

24360

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
Prof. Dr. Gürbüz GÜMÜŞDİŞ

CCRF / CEM HÜCRE HATTINDA DİRENÇ MEKANİZMALARI

UZMANLIK TEZİ

TEZ SORUMLUSU

Prof. Dr. Mustafa KARACA

Dr. Erdem GÖKER

İZMİR - 1992

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

ÖNSÖZ

Hematolojik neoplazilerin, ana başlıklar altında toplayacak olursak; lösemiler, lenfomalar, Hodgkin Hastalığı ve diğer myeloproliferatif ve myelodisplastik hastalıkların tanı ve tedavisi, günümüzün ilerleyen teknolojisine karşın, halen hem klinikte çalışan hekim hem de araştırmacılar için öncelikle çözülmesi gereken problemlerin başında gelmektedir. Yıllardır yapılan araştırmaların yanısıra, son on yılda verilen emek ve finans, genel anlayışımızda önemli farklılıklara yol açmakla birlikte kesin çözümleri içermekten uzaktadır.

Kanser tedavisinde alınan onca yola karşın, hala başarılı denecek bir sonuca ulaşamamak, bu yolda yapılan çalışmalarını kamçulamaktadır. Türkiye'nin bu çalışmalara olan katkısı ne yazık ki bireysel olmaktan öteye gidememiştir. Çok değerli üniversite elemanlarının tüm çabalarına karşın, multidisipliner ve kooperatif çalışmalardan uzak kalmak ve özellikle bu tür çalışmalar için gerekli finans kaynaklarının bulunmaması bu sonucu doğurmuştur.

Son bir yıl içinde, kanser araştırmaları yapılan uluslararası bir enstitüde görev yapmak ve dünyadaki durumu gözlemek benim için bir şans olmuştur. Memorial Sloan-Kettering Kanser Enstitüsünde, bir yıl boyunca yaptığım klinik çalışmalara temel oluşturan in vitro deney-lerin sonuçlarını uzmanlık tezi olarak sunuyorum.

Dört yıl süren iç Hastalıkları uzmanlık öğrenciliğimin geçtiği Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi iç Hastalıkları Kliniğini ve orada öğrendiklerimi her zaman minnetle anacağım. Bu kliniğin

öğretim üyelerine ayrı ayrı teşekkür ediyorum. Beni Hematoloji'ye yönlendiren ve mikroskobun büyüünü ilk kez tattıran hocam Prof.Dr.Mustafa Karaca ve Prof.Dr.Filiz Büyükkeçeci'nin katkılarını unutmam mümkün olmayacaktır. Yurt dışı eğitimimi fikir aşamasından gerçekleşme aşamasına kadar destekleyen, bana beni öğreterek hekimliği tanıtan Prof.Dr.Muvaffak A. Atamer'e teşekkür ediyorum.

Uzmanlık öğrencisi sıfatıyla son bir yılda yaptığım çalışmaların temelini oluşturan, bu uzmanlık tezinin her aşamasında yardımcı olan Dr.Joseph R. Bertino, Dr.Debabrata Banerjee, Dr.Mark Waltham ve teknisyenim Yaroslav Elisseyeff'i her zaman takdirle anacağım.

Dr.Erdem GÖKER

1992

İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa No</u>
GİRİŞ	1
ÇALIŞMANIN AMACI	3
İLAÇ BİLGİSİ	4
HÜCRE İÇİ METHOTREXATE METABOLİZMASI	6
ARAÇ ve YÖNTEM	12
SONUÇLAR	27
TARTIŞMA	35
ÖZET	41
KAYNAKLAR	42

GIRIŞ

Moleküler biyoloji ve genetik bilimlerinin çok da uzun olmayan tarihlerine karşın, klinik bilimlere uyarlanmaları ve bir bütün oluşturmaları son on yılda başdöndürücü hıza ulaşmıştır. Bunun doğal sonucu olarak, her çalışmayı, her yeni buluşu izlemek bir klinisyen için olanaksız hale gelmiştir. Her yıl yüzlerce kez yinelen uygulamalı mezuniyet sonrası kurslar bir oranda yararlı olmakla birlikte yetersiz kalmaktadır.

Moleküler biyoloji ayrı bir disiplin olarak algılanabileceği gibi, klinik bilimleri tamamlayan bir bütünün parçası olarak da görülebilir. Bugün için, özellikle Hematoloji ve Onkolojiyi, moleküler biyoloji ve genetik bilimleri olmaksızın düşünmek olanaksızdır. Bu bilim dalları tanı ve tedaviden, etyopatogezin açıklanmasına kadar her basamakta klinik bilimlere yardımcı olmakta, onlarla bir bütünü oluşturmaktadırlar.

Kemoterapinin kansere uygulanması ile görülmüştür ki, verilen tedavi aynı olmasına karşın elde edilen sonuç her hastada farklı olmaktadır. Tanı yöntemlerinin gelişmesi ile birlikte malign hastalıklar gruplanabilir hale gelmişlerse de aynı dar sınırlı bir grup üyesi hastalıkta dahi aynı ilaçlarla aynı sonuçlar alınamamaktadır. Bunun en tipik örneği olarak lösemileri verebiliriz. On yıl önce Myelodisplastik sendromlar bilinmezken, bu grup hastalıklar da lösemiler gibi görülüp ya tedavi verilmekte ya da lösemi tablosu ortaya çıkana dek beklenilmekteydi. Öte yandan pek çok lösemi türünün değişik şekilde sınıflandırılmasından sonra her bir tür lösemi için değişik tedavi programları plan-

lanabildi. Monoklonal antikörlerin tanımlanmasından ve flow sitometrenin günlük tanı araçları arasına girmesinden sonra, bu çeşiklilik arttı. Ama en çarpıcı örnekler moleküler düzeyde oldu ve malign hücrenin genetik yapısı belirlenince, yıllarca süregelen temel kanser anlayışımız toptan değişti. Tüm bu ince ayrıntılara ve büyük bilgi birikimine karşın hala, tedaviye cevap uniform hale getirilemedi. Ancak yeni bir kavram, tıp dünyasında yerini aldı:

KEMOTERAPİYE DİRENÇ. Aynen bir bakterinin doğal veya akkiz olarak bir antibakterial ajana gösterdiği direnç gibi bazı malign hücreler de bazı antikanser ajanlara ya doğal olarak ya da sonradan kazanılarak direnç göstermektedir. Bu direnç, iki büyük sınıfta toplanabilir: 1. Herediter Direnç 2. Akkiz Direnç Herediter direnç hakkında bilinmeyenler, bilinenlerden çok daha fazladır. En tipik örneği olarak Akut Myeloblastik Löseminin doğal olarak Methotrexate'e gösterdiği direnç verilebilir (1). Akkiz direnç mekanizmaları ise, Multi Drug Resistance (MDR) geni ve bu genin ürünü olan P glikoprotein ile birlikte olanlar ve diğer mekanizmalar olarak ayrımlanabilirler.

Bir antifolat ilaç olan Methotrexate (MTX), antikanser ilaçlar arasında en fazla çalışılan ilaçtır. Bugün için etki mekanizmaları ayrıntılı olarak bilinmektedir. MTX, dihidrofolat reduktaz (DHFR) enziminin kompetitif inhibitörüdür ve hücre için redükte folat eksikliği yaratarak, 1-karbon metabolizmasını ve dolayısıyla purin ve pirimidine biosentezini bloke ederek etkisini göstermektedir (2). Etki mekanizmaları gibi MTX'a karşı olan direnç

mekanizmaları da hem in vivo hem de invitro sistemlerde ayrıntılı olarak çalışılmıştır. Bu çalışmalar klinik uygulama alanına da girmiş ve bu teknoloji kullanılarak hastaların MTX'a olan dirençleri araştırılmıştır. Bugün için in vitro sistemlerde gösterebildiğimiz 5 grup direnç mekanizması mevcuttur(3):

1. MTX transportunda azalma
2. MTX poliglutamillenmesinde defekt
3. DHFR enzim miktarının artması
4. DHFR gen amplifikasyonu
5. Mutant DHFR geni ve MTX'in bağlanmadığı anormal DHFR

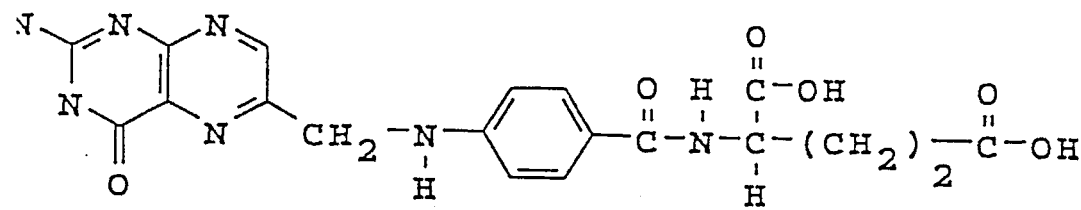
ÇALIŞMANIN AMACI

MTX rezistansının in vitro hücre kültürlerinde araştırılıp, tanınması ve kullanılan metodolijinin geliştirilerek hasta örneklerine uyarlanması, çalışmanın ana temasını oluşturmaktadır. Seçilen hücre hattı, bir T hücre lenfoblastik lösemi hücre hattıdır. Elde edilen bu ana hücre hattında ve değişik doz ve sürelerle MTX uygulayarak elde edilen MTX'a resistant alt gruplarda direnç mekanizmaları ve direncin düzeyinin araştırılması, bu çalışmaların sonunda yeni klinik protokollerin geliştirilmesi ve rezistansın değişik modülasyonlarla kırılması amaçlandı.

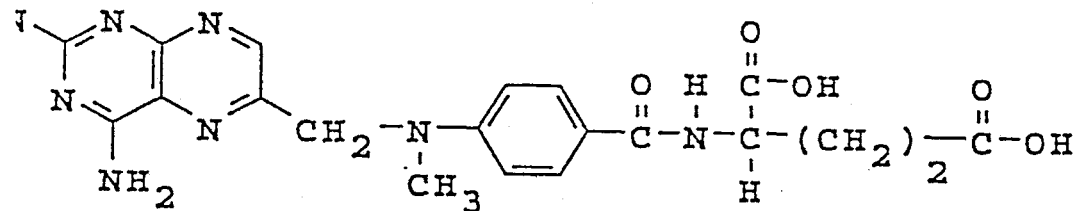
İLAÇ BİLGİSİ

Folik asit vitaminleri antitümör kemoterapi için iyi bir target durumundadırlar. Bunun nedeni, DNA öncü maddelerinin sentezlerinde aldıkları önemli roldür. 1948 yılında Farber ve arkadaşları, folik asidin 4-amino analogu olan Aminopterin'in lösemik hücre proliferasyonunu önleyerek, çocuklarda akut lösemilerin remisyonuna yol açtığını gösterdikten sonra, bu maddelere olan ilgi giderek yoğunlaşmıştır (4). Bu tarihten itibaren antifolat tedavi, klinikte, lösemi, meme kanseri, baş-boyun kanserleri, lenfomalar ve choriocarcinoma gibi malign hastalıklarda olduğu kadar, romatoid artrit, kemik iliği transplantasyonu sonrası oluşan graft versus host reaksiyonu ve psoriasis tedavisi olarak da kullanılmaya başlanmıştır (5).

