miktarda protein (100µg) içeren sitozolik lizatlar, %15'lik SDS-PAGE'e yüklenerek 100V'da 2 saat jelde yürütölmüştür.

- PVDF membrana transfer edilerek blotlama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, elektroforez tamamlandıktan sonra jeller camlardan çıkartılmış ve 25 mM Tris, 0,192 M glisin, %20(v/v) metanol, 0,5 g SDS içeren transfer tamponunda, 10 dakika oda sıcaklığında orta hızda çalkalanarak dengeye getirilmiştir. SDS-PAGE sonucu elde edilen jel boyutunda kesilen ve metanolle 30 saniye aktive edilmiş PVDF membran, blotlama sırasında kullanılacak süngerler ve filtre kağıtları birkaç dakika transfer tamponunda ıslatılmış ve western blot modölünün kullanma talimatına uygun şekilde katottan anoda doğru, sünger, filtre kağıdı, jel, membran, filtre kağıdı ve iki sünger üst üste konarak ve arada hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek sandviç yapılmış ve 1 saat 100 V'da transfer yapılmıştır.

- Membran bloklama işlemi %10 yağsız süt tozunun PBS'deki çözeltisi kullanılarak oda sıcaklığında 1 saat düşük hızda çalkalama ile gerçekleştirilmiştir.

- Primer antikor (Mouse anti-cytochrome C antibody, beta-actin) ile inkübasyon aşamasında, anti sitokrom c primer antikor, PBS içerisinde 1:200 seyreltilmiş ve membran ile +4°C'de bir gece düşük hızda çalkalanarak inkübe edildi. İnkübasyon sonunda membran üç kez, beşer dakika PBS tween de orta hızda çalkalanarak yıkanmıştır.

- Daha sonra membran, sekonder antikor (Anti-Mouse IgG (H+L), AP Conjugate) ile 1 saat orta hızda çalkalanarak, oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Sekonder antikor,

PBS-tween içinde 1:1000 oranında seyreltilmiş ve membran ile inkübe edilmiştir. Ardından PBS tween çözeltisi ile yüksek hızda çalkalanarak 20 dakika yıkanmıştır. En son aşamada membranlarda oluşan protein bantları, Millipore ECL ajanı kullanılarak Li-cor Oyssey Fc görüntüleme sistemi ile görüntülenmiş ve bant yoğunlukları ImageJ programı ile hesaplanarak analiz edilmiştir.

2.1.18. İstatistik

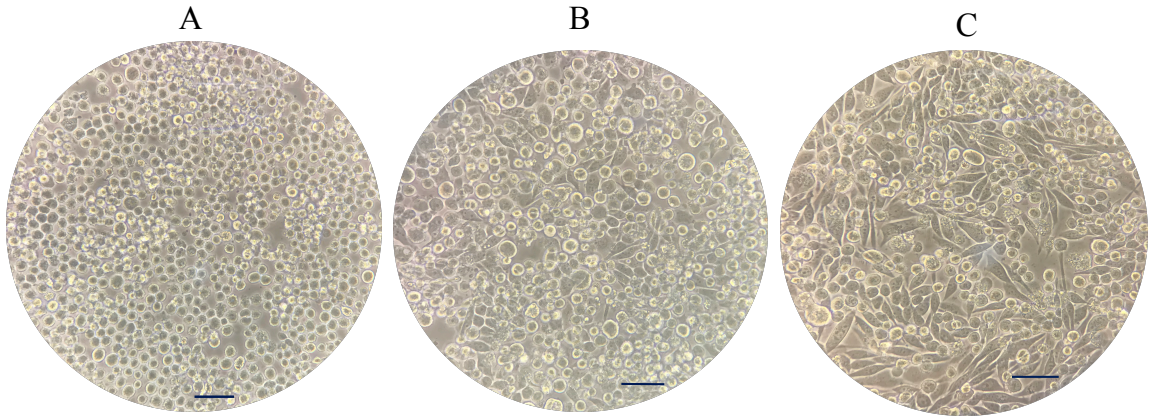
Ölçümle elde edilen verilerin analizinde SPSS 21.0 istatistik yazılımı (IBM Corp. Armonk, N.Y., U.S.A.) kullanılmıştır. İki den fazla sayıdaki gruba ait veriler tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve bu analizi takiben Tukey post-hoc testi kullanılarak analiz edilmiştir. $P < 0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir.

3. BULGULAR

3.1. K562R-adh Hücrelerin Fenotipik ve Fonksiyonel Karakterizasyonu

K562R (süspanse) hücreleri kendi labratuvarımızda 5 μ M İmatinib'e dirençli hale getirilmiştir (Hekmatshoar ve ark., 2018). K562R hücrelerinin devamlı ve uzun süreli İmatinib'e maruz bırakıldığı süreçte, yayılmış ve yapışan hücre morfolojisine sahip küçük hücre popülasyonunun varlığı tespit edilmiştir.

Bu yapışan hücre morfolojisine sahip olan K562R-adh hücreler daha sonra K562R süspanse olan hücrelerden ayrıldı ve başka bir flaskta 5 μ M İmatinib varlığında kültüre edilmiştir (Şekil 3.1).



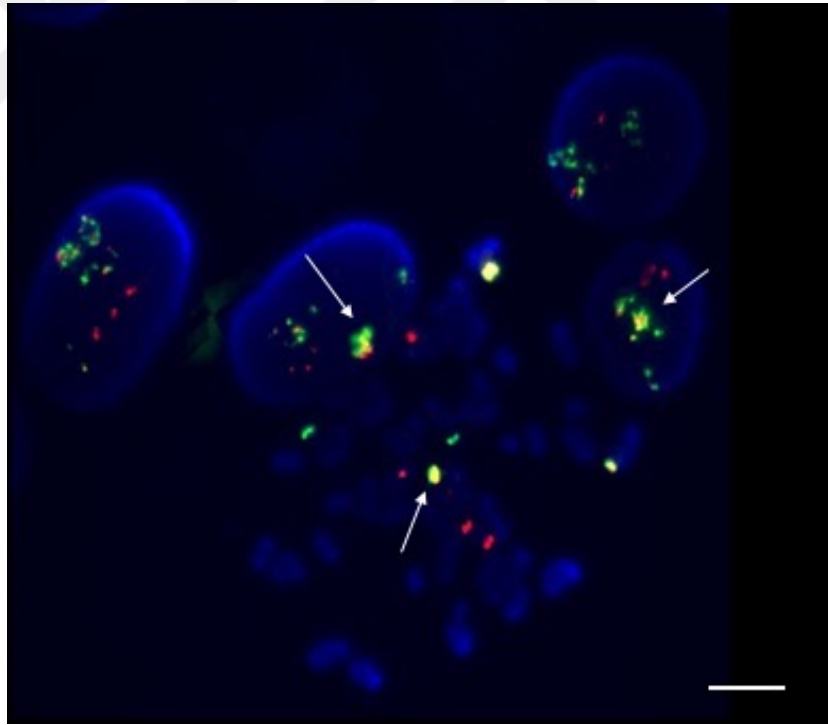
Şekil 3.1. Hücrelerin Işık mikroskopi görüntüsü; A) K562S B) K562R C)K562R-adh (40x)

Çalışmamızda yapışan K562R-adh hücrelerimizin karakterizasyonu yapılmıştır.

Yapılan bu hücre popülasyonunun KML kökenli olduğunu belirtmek amacı ile bu hücrelerde BCR-ABL taraması yapılmıştır.

3.1.1. FISH Yöntemi ile BCR-ABL Füzyon Geni Analizi

Yapılan bu hücre popülasyonunun KML kökenli olduğunu belirtmek amacı ile FISH yöntemi ile BCR-ABL analizi yapılmış, elde edilen sonuçlara göre K562R-adh hücrelerinde BCR-ABL füzyon geni saptanmıştır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. K562R-adh hücrelerinde metafaz ve interfaz kromozomlarındaki BCR-ABL füzyon geninin FISH analizi. Yeşil:BCR, Kırmızı:ABL, Sarı:BCR-ABL füzyon genini göstermektedir (x40).

3.1.2. BCR-ABL Füzyon Geninin Kantitatif Real Time-PCR Analizi

BCR-ABL füzyon geninin FISH yöntemi ile tespiti yapıldıktan sonra, qRT-PCR ile de her 3 hücre serisi (K562S, K562R ve K562R-adh) arasında BCR-ABL ifadesi bakılmış, elde edilen sonuçlara göre BCR-ABL amplifikasyonu aşağıdaki tabloda belirtildiği gibi K562R-adh, K562S ve K562R hücrelerinde yüksek oranda saptanmıştır, ABL geni internal kontrol olarak kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. BCR-ABL real time sonuçları

CT Değerleri	BCR-ABL	ABL
K562R-adh	16.68	17.64
K562R	18.24	19.18
K562S	17.30	18.39

3.1.3. Kantitatif Eş Zamanlı PCR Array Analizi

K562S, K562R ve K562R-adh hücrelerde qRT-PCR array yapılarak, hücreler arasında integrin ve kanser kök hücre panelindeki genlerin ifade analizi yapılmıştır.

K562R-adh hücrelerimiz aderan özellik gösterdiği için, integrin hücre paneli kullanılırken, EMT geçişinin gerçekleştiğini ve bu hücrelerin kök hücre özelliğini

taşıdığını araştırmak amacı ile de kanser kök hücre paneli kullanılarak 176 genin taraması yapılmıştır.

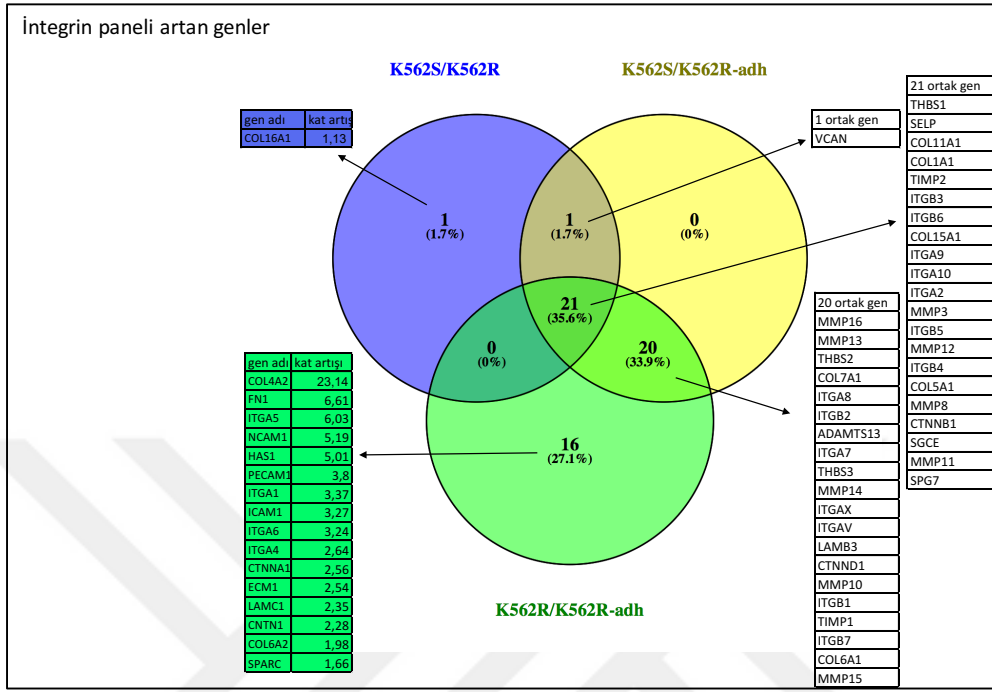
3.1.3.1. İntegrin Hücre Panelinde Artan ve Azalan Genlerin İfadeleri

K562R hücreleri K562S hücreleri ile kıyaslandığında 23 genin ifadesinde artış diğer yandan 37 genin ifadesinde azalma saptanmıştır (Şekil 3.3 A).

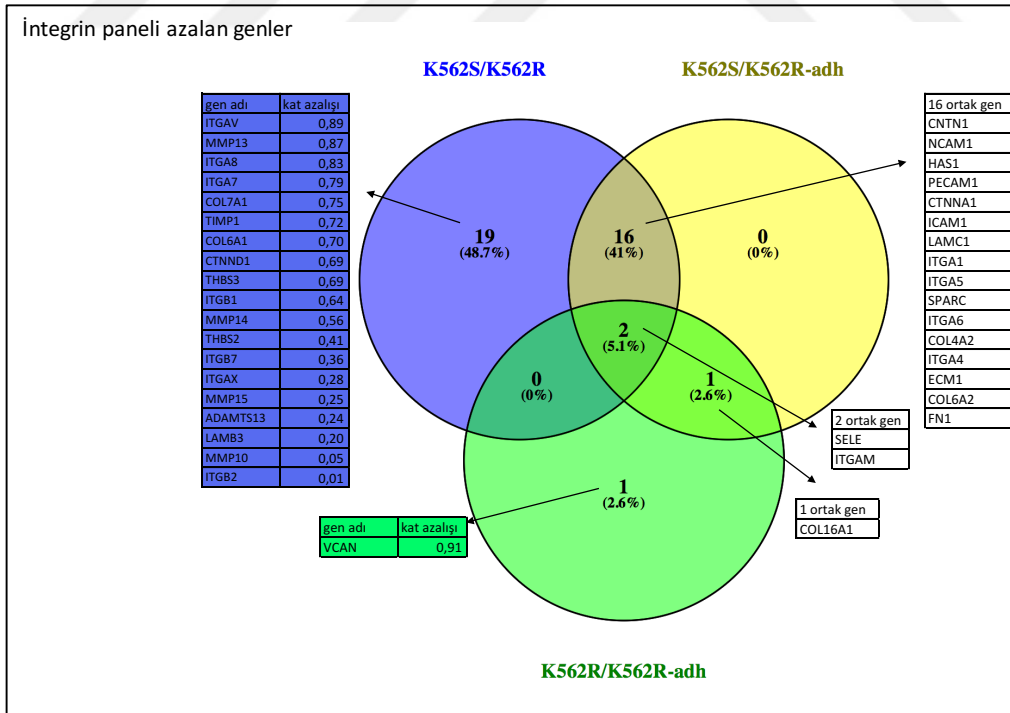
K562R-adh hücreleri K562S hücresiyle kıyaslandığında, 42 genin ifadesinde artış gözlenirken 19 genin ifadesi azalmıştır (Şekil 3.3. B). K562R-adh hücreleri K562R hücreleri ile kıyaslandığında 57 genin ifadesi yüksek ve 4 genin ifadesi azalmış olarak bulunmuştur (Şekil 3.3. C).

Hücreler arası ortak artan ve azalan genlerin analizi venn şeması ile gösterilmiştir (Şekil 3.4 ve Şekil 3.5).

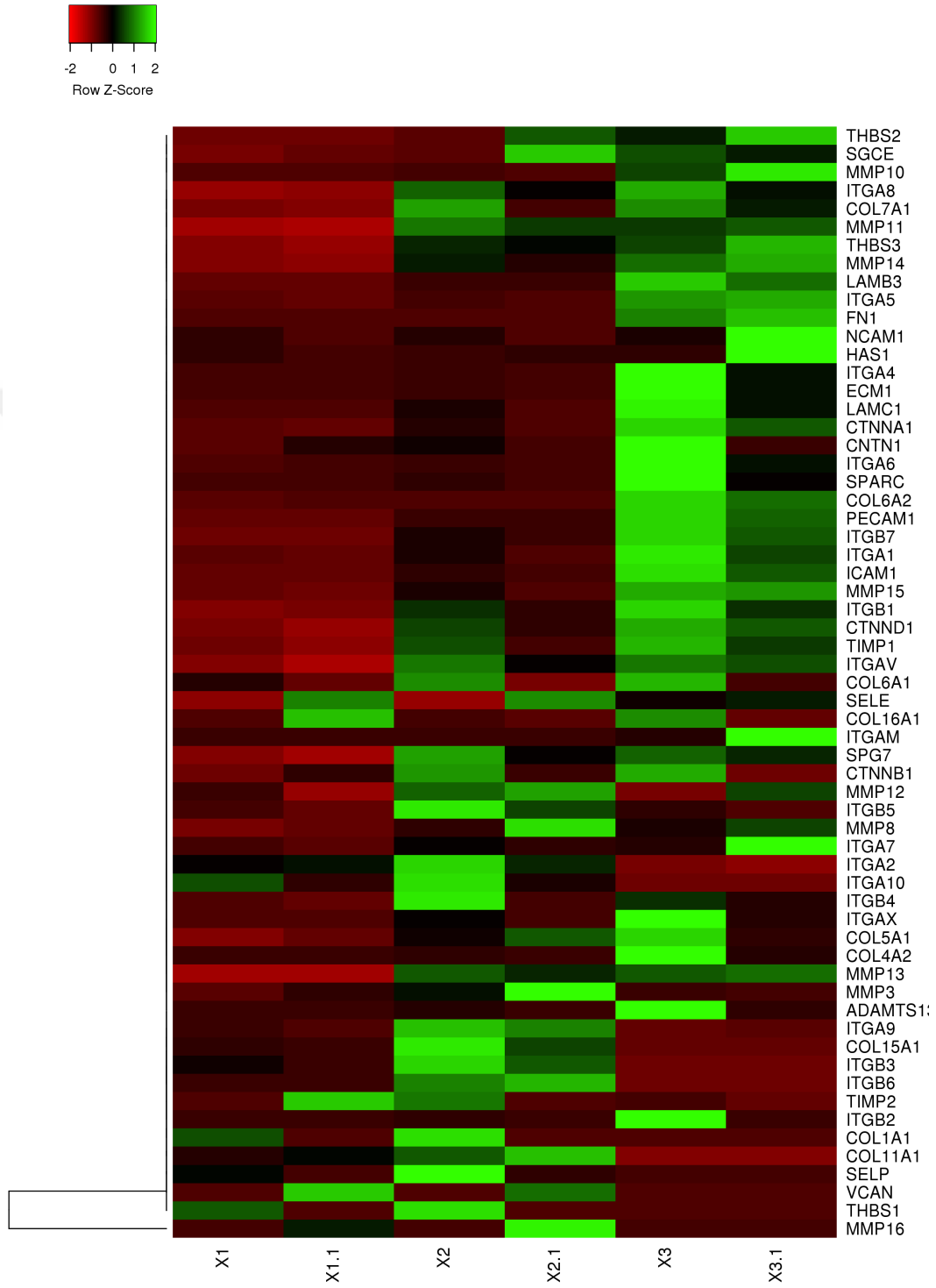
Hücreler arasındaki kıyaslamadan elde edilen artan ve azalan gen ifade sonuçları “heat map” analizi ile gösterilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.4. İntegrin panelindeki hücreler arasında yüksek olarak ifade olan ortak genler



Şekil 3.5. İntegrin panelindeki hücreler arasında düşük ifade olan ortak genler



Şekil 3.6. İntegrin hücre paneli heat map analiz sonuçları (1.K562S/K562R 2.K562S/K562R-adh 3.K562R/K562R-adh)

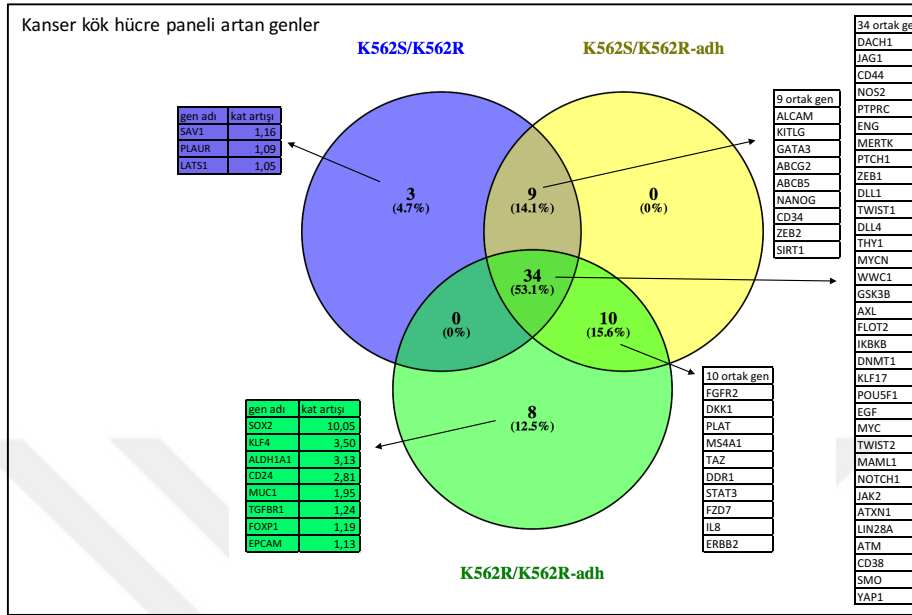
3.1.3.2. Kanser Kök Hücre Panelinde Artan ve Azalan Genlerin İfadeleri

K562R hücreleri K562S hücresi ile kıyaslandığında 46 genin ifadesinde artış diğer yandan 28 genin ifadesinde azalma saptanmıştır (Şekil 3.7. A).

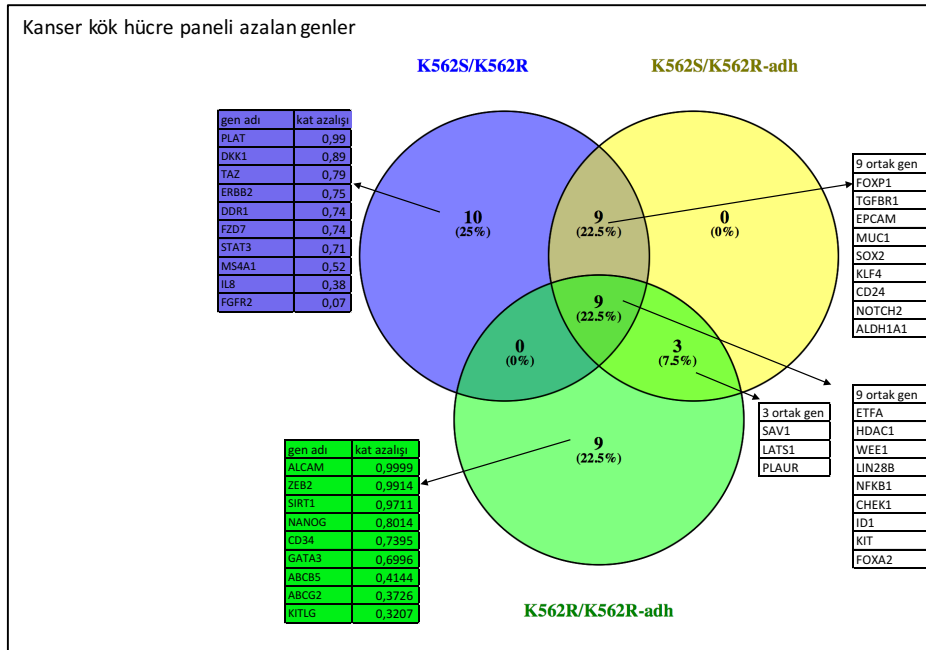
K562R-adh hücreleri K562S hücresiyle kıyaslandığında, 53 genin ifadesinde artış gözlenirken 21 genin ifadesi azalmıştır (Şekil 3.7.B). K562R-adh hücreleri K562R hücreleri ile kıyaslandığında 52 genin ifadesi yüksek ve 21 genin ifadesi azalmış olarak bulunmuştur (Şekil 3.7. C).

Hücreler arası ortak artan ve azalan genlerin analizi venn şeması ile gösterilmiştir (Şekil 3.8 ve Şekil 3.9).

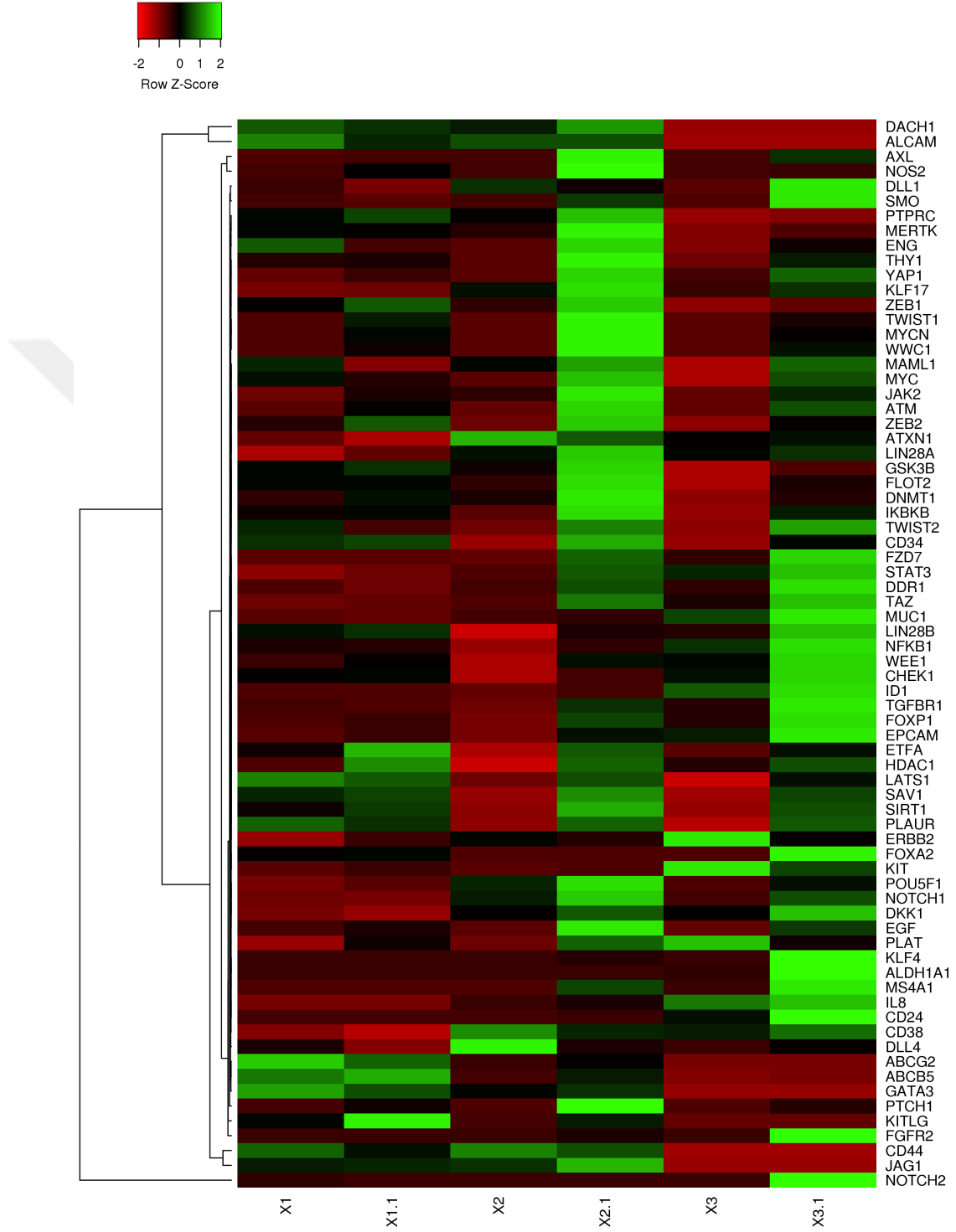
Hücreler arasındaki kıyaslamadan elde edilen artan ve azalan gen ifade sonuçları “heat map” analizi ile gösterilmiştir (Şekil 3.10).



Şekil 3.8. Kanser kök hücre panelindeki hücreler arasında yüksek olarak ifade olan ortak genler

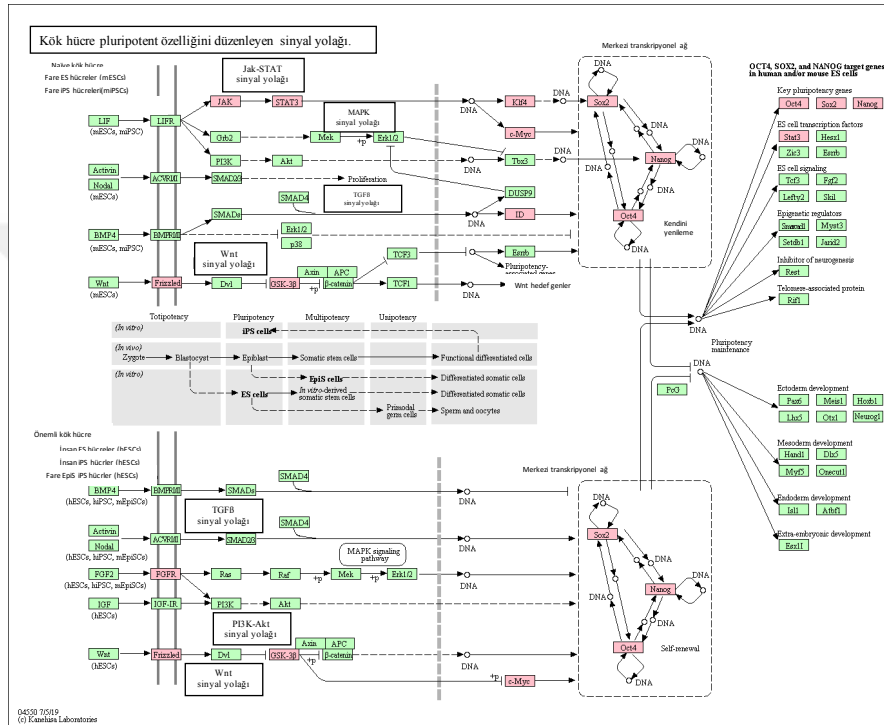


Şekil 3.9. Kanser kök hücre panelindeki hücreler arasında düşük olarak ifade olan ortak genler

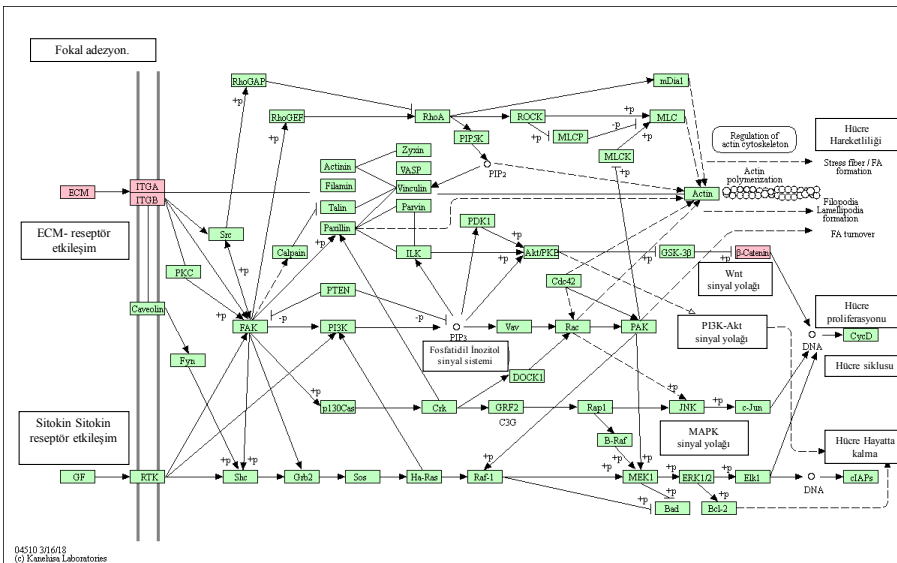


Şekil 3.10. Kanser kök hücre paneli heat map analiz sonuçları (1.K562S/K562R 2.K562S/K562R-adh 3.K562R/K562R-adh)

İntegrin ve kök hücre panelinde yer alan genlerin ilişkili olduğu yolların belirlenmesi amacı ile KEGG (The Kyoto Encyclopaedia of Genes and Genomes) yolak analizi yapılmıştır (Şekil3.11 ve. Şekil 3.12).



Şekil 3.11: Kök hücre pluripotent özelliğini düzenleyen sinyal yolağı.



Şekil 3.12. Fokal adezyon yolağı

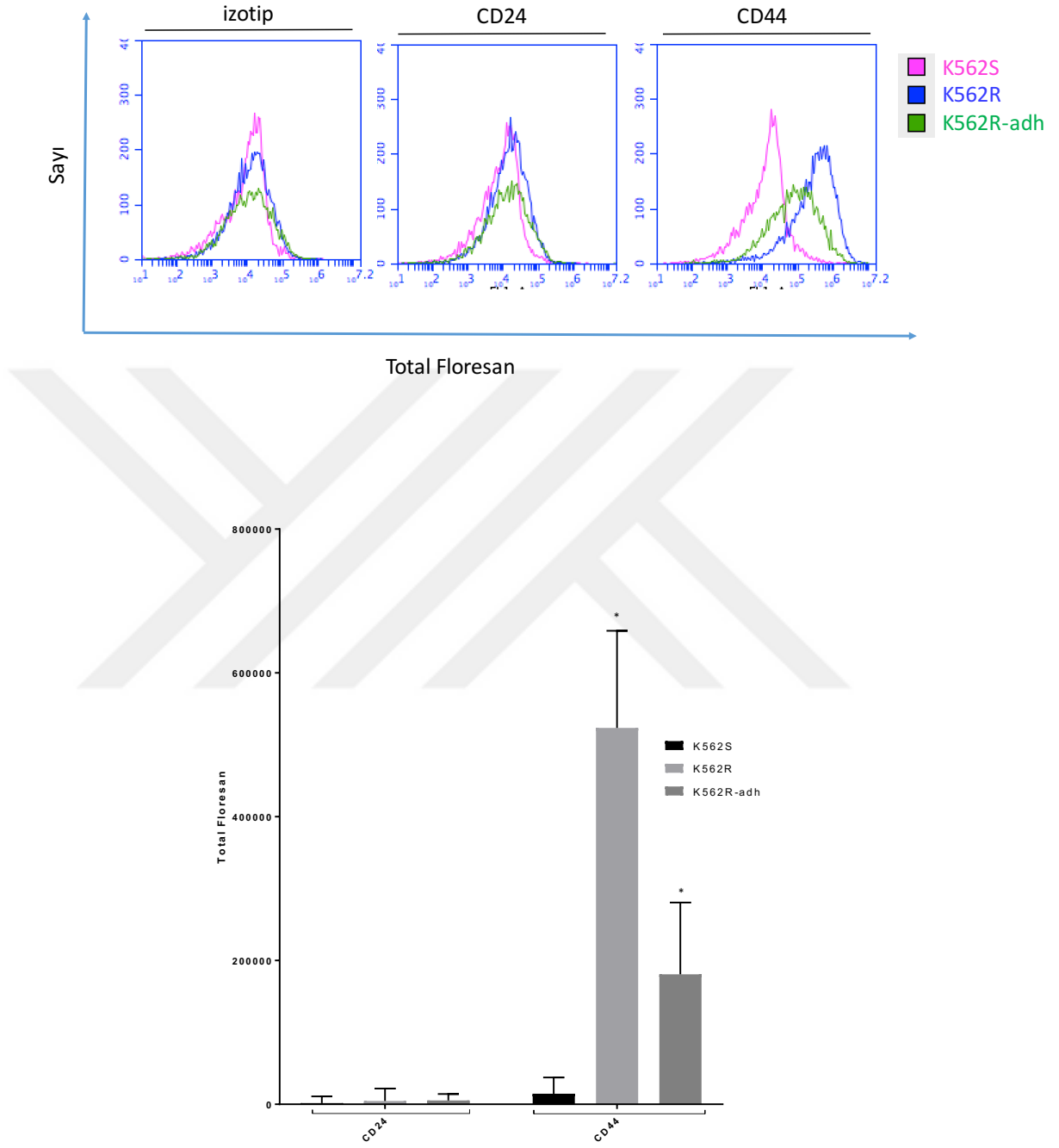
Array sonuçlarına göre CD24/CD44 genlerinin ifade sonuçları (kat değişimi) Çizelge 3.2.'de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. CD24 ve Cd44 genlerinin mRNA seviyesindeki ifadeleri.

	K562S/K562R	K562S/K562R-adh	K562R/K562R-adh
CD24	Kat değişimi: 0.040	Kat değişimi: 0.113	Kat değişimi: 2.807
CD44	Kat değişimi: 149.431	Kat değişimi: 185.091	Kat değişimi: 1.261

Elde ettiğimiz sonuçlara göre hem süspanse hem de adezif dirençli hücrelerimizde CD44'ün yüksek oranda ifade edildiği bulunmuştur. Bir kök hücre belirteci olarak kabul edilen CD44'ün dirençli hücrelerde duyarlı hücelere göre 149.431 ve 185.991 kat fazla ifadesi olması dirençli hücrelerin kök hücre karakterinde olduğunu destekler yöndedir (Çizelge 3.2).

CD24 ve CD44 genlerinin real-time sonuçlarını desteklemek amacı ile bu hücrelerde yüzey proteinlerinin ifadesi için akım sitometri ile analiz yapılmıştır (Şekil 3.13).



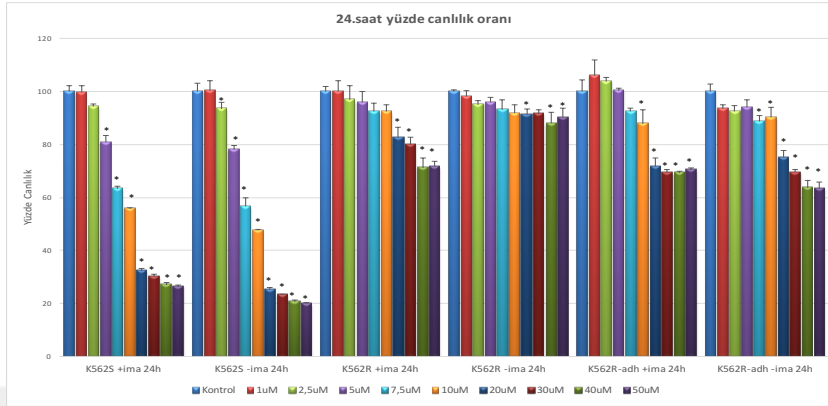
Şekil 3.13. K562S, K562R ve K562R-adh hücrelerinde akım sitometri yöntemi ile CD24 ve CD44 yüzey proteinlerinin oranları.

3.2. Mitokondriyal HSP90 (TRAP-1) İnhibitörü Olan Gamitrinib'in Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi

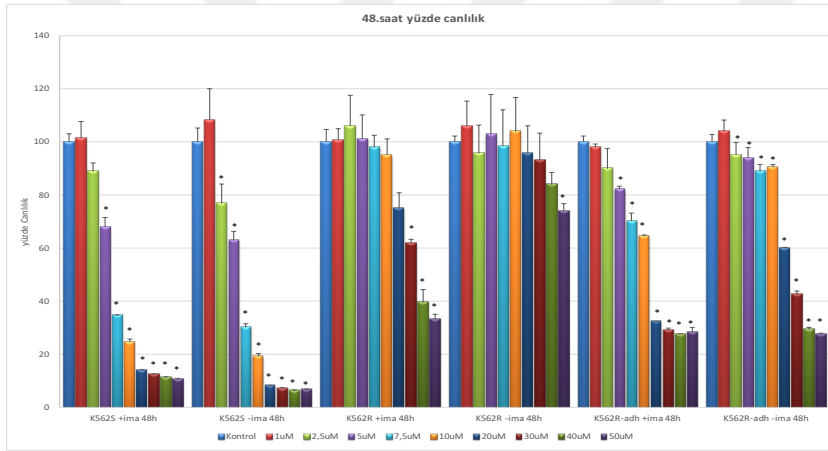
Gamitrinib 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 20, 30, 40, 50 μ M doz aralığında tek başına ve İmatinib ile kombine şekilde K562S, K562R ve K562R-adh hücrelerine uygulanıp, canlılık üzerindeki etkisi 24, 48 ve 72. saatlerde araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre K562S hücreleri için 10 μ M gamitrinib etkili bulunurken, K562R ve K562R-adh hücreleri için 50 μ M Gamitrinib etkili doz olarak belirlenmiştir. Gamitrinib'in tek başına ve İmatinib ile (K562S hücreleri için 0.2 μ M İmatinib, K562R ve K562R-adh hücreleri İmatinibe dirençli olduklarından Gamitrinib ile kombine uygulandığında 5 μ M İmatinib kullanılmıştır) kombine uygulandığında ilaçların etkilerinin gözlemlendiği en etkin saatin 48. saat olduğu belirlenmiştir. Yapılan bütün deneylerde;

K562S hücrelerine 0.2 μ M İmatinib ve 10 μ M Gamitrinib, K562R ve K562R-adh hücrelerinde ise 5 μ M İmatinib, 50 μ M Gamitrinib optimum dozlar olarak belirlenmiş ve bu dozlar kullanılmıştır (Şekil 3.14).

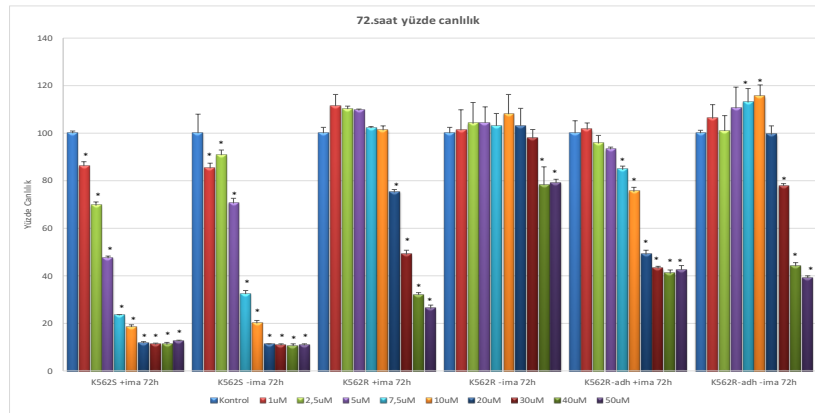
A)



B)



C)



Şekil 3.14. Gamitrinib'in K562S, K562R ve K562R-adh hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi A)24.saat, B)48.saat ve C)72.saat

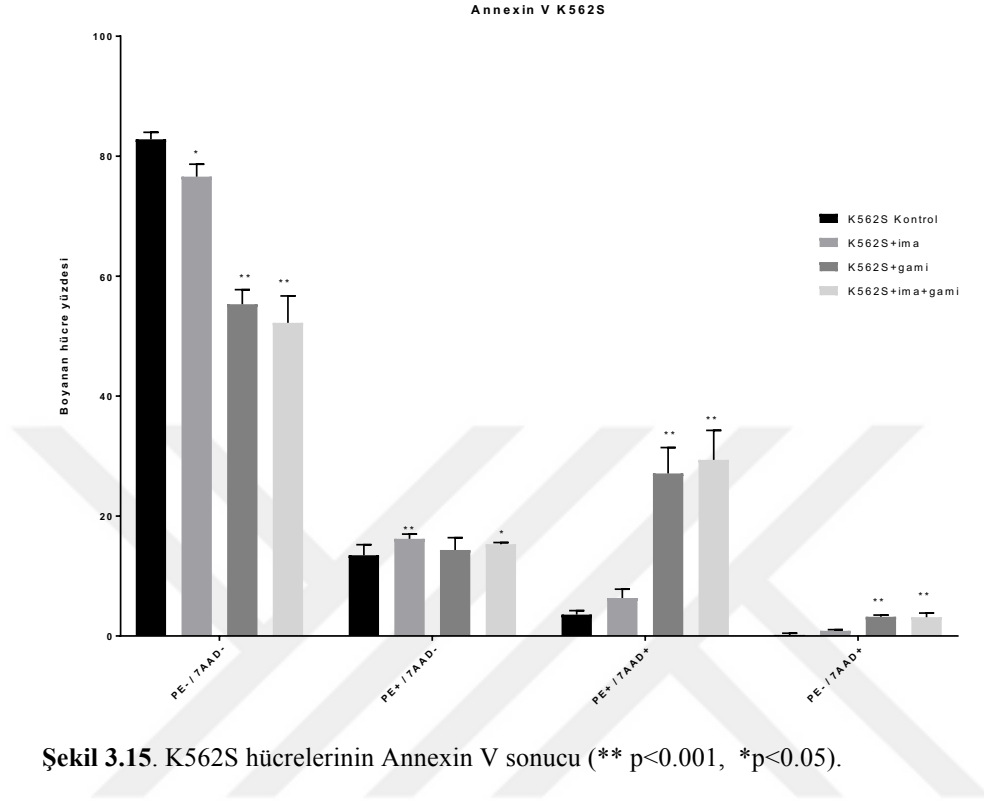
3.3. Gamitrinib Uygulanan K562S, K562R ve K562R-adh Hücrelerinde Annexin V-PE ve 7AAD ile Apoptoz Tayini

K562S hücrelerinin canlılığı (PE-/7AAD-), kontrol grubunda $82.81 \pm 0.47655\%$ iken, $0.2 \mu\text{M}$ İmatinib, $10 \mu\text{M}$ Gamitrinib ve $0.2 \mu\text{M}$ İmatinib+ $10 \mu\text{M}$ Gamitrinib kombine olarak uygulandığında canlılık oranı sırasıyla $76.59 \pm 0.83\%$, $55.33 \pm 0.97\%$, $52.21 \pm 1.80\%$ olarak belirlenmiş ve istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma göstermiştir.

K562S hücrelerinde erken apoptoz (PE+/7AAD-), kontrol grubunda $13.45 \pm 0.71\%$ iken, $0.2 \mu\text{M}$ İmatinib, $10 \mu\text{M}$ Gamitrinib ve $0.2 \mu\text{M}$ İmatinib+ $10 \mu\text{M}$ Gamitrinib kombine olarak uygulandığında, erken apoptoz oranları sırasıyla $16.21 \pm 0.31\%$, $14.35 \pm 0.82\%$, $15.29 \pm 0.11\%$ olarak hesaplanmıştır ve istatistiksel olarak anlamlı derecede artış göstermiştir (Şekil 3.15).

K562S hücrelerinde geç apoptoz (PE+/7AAD+), kontrol grubunda $3.56 \pm 0.27404\%$ iken, $0.2 \mu\text{M}$ İmatinib, $10 \mu\text{M}$ Gamitrinib ve $0.2 \mu\text{M}$ İmatinib+ $10 \mu\text{M}$ Gamitrinib kombine olarak uygulandığında, geç apoptoz oranı sırasıyla $6.33 \pm 0.59\%$, $27.10 \pm 1.73\%$, $29.36 \pm 1.97\%$ olarak saptanmıştır ve istatistiksel olarak anlamlı derecede artma göstermiştir (Şekil 3.15).

K562S hücrelerinin nekroz (PE-/7AAD+), kontrol grubunda $0.17 \pm 0.12\%$ iken, $0.2 \mu\text{M}$ İmatinib, $10 \mu\text{M}$ Gamitrinib ve $0.2 \mu\text{M}$ İmatinib+ $10 \mu\text{M}$ Gamitrinib kombine olarak uygulandığında, geç apoptoz oranı sırasıyla $0.86 \pm 0.07\%$, $3.21 \pm 0.11\%$, $3.13 \pm 0.27\%$ olarak bulunmuştur ve istatistiksel olarak anlamlı derecede artma göstermiştir. (Şekil 3.15 ve Şekil 3.18).



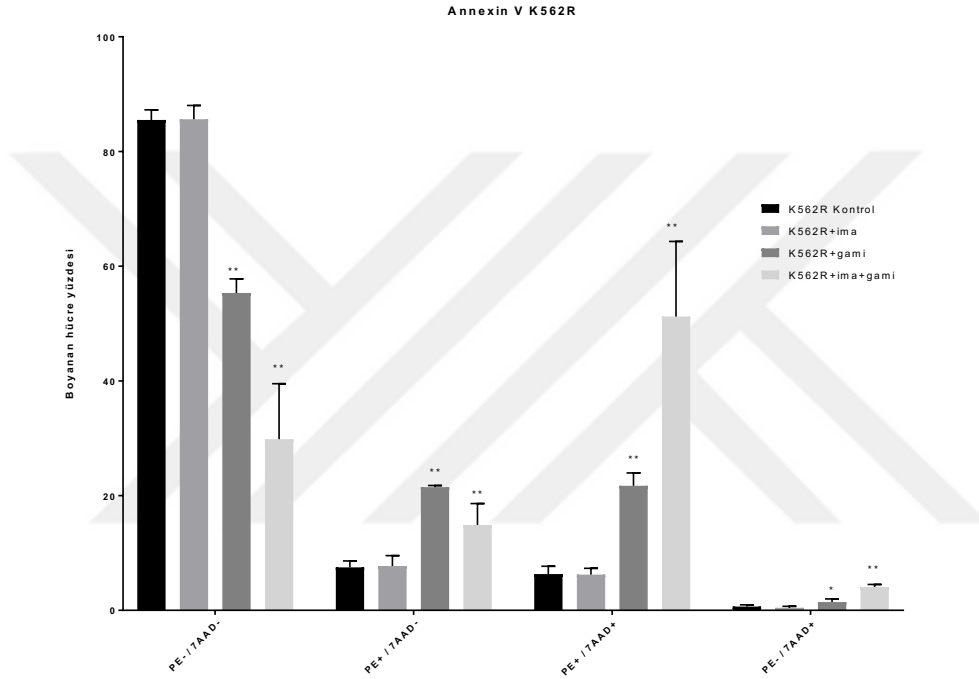
Şekil 3.15. K562S hücrelerinin Annexin V sonucu (** p<0.001, *p<0.05).

K562R hücrelerinin canlılığı (PE-/7AAD-), kontrol grubunda $85.5 \pm 0.7\%$ iken, 0.2 μM İmatinib, 10 μM Gamitrinib ve 0.2 μM İmatinib+10 μM Gamitrinib kombine olarak uygulandığında canlılık oranı sırasıyla $85.61 \pm 0.97\%$, $55.34 \pm 0.98\%$, $29.85 \pm 3.89\%$ istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma göstermiştir (Şekil 3.16).

K562R hücrelerinin erken apoptoz (PE+/7AAD-), kontrol grubunda $7.5 \pm 0.45\%$ iken, 0.2 μM İmatinib, 10 μM Gamitrinib ve 0.2 μM İmatinib+10 μM Gamitrinib kombine olarak uygulandığında, erken apoptoz oranı sırasıyla $7.73 \pm 0.72\%$, $21.48 \pm 0.11\%$, $14.87 \pm 1.51\%$ olarak istatistiksel olarak anlamlı derecede artma göstermiştir (Şekil 3.16).

K562R hücrelerinin geç apoptoz (PE+/7AAD+), kontrol grubunda $6.33 \pm 0.53\%$ iken, 0.2 μM İmatinib, 10 μM Gamitrinib ve 0.2 μM İmatinib+10 μM Gamitrinib kombine olarak uygulandığında, geç apoptoz oranı sırasıyla $6.22 \pm 0.44\%$, $21.71 \pm 0.9\%$, $51.22 \pm 5.26\%$ olarak istatistiksel olarak anlamlı derecede artma göstermiştir (Şekil 3.16).

