

## Genistein ve STI571'in (Imatinib) Kronik Myeloblastik Lösemide Etkili Sinyal Protein Düzeylerine Etkileri

The Effects of Genistein and STI571 (Imatinib) on Signal Protein Levels Affecting Chronic Myeloid Leukemia

Nur Erden Armutcuoğlu, Yeşim Korkmaz Kasap, Erkan Yurtcu

Başkent Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

### ÖZET

**Amaç:** Kronik myeloid lösemi (KML) malign klonal hematopoetik bir hastalıktır. *BCR-ABL1* füzyon geni olup KML'nin moleküler patogenezinde rol oynar. Bu protein bir tirozin kinaz kodlar. AKT, ERK, STAT yolları üzerinde etkili olan bu tirozin kinazın modulatorleri GAB2 ve GRB2'dir. KML tedavi protokolünde yer alan STI571 (imatinib mesilat) tirozin kinaz inhibitörüdür. Genistein, östrojenik özelliğinin yanı sıra tirozin kinaz inhibitör aktivitesine sahip olan bitkisel bir flavonoiddir. Bu çalışmada, insan KML hücre dizisi K562 hücrelerine STI571 uygulaması ile birlikte genistein uygulamasının hücre içi sinyal yolları üzerine etkisinin protein seviyesinde belirlenmesi hedeflenmiştir.

**Yöntem:** K562 hücreleri standart koşullarda çoğaltıldı. STI571 ve genisteinin sitotoksik dozu MTT testi ile belirlendi. STI571 ve genistein, tek tek ve birlikte olacak şekilde 24 ve 48 saat sürelerle uygulandı. Protein düzeyleri ELISA metoduyla belirlendi. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

**Bulgular:** Veriler toplu halde değerlendirildiğinde STI571 ve genisteinin tek başına ya da birlikte uygulanması ile protein düzeylerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı belirlendi.

**Sonuç:** Bu çalışmada genisteinin STI571 ile birlikte etkileri geniş bir protein paneli üzerinde değerlendirilmiştir. STI571'in ve genisteinin tirozin kinaz inhibitörü özellikleri bilinmektedir. Ancak her iki ajanın protein düzeyleri üzerine etkilerini inceleyen çalışmalarda tartışılmalı sonuçlar mevcuttur. Sonuçlarımıza göre her iki ajanın birlikte kullanılması protein düzeyleri açısından anlamlı bir fark oluşturmamaktadır.

**Anahtar Sözcükler:** Kronik Myeloblastik Lösemi, imatinib, genistein, BCR-ABL1, GRB2, GAB2, ERK, AKT

**Geliş Tarihi:** 14.11.2017

**Kabul Tarihi:** 23.01.2018

### ABSTRACT

**Objective:** Chronic myeloid leukemia (CML) is a malignant clonal hematopoietic disease. *BCR-ABL1* is a fusion gene and plays role on molecular pathogenesis of CML. This protein encodes a tyrosine kinase. GAB2 and GRB2 are its modulators of this tyrosine kinase which has effects on AKT, ERK, STAT pathways. STI571 (imatinib mesilat) which is used for CML treatment, is a tyrosine kinase inhibitor. Genistein is a herbal flavonoid which has estrogenic effects besides tyrosine kinase inhibitor activity. In this study, we aimed to determine the effect of STI571 and genistein application for intercellular signal transduction pathways at protein level on the K562 cells.

**Methods:** K562 cells were cultured at standard conditions. The cytotoxic concentrations of STI571 and genistein were determined with MTT. STI571 and genistein were applied alone and in combination at 24 and 48 hours. The protein levels were determined by ELISA method. The data were evaluated statistically.

**Results:** There was no statistically significant difference of protein levels with STI571 and genistein alone and in combination.

**Conclusion:** In this study, the effects of STI571 and genistein were evaluated on a wide protein panel. It is well known STI571 and genistein have tyrosine kinase inhibitory effects. However, in previous reports there are controversial results on the protein levels of both agents. Our results showed that the combination of STI571 and genistein have no significant effect on the protein levels.