Folat analoglarının antitümör etkilerine yol açan en önemli yapısal değişiklik, pteridin halkası 4 pozisyonundaki hidroksil grubunun bir amino grubuyla yer değiştirmesidir (Bkz.şekil). Bu değişiklik molekülü substrat olmaktan çıkarıp, DHFR'a bağlanan bir inhibitör haline getirmektedir (6). Bilindiği gibi DHFR, intrasellular folat homeostazinde anahtar rolü oynamaktadır (7).



Folik Asit



Methotrexate

Sadece tam redükte folik asit molekülleri, yani tetrahidrofolatlar aktif koenzim olarak işlev görebilirler (8). DNA öncüsü moleküllerin sentezinde iki ayrı tür tetrahidrofolat molekülüne gereksinim duyulmaktadır. Bunlardan birincisi 10-formül tetrahidrofolat, purin halkasının oluşma reaksiyonlarının iki basamağında, glisinamid ribonukleotid (GAR) transformilaz ve aminoimidazol karboksamid ribonukleotid (AICAR) transformilaz reaksiyonlarında 1-karbon kaynağını oluşturmaktadır (9,10). ikincisi ise, 5-10 metilentetrahidrofolat, pirimidin sentezindeki deoksiuridilattan timidilat oluşum reaksiyonunda yine 1-karbon kaynağını oluşturmaktadır (11).

Dihidrofolat molekülleri, DHFR enzimi tarafından tetrahidrofolatlara redüklenerek hücre içi aktif folat kofaktörleri havuzunu oluşturmaktadırlar. Hızla çoğalan tümör hücrelerinde, DHFR'in MTX tarafından inhibe edilmesiyle inaktif olan dihidrofolatlar artarken, kısmen aktif tetrahidrofolatlar azalmaktadır (12). Bu gelişen tetrahidrofolat eksikliği, MTX sitotoksitesinin bir kısmından sorumludur. Öte yandan, MTX poliglutamil deriveleri ve dihidrofolatların bizzat kendileri de DHFR'i inhibe edebilmektedirler (13). Sonuç olarak, DNA öncüsü moleküllerin sentezlerinin inhibisyonu multifaktöryeldir ve inhibisyon hem substrat eksikliği hem de folatlara bağımlı enzimlerin doğrudan inhibisyonu ile oluşmaktadır (14).

HÜCRE İÇİ METHOTREXATE METABOLİZMASI

A. Transmembran Transport:

MTX etkisini hücre içinde gösterdiğinden, ilacın, biyolojik etkisi için membran transportu büyük önem taşımaktadır. Öte yandan, klinikte görülen ilaç resistansı için bu tip membran transport anormallikleri bir hayli ilgi çekici olmaktadır(15). MTX hücre içine tek bir yüksek affiniteli influx mekanizmasıyla girmektedir(16). Bu mekanizma, enerjiye bağımlı, ısıya ve ekstrasellüler ilaç konsantrasyonuna duyarlı olarak işlev görmektedir. Mekanizmadaki bu özellikler, transportun spesifik bir membran proteininin fonksiyonu olduğu düşündürmektedir (17). Bu mekanizma, anyonlara bağımlı iken glukozdan bağımsızdır(18). 50u M. akadar olan MTX konsantrasyonlarında, hemen hemen tüm MTX transportundan sorumludur (18,19). MTX transportundan sorumlu olan bu taşıyıcı, aynı zamanda doğal olarak oluşan redukte folatların (Citravarum Faktör = Leucovarin) da transportundan sorumludur(20). Bu nedenle MTX ve fizyolojik folatlar hücre içine girebilmek için birbiriyle yarışmaktadırlar. Bu yarışmanın ötesinde, "Heteroexchange" olarak isimlendirilen kavram da açıklığa kavuşturulacak olursa; hücre içinde bulunan serbest MTX (Serbest MTX deyimi poliglutamilasyona uğramamış anlamında kullanılmaktadır), hücre dışında yüksek konsantrasyonda bulunan folatlar, hücre içine girerlerken dışarı çıkması (efflux) için zorlanmaktadır. Özetle, bir molekül folat hücre içine girdiğinde bir molekül MTX dışarı çıkmaktadır yani MTX ve redukte folatların toplamı hücre içinde sabit kalmaktadır(21).

Taşıyıcı proteinin MTX'a olan affinitesi $0.7-6 \text{ M}$ olarak değişik tümör hücrelerinde belirlenmiştir (22,23). Folat taşıyıcı membran proteini, henüz tam olarak purifiye edilememiştir. Ancak araştırmacılar, hücre membranına bağlı, redükte folatları, MTX'i ve çeşitli folik asid moleküllerini bağlayabilen çeşitli membran proteinlerini izole edebilmişlerdir (24). Örneğin, KB epidermoid hücrelerinde 50 kD büyüklüğündeki membran folat bağlayıcı proteinin varlığı gösterilmiştir(25). Bu protein, folat eksikliğinde, artma (up-regulation); fazlalığında ise azalma (down-regulation) göstermektedir(26). Bu bulguların ötesinde, bu proteine karşı geliştirilen monoklonal veya poliklonal antikolar, hem folatların hem de MTX'in hücre içine girmelerini önlemektedir. Membran folat bağlayıcı proteinin (MFBP) gerçek rolünün folatları ve MTX'i hücre zarında tutmak mı yoksa bunların tam transportlarını sağlamak mı olduğu anlaşılammıştır. Bu membran proteinini (MFBP) kodlayan cDNA, geçen yıl klonlanabilmiştir. Ancak, daha pek çok araştırmaya gereksinim vardır(27).

Tümör hücresinin proliferatif veya kinetik durumu folat ve MTX transportunu belirgin olarak etkilemektedir. Hızla bölünen hücrelerde ve MTX "up-take"i çok artarken "efflux" azalmaktadır(28). Bunun net sonucu, hücre içindeki MTX miktarının artmasıdır. Buna karşın daha yavaş bölünen veya bölünmeyen hücrelerde "influx" azalırken, "efflux" artmaktadır(28). Bunun da net sonucu, azalmış intrasellular MTX olmaktadır. Bazı deney sistemlerinde ise, hücrelerin büyüme ve bölünme hızlarından bağımsız olarak, sadece farklılaştırılma (differentiation) hızlandırılarak MTX transportu azaltılabilmektedir(29). Hızla bölünen

hücrelerde, transportun artması yanısıra, artan DNA öncü molekül ve timidilat sentaz aktivitesi, MTX sitotoksitesinin artışına neden olmaktadır(30). Tüm bu olaylar dizisi ile MTX sitotoksitesinin neden hücrelerin proliferasyon durumlarından etkilendiğini açıklamak mümkündür. ilginç olanı, bu tür etkilenme normal intestinal epitelyal hücrelerde görülmemekte ve bu bulgu klinikte, ilacın toksisitesi yönünden önem taşımaktadır(31).

Yukarıdaki pragrafta tanımlanan yüksek affiniteli "uptake" sisteminin yanı sıra, MTX için ikinci bir giriş yolu daha tanımlanmıştır (32,33). Bu mekanizmanın etkisi yok denecek kadar azdır. Önemi yüksek ilaç konsantrasyonlarında (20uM'in üzerindeki konsantrasyonlar) pasif diffüzyonla yeterli intrasellular MTX miktarını sağlamaktır. Bu pasif diffüzyon sisteminde, MTX ve diğer folatlar arasında yarışma veya "heteroexchange" görülmemektedir (34). Bu mekanizmanın varlığı, klinikte yüksek doz MTX kullanımının gerekçesini oluşturmaktadır.

B.HÜCRE İÇİ DEĞİŞİM

Doğal folatlar, hücre içinde poliglutamam tuzları halinde bulunurlar(35). Poliglutamamasyondan sorumlu enzim, Folilpoliglutamam Sentetaz, gamma-peptid bağıyla 6'ya kadar olan glutamam grubunu substratına ekleyebilir(36). Poliglutamamasyondan amaç iki tanedir. Birincisi hücre içi bir depo oluşturmak, ikincisi folatlara bağımlı enzimler için kofaktör affinitesini artırmaktır(37). Monoglutamam halindeki folatlar hücre içinden dışarı serbestçe çıkabilirlerken, poliglutamamlar son derece ionize moleküller olduklarından selektif olarak hücre içinde

tutulurlar(38). MTX de folatlar gibi hücre içinde poliglutamilasyona uğramaktadır(39). Poliglutamilasyon, normal karaciğer hücresinde, kemik iliği öncü hücrelerinde, çeşitli solid tümör ve lösemi hücrelerinde gerçekleştirilebilmektedir(40). Folilpoliglutamil Sentetaz (FPGS) aktivitesi MTX-sensitif hücrelerde oldukça yüksek bulunmaktadır(41). Poliglutamilasyon, ilacın verilmesinden 12-24 saat sonra maksimum olmakta ve bu zaman zarfında hücre içindeki MTX'in büyük kısmı poliglutamat haline dönüştürülmektedir(42).

FPGS, 62kD büyüklüğünde, magnezyum, ATP ve potasyuma bağımlı bir enzimdir(43). Halen purifiye edilmiş ve cDNA'sı klonlanmıştır(44).

Hücre içindeki poliglutamilasyon, FPGS ve Hidrolaz (Konjugaz) enzimleri arasındaki dengeye bağlıdır(45). Hidrolaz, terminal gamma-glutamil spesifik peptidazdır ve glutamil gruplarını poliglutamat zincirinden kopararak molekülü tekrar monoglutamat haline çevirmektedir(46).

MTX poliglutamatları genel olarak hücre içinde bulunurlar. MTX'in di-glutamat halinin up-take hızı, MTX'in onbeşte biri kadardır. Daha çok sayıda glutamat taşıyan moleküller daha da yavaş transport edilirler(47). Bunun pratik anlamı, MTX poliglutamatlarının, hücre dışı MTX konsantrasyonu düştükten sonra dahi hücre içinde tutulabilmeleridir.

MTX poliglutamillenmesi pek çok etkene bağlıdır. Bunlardan en önemlileri, hücrelerin büyüme-gelişme hızları ile hücre içi folat miktarlarıdır(48). Örneğin, hücrelerin çoğalması,

insülin, deksametason, tokoferol veya östrojen gibi büyüme faktörleri ile uyarıldığında MTX poliglutamillenmesi artmaktadır(49). Buna karşın isolösin gibi bir esansiyel amino asit ortamdan alındığında ise, poliglutamilasyon belirgin olarak azalmaktadır(50). Bu bilgiler ışığında, klinikte sıkça kullanılan bir kombinasyon olan L-Aspariginase/MTX kombinasyonunun aslında, antagonistik olabileceği ortaya çıkmaktadır. L-Aspariginase, MTX'den önce verildiği takdirde amino asid deprivasyonu oluşturarak, MTX'in poliglutamilasyonunu ve dolayısıyla de sitotoksitesini azaltmaktadır(51).