K562R hücrelerinin nekroz (PE-/7AAD+), kontrol grubunda $0.66 \pm 0.12\%$ iken, $0.2 \mu\text{M}$ İmatinib, $10 \mu\text{M}$ Gamitrinib ve $0.2 \mu\text{M}$ İmatinib+ $10 \mu\text{M}$ Gamitrinib kombine olarak uygulandığında, geç apoptoz oranı sırasıyla $0.43 \pm 0.11\%$, $1.45 \pm 0.21 \%$, $4.06 \pm 0.18 \%$ olarak istatistiksel olarak anlamlı derecede artma göstermiştir (Şekil 3.16 ve Şekil 3.18).



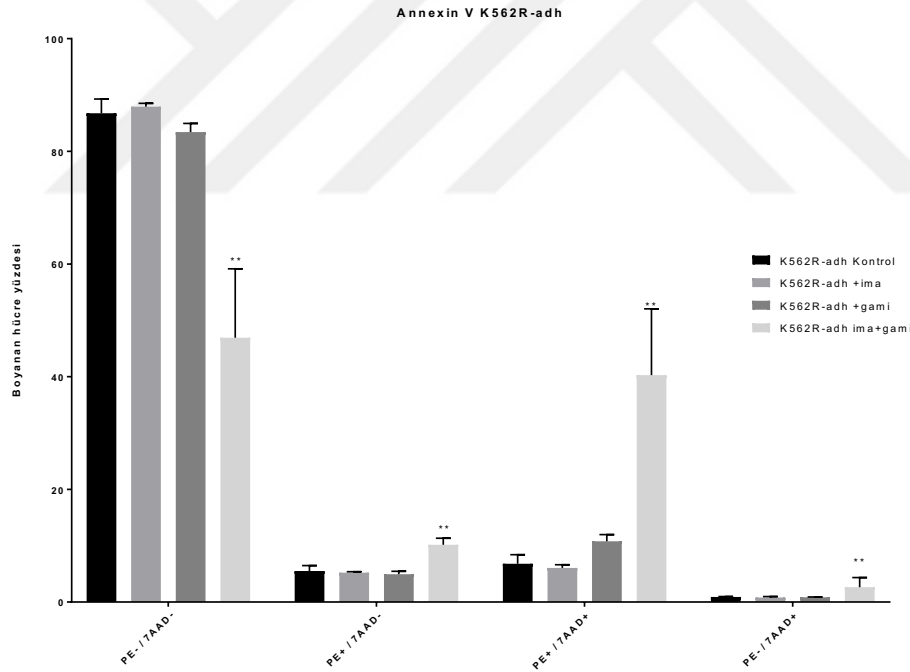
Şekil 3.16. K562R hücrelerinin Annexin V sonucu (** p<0.001, *p<0.05).

K562R-adh hücrelerinin canlılığı (PE-/7AAD-), kontrol grubunda $86.76 \pm 1.01 \%$ iken, $0.2 \mu\text{M}$ İmatinib, $10 \mu\text{M}$ Gamitrinib ve $0.2 \mu\text{M}$ İmatinib+ $10 \mu\text{M}$ Gamitrinib kombine olarak uygulandığında canlılık oranı sırasıyla $87.92 \pm 0.24\%$, $83.41 \pm 0.62\%$, $46.91 \pm 4.92\%$ istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma göstermiştir (Şekil 3.17).

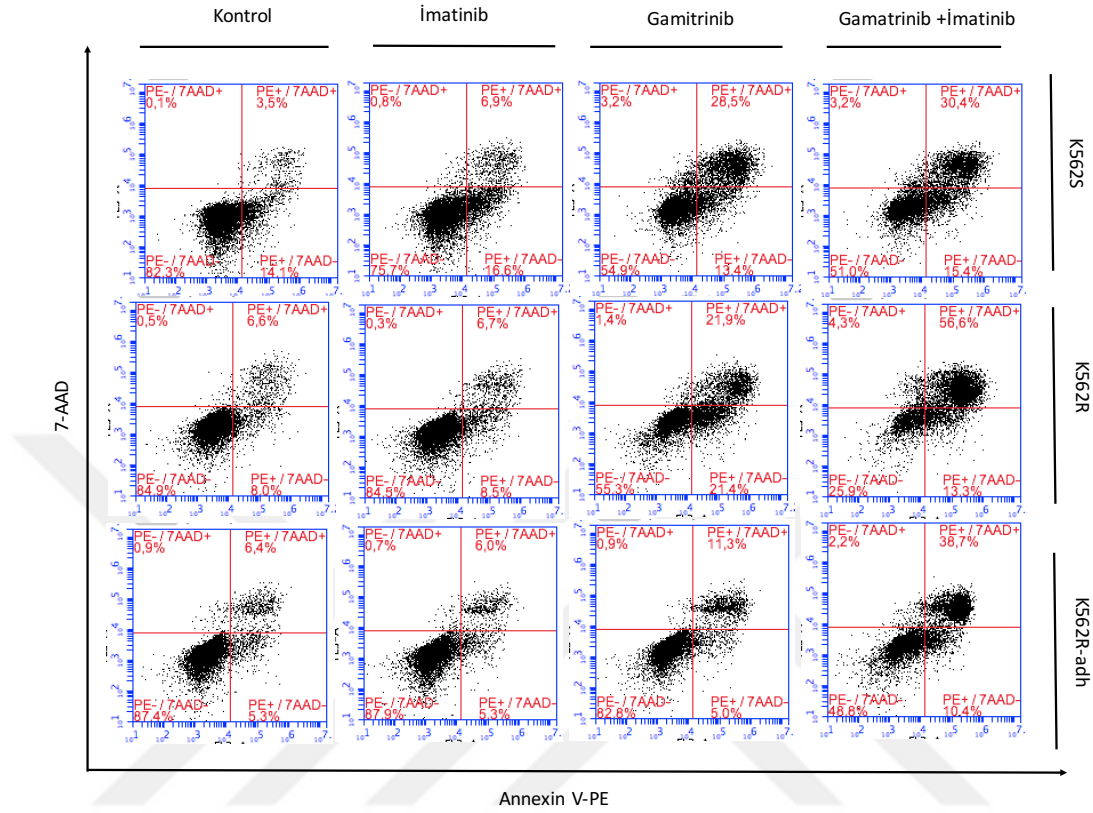
K562R-adh hücrelerinin erken apoptoz (PE+/7AAD-), kontrol grubunda $5.52 \pm 0.38\%$ iken, $0.2 \mu\text{M}$ İmatinib, $10 \mu\text{M}$ Gamitrinib ve $0.2 \mu\text{M}$ İmatinib+ $10 \mu\text{M}$ Gamitrinib kombine olarak uygulandığında, erken apoptoz oranı sırasıyla $5.22 \pm 0.62\%$, $4.93 \pm 0.21\%$, $10.16 \pm 0.47\%$ olarak istatistiksel olarak anlamlı derecede artma göstermiştir (Şekil 3.17).

K562R-adh hücrelerinin geç apoptoz (PE+/7AAD+), kontrol grubunda $6.8 \pm 0.64\%$ iken, $0.2 \mu\text{M}$ İmatinib, $10 \mu\text{M}$ Gamitrinib ve $0.2 \mu\text{M}$ İmatinib+ $10 \mu\text{M}$ Gamitrinib kombine olarak uygulandığında, geç apoptoz oranı sırasıyla $6.05 \pm 0.23\%$, $10.78 \pm 0.47\%$, $40.28 \pm 4.7\%$ olarak istatistiksel olarak anlamlı derecede artma göstermiştir (Şekil 3.17).

K562R-adh hücrelerinin nekroz (PE-/7AAD+), kontrol grubunda $0.9 \pm 0.3\%$ iken, $0.2 \mu\text{M}$ İmatinib, $10 \mu\text{M}$ Gamitrinib ve $0.2 \mu\text{M}$ İmatinib+ $10 \mu\text{M}$ Gamitrinib kombine olarak uygulandığında, geç apoptoz oranı sırasıyla $0.8 \pm 0.7\%$, $0.86 \pm 0.15\%$, $2.63 \pm 0.69\%$ olarak istatistiksel olarak anlamlı derecede artma göstermiştir (Şekil 3.17 ve Şekil 3.18).



Şekil 3.17. K562R-adh hücrelerinin annexin V sonucu (** p<0.001, *p<0.05).



Şekil 3.18. Gamitrinib uygulanan K562S, K562R ve K562R-adh hücrelerinin Annexin V sonucu

3.4. Gamitrinib Uygulanan K562S, K562R ve K562R-adh Hücrelerinde Kaspaz Aktivitesi Analizi.

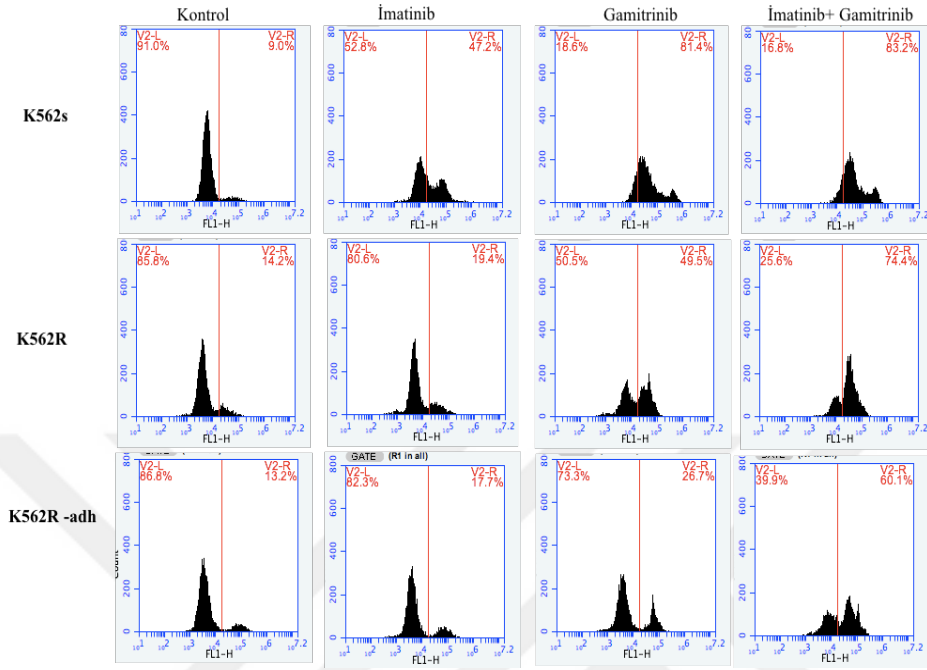
Gamitrinib'in apoptotik etkisini belirlemek için, diğer bir apoptoz belirteci olan kaspaz 3/7 aktivasyon tayini yapıldı ve sonuçlar Şekil 3.19 ve Şekil 3.20 te gösterilmiştir.

Kaspaz aktivitesi total floresan değerleri ile gösterilmiştir. Total floresan miktarı sırayla kontrol K562S'de 11546.72 ± 310.5 , 0.2 μM İmatinib uygulanan K562S hücrelerinde 38797.56 ± 2688.63 , 10 μM Gamitrinib uygulanan K562S hücrelerinde ise 74927.72 ± 6939.12 ve kombine olarak 0.2 μM İmatinib ve 10 μM Gamitrinib uygulanan

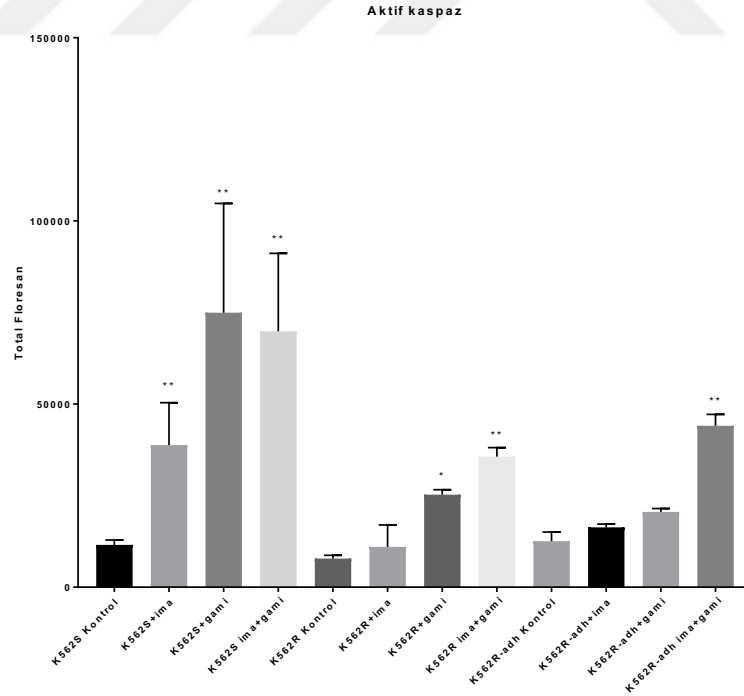
hücrelerde 69862.75 ± 4942.37 saptanmıştır. Bütün gruptaki kaspaz aktivitesi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur $p<0.001$ (Şekil 3.20).

K562R hücrelerinde, total floresan miktarı kontrol grubunda 7812.01 ± 205.38 , 5 μM İmatinib uygulanan hücrelerde 11010.69 ± 1388.64 , 50 μM Gamitrinib uygulanan hücrelerde 25261.63 ± 316.05 ve kombine olarak 5 μM İmatinib ve 50 μM Gamitrinib uygulanan hücrelerde ise bu değer 35667.28 ± 566.94 bulunmuştur. Kaspaz aktivitesi Gamitrinib'in tek başına uygulandığı hücrelerde kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı artış göstermiştir $p<0.05$. Buna ilaveten Gamitrinib ve İmatinib'in kombine olarak uygulandığı hücrelerdeki kaspaz aktivitesi, kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur $p<0.001$ (Şekil 3.20).

K562R-adh hücrelerinde, kontrol, 5 μM İmatinib uygulanan K562R-adh, 50 μM Gamitrinib uygulanan K562R-adh ve kombine olarak 5 μM İmatinib ve 50 μM Gamitrinib uygulanan hücrelerde total floresan miktarı sırasıyla 12556.32 ± 575.51 , 16342.72 ± 209.98 , 20533.44 ± 218.11 ve 44060.87 ± 719.71 olarak saptanmıştır. Gamitrinib ve İmatinib'in kombine olarak uygulandığı hücrelerdeki kaspaz aktivitesi, kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur $p<0.001$ (Şekil 3.20).



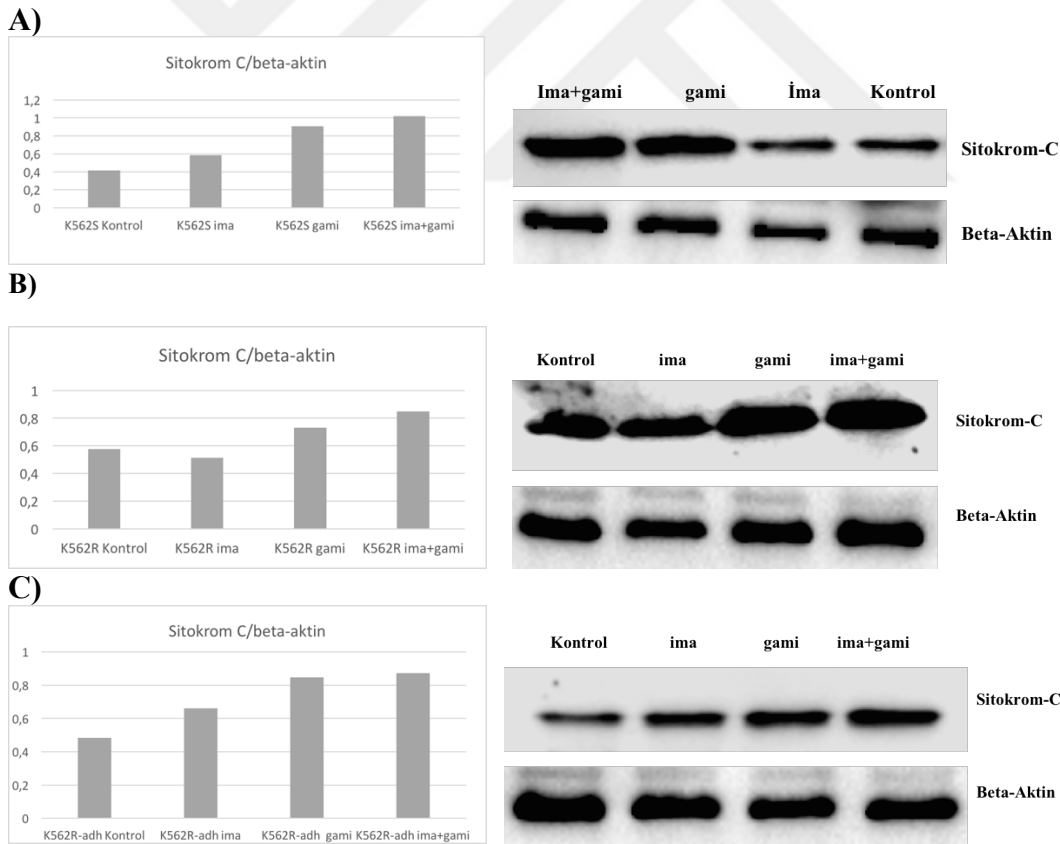
Şekil 3.19. Gamitrinib uygulanan K562S, K562R ve K562R-adh hücrelerinde kaspaz aktivitesi sonuçları



Şekil 3.20. Gamitrinib uygulanan K562S, K562R ve K562R-adh hücrelerinde kaspaz aktivitesi tayini bar grafiği

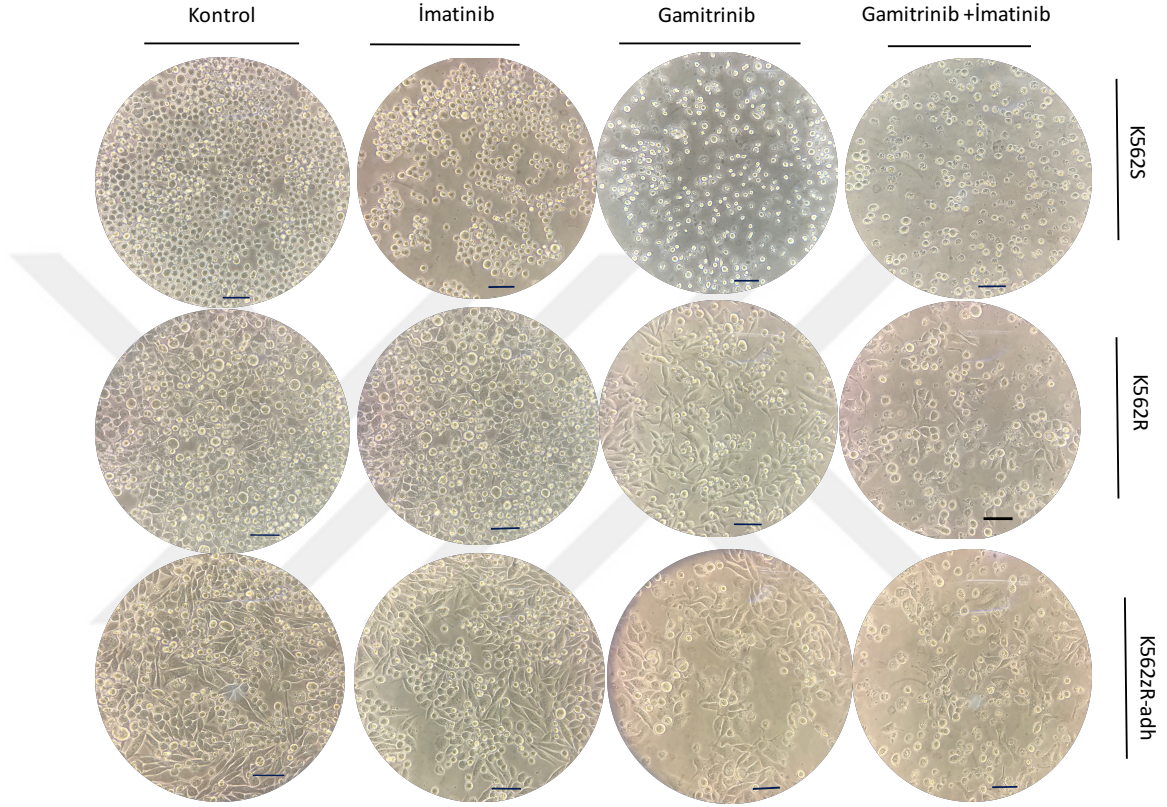
3.5. Gamitrinib Uygulanan K562S, K562R ve K562R-adh Hücrelerinde Sitoplazmik Sitokrom C Salınım Analizi

Gamitrinib aracılıklı apoptozun indüklenmesinin diğer bir belirtici olan **sitokrom C**'nin sitoplazmaya salınımı, protein seviyesinde western blot tekniğiyle bakıldı, elde edilen sonuçlara göre, her 3 hücre serisinde İmatinib ve Gamitrinib tek başına uygulandığında sitokrom C artışı gözlenmiş, özellikle İmatinib ve Gamitrinib kombine uygulandığında apoptoz belirtici olarak en yüksek sitokrom C salınımı gösterilmiştir, tüm bu sonuçlar Şekil 3.21 de gösterilmiştir.



Şekil 3.21. A) K562S, B) K562R ve C) K562R-adh hücrelerine İmatinib, Gamitrinib ve kombinasyon olarak uygulanması sonucundaki mitokondrilerinden salınan sitoplazmik sitokrom C western sonuçları.

✓ İlaç (İmatinib, Gamitrinib ve kombine İmatinib ve Gamitrinib) uygulamaları sonucunda indüklenen apoptozun hücrelerdeki morfolojik değişikliklerini izlemek amacıyla ışık mikroskopunda hücreler fotoğraflanmıştır (Şekil 3.22).



Şekil 3.22. K562S, K562R ve K562R-adh hücrelerine İmatinib, Gamitrinib ve kombinasyon olarak uygulanması sonucundaki ışık mikroskopi görüntüleri (40x)

3.6. Apoptotik Genlerin Analizi

Gamitrinib'in apoptoz, otofaji, ER-stress, metabolizma, kök hücre ve ilaç taşınmasından sorumlu genlerin mRNA ifadeleri üzerindeki etkisini araştırmak amacı ile qRT-PCR ile gen ifadeleri araştırılmıştır.

Tüm genlerin ifadelerindeki değişim, her hücre tipindeki ilaç uygulanan hücre gruplarının kendi gruplarındaki ilaç uygulanmayan kontrol gruplarına kıyaslanarak hesaplanmıştır.

Apoptoz yolağındaki pro-apoptotik (BAX, BIM, BAD) ve anti-apoptotik (BCL-2, BCL-XL) genlerinin ifadeleri Şekil 3.23 gösterilmiştir.

3.6.1. BAX Gen İfadesi

0.2 μ M İmatinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadesi K562S kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 1.08 ± 0.16 kat bulunurken, 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S ve kombine 0.2 μ M İmatinib ve 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 3.09 ± 0.03 ve 11.07 ± 1.46 kat artmıştır (Şekil 3.23A).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadesi K562R kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 1.16 ± 0.11 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 0.98 ± 0.02 ve 2.08 ± 0.13 kat olarak saptanmıştır (Şekil 3.23B).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R-adh hücrelerindeki gen ifadesi K562R-adh kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 2.4 ± 0.27 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 3.69 ± 0.14 ve 1.80 ± 0.12 kat artış göstermiştir (Şekil 3.23C).

K562R ve K562R-adh hücrelerinin kontrol gruplarındaki BAX genin ifadesi K562S hücrelerin kontrol grubu ile kıyaslandığında sırayla 1.31 ± 0.15 ve 0.97 ± 0.09 kat olarak saptanmışken, K562R-adh hücrelerindeki kontrol grubu K562R hücrelerinin kontrol grubuyla kıyaslandığında 0.74 ± 0.02 kat bulunmuştur (Şekil 3.23D).

3.6.2. BCL-2 Gen İfadesi

0.2 μ M İmatinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadesi K562S kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 0.58 ± 0.15 kat bulunurken, 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S ve kombine 0.2 μ M İmatinib ve 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 0.53 ± 0.51 ve 2.74 ± 0.32 kat olarak bulunmuştur (Şekil 3.23A).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadesi K562R kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 0.93 ± 0.13 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 0.39 ± 0.09 ve 0.05 ± 0.01 kat azalmıştır (Şekil 3.23B).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R-adh hücrelerindeki gen ifadesi K562R-adh kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 1.5 ± 0.07 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 2.2 ± 0.16 ve 0.48 ± 0.02 kat değişimi göstermiştir (Şekil 3.23C).

K562R ve K562R-adh hücrelerinin kontrol gruplarındaki BCL-2 genin ifadesi K562S hücrelerin kontrol grubu ile kıyaslandığında sırayla 12 ± 3.13 ve 10.74 ± 1.69 kat olarak saptanmışken, K562R-adh hücrelerindeki kontrol grubu K562R hücrelerinin kontrol grubuyla kıyaslandığında 0.91 ± 0.08 kat bulunmuştur (Şekil 3.23D).

3.6.3. BCL- XL Gen İfadesi

0.2 μ M İmatinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadesi K562S kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 0.45 ± 0.02 kat bulunurken, 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S ve kombine 0.2 μ M İmatinib ve 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 1.98 ± 0.11 ve 1.21 ± 0.16 kat olarak bulunmuştur (Şekil 3.23A).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadesi K562R kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 0.54 ± 0.054 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 0.28 ± 0.01 ve 0.15 ± 0.01 kat azalmıştır (Şekil 3.23B).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R-adh hücrelerindeki gen ifadesi K562R-adh kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 1.07 ± 0.13 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 0.82 ± 0.03 ve 0.21 ± 0.02 kat değişimi göstermiştir (Şekil 3.23C).

K562R ve K562R-adh hücrelerinin kontrol gruplarındaki BCL- XL genin ifadesi K562S hücrelerin kontrol grubu ile kıyaslandığında sırayla 2.61 ± 0.17 ve 3.57 ± 0.55 kat olarak saptanmışken, K562R-adh hücrelerindeki kontrol grubu K562R hücrelerinin kontrol grubuyla kıyaslandığında 1.36 ± 0.21 kat bulunmuştur (Şekil 3.23D).

3.6.4. BAD Gen İfadesi

0.2 μ M İmatinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadesi K562S kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 1.5 ± 0.11 kat bulunurken, 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S ve kombine 0.2 μ M İmatinib ve 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 4.04 ± 0.47 ve 4.58 ± 1.084 kat artış göstermiştir (Şekil 3.21A).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadesi K562R kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 1.13 ± 0.12 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 1.27 ± 0.10 ve 3.05 ± 0.30 kat artmıştır (Şekil 3.23B).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R-adh hücrelerindeki gen ifadesi K562R-adh kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 1.43 ± 0.09 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 0.85 ± 0.05 ve 1.15 ± 0.11 kat değişimi göstermiştir (Şekil 3.23C).

K562R ve K562R-adh hücrelerinin kontrol gruplarındaki BAD genin ifadesi K562S hücrelerin kontrol grubu ile kıyaslandığında sırayla 1.78 ± 0.19 ve 2.41 ± 0.24 kat olarak saptanmışken, K562R-adh hücrelerindeki kontrol grubu K562R hücrelerinin kontrol grubuyla kıyaslandığında 1.35 ± 0.02 kat bulunmuştur (Şekil 3.23D).

3.6.5. BIM Gen İfadesi

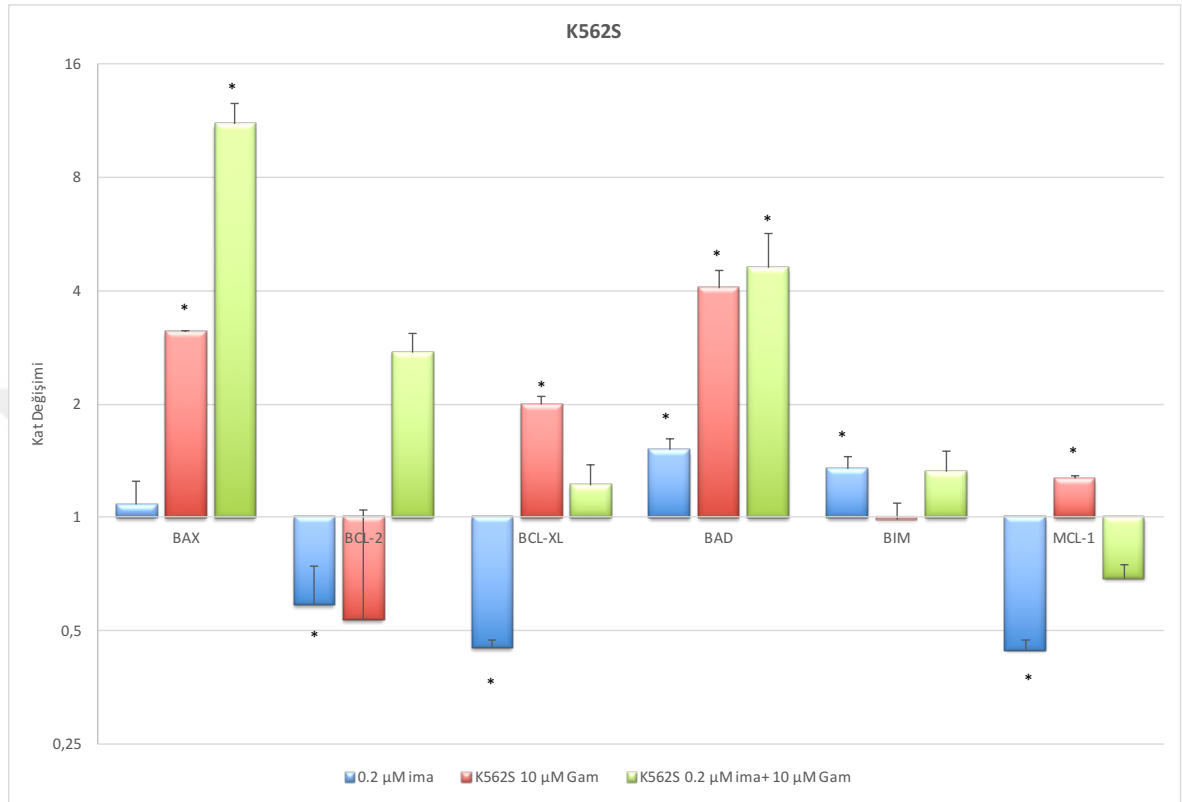
0.2 μ M İmatinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadesi K562S kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 1.34 ± 0.10 kat bulunurken, 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S ve kombine 0.2 μ M İmatinib ve 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 0.98 ± 0.09 ve 1.32 ± 0.17 kat değişimi bulunmuştur (Şekil 3.23A).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadesi K562R kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 1.46 ± 0.16 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 0.91 ± 0.07 ve 1.26 ± 0.14 kat değişimi göstermiştir (Şekil 3.23B).

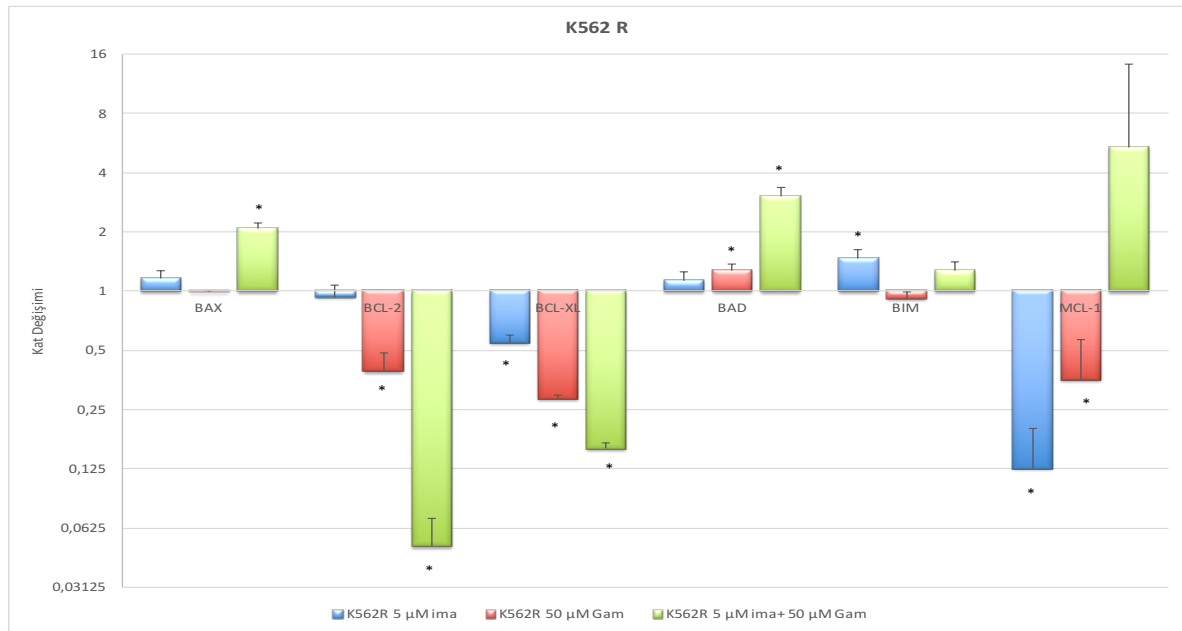
5 μ M İmatinib uygulanan K562R-adh hücrelerindeki gen ifadesi K562R-adh kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 2.11 ± 0.12 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 0.70 ± 0.05 ve 1.13 ± 0.06 kat değişimi göstermiştir (Şekil 3.23C).

K562R ve K562R-adh hücrelerinin kontrol gruplarındaki BIM genin ifadesi K562S hücrelerin kontrol grubu ile kıyaslandığında sırayla 0.79 ± 0.07 ve 0.95 ± 0.06 kat olarak saptanmışken, K562R-adh hücrelerindeki kontrol grubu K562R hücrelerinin kontrol grubuyla kıyaslandığında 1.2 ± 0.1 kat bulunmuştur (Şekil 3.23D).

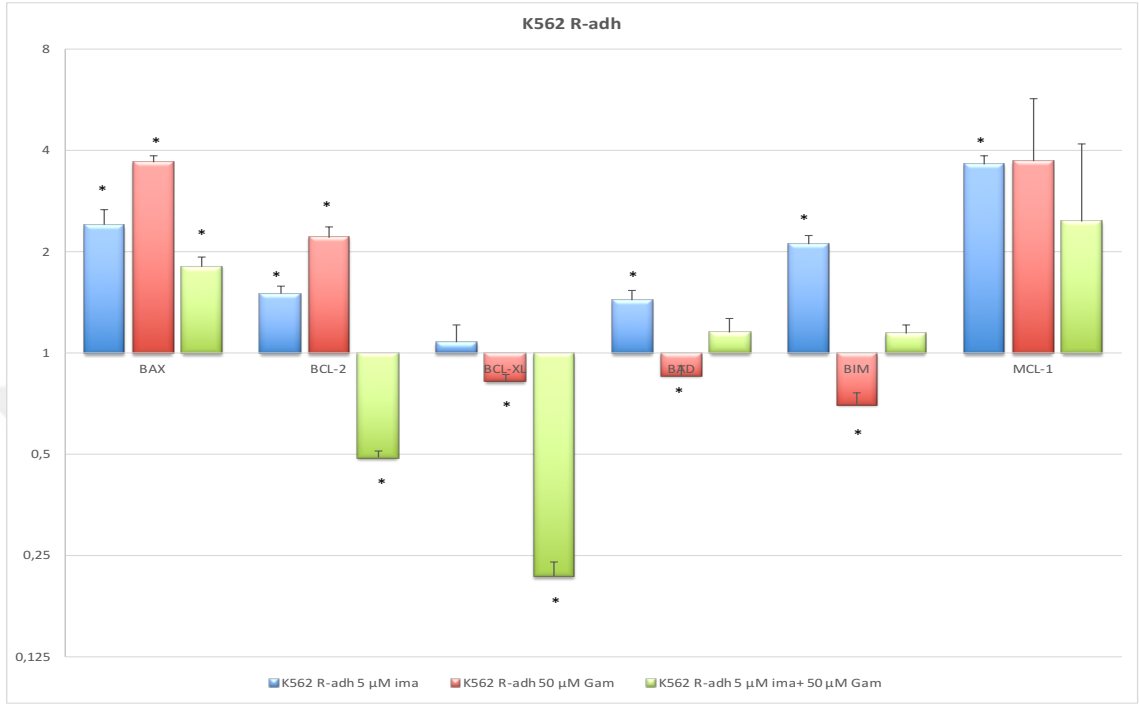
A)



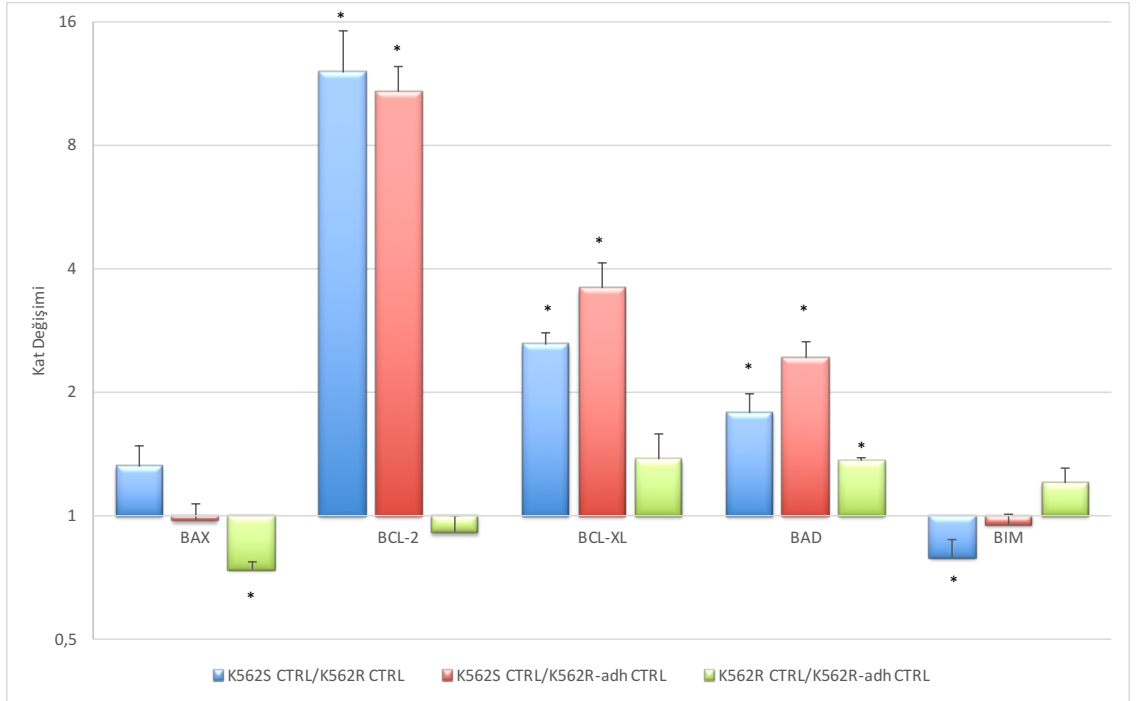
B)



C)



D)



Şekil 3.23. A) K562S, B) K562R, C) K562R-adh D) Kontrol grubu hücrelerde apoptotik genlerin ifadesi

3.7. ER Stres Yolağındaki Genlerin İfadeleri

Gamitrinib'in er stresi yolağındaki genlerin ifadesini ne yönde etkilediğini belirlemek amaçlı GRP78, CHOP, IRE-1, ATF6 ve PERK genlerinin ifadesine bakılmıştır.

3.7.1. GRP 78 Gen İfadesi

0.2 μ M İmatinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadesi K562S kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 0.18 ± 0.01 kat bulunurken, 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S ve kombine 0.2 μ M İmatinib ve 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 1.14 ± 0.03 ve 0.66 ± 0.05 kat değişimi göstermiştir (Şekil 3.24A).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadesi K562R kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 1.87 ± 0.03 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 3.39 ± 0.36 ve 1.81 ± 0.09 kat olarak saptanmıştır (Şekil 3.24B).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R-adh hücrelerindeki gen ifadesi K562R-adh kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 0.92 ± 0.06 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 1.71 ± 0.1 ve 0.85 ± 0.05 kat değişim göstermiştir (Şekil 3.24C).

K562R ve K562R-adh hücrelerinin kontrol gruplarındaki GRP 78 genin ifadesi K562S hücrelerin kontrol grubu ile kıyaslandığında sırayla 0.34 ± 0.01 ve 0.63 ± 0.02 kat olarak saptanmışken, K562R-adh hücrelerindeki kontrol grubu K562R hücrelerinin kontrol grubuyla kıyaslandığında 1.83 ± 0.11 kat bulunmuştur (Şekil 3.24D).

3.7.2. CHOP Gen İfadesi

0.2 μ M İmatinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadesi K562S kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 0.29 ± 0.01 kat bulunurken, 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S ve kombine 0.2 μ M İmatinib ve 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 1.57 ± 0.26 ve 1.71 ± 0.34 kat değişimi göstermiştir (Şekil 3.24A).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadesi K562R kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 0.29 ± 0.03 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 0.65 ± 0.06 ve 0.86 ± 0.18 kat azalmıştır (Şekil 3.24B).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R-adh hücrelerindeki gen ifadesi K562R-adh kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 0.93 ± 0.15 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 1.86 ± 0.36 ve 0.86 ± 0.07 kat değişim göstermiştir (Şekil 3.24C).

K562R ve K562R-adh hücrelerinin kontrol gruplarındaki CHOP genin ifadesi K562S hücrelerin kontrol grubu ile kıyaslandığında sırayla 0.48 ± 0.07 ve 0.58 ± 0.03 kat olarak saptanmışken, K562R-adh hücrelerindeki kontrol grubu K562R hücrelerinin kontrol grubuyla kıyaslandığında 1.22 ± 0.14 kat bulunmuştur (Şekil 3.24D).

3.7.3. IRE-1 Gen İfadesi

0.2 μ M İmatinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadesi K562S kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 0.21 ± 0.01 kat bulunurken, 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S ve kombine 0.2 μ M İmatinib ve 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 2.6 ± 0.06 ve 2.39 ± 0.51 kat değişimi göstermiştir (Şekil 3.24A).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadesi K562R kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 0.77 ± 0.04 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 1.28 ± 0.18 ve 1.25 ± 0.13 kat değişimi göstermiştir (Şekil 3.24B).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R-adh hücrelerindeki gen ifadesi K562R-adh kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 1.20 ± 0.21 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 3.53 ± 0.11 ve 1.09 ± 0.09 kat değişim göstermiştir (Şekil 3.24C).

K562R ve K562R-adh hücrelerinin kontrol gruplarındaki IRE-1 genin ifadesi K562S hücrelerin kontrol grubu ile kıyaslandığında sırayla 0.41 ± 0.01 ve 0.61 ± 0.03 kat olarak saptanmışken, K562R-adh hücrelerindeki kontrol grubu K562R hücrelerinin kontrol grubuyla kıyaslandığında 1.48 ± 0.06 kat bulunmuştur (Şekil 3.24D).

3.7.4. ATF-6 Gen İfadesi

0.2 μ M İmatinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadesi K562S kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 0.4 ± 0.002 kat bulunurken, 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S ve kombine 0.2 μ M İmatinib ve 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 0.85 ± 0.07 ve 1.02 ± 0.15 kat değişimi göstermiştir (Şekil 3.24A).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadesi K562R kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 0.97 ± 0.09 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 1.53 ± 0.39 ve 1.11 ± 0.17 kat değişimi göstermiştir (Şekil 3.24B).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R-adh hücrelerindeki gen ifadesi K562R-adh kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 1.30 ± 0.03 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 2.43 ± 0.23 ve 1.43 ± 0.03 kat artışı göstermiştir (Şekil 3.24C).

K562R ve K562R-adh hücrelerinin kontrol gruplarındaki ATF6 genin ifadesi K562S hücrelerin kontrol grubu ile kıyaslandığında sırayla 0.61 ± 0.05 ve 0.57 ± 0.05 kat olarak saptanmışken, K562R-adh hücrelerindeki kontrol grubu K562R hücrelerinin kontrol grubuyla kıyaslandığında 0.92 ± 0.07 kat bulunmuştur (Şekil 3.24D).

3.7.5. PERK Gen İfadesi

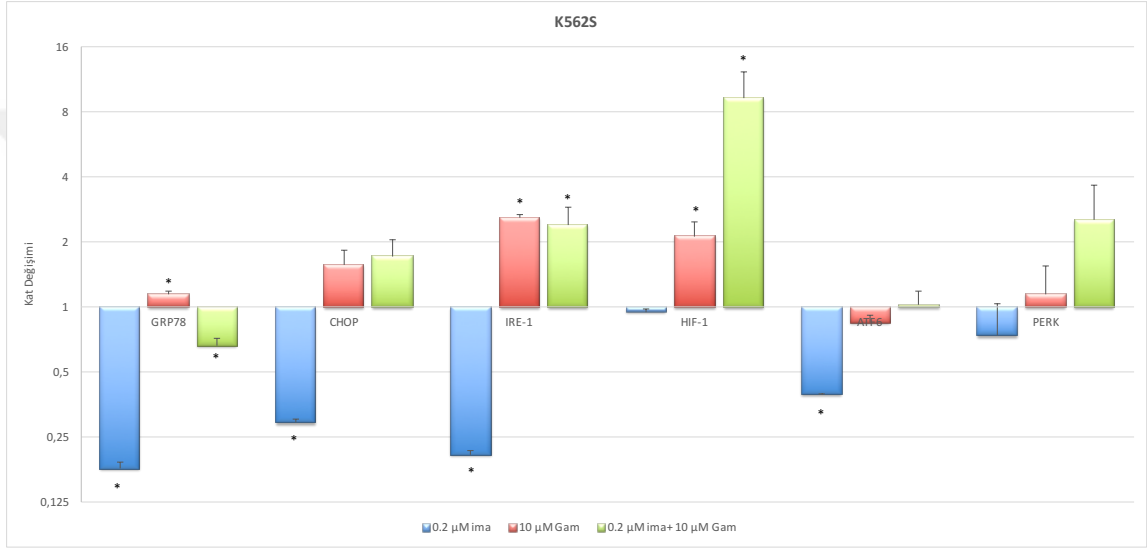
0.2 μ M İmatinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadesi K562S kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 0.74 ± 0.29 kat bulunurken, 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S ve kombine 0.2 μ M İmatinib ve 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 1.15 ± 0.40 ve 2.53 ± 1.13 kat artış göstermiştir (Şekil 3.24A).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadesi K562R kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 1.07 ± 0.15 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 1.31 ± 0.27 ve 1.54 ± 0.26 kat değişimi göstermiştir (Şekil 3.24B).

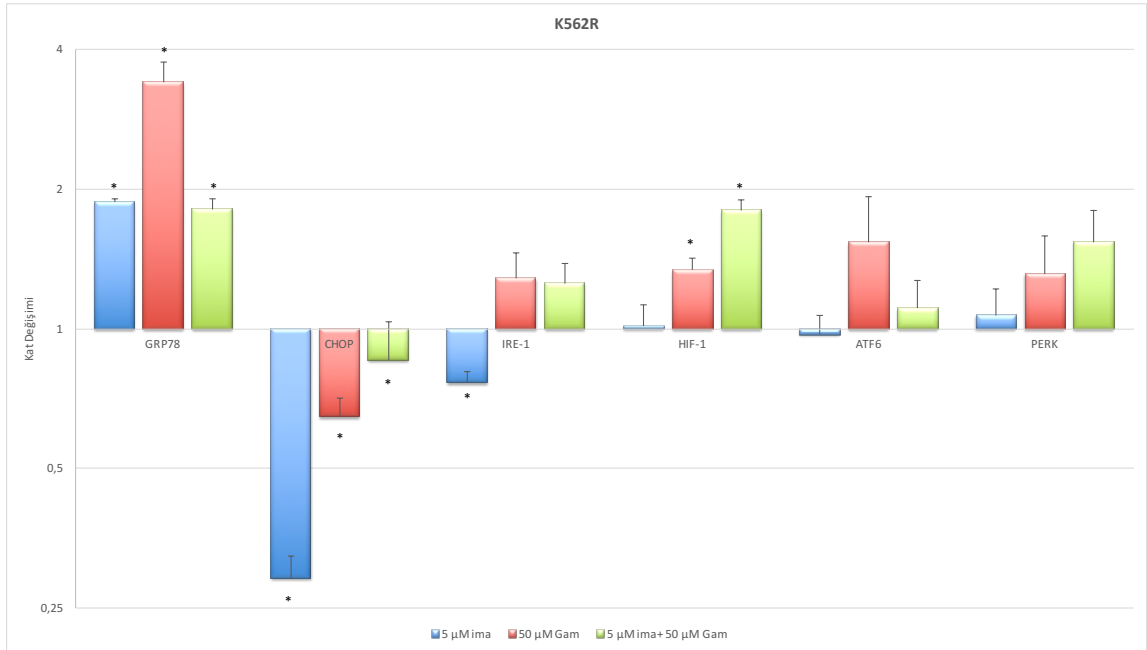
5 μ M İmatinib uygulanan K562R-adh hücrelerindeki gen ifadesi K562R-adh kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 0.93 ± 0.04 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 1.43 ± 0.21 ve 0.92 ± 0.13 kat değişimi göstermiştir (Şekil 3.24C).

K562R ve K562R-adh hücrelerinin kontrol gruplarındaki PERK genin ifadesi K562S hücrelerin kontrol grubu ile kıyaslandığında sırayla 1.13 ± 0.46 ve 1.52 ± 0.40 kat olarak saptanmışken, K562R-adh hücrelerindeki kontrol grubu K562R hücrelerinin kontrol grubuyla kıyaslandığında 1.39 ± 0.21 kat bulunmuştur (Şekil 3.24D).

