

Telomeraz İnhibitörü BIBR1532, Akut Lenfoblastik Lösemi Hücrelerinde CDH13, DAPK1, NR4A3 Genlerinin Ekspresyonunu Artırır ve Apoptozu Uyarır

Telomerase Inhibitor BIBR1532 Increases the Expression of CDH13, DAPK1, NR4A3 Genes in Acute Lymphoblastic Leukemia Cells and Induced Apoptosis

Neslihan Pınar ÖZATEŞ AY¹, Bakiye GÖKER BAĞCA¹, Fatma DOĞAN¹,
Cumhur GÜNDÜZ¹, Güray SAYDAM², Çığır BİRAY AVCI¹

¹ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

² Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, İzmir, Türkiye

ÖZET

Amaç: Akut lenfoblastik lösemi (ALL), kemik iliği veya diğer lenfoid dokulardaki lenfoid progenitor hücrelerin farklılaşma ve çoğalma anomalilerinden kaynaklanan hematolojik malignitedir. Telomeraz inhibitörleri çoğalmayı ve büyümeyi önleyen bir diğer önemli antikanser ajanlardır. BIBR1532, keşfedildiği günden beri, oldukça etkili bir hTERT inhibitörü olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, BIBR1532'nin yetişkin akut lenfoblastik lösemi hücre hattı olan CCRF-CEM üzerindeki sitotoksik etkisinin kontrol grubuyla kıyaslanarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

Hastalar ve Yöntem: BIBR1532'nin CCRF-CEM hücre hattı üzerindeki etkisi WST-1 analizi ile belirlenmiştir. Apoptozun belirlenmesinde Annexin V yöntemi kullanılmıştır. Gen ekspresyon değişiklikleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile belirlenmiştir.

Bulgular: BIBR1532'nin CCRF-CEM hücre hattı üzerindeki IC₅₀ dozu 48 saat sonunda 89 µM olarak belirlenmiştir. Aynı zamanda apoptozu kontrole göre %7 artırdığı ve CDH13, DAPK1 ve NR4A3 genlerinin ekspresyon seviyelerinde belirgin bir artışa sebep olduğu belirlenmiştir.

Sonuç: Sonuç olarak elde ettiğimiz bulgulara göre ALL tedavisinde telomeraz inhibitörü BIBR1532 kullanımı, telomeraz aktivitesini düşürebileceği gibi apoptotik hücre ölümünü de uyarabilir. Ayrıca bu yolla görevli genlerin anlamlı ekspresyon değişikliğinin olması hastalığın moleküler patolojisinin aydınlatılmasına ve alternatif tedavi hedefi olabilecek genlerin belirlenmesine katkı sağlayabilir.

Anahtar Sözcükler: Akut lenfoblastik lösemi (ALL); BIBR1532; CDH13; DAPK1; NR4A1

ABSTRACT

Objective: Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is hematologic malignancy resulting from differentiation and proliferative anomalies of lymphoid progenitor cells in bone marrow or other lymphoid tissues. Telomerase inhibitors are other important anticancer agents that prevent proliferation and growth. Since it was discovered, BIBR1532 has been used as a highly effective hTERT inhibitor. In this study, it was aimed to determine the cytotoxic effect of BIBR1532 on adult acute lymphoblastic leukemia cell line CCRF-CEM compared with the control group.

Yazışma Adresi

Araş. Gör. Neslihan Pınar ÖZATEŞ AY

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji
Anabilim Dalı, İzmir-Türkiye

Geliş: 06.12.2017 - Kabul: 20.12.2017

E-posta: npozates@gmail.com

Patients and Methods: The cytotoxic effect of BIBR 1532 on the CCRF-CEM cell line was determined by WST-1 assay. Annexin V method was used in determination of apoptosis. Gene expression changes were determined by real-time PCR.

Results: The IC₅₀ dose on the CCRF-CEM cell line of BIBR1532 was determined to be 89 uM for 48 hours. It has also been determined that the IC₅₀ dose increases apoptosis 7% relative to control, and cause a marked increase in expression levels of CDH13, DAPK1 and NR4A3.

Conclusion: According to our findings in conclusion, the use of telomerase inhibitor BIBR1532 in ALL treatment may decrease telomerase activity as well as induce apoptotic cell death. In addition, the presence of significant expression changes in genes acting in this pathway may contribute to elucidation the molecular pathology of the disease and the identification of genes that may be alternative therapeutic targets.