**Key Words:** Chronic myeloid leukemia, imatinib, genistein, BCR-ABL1, GRB2, GAB2, ERK, AKT

**Received:** 11.14.2017

**Accepted:** 01.23.2018

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no: DA DA15/13) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

**Yazışma Adresi / Address for Correspondence:** Prof. Erkan Yurtcu, Başkent Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD, Bağlıca, Etimesgut, Ankara, Türkiye E-posta erkanyurtcu@gmail.com

©Telif Hakkı 2018 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi - Makale metnine <http://medicaljournal.gazi.edu.tr/> web adresinden ulaşılabilir.

©Copyright 2018 by Gazi University Medical Faculty - Available on-line at web site <http://medicaljournal.gazi.edu.tr/>

doi:<http://dx.doi.org/10.12996/gmj.2018.53>

## GİRİŞ

Kronik miyeloid lösemi (KML) miyeloid, eritroid ve megakaryositlerin anormal bölünmesine yol açan bir hematopoietik kök hücre hastalığıdır. Tüm KML hastalarının yaklaşık %95'inde t(9;22)(q34;q11) translokasyonu görülür ve oluşan kimerik "Philadelphia" kromozomu *BCR-ABL* füzyon genini barındırır. Füzyon genin transkript ürünlerinden birisi olan p210BCR/ABL proteini bir tirozin kinazdır (1).

BCR-ABL mitojenle aktive olan protein kinaz (RAS/MAPK), Fosfoinozotid 3-Kinaz (PI-3 kinaz), Janus kinaz-sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü (JAK-STAT) ve onkogenik protein (Src yolağı) gibi hücre içi sinyal yollarını aktifleştirir. Ras yolağının aktifleşmesinde GAB2, GRB2, Ras aktivatörü olan Son of sevenless (Sos) ve BCR-ABL'in SH2-SH3 adaptörü gibi birçok aracı molekül görev yapar. Aktifleşen RAS yolağı, hücre zarında bulunan bir serin/treonin kinaz olan Ref molekülünün aktivasyonu sağlayarak MAP/ERK kinazlar ve MAPK'ların (Mitogen Activated Protein Kinaz) aktivasyonu gerçekleştirerek transkripsiyonu artırır. *BCR-ABL* aracılı transformasyonda ve proliferasyonda Akt'ın hücrelerde ikincil haberci sistemini uyardığı, büyüme ve sağ kalımda görev yaptığı, RAC'ın (adhezyon sinyallerini yanıtlayan GTP-bağlayıcı protein) motilitede görevli olduğu, PI3K yolağının da protein sentezini artırma görevi olan S6 kinaz ve RAS yolağı ile etkileşebildiği bildirilmiştir (2).

KML tedavisinde allojeneik kemik iliği nakli bilinen en etkili tedavi olsa da mortalite ve morbidite riskinin yüksek oluşu kullanımını sınırlandırmaktadır. Bir reseptör tirozin kinaz inhibitörü olan STI571 (imatinib mesilat) hedefe yönelik bir ilaç olarak geliştirilmiş olup KML'nin ilaçla tedavisinde ilk tercih edilen ajandır. Ancak STI571'in hastalığın eradikasyonunda yeterli olup olmadığı tartışmalıdır ve bazı hastalarda direnç geliştiği gözlenmiştir (3).

İçerisinde lösemnin de bulunduğu çok sayıda malignitede hastaların kullandıkları kemoterapötiklerin etkinliğini artırmak için bitki kaynaklı kimyasalları da (fitokimyasal) kullandığı bilinmektedir (4). Flavonoidler antioksidan, antiinflamatuvar, antikanserojen etkilere sahip olan, bitkiler tarafından sentez edilen bileşiklerdir. Genistein, en kolay sentezlenebilen ve en güçlü aktiviteye sahip olan izoflavondur. Çalışmalar genisteinin başta meme ve prostat olmak üzere hormona bağlı kanser türleri ile mide, mesane, kolon, rektum, karaciğer ve pankreas gibi diğer kanser türlerine karşı koruyucu etkisi olabileceğini göstermektedir (5). Kan kanserini konu alan çalışmalar sınırlı sayıda olmakla birlikte, genistein lösemi hücrelerinin büyümesini, doza ve uygulama süresine bağlı olarak azalttığı gösterilmiştir (6).