MTX sitotoksitesinin proliferatif hücre seçiciliğini belirleyen bir diğer bulgu da, poliglutamilasyonun normal hücrelerde tümör hücrelerine oranla daha az oluşmasıdır. Örneğin normal intestinal mukoza hücrelerinde çok az miktarda MTX poliglutamilasyona uğrarken, L-1210 fare lösemi hücrelerinde MTX hızla poliglutamit tuzları haline dönüşebilmektedir(52).

MTX poliglutamilasyonu, MTX'in hücre içinde tutulmasını sağladığı gibi, aynı zamanda MTX'in spesifik enzimleri inhibe edici etkisini de artırmaktadır. MTX poliglutamit tuzlarının bağlandıkları DHFR enziminden ayrılma hızları, MTX'in ayrılma hızından çok daha yavaştır(53). Bu nedenle, poliglutamillenmiş MTX'in DHFR üzerindeki inhibitif etkisi çok daha fazladır(53). DHFR'in yanısıra, Timidilat sentaz, AICAR ve GAR transformilaz da MTX poliglutamitleri ile daha güçlü olarak inhibe edilebilmektedirler(53). Farmakolojik dozlardaki MTX'in, bu son üç enzim üzerinde yok denecek kadar az bir etkisi varken, MTX pentaglutamatin (5 glutamil residu eklenmiş MTX) bu enzimler üzerindeki inhibitif etkileri (Ki) sırasıyla, 50; 57; ve 2000 mM. dur(53).

C. DHFR ENZİMİNE BAĞLANMA

Methotrexate ve nikotinamid dinukleotid fosfatın (NADPH), DHFR enzimine bağlanmasının fiziksel özellikleri, X-ray kristallografi, mağnetik rezonans spektroskopi, amino asid "sequencing" ve "site directed mutagenesis" çalışmaları ile belirlenmiş durumdadır(54). MTX'in DHFR'a optimal bağlanabilmesi için, hücre içi NADPH konsantrasyonu önem taşımaktadır. Çok miktarda NADPH varlığında, MTX'in enzime bağlanma affinitesi 10-200 pM arasında değişmektedir (55). MTX'in DHFR'a olan affinitesi, ortamın pH ve tuz konsantrasyonundan ve enzimin sulfidril gruplarının durumundan etkilenmektedir(56). Düşük pH ve MTX/DHFR oranında, MTX enzime stoichometrik olarak bağlanmaktadır, yani 1mol MTX, 1 mol DHFR'a bağlanmaktadır(57). Enzim-MTX-NADPH kompleksi oldukça stabil olmasına karşın,irreversibl değildir(58). MTX'in, NADPH varlığında enzime bağlanması yavaş bir ternary kompleks oluşumuna yol açmaktadır. Sonuçta, MTX sıkı bağlanma gösteren ama reversibl bir inhibitör rolü oynamaktadır. Eğer ortama yüksek konsantrasyonlarda diğer bir kompetitif inhibitör, dihidrofolat konacak olursa, enzimin inhibisyonu için gerekli MTX konsantrasyonunun giderek artırılması gerekmektedir(58).

Methotrexate poliglutamaları ise enzime aynı güçte bağlanmakta ancak daha güç enzimden ayrılmaktadırlar. Dolayısıyla enzim inhibisyonu çok daha güçlü ve kısmen irreversibl olmaktadır(59).

Hücre içinde yeterli MTX bulunmadığı takdirde, çok küçük miktarlarda dahi olsa, DHFR hücre metabolizmasının sürdürülmesi

için yeterli olabilmektedir. Bu DHFR yeni sentezlenmiş bir enzim olabileceği gibi MTX'in ayrıldığı ve tekrar katalitik özelliğini kazanmış bir enzim molekülü de olabilir. hücre içi serbest MTX (enzime bağlı olmayan) miktarının yüksek tutulmasının gereği, ilacın toksik etkisinin anlaşılması yönünden önem taşımaktadır ve farmakokinetik ve toksisite arasındaki ilişkinin temelini oluşturmaktadır.

Methotrexate toksisitesine dirençli hücrelerin bazılarında DHFR aktivitesinde artma veya anormal DHFR enzimi saptanmıştır(60). Bunun yanısıra, DHFR geninde amplifikasyon ve/veya mutasyon çeşitli hücre hatlarında gösterilmiştir(61,62).

ARAÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmanın hücre hatları ile ilgili olan kısmı tamamen steril koşullar altında gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar hücre kültürü odasında, özel hoodlarda yapıldı. Kullanılan tüm araç ve gereç steril ve disposabldi.

HÜCRE KÜLTÜRÜ

Çalışmada CCRF-CEM insan T-lenfoblastik lösemi hücreleri kullanıldı. Hücreler American Type Tissue Collection (ATCC) Rockville, Maryland.'dan steril ampuller şeklinde elde edildi. Hücreler, uygun koşullarda geliştirildi. Kültür için RPMI-1640, % 10 oranında at serumu ve % 1 oranında Glutamin (Sigma Co., St. Lois, Mo.) kullanıldı. 37 C°'de önceden ısıtılan bu kültür medyası

hücrelere ilave edildi. Karışım, 25cm² doku kültürü flasklarına (Becton-Dickinson, Plymouth, GBR) kondu ve 37 C ve % 5 CO₂ altında inkübe edildi. Her 3 günde bir hücreler coulter counter'da sayıldı ve canlılıkları Trypan Blue exclusion yöntemiyle saptandıktan sonra, mm³ de bir milyon hücre olacak şekilde dilue edilerek daha büyük flasklara (50 ve 75 cm²) transfer edildi. Hücre kültürleri, bakterial veya fungal bulaş yönünden haftada bir kez mikrobiyolojik testlerle (kültür, mycoplasma DNA, PCR) kontrol edildi ve bulaş olmadığı saptandı.

METHOTREXATE REZİSTAN ALT GRUPLARININ GELİŞTİRİLMESİ

Methotrexate (MTX), Amerikan Ulusal Kanser Enstitüsünden elde edildi ve 1N NaOH ile sulandırıldıktan sonra pH 7'ye ayarlandı. 100uM konsantrasyonunda stok olarak -20 C da kullanılabilecek şekilde saklandı. Rezistan alt grup elde etmek amacıyla hücrelere sürekli MTX içeren ortamlarda tutuldu ve MTX dozu giderek artırıldı veya pulse şeklinde MTX uygulanıp hücreler pasaj edildi. Sonuçta üç ayrı tip büyüme patterni gösteren alt grup ve ana hücre hattından oluşan hücre serileri elde edildi.

HÜCRE ÇOGALMA HIZLARININ SAPTANMASI

Methotrexate uygulanması ile elde edilen 3 değişik alt grup ve ana sensitif hücre kültürlerinden birer milyon hücre Coulter Counter'da sayılarak alındı. Canlılıkları Trypan Blue exclusion yöntemiyle kontrol edildikten sonra bu hücreler RPMI-1640, % 10 At Serumu ve % 1 glutamin içeren media içinde 25cm²

flasklara kondu. Birinci gündenbeşinci güne dek hergün hücre sayısı Coulter Counter'da belirlendi ve canlılıkları kontrol edildi. Beş günün sonunda her bir alt grup ve parental hat için bölünme hızları hesaplandı.

METHOTREXATE TRANSPORT ÇALIŞMALARI

Kullanılan İlaçlar: N-alfa-(4-amino-4-deoksi-N¹⁰ metil pteroil)-N⁶-(4'-fluorosceinthiocarbamyl)-L-lizin veya kısaca PT-430 adlı MTX floresan analogu, Dr.Andrei Rosowski'den, Dana Farber Enstitütüsü, MA hediye olarak elde edildi. MTX, Lederle Laboratuvarları, Carolina, Puerto Rico ve Trimetrexate Glucuronate, Warner-Lambert/Parke-Davis, Ann Arbor,MI.'dan standard olarak elde edildi ve 1mM konsantrasyonlarında -20C'da saklandı. Kullanılan Flow Sitometre: Becton-dickinson Electronics Flow Cytometry aracı floresan yoğunluğunu ölçmekte kullanıldı. Eksitasyon 488nm dalga boyunda ve 500mW argon laser kullanıldı. Emisyon filtresi 525 bandpass filtresiydi. Her analizden önce araç 10u çapındaki floresferlerle standardize edildi. Her hücre için mean floresan yoğunluğu, 20000 hücre sayıldıktan sonra Lysis II komputer programı yardımıyla hesaplandı.

Yöntemin Prensipleri: MTX "up-take"i, PT-430'un kompetitif yer değiştirmesine bağlı olarak değişen floresan yoğunluğunun ölçülmesi ile hesaplandı. Hücre içine yeterli MTX transportunun olduğu durumlarda, daha önceden hücre içinde bulunan PT-430'un hücre dışına çıkacağı bilinmekteydi (Heteroexchange).

Yöntem: Toplam 25 milyon hücre 25 ml. büyüme mediasına (RPMI-1640, % 10 At Serumu, % 1 Glutamin ve 30uM Hipoksantin) kondu.

Hücrelerin canlılıkları her çalışma öncesinde kontrol edildi. Daha sonra bu hücre suspensiyonu 5'er ml. halinde 25cm² flasklara transfer edildi. Böylece, 5ml.de 5 milyon hücre olacak şekilde 5 ayrı flask edle edildi. Flasklar 1 den 5 e kadar numaralandı. 2mM konsantrasyonundaki stok PT-430, 10mM sodyumbikarbonat, pH 7., ile hazırlandı. Bu solüsyondan 50şer ul. ilaç, 2-3-4-5 numaralı flasklara eklendi. PT-430'un ışığa sensitif olması nedeniyle bu aşamadan sonra tüm çalışmalar karanlıkta gerçekleştirildi. Flask 1, otofloresan için kontrol olarak ayrıldı. 5 flask 2 saat 37 C'da ve % 5 CO² altında inkübe edildi. inkübasyondan sonra hücreler 15 ml.lik konikal tüplere aktarıldı ve 2 kez önceden 37 C'ye ısıtılmış fosfatla tampone serum fizyolojik (PBS) ile yıkandı. Yıkamadan sonra hücreler tekrar 5er ml. büyüme mediasi ile suspense edildi ve 30 dakika bu mediada inkübe edilerek değişebilir (exchangabl) PT-430'un efflux'u sağlandı. Hücreler tekrar sıcak PBS ile yıkandıktan sonra, kompetisyon solüsyonuna (%10 dialize edilmiş fetal bovin serumu, 20mM HEPES, 225mM sukroz, pH 7.4) aktarıldılar. Bu suspensiyonlara değişik konsantrasyonlarda MTX veya Trimetrexate (TMQ) eklendi ve 2 saat aynı koşullarda inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon süresinin sonunda hücreler, buzla soğutulmuş PBS ile 2 kez yıkandılar ve ml.de 1 milyon hücre olacak şekilde soğuk PBS ile suspense edilerek en kısa zamanda sitometrik analizleri sağlandı.

