



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BORTEZOMİB DİRENÇLİ MULTİPLE MYELOMA KANSER
HÜCRE HATLARINDA HÜCRE DÖNGÜSÜ KONTROL
NOKTALARI İLE İLİŞKİLİ İLAÇ DİRENÇLİLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Büşra DURSUN

DANIŞMAN

Doç. Dr. Emine ÖKSÜZOĞLU

AKSARAY, 2021



**T.C.
AKSARAY ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**BORTEZOMİB DİRENÇLİ MULTİPLE MYELOMA KANSER
HÜCRE HATLARINDA HÜCRE DÖNGÜSÜ KONTROL
NOKTALARI İLE İLİŞKİLİ İLAÇ DİRENÇLİLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Büşra DURSUN

DANIŞMAN

Doç. Dr. Emine ÖKSÜZOĞLU

AKSARAY, 2021

Aksaray Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 172307409 numaralı Yüksek Lisans öğrencisi Büşra DURSUN tarafından hazırlanan “(BORTZOMİB DİRENÇLİ MULTİPLE MYELOMA KANSER HÜCRE HATLARINDA HÜCRE DÖNGÜSÜ KONTROL NOKTALARI İLE İLİŞKİLİ İLAÇ DİRENÇLİLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI)” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Emine ÖKSÜZOĞLU

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye: Prof. Dr. Hatice Mehtap KUTLU

Eskişehir Teknik Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye: Prof. Dr. Kamile ÖZTÜRK

Aksaray Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Tez Savunma Tarihi: 25/06/2021.

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....
Doç. Dr. Mehmet Ali HİNİS
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdür

DOĞRULUK BEYANI

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, akademik kurallara ve bilimsel etik, ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yol ve yardıma başvurmaksızın yazdığımı, yararlandığım eserlerin kaynakçada gösterilenlerden oluştuğunu, çalışmamda kullandığım verilerin orijinalliğini ve her türlü intihalden uzak olduğunu beyan ederim.

Enstitü tarafından belli bir zamana bağlı olmaksızın, tezimle ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara katlanacağımı bildiririm.

Büşra DURSUN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim ve öğretimim boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, gerek akademik bilgileri gerekse hayat tecrübeleri ile özellikle yaşadığımız pandemi sürecinde başta olmak üzere her zaman her konuda yanı başımda olup beni eğiten değerli hocam ve danışmanım Doç. Dr. Emine ÖKSÜZOĞLU'na, engin bilgileri ile bana her zaman ışık olan ve yol gösteren, maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Kamile ÖZTÜRK'e, deneysel çalışmalarımın istatistiksel açıdan değerlendirilmesinde emeği geçen değerli hocam Prof. Dr. İbrahim ÖRÜN'e, akademik deneyimleri ile bana her zaman yol gösteren sevgili hocam Doç. Dr. Mehmet KARACA'ya, özellikle laboratuvar deneyimlerimi kazanmamda katkıda bulunan ve yardıma her ihtiyaç duyduğumda yanımda olup deneyimlerini benimle paylaşan sevgili arkadaşım Bilim Uzmanı Mehtap TARHAN'a, bu günlere gelebilmemde en büyük emeğe sahip olup beni tek başına büyütüp okutan, hayatını ben ve kardeşlerime adayan maddi ve manevi en büyük destekçim olan en değerlim, sahip olduğum en yüce insan melek annem Nigar ÇAKIR'a, uzakta olmalarına rağmen maddi ve manevi hep destekçim olup her zaman yanımda olan ablam Betül DURSUN'a ve kardeşim Beyza DURSUN'a, ayrıca bu günlere gelebilmemdeki en büyük rolü üstlenip beni büyüten, bana inanmaktan hiç vazgeçmeyen ve ne olursa olsun yanımda olup benim için ellerinden gelenin hep en iyisini yapan dedem Ömer ÇAKIR'a ve anneannem Ayşe ÇAKIR'a en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Tezimin gerçekleşmesinde 2020-041 numaralı proje ile maddi destek sağlayan Aksaray Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Büşra DURSUN
AKSARAY, 2021

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	3
2.1 Kanser.....	3
2.2 Hücre Döngüsü.....	4
2.3 Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları	7
2.4 Hücre Döngüsü Düzenleyici Faktörleri.....	8
2.4.1 Siklinler (Cyclins)	9
2.4.1.1 Siklin D.....	9
2.4.1.2 Siklin E	10
2.4.1.3 Siklin A.....	11
2.4.1.4 Siklin B	12
2.4.2 Siklin bağımlı kinazlar (CDK'lar).....	12
2.4.3 Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CKI)	14
2.4.4 Onkogenler ve tümör baskılayıcı genler	16
2.5 Multiple Myeloma	16
2.5.1 Multiple Myeloma epidemiyolojisi	18
2.5.2 Multiple Myeloma etiyolojisi	19
2.5.3 Multiple Myeloma evreleri ve patogenezi	19
2.5.4 Multiple Myeloma'da tanı ve tedavi.....	21
2.6 Bortezomib	23
2.6.1 Proteazom kompleksi	24
2.7 Kanserde İlaç Dirençliliği	26
3. MALZEME ve YÖNTEM.....	29
3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Genler	29
3.2 Hücre Hatlarının Çoğaltılması ve Dondurulması	29
3.3 Hücre Canlılığının Saptanması.....	30
3.4 Hücre Proliferasyon Analizi / MTT Testi	30
3.4.1 Bortezomib dozunun belirlenmesi.....	30
3.4.2 MTT testi	31
3.4.3 IC ₅₀ değerlerinin belirlenmesi	32
3.5 RNA İzolasyonu	33
3.5.1 Hücre ekim aşaması.....	33
3.5.2 RNA miktarlarının NanoDrop ile ölçümü	34
3.6 Agaroz Jel Elektroforezi.....	35
3.7 Gen İfade Düzeylerinin Belirlenmesi.....	35
3.7.1 Komplementer DNA (cDNA) eldesi	35
3.7.2 Real-Time PCR (qRT-PCR) analizi	36
3.7.3 Real-Time PCR reaksiyon ürünlerindeki katlık değişim (RQ) oranlarının belirlenmesi	37
3.8 İstatiksel Analiz.....	38
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	39
4.1 Multiple Myeloma Hücre Hatlarının Çoğalması.....	39

4.2 MTT Testi Sonuçları	39
4.2.1 KMS-28 hücre hattındaki MTT sonuçları	40
4.2.2 KMS-20 hücre hattındaki MTT sonuçları	41
4.2.3 KMS-28 ve KMS-20 hücre hatlarında IC ₅₀ değerleri.....	42
4.3 KMS-28 ve KMS-20 Hücre Hatlarında Dirençlilik İndeksinin (RI)	
Hesaplanması	42
4.4 KMS-28 ve KMS-20 Hücre Hatlarında RNA İzolasyonu Sonuçları	43
4.5 cDNA Sentezi.....	44
4.6 Gen Ekspresyon Analizleri.....	44
4.6.1 <i>CCND1</i> genine ait ekspresyon analizleri.....	45
4.6.2 <i>CCND2</i> genine ait ekspresyon analizleri.....	46
4.6.3 <i>CCNE1</i> genine ait ekspresyon analizleri	48
4.6.4 <i>CCNB1</i> genine ait ekspresyon analizleri	50
4.6.5 <i>CCNA1</i> genine ait ekspresyon analizleri	51
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	54
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	75

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BORTEZOMİB DİRENÇLİ MULTİPLE MYELOMA KANSER HÜCRE HATLARINDA HÜCRE DÖNGÜSÜ KONTROL NOKTALARI İLE İLİŞKİLİ İLAÇ DİRENÇLİLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Büşra DURSUN

Aksaray Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Emine ÖKSÜZOĞLU

ÖZET

Multiple Myeloma (MM), kemik iliğinde malign plazma hücrelerinin birikmesiyle ile karakterize olan hematolojik bir kanser türüdür. Bortezomib multiple myeloma tedavisinde klinikte kullanılan en etkin kemoterapötik ilaçlardan biridir. Fakat kanser tedavisi sürecinde bortezomibe karşı dirençlilik sıklıkla karşılaşılan bir durumdur. Tümör hücrelerinde, ilaç taşıma proteinlerinin sentezinin artması, apoptozisin baskılanması ve hücre döngüsü kontrolünde yer alan düzenleme faktörlerindeki değişiklikler kemoterapötik ilaçlara karşı direnç oluşmasına sebep olan en önemli mekanizmalardır. Bu nedenle çalışmamızda, multiple myeloma kanser hücrelerinde gelişen bortezomib dirençliliğinin hücre döngüsü kontrol noktalarında bulunan cyclin genleri ile ilişkisi araştırılmıştır.

Bu çalışmada, multiple myeloma KMS-28 (bortezomibe hassas) ve KMS-20 (bortezomibe dirençli) hücre hatları çoğaltıldı. MTT testi uygulanarak her iki hücre hattı için bortezomibin IC₅₀ değerleri saptandı. Hücre hatlarından RNA izolasyonu yapılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi ve hücre döngüsü düzenleyici faktörleri olan Cyclin D1, Cyclin D2, Cyclin A1, Cyclin E1 ve Cyclin B1 genlerinin ifade düzeyleri Real-time PCR ile analiz edildi.

Elde ettiğimiz bulgulara göre Cyclin A1 geninin bortezomibe hassas hücrelerde ifade edilmeyip, bortezomibe dirençli hücrelerdeki yüksek ifadesi (overekspresyon) bu genin multiple myelomada bortezomib dirençliliğinin gelişiminde doğrudan rolünün olduğunu göstermiştir. Cyclin D1 geni KMS-28’de aşırı ifade edilirken, KMS-20’de ise baskılanmıştır. Cyclin D1 genindeki bu değişikliklerin bortezomib dirençliliğine neden olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, multiple myelomada ilaç dirençliliğine yol açan mekanizmaların aydınlatılması, hastalığın moleküler düzeyde anlaşılmasını sağlayacak ve MM ile ilgili daha etkili tedavi seçeneklerinin oluşturulmasını olanak tanıyacaktır.

Anahtar Kelimeler: Multiple Myeloma, Bortezomib, Kanser, İlaç Dirençliliği, Hücre Döngüsü Siklin Genleri.

Haziran, 2021; 75 sayfa

M.Sc. THESIS

INVESTIGATION OF DRUG RESISTANCE RELATED TO CELL CYCLE CONTROL POINTS IN BORTEZOMIB RESISTANT MULTIPLE MYELOMA CANCER CELL LINES

Büşra DURSUN

**Aksaray University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology**

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Emine ÖKSÜZOĞLU

ABSTRACT

Multiple Myeloma (MM) is a type of hematological cancer characterized by the accumulation of malignant plasma cells in the bone marrow. Bortezomib is one of the most effective chemotherapeutic drugs used clinically in the treatment of multiple myeloma. However, resistance to bortezomib is a frequently encountered situation during the cancer treatment process. In tumor cells, increased synthesis of drug transport proteins, suppression of apoptosis and changes in regulation factors involved in cell cycle control are the most important mechanisms that cause resistance to chemotherapeutic drugs. Therefore, in our study, the relationship between bortezomib resistance in multiple myeloma cancer cells and cyclin genes at cell cycle checkpoints was investigated.

In this study, multiple myeloma KMS-28 (bortezomib-sensitive) and KMS-20 (bortezomib-resistant) cell lines were propagated. Bortezomib IC₅₀ values were determined for both cell lines by applying the MTT test. cDNA synthesis was performed by RNA isolation from cell lines and the expression levels of the cell cycle regulatory factors Cyclin D1, Cyclin D2, Cyclin A1, Cyclin E1 and Cyclin B1 genes were analyzed by Real-Time PCR.

According to our findings, the Cyclin A1 gene is not expressed at all in bortezomib-sensitive cells, and its high expression (overexpression) in bortezomib-resistant cells has shown that this gene has a direct role in the development of bortezomib resistance in multiple myeloma. The Cyclin D1 gene is overexpressed in KMS-28 and suppressed in KMS-20. It is thought that these changes in the Cyclin D1 gene may cause bortezomib resistance.

In conclusion, elucidating the mechanisms leading to drug resistance in multiple myeloma will provide an understanding of the disease at the molecular level and will enable more effective treatment options for MM.

Keywords: Multiple Myeloma, Bortezomib, Cancer, Drug-Resistance, Cell Cycle Cyclin Genes.

June, 2021; 75 pages

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Hücre döngüsü kontrol noktaları	8
Şekil 2.2. Hücre döngüsü düzenleyici faktörleri.....	8
Şekil 2.3. Siklinlerin hücre döngüsündeki ifade düzeyleri	9
Şekil 2.4. Hücre döngüsündeki Siklin-CDK kompleksleri.....	13
Şekil 2.5. Aktif/İnaktif CDK kompleksleri.....	14
Şekil 2.6. Hücre Döngüsünün Düzenlenmesinde Siklinler, CDK'lar ve CKI'ların Rolü	15
Şekil 2.7. İmmünoglobulinlerin yapısı	17
Şekil 2.8. Normal plazma hücreleri ile MM'in karşılaştırılması	18
Şekil 2.9. Bortezomib'in kimyasal yapısı.....	24
Şekil 2.10. 26S Proteozomun yapısı	25
Şekil 2.11. Bortezomib-Proteozom inhibisyonunda gerçekleşen olaylar	26
Şekil 2.12. İlaç dirençlilik mekanizmaları	27
Şekil 3.1. Bortezomibin KMS-20 ve KMS-28 Hücre Hatlarındaki MTT Sonuçları	32
Şekil 3.2. RNA İzolasyon Aşaması İçin Hücre Ekimi ve Bortezomib Dozlarının Uygulanması	33
Şekil 3.3. Agaroz jel elektroforezinin uygulanması.....	35
Şekil 3.4. qRT-PCR reaksiyonunda gerçekleşen amplifikasyon basamakları.....	37
Şekil 4.1. KMS-28 (bortezomibe hassas) Hücrelerinin Çoğalma Görüntüleri	39
Şekil 4.2. KMS-20 (bortezomibe dirençli) Hücrelerinin Çoğalma Görüntüleri	39
Şekil 4.3. KMS-28 hücre hattına uygulanan bortezomibin 24 saatlik % hayatta kalma grafiği	40
Şekil 4.4. KMS-20 hücre hattına uygulanan bortezomibin 24 saatlik % hayatta kalma grafiği	41
Şekil 4.5. KMS-28 ve KMS-20 hücre hatlarının IC ₅₀ değerleri grafiği	42
Şekil 4.6. KMS-28 ve KMS-20 hücre hatlarındaki RNA miktarlarının agaroz jel elektroforezi görüntüsü	43
Şekil 4.7. KMS-20 hücre hattında artan bortezomib dozlarına göre Cyclin D1 geninin RQ sonuçları grafiği.....	45
Şekil 4.8. KMS-28 hücre hattında artan bortezomib dozlarına göre Cyclin D1 geninin RQ sonuçları grafiği.....	46
Şekil 4.9. KMS-20 hücre hattında artan bortezomib dozlarına göre Cyclin D2 geninin RQ sonuçları grafiği.....	47
Şekil 4.10. KMS-28 hücre hattında artan bortezomib dozlarına göre Cyclin D2 geninin RQ sonuçları grafiği	48
Şekil 4.11. KMS-20 hücre hattında artan bortezomib dozlarına göre Cyclin E1 geninin RQ sonuçları grafiği.....	49
Şekil 4.12. KMS-28 hücre hattında artan bortezomib dozlarına göre Cyclin E1 geninin RQ sonuçları grafiği.....	49
Şekil 4.13. KMS-20 hücre hattında artan bortezomib dozlarına göre Cyclin B1 geninin RQ sonuçları grafiği	50
Şekil 4.14. KMS-28 hücre hattında artan bortezomib dozlarına göre Cyclin B1 geninin RQ sonuçları grafiği	51
Şekil 4.15. KMS-20 hücre hattında artan bortezomib dozlarına göre Cyclin A1 geninin RQ sonuçları grafiği	52
Şekil 4.16. KMS-28 hücre hattında artan bortezomib dozlarına göre Cyclin A1 geninin RQ sonuçları grafiği	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Hücre döngüsü evreleri.....	5
Çizelge 2.2. Hücre döngüsündeki siklin bağımlı kinazlar (CDK'lar)	13
Çizelge 2.3. Proteazom inhibitörü tarafından bozularak hücre döngüsüne katılan proteinler	26
Çizelge 3.1. qRT-PCR için gerekli olan optimum reaksiyon şartları	37
Çizelge 4.1. KMS-28 hücre hattına 24 saatlik bortezomib uygulanması sonucu elde edilen % canlılık değerleri.....	40
Çizelge 4.2. KMS-20 hücre hattına 24 saatlik bortezomib uygulanması sonucu edinilen % canlılık değerleri	41
Çizelge 4.3. KMS-28 ve KMS-20 Hücre Hatlarının IC ₅₀ Değerleri.....	42
Çizelge 4.4. KMS-28 ve KMS-20 hücre hatlarından izole edilen RNA konsantrasyonları	44
Çizelge 4.5. Hücre hatlarından sentezlenen cDNA konsantrasyonları	44
Çizelge 4.6. KMS-20 ve KMS-28 hücre hatlarında artan bortezomib dozlarına göre Cyclin D1 geninin RQ değerleri	45
Çizelge 4.7. KMS-20 ve KMS-28 hücre hatlarında artan bortezomib dozlarına göre Cyclin D2 geninin RQ değerleri	47
Çizelge 4.8. KMS-20 ve KMS-28 hücre hatlarında artan bortezomib dozlarına göre Cyclin E1 geninin RQ değerleri.....	48
Çizelge 4.9. KMS-20 ve KMS-28 hücre hatlarında artan bortezomib dozlarına göre Cyclin B1 geninin RQ değerleri.....	50
Çizelge 4.10. KMS-20 ve KMS-28 hücre hatlarında artan bortezomib dozlarına göre Cyclin A1 geninin RQ değerleri	52

SİMGELER VE KISALTMALAR

CCNA1	Siklin A1 Geni
CCNB1	Siklin B1 Geni
CCND1	Siklin D1 Geni
CCND2	Siklin D2 Geni
CCNE1	Siklin E1 Geni
CDK	Siklin Bağımlı Serin/Treonin Protein Kinaz
CDI	Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörleri
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
DMSO	Dimetil Sülfoksit
FBS	Fetal Sığır Serum
FDA	Amerika Gıda ve İlaç Dairesi
Ig	İmmüoglobülin
IgA	İmmüoglobülin Alfa
IgD	İmmüoglobülin Delta
IgE	İmmüoglobülin Epsilon
IgG	İmmüoglobülin Gama
IgH	İmmüoglobülin Ağır Zinciri
IgM	İmmüoglobülin Mu
M Protein	Monoklonal Protein
MGUS	Önemi Belirlenemeyen Monoklonal Gammopati
MM	Multiple Myeloma
NF-κB	Nükleer Faktör Kappa B
RB	Retinoblastoma Geni
TP53	Tümör Protein P53 Geni
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
°C	Santigrat
α	Alfa
β	Beta
ε	Epsilon
κ	Kappa
μM	Mikromolar
g	Gram
μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
mL	Mililitre
L	Litre
nM	Nanomolar
2^{-ΔΔCT}	Gen İfade Düzeyindeki Katlık Değişim

1. GİRİŞ

Kanser günümüzde en fazla ölüme yol açan hastalıkların başında gelmektedir. Tüm dünya genelinde kansere yakalanma oranı gün geçtikçe artmaktadır. Bu duruma karşılık sürekli yeni tedavi seçenekleri geliştirilmekte olup kullanılan en etkili tedavi yöntemlerinden birisi kemoterapidir. Kullanılan tedavi yöntemlerine karşılık kemoterapi süresince hastaların tedaviye cevap vermemesi veya tedavi sonrası kanserin nüksetmesi sıkça görülen bir durumdur. Kemoterapiye karşı geliştirilen dirençlilik pek çok antikanser ilacın hastalar üzerinde beklenen etkisini gösterememesine ve nedenle de hastalığın tedavi edilememesine neden olmaktadır (Krishan vd., 1997; Gottesman vd., 2002; Yague vd., 2007; Lage, 2008; Baguley, 2010; Shaffer vd., 2012; Saraswathy ve Gong, 2013). Kanser hücrelerinde ilaç dirençliliğine neden olan mekanizmalardan biri de hücre döngüsü düzenleme faktörlerindeki değişikliklerdir (Abdi vd., 2013).

Hücre döngüsünün her aşaması siklinler (cyclins) olarak bilinen bir dizi protein ailesi tarafından düzenlenmektedir (Heuvel ve Harlow, 1993). Bu proteinlerin düzeyleri hücre döngüsünün farklı fazlarında değişiklik gösterir. Hücre döngüsü boyunca sırasıyla siklin D, E, A ve B ortaya çıkar (Vermeulen vd., 2003). Bu düzenleyici faktörlerde meydana gelen değişiklikler sonucunda normal hücreler kanser hücrelerine dönüşebilir aynı zamanda kanser tedavisi boyunca kemoterapötik ilaçlara karşı dirençlilik gelişebilir (Sherr, 2000).

Multiple myeloma (MM), kemik iliğinde malign plazma hücrelerinin birikmesiyle ile karakterize olan hematolojik bir kanser türüdür. Genellikle 65-70 yaş aralığındaki bireylerde daha sık görülmektedir. Kemik erimesi ve yıkımı başta olmak üzere anemi, bağışıklığın azalması ve böbrek yetmezliği gibi bir dizi klinik bulguya sahiptir (Kyl ve Rajkumar, 2004; Kumar, 2010; Borrello, 2012). MM tedavisinde klinikte kullanılan ve FDA tarafından onaylanmış en etkin kemoterapötik ilaçlardan birisi bortezomibtir. Dipeptid boronik asit analogu olan bortezomib (PS-341, Velcade), antitümör özelliğe sahip bir proteozom inhibitörüdür. Bortezomibin apoptozisi indüklemesi ve proliferasyonu baskılaması hücrelerin kemoterapiye karşı duyarlılıklarının artmasına neden olur ve bu özelliğinden dolayı hematolojik kanserlerin tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Blade vd., 2005; Boccadoro vd., 2005). Fakat kanser tedavisi sürecinde bortezomibe karşı dirençlilik

sıklıkla karşılaşılan bir durumdur ve bu da tedavideki başarıyı önemli oranda azaltır. Bu nedenle multiple myelomada bortezomib dirençliliğine neden olan mekanizmaların anlaşılması hastalığın tedavisinde başarıya ulaşabilmek için oldukça önemlidir (Tsubakia vd., 2012).

Tez çalışmasının amacı, multiple myeloma tedavisinde kullanılan bortezomibe karşı oluşan dirençliliğin hücre döngüsü düzenleme faktörleriyle ilişkisinin araştırılmasıdır. Tez çalışması kapsamında bortezomib ile muamele edilmiş multiple myeloma KMS-20 (bortezomibe dirençli) ve KMS-28 (bortezomibe hassas) hücre hatlarında hücre döngüsü kontrol noktalarında yer alan cyclin D1, cyclin D2, cyclin E1, cyclin A1 ve cyclin B1 genlerinin ifade düzeyleri incelenmiştir.

Sonuç olarak, multiple myeloma hücrelerindeki bortezomib dirençliliğine neden olan moleküler mekanizmaların aydınlatılması, hastalığın moleküler düzeyde anlaşılmasına ve hastalıkla ilgili daha etkili tedavi seçeneklerinin oluşturulmasına olanak sağlayacaktır. Kanseri hücrelerinin bortezomibe karşı oluşturdıkları direncin engellenebilmesi multiple myeloma tedavisinde yeni bir umut ışığı olabilir. Ayrıca ileriki zamanlarda yapılacak çalışmalar sayesinde ilaç stratejilerinin kişiye özel olarak şekillendirilebilmesi de mümkün olabilecektir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Kanser

Kanser, günümüzde tüm dünyada rastlanılan en ölümcül hastalıklardan biridir. Patalojik ve sistemik bir hastalık olan kanser; kontrolsüz hücre çoğalması, proliferasyon, apoptozis ya da farklılaşmadaki bozukluklardan kaynaklanır. Kanserin bir kısmı kalıtsal olarak aktarılırken, büyük bir kısmının ise DNA'nın çeşitli mutajenlere maruz kalması ve DNA sentezinde oluşan hatalardan kaynaklandığı düşünülmektedir (Klug vd., 2011; Yokuş ve Çakır, 2012). 2018 yılı Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı'nın (IARC) yayınladığı GLOBOCAN verilerine göre dünya genelinde her 6 kişiden birinin kanser nedeniyle hayatını kaybettiği, 18,1 milyon yeni kanser vakası olduğu ve toplamda 9,6 milyon kişinin kanser nedeniyle hayatını kaybettiği bildirilmiştir. Bu istatistikler göz önünde bulundurularak dünya genelinde en çok ölüme neden olan kanser türleri kadınlarda meme kanseri, erkeklerde ise akciğer kanseri olduğu gözlenmiştir. Genel olarak bakıldığında, akciğer kanseri, meme kanseri, prostat kanseri ve kolon kanseri ölüm oranı en yüksek olan kanser türleridir (Klug vd., 2011). Dünya genelinde kanserin görülme oranları kadınlarda 100 binde 182,6 oranındayken erkeklerde ise 218,6 oranındadır. Aynı oran Türkiye genelinde kadınlarda 100 binde 183,6 iken erkeklerde 259,9'dur (URL-1).

Hücre bölünmesi sırasında DNA replikasyonunda oluşan hatalar nedeniyle eşey ve somatik hücrelerde çeşitli mutasyonlar oluşabilir ve bunun sonucunda normal hücreler kanser hücrelerine dönüşebilir (Abecasis vd., 2010; Alexandrov vd., 2015). Somatik hücrelerde oluşan kromozomal kayıplar ve insersiyonlar gibi çeşitli mutasyonlar birçok kanser türünde sıklıkla gözlemlenir (Lengauer vd., 1998; Rajagopalan vd., 2004). Erken tümör gelişimi esnasında, hücrelerde meydana gelen farklılaşma hataları kontrolsüz büyümeye neden olurken aynı zamanda tümörün içinde heterojeniteye sebep olabilirler (Nowell, 1976; Wolman, 1986). Tüm somatik hücreler tümör oluşturma eğilimine sahip olarak kabul edilir (Tsimberidou vd., 2020). Kanser hücreleri kitleler halinde büyümelerine devam ederler ve kan ya da lenf yolu ile vücudun diğer bölgelerine doğru dolaşım sağlayabilirler. Kanser böyle yayılma hareketi göstermesine metastaz adı verilmektedir. Kanser hücreleri oluşmaya başladıkları hücre tipine ve organlara göre sınıflandırılırlar. Farklı hücre

tipinde oluşan kanser türleri farklı oranlarda büyürler ve orjinlerine göre de değişik yayılma şekilleri gösterirler. Mevcut kanser tipine bağlı olarak, kanser hastalarının tedavisinde farklı tedavi yöntemleri kullanılmaktadır (Beemster, 1998; Alexandrov vd., 2015).

Hanahan ve Weinberg 2000 yılında kanser hücresinin temel fonksiyonel özelliklerini 6 maddede özetlediler. 2011 yılında bu özelliklere yenileri eklenmiştir. Bu özellikler aşağıdaki gibidir (Hanahan ve Weinberg, 2000, 2011):

- Kanser hücreleri büyüme sinyallerini kendileri (otonom büyüme) oluşturur,
- Büyümeyi baskılayan sinyallere karşı duyarsızdırlar,
- Sınırsız çoğalma (replikatif ölümsüzlük) potansiyelleri vardır,
- Apoptozisten (programlı hücre ölümü) kaçış gösterirler,
- Dokulara ve uzak organlara yayılma (metastaz) yaparlar,
- Kendilerine yeni damarlar (anjiogenezis) oluşturabilirler.
- Değişen enerji mekanizmasına sahiptirler,
- İmmün sistemden kaçış gösterirler,
- Kanser hücrelerinde genomik kararsızlık ve mutasyon görülür,
- Kanser hücrelerinde tümörü tetikleyen inflamasyon gözlenir.

2.2 Hücre Döngüsü

Hücrelerin bölünmeye başlamalarından itibaren bir sonraki hücre bölünmesine kadar süren zaman boyunca, hücrelerde gerçekleşen biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerin gözlemlendiği sürece hücre döngüsü adı verilmektedir (Sherr, 2000).

Hücre döngüsü iki evreden oluşur (Luo, 1995):

İnterfaz Evresi: Hücre metabolizmasının yoğun olarak gerçekleştiği büyüme ve gelişme evresidir. İnterfaz evresi bölünme için hazırlık yapar (Luo, 1995). Hücre döngüsünün yaklaşık olarak %90'nını oluşturur (Campbell ve Reece, 2006). İnterfaz evresi boyunca hücre içerisinde meydana gelen değişimler aşağıda gösterildiği gibidir (Luo, 1995):

- Hücre organellerinin sayısı artar.
- Protein sentezi, ATP üretimi ve RNA sentezi gibi metabolik olaylar hızlanır.

- Hücrenin hacminde belli oranda artış olur.
- DNA kendini eşler.
- Hayvansal hücrelerde, sentrozomun eşlenmesi bu evrede gerçekleşir.
- Bölünme sırasında gerekli olan enzimler üretilir.
- S fazı sırasında kromatin iplikler kendini eşler.