Key Words: Acute lymphoblastic leukemia (ALL); BIBR1532; CDH13; DAPK1; NR4A1

GİRİŞ

Akut lenfoblastik lösemi (ALL), lenfoid öncü hücrelerin farklılaşma ve proliferasyon özelliklerinin bozulması sonucu kemik iliği ve/veya ekstremiteler bölgelerinde birikimi ile gelişen hematolojik bir kanserdir. Ağırlıklı olarak çocuklarda görülmesine rağmen, yetişkin ALL'de tedavi daha zordur (1). Belirli genetik alt tiplerin sıklığı çocuklarda ve yetişkinlerde farklı olmasına rağmen, ALL gelişiminin altında yatan genel mekanizmalar benzerdir. Bu mekanizmalar; onkogenlerin aktivasyonu, aktif kinaz veya mutant transkripsiyon faktörlerinin oluşumundan sorumlu füzyon genlerin oluşumuna sebep olan kromozomal translokasyonlar ve hiperdiploidi durumlarıdır. Bu genetik değişiklikler, hematopoietik kök hücrelerin veya öncülerinin hücre fonksiyonlarını değiştirerek lösemik transformasyona katkıda bulunur. Sınırsız kendini yenileme kapasitesini koruyarak veya artırarak, normal çoğalmanın kontrollerini yıkarak, farklılaşmayı önleyerek ve ölüm sinyallerine direnci artırarak kilit düzenleyici mekanizmaları değiştirir (2). Ayrıca promotör hipermetilasyonu ile tümör baskılayıcı genlerin epigenetik olarak susturulması da lökemogenezde erken dönemde ortaya çıkan önemli bir mekanizmadır ve kötü ALL prognozu ile ilişkilendirilmiştir. Özellikle, ALL'de epigenetik olarak susturulduğu belirlenen, tümör invazyonunu, büyüme düzenini ve apoptozu düzenleyen CDH1, p73, p16, p15, p57, NES-1, DKK-3, CDH13, p14, TMS-1, APAF-1, DAPK, PARKIN, LATS-1 ve PTEN gibi genler tedaviden sonra nüksün sebebi olabilir ve genel sağkalımı etkileyebilir (3). CDH13 (H-kaderin ve T-kaderin olarak da bilinir), 16q24'de lokalize olan kederin geni süper ailesinin bir üyesidir. CDH13'ün tümör baskılayıcı bir gen olarak işlev görebileceği birçok kanser türünde in vitro ve in vivo çalışmalarla gösterilmiştir. Ayrıca meme ve akciğer kanserlerinde, pituitar adenomlarda, diffüz büyük B hücreli lenfomada, nazofarengeal ve kütanöz skuamöz hücreli karsinomlarda CDH13 hipermetilasyonu varlığı belirlenmiştir (4). DAPK1, Ca²⁺/kalmodulin bağımlı, sitoiskelet ilişkili bir protein kinazdır. DAPK'nin, p53 aracılı apoptoz yolunun aktivasyonu ile integrinleri içeriden ve dışarıdan inaktive ederek hücre di-

şından gelen sağkalım sinyallerinin bastırılmasını sağladığı yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Bazı çalışmalarda, DAPK ekspresyonunun kaybedilmesinin veya DAPK'nin promotör bölgesindeki CGI metilasyonunun yüksek oranda invaziv ya da metastatik tümörlerin karakteristik özelliği olabileceği ileri sürülmüştür. Ayrıca farklı çalışmalarda, B hücreli lenfoma hücre hatlarında DAPK genine ait RNA veya protein ekspresyonunun azaldığı veya olmadığı belirtilmiştir (5). NR4A1 (Nur77), NR4A2 (Nurr1) ve NR4A3 (NOR-1) Nur77 ailesine üye nükleer orfan reseptörlerdir. NR4A1, NR4A2 ve NR4A3 iskelet kası, yağ dokusu, kalp, böbrek, karaciğer ve beyin gibi değişik doku tiplerinde ve T lenfositlerde yaygın şekilde eksprese edilir (6).

ALL için standart tedavi rejimlerinde kullanılan çoğu ilaç 30 yıldan fazla bir süre önce geliştirilmiştir ve en yeni tedavi prosedürleri purin nükleotid analogları, monoklonal antikorlar, antikor ilaç konjugatları, mTOR inhibitörleri, proteazom inhibitörleri, histon deasetilaz (HDAC) inhibitörleri, hipometilasyon ajanları, dalak ilişkili tirozin kinaz (SYK) inhibitörleri, JAK-STAT inhibitörleri, anti-programlanmış hücre ölüm proteini (anti-PD-1) antikorları, poli (ADP-riboz) polimeraz (PARP) inhibitörleri ve FMS benzeri tirozin kinaz 3 (FLT3) inhibitörleri gibi ilaçların farklı kombinasyonlarını içeren protokollerdir (7).

Telomeraz, telomerik DNA'nın uzatılması için şablon olarak kullanılan bir RNA bileşeninden ve ters transkriptazdan (insanlarda hTERT) oluşan bir enzimdir (8). BIBR1532, keşfedildiği günden beri hTERT'nin etkili bir inhibitörü olarak kullanılmaktadır. Bu peptidik ve nükleozidik olmayan sentetik bileşik, telomerazdaki bir bölgeye bağlanarak deoksiribonükleotidlere ve DNA primerine ulaşımını engeller. Böylece nükleotid polimerizasyonu sırasında bir zincir sonlandırıcı görevi görür ve telomerazın katalitik aktivitesini doza bağımlı şekilde baskılar (9).