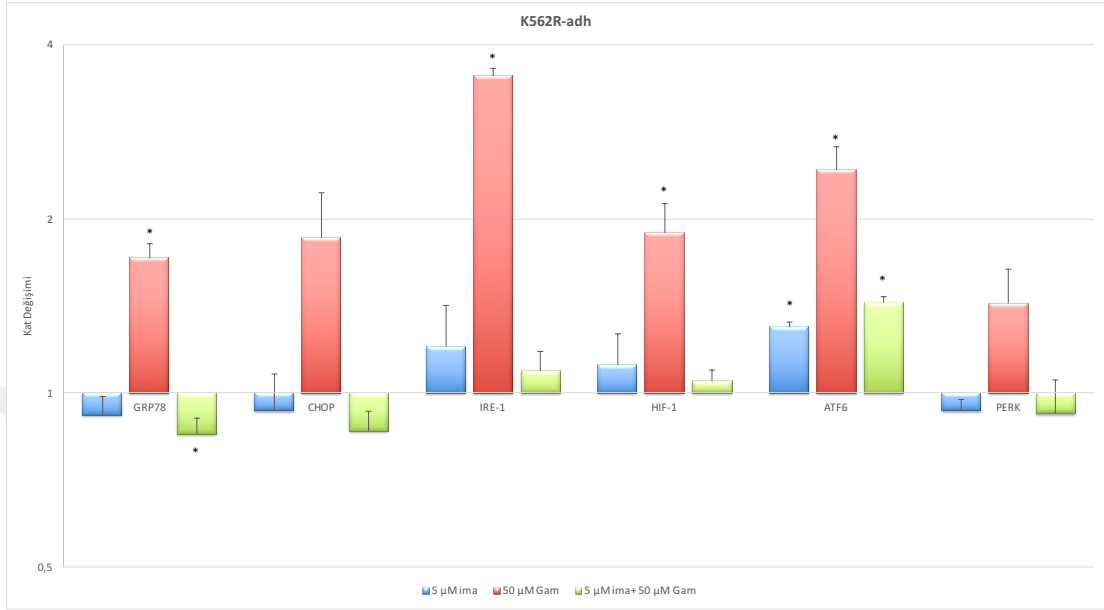
A)



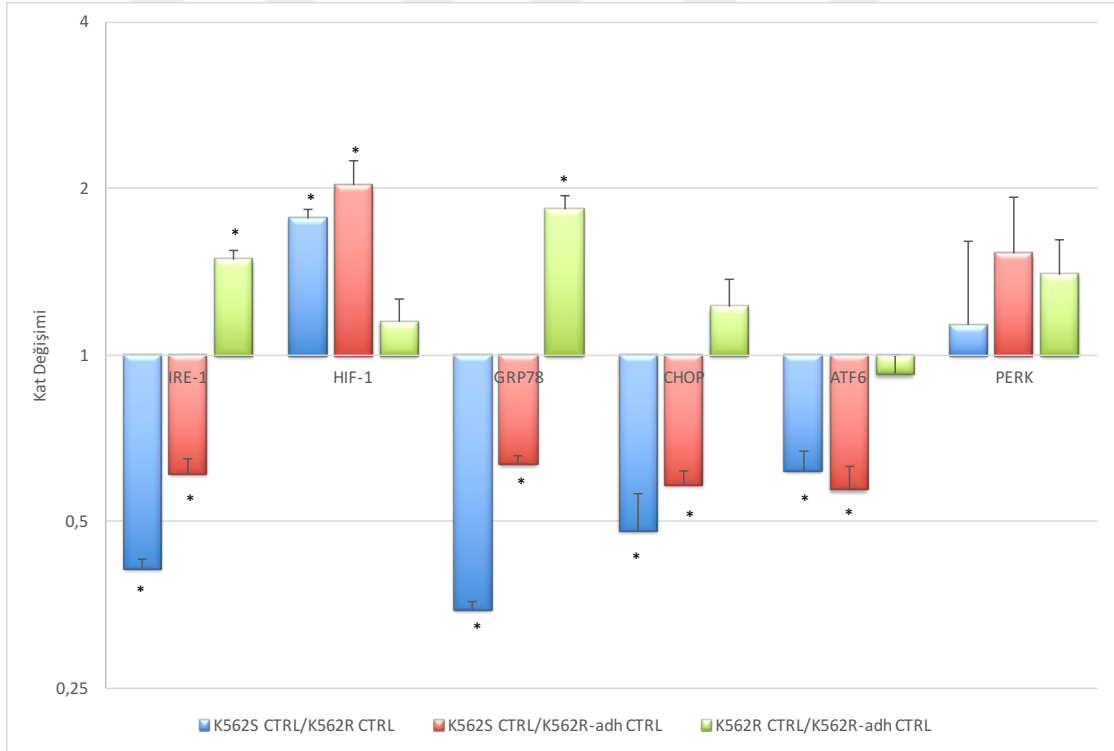
B)



C)



D)



Şekil 3.24. A) K562S, B) K562R, C) K562R-adh, D) Kontrol grubundaki hücrelerde ER stresinden sorumlu genlerin ifadesi.

3.8. Otofajik Gen İfadeleri

Gamitrinib'in otofaji yolağını üzerindeki etkisini araştırmak amacı ile otofajide rol oynayan BECLIN-1, ATG5 ve ATG7 genlerinin mRNA ifade seviyelerine bakılmıştır.

3.8.1. BECLIN-1 Gen İfadesi

0.2 μ M İmatinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadesi K562S kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 0.67 ± 0.07 kat bulunurken, 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S ve kombine 0.2 μ M İmatinib ve 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 2.06 ± 0.13 ve 1.65 ± 0.31 kat değişimi göstermiştir (Şekil 3.25A).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadesi K562R kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 0.98 ± 0.08 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 1.78 ± 0.04 ve 2.04 ± 0.35 kat artışı göstermiştir (Şekil 3.25B).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R-adh hücrelerindeki gen ifadesi K562R-adh kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 0.93 ± 0.09 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 1.12 ± 0.07 ve 1.10 ± 0.06 kat değişimi göstermiştir (Şekil 3.25C).

K562R ve K562R-adh hücrelerinin kontrol gruplarındaki BECLIN1 genin ifadesi K562S hücrelerin kontrol grubu ile kıyaslandığında sırayla 1.24 ± 0.09 ve 2.65 ± 0.11 kat olarak saptanmışken, K562R-adh hücrelerindeki kontrol grubu K562R hücrelerinin kontrol grubuyla kıyaslandığında 2.13 ± 0.19 kat bulunmuştur (Şekil 3.25D).

3.8.2. ATG 5 Gen İfadesi

0.2 μ M İmatinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadesi K562S kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 0.71 ± 0.03 kat bulunurken, 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S ve kombine 0.2 μ M İmatinib ve 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 1.01 ± 0.88 ve 1.11 ± 0.15 kat bulunmuştur (Şekil 3.25A).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadesi K562R kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 1.03 ± 0.10 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 1.30 ± 0.04 ve 1.37 ± 0.08 kat artışı göstermiştir (Şekil 3.25B).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R-adh hücrelerindeki gen ifadesi K562R-adh kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 1.14 ± 0.09 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 1.32 ± 0.12 ve 1.30 ± 0.01 kat değişimi göstermiştir (Şekil 3.25C).

K562R ve K562R-adh hücrelerinin kontrol gruplarındaki ATG5 genin ifadesi K562S hücrelerin kontrol grubu ile kıyaslandığında sırayla 0.69 ± 0.03 ve 0.81 ± 0.05 kat olarak saptanmışken, K562R-adh hücrelerindeki kontrol grubu K562R hücrelerinin kontrol grubuyla kıyaslandığında 1.17 ± 0.02 kat bulunmuştur (Şekil 3.25D).

3.8.3. ATG 7 Gen İfadesi

0.2 μ M İmatinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadesi K562S kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 0.88 ± 0.04 kat bulunurken, 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S ve kombine 0.2 μ M İmatinib ve 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 1.01 ± 0.17 ve 2.29 ± 0.66 kat bulunmuştur (Şekil 3.25A).

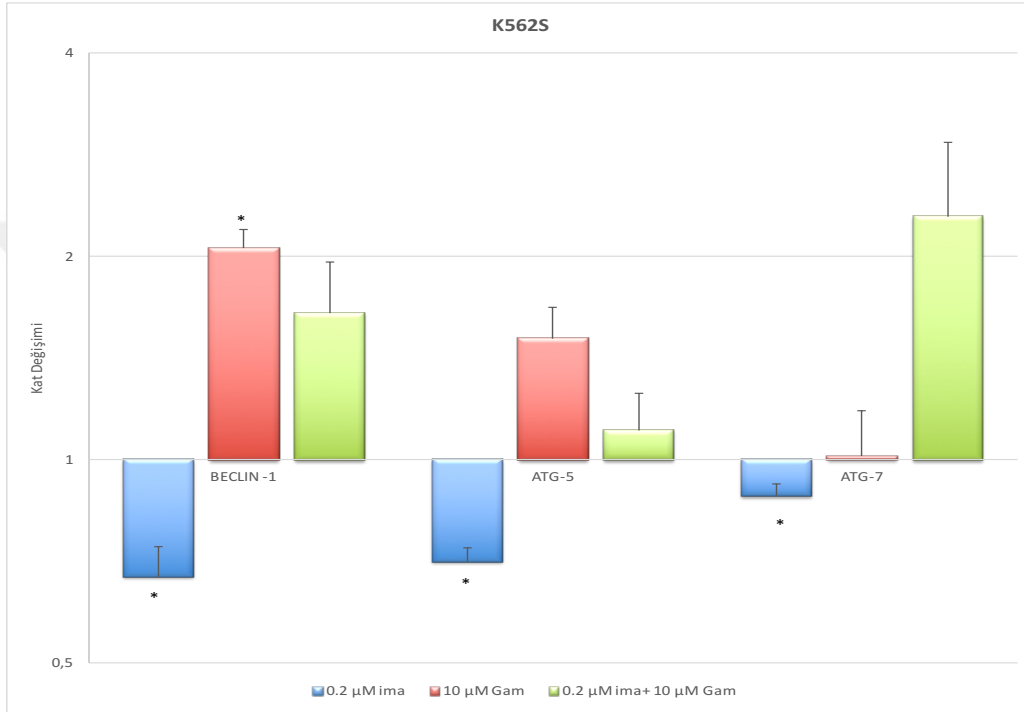
5 μ M İmatinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadesi K562R kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 1.02 ± 0.10 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 1.31 ± 0.06 ve 1.41 ± 0.12 kat olarak bulunmuştur (Şekil 3.25B).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R-adh hücrelerindeki gen ifadesi K562R-adh kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 1.28 ± 0.11 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 1.88 ± 0.10 ve 1.29 ± 0.09 kat değişimi göstermiştir (Şekil 3.25C).

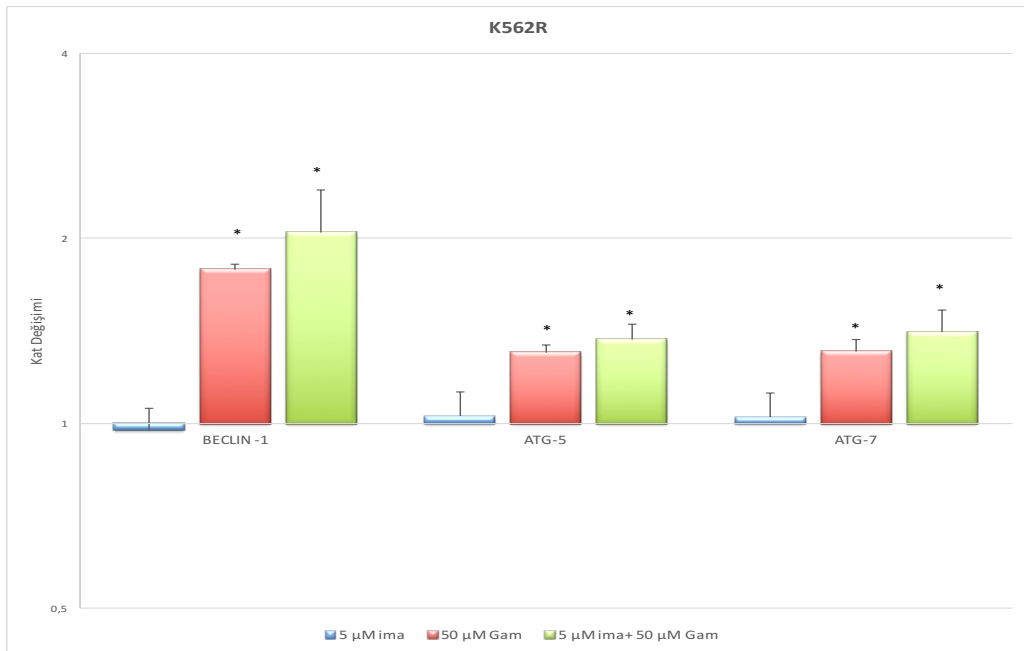
K562R ve K562R-adh hücrelerinin kontrol gruplarındaki ATG7 genin ifadesi K562S hücrelerin kontrol grubu ile kıyaslandığında sırayla 1 ± 0.05 ve 1.53 ± 0.05 kat

olarak saptanmışken, K562R-adh hücrelerindeki kontrol grubu K562R hücrelerinin kontrol grubuyla kıyaslandığında 1.52 ± 0.07 kat bulunmuştur (Şekil 3.25D).

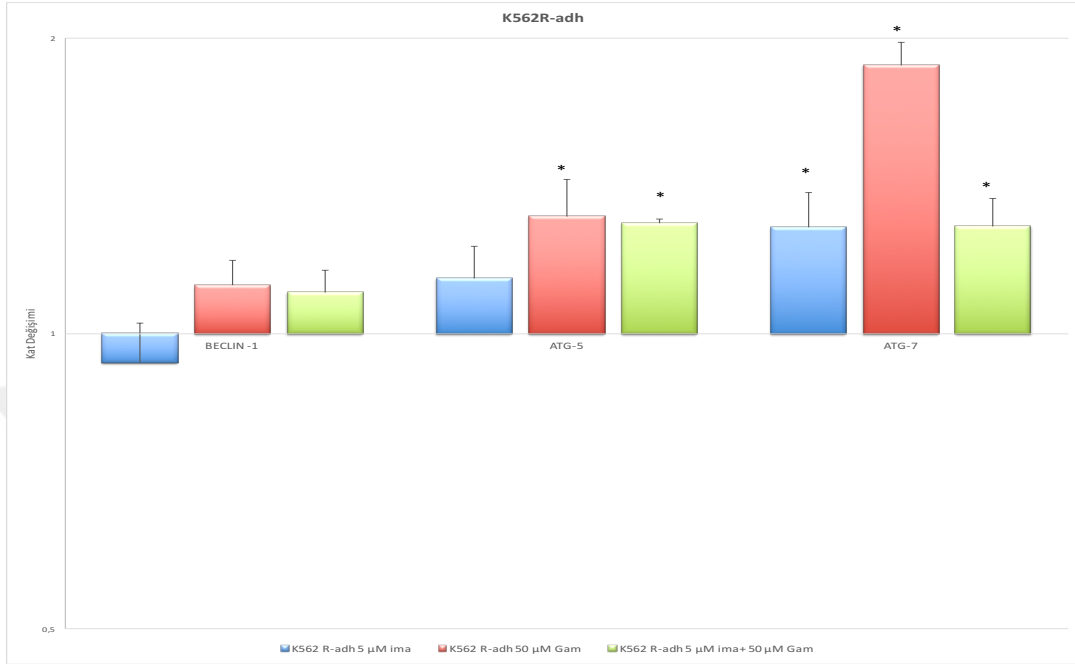
A)



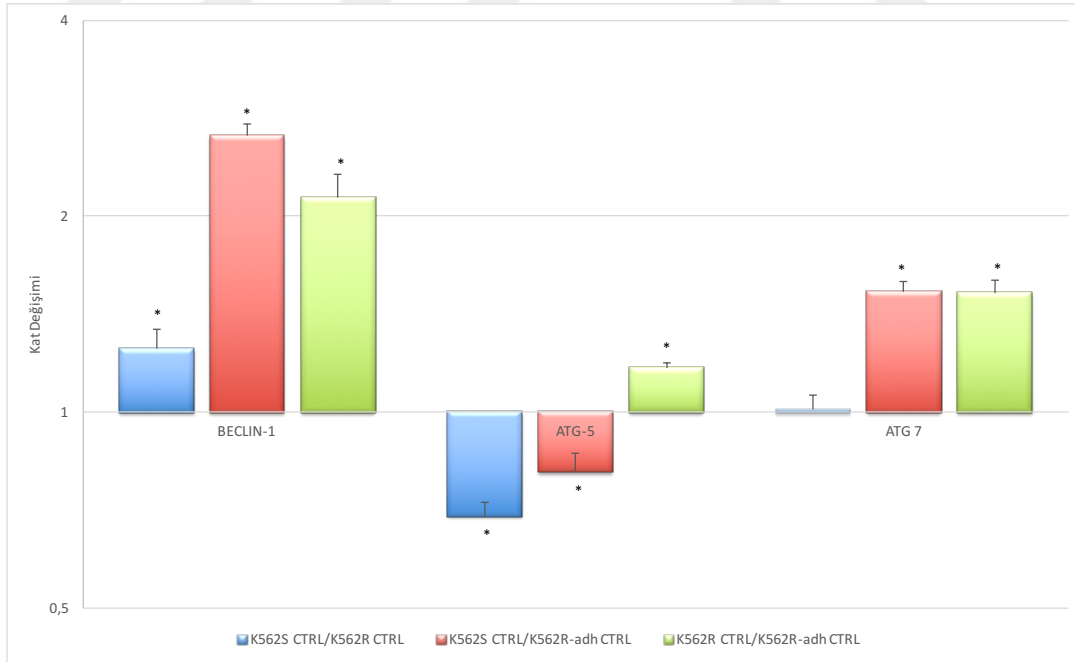
B)



C)



D)



Şekil 3.25. A) K562S, B) K562R, C) K562R-adh D) Kontrol grubundaki hücrelerinde otofajik genlerin ifadesi

3.9. İlaç Taşıyıcı Pompaların Gen İfadeleri

Gamitrinib'in ilaç taşıyıcı pompaların gen ifadeleri üzerindeki etkisini araştırmak amacı ile MDR-1, MRP-1 ve OCT-1 genlerinin ifadeleri araştırılmıştır, elde edilen sonuçlara göre;

3.9.1. MDR-1 gen ifadesi

0.2 μ M İmatinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadesi K562S kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 0.09 ± 0.02 kat bulunurken, 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadesi 3.92 ± 0.73 kat bulunmuştur (Şekil 3.26A).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadesi K562R kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 0.62 ± 0.10 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 0.41 ± 0.04 ve 0.46 ± 0.05 kat olarak bulunmuştur (Şekil 3.26B).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R-adh hücrelerindeki gen ifadesi K562R-adh kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 0.92 ± 0.13 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 2.21 ± 0.09 ve 0.46 ± 0.04 kat değişimi göstermiştir (Şekil 3.26C).

K562R ve K562R-adh hücrelerinin kontrol gruplarındaki MDR-1 genin ifadesi K562S hücrelerin kontrol grubu ile kıyaslandığında sırayla 344.36 ± 24.12 ve 492.64 ± 31.11 kat olarak saptanmışken, K562R-adh hücrelerindeki kontrol grubu K562R hücrelerinin kontrol grubuyla kıyaslandığında 1.43 ± 0.045 kat bulunmuştur (Şekil 3.26D).

3.9.2. MRP-1 gen ifadesi

0.2 μ M İmatinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadesi K562S kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 1.22 ± 0.11 kat bulunurken, 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S ve kombine 0.2 μ M İmatinib ve 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 2.54 ± 0.15 ve 3.58 ± 0.42 kat artmıştır (Şekil 3.26A).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadesi K562R kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 1.17 ± 0.14 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 1.42 ± 0.11 ve 1.62 ± 0.25 kat olarak bulunmuştur (Şekil 3.26B).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R-adh hücrelerindeki gen ifadesi K562R-adh kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 1.71 ± 0.17 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 1.80 ± 0.13 ve 1.59 ± 0.13 kat değişimi göstermiştir (Şekil 3.26C).

K562R ve K562R-adh hücrelerinin kontrol gruplarındaki MRP-1 genin ifadesi K562S hücrelerin kontrol grubu ile kıyaslandığında sırayla 1 ± 0.12 ve 1.2 ± 0.1 kat olarak saptanmışken, K562R-adh hücrelerindeki kontrol grubu K562R hücrelerinin kontrol grubuyla kıyaslandığında 1.2 ± 0.06 kat bulunmuştur (Şekil 3.26D).

3.9.3. OCT-1 gen ifadesi

0.2 μ M İmatinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadesi K562S kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 1.34 ± 0.60 kat bulunurken, 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S ve kombine 0.2 μ M İmatinib ve 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 6.79 ± 3.08 ve 16.22 ± 1.59 kat artmıştır (Şekil 3.26A).

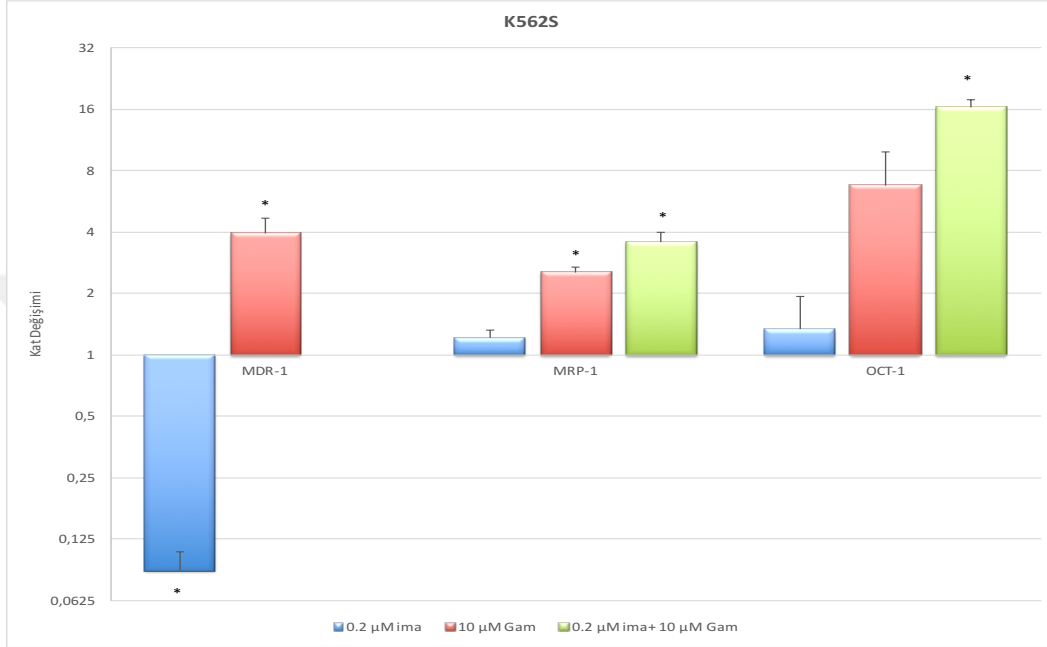
5 μ M İmatinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadesi K562R kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 1.28 ± 0.48 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 3.16 ± 0.59 ve 7.17 ± 2.19 kat artış göstermiştir (Şekil 3.26B).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R-adh hücrelerindeki gen ifadesi K562R-adh kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 1.71 ± 0.25 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 3.55 ± 0.44 ve 2.87 ± 0.64 kat artışı göstermiştir (Şekil 3.26C).

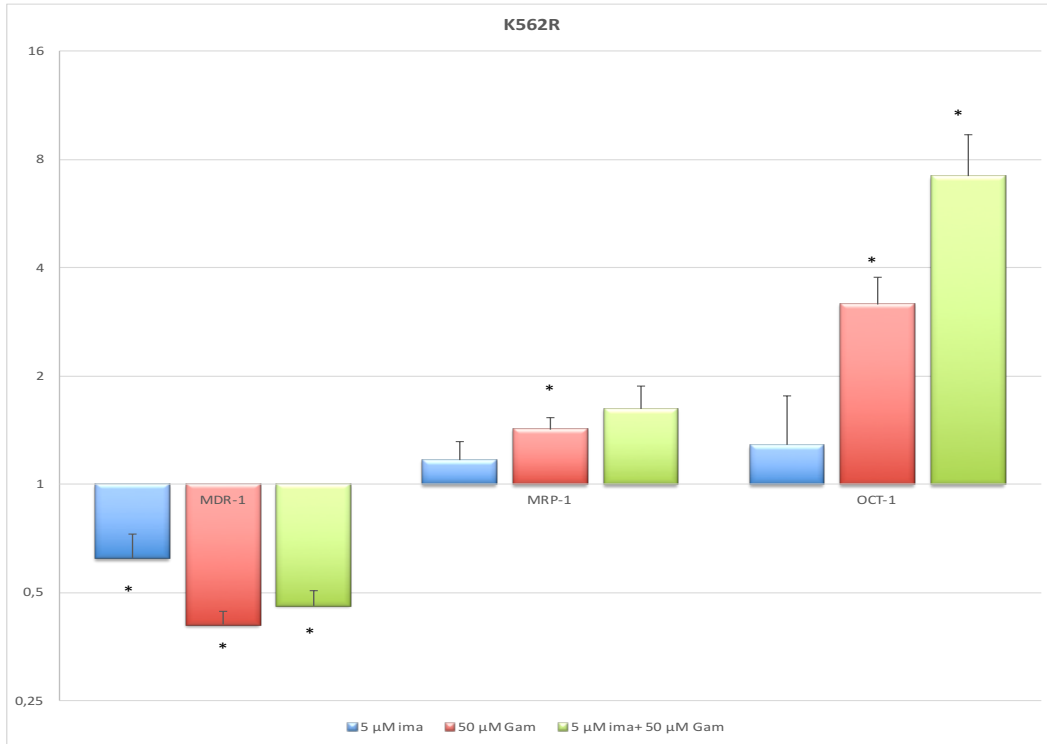
K562R ve K562R-adh hücrelerinin kontrol gruplarındaki OCT-1 genin ifadesi K562S hücrelerin kontrol grubu ile kıyaslandığında sırayla 0.58 ± 0.05 ve 1.46 ± 0.15 kat olarak

saptanmışken, K562R-adh hücrelerindeki kontrol grubu K562R hücrelerinin kontrol grubuyla kıyaslandığında 2.5 ± 0.09 kat bulunmuştur (Şekil 3.26D).

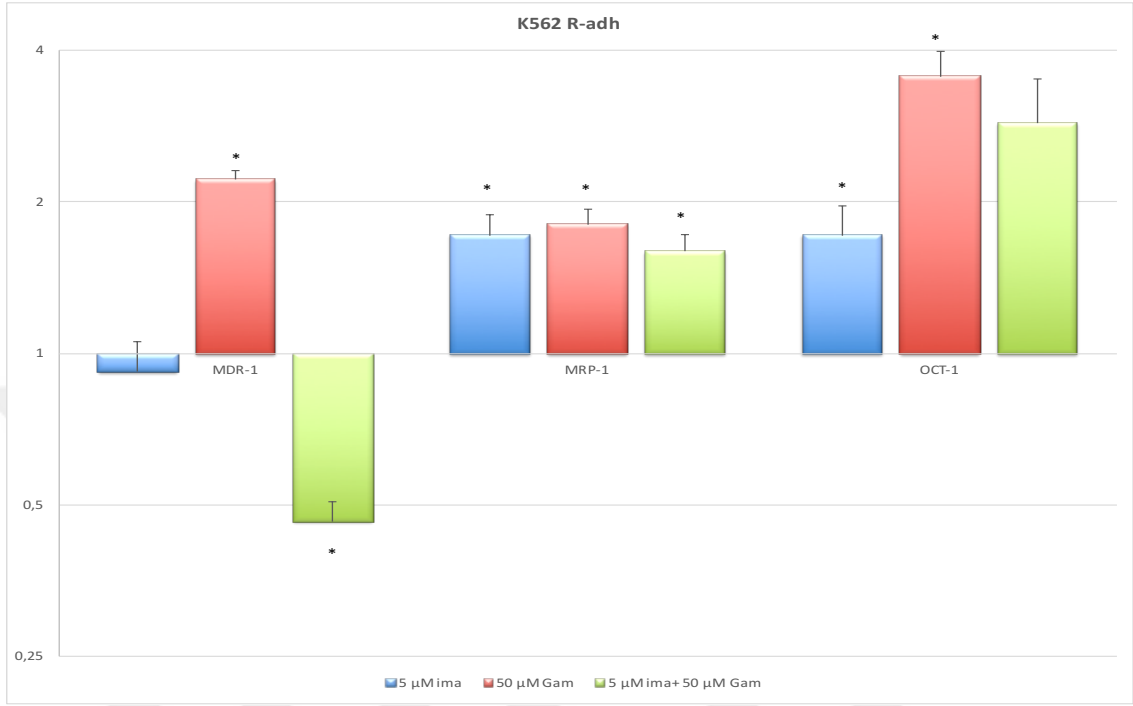
A)



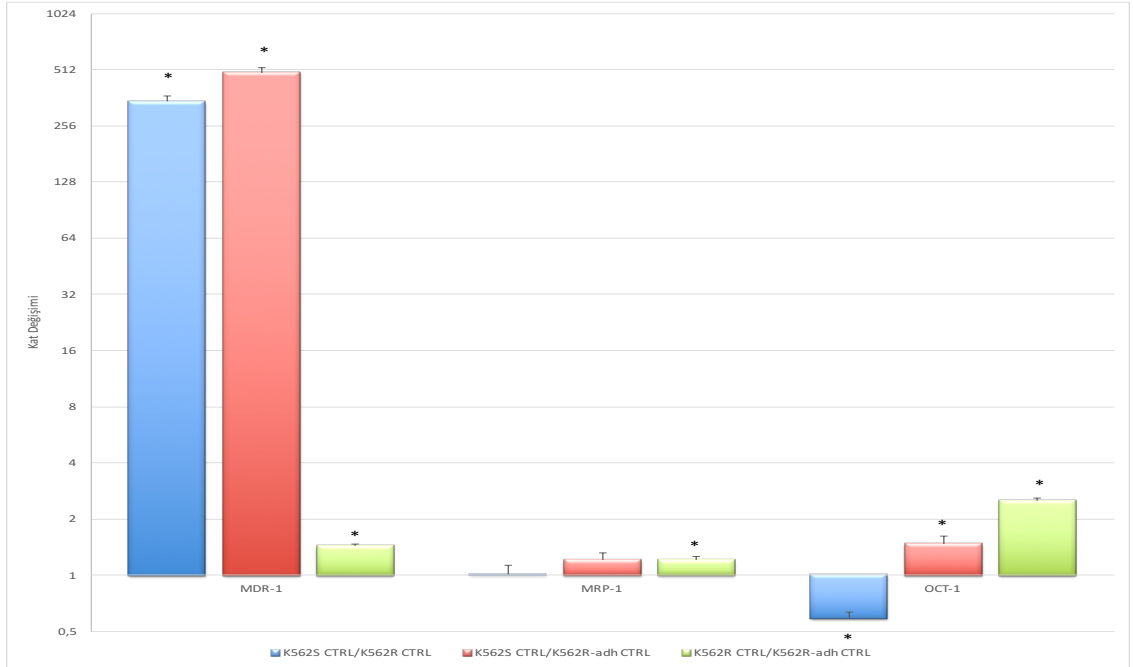
B)



C)



D)



Şekil 3.26. A) K562S, B) K562R, C) K562R-adh, D) Kontrol grubundaki hücrelerinde ilaç taşınmasından sorumlu genlerin ifadesi

3.10. Metabolik Yolaklardaki Genlerin İfadesi

Gamitrinib'in metabolik yolaklardaki genlerin ifadesini etkilemektedir, bu nedenle HK, PDK-1, PKM-1, PKM-2, LDHA ve LDHB genlerinin ifadesi incelenmiştir.

3.10.1. HK Gen İfadesi

0.2 μ M İmatinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadesi K562S kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 0.59 ± 0.08 kat bulunurken, 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S ve kombine 0.2 μ M İmatinib ve 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 1.49 ± 0.25 ve 1.15 ± 0.33 kat değişikliği yapılmıştır (Şekil 3.27A).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadesi K562R kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 1.15 ± 0.14 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 0.52 ± 0.08 ve 0.48 ± 0.04 kat azalmıştır (Şekil 3.27B).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R-adh hücrelerindeki gen ifadesi K562R-adh kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 1.89 ± 0.28 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 5.74 ± 1.10 ve 0.75 ± 0.09 kat değişikliği göstermiştir (Şekil 3.27C).

K562R ve K562R-adh hücrelerinin kontrol gruplarındaki HK1 genin ifadesi K562S hücrelerin kontrol grubu ile kıyaslandığında sırayla 0.73 ± 0.12 ve 0.44 ± 0.01 kat olarak saptanmışken, K562R-adh hücrelerindeki kontrol grubu K562R hücrelerinin kontrol grubuyla kıyaslandığında 0.61 ± 0.1 kat bulunmuştur (Şekil 3.27D).

3.10.2. PKM-1 Gen İfadesi

0.2 μ M İmatinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadesi K562S kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 0.15 ± 0.01 kat bulunurken, 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S ve kombine 0.2 μ M İmatinib ve 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 2.53 ± 0.30 ve 1.62 ± 0.33 kat değişikliği yapılmıştır (Şekil 3.27A).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadesi K562R kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 0.89 ± 0.06 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 0.71 ± 0.08 ve 0.95 ± 0.11 kat azalmıştır (Şekil 3.27B).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R-adh hücrelerindeki gen ifadesi K562R-adh kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 0.99 ± 0.08 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 1.84 ± 0.09 ve 0.78 ± 0.05 kat değişikliği göstermiştir (Şekil 3.27C).

K562R ve K562R-adh hücrelerinin kontrol gruplarındaki PKM1 genin ifadesi K562S hücrelerin kontrol grubu ile kıyaslandığında sırayla 1.8 ± 0.2 ve 1.95 ± 0.18 kat olarak saptanmışken, K562R-adh hücrelerindeki kontrol grubu K562R hücrelerinin kontrol grubuyla kıyaslandığında 1.08 ± 0.02 kat bulunmuştur (Şekil 3.27D).

3.10.3. LDHA Gen İfadesi

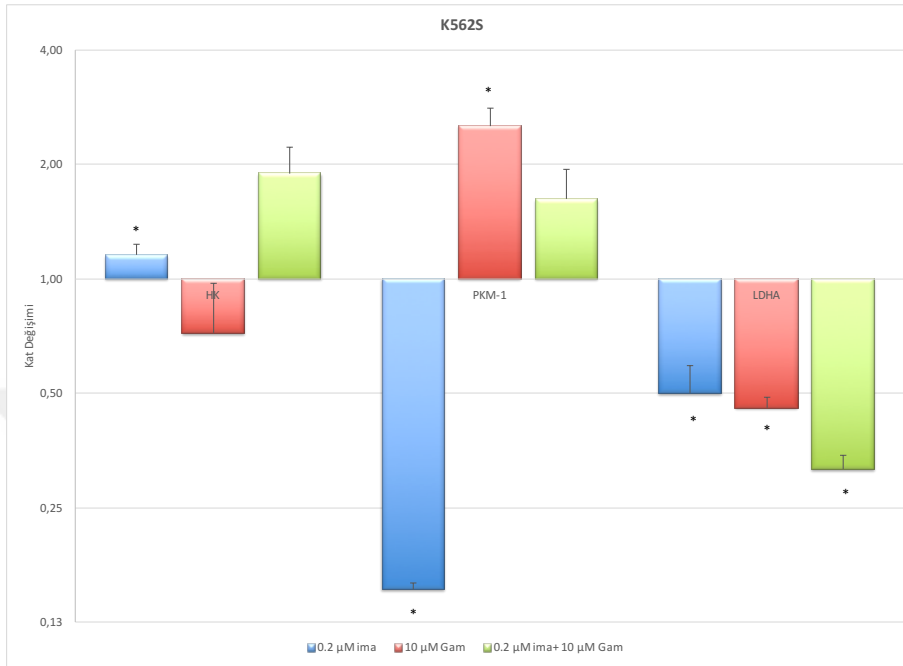
0.2 μ M İmatinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadesi K562S kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 0.50 ± 0.09 kat bulunurken, 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S ve kombine 0.2 μ M İmatinib ve 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 0.46 ± 0.03 ve 0.32 ± 0.03 kat azalmıştır (Şekil 3.25A).

5 μ M İmatinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadesi K562R kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 1.12 ± 0.33 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 0.79 ± 0.13 ve 0.27 ± 0.04 kat değişikliği bulunmuştur (Şekil 3.27B).

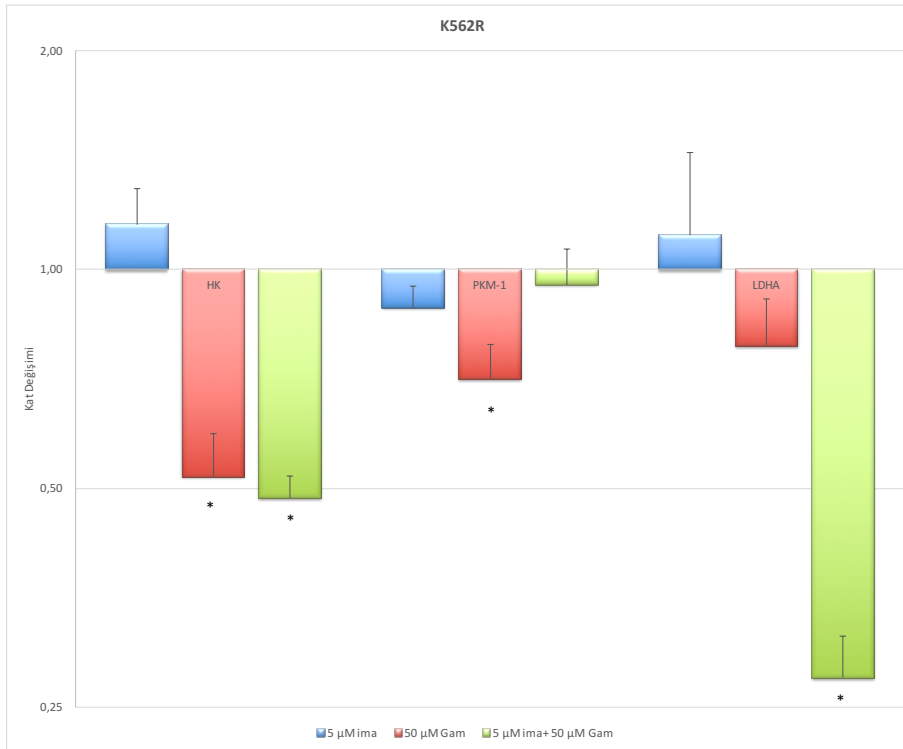
5 μ M İmatinib uygulanan K562R-adh hücrelerindeki gen ifadesi K562R-adh kontrol hücreleri ile kıyaslandığında 0.65 ± 0.05 kat bulunurken, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R ve kombine 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerindeki gen ifadeleri sırayla 0.95 ± 0.03 ve 0.40 ± 0.0 kat azalmıştır (Şekil 3.27C).

K562R ve K562R-adh hücrelerinin kontrol gruplarındaki LDHA genin ifadesi K562S hücrelerin kontrol grubu ile kıyaslandığında sırayla 0.61 ± 0.01 ve 0.45 ± 0.04 kat olarak saptanmışken, K562R-adh hücrelerindeki kontrol grubu K562R hücrelerinin kontrol grubuyla kıyaslandığında 0.73 ± 0.07 kat bulunmuştur (Şekil 3.27D).

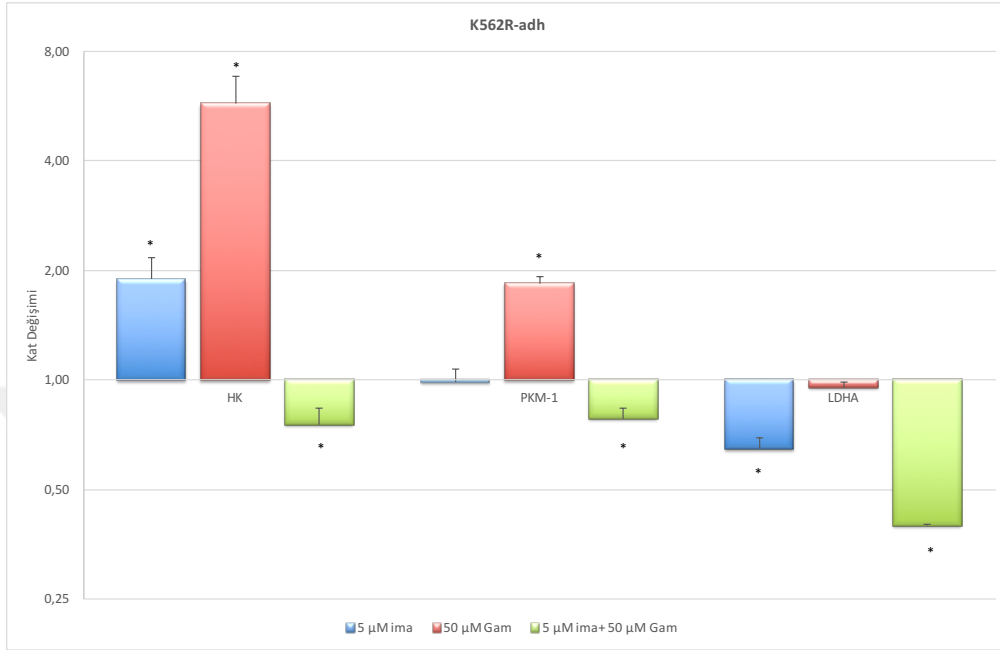
A)



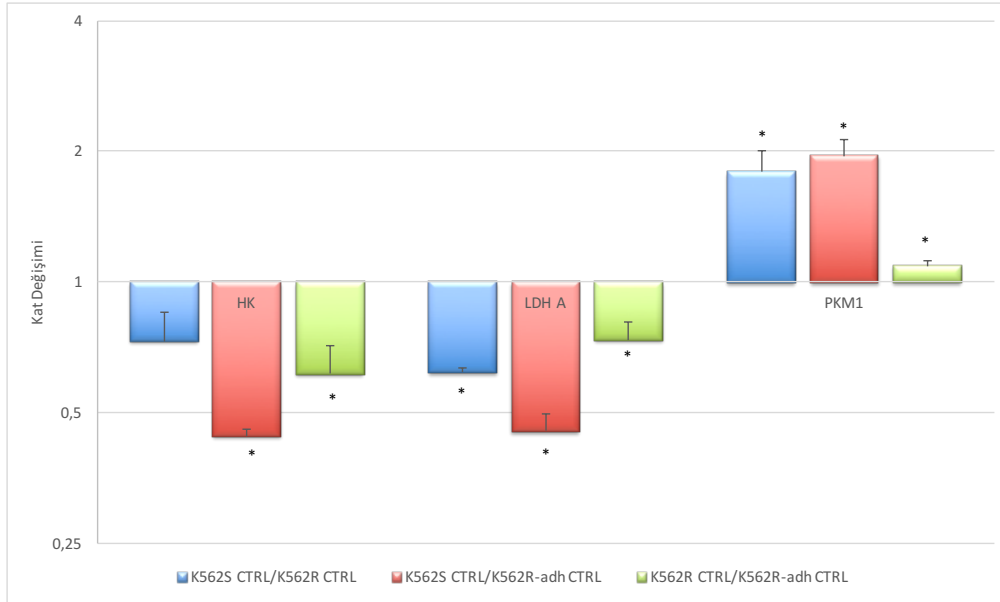
B)



C)



D)



Şekil 3.27. A) K562S, B) K562R, C) K562R-adh, D) Kontrol grubundaki hücrelerinde metabolik genlerin ifadesi

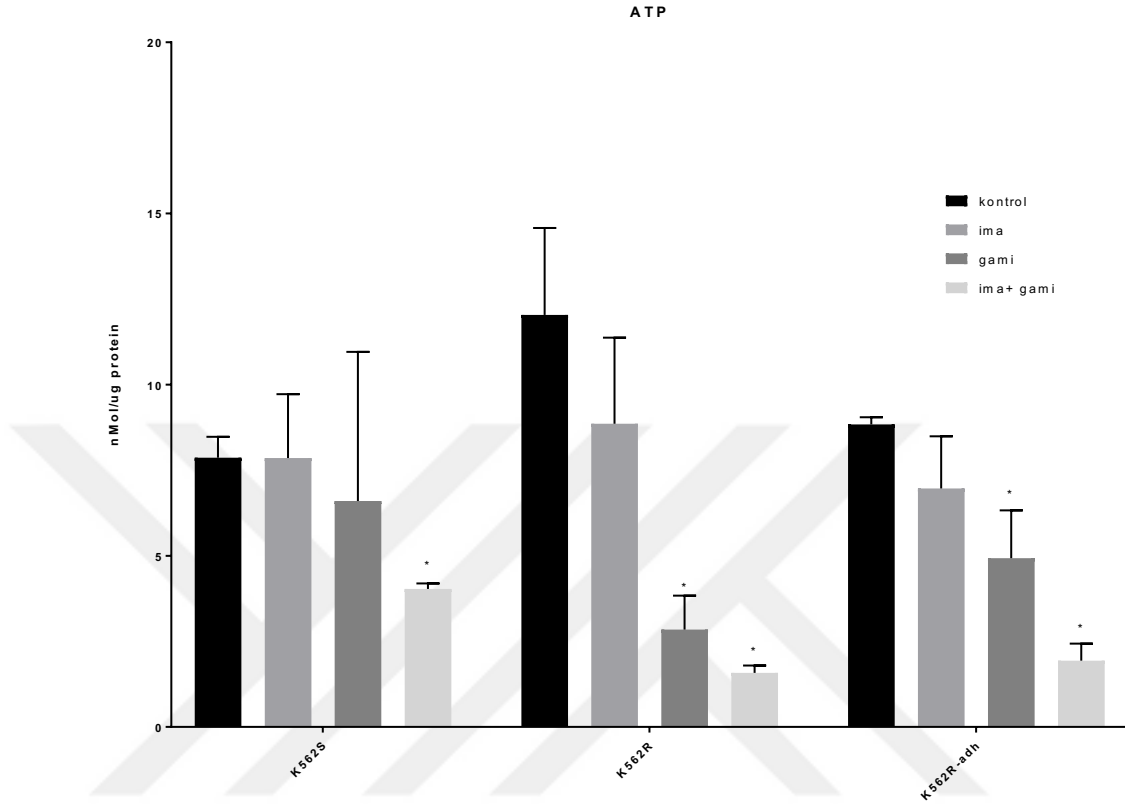
3.11. Gamitrinib'in ATP Üretimi Üzerindeki Etkisi

Gamitrinib'in hücrelerin ATP üretimi üzerindeki etkisi araştırılmıştır ve elde edilen sonuçlara göre;

ATP üretim miktarı, K562S hücrelerinin kontrol grubunda 7.86 ± 0.60 iken, $0.2 \mu\text{M}$ İmatinib, $10 \mu\text{M}$ Gamitrinib ve $0.2 \mu\text{M}$ İmatinib+ $10 \mu\text{M}$ Gamitrinib kombine olarak uygulandığında ATP miktarı sırasıyla 7.85 ± 1.86 , 6.6 ± 4.35 ve 4.03 ± 0.16 bulunmuştur (Şekil 3.28).

K562R hücrelerinde kontrol grubunda ATP üretim miktarı 12.03 ± 2.54 bulunurken, $5 \mu\text{M}$ İmatinib, $50 \mu\text{M}$ Gamitrinib ve $5 \mu\text{M}$ İmatinib+ $50 \mu\text{M}$ Gamitrinib kombine olarak uygulanan hücre gruplarında ATP üretim miktarı sırasıyla 8.85 ± 2.51 , 2.84 ± 0.99 ve 1.58 ± 0.21 olarak saptanmıştır (Şekil 3.28).

ATP üretim miktarı K562R-adh hücrelerinin kontrol grubunda 8.83 ± 0.21 bulunurken, $5 \mu\text{M}$ İmatinib, $50 \mu\text{M}$ Gamitrinib ve $5 \mu\text{M}$ İmatinib+ $50 \mu\text{M}$ Gamitrinib kombine olarak uygulanan hücre gruplarında ATP üretim miktarı sırasıyla 6.96 ± 1.52 , 4.93 ± 1.39 ve 1.93 ± 0.5 olarak belirlenmiştir (Şekil 3.28).



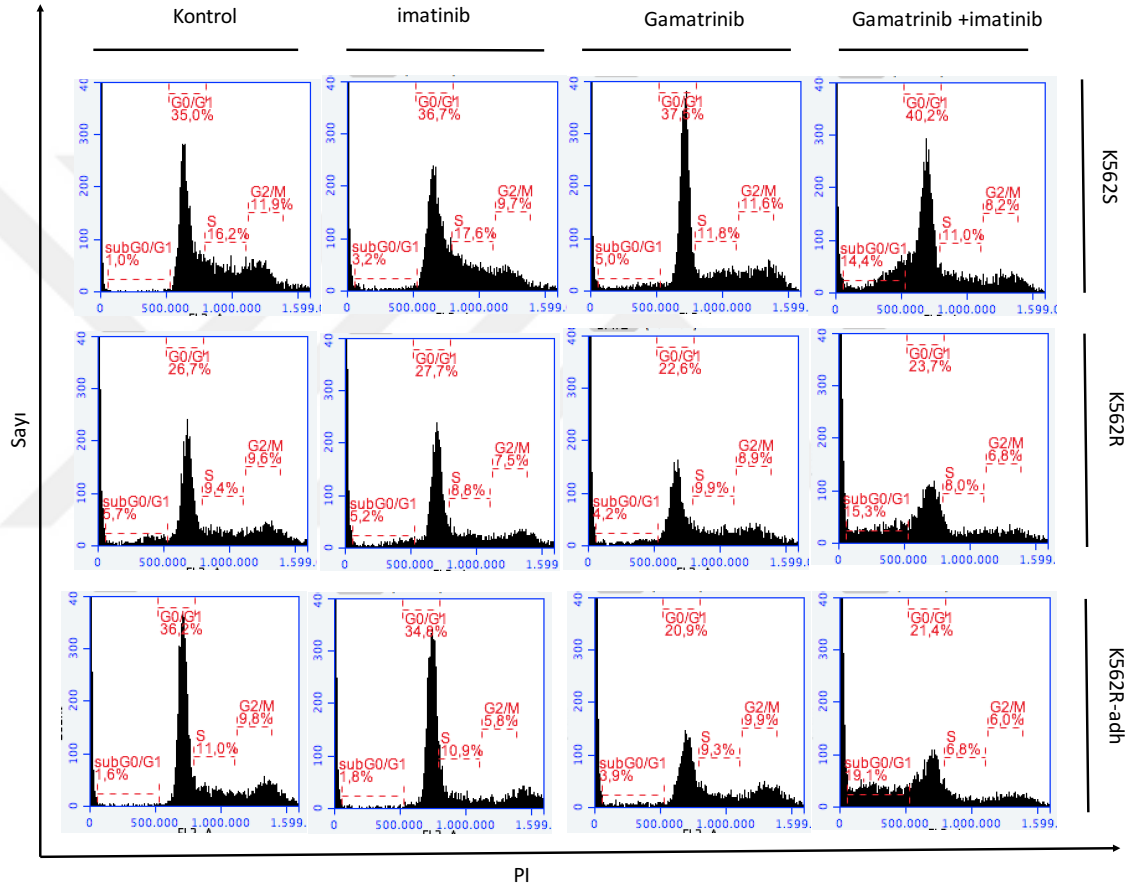
Şekil 3.28. Gamitrinib uygulanan K562S, K562R, K562R-adh hücrelerinde ATP üretimi üzerindeki etkisi

3.12. Gamitrinib'in Hücre Döngüsü Üzerindeki Etkisi

Şekil 3.29'de hücre döngüsünün değişik fazlarında bulunan hücreler yüzde olarak gösterilmiştir.