Ökaryotik hücrelerde hücre bölünmesi 4 temel evreden oluşmaktadır. Bu evreler aşağıdaki gibidir (Nelson ve Cox, 2005):

- **G₁ Fazı:** Bu evrede hücreyi bölünmeye iten büyüme faktörleri aktif olur ve RNA ile protein sentezi gerçekleşir. DNA sentezi henüz yoktur.
- **S (Sentez) Fazı:** S evresinde; RNA sentezi devam eder ve protein sentezi en üst seviyeye çıkar. DNA kopya oluşturmak üzere replike olur ve sentez sonrasında DNA miktarı iki katına çıkar.
- **G₂ Fazı:** Bu evre mitoz bölünme için hazırlık safhasıdır. Mitozu aktive edecek proteinler çoğalır. DNA sentezi dururken RNA ve protein sentezi devam eder. Sentrozom duplikasyonu tamamlanarak organeller çoğalır ve iki katına çıkar.
- **M (Mitoz) Fazı:** Mitoz fazı kendi içinde 4 (profaz, metafaz, anafaz ve telofaz) safhadan oluşmaktadır. Bu safhalar boyunca sırasıyla çekirdek zarfı kaybolmaya başlar, sentrozomlar oluşur, kromozomlar kısalıp kalınlaşır, kardeş kromozomlar hücrenin zıt kutuplarına çekilir, her bir yavru kromozom takımı yeniden çekirdek zarfı ile kaplanır ve sitokinez sonucu iki yavru hücre oluşur.

Çizelge 2.1. Hücre Döngüsü Evreleri (Mens ve Ghanbari, 2018).

G₁ Fazı	S Fazı	G₂ Fazı	M Fazı
RNA ve protein sentezlenir.	RNA sentezi devam eder.	Kromozomların yoğunlaşması ve mitoz için hazırlık aşamasıdır.	Profaz, Metafaz, Anafaz, Telofaz evrelerinden oluşur.
DNA sentezi henüz yoktur.	Protein sentezi en yüksek seviyeye çıkar.	Mitozu aktive edecek proteinler birikir.	Mitotik ipliklerin oluşumu ilk sinyallerdir.

Çizelge 2.1 (devam). Hücre Döngüsü Evreleri (Mens ve Ghanbari, 2018).

Hücreyi bölünmeye iten proteinler (büyüme faktörleri) aktive olur.	Çok sayıda replikasyon orijini aktive olur.	DNA sentezi durur, RNA ve protein sentezi devam eder.	Sentrozom dublike olur.
Büyüme için şartlar uygun değil ise döngü geciktirilir ve hücre G0'a fazına girer.	DNA sentezi başlar ve iki katına çıkar.	Sentrozom duplikasyonu tamamlanır.	Yavru kromozomlar meydana gelir.
	Sentrioller kendini eşlemeye başlar.	Organeller çoğalır, iki katına çıkar.	Sitokinez meydana gelir.

Genel anlamda hücreler, büyüme faktörleri, sitokinler ve tümör virüsleri gibi mitojenlerin gönderdiği bölünme sinyallerini alamadıkları zaman G₁ fazına giremezler ve istirahat fazı denilen G₀ fazında beklerler (Pucci vd., 2000; Ho ve Dowdy, 2002). Ökaryotik bir hücre M fazı sonunda G₁ fazına tekrar geçiş yapar ve gelen bölünme sinyali ile birlikte yoluna devam eder ya da bölünme için gerekli şartlar uygun değil ise bölünmeyi durdurarak G₀ (Pasif) fazına girer ve burada saatler, aylar hatta ondan sonraki tüm yaşamı boyunca kalabilir. G₀ fazında olan bir hücre tekrar bölünmeye başlayacak ise döngüye G₁ fazından başlar (Nelson ve Cox, 2005).

Toplam döngü süresi 24 saat olan bir insan hücresi için bu bölünme interfaz ve mitoz aşamaları olmak üzere iki temel aşamadan oluşmaktadır (Çoğulu vd., 2007). Hızlı veya yavaş bölünen hücrelerde farklılık görülse de genel olarak 24 saat süren bir hücre döngüsünde; G₁ fazı ~11 saat, S fazı ~8 saat, G₂ fazı ~4 saat ve M fazı ~1 saat sürmektedir (Cross vd., 1989).

Mitotik evre: Karyokinez (çekirdek bölünmesi) ve sitokinez (sitoplazma bölünmesi) olmak üzere iki temel evreden oluşmaktadır. Mitotik evre sonunda sitoplazma bölünmesi de tamamlanmış olur ve sonuçta birbiriyle özdeş iki yeni yavru hücre oluşur (Campbell ve Reece, 2006). Mitotik evrenin temel karakteristik özellikleri şu şekildedir:

- Mitoz sonucunda iki yeni yavru hücre oluşur. Bu hücrelerin organel çeşitleri aynı iken organel sayıları ve sitoplazma miktarları farklı olabilir.
- Oluşan hücrelerin DNA'larındaki nükleotid dizilimleri aynı olduğundan dolayı kalıtsal özellikleri de tıpa tıp aynıdır.
- Mitoz sırasında kromozom sayılarında değişim görülmez. Yavru hücrelerin kromozom sayıları ana hücre ile aynıdır. Böylelikle mitoz bölünme ile birlikte kalıtsal devamlılık sağlanmış olur.
- Mitoz bölünme tek hücreli canlılarda üremeyi, çok hücreli canlılarda büyümeyi ve gelişmeyi sağlar (Klug vd., 2011).

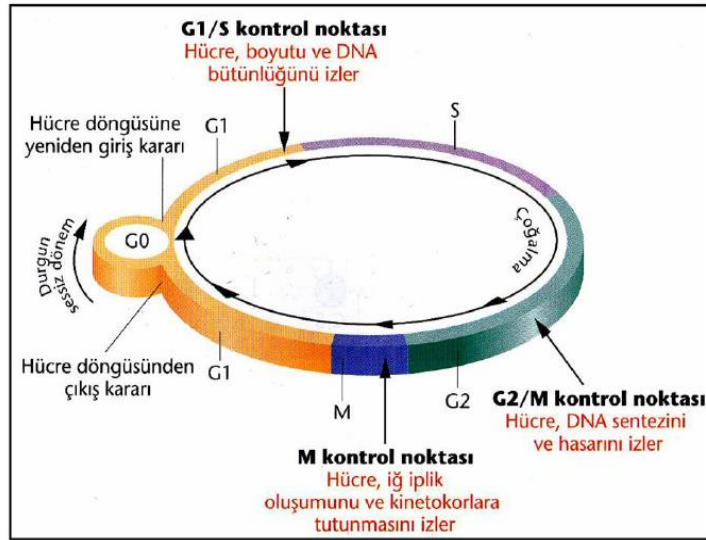
2.3 Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları

Hücre döngüsünün fazları arasındaki ilişkileri sağlamak için hücreler 3 adet kontrol noktasına sahiptir. Kontrol noktaları, hücre döngüsünde yer alan her aşama sonundaki olayların bir sonraki aşamaya geçebilmesi için düzgün ve doğru şekilde tamamlanabilmesini sağlamaktadır (Kastan ve Bartek, 2004). Böylece faz geçişleri sırasında olayların akışına bağlı olarak bir dizi özel protein aracılığı ile hücreye, “DUR!” ya da “DEVAM!” şeklinde sinyaller gönderilir ve döngü mekanizmasının sistemli olarak çalışmasına olanak verilir (Schneider, 1997). Hücre döngüsü kontrol noktaları aşağıda belirtildiği gibidir (Seidel, 2001):

G₁/S Kontrol Noktası: G₁ fazında hücreler bölünme için yeterli büyüklüğü ulaşırsa “DEVAM!” sinyalleri vererek döngünün S fazına doğru ilerlemesini sağlar. Metabolik olaylarda anormallik var ise hücre “DEVAM!” sinyalini alamaz ve döngü G₁ fazında durur, S fazına ilerleyemez ve hücre G₀ fazına girer.

G₂/M Kontrol Noktası: S fazı sonunda DNA replikasyonunda herhangi bir hata olup olmadığını ve hücrenin metabolik aktivitelerinde anormallik olup olmadığını kontrol eder. Hücre bölünmesi sırasında anormallik yok ise hücreye “DEVAM!” sinyali göndererek bir sonraki faza doğru ilerlemesini sağlar.

M Kontrol Noktası: G₂ fazı sonunda kromozomlar iğ ipliklerine düzgün bir şekilde bağlanıp bağlanmadığını kontrol eder. İğ ipliklerinin bağlanmasında sorun yaşanırsa hücre G₀ fazına gönderilir. Eğer anormallik olmaz ise hücreye “DEVAM!” sinyali göndererek bir sonraki faz olan M fazına doğru ilerlemesini sağlar.

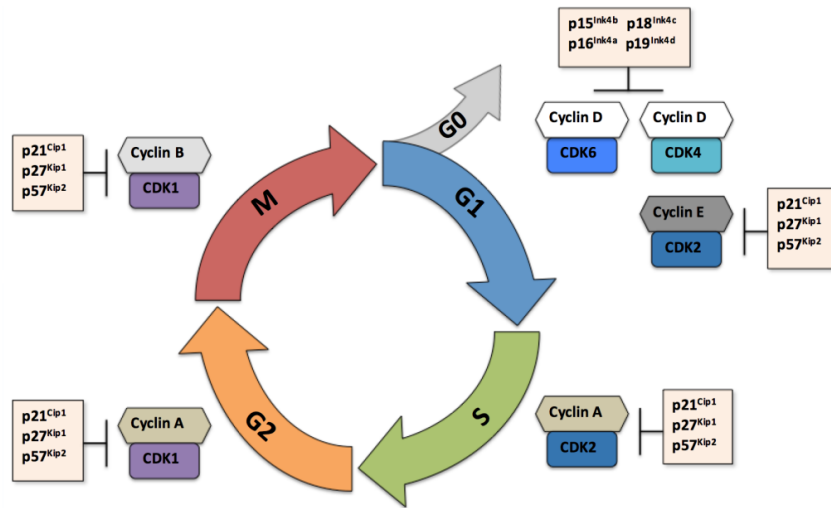


Şekil 2.1. Hücre Döngüsü Kontrol Noktaları (Klug vd.,2011).

2.4 Hücre Döngüsü Düzenleyici Faktörleri

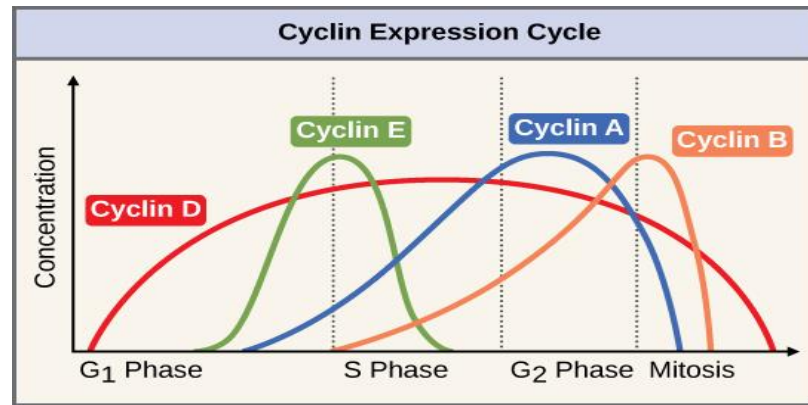
Hücre döngüsünde yer alan G1, S, G2 ve M evreleri;

- Siklinler (Cyclins),
- Siklin bağımlı kinazlar (CDK),
- Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CKI) tarafından kontrol edilir (Kaldis vd., 1998; Mens ve Ghanbari, 2018).



2.4.1 Siklinler (Cyclins)

Hücre döngüsünün aşamaları siklinler (cyclins) olarak da bilinen bir dizi protein ailesi tarafından düzenlenir ve bir grup siklinin görevini tamamlamasından sonra, diğer grup siklin aktif hale gelir (Heuvel ve Harlow, 1993). Bu proteinlerin düzeyleri hücre döngüsünün farklı fazlarında değişiklik gösterir. Siklinlerin fonksiyonları siklin bağımlı kinazları (CDK'lar) aktif etmek olup, hücre döngüsünün belirli fazlarında sistemik olarak sentezlenirler ve görevlerini tamamladıktan sonra siklinlerin düzeyleri hızla düşer (Senderowicz ve Sausville, 2000). Siklinlerin yokluğunda siklin bağımlı kinazlar (CDK) inaktif haldedir. Ancak siklinler, CDK komplekslerine bağlandıklarında katalitik bölge açılır ve katalitik alt birimlerin aktiviteleri 10.000 kat artar (Nelson ve Cox, 2005). Siklinlerin seviyeleri transkripsiyonel düzeyde regüle edilirken, yıkımları ubiquitin yoluyla sağlanmaktadır (Ulukaya, 2001). Literatürde on beşten fazla farklı siklin tanımlanmıştır; hücre döngüsünde ise sırasıyla siklin D, E, A, ve B ortaya çıkar (Vermeulen vd., 2003).



Şekil 2.3. Siklinlerin Hücre Döngüsündeki İfade Düzeyleri (Vermeulen vd., 2003).

2.4.1.1 Siklin D

Cyclin D1, *CCND1* geni tarafından kodlanan 295 amino asitlik bir proteindir. İnsan *CCND1* geni 13.388 baz çifti uzunluğunda olup 11. kromozomun q13 bandında yer alır (Withers, 1991; Inaba, 1992; URL-3). Hücre döngüsünün başlaması cyclin D genlerinin ifade düzeylerine bağlıdır. Cyclin D, G₁/S fazında sentezlenir ve hücre S fazına girdikten sonra yıkılmaya başlar (Sherr, 2000). Büyüme faktörleri veya mitojenlere cevap olarak sentezlenirler. Mitojenler ve büyüme faktörleri ortamdan uzaklaştırıldığında D tipi siklinlerin seviyeleri hızla düşerek yıkılır (Sewify vd.,

2014). *Drosophila*'da bir tane cyclin D proteini bulunurken, farelerde ve insanlarda 3 tip cyclin D bulunur. Bu üç tip homolog siklin proteinleri çoğalan hücrelerde sentezlenir ve bunların miktarları çeşitli hücre tiplerinde farklılık gösterir (Terpstra vd., 1992).

D tipi siklinlerin; D1, D2 ve D3 olmak üzere 3 adet izoformu bulunmaktadır (Aktuğ, 2014). Hangi çeşit cyclin D'nin sentez edileceği dokuların tipine özgüdür. Örneğin, T lenfositler D3 tipini sentez ederler. Genel olarak cyclin D'ler CDK4 ve CDK6'yı regule ederler (Pucci vd., 2000). *CCND1*'in aşırı ekspresyonunun, tümör farklılaşması, artan metastaz ve zayıf sağkalım ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. İnsan tümörlerinin çoğunda cyclin D1'in aşırı ifade edildiği rapor edilmiştir (Ding vd., 2019). Yapılan çalışmalarda, hemen hemen tüm multiple myeloma tümörlerinde üç tip cyclin D geninden birinin düzensizliği saptanmıştır. *CCND2* gen ekspresyonunun *CCND1* veya *CCND3*'ün over ekspresyonuna bağlı olmaksızın multiple myeloma örneklerinin çoğunda up-regüle olduğu bildirilmiştir (Misiewicz-Krzeminska, vd., 2016). *CCND2* gen ifadesinin bozulması, multiple myeloma, T hücreli lenfoma ve kolon gibi kanser tiplerinde görülürken, *CCND3* gen ifadesindeki değişikliklerin multiple myeloma, glioma ve cilt kanser tiplerinde gözlemlendiği rapor edilmiştir (Thanh-Truc vd., 2010).

2.4.1.2 Siklin E

Cyclin E1 proteini, *CCNE1* geni tarafından kodlanmaktadır (Lew vd.,1991). Aşırı ifadesi hipofiz tümörlerinde baskındır (Reincke vd., 2019). Cyclin E'nin aşırı ifadesi, kanser gelişimine yol açmaktadır. Göğüs ve kolon başta olmak üzere birçok kanser türünde etkilidir (Donnellan ve Chetty, 1999). Cyclin E, G1/S fazlarının sınırında geçici olarak sentez edilir ve hücre S fazına girdiğinde hızla yıkılır (Pucci vd., 2000). Cyclin E, CDK2'yi regule eder ve S fazında DNA replikasyonunun başlayabilmesi için cyclin E ile CDK2 arasında aktif bir kompleksin oluşması gerekir (Lew vd., 1991). Bu kompleks için aktif E₂F transkripsiyon faktörüne ihtiyaç duyulur. Aktif E₂F, cyclin E ve DNA polimerazın transkripsiyonunu artırır ve böylece DNA sentezi uyarılır. Cyclin E'nin, E1 ve E2 olmak üzere 2 adet izoformu bulunur. Bu izoformların eksikliğinde G₀'da bekleyen hücreler döngüye giremezler (Aktuğ, 2014).

Cyclin E1, ilk olarak 1991'de tanımlanmış olup 19q12'de *CCNE1* geni tarafından kodlanır. Hücre proliferasyonu ve onkogeneizde çok önemli rollere sahip olduğu bilinmektedir. Cyclin E2 ise 1998'de tanımlanmıştır ve 8q22.1'de *CCNE2* geni tarafından kodlanır. Cyclin E1 ve cyclin E2 proteinlerinin insanda (*homo sapiens*) %69,3'lük yüksek dizi benzerliği gösterdikleri ve benzer rollere sahip oldukları bulunmuştur. Cyclin E1 ve E2'de görülen düzensizlikler, onkogenik transformasyonu ve kanser hücresi proliferasyonunu artırır. Cyclin E1'in meme dışındaki diğer tümör tiplerininin çoğunda ve özellikle timusta cyclin E2'ye göre daha yüksek seviyelerde eksprese edildiği tanımlanmıştır. Cyclin E2'nin ise insan beyinde yüksek seviyelerde eksprese edildiği görülmüş fakat aynı hücrelerde cyclin E1'in belirgin şekilde ifade edilmediği saptanmıştır (Caldon ve Musgrove, 2010).

2.4.1.3 Siklin A

Cyclin A1 proteini, *CCNA1* geni tarafından kodlanmaktadır (Yang vd., 1997). Cyclin A, hücre döngüsü düzenleyici proteinlerinden olan cyclin ailesinin bir üyesidir (Bendris, 2011). 1983 yılında ilk olarak deniz kestanesi embriyolarında görülmüştür (Evans vd., 1983). Cyclin A, S fazı boyunca sentez edilir, anafaz esnasında yıkılır. CDK2 ile kompleks yaparak DNA replikasyonunda rol oynar (Pucci vd., 2000). G₂/M kontrol noktasında E₂F transkripsiyon faktörü, cyclin A'yı transkribe eder ve kontrol noktaları arasındaki geçiş cyclin A-CDK2 kompleksi tarafından sağlanır. Ayrıca cyclin A-CDK2 kompleksi, profaz evresinde gerçekleşen olayları düzenler (Ulukaya, 2001; Aktuğ, 2014).

A tipi siklinlerin, cyclin A1 ve cyclin A2 olmak üzere iki izoformu bulunmaktadır. Cyclin A1'in testis, beyin ve bazı lösemik hücre hattında eksprese edildiği bilinmektedir. Cyclin A1, mayoz ve embriyogenezde önemli bir rol oynar; spermatogenez sırasında testiste yüksek oranda eksprese edilir (Sweeney vd., 1996). Aynı zamanda cyclin A1 geninin hematopoietik kök hücrelerde ve akut miyeloid lösemide yüksek seviyelerde eksprese edildiği bildirilmiştir (Yang vd., 1997). Cyclin A2 ise memelilerdeki ana A tipi cyclin olup bölünen somatik hücrelerde eksprese edilir (Sweeney vd., 1996). Cyclin A2, hem G₁/S kontrol noktasının (CDK2 ile etkileşim yoluyla) hem de G₂/M kontrol noktasının (CDK1 ile) düzenlenmesinde rol oynar (Lara-Pezzi ve Rosenthal, 2010).

2.4.1.4 Siklin B

Cyclin B1 proteini, *CCNB1* geni tarafından kodlanmaktadır (Sartor vd., 1992). Cyclin B, S fazının sonlarına doğru sentez edilir ve G2 fazından M fazına geçerken sentezi en yüksek düzeye ulaşır, ardından anafaz evresi esnasında yıkılır. Böylece hücre mitoz evresinden çıkarak G₁ fazına geri döner. Cyclin B, CDK1 ile kompleks oluşturur ve bu komplekse MPF (“M-phase/maturation promoting factor”, Mitoz aktif edici faktör) adı verilir. Bu kompleks hücre döngüsünün profazdan sonraki evrelere doğru ilerlemesini sağlar. Cyclin B-CDK1 kompleksi Cdc25 olan protein fosfataz tarafından aktive edilmektedir. Kompleksin aktivasyonu ile birlikte çekirdek zarı çözülür ve mitoz başlar (Pucci vd, 2000; Ulukaya, 2001; Aktuğ, 2014).

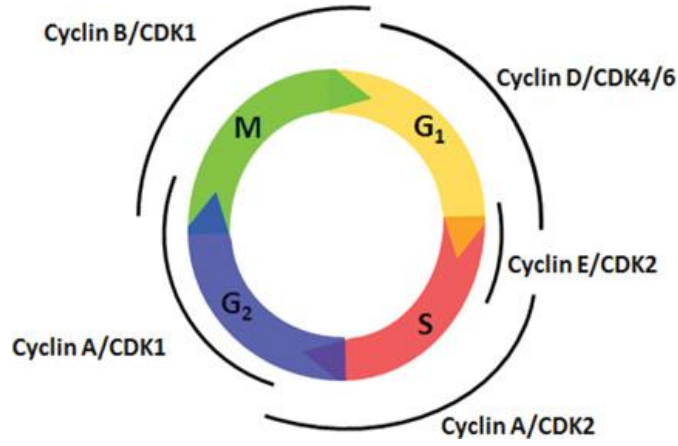
Yapılan birçok araştırmada, farklı kanser tiplerinde hücre döngüsü düzenleme faktörleri olan siklin (cyclin) genlerinin aşırı ifade edildikleri aşağıda belirtildiği gibi rapor edilmiştir (Bai vd., 2017).

- Siklin D1: B-hücre malignitelerinde (lenfoma, myeloma), meme, mesane kanseri,
- Siklin D2: Meme ve prostat kanseri,
- Siklin E: Ovaryum ve lenfoma kanseri,
- Siklin A: Tiroid ve meme kanseri,
- Siklin B: Kolon, tiroid, meme kanseri.

Bir başka araştırmada ise, hücre döngüsü kontrolünde yer alan cyclin D1 geninin aşırı ifadesinin multiple myelomada çoklu ilaç dirençliliğiyle ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Sewify vd., 2014).

2.4.2 Siklin bağımlı kinazlar (CDK’lar)

Memeli hücrelerinde hücre döngüsünün düzenlenmesinde cyclin proteinleri ile birlikte Siklin Bağımlı Kinazlar (CDK’lar) rol oynamaktadır. CDK’lar hücre döngüsünün her evresinde inaktif olarak sentez edilirler ve cyclin proteinlerine bağlanarak aktif hale gelirler (Senderowicz ve Sausville, 2000). Her bir siklin proteini, spesifik bir CDK’ya bağlanarak aktif Siklin/CDK komplekslerini oluşturur (Bai vd., 2017).



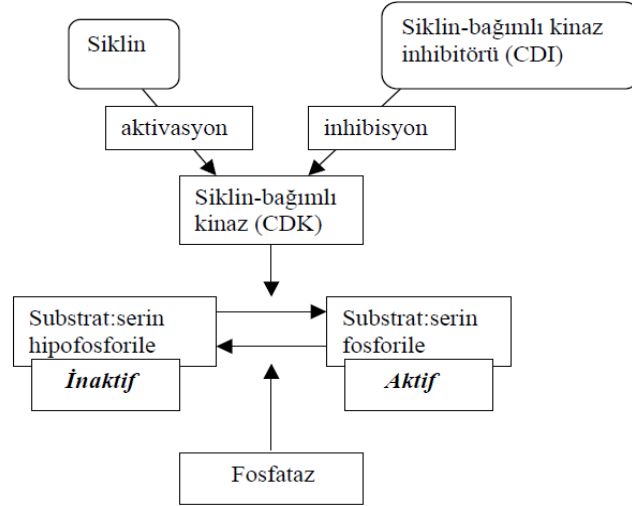
Şekil 2.4. Hücre Döngüsündeki Siklin-CDK Kompleksleri (Suryadinata vd., 2010).

Siklinler ve CDK'lar heterodimerik proteinlerdir. CDK'lar siklinlerin ekspresyonu ile aktif olan serin/ treonine özgü protein kinazlardır. CDK'nın regülatör kısmı "cyclin", katalitik kısmı ise "cyclin dependent kinaz" (CDK) olarak adlandırılır. CDK'lar herhangi bir siklin ile kompleks oluşturmadığı sürece katalitik aktivite gösteremezler. Her CDK farklı bir siklin ile kompleks oluşturur ve hangi proteinlerin fosforile edileceği bu siklinlerin tipine bağlıdır. Hücre döngüsünde CDK1, CDK2, CDK4 ve CDK6 olmak üzere dört tane spesifik siklin bağımlı kinaz proteini görev alır (Ulukaya, 2001; Morgan, 2007).

Çizelge 2.2. Hücre Döngüsündeki Siklin Bağımlı Kinazlar (CDK'lar).

CDK4/6	◦ Cyclin D ile kompleks oluştururlar ◦ Kompleks RB'yi fosforile eder
CDK2	◦ G1 geç döneminde cyclin E ile kompleks oluşturur ◦ G1/S geçişinde rol alır ◦ S fazında cyclin A ile kompleks oluşturur ◦ G2/M geçişini kolaylaştırır
CDK1	◦ Cyclin B ile kompleks oluşturur ◦ G2/M geçişinde rol oynar

CDK'ların fonksiyonları fosforile olma derecelerine ve oluşturdukları komplekslere bağlıdır (Raff, 1996). CDK'lar siklinlerle birleşince aktif olurlarken, siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CDI) ile birleştikleri zaman inaktif olurlar. Aktif halde bulunan formları, substratları fosforiller ve aktifleştirir. Böylelikle substratın aktivasyonuna göre hücre döngüsü durur ya da bir fazdan diğerine geçer (Pucci vd., 2000; Ulukaya, 2001).



Şekil 2.5. Aktif/İnaktif CDK Kompleksleri (Ulukaya, 2001).

Siklin bağımlı kinazlar ile yapılan çalışmalar sonucunda on beşten fazla farklı CDK'nın olduğu bildirilmiştir. Hücre döngüsünde yer alan temel CDK1, 2, 4 ve 6'ya ek olarak bu protein ailesinin alt dalları olan CDK3, 5, 7, 8, 9, 10, 12 ve 13 tanımlanmıştır (Jeronimo vd., 2016). CDK7, hücre döngüsünde görev alan temel CDK'ları (1, 2, 4 ve 6) aktif ederek döngüyü düzenler (Fisher ve Marga, 1994). CDK3, G₀'dan G₁'e geçişte retinoblastoma proteinini (pRB) fosforile eder (Ren ve Rollins, 2004). CDK5, döngüsel olmayan hücrelerde işlev görür (Dhavan ve Tsai, 2001). CDK10, transkripsiyonda görev alır (Guen vd., 2013).

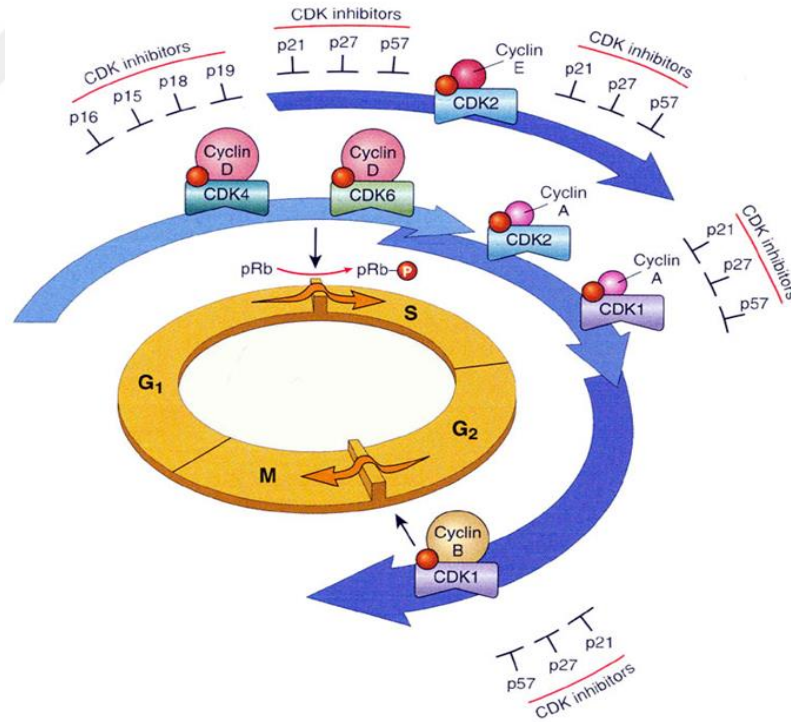
2.4.3 Siklin bağımlı kinaz inhibitörleri (CKI)

Siklin bağımlı kinaz inhibitör proteinleri (CKI), CDK aktivitesini kontrol ederler. Bu proteinler cyclin/CDK kompleksi oluşumunu inhibe ederek DNA replikasyonu ve hücre proliferasyonunu durdururlar. CKI'ler hücre döngüsü boyunca ilerleme, S fazında DNA sentezinin başlaması gibi olayları yönetirler (Hirai vd., 1995). CDK'ların aktivasyonu hücre döngüsünü hızlandırırken, CKI'lerin CDK'ları inhibe etmesi döngüyü yavaşlatır ve inhibe eder. CKI'ler somatik olan hücrelerde, hücre çoğalmasının düzenlenmesini sağlarlar. Bazı CKI'ler G₁ fazında döngünün devam edip etmeyeceğinden sorumludur. (Toshiaki vd., 2017).