Telomeraz aktivasyonu kanserin özelliklerinden biridir ve enzim aktivitesinin inhibisyonu kanserle mücadele için etkili bir araç olabilir. Bu çalışmamızda BIBR1532'nin in vitro

ALL hücre hattı CCRF-CEM üzerindeki etkilerinin belirlenmesi, etkinin altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılması ve terapötik etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

HASTALAR ve YÖNTEM

Hücre Hatlarının Elde Edilmesi ve Kültürü

Çalışma, American Type Culture Collection (ATCC)'den temin edilen yetişkin B hücreli ALL (CCRF-CEM) hücre hattı üzerinde yürütülmüştür. Hücreler 25 mL'lik flasklarda, %10 FBS (Bio.Ind), %1 2 mM L-Glutamin (Bio.Ind) ve %1 penisilin-streptomisin (Bio.Ind) içeren RPMI-1640 (Bio.Ind) ortamında, %95 nem, %5 CO₂ içeren 37°C etüvde inkübe edilmiştir. Hücre canlılığının ve proliferasyonunun kontrolü Tripkan Blue (Bio.Ind) boyama testi ile gerçekleştirilmiştir.

Sitoksisite Analizi

BIBR1532 etken maddesinin CCRF-CEM hücre hattı üzerindeki doz ve zamana bağlı sitotoksik etkisi, WST-1 (Roche) analiziyle belirlenmiştir. 96 kuyucuklu plakaya 106 hücre/mL yoğunluğunda ekilen hücrelere 24, 48 ve 72. saatlerin sonunda ölçüm yapılmak üzere, üç tekrarlı olarak, 1 µM ile 200 µM arasında değişen konsantrasyonlarda BIBR1532 uygulanmıştır. İlaç uygulanmayan hücreler kontrol grubu olarak kullanılmıştır. 24, 48 ve 72. saatlerin sonunda, WST-1'in canlı hücrelerde mitokondri solunum sistemi tarafından glikolitik NAD(P)H üretimine bağlı oluşturduğu formazan boya değişimi "Multiskan FC microp-plate" cihazı ile kantitatif olarak ölçülmüştür. BIBR1532'nin CCRF-CEM hücreleri üzerindeki IC₅₀ dozu CalcuSyn Version 2.0 yazılımı ile zaman ve doza bağlı olarak hesaplanmıştır.

Apoptozun Flow Sitometri ile Belirlenmesi

BIBR1532'nin hücre hattı üzerindeki apoptotik etkisi, apoptotik yıkımın bir belirteci olan DNA fragmentasyonu-

nu, fosfatidilserin translokasyonunun tespiti ile gösteren Annexin V-FITC (BD Pharmingen) yöntemi ile belirlenmiştir. Hücreler 6 kuyucuklu plaklara 10⁵ hücre/mL konsantrasyonda ekilmiştir ve 48 saat süresince BIBR1532'nin IC₅₀ dozu ile muamale edilmiştir. Sonuçlar, BD Accuri C6 Flow Cytometer (BD Biosciences) cihazı kullanılarak ilaç uygulanmayan kontrol gruplarına göre değerlendirilmiştir.

Total RNA İzolasyonu, cDNA (Komplementer DNA) Sentezi ve Gen Ekspresyon Değişimlerinin Analizi

BIBR1532'nin IC₅₀ dozu uygulanan CCRF-CEM hücrelerindeki gen ekspresyon değişiklikleri, 48 saat sonunda gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) yöntemi ile belirlenmiştir. İnkübasyon sonunda total RNA izolasyonu, RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) kullanılarak, cDNA sentezi RT2 First Strand Kit (Qiagen) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. RT-PCR, LightCycler 480 II (Roche) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar 2^{-ΔΔCT} yöntemi ile değerlendirilmiştir. Kat değişimi ±2 kattan fazla olan genlerin ekspresyonları değerlendirmeye alınmıştır (p < 0.05).