G0/G1 fazındaki hücre sayısı, K562S Kontrol 32.67 ± 2.85 , 0.2 μ M İmatinib uygulanan K562S hücrelerinde 35.92 ± 1.82 , 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S 36.41 ± 1.23 ve kombine olarak 0.2 μ M İmatinib ve 10 μ M Gamitrinib uygulanan hücrelerde ise

39.4 ± 1.12 olarak bulunmuştur. Sadece kombine İmatinib ve Gamitrinib uygulanan gruptaki hücre sayısı kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 3.30; p<0.05).



Şekil 3.29. Gamitrinib uygulanan K562S, K562R ve K562R-adh hücrelerinin hücre döngüsü analizi

K562R hücrelerindeki G0/G1 fazındaki hücre sayısı sırasıyla, K562R kontrol (26.14 ± 0.41), 5µM İmatinib uygulanan K562R (28.02 ± 0.49), 50 µM Gamitrinib uygulanan K562R (21.19 ± 0.97) ve kombine olarak 5 µM İmatinib ve 50 µM Gamitrinib uygulanan K562R (23.64 ± 0.39) bulunmuştur (Şekil 3.31).

G0/G1 fazında bulunan K562R-adh hücrelerinin kontrol grubundaki hücre sayısı 35.54 ± 0.6 iken, 5 μ M İmatinib uygulanan K562R-adh hücre sayısı 36.37 ± 0.65 , 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R-adh hücre sayısı 21.25 ± 0.97 ve kombine olarak 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R-adh hücre sayısı 20.18 ± 0.85 olarak bulunmuştur. Gamitrinib'in tek başına veya İmatinib ile uygulanan gruplardaki hücre sayıları kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 3.32; $p < 0.001$).

Sub G0/G1 fazındaki hücre sayısı, K562S kontrol 0.94 ± 0.11 , 0.2 μ M İmatinib uygulanan K562S hücrelerinde 3.04 ± 0.12 , 10 μ M Gamitrinib uygulanan K562S 4.92 ± 0.27 ve kombine olarak 0.2 μ M İmatinib ve 10 μ M Gamitrinib uygulanan hücrelerde ise 13.82 ± 0.98 olarak bulunmuştur. Gamitrinib'in tek başına veya İmatinib ile uygulanan gruplardaki hücre sayıları kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur $p < 0.001$ (Şekil 3.30).

K562R hücrelerindeki G0/G1 fazındaki hücre sayısı sırasıyla, K562R kontrol (5.22 ± 0.30), 5 μ M İmatinib uygulanan K562R (5.14 ± 0.23), 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R (4.39 ± 0.30) ve kombine olarak 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R (14.70 ± 0.79) bulunmuştur. Sadece kombine İmatinib ve Gamitrinib uygulanan gruptaki hücre sayısı kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 3.31; $p < 0.001$).

Sub G0/G1 fazında bulunan K562R-adh hücrelerinin kontrol grubundaki hücre sayısı 1.52 ± 0.73 iken, 5 μ M İmatinib uygulanan K562R-adh hücre sayısı 1.72 ± 0.18 , 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R-adh hücre sayısı 3.7 ± 0.24 ve kombine olarak 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R-adh hücre sayısı 19.01 ± 1.21 olarak

bulunmuştur. Gamitirib'in İmatinib ile uygulanan gruptaki hücre sayıları kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 3.32; $p<0.001$).

S fazındaki hücre sayısı, K562S kontrol grubunda 16.64 ± 0.43 , 0.2 μM İmatinib uygulanan K562S hücrelerinde 17.96 ± 0.47 , 10 μM Gamitirib uygulanan K562S 12.60 ± 0.69 ve kombine olarak 0.2 μM İmatinib ve 10 μM Gamitirib uygulanan hücrelerde ise 11.23 ± 0.43 olarak bulunmuştur. Gamitirib'in tek başına veya İmatinib ile uygulanan gruplardaki hücre sayıları kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 3.30; $p<0.001$).

K562R hücrelerindeki S fazındaki hücre sayısı sırasıyla, K562R kontrol (9.9 ± 0.23), 5 μM İmatinib uygulanan K562R (8.61 ± 0.85), 50 μM Gamitirib uygulanan K562R (9.92 ± 0.13) ve kombine olarak 5 μM İmatinib ve 50 μM Gamitirib uygulanan K562R (7.83 ± 0.11) bulunmuştur. Sadece kombine İmatinib ve Gamitirib uygulanan gruptaki hücre sayısı kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 3.31; $p<0.05$).

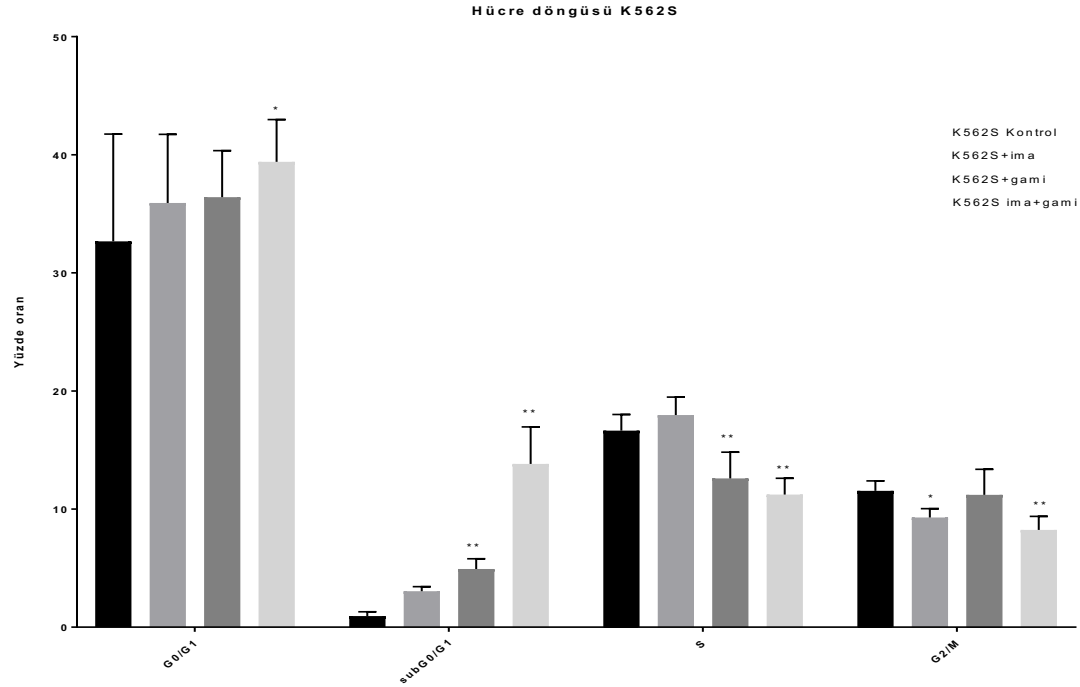
S fazında bulunan K562R-adh hücrelerinin kontrol grubundaki hücre sayısı 10.88 ± 0.21 iken, 5 μM İmatinib uygulanan K562R-adh hücre sayısı 9.88 ± 0.73 , 50 μM Gamitirib uygulanan K562R-adh hücre sayısı 9.12 ± 0.086 ve kombine olarak 5 μM İmatinib ve 50 μM Gamitirib uygulanan K562R-adh hücre sayısı 7.49 ± 0.38 olarak bulunmuştur. Gamitirib'in İmatinib ile uygulanan gruptaki hücre sayıları kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 3.32; $p<0.001$).

G2/M fazındaki hücre sayısı, K562S kontrol grubunda 11.55 ± 0.26 , 0.2 μM İmatinib uygulanan K562S hücrelerinde 9.28 ± 0.23 , 10 μM Gamitirib uygulanan K562S

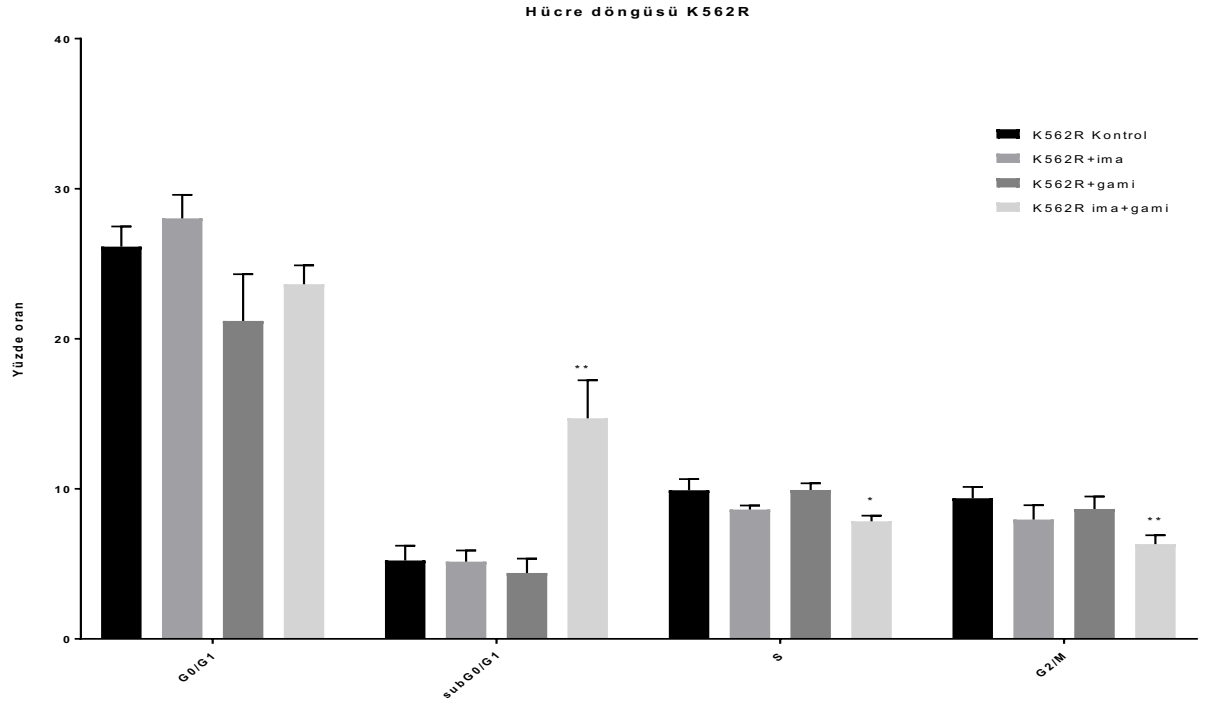
11.20 $\pm$ 0.67 ve kombine olarak 0.2 μ M İmatinib ve 10 μ M Gamitrinib uygulanan hücrelerde ise 8.23 $\pm$ 0.35 olarak bulunmuştur. İmatinib'in tek başına veya Gamitrinib ile kombine uygulandığı gruplardaki hücre sayıları kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 3.30; $p < 0.05$, $p < 0.001$).

K562R hücrelerindeki G2/M fazındaki hücre sayısı sırasıyla, K562R kontrol (9.37 $\pm$ 0.23), 5 μ M İmatinib uygulanan K562R (7.95 $\pm$ 0.3), 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R (8.65 $\pm$ 0.26) ve kombine olarak 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R (6.32 $\pm$ 0.18) bulunmuştur. Sadece kombine İmatinib ve Gamitrinib uygulanan gruptaki hücre sayısı kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 3.31; $p < 0.05$).

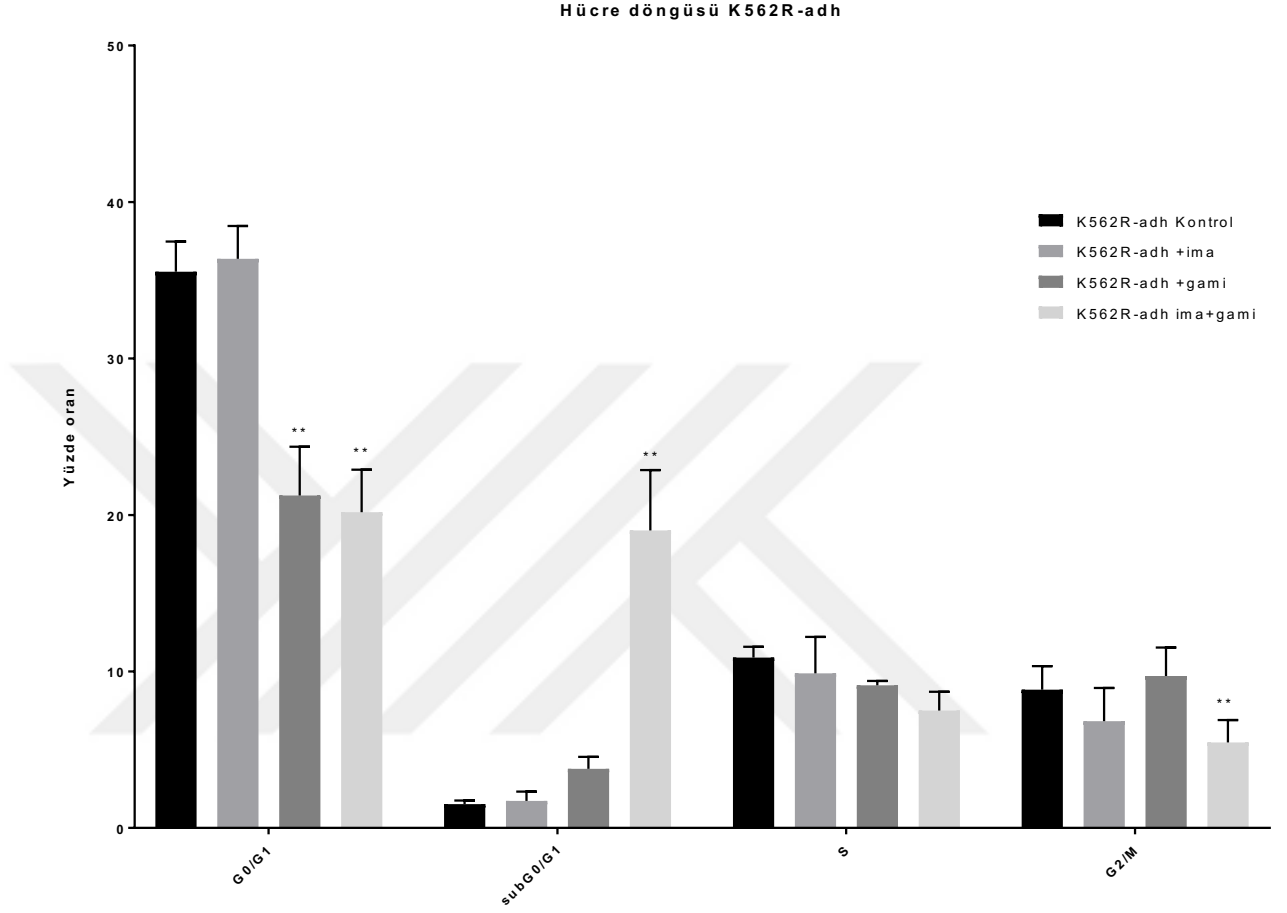
G2/M fazında bulunan K562R-adh hücrelerinin kontrol grubundaki hücre sayısı 8.84 $\pm$ 0.47 iken, 5 μ M İmatinib uygulanan K562R-adh hücre sayısı 6.82 $\pm$ 0.66, 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R-adh hücre sayısı 9.71 $\pm$ 0.571 ve kombine olarak 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R-adh hücre sayısı 5.46 $\pm$ 0.45 olarak bulunmuştur. Gamitrinib'in İmatinib ile kombine uygulandığı gruptaki hücre sayıları kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 3.32; $p < 0.001$).



Şekil 3.30. K562S hücrelerinin hücre döngüsü analizi



Şekil 3.31. K562R hücrelerinin hücre döngüsü analizi



Şekil 3.32. K562R-adh hücrelerinin hücre döngüsü analizi

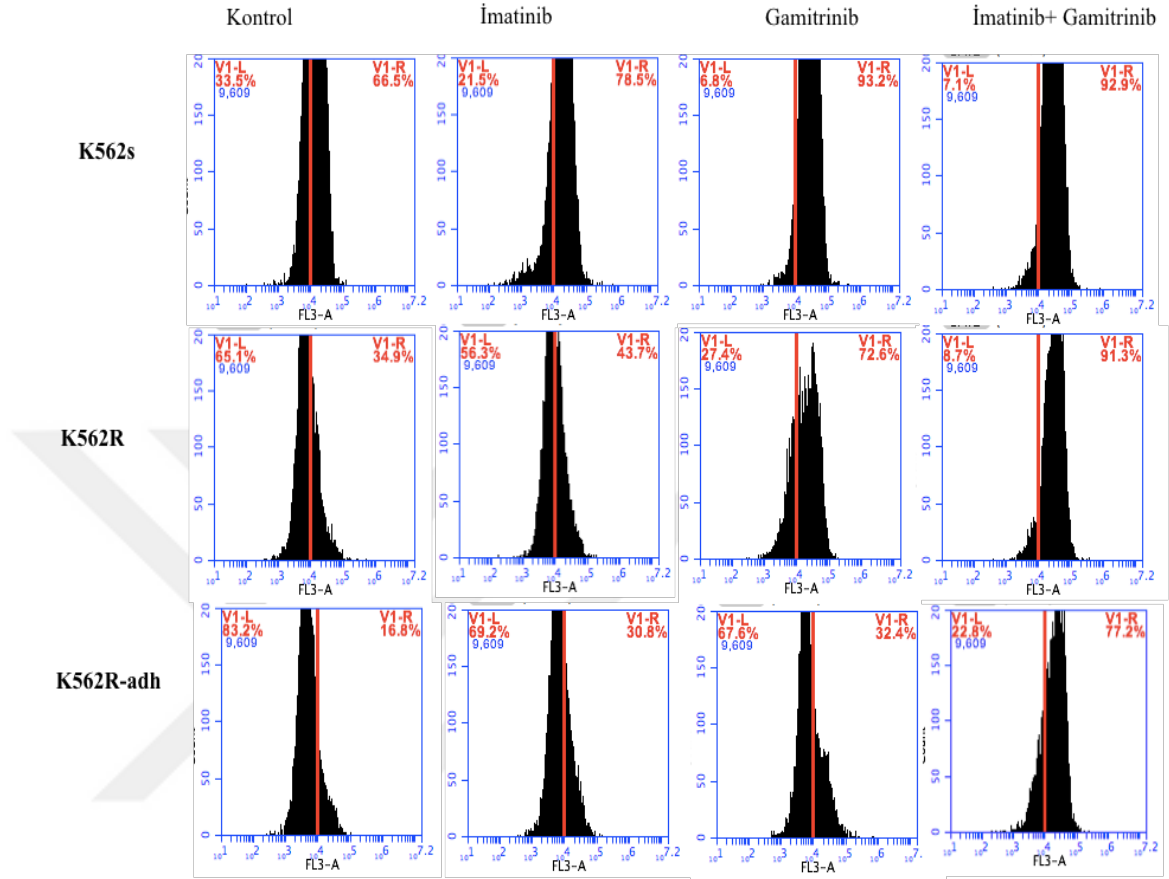
3.13. MitoTracker Red ile Boyanma Sonuçları

Şekil 3.33’de mitoTracker boyama sonuçları yüzde olarak gösterilmiştir. Şekil 3.32’de ise total floresan miktarları grafik olarak gösterilmiştir. Mitokondri sayısının belirlenmesinde mitoTracker red boyası kullanılmıştır.

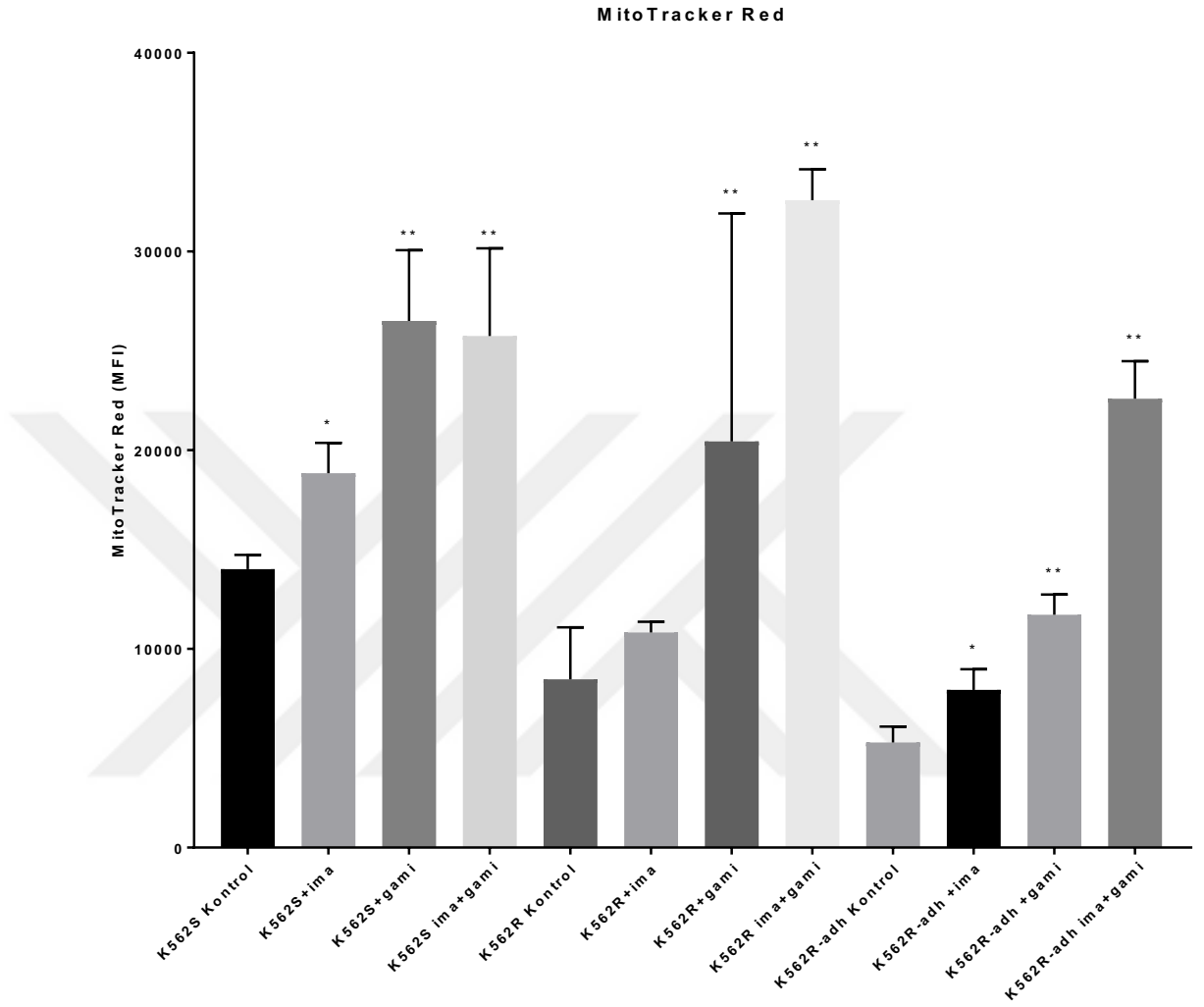
Şekil 3.34’de gösterildiği gibi K562S hücrelerinde boyanmanın floresan şiddeti 13983.83 ± 546.51 , $0.2 \mu\text{M}$ İmatinib uygulanan K562S hücrelerinde 18964.83 ± 1136.18 , $10 \mu\text{M}$ Gamitrinib uygulanan K562S hücrelerinde 27005.12 ± 2448.03 ve kombine olarak $0.2 \mu\text{M}$ İmatinib ve $10 \mu\text{M}$ Gamitrinib uygulanan hücrelerde ise 26572.04 ± 2727.05 olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlara göre, K562S hücrelerinde Gamitrinib ve İmatinib/Gamitrinib kombinasyonunun mito-red boyanmasını üzerinde anlamlı artışa yol açtığı belirlenmiştir ($p<0.001$).

K562R hücrelerinde ise, mito-red total floresan miktarı kontrol grubunda 8464.25 ± 1053.66 , $5 \mu\text{M}$ İmatinib uygulanan hücrelerde 10828.36 ± 216.27 , $50 \mu\text{M}$ Gamitrinib uygulanan hücrelerde 20439.19 ± 4620.12 ve kombine olarak $5 \mu\text{M}$ İmatinib ve $50 \mu\text{M}$ Gamitrinib uygulanan hücrelerde ise 32579.49 ± 626.764 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, K562R hücrelerine Gamitrinib’in tek başına ve İmatinible kombine uygulanmasının kontrol hücrelerine göre MitoRed boyanmasını anlamlı olarak arttırdığını göstermiştir (Şekil 3.34; $p<0.001$).

K562R-adh hücrelerinde ise, kontrol, $5 \mu\text{M}$ İmatinib uygulanan K562R-adh, $50 \mu\text{M}$ Gamitrinib uygulanan K562R-adh ve kombine olarak $5 \mu\text{M}$ İmatinib ve $50 \mu\text{M}$ Gamitrinib uygulanan K562R-adh hücrelerinde MitoRed total floresan miktarı sırasıyla 5287.01 ± 322.76 , 7939.37 ± 419.71 , 11718.88 ± 408.05 ve 22594.25 ± 759.14 olarak ölçülmüştür. Buna göre, Gamitrinib uygulanan ve Gamitrinib/İmatinib uygulanan K562R-adh hücrelerinde tedavisiz K562R-adh hücrelerine göre MitoRed boyanma şiddeti anlamlı olarak artmış bulunmuştur (sırasıyla $p<0.05$ ve $p<0.001$).



Şekil 3.33. K562S, K562R , K562R-adh hücrelerinin mitoTracker-red analizi



Şekil 3.34. K562S, K562R, K562R-adh hücrelerinin mitoTracker-red analiz grafiği

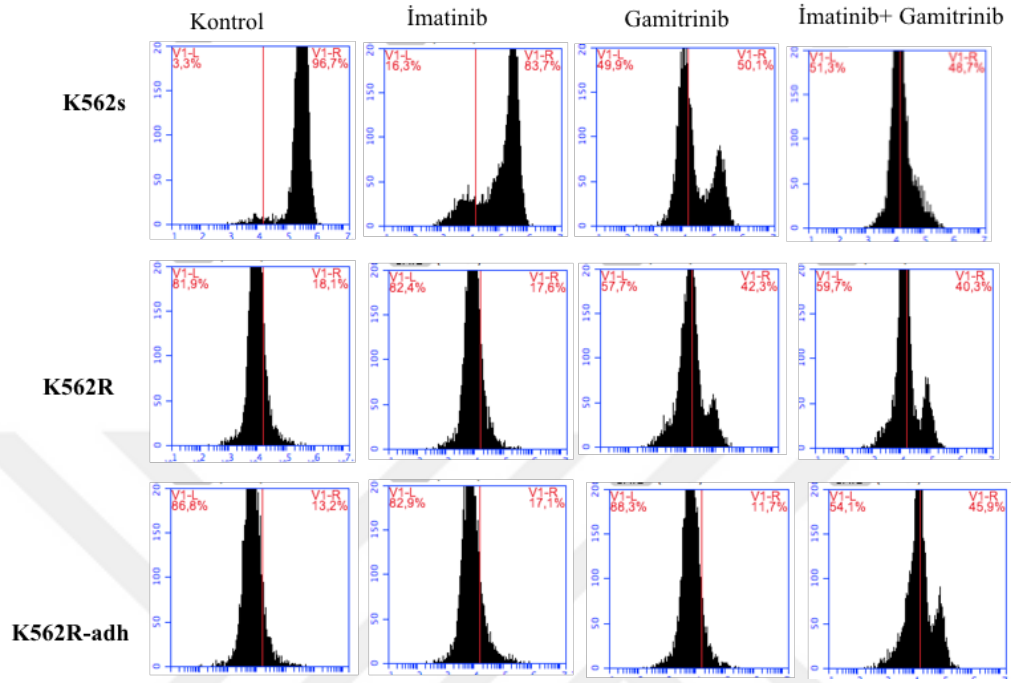
3.14. p-Glikoprotein Aktivitesinin Tayini için Rh123 Boyanma Sonuçları

MDR1(p-Glikoprotein) aktivitesinin bir göstergesi olan, Rh123 boyanması sonuçları yüzde olarak şekil 3.35'te gösterilmiştir. Rh123 boyasının hücre içindeki birikimin şekil 3.36'de grafik olarak gösterilmiştir.

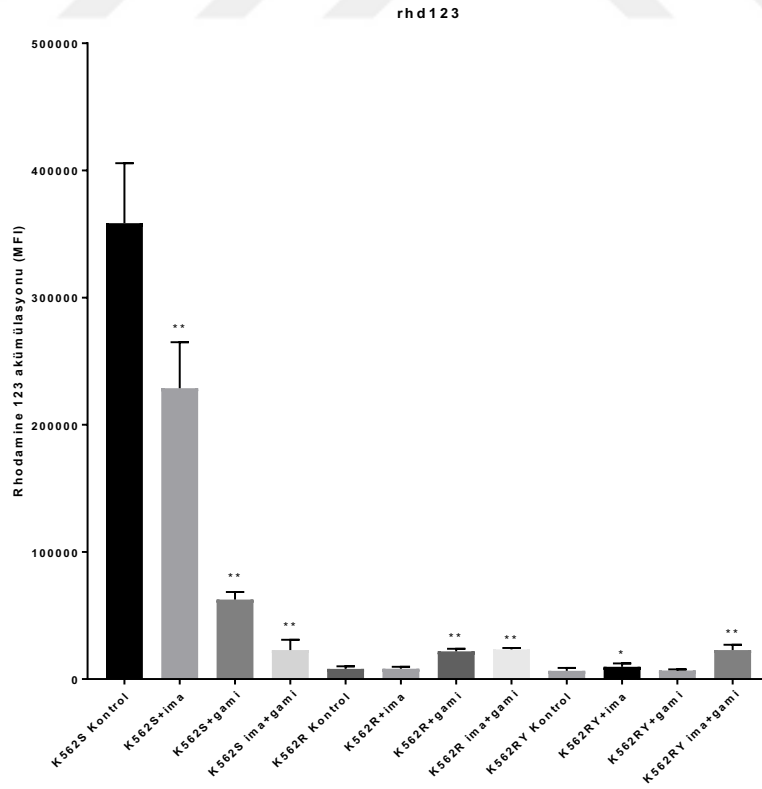
Bu sonuçlara göre, K562S hücrelerinde floresan şiddeti 358586.84 ± 18955.53 ; $0.2 \mu\text{M}$ İmatinib uygulanan K562S hücrelerinde 228695.22 ± 14597.30 $10 \mu\text{M}$ Gamitrinib uygulanan K562S hücrelerinde 62528.43 ± 2403.23 ve kombine olarak $0.2 \mu\text{M}$ İmatinib ve $10 \mu\text{M}$ Gamitrinib uygulanan hücrelerde 22855.66 ± 3258.37 olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlara göre, Gamitrinib ve İmatinib Gamitrinib kombinasyonu uygulanan K562S hücrelerinde kontrol hücrelerine göre floresan şiddetinin anlamlı olarak azaldığı, MDR fonksiyonunun arttığı saptanmıştır (Şekil 3.36; $p < 0.001$).

K562R hücrelerinde ise, total floresan miktarı kontrol grubunda 8053.04 ± 803.02 , $5 \mu\text{M}$ İmatinib uygulanan hücrelerde 8113.86 ± 631.30 , $50 \mu\text{M}$ Gamitrinib uygulanan hücrelerde 21863.37 ± 771.89 ve kombine olarak $5 \mu\text{M}$ İmatinib ve $50 \mu\text{M}$ Gamitrinib uygulanan hücrelerde 23280.46 ± 462.90 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, K562R hücrelerinde İmatinib ve Gamitrinib'in tek başına ve kombine uygulamalarının Rh123 boyanması üzerinde anlamlı etki sergilemediği belirlenmiştir (Şekil 3.36; $p > 0.05$).

K562R-adh hücrelerinde, kontrol, $5 \mu\text{M}$ İmatinib uygulanan K562R-adh, $50 \mu\text{M}$ Gamitrinib uygulanan K562R-adh ve kombine olarak $5 \mu\text{M}$ İmatinib ve $50 \mu\text{M}$ Gamitrinib uygulanan K562R-adh hücrelerde total floresan miktarı sırasıyla 6546.98 ± 894.99 , 9713.55 ± 1061.60 , 6784.40 ± 371.58 ve 22800.41 ± 1681.11 olarak saptanmıştır. Bu sonuçlara göre, K56R-adh hücrelerinde ilaç uygulamaları Rh123 boyanması üzerindeki etkileri anlamlı olarak farklı bulunmamıştır (Şekil 3.36; $p > 0.05$).



Şekil 3.35. K562S, K562R, K562R-adh hücrelerinin rhodamine123 analizi



Şekil 3.36.K562S, K562R, K562R-adh hücrelerinin rhodamine123 grafiği

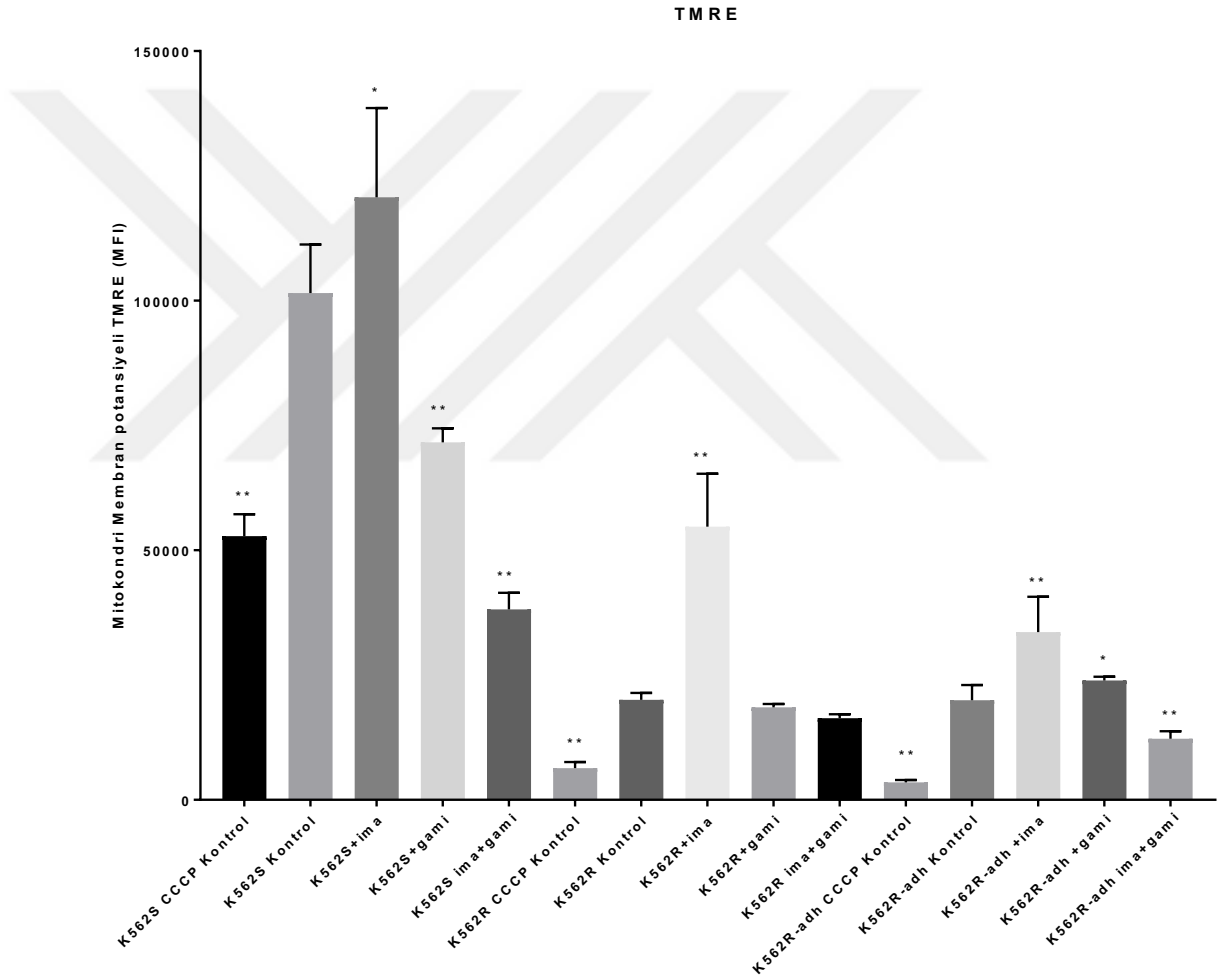
3.15. Mitokondriyal Membran Potansiyeli Sonuçları

TMRE boyanma sonuçlarına göre CCCP uygulanan, madde uygulanmayan kontrol, 5 μ M İmatinib uygulanan, 50 μ M Gamitrinib uygulanan ve kombine olarak 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562S hücrelerinde total floresan miktarları sırasıyla 52841.48 ± 1757.28 , 101521.58 ± 3913.54 , 120720.81 ± 7186.83 , 71627.60 ± 1134.27 , ve 38162.79 ± 1325.85 olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlara göre, TMRE boyanma şiddeti CCCP, Gamitrinib ve İmatinib/Gamitrinib uygulanan hücrelerde K562S hücrelerine göre anlamlı ($p < 0.001$) olarak azalırken, İmatinib uygulanan K562S hücrelerinde ise anlamlı olarak artmıştır (Şekil 3.37).

K562R hücrelerinde ise CCCP uygulanan hücrelerdeki TMRE floresan şiddeti 6365.87 ± 485.04 olarak ölçülürken madde uygulanmayan kontrol, 5 μ M İmatinib uygulanan, 50 μ M Gamitrinib uygulanan ve kombine olarak 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan K562R hücrelerinde sırasıyla 20020.26 ± 570.68 , 54746.30 ± 4254.74 , 18520.67 ± 271.57 ve 17641.78 ± 2120.70 olarak ölçülmüştür. Bu sonuçlara göre CCCP uygulanan ve İmatinib uygulanan K562R hücrelerinde TMRE floresan şiddetinde anlamlı azalma ($p < 0.001$) saptanmıştır. Gamitrinib ve İmatinib+Gamitrinib uygulanması kontrol grubuna göre TMRE floresan şiddetini azaltsa da bu azalma anlamlı bulunmamıştır (Şekil 3.37).

K562R-adh hücrelerinde, total floresan miktarı CCCP uygulanan grupta 3494.0967 ± 196.36 , kontrol grubunda 19938.17 ± 1230.52 , 5 μ M İmatinib uygulanan hücrelerde 33602.74 ± 2847.27 , 50 μ M Gamitrinib uygulanan hücrelerde 23904.24 ± 300.31 ve kombine olarak 5 μ M İmatinib ve 50 μ M Gamitrinib uygulanan hücrelerde ise 12242.63 ± 597.24 bulunmuştur. TMRE boyanması CCCP uygulanan hücrelerde kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0.001$) olarak azalmış, İmatinib uygulanan hücrelerde ise anlamlı

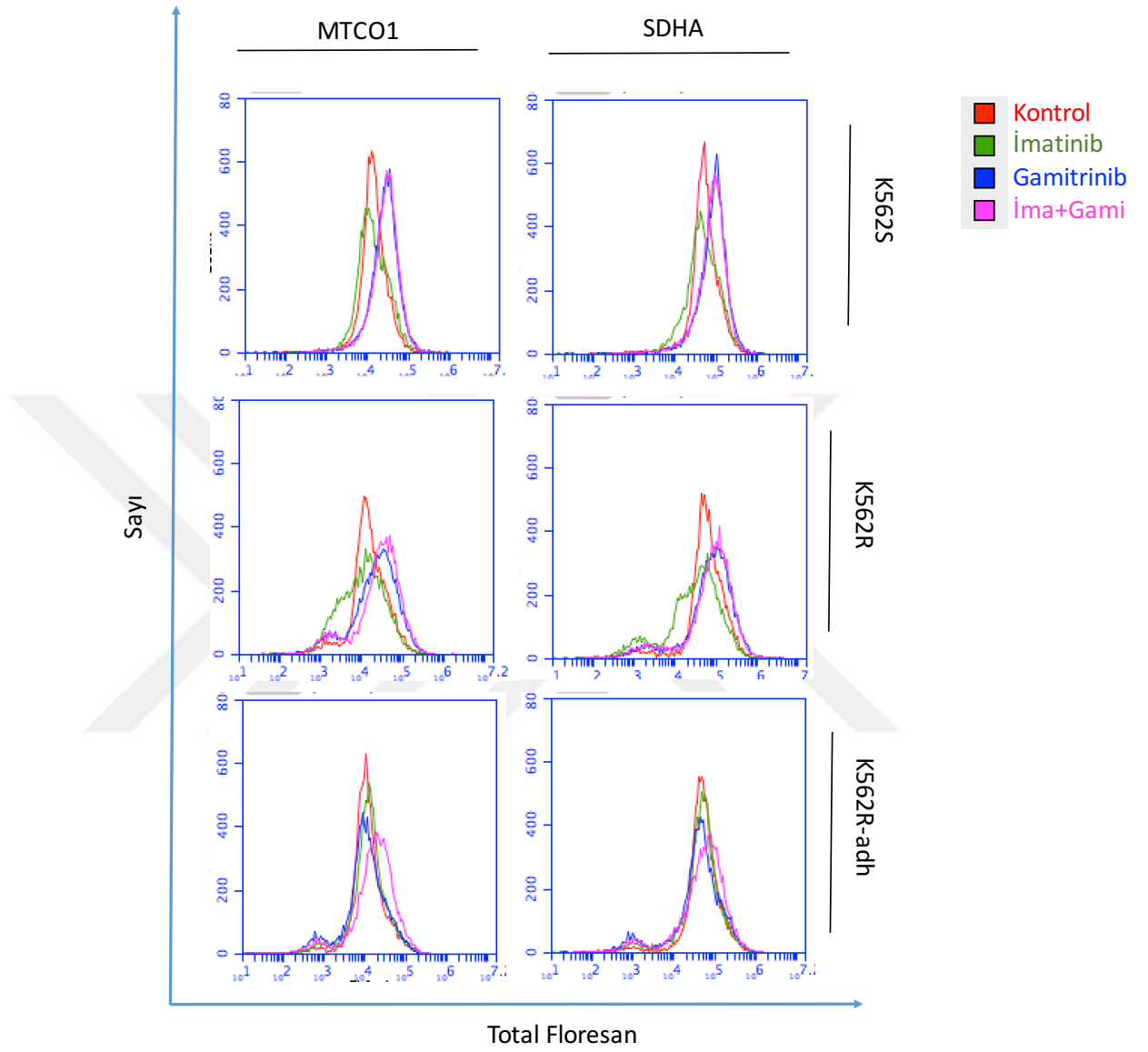
($p<0.001$) olarak artmıştır. TMRE floresan şiddeti diğer ilaç uygulanan K562R-adh hücrelerle kontrol K562R-adh hücreler arasında anlamlı farklılık sergilememiştir (Şekil 3.37).



Şekil 3.37. K562S, K562R, K562R-adh hücrelerinin TMRE grafiği

3.16. Mitobiyogenez Analizi

Çalışmamızda biri mitokondriyal DNA (mtDNA) tarafından kodlanan Kompleks IV' ün (COX-I) 1. altbirimi olan MTCO1 proteinine diğeri ise Kompleks II'nin (SDH-A) 70 kDa'luk alt ünitesini oluşturan ve nükleer DNA tarafından kodlanan SDHA proteinine özgü antikorlar kullanılarak hücrelerde bu iki protein arasındaki oranın akım sitometri yöntemi ile değerlendirmesi yapılmıştır. MTCO1/SDHA oranındaki değişimler biyogenezdeki değişimleri saptamamıza olanacak sağlamıştır. Hücrelerdeki mitobiyogenez oranı sırasıyla K562S hücrelerinde 1 iken, İmatinib, Gamitrinib ve kombine uygulanan K562S hücrelerinde bu oran sırayla 1.18 ± 0.78 ($p < 0.05$), 1.39 ± 0.84 ($p < 0.001$) ve 1.5 ± 0.88 ($p < 0.001$) olarak bulunmuştur. K562R hücrelerde ise kontrol grubu 1 olarak hesaplanırken, İmatinib, Gamitrinib ve kombine ilaç uygulanan grupta sırayla 1.21 ± 0.076 ($p < 0.05$), 1.26 ± 0.62 ($p < 0.001$) ve 1.48 ± 0.88 ($p < 0.001$) oranında bulunmuştur. K562R-adh hücrelerinde kontrol grubunda oran 1 olarak hesaplanırken İmatinib, Gamitrinib ve kombine uygulanan hücrelerde sırayla 1.16 ± 0.05 , 1.05 ± 0.30 ve 1.51 ± 0.49 ($p < 0.001$) oranı ile hesaplanmıştır (Şekil 3.38).



Şekil 3.38. K562S, K562R, K562R-adh hücrelerinin mitobiyogenez sonuçları

4. TARTIŞMA

BCR-ABL füzyon proteinin oluşması ile tanımlanan KML miyeloproliferatif bir hastalıktır. BCR-ABL füzyon proteini yüksek tirozin kinaz aktivitesine sahiptir, bu nedenle KML tedavisinde tirozin kinaz inhibitörleri kullanılmaktadır. İmatinib birinci nesil tirozin kinaz olarak, KML tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak tedavi sürecinde, bazı hastalarda İmatinib'e karşı direnç gelişimine, tedavinin başarısız olmasına ve hastalığın tekrarlamasına neden olmaktadır.

KML'de ilaç direncinden sorumlu mekanizmaların araştırıldığı bu tez çalışmasında, İmatinib'e duyarlı K562S ve kendi laboratuvarımızda 5 µM İmatinibe karşı dirençli hale getirdiğimiz K562R hücreler kullanılmıştır.

Dirençli hücrelerin kültürü esnasında, İmatinib'in varlığında belli bir hücre popülasyonunun yapışan hücre özelliği gösterdiği tespit edilmiştir ve bu hücrelere K562R-adh adı verilmiştir.

Yapışan bu hücre popülasyonunun KML kökenli olduğundan emin olmak amacı ile, qRT-PCR ve FISH tekniğiyle BCR-ABL geninin hem mRNA seviyesinde ve hem protein seviyesinde varlığı gösterilmiştir.

Puissant ve arkadaşlarının yaptığı çalışma da aynı şekilde İmatinib varlığında dirençli hale getirdikleri K562 hücrelerinin kültürü esnasında yapışan hücrelerin varlığı tanımlanmıştır (Puissant ve ark., 2012). Bu çalışmada K562 yapışan hücrelerin kök hücre özelliklerini taşıdığı ve EMT'nin gerçekleştiğini göstermek amacı ile hücre yüzey

glikoproteini olan ve hücreler arası etkileşimden, hücre adezyonu ve göç etmesinden sorumlu olan CD44 ve CD24 ifadeleri araştırılıp, bunun sonucunda K562 yapışan hücrelerinde (IM-adh), CD44'ün yüksek ifade olduğu ve CD24 ifadesinin azaldığı gösterilmiştir. Diğer yandan duyarlı IM-S hücrelerde CD44 ^{düşük} /CD24 ^{yüksek} olarak bulunmuştur (Puissant ve ark., 2012).

CD24 ve CD44, her ikisi hücre yüzey glikoproteinleri olarak hücreler arası etkileşimden, hücre göçü ve adezyonundan görev almaktadırlar. Her ne kadar CD44 çok sayıda memeli hücre tipinde ifade ediliyor ve lenfosit aktivasyonu, resirkülasyon (dolaşım), homing ve hematopoezi içeren bir çok çeşitli hücresel fonksiyonlara katılsa da, CD24 ifadesi çoğu B lenfosit ve farklılaşan nöroblastlarla sınırlıdır (Gires 2011). Normal olarak embriyonik gelişimden sonra susturulmuş EMT programları, metastaz bölgelerinde yayılma, kolonizasyon/homing ve çoğalmadan sorumlu mezenkimal bir fenotip elde etmek için CD44 yüksek/CD24 düşük hücreler tarafından yeniden aktive edilir.

Bu tez çalışmasında da Puissant ve arkadaşlarının sonuçları ile uyumlu olarak K562R-adh ve K562R hücre popülasyonunda K562S hücreleri ile kıyaslandığında gen ifadeleri CD44 ^{yüksek} / CD24 ^{düşük} olarak bulunmuştur.

Bu sonuçlara istinaden, K562R-adh hücrelerinde hücre karakterizasyonunu daha detaylı incelemek amacı ile K562S, K562R ve K562R-adh hücrelerinde integrin ve kanser kök hücre panelinde bulunan birçok genin ifadesi PCR array ile araştırılmıştır.

İntegrin panelinde yer alan ve sadece K562R-adh hücrelerde K562R hücrelerine kıyasla 2 kat ve üzerinde ifade artışı gösteren genler en yüksek kat artışından en düşük kat

artışına doğru sıralandığında, COL4A2, FN1, ITGA5, ITGA4; CTNNA1, ECM1, LAMC1 ve CNTN1 genleri olarak bulunmuştur.

K562R-adh hücrelerinde K562R hücrelerine göre 23.14 kat artışla en fazla kat ifade artışını sergileyen COL4A2 (kolajen tip 4 alfa 2) geni, bazal membranların başlıca yapısal bileşeni olan tip 4 kolajenin alt ünitelerinden birini kodlama fonksiyonunu üstlenmektedir. Bu alt ünitenin kanstatin olarak adlandırılan C-terminal kısmının, anjiyogenezin ve tümör büyümesinin bir inhibitörü olduğu bilinmektedir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1284>). COL4A2'nin, bağlanma partnerleriyle doğru etkileşimi, bazal membranda kollajen yapının bir arada kalmasını ve böylece bazal membranın bütünlüğünü sağlamaktadır. Bu etkileşimdeki bozukluklar ECM'de defektlere ve kanser anjiyogenezine yol açabilmektedir (Kurban ve ark., 2008). Literatürde COL4A2'nin kanserle ilişkisine dair çeşitli önemli bulgular ortaya konulmuştur. 2007 yılında yapılmış bir çalışmada merkezi sinir sisteminin primer tümörlerinde, COL4A2 aşırı ifadesi tümörlerde yüksek proliferasyon ve zayıf prognozla ilişkilendirilmiştir (Lukashova-v Zangen ve ark., 2007). Beyin metastazlı akciğer ve melanoma kanserlerinde anjiyogenezle ilişkili genlerin araştırıldığı bir çalışmada ise, diagnoz yapılan bütün gruplarda COL4A2'nin 50 katın üzerinde ifade sergilediği gösterilmiştir (Ilhan-Mutlu ve ark., 2016). Triple negatif meme kanserinde COL4A2 siRNA'sının, bu hücrelerin göçünü ve proliferasyonunu baskıladığı bildirilmiştir (JingSong ve ark., 2017). Bu çalışmaların yanısıra, COL4A2'nin özofagus kanserinde diagnostik bir belirteç olduğu (Warnecke-Eberz ve ark., 2016) ve prostat kanseri (Zhu ve ark., 2015), gastrik kanser (Mitchell ve ark., 2014) ve over kanseri (Brown ve ark., 2015) gibi farklı kanserlerin patogenezinde de rol oynadığına dair çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. COL4A2'nin kanserde ilaç direci gelişimindeki rolünün doğrudan araştırıldığı bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Ancak, 2012 yılında yapılmış olan bir çalışmada periton yayımlı gastrik kanserin rodent modelinde sisplatinin MDR1 ifadesini arttırdığı ve p38 MAPK inhibitörü ve sisplatin kombinasyonunun ise MDR1 ifadesini azaltmanın yanısıra COL4A2 ifadesini de azalttığı ve karın yayımlı gastrik kanserin tedavisinde başarılı etkiler sergilediği bildirilmiştir.