Etkiledikleri cyclin/CDK kompleksi ve inhibisyon mekanizmalarına göre iki farklı Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör (CKI) ailesi vardır:

Cip-Kip Ailesi (p21, p27, p57): CDK2'nin cyclin A ve E ile yaptığı kompleksleri baskımlarken, CDK4 ve 6'nın cyclin D ile yaptığı kompleksleri aktive ederler. DNA hasarı olduğuunda p21, p53 tumor supressor gen ile uyarılır ve cyclin/CDK kompleksini inhibe eder, böylece hücre döngüsünü durdurmuş olur. Cip-Kip ailesine ait proteinler, siklinlere ve CDK'lara ayrı ayrı bağlanma özgülüklerine sahip olmalarına karşın siklin-CDK kompleksinin oluşumunda da rol oynarlar (Sherr ve Roberts, 1995, 1999).

INK4/ARF Ailesi (p15,p16,p18,p19): CDK4 ve CDK6'yı inhibe ederler. Bu proteinlerden herhangi birinin CDK4 veya CDK6'ya bağlanması durumunda bu CDK'ların cyclin D ile kompleks oluşturmasını ve bu sebeple de aktif olmasını engeller (Sherr ve Roberts, 1995, 1999; Roussel, 1999). CDK'lar retinoblastomayı fosforile ederler. p16^{ink4} ise cyclin D/CDK4 kompleksine bağlanarak RB'nin inhibitör etkisini kolaylaştırır ve tumor baskılayıcı olarak işlev görür (Lukas vd., 1995; Medema vd., 1995).



Şekil 2.6. Hücre Döngüsünün Düzenlenmesinde Siklinler, CDK'lar ve CKI'ların Rolü (URL-4).

2.4.4 Onkogenler ve tümör baskılayıcı genler

Hücre döngüsü kontrolünde iki tip gen grubu daha rol oynamaktadır. Bunlar:

Onkogenler (BRCA1, BCL2 vb.): Doğrudan ve dolaylı olarak kanser gelişimini indükleyen gen grubudur. Protoonkogenler, sinyal ileti mekanizmalarında rol alan birçok proteinin sentezinden sorumludurlar. Protoonkogenler ve onkogenler, hücre büyümesinin düzenlenmesinde görev alan proteinleri sentezlerler. Protoonkogenler, onkogenlere dönüştüklerinde hücre döngüsünde bozulmalara, kanser hücrelerinin kontrolsüzce çoğalıp büyümelerine sebep olurlar. Hücre döngüsünün çalışmasını bozan onkogenler, gerektiği kadar prolife olamayan hücreleri inhibe eder ve apoptozisi tetikler. Protoonkogenlerin önüne “c” eki (c-Fos, c-Myc) getirilirken, onkogenlerin önüne “v” eki (v-Fos, v-Myc) getirilir (Yokuş ve Çakır, 2012).

Tümör baskılayıcı genler (Retinoblastoma geni, p53 geni): Kanser gelişimini baskılar (Lodish vd., 2000). Tümör baskılayıcı genlerden herhangi birinde mutasyon, hücre büyümesinin baskılanmasını engeller ve böylece tümör oluşur (Yokuş ve Çakır, 2012).

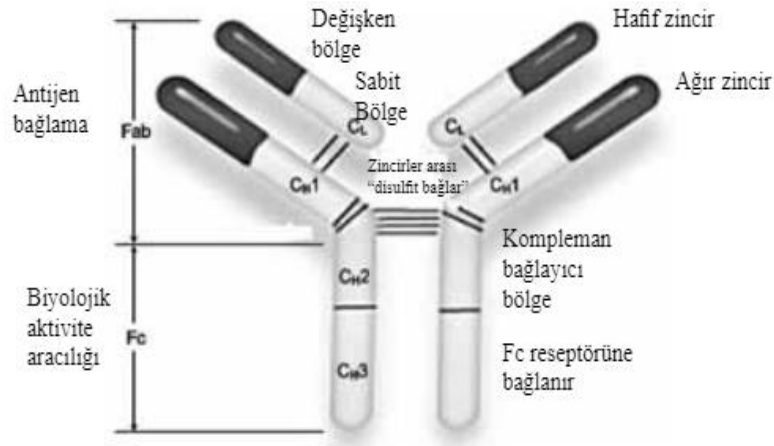
Retinoblastoma (RB): İlk bulunan tümör baskılayıcı gendir. Normal olan retinoblastoma geninde heterizogotluğun kaybı kansere yol açar (Yokuş ve Çakır, 2012). Hücre döngüsünün devamlılığı Rb proteininin fosforillenmesi ile belirlenir. (Kirsch ve Kastan, 1998). Fosforillenmemiş haldeki Rb proteini, E2F transkripsiyon faktörünü bağlar ve inaktifleştirir. E2F'nin inaktifleşmesi sonucu hücre S fazına geçiş yapamaz ve döngü durur (Dyson, 2002).

p53 Proteini: Hücre döngüsünü düzenleyen bir transkripsiyon faktörüdür. Bu protein; hücre büyümesinin durdurulmasında, programlanmış hücre ölümünde (apoptozis), hücre farklılaşmasında ve DNA tamir mekanizmasının başlatılmasında rol alır. p53 geninde mutasyon olursa fonksiyonunu kaybeder ve hücre büyümesinin kontrolü ortadan kalkarak hücre kanserleşmeye gider (Vermeulen vd., 2003).

2.5 Multiple Myeloma

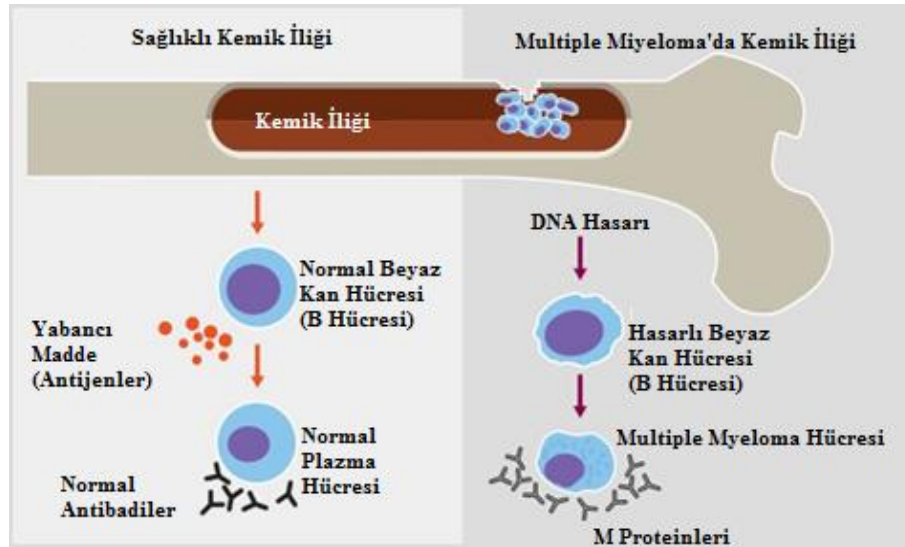
Multiple Myeloma (MM), kemik iliğinde anormal plazma hücrelerinin birikmesi ile karakterize edilen ikinci en yaygın hematolojik kanser türüdür (Raab vd., 2009). En tehlikeli kanser türleri arasında kanser ölümlerinin %2'sini oluşturur (Zaidi ve

Vesole, 2001). MM, kemik iliğindeki plazma hücrelerinde bulunan anomalilerden kaynaklanır. Multiple myelomada, belli bir plazma hücresi (bir klon) çok yüksek sayılarda kopyalanarak, monoklonal protein veya M-protein adı verilen bir immünoglobülin türünün aşırı miktarda oluşturulmasına neden olur (Kyle, 2003). Normal plazma hücreleri enfeksiyonlara karşı immünoglobulin olarak da adlandırılan antikorlar üretirken, MM'de bulunan anormal plazma hücreleri paraprotein (M-protein) adı verilen antikorlar üretmektedir. Vücutta farklı türlerde plazma hücreleri bulunur ve her bir plazma hücresi yalnızca bir türde immünoglobülin oluşturur. Sonuçta çok çeşitli ve farklı türlerde immünoglobülinler meydana gelir. Memelilerde 5 farklı tip (IgG, IgA, IgD, IgE ve IgM) immünoglobulin tanımlanmıştır. İmmünoglobulinler, ağır (μ , δ , γ , ϵ , α) ve hafif zincirlerden [kapa (K) ve lambda (λ)] oluşurlar. Normal bir antikor molekülü Şekil 2.6'da görüldüğü gibi 2 ağır, 2 hafif zinciri olan ve her bir zincir bir değişken (V) ve bir sabit (C) bölge içeren toplamda dört adet polipeptit zincirinden meydana gelir (Abbas vd., 2015).



Şekil 2.7. İmmünoglobulinlerin Yapısı (URL-5).

MM, normal plazma hücrelerinde gerçekleşen mutasyonlar sonucu bu hücrelerin anormal plazma hücrelerine dönüşmesi ile meydana gelir. MM, diğer kanser hücreleri gibi tümör halinde bulunmak yerine bölünme ve çoğalma gibi metabolik olaylarını kemik iliği içinde gerçekleştirir. MM, yetişkin bireylerde omurga, kafatası, leğen kemiği, göğüs kafesi vb. kemik iliğinin aktif olduğu bölgelerde bulunur ve bu nedenle multiple myeloma olarak adlandırılır. MM'in kemik yıkımı, kemik iliği çevresinin değişmesi, anemi, böbrek yetmezliği, anjiyogenezin artması, bağışıklığın baskılanması gibi birden fazla klinik görünümü vardır (URL-6).



Şekil 2.8. Normal Plazma Hücreleri İle MM'in Karşılaştırılması (Multiple Myeloma Research Foundation [MMRF], 2015).

Multiple myeloma, 13. ve 14. kromozomlardaki translokasyonları içermektedir. Bu translokasyonların yarısı, immünoglobulin ağır zincirde yer alan onkogenleri içermektedir. Bu nedenle çoğu MM'de her üç siklin D (D1, D2, D3) geninin birinde çeşitli mutasyonlar gözlemlenir (Kyle vd., 2003; Hideshima vd., 2004; Campo vd., 2011). MM'in patogenezi için açıklamak üzere yeni bir model önerilmiştir. Bu modele göre iki tane patogenezi yolu tanımlanmıştır. İlk yolda, hiperdiploid olmayan tümör hücrelerinin çoğunda Ig ağır zincir (IgH) translokasyonlarına ve 13. kromozomun kaybına rastlanılmıştır. İkinci yol ise kromozom 13'ün delesyon sıklığı ile IgH'nin transkripsiyonu ile ilgilidir. Her iki model de cyclin D geninin düzensizliğini içermektedir. Hastalarda en sık rastlanılan M-protein tipi IgG iken en az rastlanılan tip ise IgE'dir. IgA kemik dışı hastalıklar ile ilgiliyken, IgD plazma hücreli lösemi ve böbrek hasarlarıyla ilişkilidir (Alexander vd., 2007).

2.5.1 Multiple Myeloma epidemiyolojisi

MM, tüm kanserlerin %1'ini oluştururken, hematolojik kanserlerin %15'ini oluşturmaktadır (Siegel vd., 2015). Genellikle ortalama 65-75 yaş aralığında görülür. Hastaların %35'i 65 yaş altı iken %28'i 65-74 yaş arasında ve kalan %37'lik kısım 75 yaşın üzerindedir. MM, ABD'deki tüm hematolojik kanserlerin yaklaşık %10'unu oluşturan yıllık 14.000-15.000'lik bir insidansa sahiptir (San vd., 1999; Collins, 2005; Raab vd., 2009). Türkiye'de ise bu oran yıllık ortalama 3 bindir (Lag vd., 2002; Horner vd., 2009). Erkeklerde kadınlardan iki kat daha sık görülür. MM

duyarlılığı yaşlanma süreci ile birlikte artmaktadır ve siyah ırklı insanlarda beyaz ırklılara göre iki kat daha fazla görülmektedir (Mitsiades vd., 2004; Sirohi ve Powles, 2004).

2.5.2 Multiple Myeloma etiyolojisi

MM'in etiyolojisi henüz tam bilinmemektedir. Uzun süre radyasyona maruz kalan insanlarda multiple myelomada artış gözlenmiştir (Riedel ve Pottern, 1992). Yapılan araştırmalara göre daha önceleri geçirilmiş olan enfeksiyonların ve alerjik hastalıklarında MM'e neden olabileceği ileri sürülmüştür (Kyle ve Rajkumar, 2009). Kötü olan sosyoekonomik ortamlar da multiple myeloma ile ilişkili çevresel faktörlerden biridir (Dispenzieri vd., 2004). MM, insan herpes ve HIV virüsü enfeksiyonları, tüberküloz ve kronik osteomyelit gibi hastalıklarda daha sık görülmektedir (Isomaki vd., 1978; Lichtenstein vd., 1995).

2.5.3 Multiple Myeloma evreleri ve patogenezi

1975 yılından itibaren multiple myelomalı hastaları sınıflandırmak için Durie-Salmon evreleme sistemi kullanılmaktadır ve evreleme sistemi kemik lezyonlarının sınıflandırılmasında önemlidir. Greipp ve arkadaşları'da 2005 yılında 11.171 hasta üzerinde uluslararası bir evreleme sistemi geliştirmiştir. Evrenin yanı sıra asıl prognostik faktörler, immünoglobulin ağır zincir translokasyonları, karyotiplemede gerçekleşen delesyon 13 ve hipodiploididir. Böylece Greipp ve arkadaşları bu faktörlerden en az birinin multiple myelomalı hastalarda görülmesini yüksek riskli olarak sınıflandırmışlardır. Bu çalışma ile hastalarda bulunan 5 yıllık sağkalım süresi ile yüksek risk sınıfında bulunan hastalar karşılaştırılmıştır ve buna göre yüksek risk sınıfındaki hastaların sağkalım sürelerinin 2-3 yıl olduğu gözlemlenmiştir (Durie ve Salmon, 1975; Greipp vd., 2005). Multiple myelomanın başlangıç noktası sebebi bilinmeyen monoklonal gamopatidir (MGUS) ve saptanabilmesi için 109 tane klonal plazma hücresine gereksinim vardır. MGUS'lu kişiler zamanla myeloma veya plazma hücre bozukluklarına dönüşebilir. Non-IgM MGUS, %1 oranında multiple myelomaya dönüşebilmektedir. M - protein düzeyi ≥ 30 g/L ise ya da kemik iliği %10 plazma hücresi içeriyorsa, asemptomatik myeloma olarak adlandırılır. Asemptomatik myeloma gösteren hastaların idrarlarında az miktarda M-proteini olabilirken serumda normal immünoglobulin konsantrasyonunda azalmalar

görülebılır (Kyle ve Greipp, 1980). Asemptomatik myeloma olan hastalar MGUS ile benzerlik gösterir fakat serumdaki M-protein seviyesi ≥ 30 g/L olduğu için veya kemik iliğinde $\geq \%10$ plazma hücresi bulunduğu için teşhisi zordur. Asemptomatik myelomaların birçoğunda semptomatik myeloma gelişir bu nedenle hastalar yakın takibe alınmalıdır (Kyle vd., 2003; Dispenzieri vd., 2007). 2009 yılında yapılan iki ayrı çalışmaya göre multiple myeloma olguları MGUS evresinden geçerek semptomatik multiple myeloma dönüştüğü gösterilmiştir. Bu iki araştırmaya göre semptomatik myelomanın 2-10 yıl kadar öncesinde MGUS saptandığı bildirilmiştir. Monoklonal gamopati (MGUS) bireylerdeki izlenimlere göre multiple myeloma, MGUS'li olguların yarısında ilk başlarda hiç değişmeden daha sonralarında ise ani bir dönüşüm şeklinde ortaya çıkmıştır. Diğer yarısında ise kademe kademe ilerleyerek semptomatik myeloma halini almıştır (Landgren vd., 2009; Weiss vd., 2009). Multiple myelomanın oluşumunda patolojik olaylar da etkilidir. Genel olarak neoplazi örnek verilebilir ve hastalığın MGUS'den ortaya çıkışı ile evrelerin ilerlemesi gösterilebilir (Kuehl ve Bergsagel, 2002; Bergsagel vd., 2005). Kronik antijenik uyarım, viral enfeksiyonlar, pestisitler ve genetik gibi faktörler MM patogenezinde yatkınlık olarak belirtilmektedir. Ayrıca MM'de kromozom translokasyonları ve kromozom kayıpları da görülmektedir. Genetik lezyonların birçoğu MGUS'lu kişilerin aile bireylerinde de görüldüğü saptanmıştır. Buna göre ailesel genetik riskler 2-4 kat fazla bulunmuştur (Altieri vd., 2006; Broderick vd., 2011). Yapılan diğer araştırmalarda HIV-1 (+) olan bireylerde plazma hücrelerinde monoklonal artış gözlenmiştir (Konrad vd., 1993). Bir başka araştırmada ise insan herpes virüsü tip-8'in multiple myeloma ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Berenson ve Vescio, 1999). Multiple myelomada spesifik bir kromozomal anormallik yoktur, birden fazla anormallik görülebilir (Feinman vd., 1997). Yapısal anormallikler arasında en sık rastlanılan translokasyon; t(8;14) (q24;q32) ve t(11;14) (q13;q32)'dir. 8q24 bandı c-myc'yi ve 11q13 bandı bcl-1 protoonkogenlerini tanımlarken, 14q32, Ig ağır zincir geninin lokusudur. MM'de 14q32 anomalisi tanı olgularının %30-50'sinde görülmektedir (Greil vd., 1991; Hallek vd., 1998).

Multiple myeloma patogenezindeki etkenler aşağıda belirtildiği gibidir:

Sitogenetik ve kromozom anomalileri: Hastalığın seyrini etkileyen en önemli faktördür. MM'de kromozom anomalileri hipodiploidi ve hiperdiploidi, kromozom 1 ve kromozom 13 anomalileridir. Sitogenetik anormallikler 3. evrede görülmektedir.

Bu oran tanı sırasında %20-60 iken, 3. evrede %90'a çıkmaktadır (Çevigen, 2005; Durak ve Gülbaş, 2008).

Hücre döngüsü bozuklukları: Cyclin D geninin ekspresyonundaki artışlar, p16'da gerçekleşen mutasyonlar ve p53 kaybı gibi olayların MM patogenezinde büyük rolü vardır. Mutasyonlar ve kromozomal translokasyonlar da MM patogenezinde önemli rol oynarlar (Dispenzieri vd., 2004; Yıldız, 2005).

Kemik iliği mikroçevresi: Kemik iliğinin hücresel ve protein bileşenleri MM patogenezinde önemli rol oynar. Yapılan çalışmalarda kemik iliği mikro çevre hücreleri ile plazma hücreleri arasında patolojik bir ilişki olduğu da gözlemlenmiştir. Myeloma hücrelerinin ekstraselüler matrikse adezyonu, bu hücrelerin çeşitli sitokinlerin salınımına aracılık ederken proliferasyonda ve anjiogeneizde de önemli roller oynar (Dispenzieri vd., 2004; Özsan, 2008).

Sitokinler ve sinyal ileti sistemi: MM'de kemik iliğindeki plazma hücreleri, myeloma hücrelerine farklılaşır. Olgunlaşmamış B hücreleri, olgun plazma hücrelerine dönüşürken DNA'da oluşabilecek herhangi bir bozunma B hücrelerinin genetik yapısının bozulmasına sebep olmaktadır. Bu nedenle Ig ağır zincir (IgH) bölgesinde yer alan 14q32 gen lokusunda değişiklikler olmaktadır (Sirohi ve Powles, 2004).

2.5.4 Multiple Myeloma'da tanı ve tedavi

Multiple myeloma tanısında rutin testler, kemik iliği incelemesi ve görüntüleme yöntemleri olmak üzere 3 adet tanı yöntemi bulunmaktadır. Uygulanan testler tarama, tanı koyma, prognoz belirlenmesi ve organ hasarının değerlendirilmesi amacıyla kullanılmaktadır (Bolaman, 2008). MM'de kullanılan tanı kriterleri 2003 yılında Uluslararası Myeloma Çalışma Grubu (IMWG) tarafından oluşturulmuştur. IMWG, 2014 yılında multiple myeloma tanı kriterlerini revize etmiştir. MM tanısında, yapılan kemik iliği biyopsisi sonucu monoklonal plazma hücre oranının minimum > %10 olması gerekmektedir (Kyle, 2003). Organ hasarı bulunan MM'li hastalara yeterli tedavi uygulanmalıdır. Bu tedavi genelde tam iyileşmeyi sağlamasa da modern tedavi yöntemleri 75 yaşına kadarki hastalar için 5 yıllık sağkalım oranını %50'nin üzerine çıkarabilmeyi başarmıştır (Pulte vd., 2015). MM tedavisinde en çok tercih edilen yöntem kemoterapidir ve günümüzde klinikte kullanılan en yaygın

kemoterapötik ilaçlar proteozom inhibitörleri olan bortezomib (Velcade) ile deksametazondur. Bazı durumlarda bu ilaçlar siklofosamid, adriamisin ya da talidomid (VTD) ile birleştirilerek kombine olarak da verilir. Avrupa İlaç Ajansı 2013 yılının Ağustos ayında gerçekleştirdiği bir çalışma sırasında daha öncesinde tedavi görmemiş hastalar üzerinde 3-6 döngülük bortezomib ile uyguladığı indüksiyon tedavisi sonrasında bu hastaların %75-80'inde MM'i kontrol altına almayı başarmıştır. Amerika Birleşik Devletleri'nde lenalidomid ve deksametazonu birleştiren indüksiyon tedavisi Avrupa onayı almıştır (Gerecke vd., 2016). Talidomid, bortezomib ve lenalidomid'in geliştirilmesi ile birlikte tedavi yaklaşımları büyük ölçüde öneme sahip olmuştur. 65 yaş üstü hastalar için melfalan/prednizon (MP) hala kullanılsa da trasplantasyona uygun olmayan hastalarda MP'den daha büyük ölçüde etki eden melfalan/prednizon/talidomid (MPT) ve bortezomib/melfalan/prednizon (VMP) kombinasyonları kullanılmaktadır. 2007 yılında yapılan bir çalışmada MP ile MPT'yi karşılaştırılmış ve MPT'nin tedaviye daha çok yanıt verdiği ayrıca sağ kalımı arttırdığı gözlenmiştir. Yaş ortalamaları 71 olan 682 hastayı kapsayan daha büyük bir çalışma sonucunda, VMP kombinasyonunun MP kombinasyonuna göre daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür (Facon vd., 2007). Hastalarda tedaviye yanıt, sağ kalım ve hastalığı kontrol altına alma oranlarının hepsi MP ilaç stratejisine göre daha büyüktür. Bu çalışma ile birlikte VMP ilaç protokolü standart tedaviye nazaran büyük bir üstünlük göstermiştir (San Miguel vd., 2008). Tekrarlayan multiple myeloma tedavisi yaşa ve önceki tedaviye bağlıdır. Nükseden multiple myelomada, M-proteini yavaş yavaş artıyorsa tedaviye hemen başlanmayabilir, ancak organ hasarında ya da M-proteininde hızlı bir artış varsa tedaviye hemen başlanmalıdır (Bladé vd., 2015). Proteozom inhibitörleri, immünomodülatör maddeler ve klasik kemoterapi ajanları, tekrarlayan multiple myeloma tedavisinde çok önemlidir. Proteozom inhibitörü olan bortezomib, tekrarlayan ve dirençli multiple myelomalı hastalarda en çok kullanılan ilaçlardan biridir (Richardson vd., 2005). Bortezomib, 2001 yılında Dana-Farber Kanseri Enstitüsü'nde Kenneth Anderson'ın laboratuvarlarında yapılan deneylerde, pre-klinik çalışmalarda myeloma hücrelerine karşı etkili olduğu görülmüş ve 2002 yılında ilk faz 1 çalışmaları sonucunda şaşırtıcı derecede anti-myeloma aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır. 2003 yılında yapılan bir başka çalışmada ise ilk faz 2 denemesi ile tedaviye yanıt vermeyen ve tekrarlayan 202 multiple myeloma hastasına uygulanmıştır. Bu hastaların yaklaşık 67'si bu tedaviye ortalama 1 yıl sağ

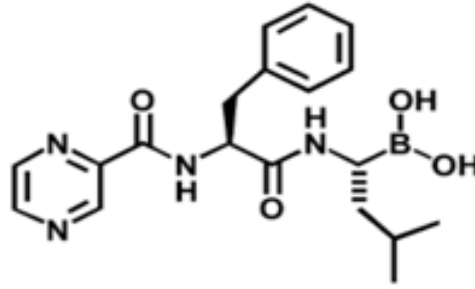
kalım ile cevap vermiştir. Böylece 2003 yılı Mayıs ayında bortezomib multiple myeloma tedavisinde kullanılmak üzere US Food and Drug Administration (FDA) tarafından onaylanmıştır. 2005 yılında yapılan başka bir çalışma ile tekrarlayan MM'li hastalarda bortezomibin tek başına deksametazona göre daha iyi sonuçlar verdiği görülmüştür (Hideshima vd., 2001; Orlowski vd., 2002; Richardson vd., 2003; Richardson vd., 2005).

2.6 Bortezomib

Bortezomib (PS-341, Velcade), dipeptid boronik asit analogu olan, antitümör özelliğe sahip bir proteozom inhibitörüdür (Şekil 2.9.). Bortezomibin proteozomları inhibe etmesi, hücre döngüsünün durmasına yol açan, apoptoza neden olan ve anjiyogenezi inhibe eden çeşitli hücre sinyal iletim yollarını bozar. Yapılan çalışmalar, bortezomibin transkripsiyonel faktör NF-kB'nin aktivasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir. Bu etkiyi, NF-kB'nin hücre içi inhibitörü I-kB'nin proteozomal yıkımını engelleyerek gerçekleştirir. Bortezomibin apoptozu indüklemesi ve proliferasyonu baskılaması hücrelerin kemoterapiye karşı duyarlılıklarının artmasına neden olur. Bortezomib bu özelliğinden dolayı hematolojik kanserlerin tedavisinde yaygın bir şekilde kullanılır. Bortezomib, 2003 yılında ilk olarak multiple myelomanın 3. basamak tedavisi için FDA tarafından onaylamıştır (Ma vd., 2003; Mitsiades vd., 2003; Blade vd., 2005; Richardson vd., 2005; Kane vd., 2007).

Proteozom inhibisyonu kanser tedavilerinde kullanılan hedefe yönelik bir yöntemdir. Doğal ve sentetik olarak kullanılabilen proteazom inhibitörleri spesifik olarak kanser hücrelerine etki ederler ve tümörjenez ile metastazda görev yapan düzenleyici proteinlerin yok edilmesini engeller. Bu sayede hücre içinde bu proteinlerin dengesizliğine neden olurken, tümör hücresinin sinyal yollarının sistematik aktivasyonuna da müdahalede bulunur ve böylelikle hücre replikasyon inhibe edilerek sonuçta apoptozis başlatılmış olur. İnsan klinik deneylerinde kullanılan ilk proteazom inhibitörü bortezomibtir (PS-341, Velcade). Hücre içi ubiquitin-proteozom yolağının çalışmasını inhibe eder ve MM hücrelerinde çeşitli yollarla apoptozisi uyarak kemoterapik etki gösterir. Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) tarafından 60 kanser hücre hattında yapılan bir çalışma sonucunda bortezomibin çoklu insan tümörlerine karşı in vitro olarak önemli bir sitotoksositeye sahip olduğu gösterilmiştir (Adams vd., 1999). Çalışma sonrasında, bortezomibin

çeşitli kanser tiplerinde fare ksenograft modellerinde kullanılmasına olanak sağlayarak tümör hacmini düşürdüğü bildirilmiştir. Ayrıca çeşitli kemoterapi ajanları ile birlikte kullanıldığında insan ksenograftlarında tümör hücrelerini öldürücü etkisinde arttığı gösterilmiştir (Shah vd., 2001; Cusack vd., 2001; LeBlanc vd., 2002; Pink vd., 2002). Bortezomibin kanser hücrelerini öldürmesinde hücre adezyonunun bozulması, sitokin yollarının kesilmesi, angiogenезin inhibe edilmesi ve pro-apoptotik genlerin upregülasyonu gibi birden fazla mekanizma görev alır (Brüning vd., 2011). Bortezomib ayrıca DNA onarım mekanizmasında görev alan genlerin transkripsiyonu gibi direnç yollarını ve mekanizmalarını upregüle ederek bozar. Multiple myeloma için günümüzde çeşitli tedavi seçenekleri geliştirilmeye devam ederken bortezomib halen MM tedavisinde kullanılan en etkin kemoterapötik ilaçlardan birisidir (Cusack, 2003; Jung vd., 2004; Pandit, 2005; Blade vd., 2005; Dmoszyńska, 2008).