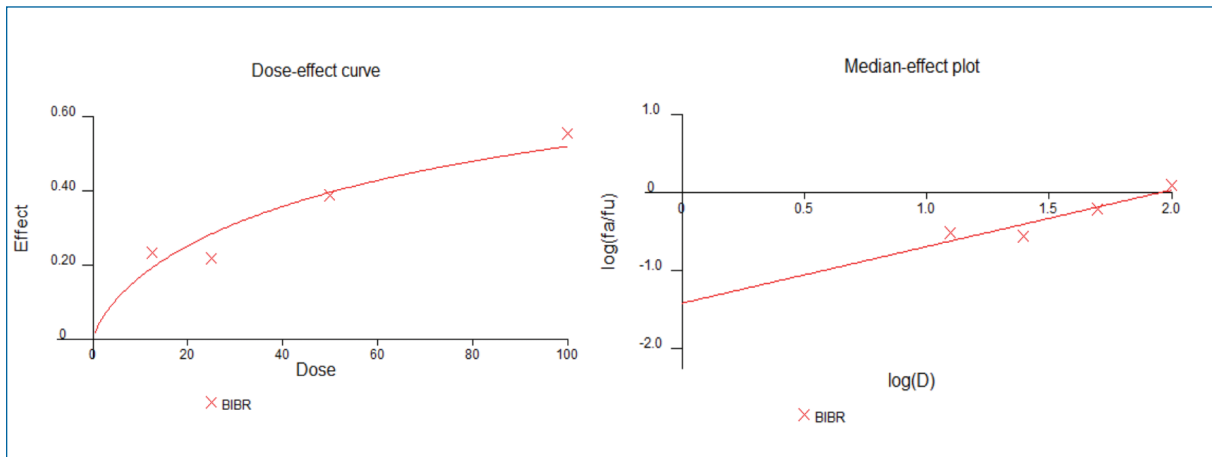
BULGULAR

Sitotoksosite Sonuçları

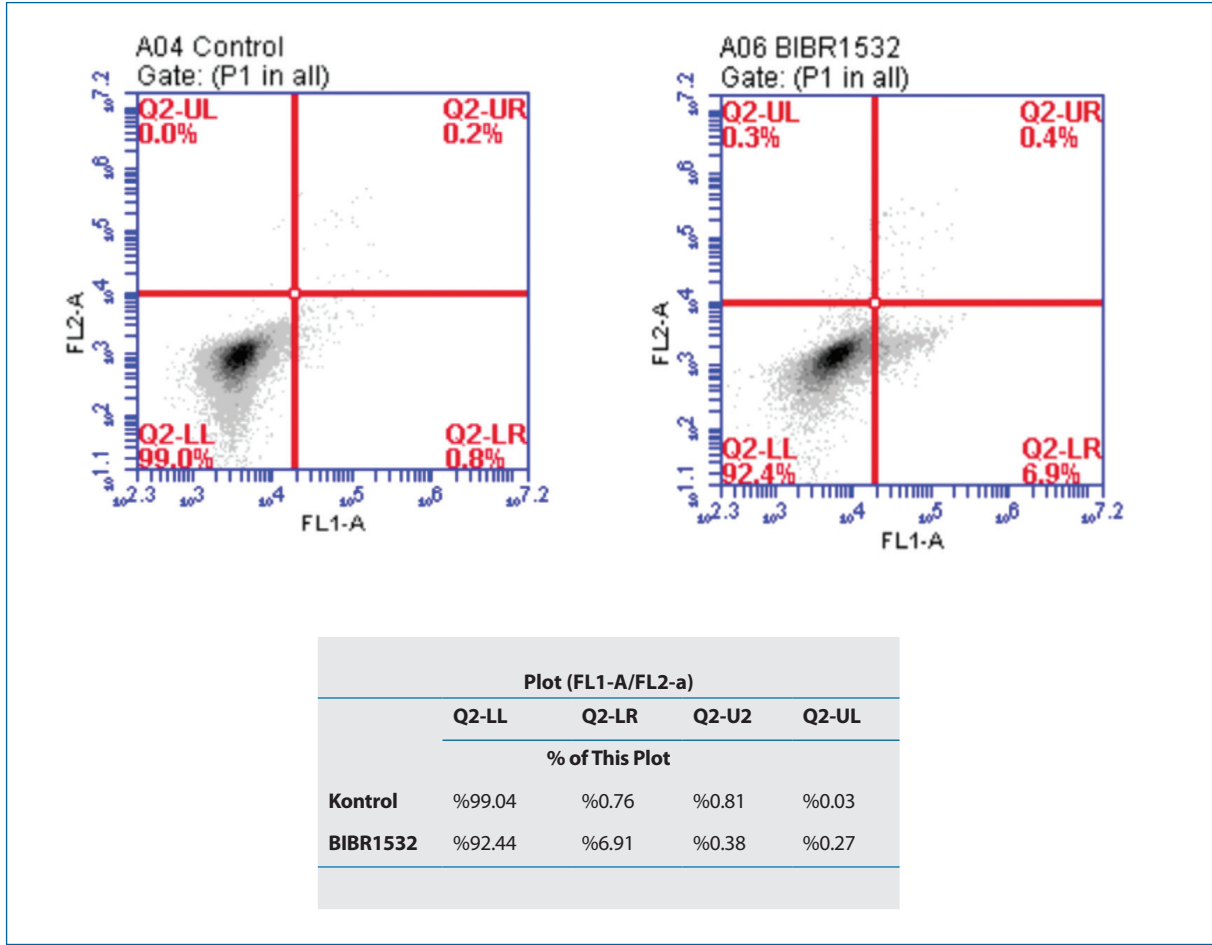
BIBR1532'nin CCRF-CEM hücre hattındaki sitotoksik etkisi Şekil 1'de gösterilmektedir. BIBR1532 IC50 konsantrasyonu 48. saatte 89 µM olarak belirlenmiştir.