Çalışmamızda insan KML hücre dizisi K562 hücrelerinde STI571 uygulaması ile birlikte genistein uygulamasının KML patogenezinde rol oynayan hücre içi sinyal yollarındaki rol oynayan BCR-ABL, GRB2, GAB2, AKT ve ERK protein düzeylerine etkisinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

## GEREÇ ve YÖNTEM

### Hücre kültürü

İnsan KML hücre dizisi K562 (CCL243, ATCC, Rockville, ABD) %10 FBS (Biochrome, Almanya) eklenmiş RPMI 1640 (Biochrome) besiyeri içinde 37°C sıcaklıkta ve %5 CO<sub>2</sub> içeren nemlendirilmiş inkübatörde (Heracell 150i, Heraeus, Almanya) çoğaltıldı. Hücreler her 24 saatte bir pasajlandı ve çalışmada 5-7. pasajda hücreler kullanıldı. Çalışma öncesinde hücre canlılıkları tripan mavisi boya atma testi, hücre sayıları ise Thoma lamı ile sayılarak belirlendi. 6'lı kültür kabının her bir kuyucuğunda %98'i canlı en az 5 X 10<sup>5</sup> hücre olacak şekilde deneylere başlandı.

### Sitotoksik ilaç/kimyasal dozlarının (IC<sub>50</sub>) belirlenmesi

STI571 (Novartis, İsviçre) ve genisteinin (Sigma-aldrich, Almanya) sitotoksik etkilerinin belirlenmesinde kantitatif kolorimetrik bir yöntem olan MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H tetrazolium bromide] hücre proliferasyon testi kullanıldı. IC<sub>50</sub> değerlerinin belirlenmesinden sonra STI571 ve genistein hücrelere ayrı ayrı ve birlikte olacak şekilde 24 ve 48 saatlik sürelerle uygulandı. Hiçbir uygulama yapılmayan hücreler kontrol grubu olarak kullanıldı.

### ELISA yöntemi ile protein düzeylerinin belirlenmesi

BCR-ABL (P190), GAB2, GRB2, ERK1-2 ve PKB düzeyleri ELISA (Mybiosource, İngiltere) yöntemi ile belirlendi. Yöntem üretici firmanın öngördüğü şekilde gerçekleştirildi.

### İstatiksel Yöntem

Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov normallik testi ile değerlendirildi. Gruplar arası verilerin analizi ve farklılıkların belirlenmesi için iki yönlü ANOVA\* ve Dunnett testi uygulandı. p<0.05 düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Veri analizi SPSS 17.0 paket programı ile gerçekleştirildi.

## BULGULAR

### IC<sub>50</sub> değerleri

STI571 için 24 saat uygulama konsantrasyonu 30,25 µM, 48 saat uygulama konsantrasyonu 240 µM olarak belirlendi. Genistein için 24 saatlik konsantrasyon 513,193 µM, 48 saatlik konsantrasyon 737,744 µM olarak belirlendi (Tablo 1).

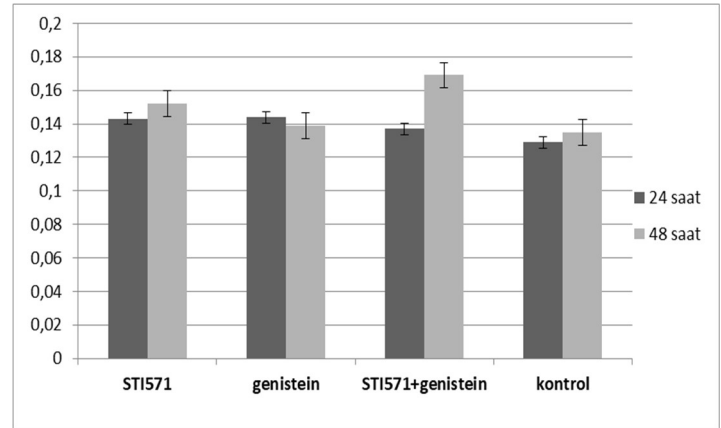
Tablo 1: Ajanların IC<sub>50</sub> Dozları