(Graziosi ve ark., 2012). Literatürde COL4A2'nin lösemi ve ilaç dirençli lösemi hücrelerindeki rolünün araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez çalışmamızda elde edilen bulgular, COL4A2'nin, ilaç dirençli lösemi hücrelerinin adherensinde fonksiyon gösteriyor olabileceğine işaret etmektedir. Böylece, adheren karakterli ilaç dirençli KML hücrelerinde bu genin hedeflenmesi, terapötik bir yaklaşım geliştirilmesine olanak sağlayabilir.

İntegrin panelinde yer alan bir başka gen olan FN1 (fibronektin 1) geni de K562R-adh hücrelerinde K562R hücrelerine göre 6,62 kat artış sergilemiştir. Fibronektin geni, plazmada çözünür dimerik bir formda bulunan bir glikoprotein olan fibronektini kodlamaktadır. Fibronektin, hücre adhezyonu ve göç prosesleri ile yakından ilişkilidir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2335>). Fibronektinin farklı tipteki kanserlerdeki rolüne ilişkin çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. FN1 upregülasyonunun pankreatik kanal adenokarsinomunun esansiyel bir histolojik özelliği olan tüp oluşturarak büyümede ve agresif invazyonda rol oynadığı bildirilmiştir (Yamaguchi ve ark., 2019). FN1 geninin ifadesi ayrıca, lenf nodu metastazlı papiller tiroid kanserinde relapsla (Zhai ve ark., 2019), kolon kanserinde metastazla (Xie ve ark., 2019) adenokarsinomada zayıf hayatta kalımla (Alshabi ve ark., 2019), gastrik kanserde EMT geçişiyle ve zayıf prognozla ilişkilendirilmiş (B. Xu ve ark., 2019), oral skuamöz hücre karsinomunda ise inhibisyonunun, kanser gelişimini baskıladığı bildirilmiştir (Chen ve ark., 2019). Fibronektinin ayrıca akut myelojen lösemiye ilerleyen myelodisplastik sendromda da artmış ifade sergilediği belirlenmiştir (Mahadevan ve ark., 2006). Bu çalışmalarda genel olarak FN1'deki artışın kanser patogenezinde olumsuz bir rol üstlendiği ortaya çıkmaktadır. FN1'in kanser ilaç direncindeki rolünün araştırıldığı çalışmalarda ise, FN1'in taksana dirençli over kanserinde (Duran ve ark., 2017) ve vinkristine dirençli multiple myeloma hücrelerinde arttığı (Mutlu ve ark., 2012), ifadesinin akciğer kanserinde docetaksel direnci ile korelasyon sergilediği (Qin ve ark., 2016) ve FN1 inhibisyonunun ilaç dirençli meme kanserinde ilaca duyarlılığı arttırdığı (Yang ve ark., 2017) bildirilmiştir. Bizim de çalışmamızda ilaç dirençli K562R hücrelerin yüksek aderen

özellik gösteren K562R-adh fraksiyonunda bu genin ifadesini artmış olarak bulmamız, dirençli hücrelerin bu alt populasyonunda bu genin ayırıcı bir belirteç ve bir terapi hedefi olabileceğine işaret etmektedir.

Sonuçlarımıza göre, integrin panelinde K562R-adh hücrelerinde K562R hücrelerine göre en fazla artış sergileyen 3. gen, 6 kat fazla artış sergileyen ITGA5 (integrin subunit alpha 5) genidir. ITGA5 geninin kanser hücrelerinin hayatta kalımı, invazivliği ve ilaç direnci geliştirmesiyle ilişkisine dair çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. ITGA5 geninin ifadesi, prostat kanseri hücrelerinde apoptoza direnç ve invazivlikle (Martinucci ve ark., 2019), akciğer adenokarsinoma hücrelerinde zayıf prognozla (Yin ve ark., 2016) ve pankreatik duktal adenokarsinoma hücrelerinde ilaç direnciyle ilişkilendirilmiştir (Wang ve ark., 2015). Azasitidine cevap vermeyen hematopoietik progenitör hücrelerin sessizliğinde de ITGA5 sinyal yolağının görev yaptığı bildirilmiştir (Unnikrishnan ve ark., 2017). Bu literatür bulguları, ITGA5 geninin terapi direnci, invazivlik ve zayıf prognozla ilişkili olduğuna işaret etmektedir, bizim bulgularımız da literatürle uyumlu olarak daha agresif özellik sergileyen K562adh hücrelerde ITGA5 geninin yüksek ifadesini ortaya koymuştur. Ayrıca, tez çalışmamızda elde ettiğimiz K56Radh hücrelerinin sergilediği yüksek ITGA5 ifadesi, adheren ve süspanse dirençli hücreler için ayırıcı bir belirteç, bir terapi hedefi olabilir. Bu hücrelerin süspanse K562R hücrelerinden ayrımının yapılmasında bir belirteç ve bunun yanısıra adherens sergileyen dirençli hücrelerin ortadan kaldırılmasında bir terapi hedefi olarak düşünülebilir.

İntegrin sinyal ağında görev yapan NCAM1 (neural cell adhesion molecule 1) geni de K562R-adh hücrelerinde K562R hücrelerine göre 5.19 kat artışla en fazla artış sergileyen 4. gen olarak bulunmuştur. Bu gen, immünglobulin süper ailesinin bir üyesi olan bir hücre adhezyon proteinini kodlar. Bu protein, gelişim ve farklılaşma sırasında hücre hücre interaksyonlarından ve hücre-matriks interaksyonlarından sorumludur (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4684>). NCAM1'in kanserdeki rolüne ilişkin yapılmış çalışmalarda, NCAM1'in pediatrik Wilms tümöründe, heterojen bir hücre populasyonunun içerdiği küçük bir hücre fraksiyonunu oluşturan kanser kök hücre

fraksiyonunun iki belirticiden biri olarak belirlenmiştir (Shukrun ve ark., 2014). Nadir görülen bir hematolojik malignansi olan blastik plazmasitoid dendritik hücre neoplazmında NCAM1 ifade olunan genler arasında belirlenmiştir (Shukrun ve ark., 2014). Difüz büyük B hücre lenfomasında da NCAM1'in anormal ifadelendiği ve B hücre lenfoma alt tiplerinin belirlenmesi ve izlenmesinde kullanılabileceği önerilmiştir (Stacchini ve ark., 2012). Literatürde NCAM1'in kemoterapi direnci ile ilişkisi de araştırılmış ve ilaca dirençli ve yüksek agresiflik sergileyen olgun NK/T-hücre neoplazmı olan ektranodal NK/T-hücre lenfomasında belirli ölçüde CD56 fenotipik ifadesi tipik olarak saptanmıştır ve nazal tipteki ektranodal NK/T-hücre lenfomasında bu genin belirteç olabileceği önerilmiştir (Tse ve Kwong 2016, Hu ve Oki 2018). Bu çalışmalarla paralel olarak, çalışmamızda elde edilen bulgulardan hareketle, adheren ve adheren olmayan dirençli KML hücrelerimiz arasındaki ifade farklılığına dayanarak, dirençli KML hücrelerinin alt populasyonlarının belirlenmesinde ve takibinde NCAM1 geni kullanılabilir.

Çalışmamızda K562R-adh hücrelerde K562R hücrelerine göre artmış ifade sergileyen bir diğer gen olan Hyaluronan synthase 1 (HAS1) geni, integrin yolağında yer alan ve hyaluronan sentezinden sorumlu enzimi kodlayan gendir. Hyaluronan veya hyaluronik asit (HA), bakterilerden memelilere kadar çok çeşitli organizmalar tarafından sentezlenen yüksek moleküler ağırlıklı, dallanmamış bir polisakarittir ve hücre dışı matriksin bir bileşenidir. HA'nın, lökosit reseptörü CD44 ile etkileşimi, lökositler tarafından dokuya özgü aramada önemlidir ve HA reseptörlerinin aşırı ekspresyonu, tümör metastazı ile korelasyon göstermektedir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3036>). Kanserlerin büyük çoğunluğunda hyaluronan seviyeleri, artmış malignite ve kötü prognoz ile doğrudan ilişkilidir. Prostat kanserinde, örneğin, tümör stromasında artmış HA, hücre proliferasyonunda artış ve zayıf prognoz ile bağlantılı bulunmuştur (Josefsson ve ark., 2011). Meme kanseri üzerinde yapılan klinik çalışmalar, daha yüksek istilacı potansiyel sergileyen kanser hücrelerinde LMW - HA ekspresyonunun arttığını göstermiştir (Wu ve ark., 2015). Ayrıca, HER2 - pozitif meme tümörleri ve perineoplastik

stromadaki yüksek stromal HA boyama düzeyi, lenf nodu pozitif meme kanseri ve azalmış sağkalım ile ilişkilendirilmiştir (Auvinen ve ark., 2013). İleri evre mesane kanseri hastalarının idrarında (Morera ve ark., 2017) ve ileri evre baş boyun boynu skuamöz hücreli karsinom hastalarının tükürüğünde yüksek CD44 ekspresyonu ile birlikte yüksek konsantrasyonlarda LMW - HA tespit edilmiştir (Cohen ve ark., 2017). Bütün bu çalışmalar, özellikle tümör stromasındaki yüksek HA seviyeleri ile pro-tümörijenik mekanizmalar ve neoplastik progresyon arasında güçlü bir korelasyon olduğunu ortaya koymaktadır (Schwertfeger ve ark., 2015). Bununla birlikte, HA'nın kanserdeki rolü oldukça karmaşıktır ve bazı malignitelerin HA içeriğini azalttığı da bildirildiği için biraz tartışmalıdır. Örneğin, kötü farklılaşmış skuamöz hücreli karsinomlar, tümörle ilişkili stromadaki sabit HA ekspresyonuna rağmen düşük HA konsantrasyonu gösterir (Boregowda ve ark., 2006). Ayrıca, evre I kutanöz melanomlarının HA reseptörü CD44 seviyesinde azalma gösterdiği bildirilmiştir (Karjalainen ve ark., 2000). Bizim çalışmamızda HAS1'in K562R-adh hücrelerde K562R hücrelere göre artmış ifade sergilediği bulunmuştur. Bu artışın, hücrelerin yüzeye tutunma yeteneğinin değişmesine ve ekstraselüler matriksin tekrar modellenmesine yol açabilecek gen ifade artışları arasında olabileceği düşünülmektedir.

İntegrin panelinde yer alan ve K562R adh hücrelerde K562R hücrelerine göre 3.8 kat ifade artışı sergileyen PECAM-1 (CD31) geni, çeşitli hematopoetik hücrelerde ve endotel hücrelerinde ifade edilen immünoresptör tirozin bazlı inhibitör motif (ITIM) içeren bir yüzey glikoproteinidir. PECAM-1'in yapışma, göç ve apoptozun düzenlenmesinde rol oynadığı gösterilmiştir. İmatinib ile indüklenen apoptozu inhibe etmektedir. PECAM-1'in, İmatinib duyarlılıklarını modüle etmek için BCR / ABL eksprese eden hücrelerin yapışmasının yanı sıra apoptozun düzenlenmesinde rol oynayabileceği önerilmiştir ve Ph + lösemilerde terapötik hedef için olası bir aday olarak görülmektedir. BCR / ABL eksprese eden hücrelerde PECAM-1'in aşırı ifadesi, hücre yapışmasını arttırmaktadır ve kısmen ITIM'den bağımsız bir şekilde mitokondri depolarizasyonunu ve kaspaz-3 yarılmasını içeren İmatinib kaynaklı apoptozu kısmen

inhibe etmektedir (Wu ve ark., 2013). CD31, epitelyal-mezenkimal geişı indükleyerek hepatoselüler karsinomda tümör metastazı başlatır. ITGB1-FAK-Akt sinyal yolu CD31 için epitelyal-mezenkimal geişı indüklemesi için kritik öneme sahiptir (Y. Y. Zhang ve ark., 2018). Çalışmamızda K562R-adh hücrelerinde K562R hücrelerine göre saptanmış olan artmış PECAM-1 ifadesinin, bu literatür bulgularıyla uyumlu olarak, K562R hücrelerinin yapışma özelliği kazanmasında görev yaptığı düşünülmektedir.

İntegrin panelinde yer alan ITGA1 (Integrin subunit alpha 1) ve ICAM1 genleri de K562R-adh hücrelerinde K562R hücrelerine göre sırasıyla 3.37 ve 3.27 kat artışla daha fazla ifade sergilemişlerdir. ITGA1 geni, integrin reseptörlerinin alfa 1 alt ünitesini kodlamaktadır. ITGA1'in over kanserinde ilaç direncinin düzenlenmesinde görev alabileceği ve over kanserinin prognozu için potansiyel bir biyolojik belirteç olarak kullanılabileceği önerilmiştir (Wei ve ark.,2008). Pankreas duktal adenokarsinomu hücrelerinde ise ITGA1'in TGFβ/kolajen kaynaklı EMT ve metastaz için gerekli olduğu ve ITGA1'in yeni bir biyobelirteç ve hasta sonuçlarını iyileştirmek için yararlanılabilecek bir hedef olduğu gösterilmiştir (Gharibi ve ark., 2017). Elde ettiğimiz sonuçlara göre, artmış ITGA1 ifadesi, literatür bulgularıyla paralel olarak dirençli hücrelerimizin adherens sergileyen alt popülasyonunda EMT geişinin bir ifadesi olabilir. Dirençli adheran hücrelerde artmış ifade sergileyen ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) geni ise endotelial hücrelerde ve immün sistem hücreleri üzerinde ifade olan bir glikoproteini kodlar. İlaça direnç gösteren multiple myeloma hastalarında, ICAM-1 ekspresyonu ilaca yanıt veren hastalardan anlamlı olarak daha yüksek bulunmuş ve ICAM-1'in, ilaca cevap vermeyen hastaların tanımlanmasında moleküler belirteç olarak kullanılması önerilmiştir (Schmidmaier ve ark., 2006). Son yapılan çalışmalarda, ICAM1 hepatoselüler karsinoma kök hücrelerinin bir belirteci olarak kullanılmaya başlanmıştır (Liu ve ark., 2013). ICAM1'in, yüksek seviyede stemness faktörlerini ifade eden özofagus kanseri hücrelerinde yüksek seviyede exprese olduğu ve ICAM1'in ekspresyonunun yüksek olduğu, fare xenotransplantasyon modelinde kanser hücresi kütle veya sferoid oluşumuna, ilaca direncine ve tümörigenezise katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Tsai ve

ark., 2015). Çalışmamızda elde ettiğimiz dirençli adherent hücrelerde süspanse dirençli hücrelere göre artmış ICAM1 ifadesinin, literatür bulgularıyla paralel olarak, adherent dirençli hücrelerde ilaca yanıtı azalttığı düşünülmektedir. Diğer anlamlı fark sergileyen genlere benzer şekilde bu gen de ayrıca bu hücrelerin ayırımında belirteç olarak kullanılabilir.

Çalışmamızda integrin panelinde yer alan ITGA6 (Integrin subunit alpha 6) geni K562R-adh hücrelerinde K562R hücrelerine göre 3.24 kat artış göstermiştir.

K562R-adh hücrelerinde artmış ifade sergileyen ITGA6 (integrin alfa 6)'nın yüksek ifadesinin pankreatik kanserlerde invazyon ve metastazı başlattığı ve kötü prognozun bir belirteci olduğu bildirilmiştir (Wu ve ark., 2019). ITGA6'nın HIF'ye bağlı düzenlenmesinin, meme kanserlerinde KKH ve metastatik fenotipleri arttırdığı bir mekanizma olduğunu gösterilmiştir (Brooks ve ark., 2016). ITGA6, over kanseri ve ilaç direnci ile anlamlı şekilde ilişkili bulunmuştur. ITGA6'nın yüksek ifadesi tedaviye kötü sonuçla ilişkilendirilmiş ve ITGA6'nın over kanserinde ilaç direncinin düzenlenmesindeki rolünün daha iyi anlaşılması ile over kanserinin prognozu için potansiyel bir belirteç olabileceğini göstermişlerdir (Wei ve ark., 2019). İntegrin $\alpha 6$ (ITGA6) 'nın Artmış İfadesinin, akut Lösemilerde İlaç Direncini Arttırdığı da bildirilmiştir (Yamakawa ve ark., 2012). Bir başka integrin olan ITGA4 (İntegrin alfa4) inhibisyonunun ilaca dirençli pre-B akut lenfoblastik lösemiye kemoterapiye duyarlı hale getirdiği bildirilmiştir. Literatür bulgularında bildirildiği üzere bu genin kötü prognoz ile pozitif korelasyon sergilediği dikkate alındığında, K562R-adh hücrelerinde bu gen hedeflenerek ilaç direncinin geri döndürülmesine yönelik terapi yaklaşımları geliştirilebilir.

Çalışmamızda, integrin sinyal yolağında yer alan CTNNA1 geni de K562R-adh hücrelerinde, K562R hücrelerine göre 2,56 kat artmış ifade sergilemiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, CTTNA1'in normal hematopoietik kök hücrelerde (HSCs) eksprese edildiğini ancak AML'de, insan lösemi başlatıcı hücrelerde (human leukemia initiating

cells (LICs)) ekspresyonunun oldukça düşük olduğunu göstermiştir. PTEN, CEBPalfa ve CTNNA1 gibi tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonunun kaybının, lökomogenezde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Fu ve ark., 2010). Çeşitli solid tümörlerden myeloid malignansilere dönüşen insan kanser hücre serilerinde, CTNNA1 fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlar ya da CTNNA1 seviyelerinde azalma olduğu ve hastalık ilerlemesiyle yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir (Liu ve ark., 2007) ve bizimde sonuçlarımız bu çalışmalarla uyumludur.

Çalışmamızda K562 R adh hücrelerde, K562R hücrelerine göre 2,54 kat artmış ifade sergileyen hücre dışı matriks proteini 1 (ECM1), epitelial organlarda ifade edilen ve hücre dışı stroma içine salgılanan bir glikoproteindir (Lee ve ark., 2015). İnvaziv duktal meme karsinomları, larenks karsinomları, hepatoselüler karsinomlar, kolanjio karsinomalar, özofagus skuamöz hücreli karsinomalar, gastrik, kolorektal, akciğer ve tiroid kanserleri dahil olmak üzere, çeşitli malignitelerde artan ECM1 ekspresyonu bildirilmiştir (Kebebew ve ark., 2006, Xiong ve ark., 2012). Hepatoselüler karsinoma örneklerinde yüksek bir ekspresyon sergileyen ECM1, klinikopatolojik verilerle yakından ilişkilidir ve EMT'yi indükleyerek hepatoselüler karsinoma hücrelerinin migrasyonunu ve invazyonunu indükler (Chen ve ark., 2016). Literatür bulgularıyla uyumlu olarak, bu tez çalışmasında ECM1 ifadesi K562R-adh hücrelerde süspanse K562R hücrelerine kıyasla artmıştır.

K562R-adh hücrelerimizde K562R hücrelere göre artış gösteren integrin panel genleri arasında LAMC1(2.35 kat) ve CNTN1(2.27 kat) de bulunmuştur. LAMC1, bir ekstraselüler matriks proteini olan ve doku gelişimi, tümör hücre invazyonu ve metastazı gibi pek çok biyolojik ve patolojik süreçte yer alan laminin γ 1chain'i kodlar. Yapılan bir çalışmada, LAMC1 protein ve mRNA düzeylerinin hepatoselüler karsinoma dokularında kanser olmayan dokularla karşılaştırıldığında artmış olduğu bulunmuştur (Zhang ve ark., 2017) LAMC1'in glioma ilerlemesinde önemli rol oynadığı ve teşhis ve tedavide

kullanılabileceği belirtilmiştir (Liu ve ark., 2019). Çalışmamızda K562 LAMC1 gen ifadesi Radh hücrelerde, K562R hücrelerine göre 2,35 kat artmış bulunmuştur. Literatürde lösemi hücrelerinde LAMC1 ifadesinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

İmmünoglobulin (Ig) familyasının bir üyesi olan Contactin-1 (CNTN1), bir nöronal hücre adezyon molekülü olarak işlev gören bir glikosilfosfatidilinositol (GPI) bağlı nöronal membran proteinidir (Falk ve ark., 2002). CNTN1, insan beyni ve sinir dokularında bol miktarda bulunur ve sinir sistemi gelişiminde önemli rol oynar (Bizzoca ve ark., 2012). Son zamanlarda, çeşitli çalışmalar, CNTN1'in, akciğer adenokarsinomu, skuamöz karsinom, hepatoselüler karsinom ve mide kanseri gibi birçok kanserin ilerlemesinin önemli bir aracı olduğunu ortaya koymuştur (Liu ve ark., 2012, H. M. Wu ve ark., 2012). Çalışmamızda, literatürde CNTN1'in kanserleşme ile korelasyon gösterdiğine ilişkin bu bulgularla paralel olarak K562 R adh hücrelerinde, K562R hücrelerine göre 2,28 kat artmış CNTN1 ifadesi bulunmuştur.

İntegrin panelinde yer alan ve çalışmamızda K562R hücrelerinde K562S hücrelerine göre %50 ve üzerinde kat azalma gösteren genler yüksek kat azalışından düşük kat azalışına göre sıralandığında ITGB2, MMP10, LAMB3, ADAMTS13, MMP15, ITGAX, ITGB7 ve THBS2 genleri olarak belirlenmiştir.

ITGB2 (Integrin beta zinciri-2, CD18), insanlarda ITGB2 geni tarafından kodlanan bir integrin beta zinciri proteinidir. CD18, hücresel yapışma ve hücre yüzeyi sinyalleşmesinde ve ayrıca immün sistemde önemli roller oynamaktadır. CD18 ekspresyonundaki eksiklikler, insanlarda dolaşımdaki beyaz kan hücrelerinde yapışma kusurlarına yol açarak bağışıklık sisteminin yabancı istilacılarla savaşma kabiliyetini azaltır (Arnaout 1990). Çalışmamızda ise K562R hücrelerinde K562S hücrelerine kıyasla 0,01 kat azaldığı tespit edilmiştir. Hücrelerimizde ITGB2'nin ilaç direncinde azalışını

destekleyen bir çalışmada ise prednisone, vincristine ve melphalan direnci geliştirilen RPMI-8226 miyeloma hücrelerinde mikroarray çalışması yapılmış ve çeşitli ECM elementlerinin ekspresyonları araştırılmıştır. ITGAL ve ITGB2'nin ekspresyonlarının vincristine dirençli hücrelerde artarken prednisone dirençli hücre popülasyonlarında azaldığı tespit edilmiştir (Mutlu ve ark., 2012).

Çalışmamızda, K562R hücrelerinde K562S hücrelerine göre azalmış ifade sergileyen genler arasında MMP10 ve MMP15 genleri de belirlenmiştir. MMP'ler, ECM proteinlerinin parçalanması ve yeniden şekillenmesi ile ilgili stroma bölmesinde üretilen, bir enzim ailesidir. Graudens ve arkadaşları, ilaç dirençli tümörlerde MMP kodlayan genlerin düşük ifadesini bildirmişlerdir (Graudens ve ark., 2006). Çalışmamızda, bu literatür bulgusuna paralel olarak dirençli hücrelerde düşük MMP-10 ve MMP-15 ifadesi belirlenmiştir.

K562R hücrelerinde K562S hücrelerine göre daha düşük ifadesini belirlediğimiz bir başka gen olan LAMB3 geninin ifade düzeylerinin ise tiroid kanser hastalarında artmış olarak bulunması bu genin proliferasyon ve metastaz ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur (Wang ve ark., 2018). 2010 yılında yapılmış olan bir diğer çalışmada ise LAMB3 geninin hipermetilasyonla azalmış ifadesinin kanserde sisplatin direncinde rol oynuyor olabileceği önerilmiştir (Chang ve ark., 2010). Bizim de çalışmamızda bu literatürle uyumlu olarak İmatinib dirençli K562 hücrelerinde LAMB3 ifadesi K562S hücrelerine kıyasla azalmış olarak belirlenmiştir.

İntegrin sinyal yolağında yer alan ve K562R hücrelerinde K562S hücrelerine göre azalmış ifade sergileyen bir gen olan ITGAX 'ın HUVEC'lerdeki aşırı ekspresyonunun, over kanseri hücrelerinin sferoid oluşumunu uyarabildiği ve ITGAX'in kanser gelişimi sırasında PI3K / Akt sinyal aracılı VEGFR2 / VEGF-A aşırı ekspresyonu yoluyla

anjyogenezi uyardığı bildirilmiştir (J. Wang ve ark., 2019). Başka çalışmalarda ise, ITGAX geni, yeni agresif prostat kanserine ve melanomaya yatkınlık genleri arasında bildirilmiştir (Lenci ve ark., 2012, Williams ve ark., 2014). Literatür bulguları değerlendirildiğinde, kanserleşme sürecinde ITGAX'in genel olarak artmış ifade sergilediği bildirilmiştir. Çalışmamızda, literatürden farklı olarak dirençli K562 hücrelerinde bu genin ifadesi azalmış olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda, K562R hücrelerinde K562S hücrelerine göre azalmış ifade sergileyen bir diğer gen ise metalloproteinaz olan ADAMTS13'tir, bu genin ürünü olan protein spesifik olarak, multimerik von Willebrand faktörü (VWF), Tyr1605 ve Met1606 rezidüleri arasında A2 domaininde yıkar. ADAMTS13, endotel hücrelere komşu olan, hepatik satellit hücrelerinde üretilir. VWF, vasküler endotel hücrelerde sentezlenir ve plazmaya, büyük VWF multimerleri olarak salınır. ADAMTS13 ve VWF arasında dengesizlik, VWF multimerlerinin uygunsuz olarak yıkılmasına, birikmelerine ve yüksek shear stres altında, platellet trombus oluşumunun indüklenmesine neden olur (Takaya ve ark., 2019). ADAMTS13, mikrovaskülatürde ateroskleroz ve inmede önemli bir koruyucu etki yaratır. ADAMTS13'ün plazmadaki seviyelerinin azalması ve artmış VWF seviyeleri, kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklar ile (ateroskleroz, inme ve vasküler yeniden modellenme gibi) ilişkilidir (Andersson ve ark., 2012). ADAMTS13, çalışmamızda, dirençli hücrelerde, duyarlı hücrelere göre, 0,24 kat azalmıştır. Literatürde, kemoterapiye dirençli bir intravascular büyük B-hücre lenfoması (IVL) hastasında düşük ADAMTS13 ifadesi bildirilmiştir (Kanno ve ark., 2008). Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular bu yayınla paralellik göstermektedir, dirençli K562 hücrelerinin sergilediği düşük ADAMTS13 ifadesi, bu hücrelerin duyarlı hücrelerden ayrımının yapılmasına ve takibine ilişkin bir belirteç ve bir terapötik hedef olabilir. Literatürde KML ve İmatinib dirençli KML'de ADAMTS13 gen ifadesine ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır.

K562R hücrelerinde K562S hücrelerine göre azalmış ifade sergileyen THBS geni tarafından kodlanan protein, trombospondin ailesine aittir. Hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimlerine aracılık eden disülfid bağlı bir homotrimerik glikoproteindir. Bu proteinin, güçlü bir tümör büyümesi ve anjiyogenez inhibitörü olarak işlev gördüğü gösterilmiştir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7058>). siHa servikal kanser hücrelerinde THBS2'nin azalmış ifadesinin hücrelerin proliferasyon, invazyon ve migrasyonunu arttırdığı bildirilmiştir (Sun ve ark., 2019). Ayrıca, THBS2 ifadesi artmış olan mesane kanseri hücrelerinde ECM-reseptör etkileşimi ile ilişkili gen kümelerinin zengin olduğu ve ayrıca artmış THBS2 ifadesinin diğer aday genlerle birlikte mesane kanserinin ilerlemesi ve prognozu için biyobelirteç olabileceği bildirilmiştir (Shi ve Tian 2019).

Bizim çalışmamızda, literatürde yer alan bazı çalışmalar ile paralel olarak K562R hücrelerinde K562S hücrelerine kıyasla THBS gen ifadesi azalmış olarak bulunmuştur.

K562R hücrelerinde K562S hücrelerine göre azalmış ifade sergileyen ITGB7 geni, integrin süper ailesinin bir üyesi olan bir proteini kodlar. Bu ailenin üyeleri, hücre dışı matristen hücreye sinyal vermede işlev yapan adezyon reseptörleridir. İşlevsel olarak, ITGB7'nin shRNA aracılı susturulmasının, hücre dışı matriks elemanlarına (fibronektin, E-kadherin) MM-hücresi yapışmasını azalttığını ve onları bortezomib ve melfalan'a duyarlı hale getiren hücre yapışma aracılı ilaç direncini (CAM-DR) tersine çevirdiği bildirilmiştir. Bir başka çalışmada ise, trizomi 12 kronik lenfositik lösemi hücrelerinde integrin sinyalizasyonunun arttığı bildirilmiştir (Riches ve ark., 2014). Bu çalışmalarda da bildirildiği gibi ITGB7 geni, kanserleşme sürecinde önemli rol oynayan bir gendir ve bu nedenle bizim hücrelerimizde de direnç gelişimi sırasında sergilediği ifade değişimi oldukça anlamlıdır.

Kök hücre paneli genler arasında yer alan genler arasında K562R-adh hücrelerde, K562R hücrelerine göre SOX2, KLF4, ALDH1A1 ve CD24 genleri iki kattan daha fazla artış göstermişlerdir. K562R-adh hücrelerde K562R hücrelerine göre 10.05 kat artışla en fazla kat artışı sergileyen SOX2 (SRY-box transcription factor 2) geni, embriyonik gelişimin düzenlenmesinde ve hücre kaderinin belirlenmesinde rol alan SRY ile ilgili HMG-box (SOX) transkripsiyon faktörleri ailesinin bir üyesini kodlar. Bu genin ürünü, merkezi sinir sistemindeki kök hücre bakımı için gereklidir ve ayrıca midede gen ekspresyonunu da düzenler (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6657>). SOX2 ekspresyonunun düzensizliği, kanser patogeneze katkıda bulunan önemli bir faktördür. Sayısız araştırma, SOX2 gen lokusunun amplifikasyonunun ve artmış SOX2 ifadesinin kanser ilerlemesini etkilediğini bildirmiştir. SOX2 kanser hücrelerinde proliferasyon, epitelial-mezenkimal geçiş (EMT), göç, istila, metastaz, sferoid ve koloni oluşumu, tümörün başlatılması, kanser kök hücre oluşumu, apoptoz ve tedaviye direnç gibi birçok özelliği kontrol eder. İlginç bir şekilde, SOX2'nin sergilediği etki kanser tipine bağlı olarak değişebilir. Bass ve ark, SOX2 lokusunun özofagus ve akciğer skuamöz hücreli karsinomlarda (SCC'ler) çoğaldığını ve bunun sonucunda gerçekleşen SOX2 ifade artışının ankorajdan bağımsız büyüme ve SCC (skuamöz hücre karsinoma)'lerin artmasına yol açtığını göstermiştir (Bass ve ark., 2009). SOX2'nin kanserdeki ifadesi araştırıldığında genel olarak artmış ifade profili sergilediği belirlenmiştir. Meme, kolorektal kanser, özofagus kanseri, glioblastoma, karaciğer kanseri, akciğer adenokarsinomu, narofarinks kanseri, prostat kanseri, sinonasal kanser, küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, over kanseri ve baş ve boyun kanserinde artmış ifade sergilediği, gastrik kanserde ise azalmış ifade sergilediği bildirilmiştir. Kanser gelişiminde ve terapi direncinde önemli rol oynayan faktörlerden biri de kanser kök hücrelerin varlığıdır. Kanser kök hücre (KKH) modeline göre, tümör kitlesi içerisinde tedaviye dirençli küçük bir kök hücre benzeri hücre popülasyonu bulunmakta ve bu popülasyon bir tümörün büyümesini sürdürmekte ve başlangıçta başarılı bir tedaviden sonra nükslere neden olmaktadır (Kreso ve Dick 2014). Kanser kök hücreler, kendini yenileme kapasitesini normal kök hücrelerle paylaştığından ve SOX2, pluripotent kök hücrelerin 'stemness'ının korunmasında önemli bir rol oynadığından, birçok çalışmanın SOX2'nin, KKH'nin 'stemness' ve kendini yenilemesini

düzenlemeyle ilgili olduğunu bildirmesi şaşırtıcı değildir. Çalışmamızda, K562R-adh hücrelerinde SOX2 geninin artmış ifade sergilemeleri, bu hücrelerin K562R hücrelere kıyasla daha yoğun bir şekilde kök hücre karakteri kazanmasıyla ilişkilendirilebilir.

Meme kanserinde, SOX2 eksprese eden bir kök hücre popülasyonunun östrojen reseptörü antagonisti tamoksifen ile tedaviye direnç gösterdiği bildirilmiştir. Bu popülasyonun büyüklüğü ve tamoksifene karşı direnci, SOX2 ekspresyonu ile pozitif yönde ilişkilidir (Piva ve ark., 2014). SOX2'nin terapi direnci ile ilişkisine ve bu ilişkinin geniş bir moleküler mekanizma aracılığıyla gerçekleştiğine dair birçok çalışma bulunmaktadır. Meme kanseri kök hücrelerinin paklitaksele duyarlılığının SOX2 varlığına bağlı olduğu, SOX2'nin yıkılmasının kemosenesitiviteyi arttırarak bu hücrelerin istila kapasitesini azalttığı saptanmıştır (Mukherjee ve ark., 2017). Benzer şekilde, tamoksifene karşı dirençli olan kök hücre benzeri fenotipli meme kanseri hücrelerinin direncinin de SOX2'nin (Piva ve ark., 2014) düşürülmesiyle ortadan kaldırılabildiği gösterilmiştir (Mukherjee ve ark., 2017). PC3 prostat kanseri hücrelerindeki yüksek SOX2 seviyelerinin de, PI3K / Akt yolunu aktive ederek paklitaksele karşı direnci arttırdığı bildirilmiştir (Li ve ark., 2014). Yumurtalık kanseri hücre hatlarının, ektopik olarak SOX2'yi aşırı eksprese ettikten sonra karboplatin, sisplatin ve paklitaksele karşı direnç geliştirdiği bildirilmiştir. Öte yandan, SOX2-pozitif over kanseri hücrelerinde SOX2'nin baskılanmasının, onları bu bileşiklere duyarlı hale getirdiği bildirilmiştir (Bareiss ve ark., 2013). Prostat kanserinde olduğu gibi, yumurtalık kanserinde de paklitakselin direncinin PX3K / Akt yolu ile SOX2 tarafından desteklendiği gösterilmiştir (Li ve ark., 2015). Glioblastoma ve medulloblastomada da SOX2'nin ilaç direncinin bir aracısı olduğu doğrulanmıştır (Vanner ve ark., 2014, Song ve ark., 2016). Gastrik kanserde, doksorubisine karşı gelişen kemodirencin, SOX2'nin düşürülmesinden sonra azaldığı bildirilmiştir (Tian ve ark., 2012). Yüksek SOX2 ekspresyonu pankreas kanserinde gemsitabin direncinde de gösterilmiştir (Jia ve ark., 2019). Bütün bu çalışmalar, SOX2'nin farklı kanser tiplerinde ilaç direncinin gelişimi ile korelasyonunu ortaya koymaktadır. Çalışmamızda K562R hücrelerinde K562S hücrelerine göre ve K562R-adh hücrelerde K562R hücrelerine göre belirlediğimiz artmış SOX2 ifadesi bu çalışmalarla da paralellik göstermektedir ve

SOX2'nin tek başına ya da kombine terapilerle hedeflenmesi, dirençli K562 hücre modelinde direncin ortadan kaldırılmasında olumlu sonuçlar verebilir.

KLF4, K562R-adh hücrelerde K562R hücrelerine göre 3,5 kat artış göstermiştir. Nükleer KLF4 birikimi, cetuximab ilaç direnci ile ilişkilidir ve nazofarengeal karsinomun (NPC) kötü prognozunu öngörmektedir. NPC hastalarında KLF4 ekspresyonu ile epitelyal-mezenkimal geçiş (EMT) biyobelirteçleri arasındaki klinik korelasyonu ortaya koymuşlardır. KLF4'ün stemness fenotipini azaltmak, EMT'yi inhibe etmek ve tümör ilerlemesini önlemek için NPC'de bir tümör baskılayıcı olarak işlev gördüğü gösterilmiştir (Li ve ark., 2018). Dirençli Burkitt lenfoma hücre hatlarında KLF4 ekspresyonunun inhibisyonu, hücre büyümesini inhibe etmektedir ve hücreleri ilaca bağlı apoptoza duyarlı hale getirmiştir. KLF4'ü aşırı eksprese eden B lenfoma tedavisinde terapötik müdahale için hedef olarak kabul edilebileceğini önerilmiştir (Mayra et al.,2015). Bizim çalışmamızda da KLF4 gen ekspresyonu, K562R adh hücrelerde, K562 R hücrelerde artmış olması bu literatür bilgileri ile uyumludur.

ALDH1A1, K562R-adh hücrelerde, K562R hücrelerine göre 3,13 kat artış göstermiştir. Erken kök hücre farklılaşması için bir kök hücre markerı olan, aldehit dehidrojenaz (ALDH), servikal karsinoma hücrelerinden izole edilen kök hücre benzeri hücrelere ek olarak, servikal epitelyal lezyonlarda ve karsinomda tespit edilebildiği gösterilmiştir (Yao ve ark., 2011). ALDH1A1, aktivitesinin yüksekliği, pek çok malignanside, kanser kök hücre özelliği gösteren bir alt popülasyonunu karakterize eder (Liu ve Zheng 2013). ALDH1A1 aktivitesinin inhibisyonunun, ovaryum kanser hücresi serilerinde, ilaç transporterlarının ekspresyonunun azalmasına ve kemoterapiye direncin azalmasına yol açtığı gösterilmiştir (Januchowski ve ark., 2016). Bu çalışmada, ALDH1A1 gen ekspresyonunun, K562R- adh hücrelerde, K562 R hücrelere yüksek olması, bu iki hücrenin ayrılmasında kullanılabilir.

CD24, K562R-adh hücrelerde, K562R hücrelerine göre 2,81 kat artış göstermiştir. Lu ve arkadaşlarının 2018 de yaptığı çalışmada hepatoselüler karsinom hücre hatlarında CD24 ekspresyonu ile ilaç direnci arasında bir korelasyon olduğunu saptamışlardır (Lu ve ark., 2018). CD24, literatürde, dirençli ve aderan hücrelerde ilk kez araştırılmıştır. Bu bakımdan dirençli hücrelerin bir alt popülasyonu olan aderan hücrelerin ayrılması için kullanılabilir.

K562R ve K562R-adh hücrelerinin K562S hücreleri ile kıyaslandığında ortak olarak artan İntegrin panelindeki genler: THSB1,VCAN, SELP, ITGB3, ITGB6, COL15A1, ITGA9, ITGA10 genlerinin KML dirençli hücrelerde ifadesi artmış bulunmuştur.

K562R hücrelerinde K562S hücrelerine göre ve K562R-adh hücrelerde K562S hücrelerine göre anlamlı kat artışı sergileyen **THBS1** geni, hücreler arası ve hücre-matriks arası etkileşimlerine aracılık eden bir adezif glikoproteindir. Bu protein trombosit agregasyonu, anjiyogenez, hücre adezyonu, göçü ve tümör oluşumunda rol oynadığı gösterilmiştir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7057>). Puissant ve arkadaşları yaptığı çalışmada, İmatinib'e dirençli ve yapışan özelliği gösteren K562R hücrelerinde THBS anlamlı olarak artmıştı (Puissant ve ark., 2012). Bu tez çalışmasında da bu çalışma ile uyumlu olarak İmatinib dirençli yapışan K562R-adh hücrelerinde K562S hücreleri ile kıyaslandığında artmış bulunmuştur.

K562R hücrelerinde K562S hücrelerine göre ve K562R-adh hücrelerde K562S hücrelerine göre anlamlı kat artışı sergileyen **VCAN** geni, adezyonu, proliferasyonu, göç ve anjiyogenezde rol oynamaktadır ve doku morfogenezi ve korunmasında önemli rol oynamaktadır. VCAN'nin KML'deki İmatinib direnciyle ilgili çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında VCAN'nin KML direncinde rolü olabileceği ilk defa önerilmiştir.

K562R hücrelerinde K562S hücrelerine göre ve K562R-adh hücrelerde K562S hücrelerine göre anlamlı kat artışı sergileyen **SLEP** geni trombosit aktivasyonu ve degranülasyonu sırasında plazma membranına yeniden dağıtır ve aktif endotel hücrelerinin veya trombositlerin lökositlerle etkileşmesine aracılık etmektedir. Bu tez çalışmasında SLEP geninin yüksek ifade olması ile KML İmatinib direnci ile ilgili, ilk kez önerilmiştir.

K562R hücrelerinde K562S hücrelerine göre ve K562R-adh hücrelerde K562S hücrelerine göre anlamlı kat artışı sergileyen **ITGB3**, trombositlerde alfa IIb zinciri ile birlikte bulunur. İntegrinler ayrıca hücre adezyonunda ve hücre yüzeyi aracılı sinyalizasyonda yer alırlar. (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000259207-ITGB3/pathology>). Dirençli hücre grubumuzun her ikisinde yüksek ifade edilen **ITGB3**'un mezenkimal akciğer kanserinde, kemoresistansın indüklenmesinde, ITGB3 ekspresyonunun yalnız başına yeterli olduğu gösterilmiştir (Hong ve ark., 2018).

ITGB3'ün dahil olmasının ardından, FAK/Akt yolağının aktivasyonu, IM-R Adh hücrelerin invazyon ve migrasyonuna aracılık eder (Puissant ve ark., 2012)

Integrin $\beta 6$ (ITGB6), epitel-spesifik bir integrindir. Oral skuamöz kanserlerde (OSCC) upregüle olmaktadır ve OSCC'nin ilerleesi ve metastazı ile ilişkilidir (M. Xu ve ark., 2019). KML'deki İmatinib ilacı ile bağlantı literatür de gösterilmemiştir, bu tez çalışmasında ilk olarak kML'deki ilaç direnci ile ilgili bağlantılı bulunmuştur.

COL15A1 (Kollajen tip XV alfa 1 zincir), tip XV kollajenin alfa zincirini kodlar. FACIT kollajen ailesinin bir üyesidir. Geniş bir doku dağılımına sahiptir. Basement membranların altta yatan bağ dokusu stromalarına yapışması işlevini görür

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1306>). COL15A1'in insan ve fare aterosklerozunda up regüle edildiği gösterilmiştir (Connelly ve ark., 2013). Bazal membran bölgesinden kolajen XV kaybının agresif meme tümörlerinin, kolon karsinomlarının ve melanomların invazyon ve metastazlarından önce geldiği ile ilgili araştırmalar, bu proteinin hücre dışı matriksi stabilize etmede ve böylece distal metastazı önlemede kritik bir role sahip olabileceğini göstermektedir (Amenta ve ark., 2000). CML İmatinib direnci ile bağlantı ilk kez bizim tez çalışmamızda gösterilmiştir.

İntegrin alfa9 (ITGA9), hızlandırılmış hücre göçünü kolaylaştıran ve anjiyogenez, lenfanjiyogenez, kanser hücresi proliferasyonu ve göç gibi çeşitli biyolojik fonksiyonlarını düzenleyen daha az çalışılmış integrin alt ünitelerinden biridir (Mostovich ve ark., 2011). ITGA9'un tümör dokularındaki ekspresyonu ile ilgili çok fazla data yoktur. ITGA9 'un melanoma hücrelerinde eksprese olduğu (Lydolph ve ark., 2009), küçük hücreli akciğer kanserlerinde ve medullablatomalarda upregüle olduğu gösterilmiştir (Hibi ve ark., 1994, Fiorilli ve ark., 2008). ITGA9'un normal yetişkin kolon hücrelerinde olmadığı ve 10 primer kolon adenokarsinoma hücresinden 6'sında eksprese edildiği ve 7 kolon adenokarsinoma hücresinden 2'sinde eksprese edildiği gösterilmiştir. (Caco-2 and T84)(Basora ve ark., 1998). Bu genin CML'deki İmatinib direnci ile ilişkisi ilk olarak bu tez çalışmasında önerilmektedir.

ITGA10,metastaz riski ve survivalda azalma ile ilişkili bir gendir. Ek olarak, ITGA10 ekspresyonu, primer tümörlere göre metastatik tümörlerde anlamlı derecede yüksektir (Okada ve ark., 2016). Kollajen ile ilişkili integrinler arasında, integrin- α 10 en az çalışılan integrindir ve overekspresyonunun tümör hücrelerinin migrasyonunu hızlandırdığı bildirilmiştir (Wenke ve ark., 2007).

Lösemi hücrelerinde ERG yüksek ifade olunması, CD24, CD44, ITGB5, ITGB3, ITGA2B ve **ITGA10** gibi mezankim-benzeri belirteçlerinin ifadesini artırmaktadır. Bu genlerin ifadesinde artışın kempoterapiden kaçışta etkili olduğu bulunmuştur .

K562R ve K562R-adh hücrelerinin K562S hücreleri ile kıyaslandığında ortak olarak artan genler DACH1, ALCAM, JAG1, CD44, KITLG, ITGA2, GATA3, ABCG2, PTPRC genlerinin ifadesi artmış bulunmuştur.

K562R hücrelerinde K562S hücrelerine göre ve K562R-adh hücrelerde K562S hücrelerine göre anlamlı kat artışı sergileyen ortak genler arasında yer alan DACH1 geni, gelişim sırasında gen ekspresyonunu ve hücre kaderinin tayinini düzenlemek için diğer DNA bağlayıcı transkripsiyon faktörleriyle birleşen kromatin ile ilişkili bir proteini kodlar. Bu genin ifadesinin, bazı metastatik kanser formlarında kaybolduğu ve zayıf prognoz ile korele olduğu bildirilmiştir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1602>). 2019 yılında yapılmış bir çalışmada DACH1'in, endometriyal karsinomada EMT'yi baskılayarak progestin direncini tersine çevirdiği bildirilmiştir (Zhou ve ark., 2019). Gastrik kanser üzerinde yapılmış bir çalışmada ise DACH1'in epigenetik sessizleştirilmesi invazyon ve metastazı arttırmıştır (Yan ve ark., 2014). Çalışmamızda bu literatür bulgularından farklı olarak dirençli KML hücrelerinde duyarlı hücelere göre DACH1 geninde yüksek kat artışı saptanmıştır.

K562R hücrelerinde K562S hücrelerine göre ve K562R-adh hücrelerde K562S hücrelerine göre anlamlı kat artışı sergileyen ortak genler arasında yer alan bir diğer gen olarak ise ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule) geni bulunmuştur. Bu gen, hücre dışı alanda beş immünoglobulin benzeri alan (VVC2C2C2) olan immünoglobulin reseptörlerinin bir alt ailesinin bir üyesi olan CD166 (farklılaşma kümesi 166) olarak da bilinen aktive lökosit hücre adezyon molekülünü (ALCAM) kodlar. Bu

protein, T hücresi farklılaşma antijen CD6'sına bağlanır ve hücre yapışması ve göç işlemlerinde görev alır (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/214>). Literatürde ALCAM'ın tamoksifene dirençli meme kanserinde arttığı (Chen ve ark., 2017) bildirilmiş, kolon kanseri hücrelerinde ise ALCAM, bir kök hücre belirteci olarak önerilmiştir (Kozovska ve ark., 2014). Bir başka çalışmada ise sisplatine dirençli A2780 hücrelerinde mitokondriyal ALCAM proteininin yüksek düzeyde bulunduğu bildirilmiştir (Chappell ve ark., 2012). Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, bu literatürlerle paralel olarak ilaca direnç gösteren K562 hücrelerinde ve adheren özellik gösteren K562R hücrelerinde ALCAM'ın yüksek olarak ifade edildiğini ortaya koymuştur.

5-Fluorourasile dirençli over kanseri hücrelerinde, paklitaksel dirençli prostat kanseri hücrelerinde ve bortezomide dirençli myeloma hücrelerinde Jagged-1'in indüklendiği ve ilaç direncinde rol oynadığı bildirilmiştir (Muguruma ve ark., 2017, Liu ve ark., 2018, Nayak ve ark., 2019). Bu literatür bulgularına paralel olarak K562R hücrelerinde K562S hücrelerine kıyasla ve K562R-adh hücrelerde K562R hücrelerine kıyasla belirlediğimiz artmış Jag1 gen ifadesi, KML hücrelerinin ilaca direnç kazanmasında ve dirençli hücrelerin adheziv özellik kazanmasında rol oynadığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda, dirençli ve adherent dirençli hücrelerde ortak olarak yüksek ifade sergileyen CD44 geni ise, hücre-hücre etkileşimleri, hücre yapışması ve göçünde yer alan bir hücre yüzeyi glikoproteinini kodlamaktadır. Bu protein, hyaluronik asit (HA) için bir reseptördür ve ayrıca osteopontin, kollajenler ve matris metaloproteinazlar (MMP'ler) gibi diğer ligandlarla etkileşime girebilir. Protein aynı zamanda lenfosit aktivasyonu, resirkülasyon ve homing, hematopoez ve tümör metastazı dahil olmak üzere çok çeşitli hücresel fonksiyonlara katılır (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/960>). Literatürde CD44'ün kanser ve ilaç direncindeki rolüne ilişkin çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalarda; multipl myeloma, meme kanseri, epitelial over kanseri, glioblastoma ve

başka pekçok kanser tipinde CD44 sinyalizasyonunun indüklendiği bildirilmiştir (Alshaer ve ark., 2019, Chen ve ark., 2019, Hartheimer ve ark., 2019, Zhang ve ark., 2019). 2019 yılında yapılmış bir başka çalışmada ise KML’de Hyaluronan ve CD44 in İmatinibe direnç gelişmesinde önemli rolü olduğu bildirilmiştir (Lompardia ve ark., 2019). Çalışmamız, dirençli ve dirençli adheren hücrelerin sergiledikleri yüksek CD44 ifadesi nedeniyle bu literatürle büyük ölçüde paralellik göstermektedir.