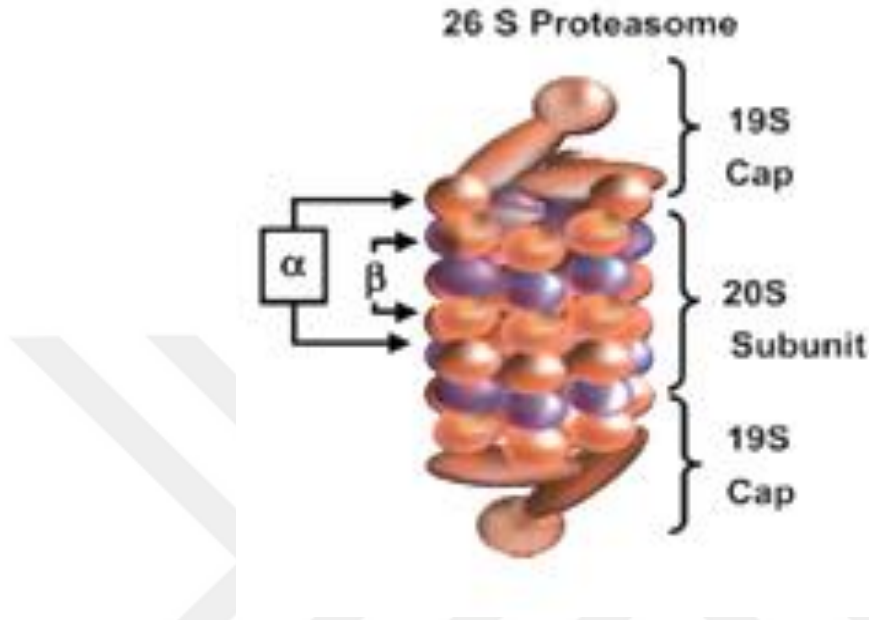


Şekil 2.9. Bortezomib'in Kimyasal Yapısı (MA: 384.24 g / mol) (Huber vd., 2015).

2.6.1 Proteazom kompleksi

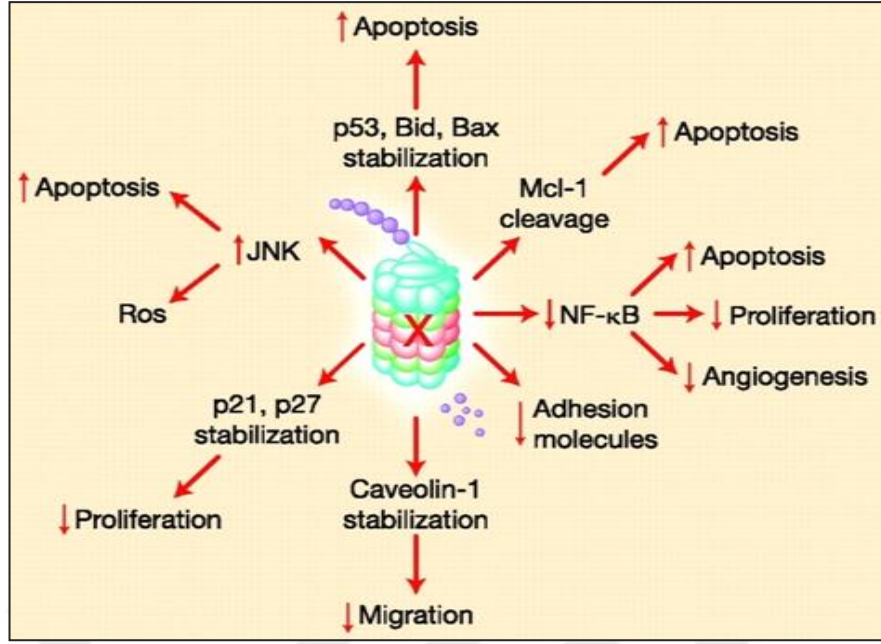
Proteazom, 2000 kDa'luk bir proteazdır. Ayrıca 20S çekirdek içeren katalitik bir birimdir ve her iki ucunda yıkılma için işaretlenmiş olan ubiquitin proteinleri tanır (Kisselev ve Goldberg, 2001; Hideshima vd., 2003; Zheng vd., 2009). Proteazom kompleksi, hücre döngüsünün kontrolü, hücresel adezyon, proliferasyon, sağkalım ve apoptoz gibi temel hücresel fonksiyonların düzenlenmesinde rol alan hücre içi proteinlerin yıkımından sorumludur. Proteazom inhibitörü olan bortezomib, 20S proteozom kompleksinin $\beta 5$ alt ünitesine bor atomuyla bağlanarak proteozomu inhibe eder (Matthews vd., 1989; Adams vd., 1998; Glickman ve Ciechanover, 2002; Kupperman vd., 2010). Hücre döngüsü düzenleyici proteinler ubiquitin ile etiketlenir ve daha sonra 26S proteazomu tarafından bozunur (Adams, 2003; 2004). 26S proteazomu, apoptoz gibi hücre döngüsü proteinlerinin bozunması için gerekli olan

ubikitin-proteazom yolunun önemli bir bileşenidir ve hasar görmüş proteinleri hidrolize eder. Ubikitin-proteazom yolunun inhibisyonu antikanser tedavileri için önemli bir hedeftir (Voorhees vd., 2003; Adams ve Kauffman, 2004; Burger ve Seth, 2004; Goy ve Gilles, 2004).



Şekil 2.10. 26S Proteozomun Yapısı (Mateos ve Miguel, 2007; Roodman, 2009).

Ubikitin-proteazom yolu ile bozulan proteinler arasında siklinler, p21 ve p27 gibi sikline bağımlı kinaz inhibitörleri ve p53 tümör baskılayıcı gen bulunur (Adams vd., 2000; Myung ve Kim, 2001). 26S proteazomunun inhibisyonu, bu substratların birikmesine ve bu sebeple hücre döngüsünün bozulmasına neden olur. Böylece birçok yol ile birlikte hücre ölümünü destekler. Bunun nedeni yüksek oranlardaki hücrel replikasyonun yanı sıra, proteazom inhibisyonunun hücre döngüsü düzenleyici proteinlerinin üzerindeki etkilerden de kaynaklanıyor olabileceği düşünülmektedir (Schenkei, 2002; Voorhees vd., 2003; Richardson vd., 2003). Bortezomib, hücre içi ubikitin-proteazom yolağının çalışmasını inhibe eder ve böylece MM hücrelerinde çeşitli yollarla apoptozisi uyararak kemoterapik etki gösterir (Blade vd., 2005).



Şekil 2.11. Bortezomib-Proteozom İnhibisyonunda Gerçekleşen Olaylar (Wright, 2010).

Çizelge 2.3. Proteazom İnhibitörü Tarafından Bozularak Hücre Döngüsüne Katılan Proteinler (Adams vd., 2000; Adams, 2003; Adams ve Kauffman, 2004).

Protein sınıfı	Proteinler	Fonksiyonları
Siklinler	Siklin A, B, D ve E	Hücre döngüsü ilerlemesi
Sikline Bağımlı kinaz inhibitörleri	s21, s27	Siklin aktivitesinin düzenlenmesi
Tümör baskılayıcılar	P53	Transkripsiyon faktörü
Onkogenler	c-myc, N-myc	Transkripsiyon faktörü
Pro- ve antiapoptotik faktörler	Bax Bcl-2	Proapoptoz faktörü Apoptoz inhibitörü

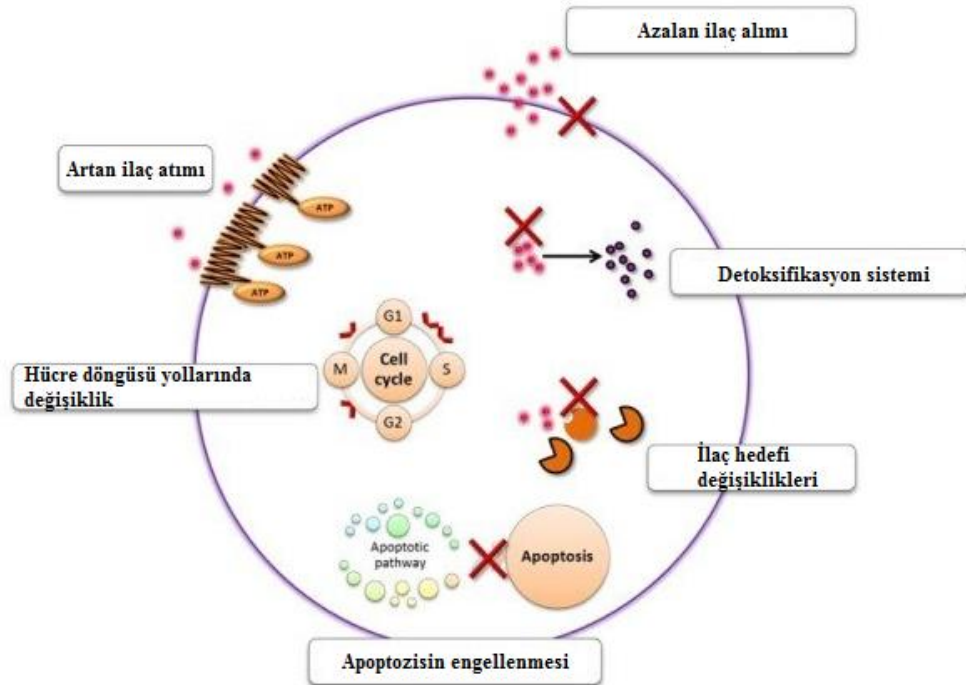
2.7 Kanserde İlaç Dirençliliği

Kanser dünyada en fazla ölüme neden olan hastalıklardan birisidir. Kemoterapi, kanser tedavisinde uygulanan en yaygın ve etkili yöntemdir. Bununla birlikte, kemoterapi süresince, hastaların tedaviye cevap vermemesi veya tedavi sonrası kanserin tekrarlanması sıklıkla görülen bir durumdur. Kanser tedavisinde başarıya ulaşmak için genellikle birden fazla antikanser ilacı uygulanmaktadır. Ancak, sonradan kazanılan ya da tedavi öncesi kişide var olan ilaç dirençliliği, kanser kemoterapisinde başarıya ulaşmayı büyük ölçüde engellemektedir. Kemoterapiye karşı geliştirilen dirençlilik pek çok antikanser ilacın hastalar üzerinde beklenen

etkisini gösterememesine ve hastalığın tedavi edilememesine neden olmaktadır. Kanser tedavilerinde sağkalımı arttırabilmek için birden fazla anti-kanser ilaç kullanılmaktadır. Dirençliliğin aksine ilaçların dozları arttırıldığı zaman olası yan etkiler çıkmakta ve böylece tedavide giderek zorlaşmaktadır (Tomida ve Tsuruo, 2001; Aksoy, 2010). Bu duruma “çoklu ilaç dirençliliği” (Multiple-Drug-Resistance; MDR) denilmektedir (Krishan vd., 1997; Gottesman vd., 2002; Yague vd., 2007; Lage, 2008; Baguley, 2010; Shaffer vd., 2012; Saraswathy ve Gong, 2013).

Şekil 2.12.’de görüldüğü gibi; kemoterapötik ilaçlara karşı direnç çeşitli mekanizmalarla olabilmektedir (Kapse-Mistry vd., 2014).

- Anormal ilaç taşınımı
- Apoptozisin baskılanması
- Hücre döngüsü düzenleyici faktörlerindeki değişiklikler
- Sinyal yollarında bozulma
- Artan DNA tamiri
- Detoksifikasyon sistemlerin aktivasyonu
- İlaç hedeflerinde meydana gelen değişiklikler



Şekil 2.12. İlaç Dirençlilik Mekanizmaları (Stella vd., 2010).

Tüm kanser türlerinde olduğu gibi Multiple Myeloma' da da sonradan kazanılan ya da tedavi öncesi kişide var olan ilaç dirençliliği, terapiyi büyük ölçüde engellemektedir. Multiple myelomada, bortezomib uygulaması ilk başlarda başarılı olsa da, daha sonra gelişen ilaç direnci genellikle hastalığın ölümle sonuçlanmasına neden olmaktadır. Kemoterapiye karşı geliştirilen dirençlilik pek çok anti-kanser ilacın hastalar üzerinde beklenen etkisini gösterememesine ve hastalığın ilerlemesine neden olmaktadır. Bortezomib dirençliliği, ilk defa tedavi görmüş hastalarda görülmüş olup klinik çalışmalar bu etkinin bortezomib dirençliliğinin doğal ya da sonradan edinilmiş olduğunu göstermektedir. Ayrıca bu dirençliliğin nedeninin proteazomun aşağı yolaklarında gerçekleştiği düşünülmektedir (Sonneveld vd., 1994; Oerlemans vd., 2008; Kale ve Moore, 2012; Schmitt vd., 2014). Kanserle ilgili yapılan çalışmalar hücre döngüsü düzenleme faktörlerinde meydana gelen değişikliklerin MM'de ilaç direncinin oluşumunda önemli olduğunu göstermektedir. Bu değişiklikler sonucunda hücre döngüsündeki genlerin ifadesi yüksek oranda artmakta, böylece uygulanan ilaç tedavisine rağmen kanser hücreleri çoğalmalarına devam ederek ilaca karşı direnç geliştirmektedirler (Bai vd., 2017).

3. MALZEME ve YÖNTEM

3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Genler

Hücre kültürü için kullanılan: L-Glutamine RPMI-1640 besiyeri, Penisilin/Streptomisin, Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS), Fetal bovine serum (FBS) Capricorn Scientific'den, dimetilsülfoksit (DMSO) NZYTech'den, Agaroze ve Etyenediaminetetraasetik asit (EDTA) Sigma'dan, MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] Serva'dan, trypan blue (%0,4), PureLink® RNA Mini Kit, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit ve RNase İnhibitor, Beta Actin (VIC MBG Probe), Taqman Gene Expression Master Mix, Life Technologies'den ve Bortezomib (Velcade 3.5mg) Millenium Pharmaceuticals Incorporated'den temin edildi.

3.2 Hücre Hatlarının Çoğaltılması ve Dondurulması

Tez çalışması kapsamında, JCRB Cell Bank'tan (Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank) temin edilen multiple myeloma KMS-20 (bortezomibe dirençli) ve KMS-28 (bortezomibe hassas) hücre hatları kullanıldı.

Bu hücre hatları 37°C su banyosunda çözüldü ve ortamdaki DMSO'nun uzaklaştırılabilmesi için phosphate buffered saline (PBS) eklenerek oda sıcaklığında 800 g'de 5 dk 2 kez santrifüj edildi ve ardından yıkandı. Hücrelerin çoğaltılması için %10 fetal bovine serum (FBS), %1 penisilin/streptomisin, L-glutamin ve RPMI-1640 içeren besiyeri hazırlanarak 7mL'si alındı. Alınan besiyeri 15mL'lik falkonlar da hücre ile süspanse edildi ve 25 cm²'lik flakslara ekimi yapıldı. Hücre hatları 37°C'de %5 CO₂ ve %95 nem varlığında CO₂ etüvünde çoğaltıldı.

Kontaminasyon riskini en aza indirip, çoğalma hızını arttırabilmek için düzenli olarak besiyeri değişikliği yapıldı. Sonuç olarak hücre sayılarında ve canlılık oranlarında değerlendirilebilir bir artış gözlemlendi. Hücreler çoğalıp, hücre flaskının yüzeyini kapladıktan sonra 25 cm²'lik flakslardan alınarak 75 cm²'lik hücre flakslarına pasajlandı. Flakslarda çoğalan hücreler canlılık ve miktar tayini yapılmak üzere trypan blue boyası kullanılarak inverted mikroskopta incelendi. Dondurma işlemi için sırasıyla %20 hücre besiyeri, %10 dimetilsülfoksit (DMSO) ve %70 FBS içeren media ve canlı hücreler falkon tüplerine alınarak süspanse edildi. Falkon

tüplerinde bulunan hücreler 1.5×10^5 – 2×10^6 hücre/mL olacak şekilde karyoviyal tüplere dağıtıldı. Ardında donma işleminin basamakları için KMS-20 ve KMS-28 hücre hatları sırasıyla 24 saat -20°C ' de bekletildikten sonra ertesi gün -80°C ' de 24 saat bekletildi ve ardından yedek hücre bankaları oluşturulmak üzere sıvı azot tankına alındı. Dondurulan hücreler tekrar kullanıma açılacağı zaman tanktan çıkarılarak 37°C 'de su banyosunda çözöldü ve besiyeri eklenerek CO_2 etüvüne konuldu.

3.3 Hücre Canlılığının Saptanması

Çoğalan hücrelerin canlılıklarının tespiti için trypan blue (tripan mavisi) boyası kullanıldı. Hücreler PBS ile yıkanarak uygun hacimde besiyeri ile süspanse edildi ve süspanse edilen hücrelerden 10 μL alındı, üzerine %0.4 trypan blue'den 10 μL eklendi. Hücreler, 5 dakikalık inkübasyonun ardından thoma lamına alınarak inverted mikroskopta mL'de canlı hücre sayımı yapıldı. Trypan blue sadece ölü olan hücrelerin, hücre zarından geçebildiği için ölü ve canlı hücreler inverted mikroskop kullanılarak kolayca ayrılabilir (Doyle ve Griffiths, 1998). Canlı hücre sayılarını ve % canlılıklarını belirlemek için aşağıdaki formüller (3.1), (3.2) kullanılmıştır.

$$\text{Toplam Canlı Hücre Sayısı} = HS \times SF \times 10 \times 10^4 \quad (3.1)$$

HS: Ortalama Canlı Hücre Sayısı

SF: Sulandırma Faktörü

% Canlılığın belirlenebilmesi için aşağıdaki formül kullanılmıştır;

$$\% \text{ Canlılık} = \left(\text{Canlı Hücre} \frac{\text{Sayısı}}{\text{Toplam}} \text{Hücre Sayısı} \right) \times 100 \quad (3.2)$$

3.4 Hücre Proliferasyon Analizi / MTT Testi

3.4.1 Bortezomib dozunun belirlenmesi

Multiple miyeloma hücre hatlarında antikanser ilacı olarak kullanılan bortezomibin sitotoksik etkileri incelendi. KMS-20 ve KMS-28 hücre hatlarının her birine bortezomibin artan konsantrasyonları uygulanarak IC_{50} değerleri saptandı. KMS-20

ve KMS-28 hücre hatları için; 1, 5, 7.5, 10, 20, 30, 50 ve 100nM konsantrasyonlarda bortezomib kullanıldı.

3.4.2 MTT testi

MTT testi, formazon boyalarının ya da MTT azalmasına bağlı olarak enzimatik aktivitenin kolorimetrik ölçümüne dayanan hücre çoğalma miktarının tespit edildiği bir yöntemdir (Bahuguna vd., 2017). Bu test ile mitokondriyal aktiviteyi belirleyen canlı hücreler MTT' yi formazan kristallerine dönüştürür. MTT testi ilaçların hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkilerinin ölçümünde büyük rol oynar (van Meerloo vd., 2011). MTT testi ile açık sarı renkli olan tetrazolyum tuzu enzimatik olarak koyu mor-mavi renkli formazana dönüşür. Optimize koşullardaki absorbans değeri canlı hücre sayısı ile orantılıdır (Grela vd., 2018).

MTT Çözeltilisinin Hazırlanışı: 0,06g MTT tartıldı ve 15 ml'lik falkona alındı. 12ml DPBS eklenerek hiç partikül kalmayacak şekilde vorteks yardımıyla karıştırıldı. Karıştırma işleminden sonra 0,22mM'lik filtreden geçirildi ve ışıktan korunmasını sağlamak amacıyla falkonun etrafı alüminyum folyo ile sarılarak +4°C'lik buzdolabında saklandı.

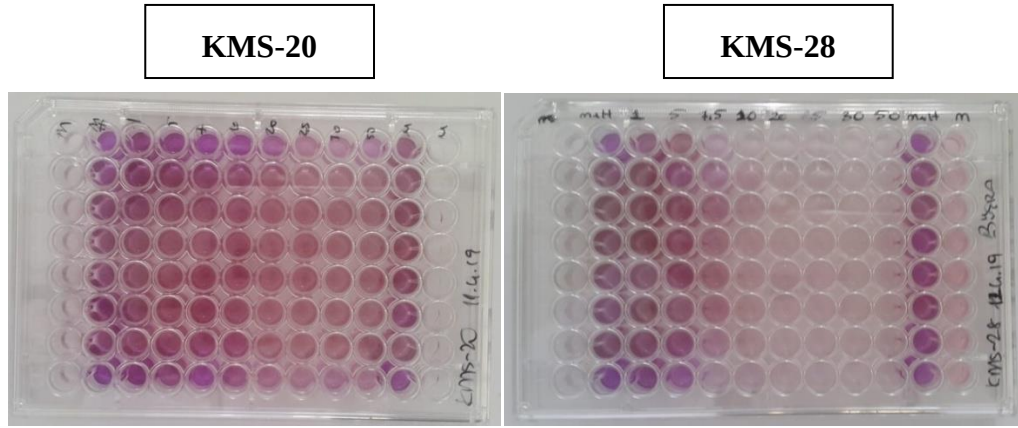
Testin Yapılışı:

1.Gün: Hücreler DPBS yardımıyla besiyerlerinden uzaklaştırıldı ve trypan blue yardımıyla hücre sayımı gerçekleştirildi. Deney için kullanılacak 96 kuyucuktan oluşan pleyt için gerekli olan 10×10^6 sayıdaki hücre 15 ml'lik falkona alındı ve toplamda 10 ml'ye tamamlanacak şekilde üzerine besiyeri eklendi. 96'lık pleytin ilk ve son kuyucuğuna 100µL sadece besiyeri konulurken, diğer kuyucuklara 100µL besiyeri+hücre konuldu. Tez çalışması kapsamında 100µL besiyeri konulan kuyucuklar kontrol amaçlı kullanılmıştır. Pleytin üzerine çalışılan hücre hattının ismi, çalışmaya başlanan tarih ve saat yazılarak 24 saat boyunca 37 °C' de ve %5'lik CO₂ etüvünde inkübe edildi. Böylece bortezomib ilacını ilave etmeden önce hücrelerin metabolik aktivitelerini kazanmaları sağlandı.

2.Gün: Stokladığımız bortezomib içerisinden 1mM alındı ve steril su ile 1/10 sulandırılarak önceden belirlenen konsantrasyonlar hazırlandı. 24 saat beklendikten sonra ilk ve son kuyucuklara kontrol olarak kullanıldığından dolayı sadece 100µL

besiyeri konulurken diğer kuyucukların hepsine toplamda 100µL olacak şekilde ilaç+besiyeri ilave edildi. İlavelerin ardından pleyt 24 saat inkübe edilmek üzere inkübatöre kaldırıldı.

3.Gün: Bortezomib ilacının hücrelere 24 saatlik muamelesinin sonunda 96'lık pleytte yer alan tüm kuyucuklara önceden hazırlanmış MTT çözeltisinden 20µL konuldu. Daha sonra pleyt 4 saatlik inkübasyon için inkübatöre kaldırıldı. 4 saat sonunda pleyt inkübatörden çıkarılarak 1000 RPM'de 10dk santrifüj edildi. Santrifüjün ardından dibe çöken hücrelerin üzerinde kalan besiyeri pipet yardımıyla alındı. Hücreler MTT konulduğunda oluşan kristallerin DMSO yardımıyla çözünerek mavi-mor renk alması için son bir inkübasyon işlemine gerek duymaktadır. Bu nedenle işlemin ardından her kuyucuğa 100 mikrolitre olacak şekilde DMSO ilave edilerek inkübatörde 10dk inkübasyonu sağlandı. 10dk sonra pleyt inkübatörden çıkarılarak ChroMate marka ELISA cihazına konuldu ve 492nm dalga boyunda hücrelerin absorbans değerleri ölçüldü. Sonuçta her hücre hattı için ayrı ayrı 24 saatlik birbirinden bağımsız üçer tekrar olacak şekilde deneyler yapıldı ve her üç çalışmanın ortalamaları alındı. Microsoft Excel programı ile bortezomib dozuna karşılık % hücre canlılık grafikleri oluşturuldu.



Şekil 3.1. Bortezomibin KMS-20 ve KMS-28 Hücre Hatlarındaki MTT Sonuçları.

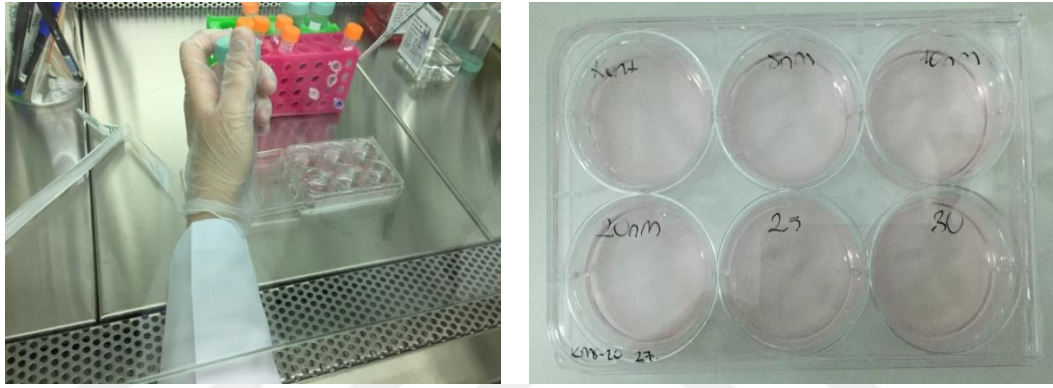
3.4.3 IC₅₀ değerlerinin belirlenmesi

KMS-28 ve KMS-20 hücre hatlarının %50 oranında inhibe oldukları konsantrasyonlarının (IC₅₀) saptanabilmesi için, Microsoft Excell programı kullanılarak uygulanan bortezomib konstantrasyonlarının 10 tabanına göre logaritması alındı ve bortezomibin hücre hatlarındaki IC₅₀ değerleri hesaplandı.

3.5 RNA İzolasyonu

3.5.1 Hücre ekim aşaması

1.Gün: KMS-20 ve KMS-28 hücre hatları için 24 saatlik sürelerde olmak üzere ayrı ayrı 6 kuyucuklu pleytlere her bir kuyuya 10×10^6 hücre gelecek şekilde 2ml hücre+besiyeri konuldu. RNA izolasyonu aşamasında, KMS-20 ve KMS-28 hücre hatları için IC_{50} değerlerinin altında ve üstünde olacak şekilde 5 farklı konsantrasyon (5; 10; 20; 25 ve 30nM) belirlendi. Pleytler etiketlendi ve çoğalmak üzere 24 saatlik inkübasyon için $37^{\circ}C$ 'ye ve %5 CO_2 'ye ayarlanmış inkübatöre kaldırıldı.



Şekil 3.2. RNA İzolasyon Aşaması İçin Hücre Ekimi ve Bortezomib Dozlarının Uygulanması.

2.Gün: 24 saat sonra her bir kuyuya 2ml olacak şekilde bortezomib+besiyeri eklendi. Kontrol grubuna ise sadece 2ml besiyeri ilave edildi. KMS-20 ve KMS-28 hücre hatlarında RNA izolasyonu gerçekleştirildi.

PureLink® mini RNA izolasyon kiti protokolüne göre sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulanmıştır:

- 1) Hücreler 15 ml'lik falkonlara alındı ve önceden ayarlı santrifüjde 2000 devirde $4^{\circ}C$ 'de olacak şekilde santrifüj edildi. İşlem 2 kez tekrarlanarak üst faz hücreden uzaklaştırıldı.
- 2) Öncede hazırlanmış ve içerisinde %1'lik 2- merkaptoetanol olan Lizis Buffer çözeltisinden 0,06ml alınarak tüm tüplere konuldu, vorteks yardımıyla çözülene kadar karıştırıldı.
- 3) Her tüpe 1:1 hacimde %70'lik etil alkol ilave edilerek vortekste karıştırıldı.

- 4) Falkonlarda bulunan hücrelerden 700µL alındı ve koleksiyon tüplerine konuldu.
- 5) Alınan hücreler oda ısısında 12.000 devirde 15 saniye olacak şekilde önceden ayarlı santrifüje alınarak santrifüj edildi ve alt faz uzaklaştırıldı. İşlem 2 kez tekrarlandı.
- 6) Koleksiyon tüplerinin her birine 700µL %100'lük etanol içeren Wash Buffer 1 ilave edildi. Hücreler oda ısısında 12.000 devirde 15 saniye santrifüj edildi. Alt faz uzaklaştırıldı.
- 7) Hücreler yeni koleksiyon tüplerine alınarak üzerlerine 500µL Wash Buffer 2 ilave edildi. Oda ısısında 12.000 devirde 15 saniye santrifüj edilerek alt faz uzaklaştırıldı.
- 8) Koleksiyon tüplerinde bulunan örnekler üzerlerine bir şey eklenmeden oda ısısında 2 dakika boş şekilde santrifüj edildi ve RNA'nın membrana bağlanması sağlandı.
- 9) İşlemin ardından koleksiyon tüpleri toplama tüpleri ile değiştirildi.
- 10) Toplama tüplerinin her birine 50 ml RNase-Free sudan eklendi ve oda ısısında 1dk inkübasyon yapıldı. Inkübasyonun ardından tüpler 12.000 devirde 2 dakika santrifüj edildi. İşlem 2 kez tekrarlandı.

İzolasyon işlemi tamamlandı ve RNA'ların miktarı Nanodrop 2000 (Thermo) cihazı ile saptandı. İzole edilen RNA'lar gen ifadesi çalışması için -80 °C'ye kaldırıldı.