Uygulama/Saat	STI571	Genistein
24 saat	30,25 µM	513,19 µM
48 saat	240 µM	737,74 µM

### Protein düzeyleri

#### BCR-ABL protein düzeyi

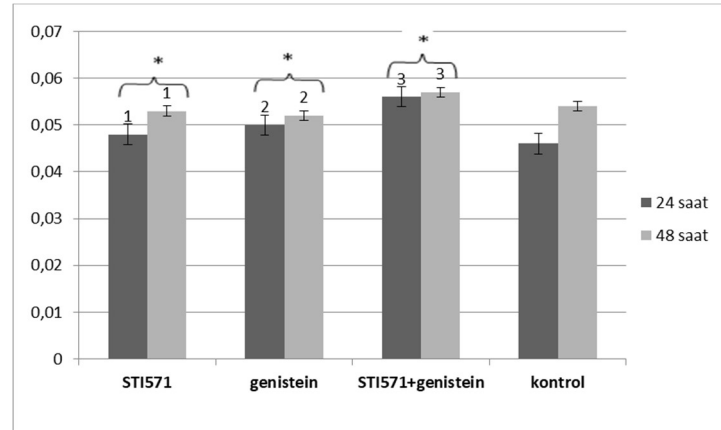
Tüm uygulama gruplarında, 24-48 saat uygulama sonunda belirlenen BCR-ABL protein düzeyleri kontrol grubu ile benzerdi (p>0,05) (Grafik 1).



Grafik 1: BCR-ABL protein düzeyleri

#### GRB2 Protein Düzeyi

Tüm uygulama gruplarında, 24-48 saat uygulama sonunda belirlenen GRB2 protein düzeyleri kontrol grubu ile benzerdi (p>0,05) (Grafik 2). Ancak her bir uygulama grubunda 24 saat sonunda elde edilen GRB2 değerleri 48 saate göre anlamlı olacak şekilde düşüktü (p<0,05) (Grafik 2).

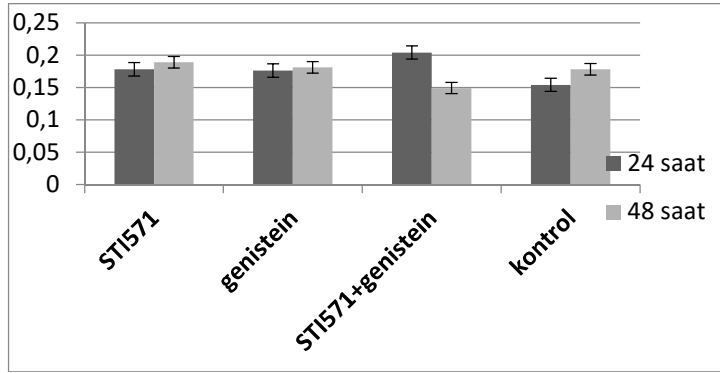


Grafik 2: GRB2 Protein düzeyleri

\*Rakamlar istatistiksel açıdan fark olan grupları göstermektedir

#### GAB2 Protein Düzeyi:

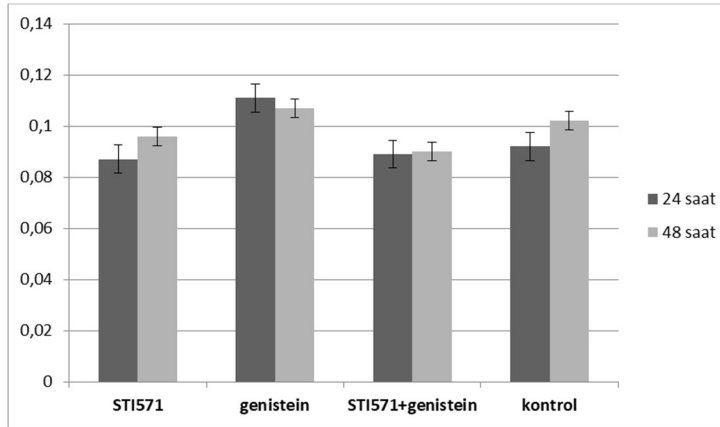
Tüm uygulama gruplarında, 24-48 saat uygulama sonunda belirlenen GAB2 protein düzeyleri kontrol grubu ile benzerdi (p>0,05) (Grafik 3).