METHOTREXATE POLİGLUTAMİLASYON ÇALIŞMALARI

MATERYAL: Methotrexate, Lederle Laboratuarları, Puerto Rico; [3'.5',7-³H] Methotrexate, Moravek Biochemicals, Brea, CA.; Methotrexate Poliglutamam standardları B.Schircks Labaratuarı,

Jona, isviçre'den temin edildi. MTX poliglutamit standartları 0.2mM konsantrasyonunda, 100mM sodyum fosfat tamponunda (pH 6.5), 250ul.lik miktarlar halinde kullanılabilmektedir. Bu standartların gerçek konsantrasyonlarından çok Yüksek Basıncılı Sıvı kromatografisi (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) sırasında gösterdikleri tepe noktası önem taşımaktadır. MTX'in kendisi Glu1 olarak kullanılabilir.

YÖNTEM: Yirmi milyon hücre 2ml. media (RPMI-1640, %10 dialize edilmiş fetal bovin serumu) ile suspense edildi. Suspensiyona 1mM konsantrasyonundaki stok MTX'dan 20 ul ve 20 ul [³H]-MTX eklendi. Böylece 10 uM final MTX miktarı elde edilmiş oldu. Bu suspensiyon 37 C ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 24 saat süreyle inkübe edildi. inkübasyon için 60X15 mm petri kutusu kullanıldı. inkübasyondan hemen önce, background belirlenmesi amacıyla 50ul suspensiyon alınarak sintillasyon şişesine kondu ve inkübasyon başlatıldı. 24 saatlik inkübasyonun sonunda, suspensiyon 15 ml konik tübe aktarıldı ve 1000rpm.de sentrifuj edildi. Supernatant atıldıktan sonra, hücrelerin oluşturduğu yumak 2 kez isotonik salın ile yıkandı. Birinci yıkama işleminden sonra hücrelerin canlılıkları Trypan Blue boya exclusion yöntemiyle kontrol edildi. ikinci yıkamadan sonra ise, santrifuj sonrası üstte kalan supernatantdan 100ul alınarak, yıkamaların etkinliğini belirlemek amacıyla sintillasyon şişesine kondu. Geri kalan supernatant atıldı ve hücre yumacı üzerine kaynar sodyum fosfat tamponundan (pH 5.6) 0.5ml eklenerek hücrelerin homojen bir solüsyon oluşturmaları sağlandı. Bu solüsyon 10 dakika süreyle kaynatıldıktan sonra konikal tüplerden, özel olarak yapılmış ve yüksek hızda santrifuje

dayanıklı tüplere aktarıldı. 10 dakika süreyle 14000 rpm.de santrifüj edildi. Süpernatant hacmi ölçüldükten sonra alındı ve hücre kırıntılarının oluşturduğu yumak atıldı. Elde edilen süpernatandan 50ul alınarak sintillasyon şişesine kondu, geri kalanı HPLC çalışmasına dek saklanmak üzere -20 C buzdolabına kondu. Sintillasyon şişelerindeki radyoaktivite sintillasyon sayacında sayıldı. Çalışmanın tüm aşamalarında radyoaktif bulaşı önlemek amacıyla azami gayret sarfedildi.

HESAPLAMA: 10uM final MTX ve [³H]-MTX miktarı 2ml. mediada 500 pM MTX anlamına gelmektedir. Aşağıdaki formülle total MTX poliglutamaları hesaplandı.

Son radioaktivite X Son Hacim X 500

Total MTX-PG = -----

(PMol/10⁷ hücre) Background Radioaktivite X 100

HPLC ANALİZİ: Revers faz kolumnlar (Absorber C18, 5uM, 4.6mm X 25cm) kullanılarak gerçekleştirildi. HPLC separasyonunun sonunda elde edilen tepe noktaları sintillasyon sayacında belirlendi ve MTX poliglutamalarının (Glu₁ den Glu₆ ya dek) miktarları hesaplandı.

DiHiDROFOLAT REDUKTAZ ENZİM AKTİVİTESİ ÖLÇÜLMESİ

Her üç alt grup ve ana hücre hattının DHFR enzim aktiviteleri çalışıldı. Metodun temel prensibi, kısaca özetlenecek olursa; DHFR enzimi, FH₂ ve NADPH moleküllerini sırasıyla FH₄ ve NADP moleküllerine çevirmektedir. Bu dönüşüm gerçekleştiğinde, 340 nm dalga boyunda FH₂'nin 5.8 ve NADPN'in 6.2 olan absorbanları 0'a düşmektedir. Bundan dolayı, her mM maddenin

maddenin dönüştürümü için 12U enzim gerektiği de bilindiğinden, her çeşit hücrenin DHFR aktivitesi hesaplanabilmektedir.

ENZİM EKSTRASİYONU: Lizis tamponu olarak sodyum fosfat 50mM, pH 7, ve % 10 gliserol kullanılmıştır. 100 milyon hücre her bir durum için kullanıldı. Suspensiyon halindeki hücreler 1000rpm. de santrifüj edildi. Üstte kalan süpernatant atıldıktan sonra, kalan hücre yumağı buz içine kondu. Sonikatör ile lizisleri sağlandıktan sonra, tam bir lizat oluşup oluşmadığını anlamak üzere Hemotositometri (Thoma Lami) ile intakt hücre varlığı araştırıldı. Elde edilen hücre ekstresi SW 50 santrifuj tüplerine aktarılarak ultrasantrifuj aletinde, 30000 g.de santrifuj edildi. Elde edilen supernatant temiz tübe aktarıldı. Bu arada optik dansite ölçümü için spektrofotometre kuvvetleri aşağıdaki şekilde hazırlandı.

MATS Tamponu*	800UL
NADPH	50ul (100uM)
Enzim Ekstresi	100ul
FH ₂	50ul (50uM)

FH₂, 1mM konsantrasyonunda folik asitten hazırlanarak -70 C'da saklandı. NADPH, 2mM konsantrasyonunda tetrosodyum tuzu halinde Sigma Co.'dan temin edildi ve -20 C'da toz halinde saklandı ve analizin yapılacağı gün taze olarak solüsyon haline getirildi. Optik spektrofotometri analizi, Biotek-Kinektics komputer programı yardımıyla gerçekleştirildi. Protein miktarı Bio-Rad Assay Kiti (BioRad Co., Richmond, CA) kullanılarak hesaplandı. Bu yöntem,

* MATS Tamponu: MES 25mM, Asetik Asit 25mM, Tris 50mM, NaCl 100mM

basit bir spektrofotometrik yöntemdir. Standard albuminin bilinen konsantrasyonlarda kullanılması ile elde edilen standard kürvden, hücrelerin içerdikleri protein miktarları bulundu. DHFR enzim aktivitesi, dönüşüme uğrayan molekül sayısı/dakika)mg. protein olarak ifade edildi.

DHFR GEN AMPLİFİKASYONUNUN GÖSTERİLMESİ

DHFR enzimini kodlayan genin amplifikasyon durumu klasik Southern Blot Analizi ile gösterildi.

DNA Ekstraksiyonu: 40 milyon hücre her bir durum için kullanıldı.

Manuel DNA ekstraksiyon kiti Applied Biosystems, FosterCity,CA.'dan elde edildi. Kitin kullanımı ve DNA ekstraksiyonunun belli başlı kasamakları şu şekilde özetlenebilir:

1. 40 milyon hücre içeren hücre yumağı 1ml.PBS ile homogenize edildi.
2. Homogenata, önceden 50 C'da 10 dakika ısıtılarak endogen nukleazları inaktive edilmiş 2X Lizis Buffer'dan 1ml ve 62.5ul RNA ase koktetyli (Stratagen Co) eklendikten sonra 37 C'da 2 saat süreyle inkübe edildi.
3. inkübasyon sonunda, homojen hücre lizatına 250ul (25U) ProteinazK eklendi ve 50 C'da tüm gece boyunca inkübasyona (yaklaşık 16 saat) bırakıldı.
4. Fenol/kloroform ekstraksiyonu ve alkol presipitasyonu ile kristalize DNA edildi.
5. Elde edilen DNA ultrapur su ile diue edildi ve pürlüğü spektrofotometrik olarak 280/260 nm deki absorbanları ölçülerek kontrol edildi ve konsantrasyonları hesaplandı.

DNA RESTRIKSİYONU: DHFR enzimini kodlayan geni oluşturan DNA parçacığını elde etmek için, 10ug. olarak 0.65ml.lik eppendorf tüplerine konan örnek DNA'lar 5ul restriksiyon endonuleazları ile inkübe edidi. Endonukleaz olarak, ECOR I ve HIND III enzimleri (Stratagene, LaJolla, CA.) kullanıldı. Ortama yine aynı şirketten elde olunan universal bufferdan 5ul eklendi. Tüm solüsyon, 37 C su banyosunda tüm gece boyunca inkübe edildi.

AGARUZ JELİN HAZIRLANMASI: Sea Kem GTG Agaroz, FMC BioProducts, Rockland ME'den elde edildi % 1 oranında olacak şekilde tartıldı ve 1X konsantrasyonundaki Tris-Asetat-EDTA solüsyonunda karışım hazırlandı. Kaynamaya yakın olacak şekilde ısıtılarak, agarozun tamamen çözünmesi sağlandı. Solüsyon oda sıcaklığına dek soğuması beklendi ve suspansiyona 10ul Ethidium Bromid (10mg/ml) eklendi. Daha sonra bu gel suspansiyonu, kenarları selofan ile kapatılmış gel trayinin içine doküldü. Hava kabarcıkları yok edildi ve katılaşması beklendi. Jel katılaştıktan sonra jel kumbu alındı ve jel trayin içinde, elektroforez aygıtına transfer edildi. Elektroforez aygıtı, jel yüzeyini de kaplayacak şekilde 1X TAE tamponu ile dolduruldu.

ELEKTROFOREZ: Bir gece su banyosunda inkübe edilerek restriksiyonu sağlanan DNA'lara "loading buffer" eklendi ve jel içinde oluşturulmuş olan yuvalara mikropipetlerin yardımıyla bu DNA suspansiyonları transfer edildi. DNA noleküler ağırlık markeri olarak PHIX marker DNA ve lambdaDNA HIND III digest marker'ları uygun yuvalara 5 ul kondu. Jel 25mV ve 0.25mA'de 18 saat elektroforez edildi. Eletroforez süresinin sonunda jel ve DNA'ların durumu U.V ışık kaynağı ile kontrol edildi. Digestion ve

elektroforez yeterli bulundu ve jel başka bir traye aktarıldı. U.V ışık kaynağının yardımıyla jelin fotoğrafı çekildi. Bundan amaç, DNA markerlerini bilinen moleküler ağırlık noktalarındaki band patterni ile bilinmeyen örneğin gösterdiği band patternini karşılaştırmaktır.

JELİN DENATÜRASYON- DEPÜRİNASYON ve NÖTRALİZASYONU: Halen bir tray içinde bulunan jel büyükçe bir kap içine kondu. Önce 500 ml. 0.25N HCl ile 15-20 dakika, mavi renkte olan loading buffer rengi kirli sarı renge dönüşene kadar, orbital çalkayıcı üzerinde çalkalandı. Sonra ultrapur su ile en az 3 kez yıkanarak HCl'nin uzaklaştırılması sağlandı. HCl, DNA'yı denatüre etmekte kullanıldı. ikinci aşamada DNA denatürasyonu sonucunda ortaya çıkan purinlerin giderilmesi ve böylece daha kolay transferin gerçekleşebilmesi amacıyla jel, 0.5N NaOH ve 1N NaCl içeren 500ml su ile 20 dakika tekrar çalkalandı. 3. aşamada ise jelin nötrale olması amacıyla, 0.5M TRIS ve 1 M NaCl içeren su 20 dakika süre için kullanıldı.