Apoptoz Analizi Sonuçları

BIBR1532 IC50 konsantrasyonu (89 µM) ile 48 saat muamele edilen CCRF-CEM hücrelerinin, kontrol grubuna kıyasla apoptotik ve nekrotik etkilerini değerlendirmek için Annexin V-FITC yöntemi kullanılmıştır. BIBR1532'nin CCRF-CEM hücrelerinde apoptozu kontrole göre %7 artırdığı tespit edilmiştir (Şekil 2).



Şekil 1. BIBR1532'nin CCRF-CEM hücrelerindeki sitotoksik etkisi.



Şekil 2. BIBR1532'nin IC_{50} dozunun CCRF-CEM hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi.

Gen Ekspresyon Değişimleri

BIBR1532'nin IC_{50} dozu uygulanan CCRF-CEM hücreleri 48 saat sonunda kontrole kıyaslandığında, hTERT ekspresyonunda kontrole göre belirgin azalış gözlenirken, apoptotik ve tümör baskılayıcı genlerden olan DAPK1, NR4A3, CDH13'ün ekspresyonlarında artış gözlenmektedir (Şekil 3).

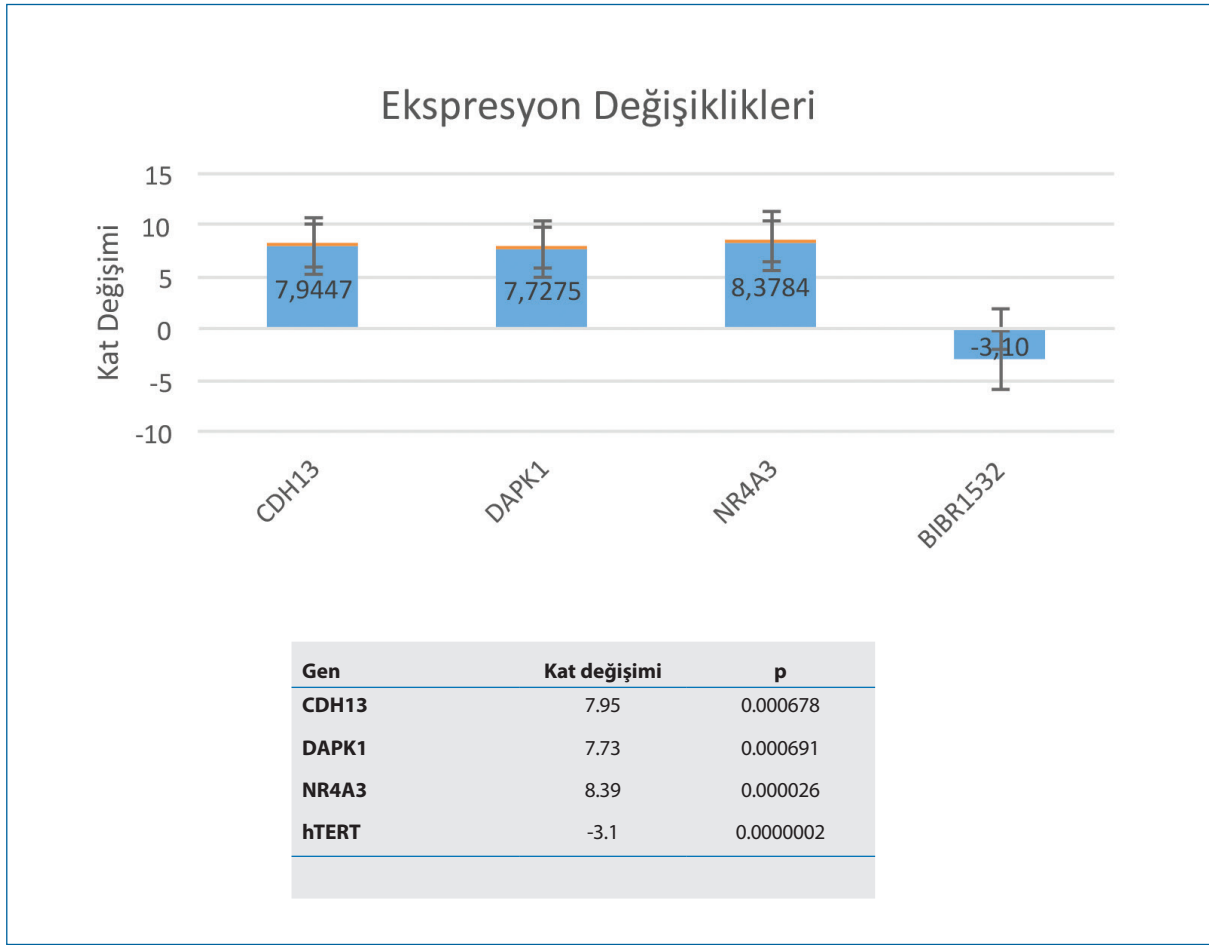
TARTIŞMA ve SONUÇ

ALL, B (%80-85) veya T hücrelerinin (%20-25) hematopoietik öncüllerinden kaynaklanan habis bir hastalıktır. Bir dizi genetik bozukluğun birikmesi, olgunlaşmanın bozulmasına, farklılaşma sürecinin durdurulmasına ve anormal çoğalmaya yol açar. Sonuç olarak, kemik iliği ve ekstramedüller bölgelerde fizyolojik hematopoez baskılanır ve lösemik hücreler birikir (10). Çocukluk çağında gelişen ALL, kemoterapiye karşı oldukça duyarlı olmasına rağmen, çocukların yaklaşık %25'inde nüks gözlenir (11). Yetişkinlerin ise daha büyük bir bölümünde tedaviden sonra nüks gözlenir ve hematopoietik kök hücre transplantasyonu dahil ileri tedavi yöntemle-

ri genel sağkalımı sınırlı bir oranda artırmaktadır. Buna ek olarak, kanser ilaçlarının spesifik olmayan etkileri, ölümlerle sonuçlanabilecek ya da ciddi morbiditeye neden olabilecek toksisiteye yol açabilmektedir (12).

Yüksek riskli hastalarda toksisiteye bağlı olarak sınırlı doz kullanımı, mevcut tedavilerin daha fazla yoğunlaştırılmamasına sebep olur ve genel sağkalımın artması için yeni ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır (13).