Grafik 3:GAB2 Protein düzeyleri

**ERK Protein Düzeyi:**

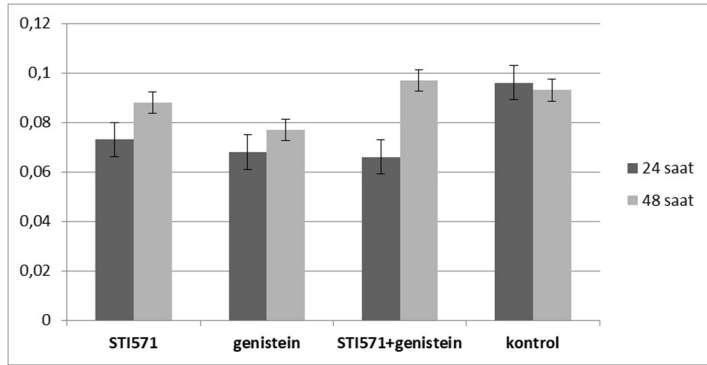
Tüm uygulama gruplarında, 24-48 saat uygulama sonunda belirlenen ERK protein düzeyleri kontrol grubu ile benzerdi ( $p>0,05$ ) (Grafik4).



Grafik 4: ERK Protein düzeyleri

**AKT Protein Düzeyi:**

Tüm uygulama gruplarında, 24-48 saat uygulama sonunda belirlenen AKT protein düzeyleri kontrol grubu ile benzerdi ( $p>0,05$ ) (Grafik5).



Grafik 5: AKT Protein düzeyleri

**TARTIŞMA**

STI571 ile tedavi edilen KML hastalarında konvansiyonel kemoterapi protokollerine göre daha iyi sonuçlar alınmaya başlamıştır. Ancak ilacın direnci ve intolerans sebebiyle tüm hastalarda beklenen fayda görülmemektedir ve hastaların yaklaşık olarak 1/3'ü alternatif tedavi arayışlarına yönelmektedir (7). Bu amaçla bitki kaynaklı bileşiklerin kemoterapötiklerle birlikte kullanılmasının yeni tamamlayıcı tedavilerin geliştirilmesine yardımcı olabileceği kabul edilmektedir (4).

Soya tüketimi, farklı toplumlarda beslenme alışkanlıklarına bağlı olarak toplam diyetin %10'una ulaşabilmektedir. Epidemiyolojik çalışmaların sonuçlarına göre bu toplumlarda hormon bağımlı kanserlerden ölüm oranları diğer ülkelerden daha düşüktür. Ayrıca *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla soyanın çok sayıda kanser hücre dizisinin büyümesini engellediği gösterilmiştir. Bu yüzden soya kansere karşı kimyasal koruyucu olarak kabul edilmektedir. Bu etkinlik genel olarak soyanın içerdiği genisteine atfedilmektedir (8).

Temel olarak STI571 BCR-ABL'nin kinaz aktivitesini baskılayarak akışaşağı hedefindeki proteinlerin aktivitesini engeller. Ancak protein düzeylerine olan etkisi halen tartışmalıdır. BCR-ABL ifade eden hücrelerde STI571 etkinliği yüksek doz uygulandığında ve ancak 2-4 gün sonra ortaya çıkar (9). Genistein K562 hücrelerinde uzun dönem (72 saat) ve yüksek dozda uygulandığında BCR-ABL'nin tirozin kinaz aktivitesini düşürür ve protein miktarını azaltır (9,10).