SOUTHERN TRANSFER: Metodun ana ilkesi, yüksek tuz konsantrasyonu varlığında, jeldeki DNA moleküllerinin solid bir supporta, naylon veya nitroselluloz membrana, aktarılabilmesidir. Bu amaçla, jelin boyutlarında kesilen Naylon membran (S&S Nytran, Por capı 0.45uM., Schleicher&Schuell, Keene, NH.) önce 5 dakika ultrapur suda ıslatıldı, ardından 10X SSC* de ıslatıldı. Bu arada önceden 3M Whatman kağıdı ile kaplanmış ve ters döndürülmüş jel trayi üzerine jel kondu. Jel ve Whatman kağıdı tekrar tekrar 10X SSC solüsyonu ile ıslatıldı. Jelin üzerine nylon membran dikkatli bir şekilde hava kabarcıkları uzaklaştırarak kondu. Membran üzerine

tekrar 10X SSC'de ıslatılmış, biraz daha küçük boyutta 3 parça 3M Whatman kağıdı kondu. Trayin içinde bulunduğu büyükçe kapta yeter miktarda 10X SSC ile dolduruldu. Trayin kenarları jöle kağıdı ile kapatıldı. Tüm bunların üzerine yeter miktarda kağıt havlu ve bunların da üzerine 500gm. ağırlığında su şişesi kondu. 16-18 saat transfer süresi verildi. Yaklaşık 18 saat sonra, jel ve membran U.V ışık ile tam transferin olup olmadığı yönünden kontrol edildi. Umulan, jel üzerinde hiç DNA'nın kalmaması ve hepsinin membrana transfer olmasıdır. Bu saptandıktan sonra, membranın her iki tarafı da 1200joules U.V ışığına birer dakika maruz bırakılarak DNA'nın denatüre olması ve single strand halde kalıcı olarak kalması sağlandı.

PREHiBRiDiZASYON: Naylon membran bir hibridizasyon tübüne uygun şekilde yerleştirildi. 2.5ml.20X SSC, 0.3 ml. potasyum fosfat, 1.6ml. ultrapur su, 0.5ml. Denhartz solüsyonu (3&5 Prime Co., WestChester), 5ml.ultrapur formamid, 200ul sodyum dodesilsulfate % 20, ve nonspesifik hibridizasyonu önlemek amacıyla her ml.de 200ug olacak şekilde salmon sperm DNA'sı 10 dakika kaynatılarak denatüre edildikten sonra inkübasyon tübüne ilave edildi. Tübün ağzı kapatıldıktan sonra hibridizasyon inkubatorüne, 42 C de 2-8 saat süreyle kondu.

DHFR PROBUNUN HAZIRLANMASI:

Daha önceden klonlanmış olan DHFR genini kodlayan cDNA ampicilline'e resistant E.coli plasmidlerine konstukte edildi ve bu bakteriler ampicilinli ortamda çoğaltıldılar. Yeterli sayıda

* 10X SSC: 3M NaCl ve 0.M trisodyumsitrat

bakteri elde edildikten sonra, bu bakterilerden Qiagenologist Kiti ile (Qiagen Inc. Chatsworth, CA) plasmid DNA elde edildi. Oligonukleotid primerler dizayn edildikten sonra, Mikrobiyoloji Laboratuvarında hazırlatıldı. Aşağıdaki şartlarda PCR (Polimeraz Chain Reaksiyonu) ile bol miktarda cDNA elde edildi.

PCR reaksiyon Karışımı:

Distile su:32.2
d Nukleotid trifosfatlar: 8
PCR Tamponu:..... 5
Oligonukleotid Primer I: 1
Oligonukleotid Primer II: 1
Taq polimeraz*:..... 0.8
Plasmid DNA: 2
TOPLAM:50.0 ul

*Taq Polimeraz: *Thermus aquaticus* adlı ısıya dirençli bakterinin DNA polimeraz enzimi (CETUS Co.)

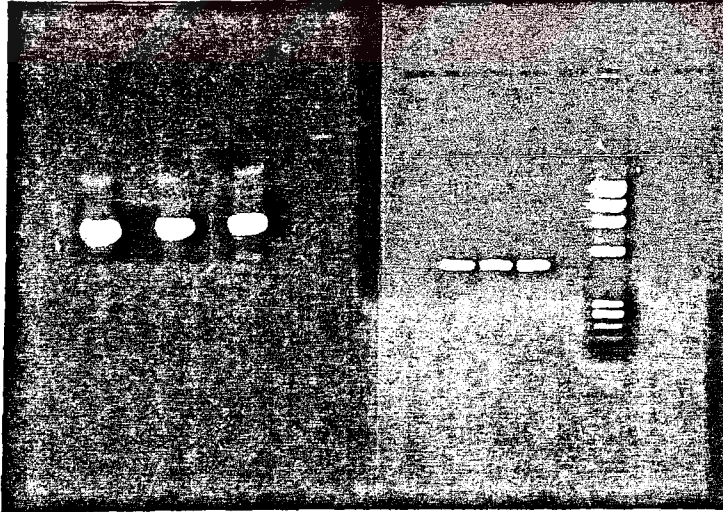
Bu karışım aşağıdaki koşullarda PCR aracına konmadan önce üzerleri organik yağ ile örtüldü.

Birinci Döngü: 94 C...3 dakika	39 Döngü: 94 C...1 dakika
45 C...2 dakika	45 C...1 dakika
72 C...2 dakika	72 C...1 dakika

Elde edilen ürün, Fenol/Kloroform ile yağdan ve diğer proteinlerden arındırıldı.

Bu PCR ürününden, temiz ve saf cDNA elde etmek amacıyla, gen temizlenmesi işlemi (Gen Cleaning) başlatıldı. Bu amaçla, Gen Clean

Kiti (Bio 101 Co.,CA) kullanıldı. Yöntemin amacı kısaca DNA dışındaki maddelerden DNA'nın arındırılması ve saf ve pur DNA elde edilmesi şeklinde özetlenebilir. Bu amaçla ilk önce, PCR ürünü, TAE jelde (%1 Tris-Asetat-EDTA) elektroforez edildi. DHFR cDNA moleküller ağırlığı 600 bp olduğundan, bu bölgedeki jel kesilerek alındı ve ağırlıkları tartıldı. Bu ağırlıklara göre, gen temizleme kiti kullanıldı. İşlemden sonra temiz DNA, TBE jelde (%1 Tris-Borat-EDTA) elektroforez edildi ve moleküler ağırlığına göre doğru yerde olup olmadığı ve konsantrasyonu moleküler ağırlık markerine (PHIX Marker) göre kontrol edildi. Aşağıdaki şekilde, sol yanda temizlenmemiş, sağ yanda ise temizleme sonrası DHFR cDNA görülmektedir.



DHFR cDNA PROBUNUN RADYOAKTİF İŞARETLENMESİ

Bu amaçla Random Primer Kiti (Boehringer-Manheim, Almanya) kullanıldı.

Reaksiyon karışımı aşağıdaki şekilde hazırlandıktan sonra, bu karışım ^{32}P -dCTP (Amersham, MA) ile ve Klenow Enzimi yardımıyla radyoaktif olarak işaretlendi.

Önce 4ul DEPC- H_2O ve 5ul DHFR cDNA karıştırılıp 10 dakika kaynatıldı. Daha sonra bu karışıma, sırasıyla, 1'er ul dATP, dTTP ve dGTP ile 2ul reaksiyon tamponu eklendi. Reaksiyon tüpü radyoaktif çalışma sahasına getirilerek, 7ul ^{32}P -dCTP ve 1ul Klenow Enzimi eklenip, 37 C su banyosunda 2-4 saat inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda saf cDNA elde etmek amacıyla bu karışım G-25 Sephadex Quick Spin Kolumnlarından (Boehringer Mannheim, Almanya) geçirildi. Elde edilen radyoaktif probun spesifik radyoaktivitesi, sintillasyon kounterda sayıldı. Yeterli radyoaktif probun bulunduğu anlaşıldıktan sonra, single stranded cDNA elde etmek amacıyla, prob, 10 dakika süreyle kaynatıldı. Çalışma süresince çevrede radyoaktif bulaş olmaması için azami gayret sarfedildi.

HİBRİDİZASYON: Ultrapur su, Denhartz Solüsyonu, formamid, sodyum dodesil sulfat ve salmon sperm DNA'dan oluşan hibridizasyon hazır karışımına toplam 50-100 milyon cpm.radyoaktivite oluşacak şekilde prob eklendi. Blotun içinde bulunduğu tüp, inkübatörden alınarak içindeki prehibridizasyon sıvısı boşaltıldıktan sonra, bu hibridizasyon sıvısı kondu. Tüp tekrar hibridizasyon inkübatörüne, 42C'de 24-36 saat hibridizasyon için geri kondu.

BLOT'un YIKANMASI: ^{32}P -cDNA spesifik olarak blottaki DHFR enzimi kodlayan genin DNA'sı ile hibrid oluştururken bir miktar da

non-spesifik denilen bağlanma olmaktadır. Bu bağlanmayı, spesifik bağlanmanın tersine, yıkama işlemiyle tamamen uzaklaştırmamız mümkündür. Bu amaçla, iki aşamalı yıkama uygulanmaktadır.

Yıkama Solüsyonu I : 100ml. 20X SSC

25ml. %20 SDC

1000ml.ye su ile tamamlanır.

Yıkama Solüsyonu II : 5ml. 20X SSC

2.5ml. %20 SDS

500ml.ye su ile tamamlanır.

300ml.yıkama solüsyonu I ile blot 3 kez oda sıcaklığında yıkandıktan sonra, yıkama solüsyonu II içine konan blot, 65C'de bir saat süreyle yıkandı. Yıkama sonunda kurutulmaya bırakıldı. Kurumuş blot, jelatin kağıdına sarıldı.