Telomer onarım mekanizmasının harekete geçirilmesi uzun zamandır kanserin önemli bir özelliği olarak kabul edilmektedir (14). Yakın zamanda, telomerase inhibitörlerinin ilk klinik denemeleri miyelofibröz ve esansiyel trombositemi gibi kan kanserlerinde bildirilmiştir (15,16). Telomerase etkinliğinin farmakolojik inhibitörü olan BIBR1532, kanser hücrelerinin çoğalmasının engellenmesinde umut vadetmektedir (17). Kanser hücreleri üzerinde gösterdiği etki yakın geçmişte çok sayıda prelinik araştırma ile değerlendirilmiştir ve bu inhibitörün birçok kanser türünde tümör hücre büyümesini baskılayabilme özelliğinin çok güçlü olduğu gösterilmiştir



Şekil 3. BIBR1532'nin IC_{50} dozunun CCRF-CEM hücrelerinde kontrole göre gen ekspresyon değişiklikleri.

(18-20). Ayrıca, BIBR1532'nin kanser kemoterapisinde yardımcı bir ilaç olarak potansiyel bir uygulama bulabileceğini gösteren kanıtlar da bulunmaktadır (21). Çalışmamızda telomeraz inhibitörü BIBR1532 uygulanan CCRF-CEM hücrelerinde hTERT geninin ekspresyon seviyesi kontrole göre 3.1 kat azalmıştır.

CDH13, transmembran bir alanı bulunmayan ve glikosilfosfatidilinositol bir çapa vasıtasıyla plazma membranının dış yüzeyine bağlanan, kaderin ailesinin atipik bir üyesidir. Hücrenin davranışını büyük oranda sinyal özellikleri üzerinden etkilediği düşünülmektedir. Genellikle akciğer, yumurtalık, servikal ve prostat kanseri gibi çeşitli kansinomlarda düşük ekspresyonu görülür ve düşük ekspresyon seviyesi kötü prognosis ile ilişkilendirilmiştir. Bunun yanı sıra, CDH13 tümör yoluyla oluşan kan damarlarında fazla oranda eksprese edilir ve tümör neovaskülarizasyonunu teşvik eder. Çoğu kanser hücre hattının aksine, endotel hücrelerinde CDH13 aşırı ekspresyonu, hücre çoğalmasını ve göçünü artırır. C6 glioma hücrelerinde, hepatoselüler karsinom hücrelerinde,

ölümsüzleştirilen keratinositlerde ve p53 (- / -) fare embriyonik fibroblastlarında CDH13'ün aşırı ekspresyonu G_2/M faz geçişini geciktirerek proliferasyonu baskılamaktadır (22-25). Bu etkinin p21^{CIP1/WAF1} ifadesine bağlı olduğu düşünülmektedir. Hepatoselüler karsinom hücrelerinde, CDH13 ekspresyonu tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α) kaynaklı apoptoza duyarlılığı da artırır (24). Çalışmamızda belirlediğimiz BIBR1532 IC_{50} dozu uygulanan CCRF-CEM hücrelerinde CDH13 gen ekspresyonunun ilaç uygulanmamış hücelere göre 7.95 kat artışının, apoptotik yolak ile ilişkili şekilde etkili olabileceğini düşünmekteyiz.