Çalışmamızda daha önceki çalışmalardan farklı olarak STI571 ve genisteinin IC<sub>50</sub> dozunda ve daha kısa dönem etkilerini değerlendirdik. Çalışma planımıza göre gerçekleştirdiğimiz deney setinde STI571 ve genisteinin tek tek veya bir arada kullanılması K562 hücrelerinin kendi sayısını iki katına çıkardığı süre (bölünme süresi) olan 24 saat (11) ve 48 saat süre zarfında BCR-ABL protein düzeyinde anlamlı bir değişiklik oluşturmamıştır. Uygulama süresinin kısalığı ve belirlediğimiz IC<sub>50</sub> dozunun diğer çalışmalarda uygulanan dozdan daha düşük olmasına ek olarak elde ettiğimiz verilerde gördüğümüz bu farklılığın bir diğer sebebi ise K562 hücrelerinin sinyal potansiyeli aşırı düzeyde artmış olması ile açıklanabilir (12).

GRB2, içerisinde BCR-ABL'nin de bulunduğu tirozin kinazlar ile etkileşen bölgesi ile GAB proteinine tutunur ve GAB2'nin tirozin fosforilasyonunu regüle eder. GAB2'nin hedefinde AKT ve ERK yolları bulunduğu için GRB2 sinyal yollarında anahtar rol oynayan proteinlerden birisidir (2). Çalışmamızda her iki ajanın tek başına ya da birlikte uygulamalarının GRB2 protein düzeyinde azalmaya sebep olduğunu ancak bunun istatistiksel açıdan anlamlı olmadığını belirledik. Ancak dikkate değer bir nokta olarak tüm uygulama gruplarında GRB2 protein düzeylerindeki 24 saatte görülen azalma 48 saatte göre anlamlı derecede düşüktü. Buna göre STI571 ve genisteinin GRB2 protein düzeylerindeki etkileri süre bağımlı olduğu sonucuna ulaştık. STI571'in K562 hücrelerindeki etki mekanizması doz bağımlı olarak fosforile haldeki GRB2 üzerinden yürür. STI571, ABL'nin kinaz aktivasyonunu tamamen engellese de içerisinde GRB2'nin de bulunduğu kinaz yürütülü diğer sinyal mekanizmaları farklı yollarla işletebilir (13). Bu bulgular deney setimizde STI571'in GRB2'nin düzeyi ve dolayısıyla akışaşağı hedeflerinin aktivasyonunu engellememesini açıklar niteliktedir.

GAB2 bir iskelet proteini olup plazma zar reseptör sinyali ile içerisinde BCR-ABL'nin de bulunduğu tirozin kinazların akışaşağı efektörlerini birbirine bağlar (14). Sonuçlarımızda göre STI571 her iki uygulama süresi sonrasında da GAB2 protein düzeyinde anlamlı bir azalmaya neden olmamıştır. Bununla birlikte genistein tek başına ya da STI571 ile birlikte uygulandığında 24 ve 48 saat süreler için GAB2 protein düzeylerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmamıştır. Daha önce yapılan bir çalışmada STI571'in GAB2'nin düzeyini azaltmaktan çok fosforilasyon yeteneğini baskıladığı ve KML hastalarının plazma konsantrasyonu olan 1 µM'ın 10 katı düzeye çıktığında bile GAB2 proteinin hedefindeki proteinlerle olan etkileşimini engellemediği belirlenmiştir (15). Verilerimiz bu sonuçlarla uyumlu olup STI571 GAB2 düzeyini değiştirmemiştir. Buna ek olarak genistein de deney setimizde kullandığımız uygulama süresi ve konsantrasyonlarda STI571'in etkinliğini değiştirmemiştir.