3.5.2 RNA miktarlarının NanoDrop ile ölçümü

İzole edilen RNA'ların miktarları, Thermo Fisher Scientific NanoDrop 2000 cihazı ile ölçüldü. 260, 280 ve 230 nM dalga boylarında sırasıyla nükleik asit, protein değerleri ve kontaminasyonları belirlemek amacıyla ölçüm yapıldı. RNA'ların saflığı 260 nM'deki absorbansın diğerlerine bölünmesi ile hesaplanmaktadır. Optimize bir RNA izolasyonunda 260/280 ve 260/230 oranlarının ~2.0 ve ~1.8 olması beklenmektedir. Bu konsantrasyonlara göre ise cDNA sentezinde kullanılacak olan RNA miktarları aşağıdaki gibi hesaplanmıştır:

$$RNA\ Miktarı \left(\frac{\mu g}{mL} \right) = A_{260} \times SF \times 40 \frac{\mu g}{mL} \quad (3.3)$$

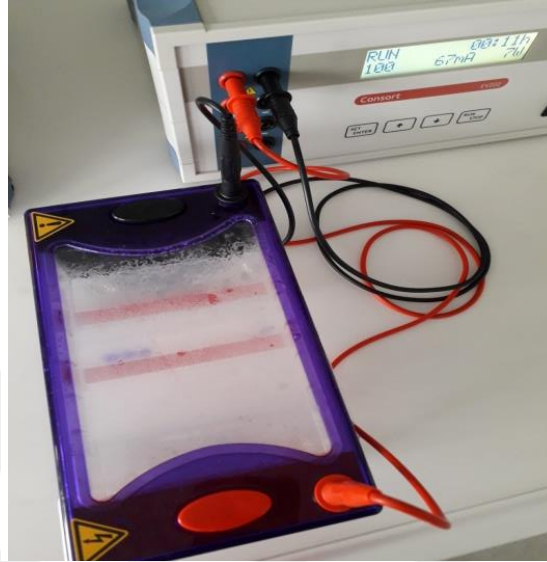
A₂₆₀ = 260 nm'daki Absorbans Değeri

SF = Sulandırma Faktörü

40 µg /mL = RNA' nın Ortalama Katsayısı

3.6 Agaroz Jel Elektroforezi

RNA saflığının belirlenmesi ardından izole edilen RNA'lar, belirlenen saflığın kontrolü amacıyla 1X Tris-Borat-EDTA (TBE, pH: 8,3) tamponu aracılığıyla %1'lik agaroz jel elektroforezi yapıldı. Jel üzerindeki bantlar Etidyum Bromür ile boyanarak jel görüntüleme cihazında (UVITEC Cambrige) görüntülendi.



Şekil 3.3. Agaroz Jel Elektroforezinin Uygulanması.

3.7 Gen İfade Düzeylerinin Belirlenmesi

3.7.1 Komplementer DNA (cDNA) eldesi

Thermo Fisher Scientific cDNA Reverse Transcription Kit protokolüne uygun olarak çalışma kapsamında kullanılacak her bir RNA'dan 1 µg alınarak üzerleri nükleaz-free su ilavesiyle 10µl'ye tamamlandı. Çalışma devamında 2µL 10x RT buffer tamponu, 0,8µl dNTP mix, 2µL random primer, 1µl reverse transkriptaz enzimi ve 4,2µL RNase free su ependor içerisinde karıştırılarak toplamda 20µl olacak şekilde hazırlanan örneklerin her birine 10µl master mix alındı ve 10µl örnek RNA'sı ilave edildi. Master mix protokol şartlarına uygun şekilde buz üzerinde yapılarak primer ile enzimin ışık almaması sağlandı. Tamamlanan tüplerdeki tüm örnekler PCR cihazına yerleştirildi. Amplifikasyon basamakları sırasıyla 25°C'de 10 dk, 37°C'de 120 dk, 85°C'de 5 dk ve soğuma 4°C'de ∞ olacak şekilde ayarlanarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. NanoDrop 2000 cihazı ile elde edilen cDNA'ların miktarları ölçüldü

ve ardından Real Time PCR (RT-PCR) işleminde kullanılmak üzere -20 °C’ deki dondurucuda saklandı.

3.7.2 Real-Time PCR (qRT-PCR) analizi

Kantitatif gerçek zamanlı RT-PCR (qRT-PCR) gen ifadesinin ölçümünde en etki yöntemlerden biridir ve PCR reaksiyonu boyunca amplifikasyon ürünlerinin sentezlenmesi için floresan raportör moleküller kullanılır. qRT-PCR, nükleik asit amplifikasyonunu tek bir homojen deneyde birleştirir böylece jel elektroforezine olan ihtiyacı ve Southern blot veya DNA sekanslama ihtiyacını da ortadan kaldırır. Ayrıca qRT-PCR bitkilerde gen ekspresyonunu izlemede, birbiri ile yakın olan genlerde gen ekspresyonunu ayırt etmede ve genlerin transkript seviyelerinin ölçümünde sıkça kullanılmaktadır (Gachon vd., 2004; Czechowski vd., 2004; Bustin vd., 2005). RT-PCR, DNA kopyalarını datalar haline dönüştürür ve mRNA miktarının saptanmasında en sık kullanılan yöntemlerden biridir. RT-PCR, tek nokta mutasyonları, DNA hasarı, patojen belirleme ve kromozom bozukluklarının tespiti gibi birden fazla alanda kullanılmaktadır (Kubista vd., 2006). PCR reaksiyonlarında verimli nicel verilere ulaşabilmek için primerlere bağlı veya primerlerden bağımsız floresan işaretleyiciler kullanılmaktadır.

Tez çalışması kapsamında elde edilen cDNA’lar kalıp olarak, genlerin TaqMan primer problemleri ile diğer gerekli moleküller ve enzimler kullanılarak Real-time-PCR gerçekleştirildi. Sonuç olarak, uygulanan bortezomibe karşı KMS-20 ve KMS-28 multiple myeloma hücre hatlarında β -aktin endojen kontrol genine göre, hücre döngüsü kontrol noktalarıyla ilgili cyclin D1, cyclin D2, cyclin A1, cyclin B1 ve cyclin E1 genlerinin ifade düzeyleri saptandı [Livak ve Schmittgen, 2001; LightCycler® Real-Time PCR System Application manual (Anonymous, 2016)].

Real-time PCR Analizinde Kullanılan Genlerin Primer / Problemleri:

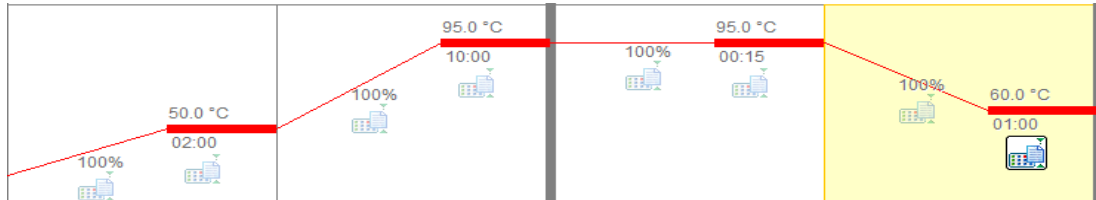
- Cyclin D1 geni: TaqMan Gene Expression Assay Hs00765553 _ m1, (FAM-MGB)
- Cyclin D2 geni: TaqMan Gene Expression Assay Hs00153380 _ m1, (FAM-MGB)
- Cyclin A1 geni: TaqMan Gene Expression Assay Hs00171105 _ m1, (FAM-MGB)

- Cyclin B1 geni: TaqMan Gene Expression Assay Hs01030099 _ m1, (FAM-MGB)
- Cyclin E1 geni: TaqMan Gene Expression Assay Hs01026536 _ m1, (FAM-MGB)
- β -Actin geni (Endojen Kontrol): TaqMan Gene Expression Assay Hs01060665 _ g1, (VIC-MGB)

Gen ekspresyonu deneyleri Q2000B Thermal Cycler Real-Time PCR (Long Gene) cihazı ile yapıldı. KMS-20 ve KMS-28 hücre hatlarından sentezlediğimiz cDNA örnekleri için iki ayrı deney ve her bir deney için üç tekrar yapıldı. Çizelge 3.1.'de qRT-PCR için gerekli olan optimum reaksiyon şartları ve Şekil 3.5.'de reaksiyon için kullanılan amplifikasyon basamakları gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. qRT-PCR için gerekli olan optimum reaksiyon şartları.

Gen Grubu	1 μ L
PCR Master Mix	10 μ L
RNase Free Su	6 μ L
cDNA	3 μ L
Toplam Hacim	20 μ L



Şekil 3.4. qRT-PCR reaksiyonunda gerçekleşen amplifikasyon basamakları.

3.7.3 Real-Time PCR reaksiyon ürünlerindeki katlık değişim (RQ) oranlarının belirlenmesi

Real-time_PCR ürünlerindeki floresan ışımlar Ct (Cycle threshold) olarak gösterilir. Her bir gen için belirlenen Ct değerlerinin hücrede her zaman ifade olan referans bir gene (β - aktin) göre karşılaştırılması gereklidir. Böylece çalışılan genlerin β - aktin kontrol genine göre ne kadar ifade edildiği belirlenir (Δ Ct). Daha sonra bortezomib uygulanan grupların Δ Ct değerleri kontrol grubu Δ Ct değerlerinden çıkarılarak çalışılan gen ile kontrol grubu arasındaki farklılık ($\Delta\Delta$ Ct) değeri belirlenir. Gruplar

arasındaki katlık değişim oranı $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (3.4a) ya da (3.4b) formüllerine göre belirlenir.

Tez kapsamında, çalışılan genlerin kontrol genine göre ifade düzeylerindeki katlık değişim (RQ) oranları $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne (3.4a) göre hesaplandı.

$$\text{Gen ifade Düzeyi} = RQ_{(\text{Relative Kantitasyon})} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (3.4a)$$

$$\Delta Ct_{\text{Çalışma grubu}} = Ct_{(\text{Hedef gen})} - Ct_{(\text{Referans gen})}$$

$$\Delta Ct_{\text{Kontrol grubu}} = Ct_{(\text{Hedef gen})} - Ct_{(\text{Referans gen})}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Çalışma grubu}} - \Delta Ct_{\text{Kontrol grubu}}$$

$$\Delta\Delta Ct = \text{Çalışma grubu} [Ct_{(\text{Hedef gen})} - Ct_{(\text{Referans gen})}] - \text{Kontrol grubu}$$

$$[Ct_{(\text{Hedef gen})} - Ct_{(\text{Referans gen})}] \quad (3.4b)$$

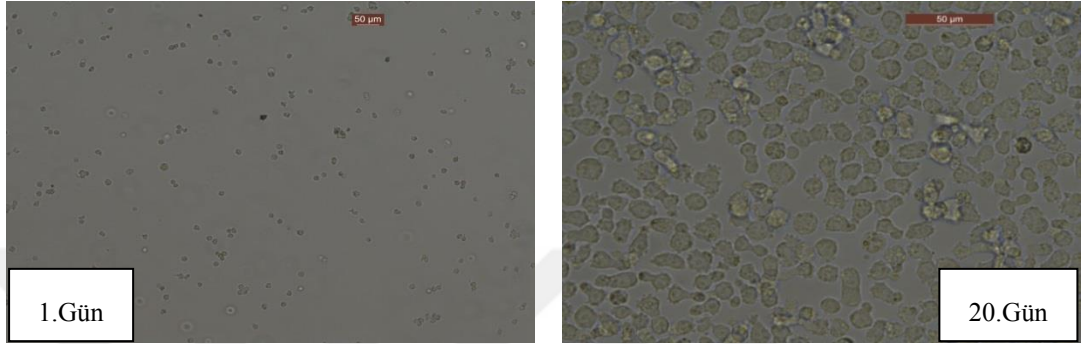
3.8 İstatiksel Analiz

Multiple myeloma KMS28 (bortezomibe hassas) ve KMS20 (bortezomibe dirençli) hücre hatlarında bortezomib dozunun artırılmasına bağlı olarak hücre döngüsü kontrol noktalarındaki genlerin ifadesindeki değişiklerin istatiksel analizi için öncelikle Microsoft Excel programında, β -aktin endojen kontrol genine (referans gen) göre her bir genin ΔCt değerleri belirlendi. ΔCt değerleri Microsoft Excel programında hesaplanarak IBM SPSS Statisticcs 21 programına aktarıldı. $\Delta\Delta Ct$ değerleri P (<0,05) olacak şekilde One-way ANOVA testi ile belirlendi (Livak ve Schmittgen, 2001).

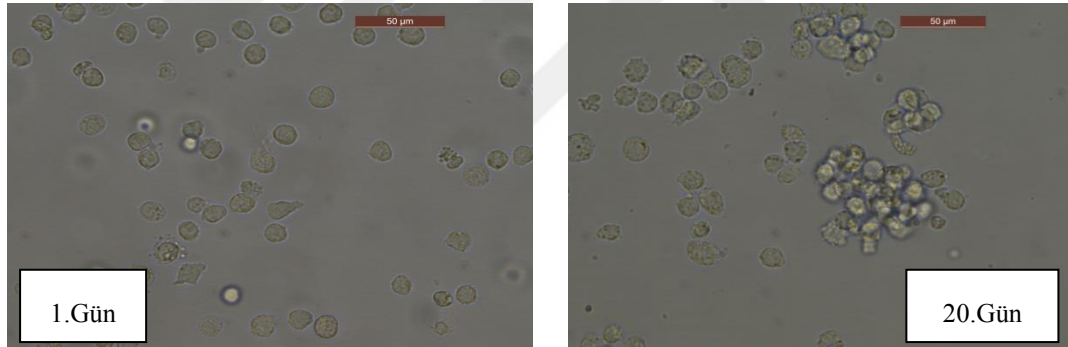
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Multiple Myeloma Hücre Hatlarının Çoğalması

KMS28 ve KMS20 hücre hatları optimum koşullarda (%5 CO₂ ve 37 °C’de) etüv içerisinde çoğaltıldı. Yeterli sayıya ulaşan hücrelerin 1. ve 20. gün sonundaki mikroskop görüntüleri Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’de yer almaktadır.



Şekil 4.1. KMS-28 (bortezomibe hassas) Hücrelerinin Çoğalma Görüntüleri.



Şekil 4.2. KMS-20 (bortezomibe dirençli) Hücrelerinin Çoğalma Görüntüleri.

4.2 MTT Testi Sonuçları

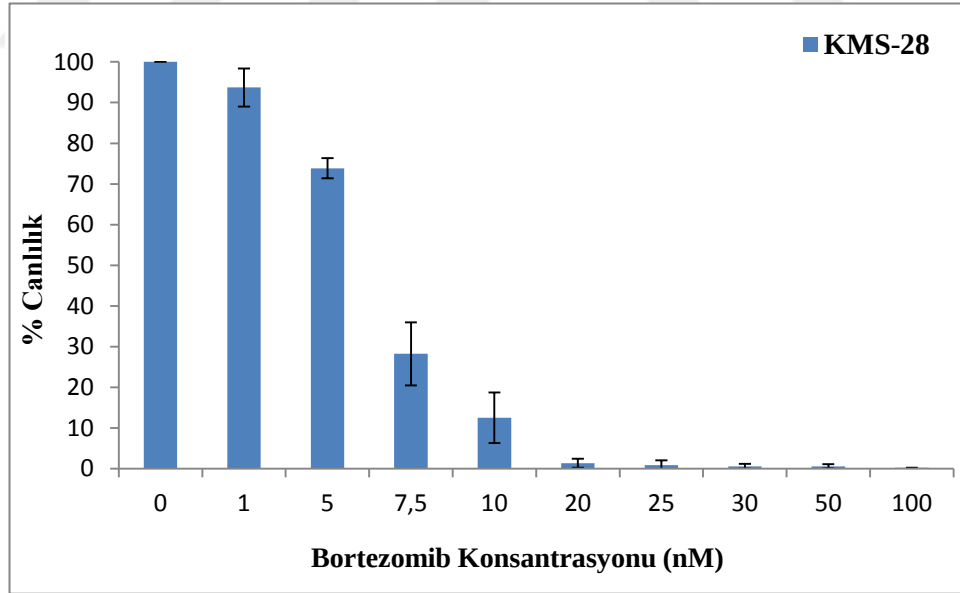
Tez çalışması kapsamında, KMS-28 (bortezomibe hassas) ve KMS-20 (bortezomibe dirençli) hücre hatlarının % canlılığı MTT testi ile saptandı. Chromate ELISA cihazı kullanılarak 492 nm dalga boyunda MTT testlerinin sonuçları ölçüldü ve Microsoft Excel programı yardımı ile uyguladığımız artan bortezomib dozlarına karşılık % hücre canlılığı verileri hesaplandı. Yapılan deneylerde uygulanan bortezomib konsantrasyonlarına karşı hücrelerin % canlılık değerleri kontrol gruplarının (sadece hücre içeren) canlılıkları %100 alınarak karşılaştırıldı. Her iki hücre hattı için 24 saatlik süreçte yapılan ve farklı zamanlarda gerçekleştirilen üçer ayrı deney sonuçlarının ortalamaları alınarak IC₅₀ değerleri hesaplandı.

4.2.1 KMS-28 hücre hattındaki MTT sonuçları

Yapılan MTT analizine göre KMS-28 hücre hattına uygulanan bortezomib dozlarına karşılık elde edilen % hücre canlılık oranları Çizelge 4.1 ve % canlılık eğrisi Şekil 4.3’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. KMS-28 hücre hattına 24 saatlik bortezomib uygulanması sonucu elde edilen % canlılık değerleri.

Bortezomib Konsantrasyonu (nM)	% Canlılık
0 nM	100
1 nM	93,7
5 nM	73,86
7.5 nM	28,23
10 nM	9,15
20 nM	1,36
25 nM	0,9
30 nM	0,6
50 nM	0,59
100 nM	0,24



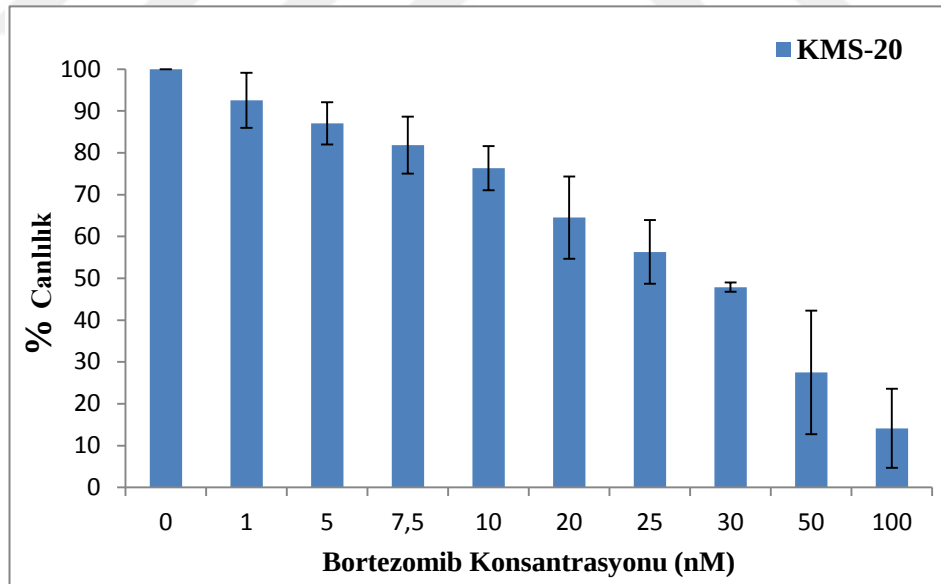
Şekil 4.3. KMS-28 hücre hattına uygulanan bortezomibin 24 saatlik % hayatta kalma grafiği.

4.2.2 KMS-20 hücre hattındaki MTT sonuçları

Yapılan MTT analizine göre KMS-28 hücre hattına uygulanan bortezomib dozlarına karşılık elde edilen % hücre canlılık oranları Çizelge 4.2 ve % canlılık eğrisi Şekil 4.4’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2. KMS-20 hücre hattına 24 saatlik bortezomib uygulanması sonucu edinilen % canlılık değerleri.

Bortezomib Konsantrasyonu (nM)	% Canlılık
0 nM	100
1 nM	92,53
5 nM	87,02
7.5 nM	81,84
10 nM	76,29
20 nM	64,52
25 nM	56,28
30 nM	47,88
50 nM	27,49
100 nM	14,13



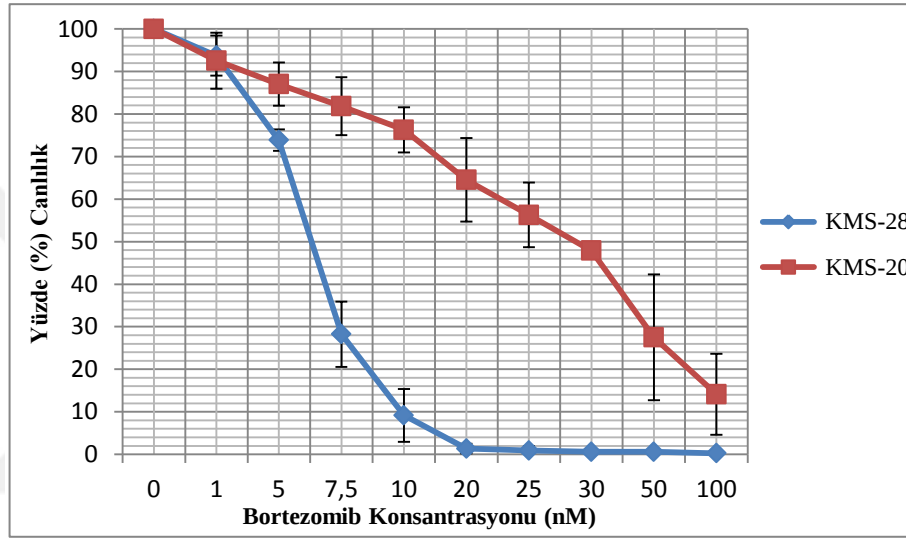
Şekil 4.4. KMS-20 hücre hattına uygulanan bortezomibin 24 saatlik % hayatta kalma grafiği.

4.2.3 KMS-28 ve KMS-20 hücre hatlarında IC₅₀ değerleri

24 saatlik bortezomib uygulaması sonucunda KMS-28 ve KMS-20 hücre hatlarında saptanan IC₅₀ değerleri Çizelge 4.3.'de ve Şekil 4.5.'de gösterildiği gibidir.

Çizelge 4.3. KMS-28 ve KMS-20 Hücre Hatlarının IC₅₀ Değerleri.

	KMS-28 (Bortezomibe Hassas)	KMS20 (Bortezomibe Dirençli)
IC ₅₀	5,13 nM	26,28 nM



Şekil 4.5. KMS-28 ve KMS-20 hücre hatlarının IC₅₀ değerleri grafiği.

4.3 KMS-28 ve KMS-20 Hücre Hatlarında Dirençlilik İndeksinin (RI) Hesaplanması

MTT sonuçları doğrultusunda KMS-20'nin IC₅₀ değerinin, KMS-28 IC₅₀ değerine bölünmesi ile dirençlilik indeksi (RI) hesaplanarak multiple myeloma hücre hatlarının bortezomibe karşı olan dirençliliği (4.1)'deki formül ile ölçüldü.

$$R \text{ indis} = \frac{IC_{50} \text{ Dirençli Hat}}{IC_{50} \text{ Hassas Hat}} \quad (4.1)$$

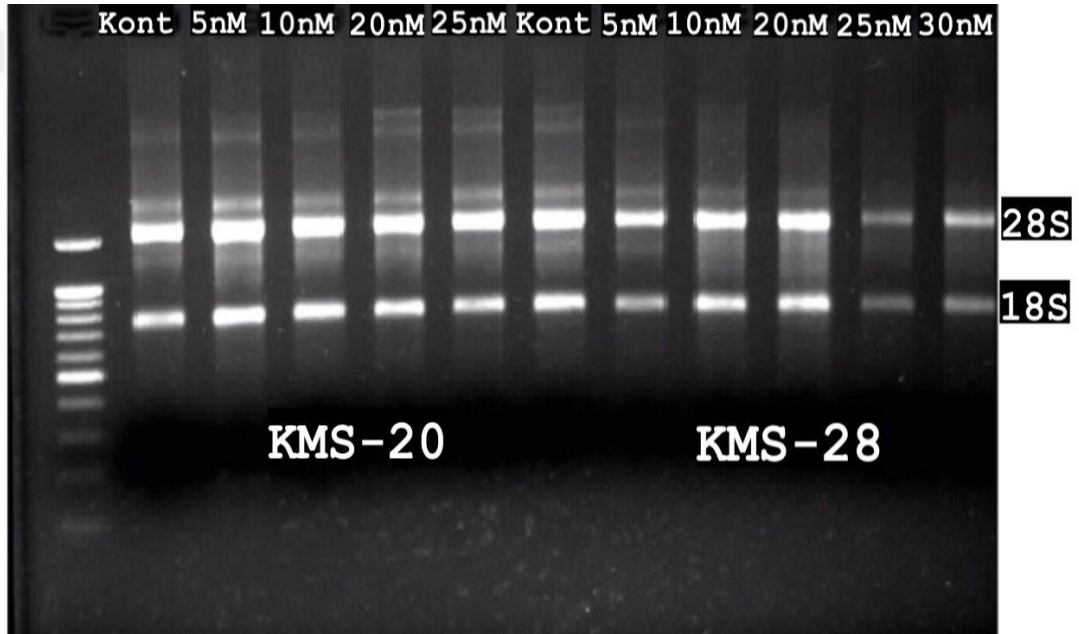
$$RI = \frac{26,28}{5,13} = 5,12$$

Hücre hatlarına 24 saat boyunca bortezomib uygulandıktan sonra, KMS-28 ve KMS-20 için RI değeri 5,12 bulundu. Bulunan RI değerine göre KMS-20 hücre hattının 24

saatlik bortezomib uygulaması sonucu KMS-28'e göre 5 kattan daha fazla dirençlilik gösterdiği bulunmuştur.

4.4 KMS-28 ve KMS-20 Hücre Hatlarında RNA İzolasyonu Sonuçları

Bortezomib ile muamele edilmiş multiple myeloma hücre hatlarından Thermo Fisher Scientific PureLink® RNA Mini Kit protokolüne göre RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Şekil 4.8'de belirtildiği gibi 1XTBE tamponu (100mM Tris, 100mM Borik asit, 2mM EDTA) kullanılarak %1'lik agaroz jel elektroforezi yapıldı ve RNA'lar görüntülendi.



Şekil 4.6. KMS-28 ve KMS-20 hücre hatlarındaki RNA miktarlarının agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

RNA izolasyonu sonucu Nanodrop 2000 cihazı ile multiple myeloma hücre hatlarının RNA miktarları ölçüldü. İzole edilen RNA'ların nanodrop ölçümü sonucu elde edilen konsantrasyonları Çizelge 4.4.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. KMS-28 ve KMS-20 hücre hatlarından izole edilen RNA konsantrasyonları.

Bortezomib Dozları	KMS-28 İçin Nükleik Asit Miktarları	KMS-20 İçin Nükleik Asit Miktarları
Kontrol Grubu	0,3314 µg/µl	0,3470 µg/µl
5 nM	0,3796 µg/µl	0,3402 µg/µl
10 nM	0,2622 µg/µl	0,3103 µg/µl
20 nM	0,2186 µg/µl	0,2387 µg/µl
25 nM	0,1858 µg/µl	0,2580 µg/µl
30 nM	0,1887 µg/µl	0,2514 µg/µl

4.5 cDNA Sentezi

Hücre hatlarından elde edilen RNA'lerden cDNA sentezi yapıldı. Elde edilen cDNA'ların konsantrasyonları nanodrop cihazı ile ölçüldü. Ölçülen cDNA konsantrasyonları Çizelge 4.5.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.5. Hücre hatlarından sentezlenen cDNA konsantrasyonları.

Örnek	KMS-28 İçin Nükleik Asit Miktarları	KMS-20 İçin Nükleik Asit Miktarları
Kontrol Grubu	26515 ng/µl	26309 ng/µl
5 nM	26615 ng/µl	26976 ng/µl
10 nM	26918 ng/µl	26758 ng/µl
20 nM	25981 ng/µl	26859 ng/µl
25 nM	25508 ng/µl	27108 ng/µl
30 nM	26507 ng/µl	27250 ng/µl

4.6 Gen Ekspresyon Analizleri

Multiple myeloma hücre hatlarında gen ekspresyonu deneylerinin hepsi Q2000B Thermal Cycler Real-Time PCR (Long Gene) cihazı kullanılarak yapıldı. Reaksiyonlar için TaqMan primer problemler kullanılırken kontrol olarak β -actin geni, negatif kontrol için ise cDNA içermeyen homojen karışım kullanıldı. Tez çalışması kapsamında, multiple myeloma hücre hatlarının 24 saatlik süre içerisinde arttırılan bortezomib dozlarına göre hücre döngüsü kontrolünde yer alan *CCND1*, *CCND2*, *CCNA1*, *CCNB1* ve *CCNE2* cyclin genlerinin her biri üçer tekrar olacak şekilde ayrı ayrı incelendi. Çalışılan genlerinin ekspresyon düzeyleri qRT-PCR ile analiz edildi. Elde edilen tüm veriler $\Delta\Delta C_t$ ve RQ (Rölatif Kantitasyon) olacak şekilde hesaplandı.

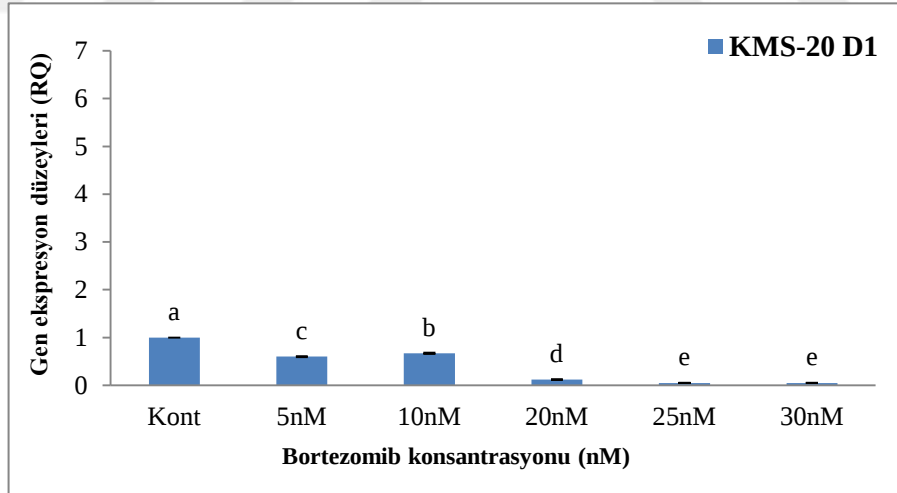
Gruplar arasındaki farklılıklar $P<0,05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.6.1 CCND1 genine ait ekspresyon analizleri

Multiple myeloma KMS-20 ve KMS-28 hücre hatlarına 24 saatlik bortezomib uygulanması sonucunda cyclin D1 genine ait RQ değerleri Çizelge 4.6.'da, grafikleri ise Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.'da gösterildiği gibidir.