Çalışmamızda, K562R hücrelerinde K562S hücrelerine göre ve K562R-adh hücrelerde K562R hücrelerine göre yüksek ifade edilen genler arasında KITLG (KIT ligand) geni de bulunmuştur. Bu gen, KIT lokusu tarafından kodlanan tirozin kinaz reseptörünün ligandını kodlar. Bu ligand, germ hücrelerinin ve sinir hücrelerinin gelişimine, hematopoeze rahimde etki eden ve hücre göçünde de rol oynadığı düşünülen pleiotropik bir faktördür (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4254>). Literatürde anormal ve aşırı KITLG ifadesi germ hücre tümörleri, AML ve meme kanseri ile ilişkilendirilmiştir (Sheikine ve ark., 2012, Handschuh ve ark., 2018, Z. Wang ve ark., 2019). Bu tez çalışmasında dirençli ve dirençli adheren hücrelerde belirlenmiş olan yüksek KITLG ifadesi, literatür bulgularıyla da paralellik göstermekte ve bu genin KML’de İmatinib direncinin tersine çevrilmesinde bir hedef olabileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda elde edilmiş olan bu bulgular, literatürde daha önce KML ve ilaç dirençli KML’de araştırılmamış olan DACH1, ALCAM, KITLG gibi genlerin kronik myeloid lösemide İmatinib’e karşı gelişen direncin oluşumunda görev yapabiliyor olduğunu ve olası birer belirteç ve terapi hedefi olabileceklerini önermektedir.

ITGA2, hücre dışı matrikse (ECM) hücre yapışması için bir transmembran reseptörü olarak $\alpha 2\beta 1$ integrinin beta 1 alt birimi ile bir heterodimer oluşturabilen alfa 2 integrinini kodlar (Tuckwell ve ark., 1995, Plow ve ark., 2000). ITGA2 ekspresyonunun birkaç

tümör tipinde (örneğin, mide kanseri, prostat kanseri ve küçük hücreli dışı akciğer kanseri) yüksek ekspresyon gösterdiği bulunmuştur ve metastaz ile yakından ilişkilidir (Tuckwell ve ark., 1995, Vihinen ve ark., 1996, Sottnik ve ark., 2013, Chuang ve ark., 2018). Oktem ve arkadaşlarının 2014'de yaptığı çalışmaya göre prostat kanseri hücre hattında CD133 - / CD44 - hücrelere göre bir monolayer olarak yetiştirilen CD133 + / CD44 + KKH'lerde ITG β , LAMB3 , ITBG2 , ITGA2 , COL6A1 , ITB4 , ITGA3 , THBS , B2M ve ITGA5'in gen ekspresyonları anlamlı şekilde artmıştır. Ek olarak NCAM1 , MMP16 , ITG β 3 , COL7A1 , LAMB1 , ADAMTS1 genlerinin ifadesi azalmıştır (Oktem ve ark., 2014). Literatürde bulunan bu çalışma bizim verilerimizde olan ITGA2 ifadesinin artışı ve COL7A1 de olan ifade azalması ile kök hücre karakterizasyonunu desteklemektedir.

ABCG2, kanser kemoterapisinde MDR'de yer alan insan ABC taşıyıcılarından biridir (Xu ve ark., 2007, Zhang 2007). Literatürde ABCG2'nin kötü huylu hematopoetik ve lenfoid hücrelerde sıkça ifade edildiği; çeşitli insan lösemilerinde ekspresyonu araştırılmış ve gösterilmiştir (Jordanides ve ark., 2006, Eechoute ve ark., 2011, Stacy ve ark., 2013). CML'de hücrelerin başlatılmasının, insan HSC'lerinde yüksek ABCG2 ifadesiyle birlikte, multipotent bir hematopoetik kök hücreden (HKH) kaynaklandığı düşünülürse (Zhou ve ark., 2001, Scharenberg ve ark., 2002), ABCG2'nin aşırı ifadesinin, CML kök hücre popülasyonunda ilaç direncine sebep olduğunu düşündürmektedir (Brendel ve ark., 2007). Bizim çalışmamızda da dirençli hücrelerin duyarlıya oranla bu genin ifadesinde ciddi bir kat artışı göstermesi ilaç direnci ile ilişkisini göstermektedir.

CD45, tüm çekirdekli hematopoetik hücrelerin yüzeyinde bol miktarda bulunan bir transmembran proteindir. CD45, *PTPRC* geni tarafından kodlanır ve SRC ve JAK familyası kinazlarının fosforilasyonunu düzenlediği bilinmektedir (Irie-Sasaki ve ark., 2001, Hermiston ve ark., 2003, Saunders ve Johnson 2010). Literatürde yer alan Drube ve arkadaşlarının 2018 da yaptığı çalışmada KML hastalarının primer kültüründe ve K562

hücre serisinde PTPRC değerleri yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada literatüre katkısı ile bizim yüksek çıkan verilerimizi desteklemektedir (Drube ve ark., 2018).

Kök hücre panelinde yer alan genler arasında K562 R hücrelerinde K562 S hücrelerine göre %50 ve üzerinde kat azalması gösteren genler, IL8, ITGA6 ve FGFR2'dir.

Çalışmamızda, K562R hücrelerinde K562S hücrelerine kıyasla azalma sergileyen IL8 geninin kanserde ilaç direncindeki rolü ile ilgili çalışmalar da bulunmaktadır. Gempitabin'e dirençli pankreas kanserinde dirençli hücreler tarafından IL-8 salımının arttığı ve IL8 için ana reseptör olan CXCR2'nin apesifik antikoru ile baskılanmasının anti anjiyogenez ve anti tümör etkiler sergilediği bildirilmiştir (Imafuji ve ark., 2019). IL-8, meme kanserinde, gastrik kanserde, melanoma hücrelerinde tümörigenez, invazivlik ve anjiyogenezle ilişkilendirilmiştir (Bourcier ve ark., 2011, Li ve ark., 2016). Literatürde IL-8 yüksek ifadesi genellikle tümörigenezin şiddetlenmesi ile korelasyon sergilemektedir. Çalışmamızda ise bu literatür bulgularından farklı olarak dirençli hücrelerde düşmüş IL8 ifadesi saptanmıştır.

ITGA6, kök hücre panelinde, çalışmamızda, K562R hücrelerinde K562S hücrelerine kıyasla azalma sergileyen genler arasındadır. ITGA6'nın yüksek ekspresyonu pankreatik kanserlerde invazyon ve metastazı başlatmaktadır ve kötü prognozun belirtecidir (Wu ve ark., 2019).

ITGA6'nın HIF'ye bağlı düzenlemesinin, meme kanserlerinde KKH ve metastatik fenotipleri arttırdığı bir mekanizma olduğunu gösterilmektedir (Brooks ve ark., 2016). ITGA6, over kanseri ve ilaç direnci ile anlamlı şekilde ilişkili bulunmuştur. ITGA6'nın

yüksek ifadesi tedaviye kötü sonuçla ilişkilendirilmiş ve ITGA6'nın over kanserinde ilaç direncinin düzenlenmesindeki rolünün daha iyi anlaşılması ile over kanserinin prognozu için potansiyel bir belirteç olabileceğini göstermişlerdir (Wei ve ark., 2019).

İntegrin $\alpha 6$ (ITGA6) 'nın artmış ifadesi, akut lösemilerde ilaç direncini artırmaktadır (Yamakawa ve ark., 2012). Bizim çalışmamızda, literatürden farklı olarak, K562R hücrelerinde K562S hücrelerine kıyasla azalma gösterdiği bulunmuştur.

Kök hücre belirteçlerinden FGFR2 geni ile yapılan çalışmada, gastrik kanserde FGFR2 amplifikasyonunun lenfatik invazyon ve kötü prognoza neden olduğu gösterilmiştir (Katoh 2016).

Kök hücre panelinde genler arasında yer alan genler arasında K562 R adh hücrelerinde K562 R hücrelerine göre %50 ve üzerinde kat azalması gösteren genler, ABCB5, ABCG2 ve KITLG'dir.

Kanser kök hücre belirteci olan ABCB5 gen amplifikasyonu ve artan gen ifade düzeyleri K562-vcr lösemi hücrelerinde gösterilmiştir ve bu genin lösemik kök hücrelerde kemoterapiye karşı dirençte rol oynayarak bir kemo direnç mekanizmasını temsil edebileceği belirtilmiştir. ABCB5, ilk önce insan derisi ve insan malign melanomunda tanımlanan, karakterize edilen bir kemo direnç mediatördür (Lehne ve ark., 2009). Bizim yaptığımız çalışmada, Lehne ve arkadaşlarının yaptığı çalışmanın sonuçlarından farklı olarak K562r-adh hücrelerinde, K562r hücreleri ile karşılaştırıldığında ABCB5 gen ifade düzeyi azalmıştır. Buna ek olarak bu tez çalışmasında K562s hücrelerine göre K562r hücrelerinde, diğer analiz edilen kök hücre belirteçlerinin ifade düzeylerindede (FGFR2, FZD7)

azalma

gözlenmiştir.

KIT (CD117), murin kolon crypt bazında, kök hücre nişine katkıda bulunan özel goblet hücrelerinde ifade edilen bir RTK'dır. İnsan kolonunda, primer kolon tümörlerinde KIT ekspresyonu tartışmalı olmasına rağmen, çeşitli kolon kanseri hücre hatlarında KIT ekspresyonu bildirilmiştir. KIT sinyali, sadece bilinen ligandını, KITLG'yi (Kök Hücre Faktörü) bağladığında meydana gelir ve reseptör dimerizasyonuna, otofosforilasyona ve hücre içi sinyallemeye neden olur. KIT, farklı biyolojik bağlamlarda, hücre büyümesini, hayatta kalma, göç, farklılaşma ve salgılanmayı teşvik edebilir (Chen ve ark., 2015).

KIT / KITLG sinyal sistemi, spermatogenez bozukluğu ve erkek infertilitesinde KIT ve KITLG genlerinin rol oynayabileceğini düşündüren spermatogenez için çok önemlidir (Cheng ve ark., 2013) KITLG / KIT yolu, baş ve boyun skuamöz hücreli karsinomu (HNSCC) dahil olmak üzere birçok insan kanserinde hayati bir rol oynar. KITLG ve KIT'deki genetik varyasyonlar, bu genlerin ekspresyonunu veya fonksiyonunu etkileyebilir ve böylece kanser riskini değiştirebilir (Hang ve ark., 2017). Çalışmamızda K562 R adh hücrelerde, K562R hücrelerine göre 0,32 kat azalmış bulduk. Başka bir ifade ile K562R'lerde yüksek ifade edildiğini gösterir, buda proliferatif sinyal oluşturmaktadır.

K562R-adh hücrelerinin karakterizasyonu yapıldıktan sonra, mitokondri ve onun rol oynadığı yollardaki mekanizmaların ilaç direnci üzerindeki etkisini araştırmak amacı ile mitokondriyal şaperon olan HSP90'nın (TRAP-1) inhibitörü kullanılmıştır. TRAP-1 inhibitörü olan Gamitrinib'in mitokondri fonksiyonunda yarattığı bozukluğun ilaç direnci mekanizmalarını nasıl etkilediği araştırılmıştır. Örneğin mitokondriyal disfonksiyonun hücre ölüm yollarının (apoptoz ve otofaji) aktivasyonunda, metabolik yolların değişiminde ve ATP üretimindeki etkisi araştırılmıştır.

Çeşitli çalışmalarda mitokondriyal HSP90 (TRAP-1) inhibitörü olan Gamitrinib'in farklı hücrelerde hücre ölüm yolağını indüklediği gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında Gamitrinib'in hücre ölüm yolağı olan apoptoz ve otofaji üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Gamitrinib genel olarak neden olduğu hücre ölüm şekli hızlı apoptozdur. Gamitrinib direkt bir mitotoksik etkiye sahiptir, buda tümör hücrelerinde mitokondriyal iç membran potansiyelinin azalmasına, dış membranın parçalanmasına ve siklofilin D'ye (CyD) bağlı mitokondriyal geçirgenlik geçişini aktive olmasına neden olmaktadır ve böylelikle pro-apoptotik proteinlerinin sitoplazmaya salınımı ile apoptozun indüklendiği gösterilmiştir (Kang ve ark., 2009).

Gamitrinib'in çalışmamızda kullandığımız İmatinib'e duyarlı ve İmatinib'e dirençli K562 hücre serileri üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla öncelikle her 3 hücre serisinde MTT yöntemiyle uygun doz ve uygun saat tayini yapılmıştır.

Yan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Gamitrinib (G-TPP) U937 ve Hep3B hücrelerinin canlılığı üzerindeki etkisi 24. ve 48.saatte araştırılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuca göre G-TPP, U937 hücrelerinde zaman ve doza bağlı olarak büyümeyi baskıladığı ve apoptoz hücre ölüm yolağını indüklediği gösterilmiştir. Gamitrinib uygulanan U937 hücrelerde apoptoz belirteci olan kaspaz 3 ve kaspaz 7'nin aktive olduğu bulunurken, bu hücrelerde BCL-2'nin yüksek ifade edilmesi ile G-TPP aracılı indüklenen apoptozda azalma saptanmıştır (Yan ve ark., 2013).

Bizim çalışmada kullanılan K562R ve K562R-adh hücrelerin 5 uM İmatinib'e dirençli olduğundan, Gamitrinib'in en etkili olduğu saat 48. saat olarak belirlenmiştir. Bizim çalışmada literatür ile uyumlu olarak, Gamitrinib'in tek başına veya İmatinib ile kombine olarak uygulandığı K562S, K562R ve K562R-adh hücrelerinde apoptozun indüklendiği bulunmuştur.

Gamitrinib'in tek başına veya İmatinib ile kombine olarak uygulandığı K562S, K562R ve K562R-adh hücrelerinde kaspaz 3/7 aktivitesinin arttığı bulunmuştur. Özellikle bütün hücrelerde ilaçların kombine olarak uygulanması sonucunda kaspaz aktivitesinin daha çok arttığı saptanmıştır.

Diğer bir apoptoz belirteci olan annexin V boyanması kaspaz aktivasyonundan elde edilen sonuçları desteklemektedir. AnnexinV boyanmasından elde edilen sonuçlara göre Gamitrinib'in tek başına veya İmatinib ile kombine olarak uygulandığı K562S, K562R ve K562R-adh hücrelerinde, hem erken apoptoz ve hem geç apoptozda artış göstermiştir. Gamitrinib'in İmatinib ile kombine olarak uygulandığı tüm hücrelerde, apoptozun tek başına Gamitrinib uygulanmasına göre yüksek olduğu belirlenmiştir.

Kang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, RM1 hücrelerinde Gamitrinib uygulaması sonucunda, mitokondri fonksiyonunda bozukluk ve mitokondri iç membran potansiyelinin azalma ve sitokrom C' nin sitozole salınımı gösterilmiştir (Kang ve ark., 2011). Bizim çalışmamızda gamitirib uygulanan tüm hücrelerde sitozole salınan sitokrom C miktarı kontrol ve sadece İmatinib uygulanan hücreler ile kıyaslandığında artış gösterdiği, buna ilaveten Gamitrinib'in İmatinib ile kombine olarak uygulandığı hücrelerde sitozolik sitokrom C'nin miktarın daha da fazla arttığı belirlenmiştir.

Bcl-2 ailesi proteinleri, apoptozun düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadırlar, özellikle mitokondri dış membran permeabilitesini düzenleyerek Sitokrom C salınımını kontrol etmektedirler.

Bazı çalışmalarda, Gamitrinib'in BCL-2 ailesi proteinlerinden bağımsız apoptozun indüklediği ve CyD aracılı mitokondri geçirgenliğini artırarak apoptozu indüklediği

gösterilmiştir. Ancak hücrelerin uzun süreli Gamitrinibe maruz kaldığında veya kombine olarak uygulandığında BCL-2 ailesi proteinlerinin etkili olduğu gösterilmiştir (Kang ve ark., 2009, Kang ve ark., 2011, Siegelin ve ark., 2011).

Park ve arkadaşlarının çalışmasına göre, Gamitrinib çeşitli insan kanser hücrelerini doxorubicin tedavisine duyarlı hale getirmiştir ve 2 ilacın kombine terapisi sinerjistik olarak apoptozu artırmıştır. İlaç kombinasyonun sitotoksitesi proapoptotik Bcl-2 ailesinin üyesi olan Bim'in aktivasyonu ve mitokondrideki birikimini kapsamaktadır. Bim aktivasyonu proapoptotik transkripsiyon faktörü C/EBP-homologous proteinin artmış ifadesi ve stres kinaz c-Jun N-terminal kinaz'ın artmış aktivitesi ile ilişkilidir. Doxorubicin ve Gamitrinib'in kombine ilaç tedavisinde tümör büyümesini prostat ve meme xenograft modellerin kardiyotoksiteyi artırmadan önemli ölçüde azaltmaktadır (Park ve ark., 2014).

Bu tez çalışmasında, K562S, K562R ve K562R-adh hücreleri 48 saat süre ile tek başına İmatinib, Gamitrinib ve her iki ilaç ile birlikte inkübe edildiklerinde, pro-apoptotik ve anti-apoptotik genlerin ifadesindeki değişim araştırılmıştır. Real time PCR'dan elde edilen sonuçlara göre, K562S hücrelerinde Gamitrinib tek başına BAX genin ifadesini artırmıştır. K562R hücrelerinde ise Gamitrinib tek başına BAX genin ifadesini etkilemezken, K562R-adh hücrelerinde BAX geninin ifadesi yüksek bulunmuştur.

BAX geninin ifadesinin her 3 hücre serisinde İmatinib ve Gamitrinib kombine uygulandığında arttığı bulunmuştur. Özellikle K562S hücrelerinde BAX geni diğer gruplar ile kıyaslandığında ifadesi 11 kat artmış bulunmuştur. İmatinib'in tek başına uygulanan K562R-adh hücrelerinde BAX genin ifadesi artmıştır, diğer hücre gruplarında etkili bulunmamıştır.

Diğer bir pro-apoptotik gen olan BAD'ın gen ifade sonuçlarına göre, tek başına Gamitrinib uygulanan hücrelerde, BAD'ın ifadesi sadece K562S ve K562R hücrelerde anlamlı derecede arttığı ve K562R-adh hücrelerde gen ifadesinde azalma tespit edilmiştir. Gamitrinib'in İmatinib ile kombine uygulandığı K562S ve K562R hücrelerinde BAD ifadesi anlamlı derecede artmıştır. Tüm hücrelerde İmatinib'in tek başına uygulandığında BAD genin ifadesi az miktarda artmıştır.

Anti-apoptotik gen olan BCL-XL'nin ifadesi Gamitrinib'in tek başına uygulandığı K562R ve K562R-adh hücrelerinde azalmış bulunurken, İmatinib ile kombine uygulanan K562R ve K562R-adh hücrelerinde daha fazla azaldığı gözlenmiştir. İmatinib tek başına uygulanması K562S ve K562R hücrelerinde BCL-XL ifadesini düşürmüştür.

BCL-2 geninin ifadesi tek başına Gamitrinib uygulanan K562S ve K562R hücrelerde ifadesi azalırken, K562R-adh hücrelerinde ifadesi artmıştır. Gamitrinib'in İmatinib ile kombine uygulandığı K562R ve K562R-adh hücrelerinde BCL-2 geninin ifadesi azalmıştır, ancak K562S hücrelerde BCL-2 ifadesi artmış bulunmuştur. İmatinib'in tek başına uygulandığı K562S'lerde anlamlı derecede bu genin ifadesi azaltmış, diğer hücrelerde anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

Pro-apototik ve anti-apoptotik gen ifadelerinden elde edilen sonuçlara göre, Gamitrinib İmatinib ile kombine uygulandığında, apoptoz yolağının indüklenmesinde daha çok etkili olduğu bulunmuştur.

Yukarıda bahsedilen apoptozda rol oynayan tüm mekanizmaların analizinden elde edilen sonuçlara göre, Gamitrinib'in İmatinib'e duyarlı K562S ve dirençli K562R,

K562R-adh hücrelerinde tek başına apoptozu indüklediği ancak İmatinib ile birlikte olarak uygulandığında daha çok etkili olduğu belirlenmiştir.

Siegelin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Gamitrinib'in yüksek konsantrasyonun her iki tip hücre ölüm yolağı olan hem apoptozu (kaspaz aktivasyonu, Annexin V) hem de otofajiyi indüklediği gözlenmiştir. Bu gözlemin hücre hattına bağlı olabileceği ve çünkü bazı hücre tipleri tercihen apoptotik hücre ölümüne maruz kaldığı, diğerlerinin ise otofajik yolu tercih edebileceği şeklinde yorumlanmıştır (Siegelin 2013).

Gamitrinib'in otofaji yolağı üzerindeki etkisi tam olarak açıklanmamıştır. Siegelin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Gamitrinib aracılı otofaji, belirgin bir hücre koruma mekanizması örneği teşkil ediyor gibi görünmektedir, çünkü otofajinin 3-Metiladenin ve Bafilomisin A1 (kimyasal blokaj) tarafından inhibe edilmesi, otofajinin azalmasına, ancak aynı zamanda apoptotik hücre ölümünü (kaspaz 3 aktive ederek) indüklenmesine ve hücre canlılığı kaybına neden olduğu bulunmuştur (Siegelin ve ark., 2011). Otofajinin kimyasal olarak baskılanmasına paralel olarak, otofajinin genetik inhibisyonunun (Atg5 spesifik siRNA), Gamitrinib-TPP aracılı apoptozu artmasına neden olmuştur (Siegelin ve ark., 2011). Bununla birlikte, G-TPP'nin neden olduğu otofajinin hücre ölümü ya da hayatta kalması için bir mekanizma olup olmadığı bilinmemektedir. Otofaji, evrimsel olarak korunmuş otofaji-bağılı genler (Atg) tarafından düzenlenmektedir, ancak ER'de yerleşik antiapoptotik ve BH3-only Bcl-2 ailesi üyeleride bu sürece katılırlar. Bu proteinlerden Bcl-2, otofagosom oluşumunu Beclin 1'e bağlanarak baskılamaktadır ve böylelikle otofajide çok önemli bir rol oynamaktadır (Wang ve ark., 2012).

Yan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre G-TPP uygulanan Hep3B hücrelerinde otofajinin indüklendiği ancak indüklenen otofajinin BECLIN-1 bağımlı değil ATG7'e bağımlı olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada ATG7 ve BECLIN-1

konckdown edilen hücrelerde, otofajinin ATG-7'si susturulmuş olanlarda baskılandığı saptanmıştır (Yan ve ark., 2013).

Bu tez çalışmasında, BECLIN-1 gen ifadesi tek başına Gamitrinib uygulanan K562S ve K562R hücrelerinde anlamlı artış gösterirken, kombine ilaç olarak uygulanan K562S ve K562R hücrelerinde artış göstermiştir. Sadece İmatinib uygulanan K562S hücrelerinde gen ifadesi azalırken diğer hücre gruplarında anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. ATG5 ve ATG7 gen ifadeleri K562R ve K562R-adh hücrelerinde tek başına Gamitrinib ve Gamitrinib/İmatinib kombinasyonu ile artmıştır.

Mitokondri veya endoplazmik retikulum'daki (ER) stres bağımsız olarak hücre ölümüne neden olurlar. Mitokondride lokalize olan TRAP1, ER'deki katlanmamış protein yanıtı (UPR) ile ilişkilidir.

Chae ve arkadaşları yaptığı çalışmada, düşük doz Gamitrinib uygulanan kanser hücrelerinde zamana bağlı olarak ER-stres kaskadındaki bir çok aşamasında görev alan proteinlerin ifade seviyesinde artışa neden olduğu bulunmuştur: i) inositol-requiri ng-1 (IRE-1) kinaz aktivasyonu ve onun sonrasında XBP1 splicing ii) Aktive Edici Transkripsiyon Faktörü 6 (ATF6) aktivasyonu ile GRP78 upregülasyonu iii) PKR-like endoplazmiik retikulum kinase (PERK) akitvasyonu ile eIf2a fosforilasyonunda artış ve stres yanıtı transkripsiyon faktörü C/EBP b and CHOP'da artış gözlenmiştir (Kang ve ark., 2009).

Chae ve arkadaşlarının fare prostat kanser modelinde yaptığı çalışmada, Gamitrinib verilen farelerde fosforillenmiş AMPK, GRP78 ve LC3-II seviyelerinde artış gözlenmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen bulgular, Gamitrinib aracılı ER stresinin

apoptotik hücre ölümünü sınırlamak için hayatta kalma destekleyicisi olarak konumlanmaktadır. Gamitrinib-TPP, GRP78'in artmasına neden olmaktadır. GRP78 kanser hücrelerinde upregüle olup ve olumsuz bir prognoz ile ilişkilendirilir (Chae ve ark., 2012). Örneğin, malign gliomalar, normal beyin dokusuyla karşılaştırıldığında GRP78'i yüksek ifade olduğu ve ekspresyonun artmış proliferasyon oranı ile bağlantılı bulunmuştur (Pyrko ve ark., 2007).

Bu tez çalışmasında sadece Gamitrinib uygulanan K562R-adh hücrelerinde GRP 78, IRE-1 ve ATF6 genlerinin ifadesi anlamlı derecede artmış bulunmuştur, diğer yandan PERK ve CHOP genlerinin ifadesindeki artış istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır. Bu sonuçlara göre Gamitrinib'in K562R-adh hücrelerde ER stresini indüklediği şeklinde yorumlanmıştır.

Gamitrinib'in ilaç taşıyıcı pompaların örneğin MDR-1, MRP-1 ve OCT-1 genlerinin üzerindeki etki ilk kez bu çalışmada araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, efluks pompası MDR-1 gen ifadesi İmatinib uygulanan K562S hücrelerinde düşüken, gamitrinib'in tek başına ve İmatinib ile kombine uygulandığı hücrelerde giderek gen ifadesi artmıştır. Sadece İmatinib uygulanan K562R hücrelerde MDR-1 gen ifadesi azalmışken, Gamitrinib'in tek başına ve İmatinib ile birlikte uygulandığı durumlarda gen ifadesi daha çok azalmış bulunmuştur. K562R-adh hücrelerde ise Gamitrinib'in tek başına MDR-1 ifadesini artırırken, İmatinib ile kombine uygulandığında ifadesini anlamlı derecede azalttığı gözlenmiştir.

Diğer bir efluks pompa olan MRP-1 gen ifadesi K562S hücrelerde, sadece İmatinib, sadece Gamitrinib ve kombine uygulanan hücrelerde sırayla artmıştır. K562R ve K562R-adh hücrelerde ise yine aynı şekilde MRP-1 gen ifadesi sadece İmatinib, sadece Gamitrinib ve kombine uygulanan hücrelerde kendi kontrol grupları ile kıyaslandığında artmıştır.

İlacı hücre içine pompalayan OCT-1 genin ifadesi sadece İmatinib, sadece Gamitrinib ve kombine uygulanan K562S hücrelerinde sırayla artmıştır, özellikle K562R hücrelerinde anlamlı olarak yüksek miktarda ifade edilmiştir. K562R-adh hücrelerde hem İmatinib, hem Gamitrinib ve İmatinib ile birlikte uygulanan hücrelerde, OCT-1 ifadesi sırayla anlamlı olarak artmıştır.

Her ne kadar Gamitrinib tek başına MDR-1 ifadesini sadece K562R hücrelerinde azaltmış olsada, İmatinib ile kombine uygulandığı K562R ve K562R-adh hücrelerinde de MDR-1 ifadesini azaltmıştır. Böylelikle ilaçların hücre dışı atılımı azalmış olup, daha çok hücrenin içine girdiği gözlenmiştir. K562R ve K562R-adh hücrelerin bazal seviyede MDR-1 ifadeleri yüksektir ve bununda İmatinib'e karşı oluşan dirençte önemli rol oynamaktadır. İmatinib'e dirençli hücrelerde Gamitrinib'in İmatinib ile kombine uygulanması sonucunda MDR-1 geninin ifadesindeki azalış, direncin kırılmasından ve ilacın daha çok etkili olmasına neden olduğu tespit edilmiştir.

K562S hücrelerinde hem İmatinib hem Gamitrinib ve hem kombine olarak uygulanmaları MDR ifadesini artırmıştır. K562S hücrelerde ilaç uygulanmadığı koşullarda MDR ifadesi saptanmamıştır, bu hücrelerinin ilaçlara maruz kaldıklarında ilaçların etkisinden kaçmak için MDR-1 ifadesini artırdıkları önceki çalışmamızda belirlenmiştir (Hekmatshoar ve ark., 2018).

Diğer eflüks pompası MRP-1 genin ifadesi tüm ilaç uygulanan hücre gruplarında (hem dirençli ve hem duyarlı hücre serilerinde) arttığı gözlenmiştir ve buda ilacın dışarı atılmasına neden olmaktadır. Bununla birlikte influx pompası olan OCT-1 geninin ifadeside tüm hücrelerde anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Örneğin K562S hücrelerinde her ne kadar her iki eflüks pompalarının ifadesi artmış olsada OCT-1 ifadesi daha çok artmıştır, buda ilacın hücre içine alınmasına böylelikle ilacın daha çok etkili

olmasına sebebiyet vermiştir. Dirençli hücrelerde ise MDR-1 geninin ifadesindeki azalma ve OCT-1 genin ifadesindeki artış, ilaçların hücre içine alınmasını sağlamıştır ve bunun sonucunda ilaçlar etkili gözlenmiştir.

MDR-1 gen ifade analizinin yanı sıra, MDR-1 aktivitesinde, MDR-1 substratı olan Rh-123 assay ile araştırılmıştır. MDR-1 gen ifadesi sonuçları ile tutarlı olarak, K562S hücrelerinde MDR-1 ifadesinin artması ile birlikte MDR-1 aktivitesinde artış saptanıp boyanın hücre içine alımı azalmıştır. Diğer hücrelerde ise MDR-1 ifadesinin azalması ile MDR-1 aktivitesi azalmıştır yani Rh123 boyasının hücre içine daha çok geçiş yaptığı bulunmuştur.

Genel olarak tümör hücreleri, varlıklarından bağımsız olarak, neoplastik olmayan hücrelere kıyasla, enerji üretim şekli olarak önemli farklılıklar göstermektedirler. Farklılaştırılmış doku olarak adlandırılan normal hücreler, hem glikoliz hem de müteakip olarak, mitokondrilerinde piruvatın oksidatif fosforilasyonuna (mitokondri içinde) bağımlıdırlar, böylece 36 mol ATP / mol glikozu üretilmektedir (Vander Heiden ve ark., 2009). Kanser hücrelerinde oksidatif fosforilasyondan aerobik glikolize geçiş gerçekleşip böylelikle sadece 4 mol ATP / mol glukozu üretilmektedir (Vander Heiden ve ark., 2009). Tümör hücreleri için bu yolak her ne kadar ATP üretimi açısından yetersiz bir strateji olsada, fakat aynı zamanda oksijenden bağımsız olma avantajını da sağlamaktadır.

Kanser hücreleri, glukoz metabolizma esnasında, piruvatın krebs döngüsüne ve ardından oksidatif fosforilasyona yön değiştirmeden, piruvatın NADH₂'ye bağlı bir şekilde laktata indirgenmesini sağlar, böylelikle komşu hücrelerin hücre dışı matriksini asitlenmesine neden olurlar. Bu durum tümör hücrelerinin farklı organlara yayılıp göç etmesine veya metastaz yapmasına neden olmaktadır (Mathupala ve ark., 2010). Kanser hücreleri, artmış Redox ekivalanları hücrenin hızla bölünmesini ve büyümesini sağlamak

için amino asitlerin biyosentezi ve nükleotid sentezinde kullanılır. Bu durum kanser hücrelerinde 2 önemli mekanizma ile belirlenmiştir (Ward ve Thompson 2012).

İlk olarak, membran taşıyıcıya bağlı alımdan sonra glikoz, metabolizmaya (Heksokinaz-II'ye bağlı) dahil olmak üzere C6-residüden hızla fosforile edilir (Siegelin 2013).

HKII'nin kanser hücrelerinde yüksek seviyede ifade olduğu ve Bcl-2 ailesi proteinlerinin seviyesinde apoptozu regüle ettiği son yapılan araştırmalarda gösterilmiştir. Malign kanser hücreleri HKII'yi yalnızca fizyolojik / metabolik durumundaki ani değişiklikler sırasında hayatta kalmalarını sağlamaları için değil de, aynı zamanda hücre ölümünden korumak amacıyla da kullanmaktadırlar. HKII mitokondrinin dış membranına bağlanmasının, HeLa hücrelerinde Bax kaynaklı sitokrom C salınımını ve apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bax gibi pro-apoptotik proteinler, apoptoz sırasında mitokondriye transloke olup ve sitokrom c de dahil olmak üzere membran arası boşlukta bulunan proteinlerin salgılanmasına aracılık etmektedir (Pastorino ve ark., 2002, Pedersen ve ark., 2002). Bax, voltaja bağlı anyon kanalına (VDAC) bağlanır. VDAC, dış mitokondriyal zarında bulunan proteindir. Düzlemsel iki lipit katmanlarında Bax ve VDAC, sitokrom c'nin içinden geçebileceği bir kanal oluşturur. HK II ayrıca VDAC'ye bağlanır. Pastorino ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada HK II'nin, Bax'ın mitokondriye bağlanma ve sitokrom C salma kabiliyetine müdahale ettiği bulunmuştur (Pastorino ve ark., 2002).

Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada melanoma hücre serisi olan WM9 hücre serisinde Gamitrinib'in PLX4720 ile birlikte uygulandığında aerobik glikozun önemli düzenleyicilerinden olan HKII, PKM1 ve LDHA genlerinin ifadesinde azalma gözlenmiştir (Zhang ve ark., 2016).

Bu tez çalışmasında HKII, PKM1ve LDHA genlerinin ifadesi araştırılmıştır. Gamitrinib'in tek başına ve İmatinib ile kombine ilaç uygulanan K562R hücrelerinde HKII, PKM1ve LDHA genlerinin ifadesinde anlamlı azalma saptanmıştır.

K562R-adh hücrelerinde Gamitrinib'in İmatinib'le kombine uygulandığında HKII, PKM1ve LDHA genlerinin ifadesinde anlamlı düşüş gözlenirken, Gamitrinib'in tek başına uygulanması sadece LDHA ifadesini anlamlı olarak düşürürken diğer genlerin ifadesini artmıştır. İmatinib'in tek başına uygulandığı K562R-adh hücrelerinde ise LDHA ifadesi anlamlı olarak azalmıştır. K562S hücrelerinde, İmatinib tek başına HKII, PKM1ve LDHA genlerinin ifadesini düşürmüştür, ancak Gamitrinib tek başına veya İmatinib ile kombine uygulandığında sadece LDHA geninin ifadesini anlamlı olarak azaltmıştır. Bu sonuçlara göre K562R hücrelerinin ATP üretiminde aerobik glikolize bağımlı olduğu önerilebilir.

Yapılan çalışmalarda hücre içi ve hücre dışı ATP miktarının kanser hücresi büyümesinde, hayatta kalmasında ve dirençte önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Kanser hücrelerinde hücre içi ATP miktarının normal dokudaki aynı kökenden olan hücreler ile kıyaslandığında yüksek olduğu ve bunda kanser hücresindeki glukoz taşınmasında artış ve aerobik glikoliz (Warburg etkisi) etkili olduğu belirtilmiştir. Ayrıca, edilnilmiş dirençli kanser hücre serilerinde kendi parental hücre serileri ile kıyaslandığında daha yüksek hücre içi ATP seviyelerine sahip oldukları bulunmuştur (Zhou ve ark., 2012). Kolon kanseri hücre serileri üzerinde yapılan çalışmada, hücre içi ATP'nin ilaca dirençli hücrelerde ilaca duyarlı parental hücreler ile kıyaslandığında 2 kat daha yüksek olduğu saptanmıştır (Zhou ve ark., 2012). Başka bir çalışmada hücre içi ATP'nin over adenokarsinom hücrelerinde, cisplatin direncinde etkili olduğu bulunmuştur (Schneider ve ark., 2013).

Bu tez çalışmasında kullanılan İmatinibe dirençli K562R hücre serilerinde, hücre içi ATP miktarı İmatinibe duyarlı K562S hücreleri ile kıyaslandığında daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Gamitrinib ile ilgili olarak, glioblastoma, prostat ve akciğer kanseri hücreleri dahil olmak üzere tümör hücrelerinde ATP üretimini önemli ölçüde azalttığı ancak neoplastik olmayan hücrelerin önemli ölçüde etkilenmediği bulunmuştur, diğer Hsp 90 inhibitörü olan 17-AAG'nin aynı konsantrasyonlarda çeşitli hücre hatlarında uygulanması ATP oluşumunu etkilememiştir (Chae ve ark., 2012), Gamitrinibin birincil etki mekanizması mitokondri içinde olduğu için, beklenen Gamitrinibin ağırlıklı olarak tümör hücrelerinin oksijen tüketimini azaltmasıdır. Chae ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 10 uM Gamitrinib uygulanan LN229 glioblastoma hücrelerinde enerji tüketimi azalmıştır, ancak 10 uM 17-AAG'nin göz ardı edilebilir etkisi olduğu bulunmuştur (Chae ve ark., 2012). Gamitrinib ayrıca sırayla glukoz ve laktatın tüketimi ve üretimini azaltmıştır, buda Gamitriniblerin tümör hücresinde glikolizi de etkileyebileceğini göstermiştir. Gamitrinib'in etkisine benzer şekilde, mitokondriyal Hsp90 şaperonunun, TRAP-1'in, knock down edilmesi (yıkılması), sırasıyla ATP ve Laktat seviyelerinin düşmesine neden olmuştur (Chae ve ark., 2012).

Bu tez çalışmasında Gamitrinib'in ATP üretimindeki etkisi araştırılmak amacı ile hücre içi ATP miktarı tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre İmatinibe dirençli hücrelerde (K562R ve K562R-adh) Gamitrinib tek başına ATP üretimini azaltırken, İmatinib ile kombine uygulandığında ATP miktarını daha çok düşürdüğü bulunmuştur.

TRAP-1'in özgün hedef protein ağı, hücre döngüsünün ilerlemesinde sorumlu proteinleri içermektedir, bu proteinler arasında, G2-M ilerlemesinde ve mitotik iğinin oluşumunda rol oynayan cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) ve mitotic arrest deficient 2

(MAD2) yer almaktadır (Sisinni ve ark., 2017). Sisinni ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, BC MCF7 ve LC A459 hücre serilerinde TRAP1 susturulması sonucunda S fazının azalmasına ve hücrelerin G2-M fazında tutulmasını indüklediği gösterilmiştir (Sisinni ve ark., 2017).

Elde ettiğimiz sonuçlara göre K562S hücrelerinde Gamitrinib tek başına uygulandığında sub G0/G1 fazındaki hücrelerde kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı artış saptanırken, Gamitrinib'in İmatinib ile kombine uygulandığı koşulda sub G0/G1 fazındaki oran anlamlı bir şekilde artış göstermektedir. Sub G0/G fazında bulunan hücreler apoptotik hücrelerdir. Buda gamatirininib'in K562S hücrelerinde tek başına uygulandığında apoptozu indüklediği, bununla birlikte İmatinib ile kombine verildiğinde apoptotik hücre sayısının arttığı bulunmuştur.

Buna ilaveten Gamitrinib tek başına veya İmatinib ile birlikte K562S hücrelerine verildiğinde S fazında azalma olduğu ve bu hücrelerde proliferasyonun azaldığını göstermektedir. Gamitrinib K562S hücrelerinin G2/M fazında duraklatılmasında etkili olmadığı bulunmuştur.

K562R hücrelerinde kontrol grupları ile kıyaslandığında, Gamitrinib'in İmatinib ile kombine uygulandığı koşullarda sub G0/G1 fazında anlamlı bir artış gözlenirken, buda kombine tedavide apoptotik hücre sayısının arttığı bulunmuştur. Ayrıca, kombine uygulama sonucunda S fazındaki hücre sayısı azalmıştır. Bu hücrelerde de G2/M fazında duraklama gözlenmemiştir. K562R-adh hücrelerde, K562R hücrelerine benzer profil gözlenmiştir, İmatinib ve Gamitrinib birlikte uygulandığında sub G0/G1 fazında anlamlı bir artış saptanmıştır, yani apoptotik hücre sayısı artmıştır. Gamitrinib'in bu hücrelerde G2/M fazında duraklamaya neden olmadığı bulunmuştur.

G-TPP, mitokondriyal iç membran potansiyelinin azalmasına, dış membranın bozulmasına ve siklofilin D'ye bağlı mitokondriyal geçirgenlik geçişini aktive ederek apoptojenik proteinlerinin sitozole salgılanmasına sağlayarak, doğrudan mitokondriyotoksik etkiye sahip olduğu ve böylelikle apoptozu indüklediği bildirilmiştir (Kang ve ark., 2009). Sağlıklı ve canlı hücrelerde mitokondrilerin intakt olmasından dolayı kullanılan TMRE floresan boya daha çok mitokondri içerisinde birikmektedir, ancak hücrelerin mitokondri yapısı bozulduğundan ve özellikle apoptoz indüklendiği koşullarda membran potansiyeli azalmaktadır.

Tüm hücre serilerinde İmatinib uygulandıktan sonra kontrol grupları ile kıyaslandığında membran potansiyeli artmış bulunmuştur. K562S hücrelerinde Gamitrinib tek başına uygulandığında membran potansiyelini anlamlı derecede azaldığı saptanmıştır, buna ilaveten Gamitrinib'in İmatinib ile kombine olarak uygulandığında daha çok etkili olduğu ve mitokondriyal membran potansiyelinin daha çok azaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçta Gamitrinib'in tek başına veya İmatinib ile kombine uygulandığında apoptozu indüklediğini gösteren sonuçlar ile tutarlılık göstermektedir. K562R hücrelerinde ise Gamitrinib'in tek başına veya İmatinib ile kombine olarak uygulandığı kontrol grubuna göre çok az bir düşüş gerçekleştiği gözlenmiş ve membran potansiyelindeki azalma anlamlı bulunmamıştır.

K562R-adh hücrelerde ise Gamitrinib'in İmatinib ile kombine uygulandığında mitokondriyal membran potansiyelini kontrol grubu ile kıyaslandığında daha çok azalttığı gösterilmiştir. Ancak tek başına Gamitrinib uygulanan hücrelerde membran potansiyelinde az miktarda artış olduğu bulunmuştur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Bu tez çalışmasında KML, ilaç direncinden sorumlu farklı mekanizmalar araştırılmıştır. Bu nedenle İmatinib'e duyarlı K562S ve kendi laboratuvarımızda 5 μ M İmatinibe karşı dirençli hale getirdiğimiz K562R hücreler kullanılmıştır.
- Dirençli hücrelerin kültürü esnasında, İmatinib'in varlığında belli bir hücre popülasyonunun yapışan hücre özelliği gösterdiği tespit edilmiştir ve bu hücreleri tanımlamak için K562R-adh adı verilmiştir.
- Yapışan bu hücre popülasyonunun KML kökenli olduğundan emin olmak amacı ile, bu hücrelerde qRT-PCR ve FISH tekniğiyle BCR-ABL geninin hem mRNA seviyesinde ve hem protein seviyesinde varlığı gösterilmiştir.
- K562R-adh hücrelerinin karakterizasyonu yapmak amacı ile kanser kök hücre ve integrin paneli araştırılmıştır. İntegrin panelinde yer alan ve sadece K562R-adh hücrelerde K562R hücrelerine kıyasla 2 kat ve üzerinde ifade artışı gösteren genler en yüksek kat artışından en düşük kat artışına doğru sıralandığında, COL4A2, FN1, ITGA5, ITGA4; CTNNA1, ECM1, LAMC1 ve CNTN1 genleri olarak bulunmuştur.
- K562R ve K562R-adh hücrelerinin K562S hücreleri ile kıyaslandığında ortak olarak artan İntegrin panelindeki genler: THSB1, VCAN, SELP, ITGB3, ITGB6, COL15A1, ITGA9, ITGA10 genlerinin KML dirençli hücrelerde ifadesi artmış

bulunmuştur. Bu genlerin KML'deki İmatinib direncinden sorumlu olabileceği düşünülmektedir.

- İntegrin panelinde yer alan ve çalışmamızda K562R hücrelerinde K562S hücrelerine göre %50 ve üzerinde kat azalma gösteren genler en yüksek kat azalışından en düşük kat azalışına göre sırasıyla ITGB2, MMP10, LAMB3, ADAMTS13, MMP15, ITGAX, ITGB7, ITGB1 ve THBS2 olarak belirlenmiştir.
- Mitokondri'nin ilaç direncinde rolünü belirlemek amacı ile, mitokondriyal HSP90 inhibitörü olan Gamitrinib uygulanmıştır. Gamitrinib mitokondri disfonksiyonuna neden olmaktadır.
- Çeşitli çalışmalarda mitokondriyal HSP90 (TRAP-1) inhibitörü olan Gamitrinib'in farklı hücrelerde hücre ölüm yolağını indüklediği gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında Gamitrinib'in hücre ölüm yolağı olan apoptoz ve otofaji üzerindeki etkisi araştırılmıştır.
- Bizim çalışmada kullanılan K562R ve K562R-adh hücrelerin 5uM İmatinib'e dirençli olduğundan, Gamitrinib'in en etkili olduğu saat 48. saat olarak belirlenmiştir. Bizim çalışmada literatür ile uyumlu olarak, Gamitrinib'in tek başına veya İmatinib ile kombine olarak uygulandığı K562S, K562R ve K562R-adh hücrelerinde apoptozun indüklendiği bulunmuştur.

- Gamitrinib'in tek başına veya İmatinib ile kombine olarak uygulandığı K562S, K562R ve K562R-adh hücrelerinde kaspaz 3/7 aktivitesinin arttığı bulunmuştur. Özellikle bütün hücrelerde ilaçların kombine olarak uygulanması sonucunda kaspaz aktivitesinin daha çok arttığı saptanmıştır.
- Diğer bir apoptoz belirteci olan annexin V boyanması kaspaz aktivasyonundan elde edilen sonuçları desteklemektedir. AnnexinV boyanmasından elde edilen sonuçlara göre Gamitrinib'in tek başına veya İmatinib ile kombine olarak uygulandığı K562S, K562R ve K562R-adh hücrelerinde, hem erken apoptoz ve hem geç apoptozda artış göstermiştir. Gamitrinib'in İmatinib ile kombine olarak uygulandığı tüm hücrelerde, apoptozun tek başına Gamitrinib uygulanmasına göre yüksek olduğu belirlenmiştir.
- Bu tez çalışmasında, K562S, K562R ve K562R-adh hücreleri 48 saat süre ile tek başına İmatinib, Gamitrinib ve her iki ilaç ile birlikte inkübe edildiklerinde, pro-apoptotik ve anti-apoptotik genlerin ifadesindeki değişim araştırılmıştır. Real time PCR'dan elde edilen sonuçlara göre, K562S hücrelerinde Gamitrinib tek başına BAX genin ifadesini artırmıştır. K562R hücrelerinde ise Gamitrinib tek başına BAX genin ifadesini etkilemezken, K562R-adh hücrelerinde BAX geninin ifadesi yüksek bulunmuştur.
- BAX geninin ifadesinin her 3 hücre serisinde İmatinib ve Gamitrinib kombine uygulandığında arttığı bulunmuştur. Özellikle K562S hücrelerinde BAX geni diğer gruplar ile kıyaslandığında ifadesi 11 kat artmış bulunmuştur. İmatinib'in tek başına uygulanan K562R-adh hücrelerinde BAX genin ifadesi artmıştır, diğer hücre gruplarında etkili bulunmamıştır.

- Diğer bir pro-apoptotik gen olan BAD'ın gen ifade sonuçlarına göre, tek başına Gamitrinib uygulanan hücrelerde, BAD'ın ifadesi sadece K562S ve K562R hücrelerde anlamlı derecede arttığı ve K562R-adh hücrelerde gen ifadesinde azalma tespit edilmiştir. Gamitrinib'in İmatinib ile kombine uygulandığı K562S ve K562R hücrelerinde BAD ifadesi anlamlı derecede artmıştır. Tüm hücrelerde İmatinib'in tek başına uygulandığında BAD genin ifadesi az miktarda artmıştır.
- Anti-apoptotik gen olan BCL-XL'nin ifadesi Gamitrinib'in tek başına uygulandığı K562R ve K562R-adh hücrelerinde azalmış bulunurken, İmatinib ile kombine uygulanan K562R ve K562R-adh hücrelerinde daha fazla azaldığı gözlenmiştir. İmatinib tek başına uygulanması K562S ve K562R hücrelerinde BCL-XL ifadesini düşürmüştür.
- Pro-apoptotik ve anti-apoptotik gen ifadelerinden elde edilen sonuçlara göre, Gamitrinib İmatinib ile kombine uygulandığında, apoptoz yolağının indüklenmesinde daha çok etkili olduğu bulunmuştur.
- Apoptozda rol oynayan tüm mekanizmaların analizinden elde edilen sonuçlara göre, Gamitrinib'in İmatinib'e duyarlı K562S ve dirençli K562R, K562R-adh hücrelerinde tek başına apoptozu indüklediği ancak İmatinib ile birlikte olarak uygulandığında daha çok etkili olduğu belirlenmiştir.
- Bu tez çalışmasında, BECLIN-1 gen ifadesi tek başına Gamitrinib uygulanan K562S ve K562R hücrelerinde anlamlı artış gösterirken, kombine ilaç olarak uygulanan K562S ve K562R hücrelerinde artış göstermiştir. Sadece İmatinib uygulanan K562S hücrelerinde gen ifadesi azalırken diğer hücre gruplarında

anlamalı bir değişiklik saptanmamıştır. ATG5 ve ATG7 gen ifadeleri K562R ve K562R-adh hücrelerinde tek başına Gamitrinib ve Gamitrinib İmatinib kombinasyonu ile artmıştır.

- Bu tez çalışmasında sadece Gamitrinib uygulanan K562R-adh hücrelerinde GRP 78, IRE-1 ve ATF6 genlerinin ifadesi anlamalı derecede artmış bulunmuştur, diğer yandan PERK ve CHOP genlerinin ifadesindeki artış istatistiksel olarak anlamalı çıkmamıştır. Bu sonuçlara göre Gamitrinib'in K562R-adh hücrelerde ER stresini indüklediği şeklinde yorumlanmıştır.
- Gamitrinib'in ilaç taşıyıcı pompaların örneğin MDR-1, MRP-1 ve OCT-1 genlerinin üzerindeki etki ilk kez bu çalışmada araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, efluks pompası MDR-1 gen ifadesi İmatinib uygulanan K562S hücrelerinde düşükken, gamitrinib'in tek başına ve İmatinib ile kombine uygulandığı hücrelerde giderek gen ifadesi artmıştır. Sadece İmatinib uygulanan K562R hücrelerde MDR-1 gen ifadesi azalmışken, Gamitrinib'in tek başına ve İmatinib ile birlikte uygulandığı durumlarda gen ifadesi daha çok azalmış bulunmuştur. K562R-adh hücrelerde ise Gamitrinib'in tek başına MDR-1 ifadesini artırırken, İmatinib ile kombine uygulandığında ifadesini anlamalı derecede azalttığı gözlenmiştir.
- Diğer efluks pompası MRP-1 genin ifadesi tüm ilaç uygulanan hücre gruplarında (hem dirençli ve hem duyarlı hücre serilerinde) arttığı gözlenmiştir ve buda ilaın dışarı atılmasına neden olmaktadır. Bununla birlikte influx pompası olan OCT-1 geninin ifadesi de tüm hücrelerde anlamalı derecede yüksek bulunmuştur. Bu nedenle ilaç daha çok hücre içine girip, etkisini göstermektedir.