BCR-ABL hedefinde yer alan Ras sinyal yolağının aktivasyonu lösemik hücrelerin proliferasyonuna neden olur. Ras aktifleştikten sonra adaptör molekül olan Raf1 aracılığıyla MAPK/ERK yolağını aktive eder (2). MAPK/ERK yolağı apoptoz ve sağ kalımı düzenlemede işlevi olan yolağıdır ve çok sayıda proteinin hedefidir. Verilerimize göre STI571 ve genistein tek tek ya da bir arada kullanıldığında ERK protein düzeyinde anlamlı bir değişikliğe neden olmamıştır. K562 hücrelerinde PKC ve BCR-ABL'nin birbirlerinden bağımsız olarak Raf1 aracılığıyla ERK'yi aktive ettiği ve bu iki proteinden herhangi birinin baskılanmasının ERK ifadelenebilirliğini etkilemediği gösterilmiştir (1). Benzer bir çalışmada bir bitki fenolü olan resveratrolün BCR-ABL ve ERK'in fosforilasyonu ve protein düzeylerine etki etmediği gösterilmiştir (16). Sonuçlarımız bu çalışmaların sonuçları ile uyumlu olup STI571 ve genistein ERK protein düzeylerinde değişiklik oluşturmamıştır.

AKT yolağı hücre sağ kalımı ve apoptoz arasındaki dengeyi sağlayan yolağıdır. Bizim çalışmamızda her iki ajanın birlikte ya da tek başlarına uygulaması ile AKT protein düzeylerinde anlamlı bir değişiklik oluşturmadığı belirlendi. STI571 K562 hücrelerinde AKT düzeyini değiştirmemiştir gibi fosforilasyonu düzeyini de değiştirmez (17). Daha önce yapılan çalışmalarda farklı hücre dizileri kullanılarak genisteinin AKT yolağı üzerindeki etkisi araştırılmış fakat toplam AKT protein düzeyinde kontrole göre bir değişim elde oluşturmadığı gösterilmiştir (8). Aynı zamanda AKT yolağı kanser hücrelerinde BCR-ABL'dan bağımsız olarak ve sürekli şekilde etkinleştirilir (14). Sonuçlarımız bu çalışmalar ile uyumlu olup her iki ajanın tek başlarına ya da bir arada kullanılması AKT protein düzeylerini değiştirmemiştir.

Bu çalışma ile genisteinin STI571 ile birlikte, bir protein paneli üzerinde kısa dönem ve sonuçları açıklanan diğer çalışmalara göre daha düşük dozda etkileri değerlendirilmiştir. STI571 ve genisteinin tirozin kinaz inhibitörü olduğu bilinmektedir. Ancak her iki kimyasalın protein düzeylerine etkisi üzerine yapılan çalışmalar halen devam etmektedir. Sonuçları yayımlanan diğer çalışmalar dikkate alındığında, STI571'in proteinlerin ve fosfoproteinlerin düzeylerini azalttığı belirlenmişse de bu konu halen tartışmalıdır (13,17). Öte yandan ikili uygulama ile BCR-ABL'nin tirozin kinaz aktivitesi baskılansa bile akışaşağı hedefleri hücre içi diğer sinyal yolları tarafından aktive edilmektedir (9).

Biz de bu tartışmalı konuya açıklık getirmeyi hedefledik ve sonuçlarımızı göre her iki ajanın birlikte kullanılmasının protein düzeyleri açısından anlamlı bir fark oluşturmadığını belirledik. Böylece *in vitro* ortamda kısa dönem ve nispeten düşük doz STI571 genistein ikili uygulamasının etki mekanizmasının protein düzeyleri üzerinden olmadığını göstermeye yönelik veriler elde etmiş olduk. Elde ettiğimiz verilerin bundan sonra yapılacak benzer çalışmalara yol gösterici olacağını ve bu iki ajanın etki mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik daha detaylı moleküler analizler gerekli olduğunu düşünüyoruz.

#### Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

#### KAYNAKLAR

- Roy M, Sarkar R, Mukherjee A, Mukherjee S. Inhibition of crosstalk between Bcr-Abl and PKC signaling by PEITC, augments imatinib sensitivity in chronic myelogenous leukemia cells. *Chemico-Biological Interactions*. 2015;242:195-201.
- O'Hare T, Deininger M, Eide C, Clackson T, Druker B. Targeting the BCR-ABL Signaling Pathway in Therapy-Resistant Philadelphia Chromosome-Positive Leukemia. *Clinical Cancer Research*. 2011;17:212-21.
- Walz C, Sattler M. Novel targeted therapies to overcome imatinib mesylate resistance in chronic myeloid leukemia (CML). *Critical Reviews in Oncology Hematology*. 2006;57:145-64.
- Yurtcu E, Iseri O, Sahin F. Genotoxic and cytotoxic effects of doxorubicin and silymarin on human hepatocellular carcinoma cells. *Human & Experimental Toxicology*. 2014;33:1269-76.
- Banerjee S, Li Y, Wang Z, Sarkar F. Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer Letters*. 2008;269:226-42.
- Uckun F, Messenger Y, Chen C, O'Neill K, Myers D, Goldman F, et al. Treatment of therapy-refractory B-lineage acute lymphoblastic leukemia with an apoptosis-inducing CD19-directed tyrosine kinase inhibitor. *Clinical Cancer Research*. 1999;5:3906-13.
- Morozova E, Vlasova Y, Pryanishnikova M, Lepik K, Afanasyev B. Efficacy of Dasatinib in a CML Patient in Blast Crisis with F317L Mutation: A Case Report and Literature Review. *Biomarker Insights*. 2015;10:43-7.
- Sarkar F, Li Y. Mechanisms of cancer chemoprevention by soy isoflavone genistein. *Cancer and Metastasis Reviews*. 2002;21:265-80.
- Bueno-da-Silva A, Brumatti G, Russo F, Green D, Amarante-Mendes G. Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis is independent of constant tyrosine-kinase activity. *Cell Death and Differentiation*. 2003;10:592-8.
- Deora A, Miranda M, Rao S. Down-modulation of p210(bcr/abl) induces apoptosis/differentiation in K562 leukemic blast cells. *Tumori*. 1997;83:756-61.
- Rutherford T, Clegg J, Higgs D, Jones R, Thompson J, Weatherall D. Embryonic Erythroid-Differentiation in the Human-Leukemic Cell-Line K562. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences*. 1981;78:348-52.
- Wohrle F, Halbach S, Aumann K, Schwemmers S, Braun S, Auberger P, et al. Gab2 signaling in chronic myeloid leukemia cells confers resistance to multiple Bcr-Abl inhibitors. *Leukemia*. 2013;27:118-29.
- Zhang M, Luo Z, Liu H, Croce C, Burke T, Bottaro D. Synergistic anti-leukemic activity of imatinib in combination with a small molecule Grb2 SH2 domain binding antagonist. *Leukemia*. 2014;28:948-51.
- Ding J, Romani J, Zaborski M, MacLeod R, Nagel S, Drexler H, et al. Inhibition of PI3K/mTOR Overcomes Nilotinib Resistance in BCR-ABL1 Positive Leukemia Cells through Translational Down-Regulation of MDM2. *Plos One*. 2013;8(12).
- Halbach S, Rigbolt K, Wohrle F, Diedrich B, Gretzmeier C, Brummer T, et al. Alterations of Gab2 signalling complexes in imatinib and dasatinib treated chronic myeloid leukaemia cells. *Cell Communication and Signaling*. 2013;11. doi: 10.1186/1478-811X-11-30. PubMed PMID: WOS:000318610900001.
- Puissant A, Grosso S, Jacquelin A, Belhacene N, Colosetti P, Cassuto J, et al. Imatinib mesylate-resistant human chronic myelogenous leukemia cell lines exhibit high sensitivity to the phytoalexin resveratrol. *Faseb Journal*. 2008;22(6):1894-904. doi: 10.1096/fj.07-101394. PubMed PMID: WOS:000256352700029.
- Shao S, Li S, Qin Y, Wang X, Yang Y, Bai H, et al. Spautin-1, a novel autophagy inhibitor, enhances imatinib-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia. *International Journal of Oncology*. 2014;44(5):1661-8. doi: 10.3892/ijo.2014.2313. PubMed PMID: WOS:000337947600027.