DAPK1, serin treonin kinaz ailesinin üyesi bir tümör supresördür. Hücre ölümü ve otofajinin düzenlenmesindeki kritik rolü gösterilmiştir. Buna ek olarak, DAPK1, TNF α ve Fas ligandı gibi çeşitli iç ve dış apoptotik uyarıcılar tarafından uyarılan çoklu hücre ölüm süreçlerine dahil olabilir veya pro-apoptotik yolda rol alabilir. İyi bilinen bir tümör supresör gen olan DAPK1 ekspresyonu, tümör büyümesini ve metastazi baskılayabilir (26). Steidl ve arkadaşlarının CD34 pozitif

polistemia vera hastalarını, sağlıklı kontroller ile kıyaslayarak gen ekspresyon paternini araştırdıkları çalışmada, CASP2, CASP3, DAPK1, ALG2 gibi tümör supresör genlerin, hastalarda kontrole göre daha düşük ekspresyon miktarına sahip olduğunu bildirmişlerdir (27). Çalışmamızda, apoptotik yolağın önemli bir mediatörü olan DAPK1'in BIBR1532 uygulaması ile birlikte 7.73 kat artış göstermesi, ilacın hücre ölümünü sağlarken hangi moleküler yolak üzerinden etki gösterdiğinin belirlenmesinde yol gösterici olabilir.

NR4A1 ve NR4A3, akut miyeloid lösemide (AML) tümör baskılayıcı olarak işlev görmektedir. Her iki nükleer reseptörü de "knockout" edilen farelerde hızla AML'nin gelişimi gözlenmiştir. NR4A1 ve NR4A3 kaybı, AML hastalarının ortak özelliğidir. Son zamanlarda, agresif lenfomalarda NR4A1 ve NR4A3 genlerinin ekspresyonunda bir azalma tanımlanmıştır ve düşük NR4A1 ekspresyonu genel sağkalımın düşük olması ile ilişkilendirilmiştir. Bir ksenograft fare modelinin agresif lenfoma hücrelerinde NR4A1'in aşırı ekspresyonu ile apoptozun indüklendiği ve tümör büyümesinin durduğu belirlenmiştir (28). BIBR1532 uyguladığımız ALL hücrelerinde NR4A3 geninin 8.38 kat arttığı göz önüne alınırsa, ilacın ALL tedavisinde hücre bölünmesi sırasında kromozom stabilitesinin sağlanmasına yardımcı olarak kemoterapiye dahil edilebileceği önerilebilir.

Sonuç olarak, elde ettiğimiz bulgulara göre ALL tedavisinde telomeraz inhibitörü BIBR1532 kullanımı, telomeraz aktivitesini düşürebileceği gibi apoptotik hücre ölümünü de uyarabilir. Ayrıca bu yolda görevli genlerin anlamlı ekspresyon değişikliğinin olması hastalığın moleküler patolojisinin aydınlatılmasına ve alternatif tedavi hedefi olabilecek genlerin belirlenmesine katkı sağlayabilir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarların çıkar çatışması bulunmamaktadır.

MALİ AÇIKLAMA

Çalışma için doğrudan veya dolaylı mali destek alınmadı. Çalışma ile ilgili herhangi bir firma veya kişi ile ilgili ticari bağlantı yoktur.

YAZAR KATKISI

Verilerin toplanması: NPÖA, BGB, FD, CG, GS, ÇBA; Literatür taranması ve makalenin yazımı: NPÖA, ÇBA