- MDR-1 gen ifade analizinin yanısıra, MDR-1 aktiviteside, MDR-1 substratı olan Rh-123 assay ile araştırılmıştır. MDR-1 gen ifadesi sonuçları ile tutarlı olarak, K562S hücrelerinde MDR-1 ifadesinin artması ile birlikte MDR-1 aktivitesinde artış saptanıp boyanın hücre içine alımı azalmıştır. Diğer hücrelerde ise MDR-1 ifadesinin azalması ile MDR-1 aktivitesi azalmıştır yani Rh123 boyasının hücre içine daha çok geçiş yaptığı bulunmuştur
- HKII, PKM1 ve LDHA genlerinin ifadesi araştırılmıştır. Gamitrinib'in tek başına ve İmatinib ile kombine ilaç uygulanan K562R hücrelerinde HKII, PKM1 ve LDHA genlerinin ifadesinde anlamlı azalma saptanmıştır.
- İmatinibe dirençli K562R hücre serilerinde, hücre içi ATP miktarı İmatinibe duyarlı K562S hücreleri ile kıyaslandığında daha yüksek olduğu bulunmuştur.
- Bu tez çalışmasında Gamitrinib'in ATP üretimindeki etkisi araştırılmak amacı ile hücre içi ATP miktar tayini yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre İmatinibe dirençli hücrelerde (K562R ve K562R-adh) Gamitrinib tek başına ATP üretimini azaltırken, İmatinib ile kombine uygulandığında ATP miktarını daha çok düşürdüğü bulunmuştur.
- Elde ettiğimiz sonuçlara göre K562S hücrelerinde Gamitrinib tek başına uygulandığında sub G0/G1 fazındaki hücrelerde kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı artış saptanırken, Gamitrinib'in İmatinib ile kombine uygulandığı koşulda sub G0/G1 fazındaki oran anlamlı bir şekilde artış göstermektedir. Sub G0/G1 fazında bulunan hücreler apoptotik hücrelerdir, bu da gamatirininin K562S

hücrelerinde tek başına uygulandığında apoptozu indüklediği, bununla birlikte İmatinib ile kombine verildiğinde apoptotik hücre sayısının arttığı bulunmuştur.

- Bu tez çalışması İmatinibe karşı gelişen dirençte mitokondri hedefleyen Gamitinib kullanılarak ilaca karşı direncin kırılmasına yönelik yapılan ilk çalışmadır.
- Çalışmanın uluslararası literatüre önemli katkılar sağlayacağı açıktır.

ÖZET

Kronik Miyeloid Lösemi’de Gelişen Dirençte Hücrelerin Yeniden Programlanmasında Mitokondrilerin Etkisinin Araştırılması

Kronik miyeloid lösemi (KML) 9. ve 22. kromozomların resiprokal translokasyonu sonucu oluşan BCR-ABL füzyon geni nedeniyle oluşan bir hematopoetik neoplazidir. KML tedavisinde kullanılan Tirozin Kinaz İnhibitörlerine karşı gelişen direnç, tedavinin başarısız olmasına neden olmaktadır. Bu proje kapsamında K562 KML hücre serilerine İmatinib uygulanarak İmatinib dirençli hücre serileri elde edilmiş ve bu hücrelerde İmatinib’e karşı gelişen direnç mekanizması kök hücrelilik, tutunma, metabolizma, ER stres ve otofaji yönünden araştırılmıştır. Dirençli hücre serileri K562R-adh (dirençli-yapışan) ve K562R(dirençli-süspanse) olarak iki farklı populasyon temelinde analiz edilmiştir. KML’de İmatinib’e karşı gelişen direnç mekanizmasını tanımlamak amacıyla K562S (duyarlı), K562R ve K562R-adh hücrelerinin integrin ve kök hücre paneli PCR array analiz sonuçları değerlendirilmiştir. İntegrin panelinde dirençten sorumlu olarak her iki hücre serisinde THSB1, VCAN, SELP, ITGB3, ITGB6, COL15A1, ITGA9, ITGA10 gen ifadelerinin anlamlı olarak arttığı belirlenmiştir. Kök hücre panelinde ise dirençli hücrelerimizde DATCH1, ALCAM1, JAG1, CD44, KITLG, ITGA2, GATA3, ABCG2, PTPRC genlerinin yüksek ifade edildiği saptanmıştır. KML’de İmatinib’e karşı gelişen dirençten sorumlu olarak VCAN, SELP, COL15A1, ITGB6 ve ITGA9 genlerinin ifadelerinin arttığı ilk kez bu tez projesinde belirlenmiştir. Özellikle, K562R-adh hücrelerimizde integrin panelinde COL4A2, FN1, ITGA5, ITGA4, LTNNA1, ECM1, LAMC1 ve CNTN1; kök hücre panelinde ise SOX2, KLF4, ALDHA1 ve CD24 kök hücre belirteçlerinin anlamlı bir şekilde yüksek ifade edildiği saptanmıştır. Bu tez projesinin ikinci aşamasında ise, KML’de gelişen İmatinib direncinin yok edilmesinde, mitokondri şaperon (HSP90) inhibitörü olan Gamitrinib’in alternatif ajan olabileceği düşünülerek İmatinib, Gamitrinib ve İmatinib+Gamitrinib ilaç kombinasyonları üç farklı hücre grubuna uygulanmıştır. K562S hücre serisine Gamitrinib uygulandığında İmatinib’den daha yüksek hücre ölümü gözlenmiş olması IM’e alternatif bir tedavi ajanı olabileceğini göstermiştir. Annexin V, kaspaz ve ATP miktar tayini sonuçlarımıza göre, İmatinib’e dirençli hücre serilerinden K562R-adh hücrelerimizde Gamitrinib+İmatinib ile kombine uygulandığında bu hücreleri yüksek oranda apoptoza götürürken, K562R hücrelerimizde ise tek başına Gamitrinib uygulanması ve İmatinib ile kombine uygulanması durumunda yüksek miktarda apoptoza yola açmıştır. Bu sonuç, KML’de gelişen İmatinib direncinde İmatinib+Gamitrinib kombine tedavisinin ilaç direncini gidermek için alternatif bir tedavi protokolü olarak önerilebileceğini göstermektedir. Gamitrinib uygulanan hücrelerde bunlara ilaveten otofaji ve ER stres belirteçleri analiz edilmiş, ancak ilaç uygulanması ile bu yollar arasında direkt bir ilişki gözlenmemiştir. Gamitrinib aerobik glikolizi inhibe eden bir ajan olduğu için bazı metabolik genler de araştırılmış ve K562R hücrelerimizde Gamitrinib’in HK2, PKM1 ve LDHA genlerinin ifadesini düşürdüğü ve bu hücrelerin normalde aerobik glikoliz yaparak hücre canlılığını arttırdığı şeklinde yorumlanmıştır.

Anahtar kelimeler: İmatinib direnci, KML, Apoptoz, Otofaji, Mitokondri, HSP 90 inhibitör.

SUMMARY

Investigation of The Effect of Mitochondria in The Reprogramming of Resistant Chronic Myeloid Leukemia Cells

Chronic myeloid leukemia (CML) is a hematopoietic neoplasm (9, 22) (q34, q11) caused by the BCR-ABL fusion gene which is produced as a result of the reciprocal translocation between 9. and 22. chromosomes. Resistance to tyrosine kinase inhibitors used in the treatment of CML causes treatment failure. In this project, Imatinib resistant cell line which was obtained by incubating cells with increasing concentrations of Imatinib was used to analyze resistance mechanisms in terms of stemness, adhesion, metabolism, ER stress and autophagy. Resistant cell lines were analyzed on the basis of two different populations, Radh (adherent) and R (suspension). In order to define the mechanism of resistance against Imatinib in CML; integrin and stem cell signaling PCR array results were analyzed in K562S (susceptible), K562R (resistant-suspension) and K562R-adh (resistant-adherent) cells. THSB1, VCAN, SELP, ITGB3, ITGB6, COL15A1, ITGA9, ITGA10 gene expressions significantly increased in both K562R and K562R-adh cells. In the stem cell panel, DATC1, ALCAM1, JAG1, CD44, KITLG, ITGA2, GATA3, ABCG2, PTPRC genes were found to be highly expressed in our resistant cells. Increased expression of VCAN, SELP, COL15A1, ITGB6 and ITGA9 genes, which are responsible for resistance to Imatinib in CML, has been identified for the first time in this thesis project. In the stem cell panel, DATC1, ALCAM1, JAG1, CD44, KITLG, ITGA2, GATA3, ABCG2, PTPRC genes were found to be highly expressed in our resistant cells. The expression of VCAN, SELP, COL15A1, ITGB6, ITGA9, and KITLG genes, which are responsible for resistance to Imatinib in CML, was first identified in this thesis project. In particular, our Radh cells exhibited significantly increased expressions of COL4A2, FN1, ITGA5, ITGA4, LTNNA1, ECM1, LAMC1, CNTN1 and SOX2, KLF4, ALDH1 and CD24 as integrin and stem cell panel genes respectively. In the second phase of this thesis project, we investigated the effects of Imatinib, Gamitrinib and Imatinib + Gamitrinib drug combinations on three different cell groups considering that mitochondria chaperone (HSP90) inhibitor Gamitrinib might be an alternative agent to Imatinib to eliminate Imatinib resistance in CML. Cell death in K562s cells achieved with Gamitrinib treatment was higher than Imatinib treatment which suggested Gamitrinib as an alternative treatment agent to Imatinib. According to Annexin V staining, caspase activity and ATP quantification results, Gamitrinib induces a high rate of apoptosis when combined with Imatinib in K562R-adh cells. On the other hand, Gamitrinib induces a high rate of apoptosis in K562R cells when applied as a single agent or in combination with Imatinib. This result shows that Imatinib + Gamitrinib combination therapy may be recommended as an alternative treatment protocol to eliminate Imatinib resistance in CML. In addition, autophagy and ER stress markers were analyzed in Gamitrinib-treated cells, but no direct correlation was observed between drug administration and these pathways. Since Gamitrinib is an agent that inhibits aerobic glycolysis, some metabolic genes have also been investigated and it was interpreted that in our K562R cells Gamitrinib reduces the expression of HK2, PKM1 and LDHA genes, and these cells normally do aerobic glycolysis to increase cell viability.

Key Words: Imatinib resistance, CML, Apoptosis, Autophagy, Mitochondria, HSP 90 inhibitor.

KAYNAKLAR

- ACOSTA-ALVEAR D., ZHOU Y., BLAIS A., TSIKITIS M., LENTS N. H., ARIAS C., LENNON C. J., KLUGER Y. and DYNLACHT B. D. (2007). "XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks." *Mol Cell* **27**(1): 53-66.
- ALSHABI A. M., VASTRAD B., SHAIKH I. A. and VASTRAD C. (2019). "Identification of important invasion and proliferation related genes in adrenocortical carcinoma." *Med Oncol* **36**(9): 73.
- ALSHAER W., ALQUDAH D. A., WEHAIBI S., ABUARQOUB D., ZIHLIF M., HATMAL M. M. and AWIDI A. (2019). "Downregulation of STAT3, beta-Catenin, and Notch-1 by Single and Combinations of siRNA Treatment Enhance Chemosensitivity of Wild Type and Doxorubicin Resistant MCF7 Breast Cancer Cells to Doxorubicin." *Int J Mol Sci* **20**(15).
- AMENTA P. S., BRIGGS K., XU K., GAMBOA E., JUKKOLA A. F., LI D. and MYERS J. C. (2000). "Type XV collagen in human colonic adenocarcinomas has a different distribution than other basement membrane zone proteins." *Hum Pathol* **31**(3): 359-366.
- AMOROSO M. R., MATASSA D. S., LAUDIERO G., EGOROVA A. V., POLISHCHUK R. S., MADDALENA F., PISCAZZI A., PALADINO S., SARNATARO D., GARBI C., LANDRISCINA M. and ESPOSITO F. (2012). "TRAP1 and the proteasome regulatory particle TBP7/Rpt3 interact in the endoplasmic reticulum and control cellular ubiquitination of specific mitochondrial proteins." *Cell Death Differ* **19**(4): 592-604.
- ANDERSSON H. M., SIEGERINK B., LUKEN B. M., CRAWLEY J. T., ALGRA A., LANE D. A. and ROSENDAAL F. R. (2012). "High VWF, low ADAMTS13, and oral contraceptives increase the risk of ischemic stroke and myocardial infarction in young women." *Blood* **119**(6): 1555-1560.
- ARMSTRONG J. S. (2007). "Mitochondrial medicine: pharmacological targeting of mitochondria in disease." *Br J Pharmacol* **151**(8): 1154-1165.
- ARNAOUT M. A. (1990). "Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18." *Blood* **75**(5): 1037-1050.
- AUVINEN P., TAMMI R., KOSMA V. M., SIRONEN R., SOINI Y., MANNERMAA A., TUMELIUS R., ULJAS E. and TAMMI M. (2013). "Increased hyaluronan content and stromal

cell CD44 associate with HER2 positivity and poor prognosis in human breast cancer." *Int J Cancer* **132**(3): 531-539.

BAREISS P. M., PACZULLA A., WANG H., SCHAIRER R., WIEHR S., KOHLHOFER U., ROTHFUSS O. C., FISCHER A., PERNER S., STAEBLER A., WALLWIENER D., FEND F., FEHM T., PICHLER B., KANZ L., QUINTANILLA-MARTINEZ L., SCHULZE-OSTHOFF K., ESSMANN F. and LENGERKE C. (2013). "SOX2 expression associates with stem cell state in human ovarian carcinoma." *Cancer Res* **73**(17): 5544-5555.

BASORA N., DESLOGES N., CHANG Q., BOUATROUSS Y., GOSSELIN J., POISSON J., SHEPPARD D. and BEAULIEU J. F. (1998). "Expression of the alpha9beta1 integrin in human colonic epithelial cells: resurgence of the fetal phenotype in a subset of colon cancers and adenocarcinoma cell lines." *Int J Cancer* **75**(5): 738-743.

BASS A. J., WATANABE H., MERMEL C. H., YU S., PERNER S., VERHAAK R. G., KIM S. Y., WARDWELL L., TAMAYO P., GAT-VIKS I., RAMOS A. H., WOO M. S., WEIR B. A., GETZ G., BEROUKHIM R., O'KELLY M., DUTT A., ROZENBLATT-ROSEN O., DZIUNYCZ P., KOMISAROF J., CHIRIEAC L. R., LAFARGUE C. J., SCHEBLE V., WILBERTZ T., MA C., RAO S., NAKAGAWA H., STAIRS D. B., LIN L., GIORDANO T. J., WAGNER P., MINNA J. D., GAZDAR A. F., ZHU C. Q., BROSE M. S., CECCONELLO I., RIBEIRO U., Jr., MARIE S. K., DAHL O., SHIVDASANI R. A., TSAO M. S., RUBIN M. A., WONG K. K., REGEV A., HAHN W. C., BEER D. G., RUSTGI A. K. and MEYERSON M. (2009). "SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas." *Nat Genet* **41**(11): 1238-1242.

BEGICEVIC R. R. and FALASCA M. (2017). "ABC Transporters in Cancer Stem Cells: Beyond Chemoresistance." *Int J Mol Sci* **18**(11).

BIZZOCA A., CORSI P., POLIZZI A., PINTO M. F., XENAKI D., FURLEY A. J. and GENNARINI G. (2012). "F3/Contactin acts as a modulator of neurogenesis during cerebral cortex development." *Dev Biol* **365**(1): 133-151.

BOREGOWDA R. K., APPAIAH H. N., SIDDAIAH M., KUMARSWAMY S. B., SUNILA S., THIMMAIAH K. N., MORTHA K., TOOLE B. and BANERJEE Sd (2006). "Expression of hyaluronan in human tumor progression." *J Carcinog* **5**: 2.

BOURCIER C., GRISERI P., GREPIN R., BERTOLOTTO C., MAZURE N. and PAGES G. (2011). "Constitutive ERK activity induces downregulation of tristetraprolin, a major protein controlling interleukin8/CXCL8 mRNA stability in melanoma cells." *Am J Physiol Cell Physiol* **301**(3): C609-618.

- BOUWMAN P. and JONKERS J. (2012). "The effects of deregulated DNA damage signalling on cancer chemotherapy response and resistance." *Nat Rev Cancer* **12**(9): 587-598.
- BRENDEL C., SCHARENBERG C., DOHSE M., ROBEY R. W., BATES S. E., SHUKLA S., AMBUDKAR S. V., WANG Y., WENNEMUTH G., BURCHERT A., BOUDRIOT U. and NEUBAUER A. (2007). "Imatinib mesylate and nilotinib (AMN107) exhibit high-affinity interaction with ABCG2 on primitive hematopoietic stem cells." *Leukemia* **21**(6): 1267-1275.
- BROOKS D. L., SCHWAB L. P., KRUTILINA R., PARKE D. N., SETHURAMAN A., HOOGEWIJS D., SCHORG A., GOTWALD L., FAN M., WENGER R. H. and SEAGROVES T. N. (2016). "ITGA6 is directly regulated by hypoxia-inducible factors and enriches for cancer stem cell activity and invasion in metastatic breast cancer models." *Mol Cancer* **15**: 26.
- BROWN C. W., BRODSKY A. S. and FREIMAN R. N. (2015). "Notch3 overexpression promotes anoikis resistance in epithelial ovarian cancer via upregulation of COL4A2." *Mol Cancer Res* **13**(1): 78-85.
- CALFON M., ZENG H., URANO F., TILL J. H., HUBBARD S. R., HARDING H. P., CLARK S. G. and RON D. (2002). "IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA." *Nature* **415**(6867): 92-96.
- CAMPISI J. (2013). "Aging, cellular senescence, and cancer." *Annu Rev Physiol* **75**: 685-705.
- CAO S. S. and KAUFMAN R. J. (2012). "Unfolded protein response." *Curr Biol* **22**(16): R622-626.
- CHAE Y. C., CAINO M. C., LISANTI S., GHOSH J. C., DOHI T., DANIAL N. N., VILLANUEVA J., FERRERO S., VAIRA V., SANTAMBROGIO L., BOSARI S., LANGUINO L. R., HERLYN M. and ALTIERI D. C. (2012). "Control of tumor bioenergetics and survival stress signaling by mitochondrial HSP90s." *Cancer Cell* **22**(3): 331-344.
- CHANG X., MONITTO C. L., DEMOKAN S., KIM M. S., CHANG S. S., ZHONG X., CALIFANO J. A. and SIDRANSKY D. (2010). "Identification of hypermethylated genes associated with cisplatin resistance in human cancers." *Cancer Res* **70**(7): 2870-2879.
- CHAPPELL N. P., TENG P. N., HOOD B. L., WANG G., DARCY K. M., HAMILTON C. A., MAXWELL G. L. and CONRADTS T. P. (2012). "Mitochondrial proteomic analysis of cisplatin resistance in ovarian cancer." *J Proteome Res* **11**(9): 4605-4614.

- CHEN E. C., KARL T. A., KALISKY T., GUPTA S. K., O'BRIEN C. A., LONGACRE T. A., VAN DE RIJN M., QUAKE S. R., CLARKE M. F. and ROTHENBERG M. E. (2015). "KIT Signaling Promotes Growth of Colon Xenograft Tumors in Mice and Is Up-Regulated in a Subset of Human Colon Cancers." *Gastroenterology* **149**(3): 705-717 e702.
- CHEN H., JIA W. and LI J. (2016). "ECM1 promotes migration and invasion of hepatocellular carcinoma by inducing epithelial-mesenchymal transition." *World J Surg Oncol* **14**(1): 195.
- CHEN M. J., CHENG Y. M., CHEN C. C., CHEN Y. C. and SHEN C. J. (2017). "MiR-148a and miR-152 reduce tamoxifen resistance in ER+ breast cancer via downregulating ALCAM." *Biochem Biophys Res Commun* **483**(2): 840-846.
- CHEN Z., TAO Q., QIAO B. and ZHANG L. (2019). "Silencing of LINC01116 suppresses the development of oral squamous cell carcinoma by up-regulating microRNA-136 to inhibit FN1." *Cancer Manag Res* **11**: 6043-6059.
- CHENG P., CHEN H., LIU S. R., PU X. Y. and A Z. C. (2013). "SNPs in KIT and KITLG genes may be associated with oligospermia in Chinese population." *Biomarkers* **18**(8): 650-654.
- CHOW C. Y., WANG X., RICCARDI D., WOLFNER M. F. and CLARK A. G. (2015). "The genetic architecture of the genome-wide transcriptional response to ER stress in the mouse." *PLoS Genet* **11**(2): e1004924.
- CHUANG Y. C., WU H. Y., LIN Y. L., TZOU S. C., CHUANG C. H., JIAN T. Y., CHEN P. R., CHANG Y. C., LIN C. H., HUANG T. H., WANG C. C., CHAN Y. L. and LIAO K. W. (2018). "Blockade of ITGA2 Induces Apoptosis and Inhibits Cell Migration in Gastric Cancer." *Biol Proced Online* **20**: 10.
- COHEN E. R., REIS I. M., GOMEZ C., PEREIRA L., FREISER M. E., HOOSIEN G. and FRANZMANN E. J. (2017). "Immunohistochemistry Analysis of CD44, EGFR, and p16 in Oral Cavity and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma." *Otolaryngol Head Neck Surg* **157**(2): 239-251.
- CONDELLI V., CRISPO F., PIETRAFESA M., LETTINI G., MATASSA D. S., ESPOSITO F., LANDRISCINA M. and MADDALENA F. (2019). "HSP90 Molecular Chaperones, Metabolic Rewiring, and Epigenetics: Impact on Tumor Progression and Perspective for Anticancer Therapy." *Cells* **8**(6).

- CONNELLY J. J., CHEREPANOVA O. A., DOSS J. F., KARAOLI T., LILLARD T. S., MARKUNAS C. A., NELSON S., WANG T., ELLIS P. D., LANGFORD C. F., HAYNES C., SEO D. M., GOLDSCHMIDT-CLERMONT P. J., SHAH S. H., KRAUS W. E., HAUSER E. R. and GREGORY S. G. (2013). "Epigenetic regulation of COL15A1 in smooth muscle cell replicative aging and atherosclerosis." *Hum Mol Genet* **22**(25): 5107-5120.
- DEAN M., FOJO T. and BATES S. (2005). "Tumour stem cells and drug resistance." *Nat Rev Cancer* **5**(4): 275-284.
- DELLA CORTE C. M., BELLEVICINE C., VICIDOMINI G., VITAGLIANO D., MALAPELLE U., ACCARDO M., FABOZZI A., FIORELLI A., FASANO M., PAPACCIO F., MARTINELLI E., TROIANI T., TRONCONE G., SANTINI M., BIANCO R., CIARDIELLO F. and MORGILLO F. (2015). "SMO Gene Amplification and Activation of the Hedgehog Pathway as Novel Mechanisms of Resistance to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Drugs in Human Lung Cancer." *Clin Cancer Res* **21**(20): 4686-4697.
- DEMARIA M., O'LEARY M. N., CHANG J., SHAO L., LIU S., ALIMIRAH F., KOENIG K., LE C., MITIN N., DEAL A. M., ALSTON S., ACADEMIA E. C., KILMARX S., VALDOVINOS A., WANG B., DE BRUIN A., KENNEDY B. K., MELOV S., ZHOU D., SHARPLESS N. E., MUSS H. and CAMPISI J. (2017). "Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse." *Cancer Discov* **7**(2): 165-176.
- DRUBE J., ERNST T., PFIRRMANN M., ALBERT B. V., DRUBE S., REICH D., KRESINSKY A., HALFTER K., SORIO C., FABISCH C., HOCHHAUS A. and BOHMER F. D. (2018). "PTPRG and PTPRC modulate nilotinib response in chronic myeloid leukemia cells." *Oncotarget* **9**(10): 9442-9455.
- DU B. and SHIM J. S. (2016). "Targeting Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) to Overcome Drug Resistance in Cancer." *Molecules* **21**(7).
- DURAN G. E., WANG Y. C., MOISAN F., FRANCISCO E. B. and SIKIC B. I. (2017). "Decreased levels of baseline and drug-induced tubulin polymerisation are hallmarks of resistance to taxanes in ovarian cancer cells and are associated with epithelial-to-mesenchymal transition." *Br J Cancer* **116**(10): 1318-1328.
- EECHOUTE K., SPARREBOOM A., BURGER H., FRANKE R. M., SCHIAVON G., VERWEIJ J., LOOS W. J., WIEMER E. A. and MATHIJSEN R. H. (2011). "Drug transporters and imatinib treatment: implications for clinical practice." *Clin Cancer Res* **17**(3): 406-415.

- FALK J., BONNON C., GIRAULT J. A. and FAIVRE-SARRAILH C. (2002). "F3/contactin, a neuronal cell adhesion molecule implicated in axogenesis and myelination." *Biol Cell* **94**(6): 327-334.
- FERNANDEZ-CARNEADO J., VAN GOOL M., MARTOS V., CASTEL S., PRADOS P., DE MENDOZA J. and GIRALT E. (2005). "Highly efficient, nonpeptidic oligoguanidinium vectors that selectively internalize into mitochondria." *J Am Chem Soc* **127**(3): 869-874.
- FIORILLI P., PARTRIDGE D., STANISZEWSKA I., WANG J. Y., GRABACKA M., SO K., MARCINKIEWICZ C., REISS K., KHALILI K. and CROUL S. E. (2008). "Integrins mediate adhesion of medulloblastoma cells to tenascin and activate pathways associated with survival and proliferation." *Lab Invest* **88**(11): 1143-1156.
- FU C. T., ZHU K. Y., MI J. Q., LIU Y. F., MURRAY S. T., FU Y. F., REN C. G., DONG Z. W., LIU Y. J., DONG M., JIN Y., CHEN Y., DENG M., ZHANG W., CHEN B., BRESLIN P., CHEN S. J., CHEN Z., BECKER M. W., ZHU J., ZHANG J. W. and LIU T. X. (2010). "An evolutionarily conserved PTEN-C/EBPalpha-CTNNA1 axis controls myeloid development and transformation." *Blood* **115**(23): 4715-4724.
- GALLUZZI L., VITALE I., AARONSON S. A., ABRAMS J. M., ADAM D., AGOSTINIS P., ALNEMRI E. S., ALTUCCI L., AMELIO I., ANDREWS D. W., ANNICCHIARICO-PETRUZZELLI M., ANTONOV A. V., ARAMA E., BAEHRECKE E. H., BARLEV N. A., BAZAN N. G., BERNASSOLA F., BERTRAND M. J. M., BIANCHI K., BLAGOSKLONNY M. V., BLOMGREN K., BORNER C., BOYA P., BRENNER C., CAMPANELLA M., CANDI E., CARMONA-GUTIERREZ D., CECCONI F., CHAN F. K., CHANDEL N. S., CHENG E. H., CHIPUK J. E., CIDLOWSKI J. A., CIECHANOVER A., COHEN G. M., CONRAD M., CUBILLOS-RUIZ J. R., CZABOTAR P. E., D'ANGIOLELLA V., DAWSON T. M., DAWSON V. L., DE LAURENZI V., DE MARIA R., DEBATIN K. M., DEBERARDINIS R. J., DESHMUKH M., DI DANIELE N., DI VIRGILIO F., DIXIT V. M., DIXON S. J., DUCKETT C. S., DYNLACHT B. D., EL-DEIRY W. S., ELROD J. W., FIMIA G. M., FULDA S., GARCIA-SAEZ A. J., GARG A. D., GARRIDO C., GAVATHIOTIS E., GOLSTEIN P., GOTTLIEB E., GREEN D. R., GREENE L. A., GRONEMEYER H., GROSS A., HAJNOCZKY G., HARDWICK J. M., HARRIS I. S., HENGARTNER M. O., HETZ C., ICHIO H., JAATTELA M., JOSEPH B., JOST P. J., JUIN P. P., KAISER W. J., KARIN M., KAUFMANN T., KEPP O., KIMCHI A., KITSIS R. N., KLIONSKY D. J., KNIGHT R. A., KUMAR S., LEE S. W., LEMASTERS J. J., LEVINE B., LINKERMANN A., LIPTON S. A., LOCKSHIN R. A., LOPEZ-OTIN C., LOWE S. W., LUEDDE T., LUGLI E., MACFARLANE M., MADEO F., MALEWICZ M., MALORNI W., MANIC G., MARINE J. C., MARTIN S. J., MARTINOU J. C., MEDEMA J. P., MEHLEN P., MEIER P., MELINO S., MIAO E. A., MOLKENTIN J. D., MOLL U. M., MUNOZ-PINEDO C., NAGATA S., NUNEZ G., OBERST A., OREN M., OVERHOLTZER M., PAGANO M., PANARETAKIS T.,

- PASPARAKIS M., PENNINGER J. M., PEREIRA D. M., PERVAIZ S., PETER M. E., PIACENTINI M., PINTON P., PREHN J. H. M., PUTHALAKATH H., RABINOVICH G. A., REHM M., RIZZUTO R., RODRIGUES C. M. P., RUBINSZTEIN D. C., RUDEL T., RYAN K. M., SAYAN E., SCORRANO L., SHAO F., SHI Y., SILKE J., SIMON H. U., SISTIGU A., STOCKWELL B. R., STRASSER A., SZABADKAI G., TAIT S. W. G., TANG D., TAVERNARAKIS N., THORBURN A., TSUJIMOTO Y., TURK B., VANDEN BERGHE T., VANDENABEELE P., VANDER HEIDEN M. G., VILLUNGER A., VIRGIN H. W., VOUSDEN K. H., VUCIC D., WAGNER E. F., WALCZAK H., WALLACH D., WANG Y., WELLS J. A., WOOD W., YUAN J., ZAKERI Z., ZHIVOTOVSKY B., ZITVOGEL L., MELINO G. and KROEMER G. (2018). "Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018." *Cell Death Differ* **25**(3): 486-541.
- GHARIBI A., LA KIM S., MOLNAR J., BRAMBILLA D., ADAMIAN Y., HOOVER M., HONG J., LIN J., WOLFENDEN L. and KELBER J. A. (2017). "ITGA1 is a pre-malignant biomarker that promotes therapy resistance and metastatic potential in pancreatic cancer." *Sci Rep* **7**(1): 10060.
- GIRES O. (2011). "Lessons from common markers of tumor-initiating cells in solid cancers." *Cell Mol Life Sci* **68**(24): 4009-4022.
- GLANSDORFF N. (2000). "About the last common ancestor, the universal life-tree and lateral gene transfer: a reappraisal." *Mol Microbiol* **38**(2): 177-185.
- GOLOUDINA A. R., DEMIDOV O. N. and GARRIDO C. (2012). "Inhibition of HSP70: a challenging anti-cancer strategy." *Cancer Lett* **325**(2): 117-124.
- GORDON R. R. and NELSON P. S. (2012). "Cellular senescence and cancer chemotherapy resistance." *Drug Resist Updat* **15**(1-2): 123-131.
- GRAUDENS E., BOULANGER V., MOLLARD C., MARIAGE-SAMSON R., BARLET X., GREMY G., COUILLAUD C., LAJEMI M., PIATIER-TONNEAU D., ZABORSKI P., EVENO E., AUFFRAY C. and IMBEAUD S. (2006). "Deciphering cellular states of innate tumor drug responses." *Genome Biol* **7**(3): R19.
- GRAZIOSI L., MENCARELLI A., SANTORELLI C., RENGÀ B., CIPRIANI S., CAVAZZONI E., PALLADINO G., LAUFER S., BURNET M., DONINI A. and FIORUCCI S. (2012). "Mechanistic role of p38 MAPK in gastric cancer dissemination in a rodent model peritoneal metastasis." *Eur J Pharmacol* **674**(2-3): 143-152.
- GUARAGNELLA N., GIANNATTASIO S. and MORO L. (2014). "Mitochondrial dysfunction in cancer chemoresistance." *Biochem Pharmacol* **92**(1): 62-72.

- HAN D., LERNER A. G., VANDE WALLE L., UPTON J. P., XU W., HAGEN A., BACKES B. J., OAKES S. A. and PAPA F. R. (2009). "IRE1alpha kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates." *Cell* **138**(3): 562-575.
- HANDSCHUH L., KAZMIERCZAK M., MILEWSKI M. C., GORALSKI M., LUCZAK M., WOJTASZEWSKA M., USZCZYNSKA-RATAJCZAK B., LEWANDOWSKI K., KOMARNICKI M. and FIGLEROWICZ M. (2018). "Gene expression profiling of acute myeloid leukemia samples from adult patients with AML-M1 and -M2 through boutique microarrays, real-time PCR and droplet digital PCR." *Int J Oncol* **52**(3): 656-678.
- HANG D., YUAN H., LIU L., WANG L., MIAO L., ZHU M., DU J., DAI J., HU Z., CHEN N., SHEN H. and MA H. (2017). "KIT polymorphisms were associated with the risk for head and neck squamous carcinoma in Chinese population." *Mol Carcinog* **56**(1): 232-237.
- HARDING H. P., NOVOA I., ZHANG Y., ZENG H., WEK R., SCHAPIRA M. and RON D. (2000). "Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells." *Mol Cell* **6**(5): 1099-1108.
- HARTHEIMER J. S., PARK S., RAO S. S. and KIM Y. (2019). "Targeting Hyaluronan Interactions for Glioblastoma Stem Cell Therapy." *Cancer Microenviron* **12**(1): 47-56.
- HASLEHURST A. M., KOTI M., DHARSEE M., NUIN P., EVANS K., GERACI J., CHILDS T., CHEN J., LI J., WEBERPALS J., DAVEY S., SQUIRE J., PARK P. C. and FEILLOTTER H. (2012). "EMT transcription factors snail and slug directly contribute to cisplatin resistance in ovarian cancer." *BMC Cancer* **12**: 91.
- HEKMATSHOAR Y., NAKHLE J., GALLONI M. and VIGNAIS M. L. (2018). "The role of metabolism and tunneling nanotube-mediated intercellular mitochondria exchange in cancer drug resistance." *Biochem J* **475**(14): 2305-2328.
- HEKMATSHOAR Y., OZKAN T., ALTINOK GUNES B., BOZKURT S., KARADAG A., KARABAY A. Z. and SUNGUROGLU A. (2018). "Characterization of imatinib-resistant K562 cell line displaying resistance mechanisms." *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **64**(6): 23-30.
- HENDERSHOT L. M. (2004). "The ER function BiP is a master regulator of ER function." *Mt Sinai J Med* **71**(5): 289-297.

- HERMISTON M. L., XU Z. and WEISS A. (2003). "CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells." *Annu Rev Immunol* **21**: 107-137.
- HETZ C., CHEVET E. and OAKES S. A. (2015). "Proteostasis control by the unfolded protein response." *Nat Cell Biol* **17**(7): 829-838.
- HIBI K., YAMAKAWA K., UEDA R., HORIO Y., MURATA Y., TAMARI M., UCHIDA K., TAKAHASHI T., NAKAMURA Y. and TAKAHASHI T. (1994). "Aberrant upregulation of a novel integrin alpha subunit gene at 3p21.3 in small cell lung cancer." *Oncogene* **9**(2): 611-619.
- HOLOHAN C., VAN SCHAEYBROECK S., LONGLEY D. B. and JOHNSTON P. G. (2013). "Cancer drug resistance: an evolving paradigm." *Nat Rev Cancer* **13**(10): 714-726.
- HONG S. K., LEE H., KWON O. S., SONG N. Y., LEE H. J., KANG S., KIM J. H., KIM M., KIM W. and CHA H. J. (2018). "Large-scale pharmacogenomics based drug discovery for ITGB3 dependent chemoresistance in mesenchymal lung cancer." *Mol Cancer* **17**(1): 175.
- HOTER A., EL-SABBAN M. E. and NAIM H. Y. (2018). "The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease." *Int J Mol Sci* **19**(9).
- HU B. and OKI Y. (2018). "Novel Immunotherapy Options for Extranodal NK/T-Cell Lymphoma." *Front Oncol* **8**: 139.
- ILHAN-MUTLU A., SIEHS C., BERGHOFF A. S., RICKEN G., WIDHALM G., WAGNER L. and PREUSSER M. (2016). "Expression profiling of angiogenesis-related genes in brain metastases of lung cancer and melanoma." *Tumour Biol* **37**(1): 1173-1182.
- IMAFUJI H., MATSUO Y., UEDA G., OMI K., HAYASHI Y., SAITO K., TSUBOI K., MORIMOTO M., KOIDE S., OGAWA R., HARA M., TAKAHASHI H. and TAKIGUCHI S. (2019). "Acquisition of gemcitabine resistance enhances angiogenesis via upregulation of IL8 production in pancreatic cancer." *Oncol Rep* **41**(6): 3508-3516.
- IRIE-SASAKI J., SASAKI T., MATSUMOTO W., OPAVSKY A., CHENG M., WELSTEAD G., GRIFFITHS E., KRAWCZYK C., RICHARDSON C. D., AITKEN K., ISCOVE N., KORETZKY G., JOHNSON P., LIU P., ROTHSTEIN D. M. and PENNINGER J. M. (2001). "CD45 is a JAK phosphatase and negatively regulates cytokine receptor signalling." *Nature* **409**(6818): 349-354.
- JAIN P., KANTARJIAN H., PATEL K. P., GONZALEZ G. N., LUTHRA R., KANAGAL SHAMANNA R., SASAKI K., JABBOUR E., ROMO C. G., KADIA T. M., PEMMARAJU N., DAVER N.,

- BORTHAKUR G., ESTROV Z., RAVANDI F., O'BRIEN S. and CORTES J. (2016). "Impact of BCR-ABL transcript type on outcome in patients with chronic-phase CML treated with tyrosine kinase inhibitors." *Blood* **127**(10): 1269-1275.
- JANUCHOWSKI R., WOJTOWICZ K., STERZYSKA K., SOSISKA P., ANDRZEJEWSKA M., ZAWIERUCHA P., NOWICKI M. and ZABEL M. (2016). "Inhibition of ALDH1A1 activity decreases expression of drug transporters and reduces chemotherapy resistance in ovarian cancer cell lines." *Int J Biochem Cell Biol* **78**: 248-259.
- JIA Y., GU D., WAN J., YU B., ZHANG X., CHIOREAN E. G., WANG Y. and XIE J. (2019). "The role of GLI-SOX2 signaling axis for gemcitabine resistance in pancreatic cancer." *Oncogene* **38**(10): 1764-1777.
- JINGSONG H., HONG G., YANG J., DUO Z., LI F., WEICAI C., XUEYING L., YOUSHENG M., YIWEN O., YUE P. and ZOU C. (2017). "siRNA-mediated suppression of collagen type iv alpha 2 (COL4A2) mRNA inhibits triple-negative breast cancer cell proliferation and migration." *Oncotarget* **8**(2): 2585-2593.
- JORDANIDES N. E., JORGENSEN H. G., HOLYOAKE T. L. and MOUNTFORD J. C. (2006). "Functional ABCG2 is overexpressed on primary CML CD34+ cells and is inhibited by imatinib mesylate." *Blood* **108**(4): 1370-1373.
- JOSEFSSON A., ADAMO H., HAMMARSTEN P., GRANFORS T., STATIN P., EGEVAD L., LAURENT A. E., WIKSTROM P. and BERGH A. (2011). "Prostate cancer increases hyaluronan in surrounding nonmalignant stroma, and this response is associated with tumor growth and an unfavorable outcome." *Am J Pathol* **179**(4): 1961-1968.
- KANG B. H., PLESCIA J., DOHI T., ROSA J., DOXSEY S. J. and ALTIERI D. C. (2007). "Regulation of tumor cell mitochondrial homeostasis by an organelle-specific Hsp90 chaperone network." *Cell* **131**(2): 257-270.
- KANG B. H., PLESCIA J., SONG H. Y., MELI M., COLOMBO G., BEEBE K., SCROGGINS B., NECKERS L. and ALTIERI D. C. (2009). "Combinatorial drug design targeting multiple cancer signaling networks controlled by mitochondrial Hsp90." *J Clin Invest* **119**(3): 454-464.
- KANG B. H., TAVECCHIO M., GOEL H. L., HSIEH C. C., GARLICK D. S., RASKETT C. M., LIAN J. B., STEIN G. S., LANGUINO L. R. and ALTIERI D. C. (2011). "Targeted inhibition of mitochondrial Hsp90 suppresses localised and metastatic prostate cancer growth in a genetic mouse model of disease." *Br J Cancer* **104**(4): 629-634.

- KANNO M., NAKAMURA S., KAWAHARA M., UENO S., NAKAMINE H., MATSUMOTO M. and FUJIMURA Y. (2008). "Chemotherapy-resistant intravascular lymphoma accompanied by ADAMTS13 inhibitor successfully treated with rituximab." *Int J Hematol* **88**(3): 345-347.
- KARJALAINEN J. M., TAMMI R. H., TAMMI M. I., ESKELINEN M. J., AGREN U. M., PARKKINEN J. J., ALHAVA E. M. and KOSMA V. M. (2000). "Reduced level of CD44 and hyaluronan associated with unfavorable prognosis in clinical stage I cutaneous melanoma." *Am J Pathol* **157**(3): 957-965.
- KATOH M. (2016). "FGFR inhibitors: Effects on cancer cells, tumor microenvironment and whole-body homeostasis (Review)." *Int J Mol Med* **38**(1): 3-15.
- KEBEBEW E., PENG M., REIFF E. and MCMILLAN A. (2006). "Diagnostic and extent of disease multigene assay for malignant thyroid neoplasms." *Cancer* **106**(12): 2592-2597.
- KOHNO K. (2007). "How transmembrane proteins sense endoplasmic reticulum stress." *Antioxid Redox Signal* **9**(12): 2295-2303.
- KOLOSENKO I., AVNET S., BALDINI N., VIKLUND J. and DE MILITO A. (2017). "Therapeutic implications of tumor interstitial acidification." *Semin Cancer Biol* **43**: 119-133.
- KOZOVSKA Z., GABRISOVA V. and KUCEROVA L. (2014). "Colon cancer: cancer stem cells markers, drug resistance and treatment." *Biomed Pharmacother* **68**(8): 911-916.
- KRESO A. and DICK J. E. (2014). "Evolution of the cancer stem cell model." *Cell Stem Cell* **14**(3): 275-291.
- KURBAN G., DUPLAN E., RAMLAL N., HUDON V., SADO Y., NINOMIYA Y. and PAUSE A. (2008). "Collagen matrix assembly is driven by the interaction of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein with hydroxylated collagen IV alpha 2." *Oncogene* **27**(7): 1004-1012.
- LEE K. M., NAM K., OH S., LIM J., LEE T. and SHIN I. (2015). "ECM1 promotes the Warburg effect through EGF-mediated activation of PKM2." *Cell Signal* **27**(2): 228-235.
- LEHNE G., GRASMO-WENDLER U. H., BERNER J. M., MEZA-ZEPEDA L. A., ADAMSEN B. L., FLACK A., REINER A., CLAUSEN O. P., HOVIG E. and MYKLEBOST O. (2009). "Upregulation of stem cell genes in multidrug resistant K562 leukemia cells." *Leuk Res* **33**(10): 1379-1385.

- LEHUEDE C., DUPUY F., RABINOVITCH R., JONES R. G. and SIEGEL P. M. (2016). "Metabolic Plasticity as a Determinant of Tumor Growth and Metastasis." *Cancer Res* **76**(18): 5201-5208.
- LENCI R. E., RACHAKONDA P. S., KUBARENKO A. V., WEBER A. N., BRANDT A., GAST A., SUCKER A., HEMMINKI K., SCHADENDORF D. and KUMAR R. (2012). "Integrin genes and susceptibility to human melanoma." *Mutagenesis* **27**(3): 367-373.
- LEWIS M. R. and LEWIS W. H. (1914). "Mitochondria in Tissue Culture." *Science* **39**(1000): 330-333.
- LI D., ZHAO L. N., ZHENG X. L., LIN P., LIN F., LI Y., ZOU H. F., CUI R. J., CHEN H. and YU X. G. (2014). "Sox2 is involved in paclitaxel resistance of the prostate cancer cell line PC-3 via the PI3K/Akt pathway." *Mol Med Rep* **10**(6): 3169-3176.
- LI H. L., WU H., ZHANG B. B., SHI H. L. and WU X. J. (2016). "MAPK pathways are involved in the inhibitory effect of berberine hydrochloride on gastric cancer MGC 803 cell proliferation and IL-8 secretion in vitro and in vivo." *Mol Med Rep* **14**(2): 1430-1438.
- LI X., ZHAO Z., YI S., MA L., LI M., LIU M., ZHANG Y. and LIU G. (2018). "Nuclear Klf4 accumulation is associated with cetuximab drug-resistance and predicts poor prognosis of nasopharyngeal carcinoma." *J Transl Med* **16**(1): 183.
- LI Y., CHEN K., LI L., LI R., ZHANG J. and REN W. (2015). "Overexpression of SOX2 is involved in paclitaxel resistance of ovarian cancer via the PI3K/Akt pathway." *Tumour Biol* **36**(12): 9823-9828.
- LIU J., LIU D., YANG Z. and YANG Z. (2019). "High LAMC1 expression in glioma is associated with poor prognosis." *Onco Targets Ther* **12**: 4253-4260.
- LIU L., SALNIKOV A. V., BAUER N., ALEKSANDROWICZ E., LABSCH S., NWAEBURU C., MATTERN J., GLADKICH J., SCHEMMER P., WERNER J. and HERR I. (2014). "Triptolide reverses hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition and stem-like features in pancreatic cancer by NF-kappaB downregulation." *Int J Cancer* **134**(10): 2489-2503.
- LIU P., CHEN S., WU W., LIU B., SHEN W., WANG F., HE X. and ZHANG S. (2012). "Contactin-1 (CNTN-1) overexpression is correlated with advanced clinical stage and lymph node metastasis in oesophageal squamous cell carcinomas." *Jpn J Clin Oncol* **42**(7): 612-618.

- LIU S., LI N., YU X., XIAO X., CHENG K., HU J., WANG J., ZHANG D., CHENG S. and LIU S. (2013). "Expression of intercellular adhesion molecule 1 by hepatocellular carcinoma stem cells and circulating tumor cells." *Gastroenterology* **144**(5): 1031-1041 e1010.
- LIU S. Y. and ZHENG P. S. (2013). "High aldehyde dehydrogenase activity identifies cancer stem cells in human cervical cancer." *Oncotarget* **4**(12): 2462-2475.
- LIU T. X., BECKER M. W., JELINEK J., WU W. S., DENG M., MIKHALKEVICH N., HSU K., BLOOMFIELD C. D., STONE R. M., DEANGELO D. J., GALINSKY I. A., ISSA J. P., CLARKE M. F. and LOOK A. T. (2007). "Chromosome 5q deletion and epigenetic suppression of the gene encoding alpha-catenin (CTNNA1) in myeloid cell transformation." *Nat Med* **13**(1): 78-83.
- LIU X., LUO X., WU Y., XIA D., CHEN W., FANG Z., DENG J., HAO Y., YANG X., ZHANG T., ZHOU L., WU Y., WANG Q., XU J., HU X. and LI L. (2018). "MicroRNA-34a Attenuates Paclitaxel Resistance in Prostate Cancer Cells via Direct Suppression of JAG1/Notch1 Axis." *Cell Physiol Biochem* **50**(1): 261-276.
- LIU Y., HE C. and HUANG X. (2017). "Metformin partially reverses the carboplatin-resistance in NSCLC by inhibiting glucose metabolism." *Oncotarget* **8**(43): 75206-75216.
- LOMPARDIA S., DIAZ M., PIBUEL M., PAPADEMETRIO D., POODTS D., MIHALEZ C., ALVAREZ E. and HAJOS S. (2019). "Hyaluronan abrogates imatinib-induced senescence in chronic myeloid leukemia cell lines." *Sci Rep* **9**(1): 10930.
- LU P. D., HARDING H. P. and RON D. (2004). "Translation reinitiation at alternative open reading frames regulates gene expression in an integrated stress response." *J Cell Biol* **167**(1): 27-33.
- LU S., YAO Y., XU G., ZHOU C., ZHANG Y., SUN J., JIANG R., SHAO Q. and CHEN Y. (2018). "CD24 regulates sorafenib resistance via activating autophagy in hepatocellular carcinoma." *Cell Death Dis* **9**(6): 646.
- LUKASHOVA-V ZANGEN I., KNEITZ S., MONORANU C. M., RUTKOWSKI S., HINKES B., VINCE G. H., HUANG B. and ROGGENDORF W. (2007). "Ependymoma gene expression profiles associated with histological subtype, proliferation, and patient survival." *Acta Neuropathol* **113**(3): 325-337.

- LYDOLPH M. C., MORGAN-FISHER M., HOYE A. M., COUCHMAN J. R., WEWER U. M. and YONEDA A. (2009). "Alpha9beta1 integrin in melanoma cells can signal different adhesion states for migration and anchorage." *Exp Cell Res* **315**(19): 3312-3324.
- MAHADEVAN D., DIMENTO J., CROCE K. D., RILEY C., GEORGE B., FUCHS D., MATHEWS T., WILSON C. and LOBELL M. (2006). "Transcriptosome and serum cytokine profiling of an atypical case of myelodysplastic syndrome with progression to acute myelogenous leukemia." *Am J Hematol* **81**(10): 779-786.
- MAJMUNDAR A. J., WONG W. J. and SIMON M. C. (2010). "Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress." *Mol Cell* **40**(2): 294-309.
- MARTINUCCI B., MINATEL B. C., CUCIELO M. S., MEDEIROS M., VECETTI-JUNIOR I. J., FELISBINO S. L. and DELELLA F. K. (2019). "Basement membrane extract attenuates the more malignant gene expression profile accentuated by fibronectin in prostate cancer cells." *Mol Cell Biochem* **451**(1-2): 131-138.
- MATASSA D. S., AGLIARULO I., AVOLIO R., LANDRISCINA M. and ESPOSITO F. (2018). "TRAP1 Regulation of Cancer Metabolism: Dual Role as Oncogene or Tumor Suppressor." *Genes (Basel)* **9**(4).
- MATHEW R., KARP C. M., BEAUDOIN B., VUONG N., CHEN G., CHEN H. Y., BRAY K., REDDY A., BHANOT G., GELINAS C., DIPOLA R. S., KARANTZA-WADSWORTH V. and WHITE E. (2009). "Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62." *Cell* **137**(6): 1062-1075.
- MATHUPALA S. P., KO Y. H. and PEDERSEN P. L. (2010). "The pivotal roles of mitochondria in cancer: Warburg and beyond and encouraging prospects for effective therapies." *Biochim Biophys Acta* **1797**(6-7): 1225-1230.
- MATHUPALA S. P., REMPEL A. and PEDERSEN P. L. (1997). "Aberrant glycolytic metabolism of cancer cells: a remarkable coordination of genetic, transcriptional, post-translational, and mutational events that lead to a critical role for type II hexokinase." *J Bioenerg Biomembr* **29**(4): 339-343.
- MATSUDA N., SATO S., SHIBA K., OKATSU K., SAISHO K., GAUTIER C. A., SOU Y. S., SAIKI S., KAWAJIRI S., SATO F., KIMURA M., KOMATSU M., HATTORI N. and TANAKA K. (2010). "PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy." *J Cell Biol* **189**(2): 211-221.
- MAYER M. P. (2010). "Gymnastics of molecular chaperones." *Mol Cell* **39**(3): 321-331.