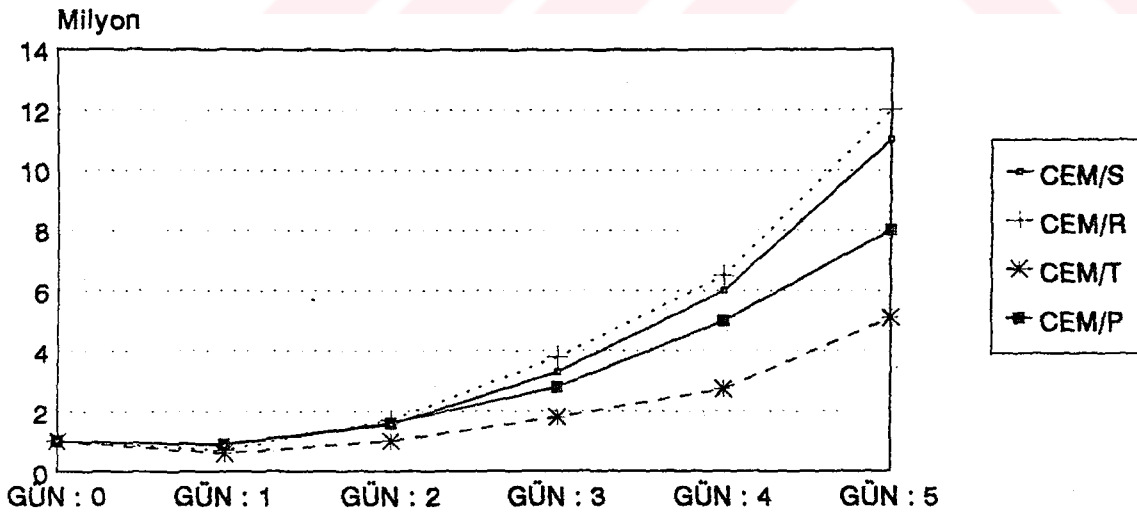
BETASTOPİK MUAYENE ve OTORADYOGRAFI: Jelatin kağıdına sarılı blot, Betagen/Betaskop denen araç içine konarak 30-60 dakikalık bir zaman sonunda ilk görüntüler ekranda alındı. Bu görüntülere göre, yeter hibridizasyonun olduğu ve non-spesifik bağlama ve "background" un düşük olduğu saptandı. Blot alınarak, karanlık odaya geçildi ve oto radyografi için, blot bir film ile birlikte kasete kondu. Daha sonra bu kaset- 70 C'de 2 gün bekletildikten sonra, film banyo edildi.

SONUÇLAR

HÜCRE KÜLTÜRÜ ÇALIŞMALARI

Ana hücre hattı, CCRF/CEM hücreleri değişik doz ve aralıklarla Mtx.'a maruz bırakılarak, bu ana hattan üç değişik tür hücre alt grubu elde edildi. Bu alt gruplar Mtx'a gösterdikleri direnç miktarına ve mekanizmasına göre, sırasıyla DHFR artışı gösteren CEM/R; transport defektif, CEM/T; poliglutamilasyon defektif CEM/P olarak isimlendirildi. Bu hücre alt gruplarının büyüme özellikleri, ana hücre hattı, CEM/S ile karşılaştırıldıklarında, farklı olarak bulundu.

CCRF/CEM HÜCRE HATLARI BÜYÜME HIZLARI



Yine bu alt grupların bölünme hızları, büyüme kürvlerinden hesaplandığında farklı olarak bulundu.

CCRF/CEM HÜCRELERİ

BÖLÜNME HIZLARI

CEM/S : 15 SAAT

CEM/T : 25 SAAT

CEM/R : 22 SAAT

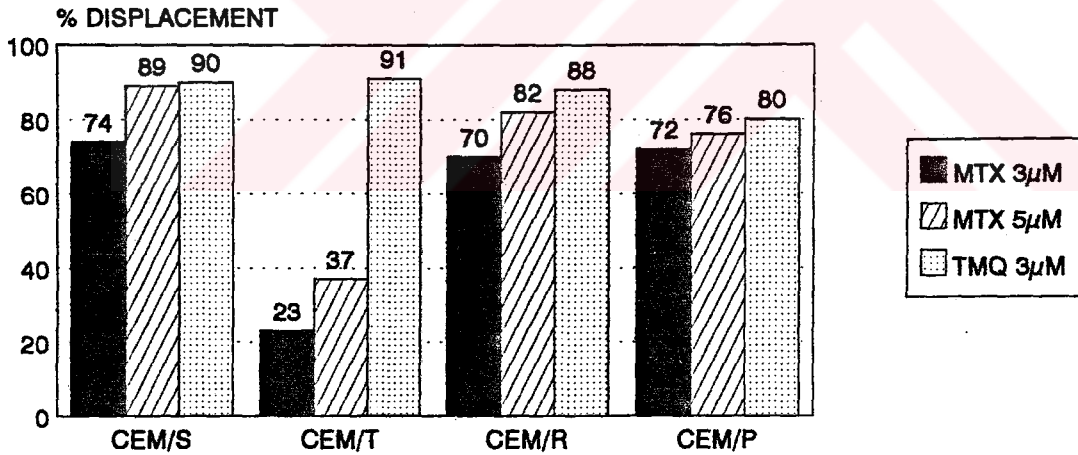
CEM/P : 13 SAAT

TRANSPORT ÇALIŞMALARI

PT-430 kullanılarak yapılan transport çalışmalarında, her hücre alt grubunda ve ana hücre hattında MTX'in değişik oranlarda yer değiştirmeye yol açtığı görüldü. CEM/S, CEM/R ve CEM/P hücreleri çalışıldığında, iki değişik konsantrasyonda (3 ve 5 uM) kullanılan MTX yüksek oranlarda yer değişimine yol açtı. CEM/T hücreleri çalışıldığında ise, bu yer değişiminin %50 altında kaldığı görüldü. Yer değiştirme oranları, CEM/S, CEM/R, CEM/P ve CEM/T hücreleri

için sırasıyla, 3 μ M MTX konsantrasyonunda, %74; %70; %72 ve %28 olarak, 5 μ M MTX konsantrasyonunda ise, %89; %82; %76 ve %37 olarak saptandı. Çalışmanın doğruluğunu ve olayın tamamiyle transporta dayalı olduğunu göstermek amacıyla, transportu basit diffüzyona bağlı olan, bir nonklasik antifolat, Trimetrexate kullanıldı. 3 μ M konsantrasyonunda kullanılan Trimetrexate (TMQ) ile tüm hücre hatlarında %80 üzerinde değiştirme olduğu saptandı.

CCRF/CEM HÜCRE HATTI TRANSPORT ÇALIŞMALARI

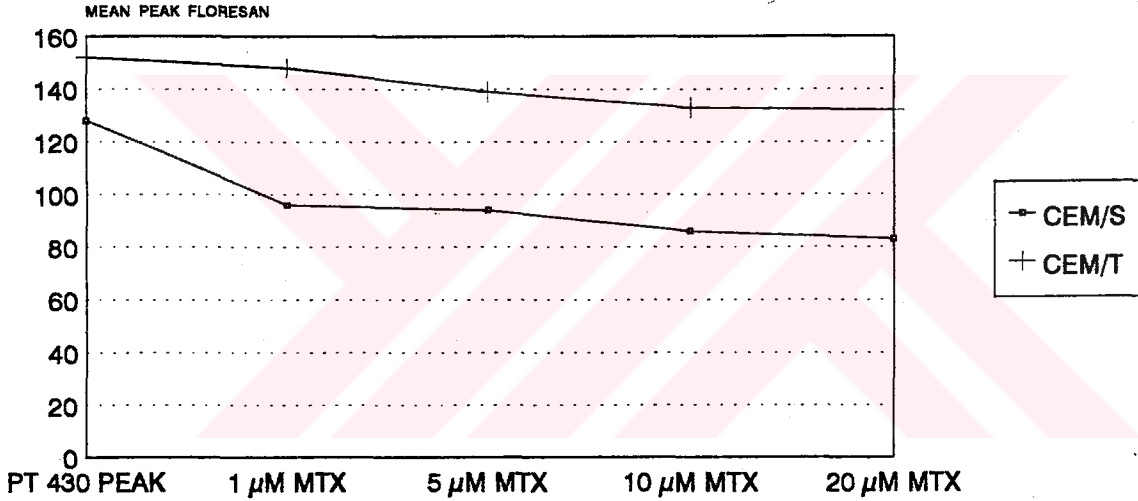


PT 430 DISPLACEMENT

Bir diğer çalışmada, CEM/S ve CEM/T hücreleri arasındaki transport farkı, MTX konsantrasyonu artırılarak gösterilmeye çalışıldı. 20uM MTX konsantrasyonlarında dahi CEM/T hücrelerinde yeterli yer değişimi gerçekleşmedi.

MTX TRANSPORTU

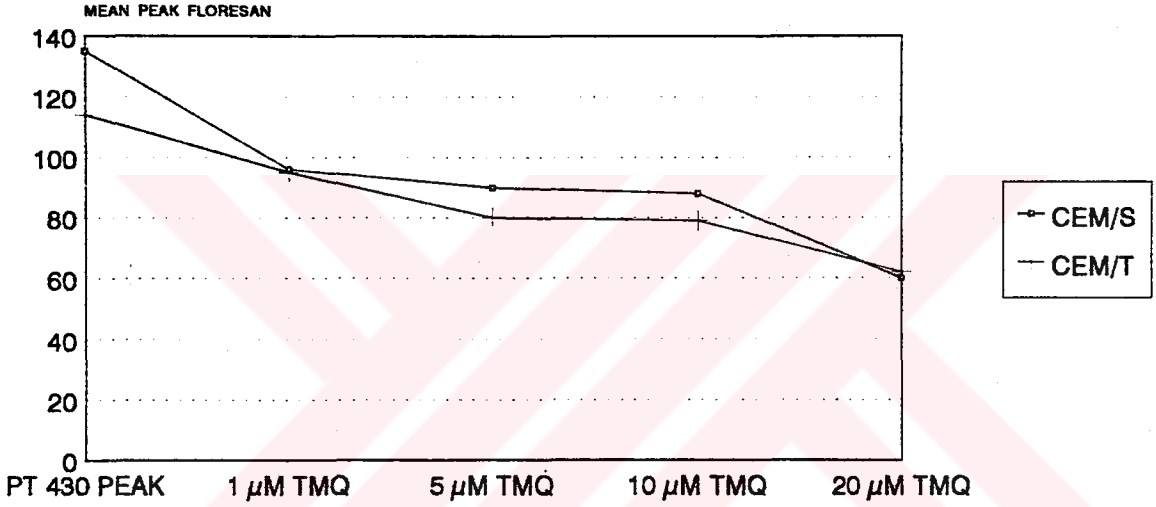
SENSITIF VE TRANSPORT DEFEKTIF HÜCRELER



Aynı tür çalışma, yine CEM/S ve CEM/T hücreleri ile, Trimetrexate kullanılarak yapıldığında yer değiştirmenin her iki grup hücrede de aynı oranlarda gerçekleştiği görüldü.