Çizelge 4.6. KMS-20 ve KMS-28 hücre hatlarında artan bortezomib dozlarına göre cyclin D1 geninin RQ değerleri.

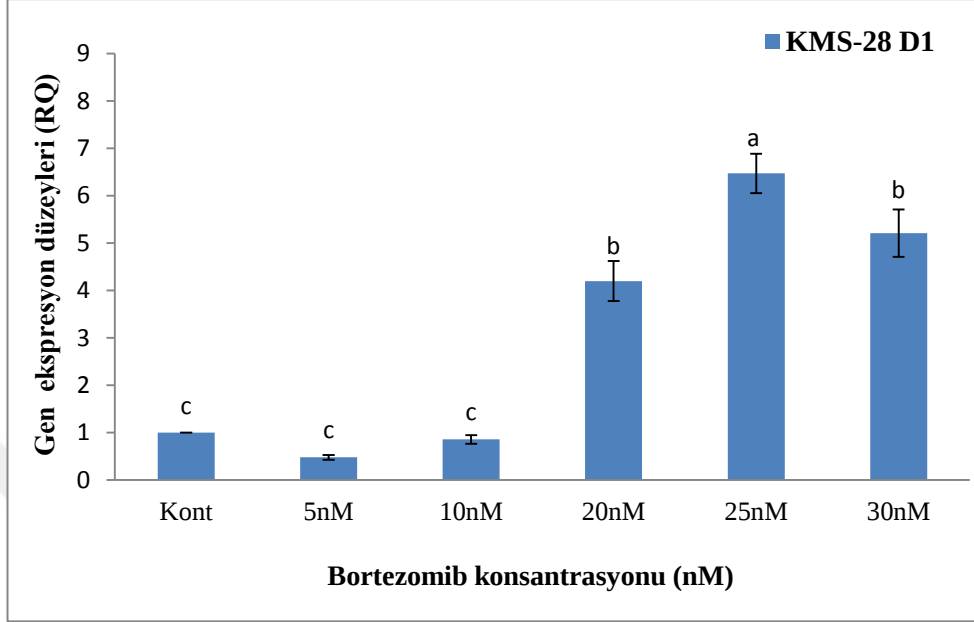
KMS-20	RQ	STD Error	KMS-28	RQ	STD Error
Kontrol	1,00	0,000	Kontrol	1,00	0,000
5nM	0,6	0,013	5nM	0,48	0,050
10nM	0,67	0,012	10nM	0,86	0,091
20nM	0,12	0,005	20nM	4,2	0,422
25nM	0,05	0,006	25nM	6,47	0,416
30nM	0,05	0,001	30nM	5,21	0,501



Şekil 4.7. KMS-20 hücre hattında artan bortezomib dozlarına göre cyclin D1 geninin RQ sonuçları grafiği.

★ Her sütunda gösterilen farklı harfler (a,b,c,d,e) istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($P<0,05$).

Çizelge 4.6. ve Şekil 4.7.'de görüldüğü gibi KMS-20 hücre hattı artan bortezomib dozlarına maruz bırakıldığında cyclin D1 gen ifadesinin tüm konsantrasyonlarda istatistiksel olarak ($P<0,05$) anlamlı azalış gösterdiği bulunmuştur.



Şekil 4.8. KMS-28 hücre hattında artan bortezomib dozlarına göre cyclin D1 geninin RQ sonuçları grafiği.

★ Her sütunda gösterilen farklı harfler (a,b,c) istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($P<0,05$).

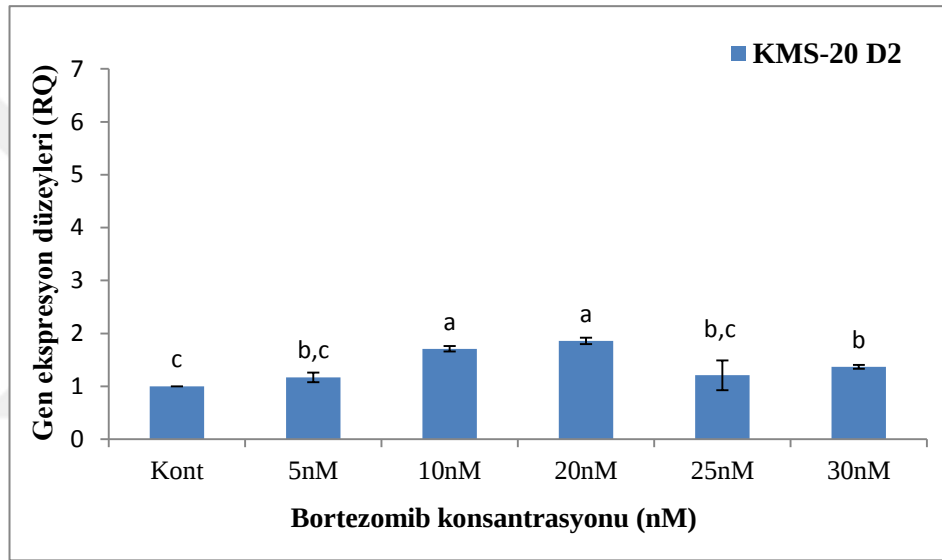
Çizelge 4.6. ve Şekil 4.8.'de görüldüğü gibi KMS-28 hücre hattı artan bortezomib konsantrasyonlarına maruz bırakıldığında cyclin D1 gen ifadesinin 20nM'da ~4,2 kat, 25nM'da ~ 6,47 kat ve 30nM'da ~5,21 katlık bir artış gösterdiği bulunmuştur.

4.6.2 CCND2 genine ait ekspresyon analizleri

Multiple myeloma KMS-20 ve KMS-28 hücre hatlarına 24 saatlik bortezomib uygulanması sonucunda cyclin D2 genine ait RQ değerleri Çizelge 4.7.'da, grafikleri ise Şekil 4.9. ve Şekil 4.10.'de gösterildiği gibidir.

Çizelge 4.7. KMS-20 ve KMS-28 hücre hatlarında artan bortezomib dozlarına göre cyclin D2 geninin RQ değerleri.

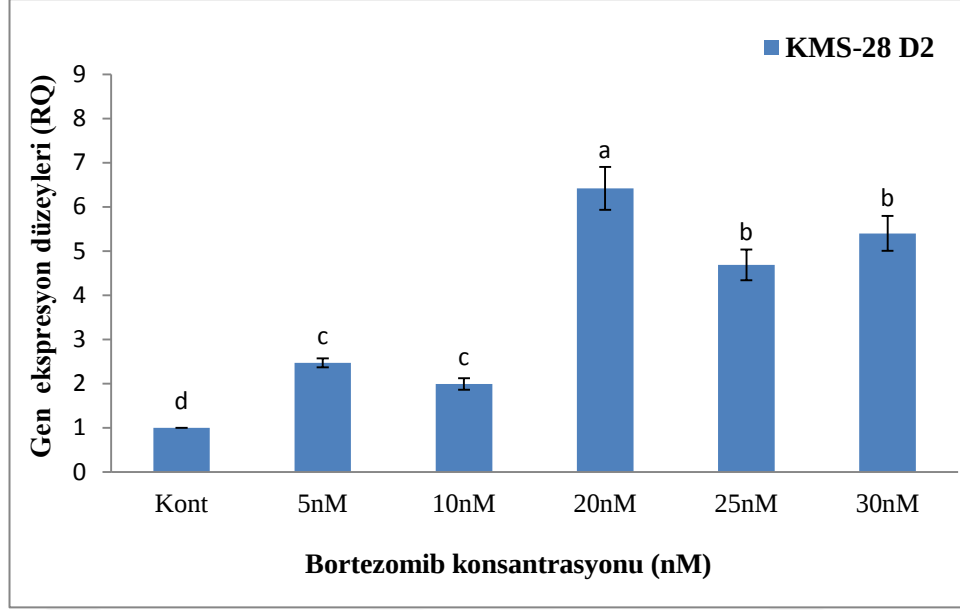
KMS-20	RQ	STD Error	KMS-28	RQ	STD Error
Kontrol	1,00	0,000	Kontrol	1,00	0,000
5nM	1,17	0,990	5nM	2,47	0,104
10nM	1,71	0,051	10nM	1,99	0,128
20nM	1,86	0,061	20nM	6,42	0,487
25nM	1,21	0,280	25nM	4,69	0,348
30nM	1,37	0,037	30nM	5,4	0,393



Şekil 4.9. KMS-20 hücre hattında artan bortezomib dozlarına göre cyclin D2 geninin RQ sonuçları grafiği.

★ Her sütunda gösterilen farklı harfler (a,b,c) istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($P < 0,05$).

Çizelge 4.7. ve Şekil 4.9.'da görüldüğü gibi KMS-20 hücre hattı artan bortezomib konsantrasyonlarına maruz bırakıldığında 10nM, 20nM ve 30nM'da cyclin D2 gen ifadesinde artış bulunmuştur. Diğer doz aralıklarında anlamlı farklılıklar gözlenmemiştir.



Şekil 4.10. KMS-28 hücre hattında artan bortezomib dozlarına göre cyclin D2 geninin RQ sonuçları grafiği.

★ Her sütunda gösterilen farklı harfler (a,b,c) istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($P<0,05$).

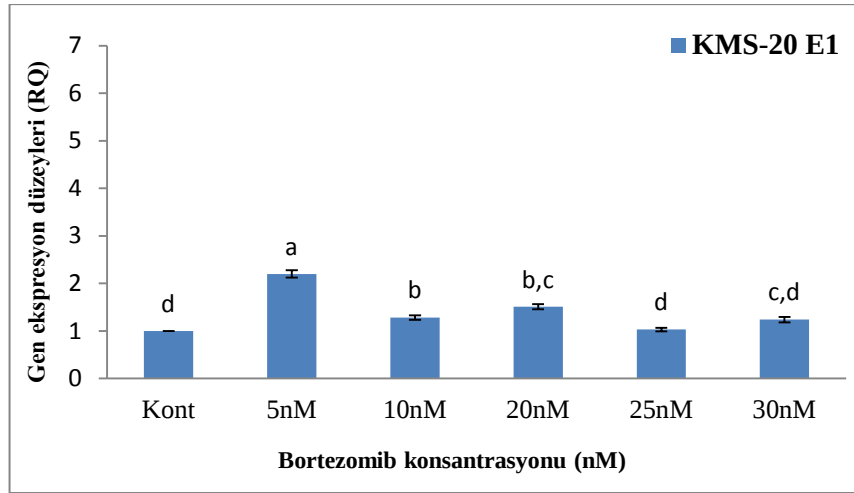
Çizelge 4.7. ve Şekil 4.10.'da görüldüğü gibi KMS-28 hücre hattı artan bortezomib konsantrasyonlarına maruz bırakıldığında cyclin D2 gen ifadesinin tüm dozlarda kontrole göre anlamlı olarak arttığı saptanmış olup özellikle yüksek dozlarda (20nM, 25nM ve 30nM) bu artışın daha yüksek olduğu gözlenmiştir.

4.6.3 CCNE1 genine ait ekspresyon analizleri

Multiple myeloma KMS-20 ve KMS-28 hücre hatlarına 24 saatlik bortezomib uygulanması sonucunda cyclin E1 genine ait RQ değerleri Çizelge 4.8.'da, grafikleri ise Şekil 4.11. ve Şekil 4.12.'da gösterildiği gibidir.

Çizelge 4.8. KMS-20 ve KMS-28 hücre hatlarında artan bortezomib dozlarına göre cyclin E1 geninin RQ değerleri.

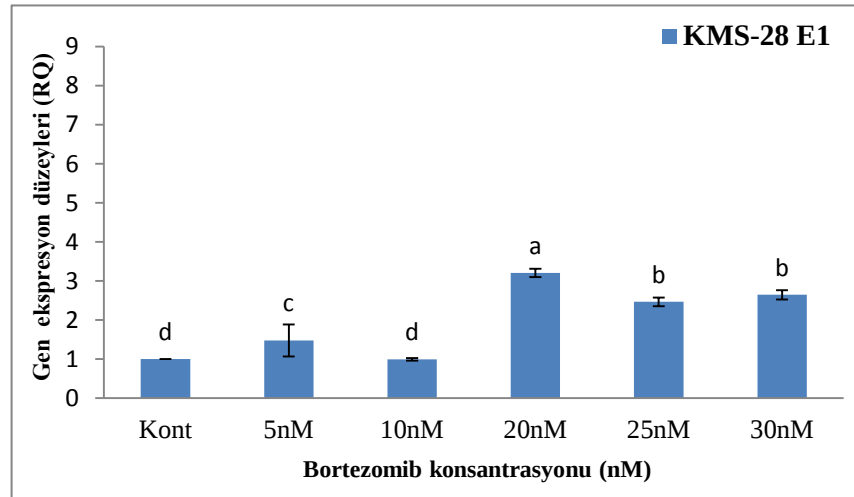
KMS-20	RQ	STD Error	KMS-28	RQ	STD Error
Kontrol	1,00	0,000	Kontrol	1,00	0,000
5nM	2,2	0,077	5nM	1,47	0,410
10nM	1,28	0,047	10nM	0,99	0,031
20nM	1,51	0,055	20nM	3,2	0,109
25nM	1,03	0,038	25nM	2,46	0,111
30nM	1,24	0,056	30nM	2,64	0,121



Şekil 4.11. KMS-20 hücre hattında artan bortezomib dozlarına göre cyclin E1 geninin RQ sonuçları grafiği.

★ Her sütunda gösterilen farklı harfler (a,b,c,d) istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($P<0,05$).

Çizelge 4.8. ve Şekil 4.11.'de görüldüğü gibi KMS-20 hücre hattı artan bortezomib konsantrasyonlarına maruz bırakıldığında cyclin E1 gen ifadesinde sadece 5nM'da ~2,2 katlık anlamlı bir artış saptanmıştır. Diğer dozlarda herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir.



Şekil 4.12. KMS-28 hücre hattında artan bortezomib dozlarına göre cyclin E1 geninin RQ sonuçları grafiği.

★ Her sütunda gösterilen farklı harfler (a,b,c,d) istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($P<0,05$).

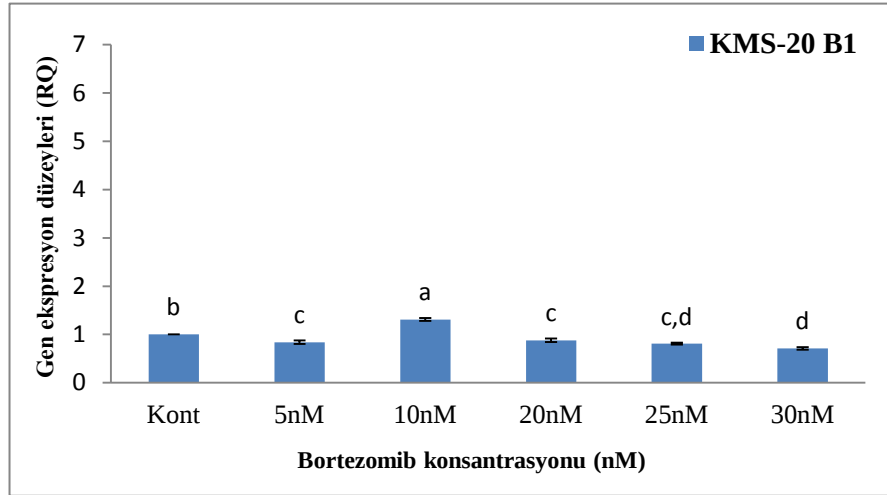
Çizelge 4.8. ve Şekil 4.12.'de görüldüğü gibi KMS-28 hücre hattı artan bortezomib konsantrasyonlarına maruz bırakıldığında cyclin E1 gen ifadesinde 20nM'da ~3,19 katlık anlamlı bir artış görülürken, 20nM ve 30nM'da sırasıyla ~2,46 ve ~2,63 katlık artışlar gözlenmiştir.

4.6.4 CCNB1 genine ait ekspresyon analizleri

Multiple myeloma KMS-20 ve KMS-28 hücre hatlarına 24 saatlik bortezomib uygulanması sonucunda cyclin D1 genine ait RQ değerleri Çizelge 4.9.'da, grafikleri ise Şekil 4.13. ve Şekil 4.14.'da gösterildiği gibidir.

Çizelge 4.9. KMS-20 ve KMS-28 hücre hatlarında artan bortezomib dozlarına göre cyclin B1 geninin RQ değerleri.

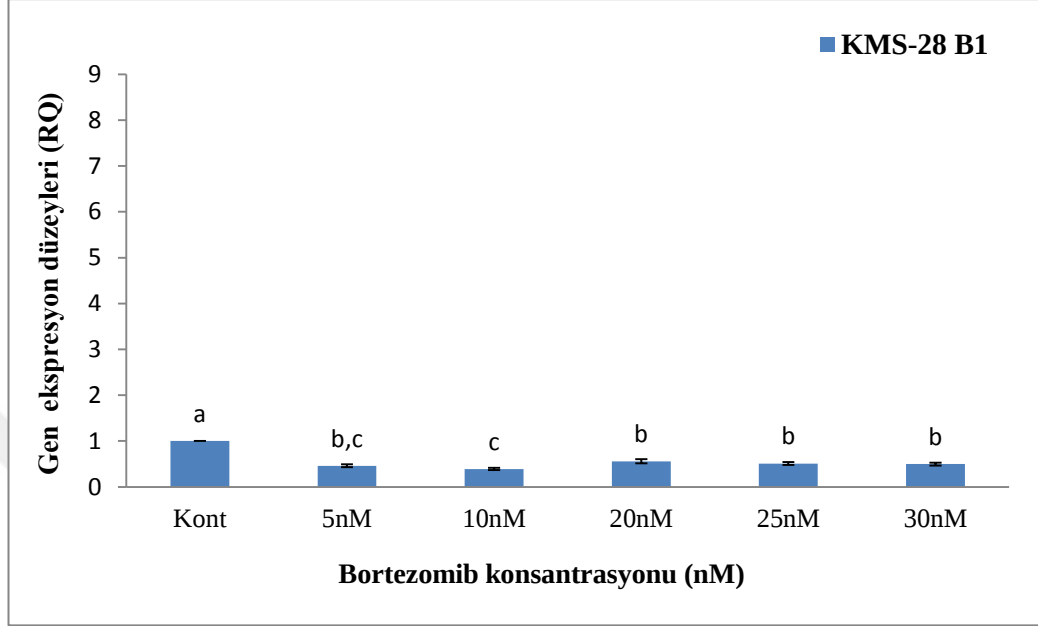
KMS-20	RQ	STD Error	KMS-28	RQ	STD Error
Kontrol	1,00	0,000	Kontrol	1,00	0,000
5nM	0,84	0,034	5nM	0,46	0,031
10nM	1,31	0,028	10nM	0,39	0,025
20nM	0,88	0,036	20nM	0,56	0,043
25nM	0,81	0,018	25nM	0,51	0,033
30nM	0,71	0,026	30nM	0,50	0,032



Şekil 4.13. KMS-20 hücre hattında artan bortezomib dozlarına göre cyclin B1 geninin RQ sonuçları grafiği.

★ Her sütunda gösterilen farklı harfler (a,b,c,d) istatistiksel olarak birbirinden farklıdır (P<0,05).

Çizelge 4.9. ve Şekil 4.13.'de görüldüğü gibi KMS-20 hücre hattı artan bortezomib konsantrasyonlarına maruz bırakıldığında cyclin B1 gen ifadesinde 10nM dışındaki diğer bortezomib dozlarında kontrole yakın değerler bulunmuştur.



Şekil 4.14. KMS-28 hücre hattında artan bortezomib dozlarına göre cyclin B1 geninin RQ sonuçları grafiği.

★ Her sütunda gösterilen farklı harfler (a,b,c,d) istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($P<0,05$).

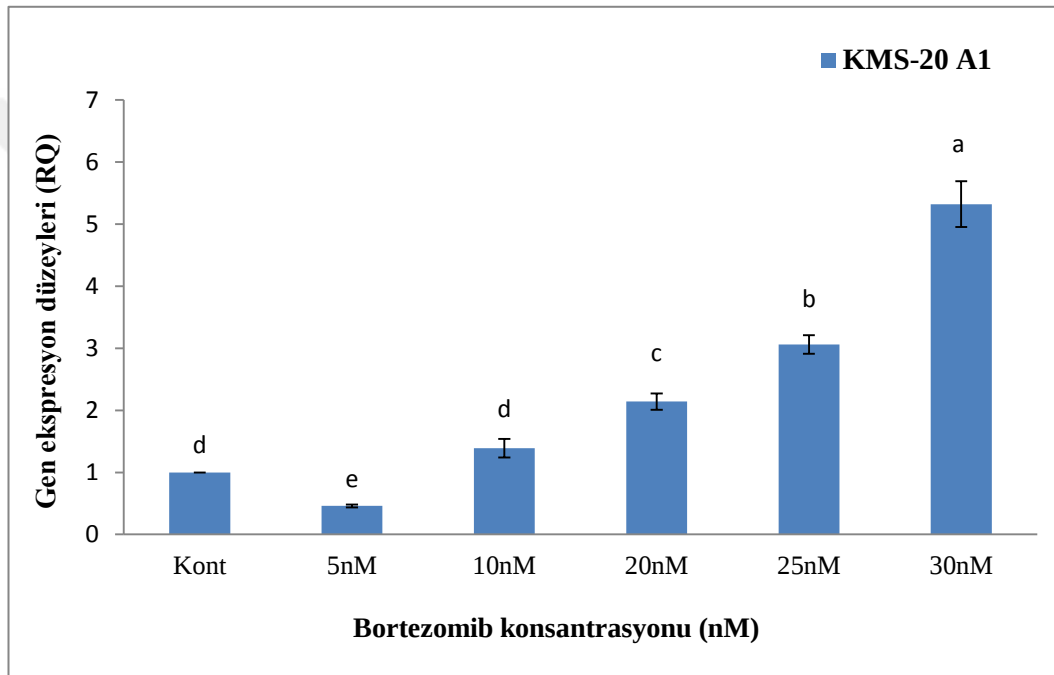
Çizelge 4.9. ve Şekil 4.14.'de görüldüğü gibi KMS-28 hücre hattındaki cyclin B1 gen ifadesinin tüm bortezomib dozlarında anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır.

4.6.5 CCNA1 genine ait ekspresyon analizleri

Multiple myeloma KMS-20 ve KMS-28 hücre hatlarına 24 saatlik bortezomib uygulanması sonucunda cyclin A1 genine ait RQ değerleri Çizelge 4.10.'da, grafikleri ise Şekil 4.15. ve Şekil 4.16.'da gösterildiği gibidir.

Çizelge 4.10. KMS-20 ve KMS-28 hücre hatlarında artan bortezomib dozlarına göre cyclin A1 geninin RQ değerleri.

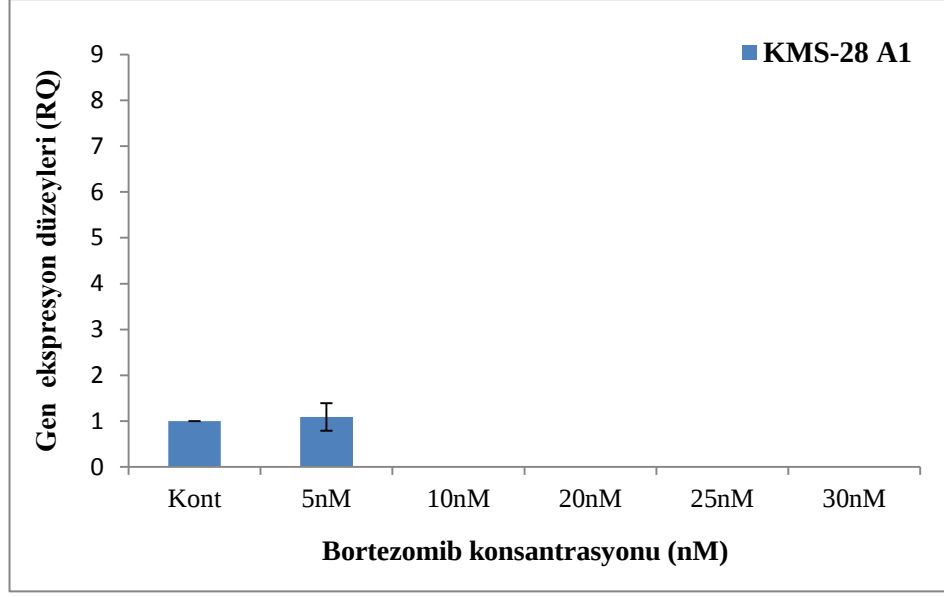
KMS-20	RQ	STD Error	KMS-28	RQ	STD Hata
Kontrol	1,00	0,000	Kontrol	1,00	0,000
5nM	0,46	0,024	5nM	1,09	0,3
10nM	1,39	0,150	10nM	–	–
20nM	2,14	0,130	20nM	–	–
25nM	3,06	0,150	25nM	–	–
30nM	5,32	0,370	30nM	–	–



Şekil 4.15. KMS-20 hücre hattında artan bortezomib dozlarına göre cyclin A1 geninin RQ sonuçları grafiği.

★ Her sütunda gösterilen farklı harfler (a,b,c,d,e) istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($P < 0,05$).

Çizelge 4.10. ve Şekil 4.15.'de görüldüğü gibi KMS-20 hücre hattındaki cyclin A1 geninin ifadesi 5nM bortezomib dozunda azalır iken, 10nM'dan itibaren diğer tüm bortezomib dozlarında yüksek oranlarda doğrusal olarak artış göstermiştir.



Şekil 4.16. KMS-28 hücre hattında artan bortezomib dozlarına göre cyclin A1 geninin RQ sonuçları grafiği.

Çizelge 4.10. ve Şekil 4.16.'da görüldüğü gibi KMS-28 hücre hattındaki cyclin A1 geninin 5nM dışındaki diğer tüm bortezomib dozlarında ifade edilmediği saptanmıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Günümüzde en ölümcül hastalıklardan biri olan kansere yakalanma sıklığı giderek artmaktadır. Buna bağlı olarak da kanser araştırmalarına yönelik tedavi seçenekleri de çeşitlenip çoğalmaktadır. Bununla birlikte, kemoterapötik ilaçlara karşı direnç, insan kanserlerinin klinik tedavisinde karşılaşılan en büyük sorunlardan birisidir. Hematolojik bir kanser türü olan multiple myelomada, ilk tedaviler çoğunlukla başarılı olsa da, daha sonra gelişen ilaç direnci genellikle hastalığın ölümle sonuçlanmasına neden olmaktadır. Bu nedenle multiple myeloma hücrelerinde ilaç dirençliliğine neden olan mekanizmaların anlaşılması oldukça önemlidir (Tsubakia vd., 2012).

Kanser hücrelerinde gelişen ilaç dirençliliğinin altında yatan moleküler mekanizmaları aydınlatmak için birçok araştırma yapılmaktadır. Dirençlilik gelişiminde rol alan önemli mekanizmalardan biri de hücre döngüsü düzenleme faktörlerinde meydana gelen değişikliklerdir (Abdi vd., 2013). Bu değişikliklerin kanser hücrelerinde oluşan ilaç dirençliliğinde önemli role sahip oldukları birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Flatt ve Pietenpol, 2000; Volm ve Koomagi, 2000; Mutlu vd., 2014).

Tez çalışması kapsamında, multiple myeloma KMS 20 (bortezomibe-dirençli) ve KMS 28 (bortezomibe-hassas) hücre hatlarında bortezomibe karşı gelişen dirençliliğin hücre döngüsü düzenleme faktörleriyle ilişkisini anlayabilmek için cyclin D1, cyclin D2, cyclin A1, cyclin B1 ve cyclin E1 genlerin ifade düzeyleri araştırılmıştır.

Multiple myeloma hücrelerinde özellikle cyclin D1 ifadesi tedaviye yanıt, hastalığın seyri, sağkalım süresi ve ilaç dirençliliği gibi birçok parametrede prognostik bir belirteç gibi rol almaktadır. Ayrıca cyclin D2 geninde meydana gelen bozuklukların multiple myeloma hücrelerinde sıkça görüldüğü bildirilmiştir (Thanh-Truc vd., 2010). Bu nedenle çalışmamızda cyclin D izoformlarından cyclin D1 ve D2'nin ifadelerini araştırdık.

Cyclin A2, ökaryotlardaki bölünen tüm somatik hücrelerde eksprese edilmektedir (Sweeney vd., 1996). Cyclin A1 geninin ise embriyogenezdeki rolü dışında özellikle hematopoietik kök hücrelerde ve akut miyeloid lösemide yüksek seviyelerde eksprese edildiği bildirilmiştir (Yang vd., 1997). Ayrıca başka bir çalışmada, cyclin

A1 geninin aşırı ekspresyonunun G1 fazından S fazına ilerlemeyi önemli ölçüde hızlandığı gösterilmiştir. Böylece cyclin A1'in hücre döngüsü ve akut miyeloid lösemi için onkogenik mekanizmalardan biri ve terapötik müdahale için uygun bir hedef olabileceği bildirilmiştir. Bu nedenle hematolojik kanserlerdeki yüksek ifadesinden dolayı biz de multiple myeloma hücre hatlarında cyclin A1 geninin ifade düzeylerini araştırdık (Sweeney vd., 1996; Lara-Pezzi ve Rosenthal, 2010).