KAYNAKLAR

- Shilpa P, Pharm D, Hagop K, Elias J. Adult acute lymphoblastic leukemia. *Mayo Clin Proc* 2016;91:1645-6.
- Pui CH, Relling MV, Downing JR. Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 2004;350:1535-48.
- Roman-Gomez J, Jimenez-Velasco A, Castillejo JA, Agirre X, Barrios M, Navarro G. Promoter hypermethylation of cancer-related genes: a strong independent prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia. *BLOOD* 2004;104:2492-8.
- Yan-Fang T, Xing F, Jian W, Wen-Li Z, Du XJ, et al. CDH13 is Frequently Inactivated by Promoter hypermethylation in pediatric acute myeloid leukemia (AML). *J Hematol Thromb Dis* 2013;1:3.
- Nikbakht M, Jha AK, Malekzadeh K, Askari M, Mohammadi S, Marwaha RK, et al. Aberrant promoter hypermethylation of selected apoptotic genes in childhood acute lymphoblastic leukemia among north Indian population. *Exp Oncol* 2017;1:57-64.
- Deutsch AJA, Rinner B, Pichler M, Prochazka K, Pansy K, Bischof M, et al. NR4A1-mediated apoptosis suppresses lymphomagenesis and is associated with a favorable cancer-specific survival in patients with aggressive B-cell lymphomas. *Cancer Res* 2017;77:2375-86.
- Man LM, Morris AL, Keng M. New therapeutic strategies in acute lymphocytic leukemia. *Curr Hematol Malig Rep* 2017;12:197-206.
- Biray Avcı C, Yılmaz S, Dogan ZO, Saydam G, Dodurga Y, Ekiz HA, et al. Quercetin-induced apoptosis involves increased hTERT enzyme activity of leukemic cells. *Hematology* 2011;16:303-7.
- Bashash D, Ghaffari SH, Mirzaee R, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A. Telomerase inhibition by non-nucleosidic compound BIBR1532 causes rapid cell death in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 2013;54:561-8.
- Chiaretti S, Gianfelici V, Ceglie G, Foa R. Genomic characterization of acute leukemias. *Med Prin Pract* 2014;23:487-506.
- Pica A, Di Santi A, D'angelo V, Iannotta A, Ramaglia M, Di Martino M, et al. Effect of rMnSOD on survival signaling in pediatric high risk T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *J Cell Physiol* 2015;230:1086-93.
- Armstrong GT, Sklar CA, Hudson MM, Robison LL. Long-term health status among survivors of childhood cancer: Does sex matter? *J Clin Oncol* 2007;25:4477-89.
- Wong J, Welschinger R, Hewson J, Bradstock KF, Bendall LJ. Efficacy of dual PI-3K and mTOR inhibitors in vitro and in vivo in acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget* 2014;5:10460-72.
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-74.
- Tefferi A, Lasho TL, Begna KH, Patnaik MM, Zblewski DL, Finke CM, et al. A pilot study of the telomerase inhibitor imetelstat in patients with essential thrombocythemia. *N Engl J Med* 2015;373:908-19.
- Baerlocher GM, Oppliger LE, Ottmann OG, Spitzer G, Odenike O, McDevitt MA, et al. Telomerase inhibitor imetelstat in patients with essential thrombocythemia. *N Engl J Med* 2015;373:920-8.
- Shi Y, Sun L, Chen G, Zheng D, Li L, Wei W. A combination of the telomerase inhibitor, BIBR1532, and paclitaxel synergistically inhibit cell proliferation in breast cancer cell lines. *Targ Oncol* 2014;10:565-73.
- Liu W, Yin Y, Wang J, Shi B, Zhang L, Qian D, et al. Kras mutations increase telomerase activity and targeting telomerase is a promising therapeutic strategy for Kras-mutant NSCLC. *Oncotarget* 2017;8:179-90.
- Bashash D, Ghaffari S, Zaker F, Hezave K, Kazerani M, Ghavamzadeh A, et al. Direct short-term cytotoxic effects of BIBR 1532 on

- acute promyelocytic leukemia cells through induction of p21 coupled with downregulation of c-Myc and hTERT transcription. *Cancer Invest* 2012;30:57-64.
20. Brassat U, Balabanov S, Bali D, Dierlamm J, Braig M, Hartmann U, et al. Functional p53 is required for effective execution of telomerase inhibition in BCR-ABL-positive CML cells. *Exp Hematol* 2011;39:66-76.e1-2.
 21. Bashash D, Zareii M, Azar SA, Omrani MD, Ghaffari SH. Inhibition of telomerase using BIBR1532 enhances doxorubicin-induced apoptosis in Pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. *Hematology* 2017;22:330-40.
 22. Andreeva AA, Kutuzov MA. Cadherin 13 in cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2010;49:775-90.
 23. Huang ZY, Wu Y, Hedrick N, Gutmann DH. T-cadherin mediated cell growth regulation involves G2 phase arrest and requires p21CIP1/WAF1 expression. *Mol Cell Biol* 2003;23:566-78.
 24. Chan DW, Lee JM, Chan PC, Ng IO. Genetic and epigenetic inactivation of T-cadherin in human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Cancer* 2008;123:1043-52.
 25. Mukoyama Y, Zhou S, Miyachi Y, Matsuyoshi N. T-cadherin negatively regulates the proliferation of cutaneous squamous carcinoma cells. *J Invest Dermatol* 2005;124:833-8.
 26. Yuan W, Chen J, Shu Y, Liu S, Wu L, Ji J, et al. Correlation of DAPK1 methylation and the risk of gastrointestinal cancer: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2017;12:e0184959.
 27. Steidl U, Schroeder T, Steidl C, Kobbe G, Graef T, Bork S, et al. Distinct gene expression pattern of malignant hematopoietic stem and progenitor cells in polycythemia vera. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1044:94-108.
 28. Wenzl K, Troppan K, Neumelster P, Deutsch AJ. The nuklear orphan receptor NR4A1 and NR4A3 as tumor suppressors in hematologic neoplasm. *Current Drug Targets* 2015;16:38-46.