TRIMETREXATE TRANSPORTU

SENSITIF VE TRANSPORT DEFEKTIF HÜCRELER

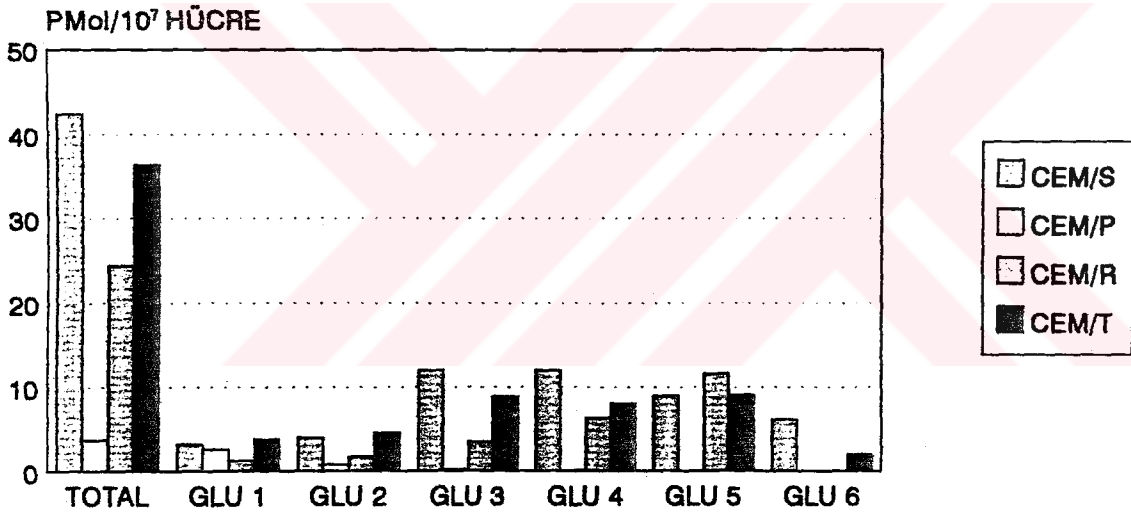


POLİGLUTAMİLASYON ÇALIŞMALARI

Ana hücre hattı, CEM/s ve 3 alt grup hücre MTX'i poliglutamilleye-bilme kapasiteleri yönünden çalışıldı. CEM/S hücreleri, 10uM konsantrasyonundaki MTX ile inkübe edildiklerinde, MTX'a hızla glutamatları ekleyebilmekte ve 24 saat inkübasyon sonunda hücre

içinde yüksek oranda MTX poliglutamatları bulunmaktadır. Oysa aynı deney CEM/P hücreleri kullanılarak yapıldığında, hücre içi MTX poliglutamatlarının son derece düşük oranlarda bulunduğu saptanmıştır.

CCRF/CEM HÜCRE HATTI MTX POLİGLUTAMATLARI



CEM/S hücrelerinde MTX'a 6 adet glutamat eklendiği halde, CEM/P hücrelerinde en fazla 3 glutamat eklenebilmekte ve hücre içi total MX konsantrasyonu da düşük olarak bulunmaktadır. Diğer 2 alt grupta, CEM/R ve CEM/T hücrelerinde ana hücre hattına benzer poliglutamilasyon gerçekleşebilmektedir.

DIHİDROFOLAT REDUKTAZ AKTİVİTESİ

Ana hücre hattı CEM/S ve diğer 3 alt grup hücrelerde DHFR aktivitesi ölçüldü. CEM/R hücre hattındaki DHFR aktivitesi ana hücre hattından 20 kat fazla olarak saptandı. Diğer alt grup hücrelerde ise DHFR aktivitesi sensitif hücrelere oranla azalmış olarak bulundu.

CCRF/CEM HÜCRE HATLARI DHFR AKTİVİTESİ

HÜCRE HATTI	AKTİVİTE (mU/ml)	PROTEİN (mg/ml)	SPESİFİK AKTİVİTE (mU/mg)
CEM/S	4.8 ± %50	3.5 ± 0.1	1.37 ± 0.72
CEM/R	140 ± %7	11 ± 0.3	12.73 ± 0.98
CEM/T	6.1 ± %50	10 ± 0.6	0.61 ± 0.34
CEM/P	5.2 ± %50	8.7 ± 0.4	0.6 ± 0.33

SOUTHERN BLOT ANALİZİ

Ana hücre hattı CEM/S ve diğer 3 alt grup hücreden elde edilen DNA'lar kullanılarak yapılan southern blotun otoradyografik analizinde, CEM/R hücrelerinin DHFR gen amplifikasyonu gösterdikleri saptandı.



Şekildeki iki ayrı grup restriksiyon patterni ECOR I ve HIND III endonükleazları kullanılarak elde edilmiştir.

T A R T I Ő M A

Hücre kültürleri çalışmalarıyla herhangi bir antikanser ilacın etkisinin varlığını araştırmak kadar, etkin olduğu bilinen bir ilaca karşı ne tür direncin gelişebileceğini bulmak, ucuz ve kolay bir yöntem olarak görünmektedir. Kuşkusuz, hücre kültürlerini oluşturmak ve bunların sürekliliğini sağlamak için geniş ve güçlü bir teknik destek gerekmektedir. Sterilite ve uygun inkübatörlerin sağlanması bu tür çalışmaların temelini oluşturmaktadır. Bir diğer önemli nokta ise, teknik hizmet ve malzemenin teminindeki sürekliliktir. Hangi tür olursa olsun, bir hücre kültürünün devamlılığı, bu hizmet akışının devamlılığı ile mümkündür.

Doku kültürü laboratuvarlarındaki bakterial bulaş, disposable malzeme kullanımı ve steril ortamı sağlayan "hood"lar sayesinde sorun olmaktan çıkmıştır. Çalışmada kullanılan hücre hatları için hiç bir antibiyotik, besi yerlerine profilaktik olarak eklenmemiştir. Buna karşılık hiç bir bakterial enfeksiyon görülmemiştir. Öte yandan karşımıza başka bir sorun çıkmıştır; Mycoplasma bulaşı, Bu nedenle sürekli mikrobiyolojik inceleme gerekliliğini sürdürmüştür. Herhangi bir kültür şişesinde Mycoplasma'nın varlığı saptandığında, o şişe derhal atılarak, enfeksiyonun yayılımı önlenmeye çalışılmıştır.

Klinikte aynı kemoterapötik, aynı hastada, değişik zamanlarda değişik yanıtların ortaya çıkmasına yol açabilmektedir. Bunun en tipik örneği, MTX kullanılarak remizyona sokulan bir hastada relaps geliştiğinde tekrar MTX verilecek olursa ya cevap çok azalmakta ya da hiç ortaya çıkmamaktadır. Bunun nedeni olarak, MTX'a karşı tümör hücrelerinin geliştirdiği dirençtir. MTX, üzerinde en çok çalışılan ve etki mekanizmaları çok iyi bilinen bir antikanser ilaçtır. Etki mekanizmalarından yola çıkılarak, tümör hücrelerinde bu ilaca karşı gelişebilecek resistans mekanizmaları bulunabilir. In vivo sisteme benzer bir sistemi in vitro kurmak hücre kültürleri ile mümkün olmaktadır. Çalışmada bir lösemik hücre hattının seçilmesinin nedeni, hem MTX'in akut lösemilerde anahtar ilaç olarak kullanılması hem de hücre hattının teminindeki ve çalışılmasındaki kolaylıktır. Diğer tip doku kültürlerinde, hücreler tüp yüzeyine yapışarak büyüdüklerinden, hücreleri tek tek sağlıklı şekilde ayırmak çok güç olmaktadır. Oysa lösemik hücreler solüsyon içinde, suspansiyon halinde büyümektedirler. Bu nedenle sayımları ve ayrıştırılmaları için, kollagenaz veya DNA az gibi ek maddelere gerek göstermemektedirler. Dolayısıyla, bu hücrelerin manuplasyonu daha kolay olmaktadır. Bu hücre hattının seçilmesindeki bir diğer neden ise, halen yürütmekte bulunduğumuz klinik çalışmalar için de uygun bir örnek sistem oluşturmalarıdır.

Hücrelerin büyüme ve bölünme hızları "Coulter Counter"da sayılarak hesaplandı. Her sayım, Thoma lamında manuel sayımla bir kez daha kontrol edildi. Sonuçlar kısmındaki büyüme grafiğinde de görüldüğü gibi, hücreler kısa bir duraklama (lag) döneminden sonra

hızla bölünmeye başlamakta ve logaritmik çoğalma göstermektedirler. Bu hücreler aynı ortamda, ek besiyeri eklenmeden tutulacak olurlarsa, bir süre sonra bölünme durarak, plato fazına ulaşmaktadır. Bu fazdan sonra, besinsizlik ve ortamdaki toksik ürünler nedeniyle hücreler ölmeye başlamakta ve sayıları giderek azalmaktadır. In vivo tümöral bir kitle göz önüne getirilecek olursa, bu fazların hepsinin geliştiği görülebilir. Son dönemde görülen azalma, tümör dokusunun nekrozu olarak algılanabilir.

Hücreler değişik doz ve sürelerde MTX ile muamele edildiler. Bundan amaç hem klinik olgularla eşgüdüm sağlamak, hem de değişik türlerde resistansın gelişimini sağlamaktır. Sonuçta, 3 değişik türde büyüme ve bölünme özellikleri gösteren hücre grupları elde edildi. Ana hücre hüttı, CEM/S hücrelerine göre, elde edilen ve MTX'a değişik düzeylerde resistan gösteren bu hücrelerin, bölünme hızları daha yavaş olarak bulundu. Bunun nedenini MTX etkisiyle açıklamak kısmen mümkündür. MTX özellikle purin biyosentezini engellediğinden, hücrelerde bir takım megaloblastik değişikliklerin gelişmesi beklenmektedir. Yani DNA sentezinin yavaşlamasına karşın, RNA ve protein sentezi kısmen normal olarak sürmekte bir süre sonra RNA/DNA oranı giderek artmaktadır. Hücreler büyüyüp gelişmekte, ancak mitozaya gidememektedirler (Bulgular gösterilmedi). Öte yandan, daha önce yapılan bir çalışmada, 10^{-8} M konsantrasyonundaki MTX'in, CEM hücrelerinde DNA sentezini yavaşlattığı ve hücrelerin çoğunun G_1/G_2 fazında birikme gösterdikleri oysa 10^{-4} M konsantrasyonundaki MTX'in ise hücrelerin G_0 fazında toplanmalarına yol açtığı gösterilmiştir. Elde edilen bu alt grup hücreler, MTX'in sitotoksik etkisine, değişik düzeylerde direnç göstermekte ve MTX içeren ortamlarda da büyüme ve bölünmelerini sürdürmekte-

dirler. Bu hücreler MTX içermeyen ortamlara nakledildiklerinde da-
hi kendilerine özgü büyüme ve gelişme patternlerini sürdürmekte-
dirler. Daha önce, başka hücre hatlarıyla yapılan çalışmalarda,
MTX'a direnç gösteren hücrelerin, bu dirençlerini kaybetme zamanı
yaklaşık 6 ay olarak bulunmuştur. Bizim gözlemlerimize göre, ör-
neğin DHFR aktivite artışı ve gen amplifikasyonu yoluyla MTX'a
resistans gösteren CEM/R hücrelerindeki bu resistans, yaklaşık 60-
100 normal media pasajından sonra azalmaya başlamaktadır (yayın-
lanmamış gözlem). Bunun nedeni, DHFR gen amplifikasyonunun Double
Minute Kromozom ile değil, Kromozom 5'i Homogen Boyanma Gösteren
Bölgesi (HSR) ile yavru hücrelere iletilmesidir (yayınlanmamış
bulgular). Bu iletimin daha stabil olduğu sanılmaktadır.