E tipi siklinler olan cyclin E1 ve E2 protein dizileri insanlarda yüksek oranda benzerlik gösterirler. Fakat cyclin E1 geni, birçok kanser tipinde cyclin E2'ye göre daha yüksek seviyelerde ifade edilir. Cyclin E1'in bu özelliğinden dolayı tez çalışmasında bu genin ifade düzeyi incelenmiştir (Caldon ve Musgrove, 2010).

B tipi siklinlerden olan cyclin B1 ise mitozda görev alan ana mitotik siklin olduğundan dolayı çalışmalarımızda bu genin ekspresyon düzeylerine bakılmıştır (Gong ve Ferrell, 2010).

Çalışmalarımızda, öncelikle multiple myeloma KMS-20'nin KMS-28 hücre hattına göre bortezomibe karşı 5 kattan daha fazla dirençli olduğu tespit edilmiştir. Bu doğrultuda her iki hücre hattında bortezomib konsantrasyonlarına bağlı olarak gerçekleştirdiğimiz gen ifadesi analiz sonuçlarına göre:

KMS28 (bortezomibe hassas) hücre hattında cyclin A1 geninin 5nM dışındaki diğer bortezomib dozlarında hiç ifade edilmediği gözlenmişken (Şekil 4.16), KMS-20 (bortezomibe dirençli) hücre hattında ise artan bortezomib dozlarına karşılık cyclin A1 gen ifadesinde 20nM'da ~2 katlık, 25nM'da 3 katlık ve 30nM'da ~5,5 katlık doğrusal bir artış olduğu bulunmuştur (Şekil 4.15).

Şekil 4.8.'de görüldüğü gibi KMS-28 hücre hattında cyclin D1 geninin ekspresyonunda 20nM'da 4,2 kat, 25nM'da 6,47 kat, 30nM'da ise 5,2 katlık artış olurken, KMS-20 hücre hattında ise bortezomib dozu arttıkça cyclin D1 gen ifadesinin önemli oranda azaldığı gözlenmiştir (Şekil 4.7).

Cyclin D2 gen ekspresyonu KMS-28 hücre hattında yüksek bortezomib dozlarında anlamlı artış göstermiştir (Şekil 4.10). KMS-20'de ise cyclin D2'nin ifade düzeylerinde kontrole yakın artışlar saptanmıştır (Şekil 4.9).

Cyclin E1'in ekspresyonu KMS-28 hücrelerinin yüksek bortezomib konsantrasyonları ile muamele edildiğinde artmıştır (Şekil 4.12). Aynı genin

ifadesi KMS-20 hücrelerinde sadece 5nM'lık bortezomib dozunda 2 katlık bir artış gösterirken diğer dozlarda herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4.11).

KMS-28 hücre hattına uygulanan tüm bortezomib dozlarında cyclin B1 geninin ifade düzeylerinde yaklaşık 0,5'er katlık bir azalma gözlenmiştir (Şekil 4.14), KMS-20 hücre hattında da aynı genin ekspresyon düzeylerinde 10nM'daki artış dışında diğer dozlarda kontrole yakın değerler bulunmuştur (Şekil 4.13).

Cyclin D'ler dışarıdan aldıkları bölünme sinyallerini hücre döngüsüne iletilmesine aracılık eden moleküllerdir. D tipi siklinlerin (D1, D2, D3) ekspresyon düzeylerinin kontrolü mitojenik sinyaller tarafından düzenlenir. Cyclin D'ler ortamdaki büyüme faktörleri ve mitojenlere cevap olarak sentezlenir. Cyclin D'lerin yarı ömürleri kısadır ve büyüme faktörleri ya da mitojenler bulundukları ortamdan uzaklaştırıldığında ekspresyon düzeyleri hızla düşer. Cyclin D genleri farklı uyarıcılar (NF- κ B yolağı, Jak/STAT sinyal yolağı, büyüme faktörleri, β -catenin, myc, cyclic AMP) tarafından indüklenir (Weinberg, 2014). Hücre döngüsü düzenlemesindeki rolüne ilave olarak, cyclin D1, aynı zamanda apoptozisin düzenlenmesinde de karmaşık bir şekilde rol alır. Cyclin D1, hücrenin proliferatif ve farklılaşma durumuna bağlı olarak hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik olacak şekilde etki gösterebilir (Han vd., 1999; Biliran vd., 2005). Deneylerimizden elde ettiğimiz bulgulara göre, cyclin D1 geni, KMS-28 hücrelerinin G₁ evresinde yukarı regüle (up-regulation) olarak yüksek bortezomib konsantrasyonlarında overeksprese edilmiştir. Bilindiği üzere bortezomib tarafından gerçekleştirilen proteozom inhibisyonu sonucu NF- κ B'nin aktivitesi azalır ve böylece apoptozis uyarılır. Bununla birlikte bazı çalışmalar, bortezomibin antikanser özelliklerinin sadece NF- κ B'nin inhibisyonu ile değil farklı mekanizmalarla da gerçekleşebileceğini göstermektedir (Hideshima vd., 2002; Ishii vd., 2006). Yapılan bir çalışmada, bortezomibe yanıt veren hücrelerde cyclin D1'in aşırı eksprese edildiği ve bu hücrelerde STAT3 ile Bcl-xL seviyelerinin azaldığı bulunmuştur. Cyclin D1'i aşırı eksprese eden hücrelerin bortezomib ile tedavisi üzerine, kalsiyum salınımı başta olmak üzere sırasıyla kaspaz aktivasyonu ve bid-cleavage (parçalanma) olaylarının hızlandığı, böylece Bax ve Bak genlerinin daha da aktifleştiği saptanmıştır. Kısaca, bortezomibin yüksek dozlarının cyclin D1 seviyelerini arttırması, STAT3 ve Bcl-xL'nin ifadelerinin azaltılmasına neden olmakta ve böylece pro-apoptotik genlerin aktivasyonu ile apoptozisin indüklenmesini kolaylaştırmaktadır (Zong vd., 2003;

Ishii vd., 2006). Sonuç olarak, KMS-28 hücrelerinde gözlemlediğimiz yüksek bortezomib konsantrasyonlarındaki aşırı cyclin D1 ifadesi ile apoptozisin indüklenme yolu Ishii ve arkadaşlarının (2006) yaptıkları araştırma bulgularıyla örtüşmektedir. KMS-20 dirençli hücrelerde ise bu anlatılan mekanizmaların tam tersi gerçekleşmekte olup cyclin D1 geninin aşağı regülasyonu (down-regulation) yoluyla bu genin ifadesi önemli oranda azalmıştır. Sonuçta bu hücre hattında pro-apoptotik genlerin ifadesi azalıp anti-apoptotik genlerin aktivitesi artmıştır. Böylece KMS-20 hücrelerinde apoptozisin baskılanması sonucu proliferasyonun devamlılık kazanarak hücrelerin bortezomibe karşı dirençli hale geldikleri düşünülmektedir.

Erken ve orta G_1 fazında mitojenlerden gelen sinyallerle cyclin D2'nin CDK 4/6 ile kompleks yapması sonucu retinoblastoma proteini (Rb) bu kompleks tarafından hipofosforillenir (pRb). Geç G_1 fazına geçen pRb'ler cyclin E-CDK2 kompleksi tarafından hiperfosforile forma sokularak transkripsiyon faktörü olan E2F'nin serbest hale geçmesi sağlanır böylece hücre döngüsü G_1 fazından S fazına doğru ilerlemeye devam eder (Kirsch ve Kastan, 1998; Dyson, 2002). Yaptığımız çalışma sonucu KMS-20 hücrelerinde cyclin D2 ve E1 ifadelerinde gözlemlediğimiz kontrole yakın değerler yukarıdaki çalışmalar ile örtüşmektedir. KMS-28 hücre hattında, yüksek ilaç konsantrasyonlarında görülen cyclin D2 overekspresyonun bortezomib kaynaklı apoptozisin uyarılmasıyla bağlantılı olabileceği düşünülmektedir.

Hücre döngüsünde geç G_1 safhasında görev alan cyclin E1 gen ekspresyonu KMS-28 hücre hattında sadece yüksek dozlarda artış gösterirken, KMS-20 hücre hattında ise kontrole yakın değerlerde bulunmuştur. Sonuç olarak bu genin bortezomib dirençliliğinde rolü olduğu düşünülmemektedir.

Araştırma bulgularımıza göre KMS-20 hücre hattında cyclin A1 geninde meydana gelen değişiklikler sonucunda S fazında bu genin ekspresyonu aşırı yükselmiş olup hücrelerin DNA sentez hızı da aynı oranda artış göstermekte ve böylece hücre proliferasyonu devamlılığını korumaktadır. Tüm bu verilere dayanarak büyük olasılıkla KMS-20 hücre hattında gelişen bortezomib dirençliliğinin altında yatan sebeplerden birinin cyclin A1 genindeki değişikliklerden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Ayrıca KMS-28 hücre hattında cyclin A1 geninin yüksek bortezomib dozlarında ifade edilmemesi hipotezimizi destekler niteliktedir. Aynı zamanda tez çalışmamız, cyclin A1 geninin MM'deki bortezomib dirençliliğiyle

ilişkili olduğunu literatürde açıklayan ilk araştırma olması nedeni ile özgün bir değer kazanmıştır.

Hücre döngüsünün M safhasında görev alan cyclin B1 gen ifadesinde KMS-28 hücre hattında önemli oranda azalmalar gözlenirken KMS-20 hücrelerinde bu genin ifadesi kontrole yakın değerlerde bulunmuştur. Yüksek dozda bortezomib ile muamele edilmiş KMS-28 hücrelerinin proliferasyonu hücre döngüsünün S safhasında durdurulduğundan dolayı M safhasına ulaşmaları beklenmemektedir. Dolayısıyla KMS-28 hücrelerinde cyclin B1 gen ekspresyonunda herhangi bir artış gözlenmesi beklenen bir durum değildir.

2010 yılında Thanh-Truc Ngo ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada cyclin D1 geninin aşırı ekspresyonunun, multiple myelomalı hastalarda bortezomib ile ilişkili olarak apoptozisi artırdığı bulunmuştur (Thanh-Truc Ngo vd., 2010). Benzer şekilde bizim çalışmalarımızda da KMS-28 hücre hatlarında yüksek bortezomib dozlarına bağlı olarak cyclin D1 geninin overekspresyonu sonucu apoptozis indüklenmiştir. Sewify ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, hücre döngüsü kontrolünde yer alan cyclin D1 geninin aşırı ifadesinin multiple myelomada ilaç dirençliliğiyle ilişkisi rapor edilmiştir (Sewify vd., 2014).

Hücre döngüsü düzenleme faktörleri ve ilaç dirençliliği ile ilgili çeşitli ilaç ve hücre hatları üzerinde de farklı deneysel çalışmalar yapılmıştır. Örneğin, multiple myeloma U266 (vinkristine dirençli) hücre hattında cyclin E2 gen ifadesinin büyük ölçüde arttığı ve çeşitli siklin bağımlı kinaz genlerinin ifadelerinde artış olduğu gözlenmiştir (Mutlu vd., 2014). Bir başka çalışmada, multiple myeloma hücre hatlarında Palbociclib (PD0332991) ilacının Cdk4/6'yı inhibe ederek hücre döngüsünün G1 safhasında durmasına neden olduğu rapor edilmiştir. Aynı zamanda apoptozu indükleyebilmek için bu ilacın tek başına yeterli olmayıp deksametazon veya bortezomib ile kombine halde uygulanması gerektiği bildirilmiştir (Maes vd., 2017).

Yapılan birçok çalışmada, farklı kanser tiplerinde hücre döngüsü düzenleme faktörleri olan siklin (cyclin) genlerinin aşırı ifade edildikleri bildirilmiştir. Örneğin; cyclin D1 geninin lenfoma ve myeloma gibi hematolojik kanserler başta olmak üzere meme ve mesane kanserlerinde, cyclin D2'nin meme ve prostat kanserinde, cyclin E'nin ovaryum ve lenfoma gibi kanserlerde, cyclin A'nın tiroid ve meme gibi kanserlerde ve cyclin B'nin kolon, tiroid ve meme gibi kanser tiplerinde aşırı ifade

edildikleri rapor edilmiştir (Zlamalikova vd., 2016; Matsubayashi vd., 2003; Padar vd., 2003; Kuhn vd., 2014; Erlanson vd., 1998; Santo vd., 2015; Aaltonen vd., 2009; Bondi vd., 2005; Nar vd., 2012; Bai vd., 2017).

Yapılan tez çalışması ile multiple myeloma KMS-20 hücrelerinin bortezomibe karşı dirençlilik kazanmasında, hücre döngüsü düzenleyici faktörlerinden olan cyclin D1 genindeki down-regülasyonun ve cyclin A1 genindeki overekspresyonun rolü olduğunu açıkça gösterdik.

Sonuç olarak, multiple myelomada ilaç dirençliliğine yol açabilecek moleküler mekanizmalardan biri olan hücre döngüsü düzenleyici faktörlerindeki değişikliklerin aydınlatılmasıyla hastalığın moleküler düzeyde anlaşılması sağlanacaktır. Bu sayede multiple myelomadaki bortezomib dirençliliğini en aza indirebilmek için yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesi mümkün olabilecektir. Böylece kanser hücrelerinin bortezomibe karşı geliştirdikleri direncin engellenebilmesi multiple myeloma tedavisinde yeni bir umut ışığı oluşturabilir. Ayrıca ilaç dirençliliğine sebep olan moleküler mekanizmaların aydınlatılması kemoterapi için kullanılan ilaç stratejilerinin kişiye özgü şekillendirilebilmesi de ileriye yönelik tedavi yöntemleri için atılmış önemli bir adım olacaktır.

KAYNAKLAR

- Aaltonen, K., Amini, R. M., Heikkilä, P., Aittomäki, K., Tamminen, A., Nevanlinna, H. ve Blomqvist, C., 2009. High cyclin B1 expression is associated with poor survival in breast cancer, *British journal of cancer*, 100, 7, 1055–1060.
- Abbas, K. A., Lichtman, A. H. ve Pillai, S., 2015. Temel immünoloji immün sistemin işlevleri ve bozuklukları, editör, Camcıoğlu, Y. ve Deniz, G., 4.baskı, Güneş Tıp Kitapevleri, Ankara, Türkiye.
- Abdi, J., Chen, G. ve Chang, H., 2013. Drug resistance in multiple myeloma: latest findings and new concepts on molecular mechanisms, *Oncotarget*, 4, 12, 2186-2207.
- Abecasis, G. R., Altshuler, D., Auton, A., Brooks, L. D., Durbin, R. M., Gibbs, R. A., Hurles, M. E. ve McVean, G. A., 2010. A map of human genome variation from population-scale sequencing, 1000 Genomes Project Consortium, *Nature*, 467, 1061–1073.
- Adams, J. ve Kauffman, M., 2004. Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib), *Cancer Investigation*, 22, 2, 304–311.
- Adams, J., 2003. Potential for proteasome inhibition in the treatment of cancer, *Drug Discovery Today*, 8, 7, 307–15.
- Adams, J., 2004. The proteasome: a suitable antineoplastic target, *Nature Reviews Cancer*, 4, 5, 349–360.
- Adams, J., Behnke, M., Chen, S., Cruickshank, A., Dick, L., Grenier, L. ve Stein, R., 1998. Potent and selective inhibitors of the proteasome: dipeptidyl boronic acids, *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 8, 4, 333–338.
- Adams, J., Palombella, V. J. ve Elliott, P. J., 2000. Proteasome inhibition: a new strategy in cancer treatment, *Investigational new drugs*, 18, 2, 109–121.
- Adams, J., Palombella, V., Sausville, E., Johnson, J., Destree, A., Lazarus, D. ve Elliott, P., 1999. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents, *Cancer Research*, 59, 11, 2615–2622.
- Aksoy, Y., 2010. Kanserde ilaç direncinin üstesinden gelmenin yolları: Yeni ilaçların tasarımı, *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 30, 6, 2011-2016.
- Aktuğ, H., 2014. Apoptozis ve hücre döngüsü. *Ege Tıp Dergisi*, 53, 1, 60-64.
- Alexander, D. D., Mink, P. J., Adami, H. O., Cole, P., Mandel, J. S., Oken, M. M. ve Trichopoulos, D., 2007. Multiple myeloma: a review of the epidemiologic literature, *International Journal of Cancer*, 120, 12, 40-61.
- Alexandrov, L. B., Jones, P. H., Wedge, D. C., Sale, J. E., Campbell, P. J., Nik-Zainal, S. ve Stratton, M. R., 2015. Clock-like mutational processes in human somatic cells, *Nature genetics*, 47, 12, 1402.
- Altieri, A., Chen, B., Bermejo, J.L., Castro, F. ve Hemminki, K., 2006. Familial risks and temporal incidence trends of multiple myeloma, *European Journal of Cancer*, 42, 11, 1661-1670.
- Baguley, B.C., 2010. Multidrug resistance in cancer, *Methods Molecular Biology*, 1-14.

- Bahuguna, A., Khan, I., Bajpai, V. ve Kang, S., 2017. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug, *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 12, 2.
- Bai, J., Li, Y. ve Zhang, G., 2017. Cell cycle regulation and anticancer drug discovery, *Cancer biology ve medicine*, 14,4, 348–362.
- Beemster, G. T. S. ve Baskin, T. I., 1998. Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Physiology*, 116, 4, 1515–1526.
- Bendris, N., Lemmers, B., Blanchard, J. M., Arsic, N., 2011. Cyclin A2 mutagenesis analysis: a new insight into CDK activation and cellular localization requirements, *Plos One*, 6, 7, e22879.
- Berenson, J. R. ve Vescio, R., 1999. HHV-8 is present in Multiple Myeloma patients, *Blood*, 93, 3157-3164.
- Bergsagel, P. ve Kuehl, W., 2005. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma, *Journal of Clinical Oncology*, 23, 26, 6333–6338.
- Biliran, H., Wang, Y., Banerjee, S., Xu, H., Heng, H., Thakur, A. ve Liao, J. D., 2005. Overexpression of Cyclin D1 promotes tumor cell growth and confers resistance to Cisplatin-mediated apoptosis in an Elastase-myc transgene-expressing pancreatic tumor cell line, *Clinical Cancer Research*, 11, 16, 6075-6086.
- Bladé, J., Rosiñol, L. ve Fernández de Larrea, C., 2015. How I treat relapsed myeloma, *Blood*, 125, 10, 1532-1540.
- Blade, J., Teresa-Ciberia, M. ve Rosinol, L., 2005. Bortezomib: A valuable new antineoplastic strategy in multiple myeloma, *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*, 44, 5, 440- 448.
- Boccadora, M., Morgan G. ve Cavenagh J., 2005. Preclinical evaluation of the proteasome inhibitor in cancer therapy, *Cancer Cell International*, 5, 1, 18.
- Bolaman, A.Z., 2008. Multipl myelom tanısı ve tedaviye yanıt kriteri, *Turkiye Klinikleri Medical Oncology - Special Topics*, 1, 1, 1-4.
- Bondi, J., Husdal, A., Bukholm, G., Nesland, J. M., Bakka, A. ve Bukholm, I. R., 2005. Expression and gene amplification of primary (A, B1, D1, D3, and E) and secondary (C and H) cyclins in colon adenocarcinomas and correlation with patient outcome, *Journal of clinical pathology*, 58, 5, 509–514.
- Borrello, I., 2012. Can we change the disease biology of multiple myeloma?, *Leukemia Research*, 3-12.
- Broderick, P., Chubb, D., Johnson, D.C., Weinhold, N., Försti, A., Lloyd, A., Olver, B., Ma, Y. P., Dobbins, S. E., Walker, B. A., Davies, F. E., Gregory, W. A., Child, J. A., Ross, F. M., Jackson, G. H., Neben, K., Jauch, A., Hoffmann, P., Mühleisen, T. W., Nöthen, M. M., Moebus, S., Tomlinson, I. P., Goldschmidt, H., Hemminki, K., Morgan, G. J. ve Houlston, R. S., 2011. Common variation at 3p22.1 and 7p15.3 influences multiple myeloma risk. *Nature Genetics*, 44, 1, 58-61.
- Bruning, A., Vogel, M., Mylonas, I., Friese, K. ve Burges, A., 2011. Bortezomib targets the caspase-like proteasome activity in cervical cancer cells, triggering

- apoptosis that can be enhanced by nelfinavir, *Current cancer drug targets*, 11, 7, 799–809.
- Burger, A. M. ve Seth, A. K., 2004. The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: therapeutic implications, *European journal of cancer*, 40, 15, 2217–2229.
- Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T. ve Pfaffl, M. W., 2005. Quantitative real-time RT-PCR – a perspective, *Journal of Molecular Endocrinology*, 34, 3, 597-601.
- Caldon, C. E. ve Musgrove, E. A., 2010. Distinct and redundant functions of cyclin E1 and cyclin E2 in development and cancer, *Cell division*, 5, 1, 1-13.
- Campbell, N. A., Reece, J. B., Meyers, N., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A. ve Jackson, R. B., 2006. Biyoloji, pp. 215-228, in: Gündüz A. ve Demirsoy İ. (Editor), 6. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Campo, E., Swerdlow, S. H., Harris, N. L., Pileri, S., Stein, H. ve Jaffe, E. S., 2011. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications, *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 117, 19, 5019-5032.
- Chai, S., To, K. K. ve Lin, G., 2010. Circumvention of multi-drug resistance of cancer cells by Chinese herbal medicines, *Chinese medicine*, 5, 1, 1-9.
- Collins, C. D., 2005. Problems monitoring response in multiple myeloma, *Cancer Imaging 5 (Spec No A)*, 119–126.
- Cross, F., Roberts, J. ve Weintraub H., 1989. Simple and complex cell cycles, *Annual Review of Cell Biology*, 5, 341-96.
- Cusack, J. C., 2003. Rationale for the treatment of solid tumors with the proteasome inhibitor bortezomib, *Cancer Treatment Reviews*, 21-31.
- Cusack, J. C., Liu, R., Houston, M., Abendroth, K., Elliott, P. J., Adams, J. ve Baldwin, A. S., 2001. Enhanced chemosensitivity to CPT-11 with proteasome inhibitor PS-34: implications for systemic nuclear factor- κ B inhibition, *Cancer research*, 61, 9, 3535-3540.
- Czechowski, T., Bari, R. P., Stitt, M., Scheible, W. R. ve Udvardi, M. K., 2004. Real-time RT-PCR profiling of over 1400 Arabidopsis transcription factors: Unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes, *The plant journal: for cell and molecular biology*, 38, 2, 366–379.
- Çevigen, T., 2005. Multipl myelomlu hastalarda HLA sınıf-I ve HLA sınıf-II alel sıklığının araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İmmünoloji Programı, Ankara.
- Çoğulu, Ö., Alpman, A., Durmaz, B. ve Özkınay, F., 2007. Mitoz ve mayozun moleküler temelleri, *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 27, 725-37.
- Dhavan, R. ve Tsai, L. H., 2001. A decade of CDK5, *Nature reviews, Molecular cell Biology*, 2, 10, 749–759.
- Ding, Z. Y., Li, R., Zhang, Q. J., Wang, Y., Jiang, Y., Meng, Q. Y., Xi, Q. L. ve Wu, G. H., 2019. Prognostic role of cyclin D2/D3 in multiple human malignant neoplasms: A systematic review and meta-analysis, *Cancer medicine*, 8, 6, 2717–2729.

- Dispenzieri, A., Lacy, M. Q. ve Greipp, P. R., 2004. Multiple Myeloma, In: Greer, J. P., Foerster, J., Lukens, J. N., Rodgers, G. M., Paraskevas, F. ve Glader, B., editors, *Wintrobe's clinical hematology*, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA, 2583- 2635.
- Dispenzieri, A., Rajkumar, S. V., Gertz, M. A., Fonseca, R., Lacy, M. Q., Bergsagel, P. L., Kyle, R. A., Greipp, P. R., Witzig, T. E., Reeder, C. B., Lust, J. A., Russell, S. J., Hayman, S. R., Roy, V., Kumar, S., Zeldenrust, S. R., Dalton, R. J. ve Stewart A. K., 2007. Treatment of newly diagnosed multiple myeloma based on Mayo stratification of myeloma and risk-adapted therapy (mSMART): Consensus Statement, *Mayo Clinic Proceedings*, 82, 3, 323–341.
- Dmoszyńska, A., 2008. Diagnosis and the current trends in multiple myeloma therapy, *Poliskie Archwium Medycyny Wewnetrznej*, 118, 10, 563-6.
- Donnellan, R. ve Chetty, R., 1999. Cyclin E in human cancers, *FASEB Journal*, 13, 8, 773–780.
- Doyle, A. ve Griffiths, J. B., 1998. *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology*, John Wiley & Sons Ltd., 57- 61, 62-64.
- Durak, B. ve Gülbaş, Z., 2008. Multiple myeloma genetics, *Türkiye Klinikleri Medical Oncology - Special Topics*, 1, 1, 9-13.
- Durie, B. G. ve Salmon, S. E., 1975. A clinical staging system for multiple myeloma: correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment and survival, *Cancer*, 36, 842–854.
- Dyson, N. J., 2002. A revised picture of the E2F transcriptional network and RB function, *Current opinion in cell biology*, 14, 6, 684-91.
- Erlanson, M., Portin, C., Linderholm, B., Lindh, J., Roos, G. ve Landberg, G., 1998. Expression of cyclin E and the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in malignant lymphomas-prognostic implications, *Blood*, 92, 770–777.
- Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D., Hunt, T., 1983. Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division, *Cell*, 33, 2, 389–96.
- Facon, T., Mary, J. Y., Hulin, C., Benboubker, L., Attal, M., Pegourie, B., Renaud, M., Harousseau, J. L., Guillemin, G., Chateix, C., Düb, M., Voillat, L., Maisonneuve, H., Troncy, J., Dorvaux, V., Monconduit, M., Martin, C., Casassus, P., Jaubert, J. ve Jardel, H., 2007. Melphalan and prednisone plus thalidomide versus melphalan and prednisone alone or reduced-intensity autologous stem cell transplantation in elderly patients with multiple myeloma (IFM 99-06): a randomised trial, *Lancet*, 370, 9594, 1209-1218.
- Feinman, R., Sawyer, J., Hardin, J., Tricot, G., 1997. Cytogenetics and molecular genetics in multiple myeloma, *Hematology/oncology clinics of North America*, 11, 1, 1-25.
- Fisher, R. P. ve Morgan, D. O., 1994. A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase, *Cell*, 78, 713–724.
- Flatt, P. M. ve Pietenpol, J. A., 2000. Mechanisms of cell-cycle checkpoints: at the crossroads of carcinogenesis and drug discovery, *Drug metabolism reviews*, 32, 3-4, 283-305.

- Gachon, C., Mingam, A. ve Charrier, B., 2004. Real-time PCR: What relevance to plant studies ?, *Journal of experimental botany*, 55, 402, 1445–1454.
- Gerecke, C., Fuhrmann, S., Striffler, S., Schmidt-Hieber, M., Einsele, H. ve Knop, S., 2016. The Diagnosis and Treatment of Multiple Myeloma, *Dtsch Arztebl International*, 113, 27-28, 470-476.
- Glassford, J., Kassen, D., Quinn, J., Stengel, C., Kallinikou, K., Khwaja, A. ve Yong, K. L., 2012. Inhibition of cell cycle progression by dual phosphatidylinositol-3-kinase and mTOR blockade in cyclin D2 positive multiple myeloma bearing IgH translocations, *Blood cancer journal*, 2, 1, e50.
- Glickman, M. H. ve Ciechanover, A., 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction, *Physiological reviews*, 82, 2, 373–428.
- Gong, D. ve Ferrell, J. E., 2010. The roles of cyclin A2, B1, and B2 in early and late mitotic events, *Molecular biology of the cell*, 21, 18, 3149–3161.
- Gottesman, M. M., Fojo, T. ve Bates, S. E. 2002. Multidrug resistance in cancer role of ATP dependent transporters, *Nature reviews*, 2, 1, 48-58.
- Goy, A. ve Gilles, F., 2004. Update on the proteasome inhibitor bortezomib in hematologic malignancies, *Clinical lymphoma*, 4, 4, 230–237.
- Greil, R., Fasching, B., Loidl, P. ve Huber, H., 1991. Expression of the c-myc protooncogene in multiple myeloma and chronic lymphocytic leukemia: an in situ analysis, *Blood*, 78-180.
- Greipp, P. R., San Miguel, J. F., Durie, B. G., vd., 2005. International staging system for multiple myeloma, *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23, 15, 3412–3420.
- Grela, E., Kozłowska, J. ve Grabowiecka, A., 2018. Current methodology of MTT assay in bacteria, *Acta histochemica*, 120, 4, 303–311.
- Guen, V. J., Gamble, C., Flajolet, M., Unger, S., Thollet, A., Ferandin, Y. ve Colas, P., 2013. CDK10/cyclin M is a protein kinase that controls ETS2 degradation and is deficient in STAR syndrome, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 48, 19525-19530.
- Hallek, M., Bergsagel, P. ve Anderson, K., 1998. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process, *Blood*, 3–21.
- Han, E. H., Ng, S. C., Arber, N., Begemann, M. ve Weinstein, I. B., 1999. Roles of cyclin D1 and related genes in growth inhibition, senescence and apoptosis, *Apoptosis*, 4, 3, 213-219
- Hanahan, D. ve Weinberg, R. A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell*, 144, 5, 646–674.
- Hanahan, D. ve Weinberg, R., 2000. The hallmarks of cancer, *Cell*, 100, 57.
- Heuvel, V. D. ve Harlow, E., 1993. Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control, *Science*, 262, 2050–4.
- Hideshima, T., Bergsagel, P. L., Kuehl, W. M. ve Anderson, K. C., 2004. Advances in biology of multiple myeloma: clinical applications, *Blood*, 104, 3, 607-618.