- MERKSAMER P. I., TRUSINA A. and PAPA F. R. (2008). "Real-time redox measurements during endoplasmic reticulum stress reveal interlinked protein folding functions." *Cell* **135**(5): 933-947.
- MICHIELS C. (2004). "Physiological and pathological responses to hypoxia." *Am J Pathol* **164**(6): 1875-1882.
- MITCHELL S. M., ROSS J. P., DREW H. R., HO T., BROWN G. S., SAUNDERS N. F., DUESING K. R., BUCKLEY M. J., DUNNE R., BEETSON I., RAND K. N., MCEVOY A., THOMAS M. L., BAKER R. T., WATTCHOW D. A., YOUNG G. P., LOCKETT T. J., PEDERSEN S. K., LAPOINTE L. C. and MOLLOY P. L. (2014). "A panel of genes methylated with high frequency in colorectal cancer." *BMC Cancer* **14**: 54.
- MOHAMMAD R. M., MUQBIL I., LOWE L., YEDJOU C., HSU H. Y., LIN L. T., SIEGELIN M. D., FIMOIGNARI C., KUMAR N. B., DOU Q. P., YANG H., SAMADI A. K., RUSSO G. L., SPAGNUOLO C., RAY S. K., CHAKRABARTI M., MORRE J. D., COLEY H. M., HONOKI K., FUJII H., GEORGAKILAS A. G., AMEDEI A., NICCOLAI E., AMIN A., ASHRAF S. S., HELFERICH W. G., YANG X., BOOSANI C. S., GUHA G., BHAKTA D., CIRIOLO M. R., AQUILANO K., CHEN S., MOHAMMED S. I., KEITH W. N., BILSLAND A., HALICKA D., NOWSHEEN S. and AZMI A. S. (2015). "Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer." *Semin Cancer Biol* **35 Suppl**: S78-S103.
- MOISOI N., KLUPSCH K., FEDELE V., EAST P., SHARMA S., RENTON A., PLUN-FAVREAU H., EDWARDS R. E., TEISMANN P., ESPOSTI M. D., MORRISON A. D., WOOD N. W., DOWNWARD J. and MARTINS L. M. (2009). "Mitochondrial dysfunction triggered by loss of HtrA2 results in the activation of a brain-specific transcriptional stress response." *Cell Death Differ* **16**(3): 449-464.
- MORERA D. S., HENNIG M. S., TALUKDER A., LOKESHWAR S. D., WANG J., GARCIA-ROIG M., ORTIZ N., YATES T. J., LOPEZ L. E., KALLIFATIDIS G., KRAMER M. W., JORDAN A. R., MERSEBURGER A. S., MANOHARAN M., SOLOWAY M. S., TERRIS M. K. and LOKESHWAR V. B. (2017). "Hyaluronic acid family in bladder cancer: potential prognostic biomarkers and therapeutic targets." *Br J Cancer* **117**(10): 1507-1517.
- MOSMANN T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* **65**(1-2): 55-63.
- MOSTOVICH L. A., PRUDNIKOVA T. Y., KONDRATOV A. G., LOGINOVA D., VAVILOV P. V., RYKOVA V. I., SIDOROV S. V., PAVLOVA T. V., KASHUBA V. I., ZABAROVSKY E. R.

- and GRIGORIEVA E. V. (2011). "Integrin alpha9 (ITGA9) expression and epigenetic silencing in human breast tumors." *Cell Adh Migr* **5**(5): 395-401.
- MUGURUMA Y., YAHATA T., WARITA T., HOZUMI K., NAKAMURA Y., SUZUKI R., ITO M. and ANDO K. (2017). "Jagged1-induced Notch activation contributes to the acquisition of bortezomib resistance in myeloma cells." *Blood Cancer J* **7**(12): 650.
- MUKHERJEE P., GUPTA A., CHATTOPADHYAY D. and CHATTERJI U. (2017). "Modulation of SOX2 expression delineates an end-point for paclitaxel-effectiveness in breast cancer stem cells." *Sci Rep* **7**(1): 9170.
- MUTLU P., URAL A. U. and GUNDUZ U. (2012). "Differential gene expression analysis related to extracellular matrix components in drug-resistant RPMI-8226 cell line." *Biomed Pharmacother* **66**(3): 228-231.
- NAKASHIMA R. A., MANGAN P. S., COLOMBINI M. and PEDERSEN P. L. (1986). "Hexokinase receptor complex in hepatoma mitochondria: evidence from N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-labeling studies for the involvement of the pore-forming protein VDAC." *Biochemistry* **25**(5): 1015-1021.
- NAYAK A., DAS S., NAYAK D., SETHY C., NARAYAN S. and KUNDU C. N. (2019). "Nanoquinacrine sensitizes 5-FU-resistant cervical cancer stem-like cells by down-regulating Nectin-4 via ADAM-17 mediated NOTCH deregulation." *Cell Oncol (Dordr)* **42**(2): 157-171.
- OKADA T., LEE A. Y., QIN L. X., AGARAM N., MIMAE T., SHEN Y., O'CONNOR R., LOPEZ-LAGO M. A., CRAIG A., MILLER M. L., AGIUS P., MOLINELLI E., SOCCI N. D., CRAGO A. M., SHIMA F., SANDER C. and SINGER S. (2016). "Integrin-alpha10 Dependency Identifies RAC and RICTOR as Therapeutic Targets in High-Grade Myxofibrosarcoma." *Cancer Discov* **6**(10): 1148-1165.
- OKTEM G., SERCAN O., GUVEN U., USLU R., UYSAL A., GOKSEL G., AYLA S. and BILIR A. (2014). "Cancer stem cell differentiation: TGFbeta1 and versican may trigger molecules for the organization of tumor spheroids." *Oncol Rep* **32**(2): 641-649.
- PARK H. K., LEE J. E., LIM J., JO D. E., PARK S. A., SUH P. G. and KANG B. H. (2014). "Combination treatment with doxorubicin and gamitrinib synergistically augments anticancer activity through enhanced activation of Bim." *BMC Cancer* **14**: 431.

- PASTORINO J. G., SHULGA N. and HOEK J. B. (2002). "Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis." *J Biol Chem* **277**(9): 7610-7618.
- PEDERSEN P. L., MATHUPALA S., REMPEL A., GESCHWIND J. F. and KO Y. H. (2002). "Mitochondrial bound type II hexokinase: a key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for therapeutic intervention." *Biochim Biophys Acta* **1555**(1-3): 14-20.
- PELLEGATTI P., RAFFAGHELLO L., BIANCHI G., PICCARDI F., PISTOIA V. and DI VIRGILIO F. (2008). "Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase." *PLoS One* **3**(7): e2599.
- PHI L. T. H., SARI I. N., YANG Y. G., LEE S. H., JUN N., KIM K. S., LEE Y. K. and KWON H. Y. (2018). "Cancer Stem Cells (CSCs) in Drug Resistance and their Therapeutic Implications in Cancer Treatment." *Stem Cells Int* **2018**: 5416923.
- PIVA M., DOMENICI G., IRIONDO O., RABANO M., SIMOES B. M., COMAILLS V., BARREDO I., LOPEZ-RUIZ J. A., ZABALZA I., KYPTA R. and VIVANCO Md (2014). "Sox2 promotes tamoxifen resistance in breast cancer cells." *EMBO Mol Med* **6**(1): 66-79.
- PLOW E. F., HAAS T. A., ZHANG L., LOFTUS J. and SMITH J. W. (2000). "Ligand binding to integrins." *J Biol Chem* **275**(29): 21785-21788.
- PORPORATO P. E., FILIGHEDDU N., PEDRO J. M. B., KROEMER G. and GALLUZZI L. (2018). "Mitochondrial metabolism and cancer." *Cell Res* **28**(3): 265-280.
- POWERS M. V., JONES K., BARILLARI C., WESTWOOD I., VAN MONTFORT R. L. and WORKMAN P. (2010). "Targeting HSP70: the second potentially druggable heat shock protein and molecular chaperone?" *Cell Cycle* **9**(8): 1542-1550.
- POZAROWSKI P. and DARZYNKIEWICZ Z. (2004). "Analysis of cell cycle by flow cytometry." *Methods Mol Biol* **281**: 301-311.
- PUDOVA E. A., KUDRYAVTSEVA A. V., FEDOROVA M. S., ZARETSKY A. R., SHCHERBO D. S., LUKYANOVA E. N., POPOV A. Y., SADRIDINOVA A. F., ABRAMOV I. S., KHARITONOV S. L., KRASNOV G. S., KLIMINA K. M., KOROBAN N. V., VOLCHENKO N. N., NYUSHKO K. M., MELNIKOVA N. V., CHERNICHENKO M. A., SIDOROV D. V., ALEKSEEV B. Y., KISELEVA M. V., KAPRIN A. D., DMITRIEV A. A. and SNEZHKINA A. V. (2018). "HK3 overexpression associated with epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer." *BMC Genomics* **19**(Suppl 3): 113.

- PUISSANT A., DUFIES M., FENOUILLE N., BEN SAHRA I., JACQUEL A., ROBERT G., CLUZEAU T., DECKERT M., TICHET M., CHELI Y., CASSUTO J. P., RAYNAUD S., LEGROS L., PASQUET J. M., MAHON F. X., LUCIANO F. and AUBERGER P. (2012). "Imatinib triggers mesenchymal-like conversion of CML cells associated with increased aggressiveness." *J Mol Cell Biol* **4**(4): 207-220.
- PYRKO P., SCHONTHAL A. H., HOFMAN F. M., CHEN T. C. and LEE A. S. (2007). "The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas." *Cancer Res* **67**(20): 9809-9816.
- QIAN Y., WANG X., LI Y., CAO Y. and CHEN X. (2016). "Extracellular ATP a New Player in Cancer Metabolism: NSCLC Cells Internalize ATP In Vitro and In Vivo Using Multiple Endocytic Mechanisms." *Mol Cancer Res* **14**(11): 1087-1096.
- QIAN Y., WANG X., LIU Y., LI Y., COLVIN R. A., TONG L., WU S. and CHEN X. (2014). "Extracellular ATP is internalized by macropinocytosis and induces intracellular ATP increase and drug resistance in cancer cells." *Cancer Lett* **351**(2): 242-251.
- QIN S., ZHANG B., XIAO G., SUN X., LI G., HUANG G., GAO X., LI X., WANG H., YANG C. and REN H. (2016). "Fibronectin protects lung cancer cells against docetaxel-induced apoptosis by promoting Src and caspase-8 phosphorylation." *Tumour Biol* **37**(10): 13509-13520.
- RAMBOLD A. S. and LIPPINCOTT-SCHWARTZ J. (2011). "Mechanisms of mitochondria and autophagy crosstalk." *Cell Cycle* **10**(23): 4032-4038.
- REDAELLI S., PIAZZA R., ROSTAGNO R., MAGISTRONI V., PERINI P., MAREGA M., GAMBACORTI-PASSERINI C. and BOSCHELLI F. (2009). "Activity of bosutinib, dasatinib, and nilotinib against 18 imatinib-resistant BCR/ABL mutants." *J Clin Oncol* **27**(3): 469-471.
- REDDY R. K., MAO C., BAUMEISTER P., AUSTIN R. C., KAUFMAN R. J. and LEE A. S. (2003). "Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation." *J Biol Chem* **278**(23): 20915-20924.
- RON D. and WALTER P. (2007). "Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(7): 519-529.
- RUTKOWSKI D. T. and KAUFMAN R. J. (2004). "A trip to the ER: coping with stress." *Trends Cell Biol* **14**(1): 20-28.

- SAUNDERS A. E. and JOHNSON P. (2010). "Modulation of immune cell signalling by the leukocyte common tyrosine phosphatase, CD45." *Cell Signal* **22**(3): 339-348.
- SAXENA M., STEPHENS M. A., PATHAK H. and RANGARAJAN A. (2011). "Transcription factors that mediate epithelial-mesenchymal transition lead to multidrug resistance by upregulating ABC transporters." *Cell Death Dis* **2**: e179.
- SCHARENBERG C. W., HARKEY M. A. and TOROK-STORB B. (2002). "The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors." *Blood* **99**(2): 507-512.
- SCHEUNER D., SONG B., MCEWEN E., LIU C., LAYBUTT R., GILLESPIE P., SAUNDERS T., BONNER-WEIR S. and KAUFMAN R. J. (2001). "Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis." *Mol Cell* **7**(6): 1165-1176.
- SCHMIDMAIER R., MORSDORF K., BAUMANN P., EMMERICH B. and MEINHARDT G. (2006). "Evidence for cell adhesion-mediated drug resistance of multiple myeloma cells in vivo." *Int J Biol Markers* **21**(4): 218-222.
- SCHMITT C. A., FRIDMAN J. S., YANG M., LEE S., BARANOV E., HOFFMAN R. M. and LOWE S. W. (2002). "A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy." *Cell* **109**(3): 335-346.
- SCHNEIDER V., KRIEGER M. L., BENDAS G., JAEHDE U. and KALAYDA G. V. (2013). "Contribution of intracellular ATP to cisplatin resistance of tumor cells." *J Biol Inorg Chem* **18**(2): 165-174.
- SCHWERTFEGER K. L., COWMAN M. K., TELMER P. G., TURLEY E. A. and MCCARTHY J. B. (2015). "Hyaluronan, Inflammation, and Breast Cancer Progression." *Front Immunol* **6**: 236.
- SEMENZA G. L. (2004). "Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level." *Physiology (Bethesda)* **19**: 176-182.
- SHEIKINE Y., GENEAGA E., MELAMED J., LEE P., REUTER V. E. and YE H. (2012). "Molecular genetics of testicular germ cell tumors." *Am J Cancer Res* **2**(2): 153-167.

- SHI S. and TIAN B. (2019). "Identification of biomarkers associated with progression and prognosis in bladder cancer via co-expression analysis." *Cancer Biomark* **24**(2): 183-193.
- SHIMIZU S., NARITA M. and TSUJIMOTO Y. (1999). "Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC." *Nature* **399**(6735): 483-487.
- SHUKRUN R., PODE SHAKKED N. and DEKEL B. (2014). "Targeted therapy aimed at cancer stem cells: Wilms' tumor as an example." *Pediatr Nephrol* **29**(5): 815-823; quiz 821.
- SIEBZEHRUBL F. A., SILVER D. J., TUGERTIMUR B., DELEYROLLE L. P., SIEBZEHRUBL D., SARKISIAN M. R., DEVERS K. G., YACHNIS A. T., KUPPER M. D., NEAL D., NABILSI N. H., KLABDE M. P., SUSLOV O., BRABLETZ S., BRABLETZ T., REYNOLDS B. A. and STEINDLER D. A. (2013). "The ZEB1 pathway links glioblastoma initiation, invasion and chemoresistance." *EMBO Mol Med* **5**(8): 1196-1212.
- SIEGELIN M. D. (2012). "Utilization of the cellular stress response to sensitize cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis." *Expert Opin Ther Targets* **16**(8): 801-817.
- SIEGELIN M. D. (2013). "Inhibition of the mitochondrial Hsp90 chaperone network: a novel, efficient treatment strategy for cancer?" *Cancer Lett* **333**(2): 133-146.
- SIEGELIN M. D., DOHI T., RASKETT C. M., ORLOWSKI G. M., POWERS C. M., GILBERT C. A., ROSS A. H., PLESCIA J. and ALTIERI D. C. (2011). "Exploiting the mitochondrial unfolded protein response for cancer therapy in mice and human cells." *J Clin Invest* **121**(4): 1349-1360.
- SIMON M. C. and KEITH B. (2008). "The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function." *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**(4): 285-296.
- SISINNI L., MADDALENA F., CONDELLI V., PANNONE G., SIMEON V., LI BERGOLIS V., LOPES E., PISCAZZI A., MATASSA D. S., MAZZOCCOLI C., NOZZA F., LETTINI G., AMOROSO M. R., BUFO P., ESPOSITO F. and LANDRISCINA M. (2017). "TRAP1 controls cell cycle G2-M transition through the regulation of CDK1 and MAD2 expression/ubiquitination." *J Pathol* **243**(1): 123-134.
- SONG W. S., YANG Y. P., HUANG C. S., LU K. H., LIU W. H., WU W. W., LEE Y. Y., LO W. L., LEE S. D., CHEN Y. W., HUANG P. I. and CHEN M. T. (2016). "Sox2, a stemness gene, regulates tumor-initiating and drug-resistant properties in CD133-positive glioblastoma stem cells." *J Chin Med Assoc* **79**(10): 538-545.

- SOTTNIK J. L., DAIGNAULT-NEWTON S., ZHANG X., MORRISSEY C., HUSSAIN M. H., KELLER E. T. and HALL C. L. (2013). "Integrin alpha2beta 1 (alpha2beta1) promotes prostate cancer skeletal metastasis." *Clin Exp Metastasis* **30**(5): 569-578.
- STACCHINI A., BARRECA A., DEMURTAS A., ALIBERTI S., DI CELLE P. F. and NOVERO D. (2012). "Flow cytometric detection and quantification of CD56 (neural cell adhesion molecule, NCAM) expression in diffuse large B cell lymphomas and review of the literature." *Histopathology* **60**(3): 452-459.
- STACY A. E., JANSSON P. J. and RICHARDSON D. R. (2013). "Molecular pharmacology of ABCG2 and its role in chemoresistance." *Mol Pharmacol* **84**(5): 655-669.
- STROBER W. (2001). "Trypan blue exclusion test of cell viability." *Curr Protoc Immunol* **Appendix 3**: Appendix 3B.
- SUN X. Y., HAN X. M., ZHAO X. L., CHENG X. M. and ZHANG Y. (2019). "MiR-93-5p promotes cervical cancer progression by targeting THBS2/MMPs signal pathway." *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **23**(12): 5113-5121.
- TAKAYA H., NAMISAKI T., SHIMOZATO N., KAJI K., KITADE M., MORIYA K., SATO S., KAWARATANI H., AKAHANE T., MATSUMOTO M. and YOSHIJI H. (2019). "ADAMTS13 and von Willebrand factor are useful biomarkers for sorafenib treatment efficiency in patients with hepatocellular carcinoma." *World J Gastrointest Oncol* **11**(5): 424-435.
- TIAN T., ZHANG Y., WANG S., ZHOU J. and XU S. (2012). "Sox2 enhances the tumorigenicity and chemoresistance of cancer stem-like cells derived from gastric cancer." *J Biomed Res* **26**(5): 336-345.
- TREPEL J., MOLLAPOUR M., GIACCONE G. and NECKERS L. (2010). "Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer." *Nat Rev Cancer* **10**(8): 537-549.
- TROTTA Andrew Paul and CHIPUK Jerry Edward (2017). "Mitochondrial dynamics as regulators of cancer biology." *Cellular and Molecular Life Sciences* **74**(11): 1999-2017.
- TSAI S. T., WANG P. J., LIOU N. J., LIN P. S., CHEN C. H. and CHANG W. C. (2015). "ICAM1 Is a Potential Cancer Stem Cell Marker of Esophageal Squamous Cell Carcinoma." *PLoS One* **10**(11): e0142834.

- TSE E. and KWONG Y. L. (2016). "Diagnosis and management of extranodal NK/T cell lymphoma nasal type." *Expert Rev Hematol* **9**(9): 861-871.
- TUCKWELL D., CALDERWOOD D. A., GREEN L. J. and HUMPHRIES M. J. (1995). "Integrin alpha 2 I-domain is a binding site for collagens." *J Cell Sci* **108** (Pt 4): 1629-1637.
- UNNIKRISHNAN A., PAPAEMMANUIL E., BECK D., DESHPANDE N. P., VERMA A., KUMARI A., WOLL P. S., RICHARDS L. A., KNEZEVIC K., CHANDRAKANTHAN V., THOMS J. A. I., TURSKY M. L., HUANG Y., ALI Z., OLIVIER J., GALBRAITH S., KULASEKARARAJ A. G., TOBIASSON M., KARIMI M., PELLAGATTI A., WILSON S. R., LINDEMAN R., YOUNG B., RAMAKRISHNA R., ARTHUR C., STARK R., CRISPIN P., CURNOW J., WARBURTON P., RONCOLATO F., BOULTWOOD J., LYNCH K., JACOBSEN S. E. W., MUFTI G. J., HELLSTROM-LINDBERG E., WILKINS M. R., MACKENZIE K. L., WONG J. W. H., CAMPBELL P. J. and PIMANDA J. E. (2017). "Integrative Genomics Identifies the Molecular Basis of Resistance to Azacitidine Therapy in Myelodysplastic Syndromes." *Cell Rep* **20**(3): 572-585.
- URANO F., WANG X., BERTOLOTTI A., ZHANG Y., CHUNG P., HARDING H. P. and RON D. (2000). "Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1." *Science* **287**(5453): 664-666.
- VANDER HEIDEN M. G., CANTLEY L. C. and THOMPSON C. B. (2009). "Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation." *Science* **324**(5930): 1029-1033.
- VANNER R. J., REMKE M., GALLO M., SELVADURAI H. J., COUTINHO F., LEE L., KUSHIDA M., HEAD R., MORRISSY S., ZHU X., AVIV T., VOISIN V., CLARKE I. D., LI Y., MUNGALL A. J., MOORE R. A., MA Y., JONES S. J., MARRA M. A., MALKIN D., NORTHCOTT P. A., KOOL M., PFISTER S. M., BADER G., HOCHEDLINGER K., KORSHUNOV A., TAYLOR M. D. and DIRKS P. B. (2014). "Quiescent sox2(+) cells drive hierarchical growth and relapse in sonic hedgehog subgroup medulloblastoma." *Cancer Cell* **26**(1): 33-47.
- VIHINEN P., RIIKONEN T., LAINE A. and HEINO J. (1996). "Integrin alpha 2 beta 1 in tumorigenic human osteosarcoma cell lines regulates cell adhesion, migration, and invasion by interaction with type I collagen." *Cell Growth Differ* **7**(4): 439-447.
- WAI T. and LANGER T. (2016). "Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation." *Trends Endocrinol Metab* **27**(2): 105-117.
- WANG J., YANG L., LIANG F., CHEN Y. and YANG G. (2019). "Integrin alpha x stimulates cancer angiogenesis through PI3K/Akt signaling-mediated VEGFR2/VEGF-A

- overexpression in blood vessel endothelial cells." *J Cell Biochem* **120**(2): 1807-1818.
- WANG S., ZHAO Y., LI D., ZHU L. and SHEN Z. (2015). "Identification of biomarkers for the prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma with miRNA microarray data." *Int J Biol Markers* **30**(2): e226-233.
- WANG X., LI Y., QIAN Y., CAO Y., SHRIWAS P., ZHANG H. and CHEN X. (2017). "Extracellular ATP, as an energy and phosphorylating molecule, induces different types of drug resistances in cancer cells through ATP internalization and intracellular ATP level increase." *Oncotarget* **8**(50): 87860-87877.
- WANG Xuan, ZHANG Haiyun and CHEN Xiaozhuo (2019). "Drug resistance and combating drug resistance in cancer." *Cancer Drug Resistance*.
- WANG Y., JIN Y., BHANDARI A., YAO Z., YANG F., PAN Y., ZHENG Z., LV S. and WANG O. (2018). "Upregulated LAMB3 increases proliferation and metastasis in thyroid cancer." *Onco Targets Ther* **11**: 37-46.
- WANG Y. Q., WANG L., ZHANG M. Y., WANG T., BAO H. J., LIU W. L., DAI D. K., ZHANG L., CHANG P., DONG W. W., CHEN X. P. and TAO L. Y. (2012). "Necrostatin-1 suppresses autophagy and apoptosis in mice traumatic brain injury model." *Neurochem Res* **37**(9): 1849-1858.
- WANG Z., LIU W., CHEN C., YANG X., LUO Y. and ZHANG B. (2019). "Low mutation and neoantigen burden and fewer effector tumor infiltrating lymphocytes correlate with breast cancer metastasization to lymph nodes." *Sci Rep* **9**(1): 253.
- WARD P. S. and THOMPSON C. B. (2012). "Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate." *Cancer Cell* **21**(3): 297-308.
- WARNECKE-EBERZ U., METZGER R., HOLSCHEER A. H., DREBBER U. and BOLLSCHWEILER E. (2016). "Diagnostic marker signature for esophageal cancer from transcriptome analysis." *Tumour Biol* **37**(5): 6349-6358.
- WEI L., YIN F., CHEN C. and LI L. (2019). "Expression of integrin alpha-6 is associated with multi drug resistance and prognosis in ovarian cancer." *Oncol Lett* **17**(4): 3974-3980.
- WENKE A. K., KJELLMAN C., LUNDGREN-AKERLUND E., UHLMANN C., HAASS N. K., HERLYN M. and BOSSERHOFF A. K. (2007). "Expression of integrin alpha10 is induced in malignant melanoma." *Cell Oncol* **29**(5): 373-386.

- WILHELM K., GANESAN J., MULLER T., DURR C., GRIMM M., BEILHACK A., KREMPL C. D., SORICHTER S., GERLACH U. V., JUTTNER E., ZERWECK A., GARTNER F., PELLEGGATTI P., DI VIRGILIO F., FERRARI D., KAMBHAM N., FISCH P., FINKE J., IDZKO M. and ZEISER R. (2010). "Graft-versus-host disease is enhanced by extracellular ATP activating P2X7R." *Nat Med* **16**(12): 1434-1438.
- WILLIAMS K. A., LEE M., HU Y., ANDREAS J., PATEL S. J., ZHANG S., CHINES P., ELKAHLOUN A., CHANDRASEKHARAPPA S., GUTKIND J. S., MOLINOLO A. A. and CRAWFORD N. P. (2014). "A systems genetics approach identifies CXCL14, ITGAX, and LPCAT2 as novel aggressive prostate cancer susceptibility genes." *PLoS Genet* **10**(11): e1004809.
- WOO Y. M., SHIN Y., LEE E. J., LEE S., JEONG S. H., KONG H. K., PARK E. Y., KIM H. K., HAN J., CHANG M. and PARK J. H. (2015). "Inhibition of Aerobic Glycolysis Represses Akt/mTOR/HIF-1alpha Axis and Restores Tamoxifen Sensitivity in Antiestrogen-Resistant Breast Cancer Cells." *PLoS One* **10**(7): e0132285.
- WU H. M., CAO W., YE D., REN G. X., WU Y. N. and GUO W. (2012). "Contactin 1 (CNTN1) expression associates with regional lymph node metastasis and is a novel predictor of prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma." *Mol Med Rep* **6**(2): 265-270.
- WU M., CAO M., HE Y., LIU Y., YANG C., DU Y., WANG W. and GAO F. (2015). "A novel role of low molecular weight hyaluronan in breast cancer metastasis." *FASEB J* **29**(4): 1290-1298.
- WU N., KUROSU T., OSHIKAWA G., NAGAO T. and MIURA O. (2013). "PECAM-1 is involved in BCR/ABL signaling and may downregulate imatinib-induced apoptosis of Philadelphia chromosome-positive leukemia cells." *Int J Oncol* **42**(2): 419-428.
- WU Y., GINTHER C., KIM J., MOSHER N., CHUNG S., SLAMON D. and VADGAMA J. V. (2012). "Expression of Wnt3 activates Wnt/beta-catenin pathway and promotes EMT-like phenotype in trastuzumab-resistant HER2-overexpressing breast cancer cells." *Mol Cancer Res* **10**(12): 1597-1606.
- WU Y., TAN X., LIU P., YANG Y., HUANG Y., LIU X., MENG X., YU B., WU M. and JIN H. (2019). "ITGA6 and RPSA synergistically promote pancreatic cancer invasion and metastasis via PI3K and MAPK signaling pathways." *Exp Cell Res* **379**(1): 30-47.

- XIE Y., LIU C., QIN Y., CHEN J. and FANG J. (2019). "Knockdown of IRE1a suppresses metastatic potential of colon cancer cells through inhibiting FN1-Src/FAK-GTPases signaling." *Int J Biochem Cell Biol* **114**: 105572.
- XIONG G. P., ZHANG J. X., GU S. P., WU Y. B. and LIU J. F. (2012). "Overexpression of ECM1 contributes to migration and invasion in cholangiocarcinoma cell." *Neoplasma* **59**(4): 409-415.
- XU B., BAI Z., YIN J. and ZHANG Z. (2019). "Global transcriptomic analysis identifies SERPINE1 as a prognostic biomarker associated with epithelial-to-mesenchymal transition in gastric cancer." *PeerJ* **7**: e7091.
- XU J., PENG H. and ZHANG J. T. (2007). "Human multidrug transporter ABCG2, a target for sensitizing drug resistance in cancer chemotherapy." *Curr Med Chem* **14**(6): 689-701.
- XU M., YIN H., CAI Y., HUANG W., JI Q., LIU F., SHI S. and DENG X. (2019). "Lysophosphatidic acid induces integrin beta6 expression in human oral squamous cell carcinomas cells via LPAR1 coupling to Gα_i and downstream SMAD3 and ETS-1 activation." *Cell Signal* **60**: 81-90.
- YAMAGUCHI H. and WANG H. G. (2004). "CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells." *J Biol Chem* **279**(44): 45495-45502.
- YAMAGUCHI T., IKEHARA S., AKIMOTO Y., NAKANISHI H., KUME M., YAMAMOTO K., OHARA O. and IKEHARA Y. (2019). "TGF-beta signaling promotes tube-structure-forming growth in pancreatic duct adenocarcinoma." *Sci Rep* **9**(1): 11247.
- YAMAKAWA N., KANEDA K., SAITO Y., ICHIHARA E. and MORISHITA K. (2012). "The increased expression of integrin alpha6 (ITGA6) enhances drug resistance in EVI1(high) leukemia." *PLoS One* **7**(1): e30706.
- YAMAMOTO K., SATO T., MATSUI T., SATO M., OKADA T., YOSHIDA H., HARADA A. and MORI K. (2007). "Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6α and XBP1." *Dev Cell* **13**(3): 365-376.
- YAN Chunlan, OH Joon Seok, YOO Seung Hee, LEE Jee Suk, YOON Young Geol, OH Yoo Jin, JANG Min Seok, LEE Sang Yeob, YANG Jun, LEE Sang Hwa, KIM Hye Young and YOO Young Hyun (2013). "The targeted inhibition of mitochondrial Hsp90

overcomes the apoptosis resistance conferred by Bcl-2 in Hep3B cells via necroptosis." *Toxicology and Applied Pharmacology* **266**(1): 9-18.

YAN W., WU K., HERMAN J. G., BROCK M. V., ZHOU Y., LU Y., ZHANG Z., YANG Y. and GUO M. (2014). "Epigenetic silencing of DACH1 induces the invasion and metastasis of gastric cancer by activating TGF-beta signalling." *J Cell Mol Med* **18**(12): 2499-2511.

YANG X., HU Q., HU L. X., LIN X. R., LIU J. Q., LIN X., DINGLIN X. X., ZENG J. Y., HU H., LUO M. L. and YAO H. R. (2017). "miR-200b regulates epithelial-mesenchymal transition of chemo-resistant breast cancer cells by targeting FN1." *Discov Med* **24**(131): 75-85.

YAO T., CHEN Q., ZHANG B., ZHOU H. and LIN Z. (2011). "The expression of ALDH1 in cervical carcinoma." *Med Sci Monit* **17**(8): HY21-26.

YIN H., WANG Y., CHEN W., ZHONG S., LIU Z. and ZHAO J. (2016). "Drug-resistant CXCR4-positive cells have the molecular characteristics of EMT in NSCLC." *Gene* **594**(1): 23-29.

ZHAI T., MUHANHALI D., JIA X., WU Z., CAI Z. and LING Y. (2019). "Identification of gene co-expression modules and hub genes associated with lymph node metastasis of papillary thyroid cancer." *Endocrine*.

ZHANG G., FREDERICK D. T., WU L., WEI Z., KREPLER C., SRINIVASAN S., CHAE Y. C., XU X., CHOI H., DIMWAMWA E., OPE O., SHANNAN B., BASU D., ZHANG D., GUHA M., XIAO M., RANDELL S., SPROESSER K., XU W., LIU J., KARAKOUSIS G. C., SCHUCHTER L. M., GANGADHAR T. C., AMARAVADI R. K., GU M., XU C., GHOSH A., XU W., TIAN T., ZHANG J., ZHA S., LIU Q., BRAFFORD P., WEERARATNA A., DAVIES M. A., WARGO J. A., AVADHANI N. G., LU Y., MILLS G. B., ALTIERI D. C., FLAHERTY K. T. and HERLYN M. (2016). "Targeting mitochondrial biogenesis to overcome drug resistance to MAPK inhibitors." *J Clin Invest* **126**(5): 1834-1856.

ZHANG J. T. (2007). "Biochemistry and pharmacology of the human multidrug resistance gene product, ABCG2." *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* **32**(4): 531-541.

ZHANG J., YUAN B., ZHANG H. and LI H. (2019). "Human epithelial ovarian cancer cells expressing CD105, CD44 and CD106 surface markers exhibit increased invasive capacity and drug resistance." *Oncol Lett* **17**(6): 5351-5360.

ZHANG X., LIU Y., LU L., HUANG S., DING Y., ZHANG Y., GUO Q., LI Z. and ZHAO L. (2017). "Oroxylolide A Overcomes Bone Marrow Microenvironment-Mediated Chronic

Myelogenous Leukemia Resistance to Imatinib via Suppressing Hedgehog Pathway." *Front Pharmacol* **8**: 526.

ZHANG X. Y., ZHANG M., CONG Q., ZHANG M. X., ZHANG M. Y., LU Y. Y. and XU C. J. (2018). "Hexokinase 2 confers resistance to cisplatin in ovarian cancer cells by enhancing cisplatin-induced autophagy." *Int J Biochem Cell Biol* **95**: 9-16.

ZHANG Y. Y., KONG L. Q., ZHU X. D., CAI H., WANG C. H., SHI W. K., CAO M. Q., LI X. L., LI K. S., ZHANG S. Z., CHAI Z. T., AO J. Y., YE B. G. and SUN H. C. (2018). "CD31 regulates metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma via the ITGB1-FAK-Akt signaling pathway." *Cancer Lett* **429**: 29-40.

ZHAO Y., BUTLER E. B. and TAN M. (2013). "Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics." *Cell Death Dis* **4**: e532.

ZHENG H. C. (2017). "The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers." *Oncotarget* **8**(35): 59950-59964.

ZHOU Q., LI W., KONG D., LIU Z., SHI Z., MA X., LI Y. and JIANG J. (2019). "DACH1 suppresses epithelial to mesenchymal transition (EMT) through Notch1 pathway and reverses progestin resistance in endometrial carcinoma." *Cancer Med* **8**(9): 4380-4388.

ZHOU S., SCHUETZ J. D., BUNTING K. D., COLAPIETRO A. M., SAMPATH J., MORRIS J. J., LAGUTINA I., GROSVELD G. C., OSAWA M., NAKAUCHI H. and SORRENTINO B. P. (2001). "The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype." *Nat Med* **7**(9): 1028-1034.

ZHOU Y., TOZZI F., CHEN J., FAN F., XIA L., WANG J., GAO G., ZHANG A., XIA X., BRASHER H., WIDGER W., ELLIS L. M. and WEIHUA Z. (2012). "Intracellular ATP levels are a pivotal determinant of chemoresistance in colon cancer cells." *Cancer Res* **72**(1): 304-314.

ZHOU Z., ZHANG L., XIE B., WANG X., YANG X., DING N., ZHANG J., LIU Q., TAN G., FENG D. and SUN L. Q. (2015). "FOXC2 promotes chemoresistance in nasopharyngeal carcinomas via induction of epithelial mesenchymal transition." *Cancer Lett* **363**(2): 137-145.

ZHU Jianguo, PAN Cong, JIANG Jun, DENG Mingsen, GAO Hengjun, MEN Bozhao, MCCLELLAND Michael, MERCOLA Dan, ZHONG Wei-De and JIA Zhenyu (2015).

"Six stroma-based RNA markers diagnostic for prostate cancer in European-Americans validated at the RNA and protein levels in patients in China." *Oncotarget* **6**(18).



ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı: Yalda

Soyadı: Hekmatshoar

Doğum yeri ve tarihi: İran/Tebriz-1985

Uyruğu: İran

Medeni durumu: Bekar

Askerlik durumu: -

İletişim adresi ve telefonu: Ankara Üniversitesi Tıp fakültesi Morfoloji Binası 2. kat
Tıbbi Biyoloji AD Sıhhiye/Ankara

II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden-eskiye doğru):

2013-	Doktora	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD.
2011-2013	Yüksek Lisans	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD.
2005-2009	Lisans	Tabriz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yabancı dili:

Türkçe dil belgesi: TÖMER (Puan: 91 = C1)

İngilizce dil belgesi: YDS (Puan: 80)

IELTS (Puan: 6.5)

Farsça dil belgesi: Ana dili

Azerice: Ana dili

Arapça: Orta Düzey

Fransızca: Başlangıç Düzeyi

III- Ünvanları (tarih sırasına göre eskiden-yeniye doğru):

2009 Biyolog

2013 Uzman

IV- Mesleki Deneyimi:

2011-2018 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji

2017-2018 (6Ay) INSERM Enstitüsü, Montpellier, Fransa

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar:

Moleküler Biyoloji Derneği

Biyokimya Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları:

- DNA İzolasyonu
- RNA İzolasyonu
- PCR
- RT PCR (Reverse Transcriptase PCR)
- MS PCR (Methylation-specific PCR (MSP))
- Primer hücre kültürü
- Hücre serisi kültürü
- Akım sitometri
- RFLP (Restriction FragmentLength Polymorphism)
- CHIP (Chromatin Immunoprecipitation)
- DNA sekanslama
- Antikor sentezi (hibridoma tekniği)
- Konfokal mikroskop görüntülemesi
- Western Blot

Yayınları: (ulusal ya da uluslararası makale, bildiri, poster, kitap ya da kitap bölümü vb.)

***SCI, SCI Expanded, SSCI Ve AHCI Kapsamında Taranan Dergilerde**

Yayınlanan Makaleler:

1. The impact of tumor and gut microbiotas on cancer therapy; Beneficial or detrimental?
Hekmatshoar Y, Saadat YR, Khatibi SMH, Ozkan T, Vahed FZ, Nariman-Saleh-Fam Z, Gargari BP, Sunguroglu A, Vahed SZ. Life Sci. 2019.
2. The role of metabolism and tunneling nanotube-mediated intercellular mitochondria exchange in cancer drug resistance. **Hekmatshoar Y**, Nakhle J, Galloni M, Vignais ML. Biochem J. 2018.
3. Expression analysis of Akirin-2, NFκB-p65 and β-catenin proteins in İmatinib resistance of chronic myeloid leukemia. Arzu Zeynep Karabay, Asli Koc, Tulin Ozkan, **Yalda Hekmatshoar**, Buket Altinok, Arzu Atalay, Asuman Sunguroglu, Zeliha Buyukbingol, Fugen Aktan. Hematology. 2018

4. Characterization of İmatinib-resistant K562 cell line displaying resistance mechanisms. **Yalda Hekmatshoar**, Tulin Ozkan, Buket Altinok, Sureyya Bozkurt, Aynur Karadag, Arzu Zeynep Karabay, Asuman Sunguroglu. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 2018
5. Genetic polymorphisms in PRM1, PRM2 and YBX2 genes are associated with male factor infertility. Oya Sena E. Aydos, **Yalda Hekmatshoar**, Buket Altınok, Tülin Özkan, Onur Şakırağaoğlu, Aynur Karadağ, Fuat Kaplan, Seda Ilgaz, Mehmet Taşpınar, Işıl Yükselen, Asuman Sunguroğlu, Kaan Aydos. Genet Test Mol Biomarkers. 2018
6. Determination of the apoptotic effect and molecular docking of benzamide derivative XT5 in K562 cells. Authors: Tulin Ozkan, **Yalda Hekmatshoar**, Tugba Ertan-Bolelli, Andry Nur Hidayat, Meral Beksac, Esin Aki-Yalcin, Ismail Yalcin, Asuman Sunguroglu. Anticancer Agents Med Chem. 2017
7. Apoptotic effects of some tetrahydronaphthalene derivatives on K562 human chronic myelogenous leukemia cell line. Asli Koç, Tulin Ozkan, Arzu Z Karabay, **Yalda Hekmatshoar**, Ayse S Gurkan-Alp, Fugen Aktan, Zeliha Büyükbingöl, Asuman Sunguroglu, Erdem Buyukbingol. Anticancer Agents Med Chem. 2017 Apr.
8. Methylsulfonylmethane Induces p53 Independent Apoptosis in HCT-116 Colon Cancer Cells. Karabay AZ, Koc A, Ozkan T, **Hekmatshoar Y**, Sunguroglu A, Aktan F, Buyukbingol Z.Int J Mol Sci. 2016 Jul.
9. Beta-Catenin Mutations in Acute Myeloid Leukemia. Buket Altinok Gunes, Tulin Ozkan, Aynur Karadag Gurel, **Yalda Hekmatshoar**, Arzu Zeynep Karabay, Meral Beksac, Asuman Sunguroglu (2019 Submit edildi)

***SCI, SCI Expanded, SSCI Ve AHCI Dışında İndekslerde Taranan Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler:**

1. Aynur Karadağ, Buket Altınok, Tülin Özkan, Yalda **Hekmatshoar**. Kemik İliği Stroması: Hücreleri ve Mikroçevresi. Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi 16 (2017)

2. Özkan, Tülin; Altınok, Buket; Karadağ, Aynur; Karabay, Arzu Zeynep; **Hekmatshoar, Yalda**; Sayinalp, Nilgün; Sunguroğlu, Asuman. Akut miyeloid lösemide akirin2 geninin ifadesi. Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi Cilt: 15 Sayı: 1 Sayfa: 019-023 DOI: 10.1501

***Uluslararası Kongre, Konferans, Sempozyum/Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildiriler:**

- Buket Altınok Gunes, Tulin Ozkan, **Yalda Hekmatshoar**, Sureyya Bozkurt, O. Sena Erdogan Aydos, Yahya Buyukasik, Asuman Sunguroglu. Analysis of Genes In CML Etiology and Drug Resistance. 6th International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey 5-8 September 2018
- **Y. Hekmatshoar**, T. Ozkan, A. Z. Karabay, A. Koc, A. Sunguroglu. Modulation of ER stress related genes by MSM in HCT-116 colon cancer cells. 43rd FEBS Congress, Prague, Czech Republic; 7–12 July 2018
- T. Ozkan, **Y. Hekmatshoar**, A. Z. Karabay, A. Sunguroglu. Novel effect of azithromycin in Imatinib resistant CML cells. 43rd FEBS Congress, Prague, Czech Republic; 7–12 July 2018
- Arzu Zeynep Karabay, Asli Koc, **Yalda Hekmatshoar**, Aynur Karadag, Tulin Ozkan Aspirin Inhibits Bcr-Abl and its Downstream Effectors in Chronic Myeloid Leukemia. Turkish Journal of Molecular Biology & Biotechnology Supplement 1 (2017).VI. International Congress of Molecular Medicine 22- 25th of May 2017, Istanbul, Turkey. Sözlü Bildiri
- Aynur KARADAĞ, Buket ALTINOK, Tülin ÖZKAN, **Yalda HEKMATSHOAR**, Asuman SUNGUROĞLU. Comparison of Signaling Pathways in CD34+ Hematopoietic and Mesenchymal Stem Cells Derived From Bone Marrow. III. International Stem Cell Symposium 2017. Abstract Book page 74-75.
- S. Aydos, B. Altinok, T. Ozkan, **Y. Hekmatshoar**, F. Kaplan, I. Yukselen, A. Sunguroglu, K. Aydos. Gene expression profile of protamines in male infertility. 41st FEBS Congress, Molecular and Systems Biology for a Better LifeThe

Ephesus, Turkey, September 3-8, 2016. FEBS Journal, Volume 283, Issue Supplement S1.2016.

- T. Ozkan, **Y. Hekmatshoar**, T. Ertan Bolelli, M. Beksac, E. Aki Yalcin, I. Yalcin, A. Sunguroglu. A benzamide derivative XT5 and Imatinib combination induced apoptosis in Imatinib resistant K562 cell line. 41st FEBS Congress, Molecular and Systems Biology for a Better Life. The Ephesus, Turkey, September 3-8, FEBS Journal, Volume 283, Issue Supplement S1. 2016.

- **Y. Hekmatshoar**, T. Ozkan, B. Altinok, A. Karadag, A. Sunguroglu. Effects of MLH1 and MSH2 expression on Imatinib resistance in CML. 41st FEBS Congress, Molecular and Systems Biology for a Better Life. The Ephesus, Turkey, September 3-8, FEBS Journal, Volume 283, Issue Supplement S1. 2016.

- **Hekmatshoar Yalda**, Özkan Tülin, Hanife Pamuk, Varol Merve, Güler Yaman, Yağız Gülşah Ceylan, Akdemir Çiğdem, Sunguroğlu Asuman. Antiproliferative and Pro-Apoptotic Effects of 6-Shogaol in Imatinib Resistance K562 Cell Lines. IV. International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey (2015).

- Özkan Tülin, **Yalda Hekmatshoar**, Sunguroğlu Asuman (2015). Combination of Imatinib and Acetylsalicylic Acid Inhibits Cell Growth in Imatinib Resistance CML Cell Lines. IV. International Congress of the Molecular Biology Association of Turkey

- B. Altinok, S. Aydos, T. Ozkan, **Y. Hekmatshoar**, F. Kaplan, I. Yukselen, A. Sunguroglu, K. Aydos. The Investigation of Genetic Analysis of Genes Encoding Sperm Nuclear Proteins with The Effects on Fertility in Infertile Men. 40th FEBS Congress Berlin, Germany, July 4–9, 2015

- **Y. Hekmatshoar**, S. Aydos, T. Ozkan, F. Kaplan, I. Yukselen, B. Altinok, A. Sunguroglu, K. Aydos. Association of Contrin (YBX2) 187T>C and 1095+16A>G Single Nucleotide Polymorphisms with Male Factor Infertility. 40th FEBS Congress Berlin, Germany, July 4–9, 2015.

- A. Karadag, G. Cubukcuglu Deni, M. Dastouri, S. Durdu, **Y. Hekmatshoar**, M. M. Davidson, M. Ugur, H. Ozdag, A. Can, A. R. Akar, A. Sunguroglu. Cell fusion following cardiomyocyte and mesenchymal stem cell co-culture and

functional evaluation of cellular changes FEBS Journal 281 (Suppl. 1) (2014) 65–783. Published: 2014.

- **Y. Hekmatshoar**, T. Ozkan, B. Altinok, A. Karadag , A. Sunguroglu. Effects of OCT4, SOX2 and NANOG expression on İmatinib resistance in CML. FEBS Journal 281 (Suppl. 1) (2014) 65–783. 2014.

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

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

***Ulusal Kongre, Konferans, Sempozyum/Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildiriler:**

10. **Hekmatshoar Yalda**, Özkan Tülin, Altınok Buket, Karadağ Aynur, Sunguroğlu Asuman. Determining Gene Expression Changes of Mechanisms playing role in resistance to İmatinib of K562 Cell Lines. PS-01 17. XIV. National Congress of Medical Biology and Genetics. 27- 30 October 2015 Ölüdeniz- Fethiye / TURKEY.

- Tülin Özkan, İlker Gökçe, Buket Altınok, Aynur Karadağ, Işıl Yükselen, **Yalda Hekmatshoar**, Oya Sena Aydos, Sümer Baltacı, Asuman Sunguroğlu. Prostat kanserli hastalarda GSTP1 geninin metilasyon analizi. 8. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi 19-23 Aralık 2012.

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

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Aldığı burslar: TÜBİTAK 111T358 Yüksek Lisans Bursiyerliği

TÜBİTAK 111S189 Yüksek Lisans Bursiyerliği

TÜBİTAK 114S189 Doktora Bursiyerliği

2017 Erasmus Programı INSERM (Montpellier/FRANCE) Doktora Araştırmacı (6 Ay)

Ödüller: -

Projeleri:

11. 2015- Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri

Proje No: 16B0230006 Kronik Miyeloid Lösemi’de Gelişen Dirençte Hücrelerin Yeniden Programlanmasında Mitokondrilerin Etkisi

12. 2015- Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri

Proje No:115B0230004 KML Etiyolojisinde ve İlaç Direncinde Etkili Olan Genlerin Analizi.

13. 2014- TÜBİTAK

Proje No: 114S189 SBAG 1003 Glioblastoma Multiforme (GBM) İlaç Direncinde Rol Oynayan CD133+ Glioblastoma Kök Hücrelerini (GKH) Hedefleyen Terapötik Monoklonal Antikor Geliştirilmesi

14. 2012-2015 TÜBİTAK

Proje No: 111S189 SBAG 1001 İnsan Kardiyomiyosit Hücrelerinin Mezenkimal Kök Hücreler ile Füzyonu ve Yeniden Programlanması

15. 2011-2013 TÜBİTAK

Proje No: 111T358 SBAG 1001 Beta katenin, NFkB ve akirin proteinlerinin birliktelikleri ve İmatinib direncindeki rolleri

Verdiği konferans ya da seminerler: -

Katıldığı paneller (panelist olarak): -

VIII- Diğer Bilgiler

Eğitim programı haricinde aldığı kurslar ve Katıldığı eğitim seminerleri:

16. Deney Hayvanları Eğitimi

17. GMP: İyi Üretim Uygulamaları Eğitimi

18. GLP: İyi Laboratuvar Uygulamaları Eğitimi

19. GHP: İyi Hijyen Uygulamaları Eğitimi

20. ISO/IEC17025:2012 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği Eğitimi

Organizasyonunda katkıda bulunduğu bilimsel toplantılar:

Diğer üyelikleri: -