Teorik olarak MTX resistansında transport defektlerinin
önemli rolünün olabileceği düşünülmektedir. Canlılığını koruyan
hücrelerde transport çalışmalarını yapmak, metodolojik olarak ol-
dukça güçtür. Tüm klasik yöntemlerde, radyoaktif madde kullanımı-
nın gerekliliği bu yöntemleri istenmez hale getirmektedir. Öte
yandan klasik transport çalışmaları için çok sayıda hücreye ge-
reksinim vardır ve bu çoğu kez klinik örnekler için olanaksız
olmaktadır. Bu nedenle geliştirilen flow sitometrik yöntem, umut
verici olarak görünmektedir. Yöntemin avantajları, metodolojisinin
nispeten kolay olması, nonradyoaktif olması, çok sayıda hücreye
gerek göstermemesi ve klinik örnekler için doğru populasyonun ay-
rılmasını sağlamasıdır. Bu çalışmalarda kullanılan floresan madde,
PT-430, MTX'in bir lizin analogudur. Ancak hücre içi metabolizması
MTX'dan tamamiyle farklı olup, hücre içinde hiç bir değişime veya

poliglutamilasyona uğramamaktadır. DHFR'a bağlanması hemen hemen MTX ile eş kuvvettedir. Bu nedenle PT-430, MTX veya diğer anti-folatlarla yer değişimi çalışmaları için ideal olmaktadır. Elde edilen 3 rezistan ve ana hücre hattında yapılan çalışmalarda farklı yer değiştirme oranları saptanmıştır. Özellikle, transport defektif CEM/T hücrelerinde, MTX, artırılan dozlara karşın, hücre içine girip, PT-430'un yer değişimine yol açamamaktadır. Buna karşılık, pasif diffüzyonla hücre içine girebilen Trimetrexate yeterli yer değişimini sağlayabilmektedir. Bu deneylerden anlaşılan, MTX transportu tamamiyle bir taşıyıcı proteinin varlığına bağlıdır ve bu protein CEM/T hücrelerinde fonksiyon görememekte yada bulunmamaktadır.

Bir diğer alt grupta, CEM/P hücrelerinde ise rezistans mekanizması olarak. MTX'in önemli hücre içi metabolizması olan poliglutamillenmenin defektif olduğu saptanmıştır. Sensitif hücrelerde, MTX'a hücre içinde hızla 6 veya daha fazla glutamat eklenirken, bu defektif hücrelerde poliglutamilasyon, hem yavaş hem de etkisiz olarak gelişmektedir. Bunun sonucunda intrasellüler MTX konsantrasyonunun sürekli düşük kalmasının yanısıra, glutamilasyona uğramamış MTX'in inhibitif etkisi de düşmekte ve hücreler MTX'a rezistan hale gelmektedir. Poliglutamilasyondan sorumlu enzim, Folil poliglutamil sentetaz (FPGS) miktarının bu hücrelerde azalması veya MTX'a olan affinitesinin değişmesi defektif poliglutamilasyona yol açabilmektedir.

Elde edilen son rezistan hücre alt grubunda ise, rezistans mekanizması olarak, DHFR enzim aktivitesinin artması ve gen amplifikasyonunun varlığı belirlendi. Artmış DHFR yani target

enzim, hücrenin gereksinim gösterdiği redükte folatları yeterince sağlayabilmektedir. Ne yazık ki, klinik örneklerde enzim çalışmalarını yapmak, oldukça güç olmaktadır. Yöntem, basit olmakla birlikte, doğru sonuçlar için çok sayıda hücreye gerek bulunmaktadır. Artmış enzim aktivitesinin nedeni olarak, DHFR gen amplifikasyonu bulunmuştur. Gerek CEM/R hücrelerinde gerekse bazı klinik örneklerde DHFR gen amplifikasyonu gösterilmiştir.

Methotrexate, üzerinde uzun yıllar çalışılmış ve etkileri ile yan etkileri iyi bilinen bir kemoterapiktir. Etkisiz olduğu durumların tanımlanması ve bunun nedenlerinin açıklanması kemoterapistlere ışık tutacaktır. Ayrıca bu çalışmalar, yeni kullanım yöntemlerinin ve biokimyasal modülasyonun gelişmesini sağlayacaktır.

Ö Z E T

Kanser tedavisinde seçkin bir ilaç olan Methotrexate (MTX) zaman zaman klinikte etkisiz kalabilmektedir. Bunun nedeni olarak, MTX'a karşı gelişen çeşitli direnç mekanizmaları öne sürülmüştür. Teorik düzeyde bu mekanizmalar, transport ve poliglutamilasyon defektleri, target enzim (DHFR) artış veya mutasyonu ile DHFR gen amplikasyonu olarak sınıflandırılmaktadır. Bu bilgi göz-önüne alınarak, bir insan lösemi hattı olan CCRF/CEM hücreleri model olarak kullanıldı. DHFR mutasyonu dışındaki tüm mekanizmalar, klasik veya yeni geliştirilen farmakolojik ve moleküler biyoloji yöntemleri kullanılarak değişik doz ve şekillerde MTX ile inkübe edilen ana hücrelerden bir süre sonra değişik büyüme ve gelişme patterni gösteren dirençli hücreler elde edildi. Her grup hücrede, direnç mekanizmaları araştırıldı.

Buna göre 3 tür hücre hattı, ana hücre hattından farklı özellikler gösterdi. Bunlardaki direnç mekanizması tanımlandı. Geliştirilen farmakolojik yöntemlerin geçerliliği saptandı ve klinik örnekler için de kullanılabileceği gösterildi.

K A Y N A K L A R

- 1- Henderson ES, Lister TA (Eds) Leukemia 5th Edition Saunders, Philadelphia, 1990.
- 2- De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA (Eds) Cancer Principles and Practice of Oncology Lippincott, Philadelphia, 1989.
- 3- Trippett T, Lin JT, et al. Personal Communication.
- 4- Farber S, Diamond LK, Mercer RD et al N Engl J Med 238:787, 1948.
- 5- Chabner BA, Collins JM (Eds) Cancer Chemotherapy Lippincott, Philadelphia, 1990.
- 6- Gilman AG, Goodman LS, Rall TW et al (Eds) The pharmacologic Basis of theapeutics Mac Millan Publishing Co, New York, 1985.
- 7- Matherly LH, Barlowe CK, Philips VH et al J Biol Chem 262:710, 1987.
- 8- Allegra CJ, Hoang K, Yeh GC et al J Biol Chem 262:13520, 1987.
- 9- Allegra CJ, Drake JC, Jolivet J et al Proc Natl Acad Sci USA 82:4881, 1985.
- 10- Baggot JE, Jaugh WH, Hudson BB Biochem J 236:193, 1986.
- 11- Allegra CJ, Chabner BA, Drake JC et al J Biol Chem 260:9720, 1985.
- 12- Baram J, Allegra CJ, Fine DL et al J Clin Invest 79:692, 1987.
- 13- Williams JW, Duggleby RG et al Biochem Pharmacol 29:589, 1980.
- 14- Werkheiser WC Cancer Res 23:1277, 1963.
- 15- Trippett T, Schlemmer S, Elisseyeff Y, Göker E et al (Submitted)

- 16- Galivan J Cancer Res 39:735, 1979.
- 17- Henderson GB and Zevely EM J Biol Chem 259:4558, 1984.
- 18- Henderson GB and Zevely EM Biochem Biophys Res Commun 104:474, 1982.
- 19- Henderson GB and Zevely EM Biochem Int 4:493, 1982.
- 20- Henderson GB, Tsuji JM, Kumar H Biochem Pharmacol 36:3007, 1987.
- 21- Goldman ID Biochim Biophys Acta 233:624, 1971.
- 22- Sirotnak FM and Donsbach RC Cancer Res 36:1151, 1976.
- 23- Goldman ID, Lichtenstein NT and Oliverio VT J Biol Chem 243:5007, 1968.
- 24- Kane MA, Portillo RM, Elwood PC et al J Biol Chem 261:44, 1986.
- 25- Anthony AC, Kane RA, Portillo RM et al J Biol Chem 260:14911, 1985.
- 26- Kamen Ba and Capdevila A Proc Natl Acad Sci USA 83:5983, 1986.
- 27- Elwood PC J Biol Chem 264:14893, 1989.
- 28- Chello PL, Sirotnak FM and Dorick DM Mol Pharmacol 18:274, 1980.
- 29- Coriun RE, Haspel RC and Sonenberg M J Biol Chem 259:206, 1984.
- 30- Sirotnak FM, Moccio DM and Yang CH Cancer Res 44:5204, 1984.
- 31- Knight CB, Elwood PC and Chabner BA Adv Enzymol (In Press)
- 32- Warren RD, Nichols AP and Bender RA Cancer Res 38:668, 1978.
- 33- Hill BT, Bailey BD, White JC Cancer Res 39:2440, 1979.
- 34- Henderson GB and Zevely M J Biol Chem 259:1526, 1984.
- 35- Koizumi S, Curt GA, Fine RL J Clin Invest 75:1008, 1985.
- 36- Rosenblatt DS, Whitehead VM, Dupont MM Mol Pharmacol 14:210, 1978.

37. Jolivet J, Schilski RL, Bailey BD J Clin Invest 70:351, 1982
38. Clarke L and Waxman DJ Arch Biochem Biophys 256:585, 1987
39. Jolivet J and Chabner BA J Clin Invest 72:773, 1983
40. Winick NJ, Kamen BA, Ballis FM Cancer Drug Deliver 4:25, 1987
41. Gewirtz DA, White JC, Randolph JK Cancer Res 39:2914, 1979
42. Galivan J, Nimec Z, Balinska M Biochem Pharmacol 32:3244, 1983
43. Kisliuk RL, Brown GM (Eds) Chemistry and Biology of
Peteridines, Elsevier, New York, 1978
44. George S, Cichowicz and Shane B Biochemistry 26:522, 1987
45. Fry DW, Yalowich jc and Goldman ID J Biol Chem 259:257 1982
46. Galivan J, Johnson T, Rhee M Adv Enzymol 26:147, 1987
47. Balinska M, Galivan J and Coward JK Cancer Res 41:2751, 1981
48. Nimec Z and Galivan J Arch Biochem Biophys 226:671, 1983
49. Galivan J Pupous A and Rhee MS Cancer Res 46:670, 1986
50. Jolivet J, Cole DE, Holcenberg JS, Poplack DG Cancer Res
45:217, 1985
51. Sur P, Fernande DJ, Kute TE Cancer Res 47:1313, 1987
52. Fabre I, Fabre Gand Goldman ID Cancer Res 44:3190 1984
53. Allegra CJ, Drake CJ, Jolivet J Praeger Publishers, New York,
1985
54. Gupta SV, Greenfield NJ, Poe M Biochemistry 16:3073, 1977
55. Matyhews DA, Bolin JT, Burr ridge JM J Biol Chem 260:392, 1985
56. Gready JA Nature 282:674, 1979
57. Stone SR and Morrison JF Biochem Biophys Acta 869:275 1986
58. Price EM, Smith PE, Klein TE Biochemistry 26: 4751, 1987
59. Galivan J Mol Pharmacol 17:105, 1985