- Hideshima, T., Chauhan, D., Richardson, P., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Hayashi, T., Munshi, N., Dang, L., Castro, A., Palombella, V., Adams, J. ve Anderson, K. C., 2002. NF kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma, *The Journal of biological chemistry*, 277, 19, 16639 – 16647
- Hideshima, T., Richardson, P., Chauhan, D., Palombella, V. J., Elliott, P. J., Adams, J. ve Anderson, K. C., 2001. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells, *Cancer Research*, 61, 7, 3071-3076.
- Hirai, H., Roussel, M. F., Kato, J., Ashmun, R. A. ve Sherr, C. J., 1995. Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases CDK4 and CDK6, *Molecular Cell Biology*, 15, 2672–2681.
- Ho, A. ve Dowdy, S. F., 2002. Regulation of G1 cell-cycle progression by onkogenes and tumor suppressor genes, *Current Opinion in Genetics and Development*, 1, 47-52.
- Horner, M. J., Ries, L. A. G., Krapcho, M., Neyman, N., Aminou, R., Howlader, N., Altekruse, S. F., Feuer, E. J., Huang, L., Mariotto, A., Miller, B. A., Lewis, D.R., Eisner, M. P., Stinchcomb, D. G. ve Edwards, B. K., 2009. SEER (Surveillance Epidemiology and End Results) Cancer Statistics Review, National Cancer Institute, Bethesda, 1975-2006.
- Huber, E., Heinemeyer, W. ve Groll, M., 2015. Bortezomib-resistant mutant proteasomes: structural and biochemical evaluation with carfilzomib and ONX 0914, *Structure*, 407–417.
- Inaba, T., Matsushime, H., Valentine, M., Roussel, M. F., Sherr, C. J. ve Look, A. T., 1992. Genomic organization, chromosomal localization, and independent expression of human cyclin D genes. *Genomics*, 13, 3, 565-574.
- Ishii, Y., Pirkmaier, A., Alvarez, J. V., Frank, D. A., Keselman, I., Logothetis, D. ve Germain, D., 2006. Cyclin D1 overexpression and response to bortezomib treatment in a breast cancer model, *Journal of the National Cancer Institute*, 98, 17, 1238-1247.
- Isomaki, H. A., Hakulinen, T. ve Joutsenlahti, U., 1978. Excess risk of lymphomas , leukemia and multiple myeloma in patient with rheumatoid arthritis, *Journal of chronic diseases*, 31, 11, 691- 96.
- Jeronimo, C., Collin, P. ve Robert, F., 2016. The RNA polymerase II CTD: the increasing complexity of a low-complexity protein domain, *Journal of molecular biology*, 428, 12, 2607–2622.
- Jung, L., Holle, L. ve Dalton, W. S., 2004. Discovery, Development, and clinical applications of bortezomib, *Oncology (Williston Park, New York)*, 18, 11, 4–13.
- Kaldis, P., Russo, A. A., Chou, H. S., Pavletich, N. P. ve Solomon, M. J., 1998. Human and yeast cdk-activating kinases (CAKs) display distinct substrate specificities, *Molecular biology of the cell*, 9, 9, 2545-2560.
- Kale, A. ve Moore, B., 2012. Molecular mechanisms of acquired proteasome inhibitor resistance, *Journal of medicinal chemistry*, 55, 23, 10317–10327.
- Kane, R. C., Dagher, R., Farrell, A., Ko, C. W., Sridhara, R., Justice, R. ve Pazdur, R., 2007. Bortezomib for the treatment of mantle cell lymphoma, *Clinical*

- cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research, 13, 1, 5291–5294.
- Kapse-Mistry, S., Govender, T., Srivastava, R. ve Yergeri, M., 2014. Nanodrug delivery in reversing multidrug resistance in cancer cells, *Frontiers in Pharmacology*, 1-22.
- Kastan, M. B. ve Bartek, J., 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer, *Nature*, 432, 316–323.
- Kirsch, D. G. ve Kastan, M. B., 1998. Tumor-suppressor p53: implications for tumor development and prognosis, *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 16, 9, 3158-68
- Kisselev, A. ve Goldberg, A., 2001. Proteasome inhibitors: from research tools to drug candidates, *Chemistry biology*, 8, 8, 739–758.
- Klug, W. S., Cummings, M. R. ve Spencer, C. A., 2011. Genetik Kavramlar, pp.434-456, in: Öner C. (Editor), Palme Yayıncılık, Ankara, Türkiye.
- Konrad, R. J., Kricka, L. J., Goodman, D. B., Goldman, J. ve Silberstein, L. E., 1993. Brief report: myeloma-associated paraprotein directed against the HIV-1 p24 antigen in an HIV-1-seropositive patient, *The New England journal of medicine*, 328, 25, 1817-1819.
- Krishan, A., Fitz, C. M. ve Andritsch, I., 1997. Drug retention, efflux and resistance in tumor cells, *Cytometry*, 279-85.
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Ståhlberg, A. ve Zoric, N., 2006. The real-time polymerase chain reaction, *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 2, 95-125.
- Kuehl, W. ve Bergsagel, P., 2002. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions, *Nat Rev Cancer*, 175–87.
- Kuhn, E., Bahadırli-Talbott, A. ve Shih, I., 2014. Frequent CCNE1 amplification in endometrial intraepithelial carcinoma and uterine serous carcinoma, *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology*, 27, 7, 1014-1019.
- Kumar, S., 2010. Multiple myeloma current issues and controversies, *Cancer Treatment Reviews*, 3-11.
- Kupperman, E., Lee, E. C., Cao, Y., Bannerman, B., Fitzgerald, M., Berger, A., Yu, J., Yang, Y., Hales, P., Bruzzese, F., Liu, J., Blank, J., Garcia, K., Tsu, C., Dick, L., Fleming, P., Yu, L., Manfredi, M., Rolfe, M. ve Bolen, J., 2010. Evaluation of the proteasome inhibitor MLN9708 in preclinical models of human cancer, *Cancer Research*, 70, 5, 1970–1980.
- Kyle, R. A. ve Greipp, P. R., 1980. Smoldering multiple myeloma, *New England Journal of Medicine*, 302, 24, 1347-1349.
- Kyle, R. A., Child, J. A., Anderson, K., Barlogie, B., Bataille, R., Bensinger, W., Bladé, J., Boccadoro, M., Dalton, W., Dimopoulos, M., Djulbegovic, B., Drayson, M., Durie, B., Facon, T., Fonseca, R., Gahrton, G., Greipp, P., Harousseau, J. L., Harrington, D. ve Wheatley, K., 2003. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related

- disorders: A report of the International Myeloma Working Group, *British journal of haematology*, 121, 5, 749-757.
- Kyle, R. A., ve Rajkumar, S. V., 2009. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma, *Leukemia*, 23, 1, 3-9.
- Kyle, R. A. ve Rajkumar, S. V., 2004. Multiple Myeloma, *The New England journal of medicine*, 351, 18, 1860-1873.
- Lag, R., Eisner, M. P. ve Kosary, C. R., 2002. SEER (Surveillance Epidemiology and End Results) Cancer Statistic Review, National Cancer Institute, Bethesda, 1973-1999.
- Lage, H., 2008. An overview of cancer multidrug resistance: a still unsolved problem, *Cellular and molecular life sciences*, 65, 20, 3145-3167.
- Landgren, O., Kyle, R. A., Pfeiffer, R. M., Katzmann, J. A., Caporaso, N. E., Hayes, R. B., Dispenzieri, A., Kumar, S., Clark, R. J., Baris, D., Hoover, R. ve Rajkumar, S. V., 2009. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study, *Blood*, 113, 5412-5417.
- Lara-Pezzi, E. ve Rosenthal, N., 2010. Genetic Enhancement of Cardiac Regeneration, In *Heart Development and Regeneration*, Academic Press., 981-997.
- Lara-Pezzi, E. ve Rosenthal, N. A., 2010. Genetic enhancement of cardiac regeneration, In N. Rosenthal, R. P. Harvey (Eds.), *Heart Development and Regeneration*, Academic Press, 1, 981-997
- LeBlanc, R., Catley, L., Hideshima, T., Lentzsch, S., Mitsiades, C., Mitsiades, N. ve Anderson, K. C., 2002. Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth in vivo and prolongs survival in a murine model, *Cancer research*, 62, 17, 4996–5000.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W. ve Vogelstein, B., 1998. Genetic instabilities in human cancers, *Nature*, 396, 643– 649.
- Lew, D. J., Dulić, V. ve Reed, S. I., 1991. Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast, *Cell*, 66, 6, 1197-1206.
- Lichtenstein, A., Tu, Y., Fady, C., Vescio, R. ve Berenson, J., 1995. Interleukin-6 inhibits apoptosis of malignant plasma cells, *Cell Immunol*, 248-255.
- LightCycler® Real-Time PCR System Application manual (Anonymous, 2016).
- Livak, K. J. ve Schmittgen, T. D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, *Methods*, 25, 4, 402-408.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. ve Darnell, J., 2000. Intracellular ion environment and membrane electric potential, In *Molecular Cell Biology*. 4th edition. WH Freeman.

- Lukas, J., Parry, D., Aagaard, L., Mann, D. J., Bartkova, J., Strauss, M. ve Bartek, J., 1995. Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16, *Nature*, 375, 6531, 503-506.
- Luo, Y., Hurwitz, J. ve Massagué, J., 1995. Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1, *Nature*, 375, 159-161.
- Ma, M. H., Yang, H. H. ve Parker, K., 2003. The proteasome inhibitor PS-341 markedly enhances sensitivity of multiple myeloma tumor cells to chemotherapeutic agents, *Clinical Cancer Research*, 9, 3, 1136-1144.
- Maes, A., Menu, E., Veirman, K., Maes, K., Vand Erkerken, K. ve De Bruyne, E., 2017. The therapeutic potential of cell cycle targeting in multiple myeloma, *Oncotarget*, 8, 52, 90501-90520.
- Mateos, M. V. ve Miguel, S. J. F., 2007. Bortezomib in multiple myeloma, *Best Practice ve Research Clinical Haematology*, 20, 701-15.
- Matsubayashi, H., Sato, N., Fukushima, N., Yeo, C. J., Walter, K. M., Brune, K., Sahin, F., Hruban, R. H. ve Goggins, M., 2003. Methylation of cyclin D2 is observed frequently in pancreatic cancer but is also an age-related phenomenon in gastrointestinal tissues, *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 9, 1446-1452.
- Matthews, W., Driscoll, J., Tanaka, K., Ichihara, A. ve Goldberg, A. L., 1989. Involvement of the proteasome in various degradative processes in mammalian cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 8, 2597-2601.
- Medema, R. H., Herrera, R. E., Lam, F. ve Weinberg, R. A., 1995. Growth suppression by p16ink4 requires functional retinoblastoma protein, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92, 14, 6289-6293.
- Mens, M. M. ve Ghanbari, M., 2018. Cell cycle regulation of stem cells by microRNAs, *Stem cell reviews and reports*, 14, 3, 309-322.
- Misiewicz-Krzeminska, I., Sarasquete, M. E., Vicente-Dueñas, C., Krzeminski, P., Wiktorska, K., Corchete, L. A., Quwaider, D., Rojas, E. A., Corral, R., Martín, A. A., Escalante, F., Báñez, A., García, J. L., Sánchez-García, I., García-Sanz, R., San Miguel, J. F. ve Gutiérrez, N. C., 2016. Post-transcriptional Modifications Contribute to the Upregulation of Cyclin D2 in Multiple Myeloma, *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 22, 1, 207-217.
- Mitsiades, C. S., Mitsiades, N., Munshi, N. C. ve Anderson, K. C., 2004. Focus on multiple myeloma, *Cancer Cell*, 6, 439-44.
- Mitsiades, N., Mitsiades, C. S., Richardson, P. G., Poulaki, V., Tai, Y. T., Chauhan, D. ve Anderson, K. C., 2003. The proteasome inhibitor PS- 341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic myeloma after one prior therapy, *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 101, 6, 2377-2380.
- MMRF., 2015. Multiple Myeloma Disease Overview, California, Multiple Myeloma Research Foundation.
- Morgan, D.O., 2007. The cell cycle principles of control (primers in biology), UK: New Science Press, London.

- Mutlu, P., Ural, A. ve Gündüz, U., 2014. Different Types of Cell Cycle- and Apoptosis-Related Gene Expressions Alter in Corticosteroid-, Vincristine-, and Melphalan-Resistant U-266 Multiple Myeloma Cell Lines, *Turk J Hematol.*, 231-238.
- Myung, J., Kim, K. B. ve Crews, C. M., 2001. The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors, *Medicinal research reviews*, 21, 4, 245–273.
- Nar, A., Ozen, O., Tutuncu, N. B. ve Demirhan, B., 2012. Cyclin A and cyclin B1 overexpression in differentiated thyroid carcinoma, *Medical oncology*, Northwood, London, England, 29, 1, 294–300.
- Nelson, D. L. ve Cox, M. M., 2005. *Lehninger Biyokimyanın Temelleri*. Palme Yayıncılık, Ankara, 469-474.
- Nowell, P. C., 1976. The clonal evolution of tumor cell populations, *Science*, 194, 23-28.
- Oerlemans, R., Franke, N. E., Assaraf, Y. G., Cloos, J., van Zantwijk, I., Berkers, C. R., Scheffer, G. L., Debipersad, K., Vojtekova, K., Lemos, C., van der Heijden, J. W., Ylstra, B., Peters, G. J., Kaspers, G. L., Dijkmans, B. A. C., Scheper, R. J. ve Jansen, G., 2008. Molecular basis of bortezomib resistance: proteasome subunit $\beta 5$ (PSMB5) gene mutation and overexpression of PSMB5 protein, *Blood*, 112, 6, 2489-2499.
- Orlowski, R., Stinchcombe, T., Mitchell, B., Shea, T., Baldwin, A., Stahl, S. ve Soignet, S. L., 2002. Phase I trial of the proteasome inhibitor PS-341 in patients with refractory hematologic malignancies, *Journal of Clinical Oncology*, 20, 22, 4420–4427.
- Özsan, G. H., 2008. Biology of multiple myeloma, *Türkiye Klinikleri Medical Oncology - Special Topics*, 1, 1, 5-8.
- Padar, A., Sathyanarayana, U. G., Suzuki, M., Maruyama, R., Hsieh, J. T., Frenkel, E. P., Minna, J. D. ve Gazdar, A. F., 2003. Inactivation of cyclin D2 gene in prostate cancers by aberrant promoter methylation, *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 9, 4730–4734.
- Pandit, S. R., 2005. Multiple myeloma: treatment options for an incurable disease, *The Journal of the Associations Physicians of India*, 53, 1060-4.
- Pink, M., Pien, C. S., Worland, P., Adams, J. ve Kauffman, M. G., 2002. PS-341 enhances chemotherapeutic effect in human xenograft models, *American Association for Cancer Research*, 43, 158.
- Pucci, B., Kasten, M. ve Giordano, A., 2000. Cell cycle and apoptosis. *Neoplasia* (New York, N.Y.), 2, 4, 291–299.
- Pulte, D., Jansen, L., Castro, F. A., Emrich, K., Katalinic, A., Holleczer, B. ve GEKID Cancer Survival Working Group., 2015. Trends in survival of multiple myeloma patients in Germany and the United States in the first decade of the 21st century, *British journal of haematology*, 171, 2, 189-196.
- Raab, M. S., Podar K., Breitkreutz, I., Richardson, P. G. ve Anderson, K. C., 2009. Multiple Myeloma, *Lancet*, 374, 9686, 324-339.

- Raff, M. J., 1996. Size control: The regulation of cell numbers in animal development, *Cell*, 86, 173-175.
- Rajagopalan, H. ve Lengauer, C., 2004. Aneuploidy and cancer, *Nature*, 432, 338– 341.
- Reincke, M., Theodoropoulou, M. ve Albani, A., 2019. Molecular Genetics of Cushing Disease, 205-214.
- Ren, S. ve Rollins, B. J., 2004. Cyclin C/cdk3 promotes Rb-dependent G0 exit, *Cell*, 117, 239–251.
- Richardson, P. G., Barlogie, B., Berenson, J. S., Singhal, S., Jagannath, S., Irwin, D., Rajkumar, V., Srkalovic, G., Alsina, M., Alexanian, R., Siegel, D., Orlowski, R. Z., Kuter, D., Limentani, S. A., Lee, S., Hideshima, T., Esseltine, D. L., Kauffman, M., Adams, J., Schenkein, D. P. ve Anderson, K., 2003. A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma, *New England Journal Of Medicine*, 348, 26, 2609-2617.
- Richardson, P. G., Hideshima, T. ve Anderson, K. C., 2003. Bortezomib (PS-341): a novel, first-in-class proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and other cancers, *Cancer control: journal of the Moffitt Cancer Center*, 10, 5, 361–369.
- Richardson, P. G., Sonneveld, P., Schuster, M. W., Irwin, D., Stadtmauer, E. A., Facon, T. ve Anderson, K. C., 2005. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma, *New England journal of medicine*, 352, 24, 2487-2498.
- Richardson, P., Sonneveld, P., Schuster, M., Irwin, D., Stadtmauer, E., Facon, T. ve Anderson, K. C., 2005. Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma, *New England journal of medicine*, 352, 24, 2487–2498.
- Riedel, D. A. ve Pottern, L. M., 1992. The Epidemiology of Multiple Myeloma, *Hematology/oncology clinics of North America*, 6, 2, 225-247.
- Roodman, G. D., 2009. Therapeutic Options in Multiple Myeloma: Focus on Bortezomib, *Clinical Medicine: Therapeutics*, 1, 495–503.
- Rosenthal, N. ve Harvey, R. P., 2010. Heart development and regeneration (Vol. 1). Academic Press., 998.
- Roussel, M. F., 1999. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer, *Oncogene*, 18, 38, 5311-5317.
- San Miguel, J., Schlag, R., Khuageva, N., Dimopoulos, M., Shpilberg, O., Kropff, M. ve Richardson, P. G., 2008. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma, *New England Journal of Medicine*, 359, 9, 906-917.
- San, M. J. F., Creixenti, J. B. ve Garcia-Sanz, R., 1999. Treatment of Multiple Myeloma, *Haematologica*, 84, 1, 36-58.
- Santo, L., Siu, K. T. ve Raje, N., 2015. Targeting Cyclin-Dependent Kinases and Cell Cycle Progression in Human Cancers, *Seminars in oncology*, 42, 788–800.
- Saraswathy, M. ve Gong, S., 2013. Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer, *Biotechnology Advances*, 1397-1407.

- Sartor, H., Ehlert, F., Grzeschik, K. H., Müller, R. ve Adolph, S., 1992. Assignment of two human cell cycle genes, CDC25C and CCNB1, to 5q31 and 5q12, respectively, *Genomics* (San Diego, Calif.), 13, 3, 911-912.
- Schenkein, D., 2002. Proteasome inhibitors in the treatment of B-cell malignancies, *Clinical lymphoma*, 3, 1, 49-55.
- Schmitt, S. M., Deshmukh, R. R. ve Dou, Q. P., 2014. Proteasome Inhibitors and Lessons Learned from Their Mechanisms of Action and Resistance in Human Cancer. In: Dou Q. (eds) *Resistance to Proteasome Inhibitors in Cancer. Resistance to Targeted Anti-Cancer Therapeutics*, Springer, Cham. 1-46.
- Schneider, U., Lessen, A. V., Huhn, D. ve Serke, S., 1997. Two subsets of peripheral blood plasma cells defined by differential expression of CD45 antigen, *British journal of haematology*, 9, 1, 56-64.
- Seidel, C., Hjertner, Ø., Abildgaard, N., Heickendorff, L., Hjorth, M., Westin, J. ve Børset, M., 2001. Serum osteoprotegerin levels are reduced in patients with multiple myeloma with lytic bone disease, *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 98, 7, 2269-2271.
- Senderowicz, A. M. ve Sausville, E. A., 2000. Preclinical and clinical development of cyclin-dependent kinase modulators, *Journal of the National Cancer Institute*, 92, 5, 376-387.
- Sewify, E. M., Afifi, O. A., Mosad, E., Zaki, A. H. ve El Gammal, S. A., 2014. Cyclin D1 amplification in multiple myeloma is associated with multidrug resistance expression, *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, 14, 3, 215-222.
- Shaffer, B. C., Gillet, J. P., Patel, C., Baer, M. R., Bates, S. E. ve Gottesman, M. M., 2012. Drug resistance still a daunting challenge to the successful treatment of AML, *Drug Resist Update*, 62-69.
- Shah, S. A., Potter, M. W., McDade, T. P., Ricciardi, R., Perugini, R. A., Elliott, P. J., Adams, J. ve Callery, M. P., 2001. 26S Proteasome inhibition induces apoptosis and limits growth of human pancreatic cancer, *Journal of cellular biochemistry*, 82, 1, 110-122.
- Sherr, C. J., 2000. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited, *Cancer research*, 60, 14, 3689-3695.
- Sherr, C. J. ve Roberts, J. M., 1995. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases, *Genes ve development*, 9, 10, 1149-1163.
- Sherr, C. J. ve Roberts, J. M., 1999. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression, *Genes ve development*, 13, 12, 1501-1512.
- Siegel, R. L., Miller, K. D. ve Jemal, A., 2015. Cancer statistics, *Cancer Journal for Clinicians*, 65, 1, 5-29.
- Sirohi, B. ve Powles, R., 2004. Multiple myeloma, *The Lancet*, 875-87.
- Sonneveld, P., De Schoester, M. ve Leeuw, K., 1994. Clinical modulation of multidrug resistance in multiple myeloma, *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 12, 8, 1584-1591.

- Suryadinata, R., Sadowski, M. ve Sarcevic, B., 2010. Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates, *Bioscience reports*, 17, 30, 4, 243-255.
- Sweeney, C., Murphy, M., Kubelka, M., Ravnik, S. E., Hawkins, C. F., Wolgemuth, D. J. ve Carrington, M., 1996. A distinct cyclin A is expressed in germ cells in the mouse, *Development*, 122, 1, 53-64.
- Tanaka, T., Ochi, H., Takahashi, S., Ueno, N. ve Taira, M., 2017. Genes coding for cyclin-dependent kinase inhibitors are fragile in *Xenopus*, *Developmental biology*, 426, 2, 291-300.
- Terpstra, W. E., Lokhorst, H. M., Blomjous, F., Th. Meuwissen, O. J. A. ve Dekker, A. W., 1992. Comparison of plasma cell infiltration in bone marrow biopsies and aspirates in patients with multiple myeloma, *British journal of haematology*, 82, 1, 46-49.
- Thanh-Truc Ngo, B., Felthaus, J., Hein, M., Follo, M., Wider, D., Ihorst, G. ve Wäsch, R., 2010. Monitoring bortezomib therapy in multiple myeloma: screening of cyclin D1, D2, and D3 via reliable real-time polymerase chain reaction and association with clinico-pathological features and outcome, *Leukemia & lymphoma*, 51, 9, 1632-1642.
- Tomida, A. ve Tsuruo, T., 2002. Drug resistance pathways as targets, *Anticancer drug development*, 77-90.
- Tsimberidou, A. M., Fountzilas, E., Nikanjam, M. ve Kurzrock, R., 2020. Review of precision cancer medicine: Evolution of the treatment paradigm, *Cancer treatment reviews*, 86, 102019.
- Tsubaki, M., Satou, T., Itoh, T., Imano, M., Komai, M., Nishinobo, M. ve Nishida, S., 2012. Overexpression of MDR1 and survivin, and decreased Bim expression mediate multidrug-resistance in multiple myeloma cells, *Leukemia research*, 36, 10, 1315-1322.
- Ulukaya, E., 2001. Hücre siklusu ve apoptozis. Akciğer Kanseri: Tanı ve tedavide temel ilkeler ve uygulamalar, Engin K ve Özyardımcı N (Editörler), Avrupa Tıp Kitapçılık Ltd. Şti. İstanbul, Türkiye, 26-38. (Kitapta Bölüm Yazarlığı)
- Van den Heuvel, S. ve Harlow, E., 1993. Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control, *Science*, 262, 5142, 2050-2054.
- Van Meerloo, J., Kaspers, G. J. ve Cloos, J., 2011. Cell sensitivity assays: the MTT assay, *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 731, 237-245.
- Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. ve Berneman, Z. N., 2003. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer, *Cell Prolif*, 36, 131- 49.
- Volm, M. ve Koomagi, R., 2000. Relevance of proliferative and pro-apoptotic factors in non-small cell lung cancer for patient survival, *British journal of cancer*, 82, 10, 1747-1754.
- Voorhees, P. M., Dees, E. C., O'Neil, B. ve Orlowski, R. Z., 2003. The proteasome as a target for cancer therapy, *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 9, 17, 6316-6325.

- Weinberg, R. A., 2014. The biology of cancer, Taylor and Francis Group, Garland Science, New York, USA
- Weiss, B. M., Abadie, J., Verma, P., Howard, R. S. ve Kuehl, W. M., 2009. A monoclonal gammopathy precedes multiple myeloma in most patients, Blood, 113, 5418-5422.
- Withers, D. A., Harvey, R. C., Faust, J. B., Melnyk, O., Carey, K. ve Meeker, T. C., 1991. Characterization of a candidate bcl-1 gene, Molecular and cellular biology, 11, 10, 4846-4853.
- Wolman, S. R., 1986. Cytogenetic heterogeneity: its role in tumor evolution, Cancer genetics and cytogenetics, 19, 1-2, 129-140.
- Wright, J. J., 2010. Combination Therapy of Bortezomib with Novel Targeted Agents: An Emerging Treatment Strategy, Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research, 16, 16, 4094-4104.
- Yague, E., Arance, A., Kubitza, L., O'Hare, M., Jat, P. ve Oglilvie, C. M., 2007. Ability to acquire drug resistance arises early during the tumorigenesis process, Cancer research, 67, 3, 1130-1137.
- Yang, R., Morosetti, R. ve Koeffler, H. P., 1997. Characterization of a second human cyclin A that is highly expressed in testis and in several leukemic cell lines, Cancer research, 57, 5, 913-920.
- Yıldız, A., 2005. Sürekli tıp eğitimi etkinlikleri hematolog olmayanlar için hematolojik maligniteler, Sempozyum dizisi, İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, 45, 249-262.
- Yokuş, B. ve Çakır, D. Ü., 2012. Kanser Biyokimyası, Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, Diyarbakır, 1, 7-18.
- Zaidi, A. A. ve Vesole, D. H., 2001. Multiple myeloma: an old disease with new hope for the future, CA: a cancer journal for clinicians, 51, 5, 273-285.
- Zheng, Q., Li, J. ve Wang, X., 2009. Interplay between the ubiquitin-proteasome system and autophagy in proteinopathies, International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology, 1, 2, 127-142.
- Zlamalikova, L., Moulis, M., Salek, D., Jarkovsky, J., Smarda, J. ve Smardova, J., 2016. Expression of D-type cyclins in mantle cell and diffuse large B-cell lymphomas, Oncology reports, 35, 2673-2680.
- Zong, W. X., Li, C., Hatzivassiliou, G., Lindsten, T., Yu, Q. C. ve Yuan, J., 2003. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis, The Journal of cell biology, 162, 1, 59-69.
- URL-1<<https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri/yillar/2016-yili-turkiye-kanser-i-istatistikleri.html>>Erişim Tarihi: 20.11.2020.
- URL-2<<http://www.cubocube.com/dashboard.php?a=1642&b=1691&c=1>>Erişim tarihi: 06.01.2021.
- URL-3<<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CCND1>>Erişim tarihi: 20.12.2020.
- URL-4<<https://slideplayer.biz.tr/slide/3092043/>>Erişim tarihi: 28.12.2020.

URL-5<<https://docplayer.biz.tr/2379260-Kisa-bir-incelemsi-multipl-miyelom-uluslararasi-miyelom-kurumu-2008-2009-baskisi-dr-brian-g-m-durie-tarafindan-haziirlanmistir.html>> Erişim tarihi: 18.02.2020.

URL-6 <http://thd.org.tr/THD_Halk/?sayfa=miyelom> Erişim tarihi: 15.02.2010.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Büşra DURSUN

EĞİTİM BİLGİLERİ (Kurum ve Yıl)

Lisans : Aksaray Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, 2010-2017

Yüksek Lisans : Aksaray Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, 2017-

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLERİ

1. Üsküdar Devlet Hastanesi/ Mikrobiyoloji Laboratuvarı / Yaz Stajı, İSTANBUL
2. Limit Eğitim Kurumları / Biyoloji Öğretmeni – 2018, AKSARAY
3. Çukuryurt İlköğretim Okulu / Fen Bilgisi Öğretmeni – 2020 / 2020, AKSARAY
4. 3M Rota Eğitim Kurumları / Biyoloji Öğretmeni - 2020, AKSARAY
5. Etkin Eğitim Kurumları / Biyoloji Öğretmeni – 2020 / 2021, AKSARAY

TEZDEN ÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER

Tez çalışması kapsamında yürütülen araştırma projesi:

1. “*Multiple Myeloma Kanseri Hücre Hatlarında Bortezomibe Karşı Gelişen Dirençlilikte Hücre Döngüsü Kontrolündeki Siklin Genlerinin Rolünün Araştırılması*” Aksaray Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, No: 2020-041.